

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA DENEYSEL KARACİĞER KANSER MODELİNDE
SİLYMARİN'İN KORUYUCU ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK
VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

(DOKTORA TEZİ)

Arş. Gör. Emin KARAKURT

Danışman
Prof. Dr. Serpil DAĞ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

2018-KARS

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA DENEYSEL KARACİĞER KANSER MODELİNDE
SİLYMARİN'İN KORUYUCU ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK
VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Arş. Gör. Emin KARAKURT
Patoloji Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Serpil DAĞ

Bu çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
desteklenmiştir. Proje No: 2016-TS-08

2018-KARS

TC
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Patoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Arş. Gör. Emin KARAKURT tarafından hazırlanmış olan “Ratlarda Deneysel Karaciğer Kanseri Modelinde Silymarin’in Koruyucu Etkisinin Histopatolojik ve Biyokimyasal Yöntemlerle Araştırılması” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmenliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile Kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/05/2018

Adı Soyadı:

Başkan: Prof. Dr. Enver BEYTUT

Üye: Prof. Dr. Serpil DAĞ

Üye: Doç. Dr. Kübra Asena TERİM KAPAKIN


Üye: Doç. Dr. Metin ÖĞÜN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZKARACA

İmza:

(Handwritten signatures in blue ink)

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10./5./18 gün ve 11/91 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Doç. Dr. Duygu KAYA
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Karaciğer kanseri kanser nedeni ölümlerde erkeklerde ikinci, kadınlarda altıncı sırada yer alır. Hepatoselüler Karsinom (HCC), karaciğerin primer malign tümörlerinin % 70-85'ini oluşturur ve dünya genelinde gözlenen kanser vakalarında beşinci sırada olup kansere bağlı ölüm sebeplerinde üçüncü sırada yer almaktadır. HCC erkeklerde kadınlardan daha sık görülmekte olup insidans oranı yaklaşık olarak 3:1'dir. HCC oldukça kötü bir prognoza sahiptir ve sıklıkla ilerlemiş safhalarda teşhis edilebilmektedir.

Dietilnitrozamin (DEN) birçok hayvan türünde başta karaciğer olmak üzere mide ve akciğer gibi çeşitli organlarda tümör oluşumuna neden olan önemli bir karsinojendir. DEN, sigara dumanında, çedar peynirinde, soya fasülyesinde, kürlenmiş ve kızartılmış yemeklerde, tuzlanmış ve kurutulmuş balıklarda, sigara dumanında, alkollü içeceklerde, kozmetik ürünlerde, tarımsal kimyasallarda bulunmaktadır. DEN bunlara ek olarak bazı ilaçların metabolizması sonucunda da üretilmektedir. Ratlarda DEN ile deneysel olarak oluşturulan HCC modeli, yaygın olarak bilimsel çalışmalarda kullanılmakta ve kabul görmektedir.

Karaciğer ve safra hastalıklarının tedavisinde 2000 yılı aşkın süredir kullanılmakta olan Silimarin, Silybum marianum bitkisinin tohumlarından ve meyvelerinden elde edilen bir polifenolik flavonoiddir. Önemli bir karaciğer koruyucu ve antioksidan olmasının yanı sıra Silimarin anti-enflamatuar, antifibrotik, anti-proliferatif, anti-metastatik, immunomodulator ve proapoptotik etki gösterir. Çeşitli kanser türlerinde koruyucu özelliklerinin olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmaktadır.

Karaciğer kanseri en yaygın kanser tiplerinden birisidir ve günümüzde kanser patogeneziye yönelik çalışmalar bu nedenle oldukça önem arz etmektedir. Yaptığımız bu çalışmada oluşturulan deneysel karaciğer kanser modelinde Silimarin'in koruyucu etkisi immunohistokimyasal ve biyokimyasal parametreler

vasıtasıyla araştırılmıştır. Yapılan literatür taramalarında deneysel karaciğer modelinde Silimarin'in koruyucu etkisinin araştırıldığı az sayıda in vivo ve in vitro çalışmanın mevcut olduğu gözlenmiştir. Yürüttüğümüz bu çalışmada detaylı olarak kullanılan markerlar vasıtasıyla hem DEN ile oluşturulan karaciğer kanser modelinin patogenezi yorumlanmış hem de Silimarin'in antihepatokarsinojenik kapasitesi bu markerların ekspresyon düzeyleri vasıtasıyla değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları karaciğer kanserinde Silimarin'in kullanılabilirliğine yönelik uygulamalara zemin teşkil edecektir ve elde edilen bulgular konuyla ilişkili diğer çalışmaların planlanmasına da olanak sağlayacaktır. Ayrıca ulaşılan verilerin literatüre katkı sağlayacağı ve faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince kıymetli bilgilerini aktaran, tecrübe ve görüşleriyle bana ışık tutan danışman hocam Prof. Dr. Serpil DAĞ'a, Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Enver BEYTUT ve Prof. Dr. Hasan ÖZEN'e, Prof. Dr. Musa KARAMAN'a, araştırma süresinde yardım ve desteklerinden dolayı Doç. Dr. Metin ÖĞÜN, Doç. Dr. Erol AYDIN, Uz. Dr. Ahmet Erkan BİLİCİ ve Arş. Gör. Hilmi NUHOĞLU'na; eğitim ve öğretim hayatımda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen canım annem, babam ve kardeşime, bu zorlu süreçte her zaman yanımda olan değerli eşim Esra'ya ve sevgili oğlum Yağız Ali'ye teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	III
SİMGELER ve KISALTMALAR	VII
ŞEKİL LİSTESİ	XIV
RESİM LİSTESİ	XV
TABLO LİSTESİ	XVIII
ÖZET	XIX
ABSTRACT	XX
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1. Karaciğer	1
1.1.1. Karaciğerin Yapısı	1
1.1.2. Karaciğer Hücreleri	4
1.1.2.1. Hepatositler	4
1.1.2.2. Kupffer Hücreleri	5
1.1.2.3. Ito Hücreleri	6
1.1.3. Karaciğerin Fonksiyonları	6
1.2. Kanser	9
1.2.1. Hücre Siklusu ve Kanser	10
1.2.2. Onkogenler ve Kanser	13
1.2.3. Tümör Süpresör Genler ve Kanser	17
1.2.4. Apoptozis ve Kanser	23
1.2.5. Telomer, Telomeraz ve Kanser	27
1.2.6. MikroRNA'lar ve Kanser	30
1.2.6.1. Tümör Süpresör MikroRNA'lar	30
1.2.6.2. Onkogenik MikroRNA'lar	31
1.2.7. Epigenetik ve Kanser	32
1.3. Karaciğerin Benign ve Malign Tümörleri	35
1.3.1. Primer Karaciğer Tümörleri	37
1.3.1.1. Hepatoselüler Tümörler	37
1.3.1.1.1. Sirotik Olmayan Karaciğerdeki Benign Lezyonlar	37

1.3.1.1.1.1. Hepatoselüler Adenom	37
1.3.1.1.1.2. Fokal Nodüler Hiperplazi	38
1.3.1.1.2. Sirotik Karaciğerdeki Benign Lezyonlar	40
1.3.1.1.2.1. Geniş Rejeneratif Nodül (Makrorejeneratif Nodül) - Düşük Dereceli Displazik Nodül	40
1.3.1.1.2.2. Yüksek Dereceli Displazik (Sınır Çizgisi) Nodül	40
1.3.1.1.3. Malign Hepatoselüler Tümörler	41
1.3.1.1.3.1. Hepatoselüler Karsinom (HCC)	41
1.3.1.1.3.2. Hepatoselüler Karsinomun Fibrolamellar Varyantı	45
1.3.1.1.3.3. Hepatoselüler ve Kolangiyolar Karsinom Kombinasyonu	45
1.3.1.1.3.4. Hepatoblastom	46
1.3.1.2. Safra Kanalı Tümörleri	47
1.3.1.2.1. Benign Safra Kanalı Tümörleri	47
1.3.1.2.1.1. Safra Kanalı Hamartomu	47
1.3.1.2.1.2. Safra Kanalı Adenomu	48
1.3.1.2.1.3. Hepatobiliyer Kistadenoması ve Kistadenokarsinoması	48
1.3.1.2.1.4. Basit Biliyer Kist	49
1.3.1.2.1.5. Diğer Nadir Benign Biliyer Tümörler veya Lezyonlar	50
1.3.1.2.2. Malign Safra Kanalı Tümörleri	50
1.3.1.2.2.1. Kolangiyokarsinom	50
1.3.1.3. Mezenkimal Tümörler	51
1.3.1.3.1. Benign Mezenkimal Tümörler	51
1.3.1.3.1.1. Hemangiyom	51
1.3.1.3.1.2. Angiyomyolipom	52
1.3.1.3.1.3. İnflamatuar Psödötümör	52
1.3.1.3.1.4. Mezenkimal Hamartom	53
1.3.1.3.1.5. İnfantil Hemangiyoendotelyom	54
1.3.1.3.2. Malign Mezenkimal Tümörler	54
1.3.1.3.2.1. Angiyosarkom	54
1.3.1.3.2.2. Epiteloid Hemangiyoendotelyom	55
1.3.1.3.2.3. Kaposi Sarkomu	56
1.3.1.3.2.4. Andiferansiye (Embriyonal) Sarkom	56

1.3.2.	Sekonder Karaciğer Tümörleri (Metastatik Tümörler)	57
1.4.	Nitrozaminler ve Dietilnitrozamin (DEN)	58
1.5.	Silimarin	62
1.5.1.	İçerik	64
1.5.2.	Farmakolojik Özellikler	65
1.5.3.	Etki Mekanizması	65
1.5.4.	Etkileri	66
1.5.4.1.	Antioksidan Etkileri	66
1.5.4.2.	Membran Stabilizasyonu Üzerine Etkileri	66
1.5.4.3.	Rejenerasyon ve Protein Sentezi Üzerine Etkileri	67
1.5.4.4.	Anti-Enflamatuvar ve İmmun Modülatör Etkileri	67
1.5.4.5.	Antifibrinojenik Etkileri	67
1.5.4.6.	Sitokrom p450 Üzerine Etkileri	67
1.5.4.7.	Anti-Proliferatif Etkileri	68
1.5.4.8.	Apoptoz Üzerine Etkileri	68
1.5.4.9.	Metastaz ve Angiyogenezis Üzerine Etkileri	69
1.5.4.10.	Kanser Üzerine Etkileri	69
1.5.4.11.	Sitoprotektif Etkileri	70
1.5.4.12.	Antibakteriyel ve Antiparaziter Etkileri	72
1.5.4.13.	Kemoterapi, İmmunoterapi ve Radyoterapi Üzerine Etkileri	72
1.6	Amaç	73
2.	MATERYAL VE METOT	74
2.1.	Deney Hayvanlarının Temin Edilmesi ve Bakımı	74
2.2.	Deney Grupları	74
2.3.	Deney Hayvanlarından Çalışılacak Örneklerin Alınması	75
2.4.	Yapılan Analiz ve İncelemeler	75
2.4.1.	Biyokimyasal Analizler	75
2.4.2.	Histopatolojik İncelemeler	75
2.4.3.	İmmunohistokimyasal İncelemeler	76
2.4.4.	TUNEL Metodu	77
2.4.5.	İstatistiksel Analizler	78
3.	BULGULAR	79

3.1. Ratların Vücut ve Karaciğer Ağırlıkları ile Karaciğer / Vücut Ağırlık Oranları _____	79
3.2. Biyokimyasal Bulgular _____	80
3.3. Makroskopik Bulgular _____	80
3.4. Histopatolojik Bulgular _____	84
3.5. İmmunohistokimyasal Bulgular _____	98
3.5.1. iNOS _____	98
3.5.2. Nitrotirozin _____	101
3.5.3. PCNA _____	104
3.5.4. GSTPi _____	108
3.5.5. MMP-9 _____	111
3.5.6. HPIP _____	114
3.6. TUNEL Bulguları _____	117
4. TARTIŞMA VE SONUÇ _____	121
5. KAYNAKLAR _____	148
6. ÖZGEÇMİŞ _____	171

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
μ	Mikron
3-NT	3-Nitrotirozin
6-OHDA	6-Hidroksi Dopamin
A	Adenin
A.phalloides	Amanita phalloides – Köygöçüren Mantarı
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABL	Abelson mürin lösemi viral onkogen homolog 1
AIDS	Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
Akt	Protein Kinaz B
ALP	Alkalen Fosfataz
ALT	Alanin Aminotransferaz
AML	Akut Miyeloid Lösemi
Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
APP	Amiloid Prekürsör Protein
AST	Aspartat Aminotransferaz
Asteraceae	Papatyagiller
AXIN1	Axis Inhibition Protein 1
Azadirachta indica	Yalancı Tespih Ağacı
Aβ	Amiloid Beta
Bad	BCL2 Associated Agonist of Cell Death – BCL2 Antagonisti
Bak	Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer – BCL-2 Antagonisti Öldürücü Hücre
BAX	Bcl-2-Associated X
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2 – B-Hücre Lenfoma Protein 2
Bcl-w	BCL2L2

VIII

Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large - Bcl-2 bağlantılı protein, uzun izoform
BCR	Breakpoint Cluster Region Protein – Kırılma Bölgesi
BH3	BCL2 Homology Region 3 - BCL2 Homolog 3 Alanı
Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist-BH3 Etkileşen Domine Sahip Ölüm Antagonisti
Bik	BCL2 Interacting Killer - Bcl-2 ile etkileşen katil
BNIP3	BCL2 Interacting Protein 3
Bok	Bcl-2 Related Ovarian Killer
Boo	BCL2L10
BUN	Kan Üre Nitrojeni
c-abl	Hücrel Abelson mürin lösemi viral onkogen proteini
C.elegans	Caenorhabditis elegans
c-erb	Hücrel östrojen reseptörü 2
c-K-ras	Hücrel Kirsten rat sarkomu viral onkogen homologu
c-myc	Hücrel Miyelositomatozis Onkogeni
Ca⁺⁺	Kalsiyum
CAD	Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz
CC	Kolangiyokarsinom
CCl₄	Karbon Tetraklorür
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A
cm	Santimetre
cNOS	Yapısal Nitrik Oksit Sentaz
CP	Siklofosamid
CpG	Sitozin-Fosfat-Guanin
Cyp	Sitokrom p450
Cyp2e1	Sitokrom P450 2E1
DAB	3,3-diaminobenzidin tetra hidroklorid
DEN	Dietilnitrozamin
DENA	Dietilnitrozamin
DHSB	2,3-dehidrosilibin

DISC	Death-Inducing Signaling Complex-Ölümü İndükleyen Sinyal Kompleksi
dk	Dakika
DMs	Double minutes
DNA	Deoksirübönükleik asit
DR5	Ölüm Reseptörü 5
dUTP	Deoksiüridin Trifosfat
E2F	Transkripsiyon Faktör (Elongation Factor II)
EBV	Epstein-Barr Virus
E-cadherin	Epithelyal kaderin
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
Endo-G	Endonükleaz G
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
ERK	Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz
ESM	Ekstrasellüler Matriks
Equiv.	Eş Değer
ERBB2 (HER2/neu)	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2
Fas	Fas Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptörü
FasL	Fas Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptör Ligandı
FB₁	Fumonisin B ₁
g	Gram
G	Guanin
G₀	Gap 0 – Boşluk 0
G₁	Gap 1 – Boşluk 1
G₂	Gap 2 – Boşluk 2
GADD45	The Growth Arrest and DNA Damage-Inducible 45
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon S-Transferaz
GSTPi	Glutasyon S-Transferaz Pi
H₂O₂	Hidrojen Peroksit

HCC	Hepatoselüler Karsinom
H&E	Hematoksilen & Eozin
HeLa	Henrietta and Lacks
Hep Par-1	Hepatosit Spesifik Antijen
HPIP	Hematopoietic PBX-Interacting Protein
Hrk	Harakiri, BCL2 Interacting Protein
HSRs	Homojen Boyanmış Bölgeler
hTER	İnsan Telomeraz RNA'sı
HTERT	İnsan Telomeraz Revers Transkriptazı
I/R	İskemi Reperfüzyon
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IFN-γ	İnterferon Gama
IHC	İmmunohistokimya
IHK	İmmunohistokimya
IL-1	İnterlökin-1
IL-1B	İnterlökin 1 Beta
IL-6	İnterlökin-6
IP	İntraperitoneal
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
Kaskad	Anayol Proteaz Dizisi
Kaspaz	Sistein Aspartat Spesifik Proteaz
KAÜ-HADYEK	Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogram
KLL	Kronik Lenfositik Lösemi
KML	Kronik Miyeloid Lösemi
KRAS	Kirsten rat sarkomu viral onkogen homolog
LDH	Laktat dehidrogenaz
LOH	Heterozigosite Kaybı
LPO	Lipid Peroksidasyonu
LPS	Lipopolisakkarit

M	Mitoz
M.Ö	Milattan Önce
M.S	Milattan Sonra
MAPK	Mitojen ile Aktive Edilen Protein Kinaz
Mcl-1	Myeloid Hücre Lösemisi
MDA	Malondialdehit
MDM2	Murine Double Minutes
Melazma	Cilt Lekeleri – Hiperpigmentasyon
mg	Miligram
miRNA	mikroRNA
ml	Mililitre
MMP	Matriks Metalloproteinazlar
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz-9
mol	mol
mRNA	Mesajcı RNA
MTX	Metotreksat
MYC	Miyelositomatozis Onkogeni
n-myc	Nöronal Miyelositomatozis Onkogeni
NaCl	Sodyum Klorür
NASH	Alkolik Olmayan Steatohepatit
NDEA	N-Nitrozodietilamin
NF-κB	Nükleer Faktör-Kappa B
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NO⁻	Nitrozil İyonu
NO₂⁻	Nitrit
NO₃⁻	Nitrat
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NOS2	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
Nrf2	Nükleer Faktör-Eritroid 2-ilışkili Faktör-2

NT	Nitrotirozin
p	İstatistiki p Değeri
p15	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2B
p16	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A
p18	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2C
p19	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2D
p21	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1A
p27	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1B
p57	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1C
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PBX	Pre-B Cell Leukemia Transcription Factor
PCNA	Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni
pH	Hidrojenin Gücü
PI3K	Fosfoinositid-3 Kinaz
POD	Peroksidaz
ppb	mikrogram/litre milyarda bir
pRb	Retinoblastoma Tümör Süpressör Proteini
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homolog
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptos
RAS	Rat Sarkoma Virus
Rb	Retinoblastoma Geni
RB2	Retinoblastoma Benzeri Protein 2
RNA	Ribonükleik asit
ROM	Reaktif Oksijen Metabolitleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPS	Rhizoma paridis saponins
S	Sentez
Smac	Mitokondri kökenli ikinci kaspaz aktivatörü
sn	Saniye
SNAC	S-Nitrozo-N-asetilsistein

SOA	Serum Oksidan Aktivite
SOD	Süperoksit dismutaz
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
STAT	Transkripsiyonun Sinyal İleticileri ve Aktivatörleri
STZ	Streptozotosin
T	Timin
TAA	Tiyoasetamid
TdT	Terminal deoksinükleotidil transferaz
TUNEL	TdT-dUTP nick-end-labelling
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNFR	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TOK	Total Oksidan Kapasite
TOS	Total Oksidan Kapasite
TP	Total Peroksid
TP 53	Tümör Protein 53
TRAIL	Tümör nekroz faktörü ilgili apoptozis indükleyici ligand
uPA	Ürokinaz Plazminojen Faktörü
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
α-hidroksilasyon	Alfa Hidroksilasyon
β-katenin	Beta Katenin
μmol	Mikromol
%	Yüzde

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1a. Klasik Lobül, Portal Lobül ve Karaciğer Asinusu _____	2
Şekil 1b. Karaciğer Asinusu. _____	2
Şekil 2. Hücre Siklus Düzenlenmesinde Siklinler, Siklin Bağımlı Kinazlar ve Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörlerin Rollerinin Şematik Görünümü _____	12
Şekil 3. Proto-Onkogenler ve Hücre Proliferasyonu _____	14
Şekil 4. Onkogenlerin Malign Transformasyondaki Rolü _____	15
Şekil 5. Tümör Süpresör Genlerin Görevleri _____	18
Şekil 6. Malign Transformasyon ve Tümör Süpresör Genler Arasındaki İlişki _____	19
Şekil 7. RB'nin G ₁ -S Kontrol Noktasını Düzenlenmesindeki Rolü _____	20
Şekil 8. Genom Bütünlüğünün Korunmasında p53'ün Görevi _____	22
Şekil 9. Apoptoz yolları _____	26
Şekil 10. Tetrahymena'da Telomer ve Telomeraz _____	28
Şekil 11. DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları _____	33
Şekil 12. RNA ile İndüklene Sessizleşme _____	34
Şekil 13. Karaciğerin Primer Tümörleri _____	37
Şekil 14. NO ₃ ⁻ dan Nitrozamin oluşumu _____	59

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Silybum marianum bitkisinin dış görünüşü _____	63
Resim 2. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu _____	81
Resim 3. Sham grubuna ait karaciğer dokusu _____	82
Resim 4. Silimarin grubuna ait karaciğer dokusu _____	82
Resim 5. DEN grubuna ait karaciğer dokusu, multifokal nodüller _____	83
Resim 6. DEN + Silimarin grubuna ait karaciğer dokusu, multifokal nodüller _____	83
Resim 7. Kontrol grubu, karaciğer dokusu _____	84
Resim 8. Sham grubu, karaciğer dokusu _____	85
Resim 9. Silimarin grubu, karaciğer dokusu _____	85
Resim 10. DEN grubu, karaciğer dokusu, atipik tümör hücreleri _____	86
Resim 11. DEN grubu, trabeküler ve asiner yapılar sergileyen tümör dokusu _____	87
Resim 12. DEN grubu, karaciğer dokusu, etrafı fibröz kapsülle çevrili kavern _____	88
Resim 13. DEN grubu, karaciğer dokusu, safra kanalı hiperplazisi _____	88
Resim 14. DEN grubu, hepatositlerde irili ufaklı yağ vakuolleri ve trabeküler yapılar _____	89
Resim 15. DEN grubu, tümör dokusu, çok sayıda mitoz, asiner yapılar ve hafif bağ doku artışı _____	89
Resim 16. DEN grubu, tümör dokusu, hepatositlerde yağ vakuolleri, hiyalin damlaları, çekirdekte pleomorfizm _____	90
Resim 17. DEN grubu, karaciğer dokusu, şeffaf sitoplazmalı hücreler _____	90
Resim 18. DEN grubu, karaciğer dokusu, soluk cisimcikler _____	91
Resim 19. DEN grubu, karaciğer dokusu, mitotik figürler _____	92
Resim 20. DEN grubu, akciğer dokusu, büyük resim: metastatik odak, küçük resim Hep Par-1 pozitif hücreler _____	93
Resim 21. DEN + Silimarin grubu, tümör dokusunda trabeküler ve asiner yapılar _____	94
Resim 22. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, megakaryosit ve trabekül yapısı _____	94
Resim 23. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, ince fibröz doku ile çevrili nodüler yapı, asiner yapılar ve hepatositlerde yağ vakuolleri _____	95
Resim 24. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, kanama alanı _____	95

Resim 25. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, safra kanalı hiperplazisi	___ 96
Resim 26. DEN + Silimarin grubu, şeffaf sitoplazmalı hücreler,	_____ 96
Resim 27. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, soluk cisimcikler, çekirdeklerde atipi, asiner yapı, trabeküler yapı	_____ 97
Resim 28. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, atipik tümör hücreleri, mitoz ve trabeküler yapılar	_____ 97
Resim 29. Kontrol Grubu, karaciğer dokusu, iNOS, IHK	_____ 99
Resim 30. Sham grubu, karaciğer dokusu, iNOS, IHK	_____ 99
Resim 31. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, iNOS, IHK	_____ 100
Resim 32. DEN grubu, karaciğer dokusu, iNOS, IHK	_____ 100
Resim 33. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, iNOS, IHK	_____ 101
Resim 34. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, Nitrotirozin, IHK	_____ 102
Resim 35. Sham grubu, karaciğer dokusu, Nitrotirozin, IHK	_____ 102
Resim 36. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, Nitrotirozin, IHK	_____ 103
Resim 37. DEN grubu, karaciğer dokusu, Nitrotirozin, IHK	_____ 103
Resim 38. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, Nitrotirozin, IHK	_____ 104
Resim 39. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, PCNA, IHK	_____ 105
Resim 40. Sham grubu, karaciğer dokusu, PCNA, IHK	_____ 106
Resim 41. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, PCNA, IHK	_____ 106
Resim 42. DEN grubu, karaciğer dokusu, PCNA, IHK	_____ 107
Resim 43. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, PCNA, IHK	_____ 107
Resim 44. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, GSTPi, IHK	_____ 109
Resim 45. Sham grubu, karaciğer dokusu, GSTPi, IHK	_____ 109
Resim 46. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, GSTPi, IHK	_____ 110
Resim 47. DEN grubu, karaciğer dokusu, GSTPi, IHK	_____ 110
Resim 48. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, GSTPi, IHK	_____ 111
Resim 49. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, MMP-9, IHK	_____ 112
Resim 50. Sham grubu, karaciğer dokusu, MMP-9, IHK	_____ 112
Resim 51. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, MMP-9, IHK	_____ 113
Resim 52. DEN grubu, karaciğer dokusu, MMP-9, IHK	_____ 113
Resim 53. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, MMP-9, IHK	_____ 114
Resim 54. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, HPIP, IHK	_____ 115

Resim 55. Sham grubu, karaciğer dokusu, HPIP, IHK _____	115
Resim 56. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, HPIP, IHK _____	116
Resim 57. DEN grubu, karaciğer dokusu, HPIP, IHK _____	116
Resim 58. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, HPIP, IHK _____	117
Resim 59. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, TUNEL metodu _____	118
Resim 60. Sham grubu, karaciğer dokusu, TUNEL metodu _____	119
Resim 61. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, TUNEL metodu _____	119
Resim 62. DEN grubu, karaciğer dokusu, TUNEL metodu _____	120
Resim 63. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, TUNEL metodu _____	120



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Oluşturulan Deney Grupları ve Özellikleri _____	74
Tablo 2. Primer Antikorlar ve Dilüsyon Oranları. _____	77
Tablo 3. Tüm Gruplara ait Son Vücut ve Karaciğer Ağırlıkları ile Karaciğer / Vücut Ağırlık Oranları _____	79
Tablo 4. Tüm gruplara ait AST, ALT, ALP aktiviteleri ve TOS seviyeleri _____	80
Tablo 5. Tüm gruplara ait ortalama iNOS pozitif hücre sayıları _____	98
Tablo 6. Tüm gruplara ait ortalama Nitrotirozin pozitif hücre sayıları _____	101
Tablo 7. Tüm gruplara ait ortalama PCNA pozitif hücre sayıları _____	105
Tablo 8. Tüm gruplara ait ortalama GSTPi pozitif hücre sayıları _____	108
Tablo 9. Tüm gruplara ait ortalama MMP-9 pozitif hücre sayıları _____	111
Tablo 10. Tüm gruplara ait ortalama HPIP pozitif hücre sayıları _____	114
Tablo 11. Tüm gruplara ait ortalama TUNEL pozitif hücre sayıları _____	118

ÖZET

Ratlarda Deneysel Karaciğer Kanseri Modelinde Silimarin'in Koruyucu Etkisinin Histopatolojik ve Biyokimyasal Yöntemlerle Araştırılması

Karaciğer kanseri, dünyada kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır. HCC, karaciğerin primer malign tümörlerinin %70-85'ini oluşturmaktadır. Bu çalışmada ratlarda DEN uygulaması yapılarak oluşturulan deneysel karaciğer kanseri modelinde, Silimarin'in koruyucu etkileri biyokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırıldı. Bu amaçla 50 adet Wistar Albino Cinsi erkek rat 10'arlı olarak 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki ratlara 20 hafta boyunca pelet yem ve içme suyu verildi. Sham grubundaki hayvanlara % 0.9 NaCl içerisinde çözdürülmüş propilen glikol intraperitoneal yolla haftada 3 kez olmak üzere 20 hafta boyunca verildi. DEN grubundaki hayvanlara 50 mg/kg dozunda haftada 1 kez olmak üzere 20 hafta boyunca DEN uygulaması yapıldı. DEN+Silimarin grubundaki ratlara DEN uygulamasından 1 hafta önce başlayacak şekilde 100 mg/kg dozunda haftada 3 kez olmak üzere 21 hafta boyunca intraperitoneal yolla Silimarin uygulandı. Silimarin grubundaki ratlara 100 mg/kg dozunda 20 hafta boyunca intraperitoneal yolla haftada 3 kez olmak üzere Silimarin uygulandı. 21 hafta sonunda hayvanların sistemik nekropsileri yapılarak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. DEN grubunda makroskopik olarak farklı büyüklük ve sayıda nodüler yapılar tespit edildi. DEN ile birlikte Silimarin uygulanan grupta da benzer durum hakimdi. Biyokimyasal parametrelere (ALT, AST, ALP ve TOS) göre DEN+Silimarin grubunda DEN grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi. Mikroskopik incelemeler sonucunda DEN ve DEN+Silimarin gruplarında HCC'nin trabeküler ve asiner paternini içeren miks tipi tespit edildi. iNOS, Nitrotirozin, PCNA, GSTP α , MMP-9, HPIP ve TUNEL boyamaları sonucunda DEN ve DEN+Silimarin grupları arasında istatistiksel karşılaştırmada anlamlı sonuç bulunamadı.

Anahtar Sözcükler: Biyokimya, DEN, HCC, immunohistokimya, karaciğer kanseri, Silimarin.

ABSTRACT**Investigation of Protective Effect of Silymarin in Experimental Liver Cancer Model in Rats by Histopathological and Biochemical Methods**

Liver cancer is the third most common cancer-related death in the World. HCC constitutes %70-85 of liver malignant primary tumors. In this study, in experimental liver cancer model that have formed by applying DEN to rats, the protective effects of Silymarin were investigated by biochemical and immunohistochemical methods. For this purpose, 50 Wistar Albino male rats were divided into 5 groups with 10 rats. The rats in the control group were fed pellet feed and drinking water for 20 weeks. Animals in Sham group were treated with propylene glycol dissolved in 0,9 % NaCl intraperitoneally 3 times a week for 20 weeks. Animals in DEN group received DEN at a dose of 50 mg/kg once a week for 20 weeks. The rats in the DEN +Silymarin group were Silymarin intraperitoneally for 21 weeks 3 times a week at a dose of 100 mg/kg, starting 1 week prior to the administration of DEN. Silymarin was administered to rats in the group of Silymarin 3 times a week intraperitoneally for 20 weeks at a dose of 100 mg/kg. At the end of 21 weeks, systemic necropsy of the animals was performed and blood and liver tissue samples were taken. Macroscopically different size and number of nodular structures were detected in the DEN group. A similar situation in the group treated with Silymarin with DEN. A statistically significant decrease was observed compared to the DEN+Silymarin group according to biochemical parameter (ALT, AST, ALP and TOS). As a result of microscopic examination, the type of mixture containing HCC trabecular and acinar pattern was determined in DEN and DEN+Silymarin groups. Statistically significant differences weren't found between the DEN and DEN+Silymarin groups as a result of iNOS, Nitrotyrosine, PCNA, GSTPi, MMP-9, HPIP and TUNEL staining.

Key Words: Biochemistry, DEN, HCC, immunohistochemistry, liver cancer, Silymarin

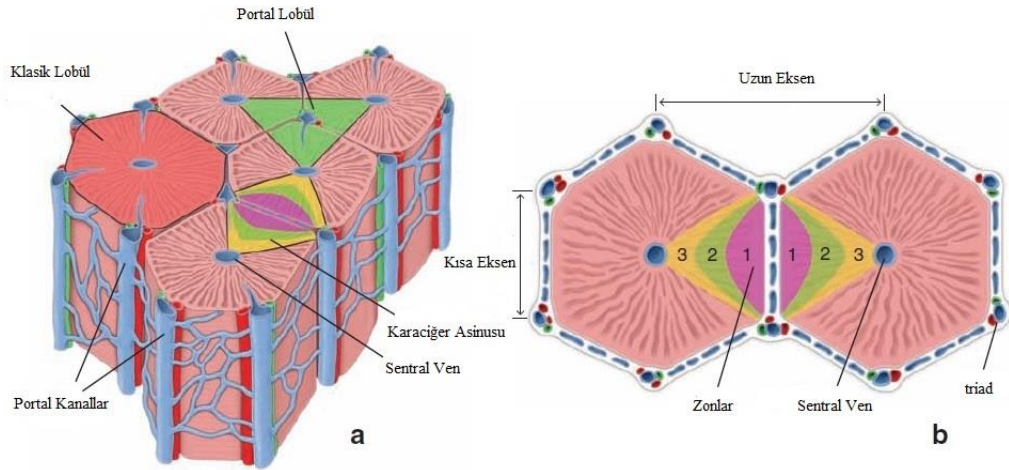
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1. Karaciğer

1.1.1. Karaciğerin Yapısı

Vücudun en büyük organı olan karaciğer karın boşluğunun sağ üst ve kısmen de sol üst bölümünde yer alır (Ross ve Pawlina 2016). Karaciğer, vücudun hemen hemen bütün sistemleriyle ilişkili olup önemli fonksiyonlara sahip bir organdır (Noyan 2011). Kanın filtrasyonu ve depolanması, karbonhidratların, proteinlerin, yağların, hormonların ve yabancı kimyasal maddelerin metabolizması, safra sentezi, demir ve vitaminlerin depolanması ile pıhtılaşma faktörlerinin yapımı ve detoksifikasyon gibi çeşitli görevleri yerine getirmektedir (Çavuşoğlu ve Yeğen 2007).

Karaciğer, kollagen ve elastik iplikler içeren bağ dokudan bir kapsülle çevrelenir (Tanyolaç 1993). Hilumda kalınlaşan ve Glisson kapsülü (kapsula fibroza) adı verilen bu yapıyı dış taraftan peritonun viseral yaprağı (kapsula seroza) sarar (Aytekin 1993). Bağ doku ile beraber karaciğere ait damar ve kanallar organın içine girerek lopları ve lopçukları oluşturur (Başımoğlu Koca 2012). Karaciğer lopçukları yapısal ve fonksiyonel özellikleri, safra ve kan akışının yönü göz önünde bulundurularak klasik hepatik lopçuk, portal lopçuk ve karaciğer asinusu olarak üç farklı biçimde değerlendirilir (Şekil 1 a-b) (Özer 2008).



Şekil 1a. Klasik Lobül, Portal Lobül ve Karaciğer Asinususu (Ross ve Pawlina 2016).

Şekil 1b. Karaciğer Asinususu (Ross ve Pawlina 2016).

1-Klasik Hepatik Lopçuk: Karaciğer parankimi hegzagonal şekilli lopçuklardan oluşmuştur (Başimoğlu Koca 2012). Bazı hayvanlarda (deve, domuz) bağ dokunun bol olması nedeniyle lopçuklar belirgin bir şekilde gözlenirken insan ve diğer hayvanlarda hegzagonal yapı belirgin değildir (Aytekin 1993). Her lopçuğun merkezinde sentral ven bulunur (Maxie 2016). Karaciğerin epitel hücreleri olan hepatositler merkezden perifere doğru yönelen kordonları oluştururlar (Gartner ve Hiatt 2014). Hepatositlerin oluşturdukları bu ışınsal dizilere Remark kordonları denir (Ergün 2012). Remark kordonları arasında karaciğer sinüzoidleri yer alır. Sinüzoidlerin duvarında tipik bir bazal membran yoktur ve endotel hücreleri aralarında az ya da çok açıklık mevcuttur. Hepatositler ve sinüzoidlerin arasındaki perisinüzoidal boşluğa Disse aralığı adı verilir (Mescher 2016). Bu aralıkta retiküler lifler ve hepatositlerin mikrovillusları yer alır. Kan sıvısı endotelial duvardan kolay bir şekilde geçer ve hepatosit yüzeyi ile temas eder. Böylece Disse aralığı makromoleküllerin sinüzoidal lumenle hepatositler arasındaki alışverişine imkan sağlar (Özer 2008, Ross ve Pawlina 2016). Birbirine komşu olan lopçuklar arasında Glisson üçgeni ya da Kiernan aralığı adı verilen alanda karaciğer üçlüsü olarak isimlendirilen Vena porta ile Arteria hepaticanın kolları ve Duktus biliferus yer almaktadır (Özer 2008).

Kan akışı hepatik lopçuğun periferinden merkezine doğru, safra akışı ise merkezden perifere doğrudur. Karaciğere kan, hepatik portal ven ile hepatik arter yoluyla gelir (Aytekin 1993). Karaciğerin fonksiyonel damarı olan vena porta sindirim sistemi, dalak ile pankreastaki kanı karaciğere getirir. Organın majör kan ihtiyacı (yaklaşık % 75 kadarı) hepatik portal ven ile karşılanır. Bu kanda oksijen miktarı düşük, besleyici madde miktarı ise yüksektir. Karaciğere taşınan portal kan; bağırsakta absorbe edilmiş toksik materyaller ile besin maddelerini, dalaktaki kan hücrelerinin yıkım ürünleri ve pankreas ile gastrointestinal kanaldaki enteroendokrin hücrelerden salınan hormonları içerir. Turuncus celiaca'nın bir dalı olan hepatik arter karaciğere gelen kanın % 25'ini taşır ve getirdiği bu kan oksijen yönünden zengindir (Krause 2005, Ross ve Pawlina 2016). Portal ven ve hepatik arter yolu ile gelen kan sinüzoidler vasıtasıyla vena sentralise iletilir. Vena Sentralis'ler birbirleriyle birleşerek sublobuler venaları, Sublobuler venalar da birleşerek Vena hepatikaları meydana getirir ve bunlar da Vena kava kavdalıs'e açılırlar (Tanyolaç 1993).

2-Portal Lopçuk: Bu modelde karaciğer üçlüsünün bulunduğu alan merkez olarak kabul edilir (Özer 2008). Klasik karaciğer lopçuğu poligonal olmasına karşın, portal lopçuk üç köşelidir ve birbirine komşu üç klasik lopçuğun vena sentralislerinin köşe olarak kabul edildiği üçgen şeklindeki alan portal lopçuğu oluşturur (Gartner ve Hiatt 2014). Portal lopçukta kan akış yönü merkezden perifere doğru iken, safra akış yönü periferden merkeze doğrudur (Aytekin 1993, Krause 2005).

3-Karaciğer Asinusu: Karaciğer asinusu komşu iki klasik lopçuk bölümünden oluşur ve klasik bir lopçuğun üçte biri büyüklüğünde olup baklava dilimi şeklindedir (Maxie 2016). Bu ünitenin uzak iki ucunda vena sentralisler bulunmakta olup asinusun merkezinde ise portal aralık yer alır (Gartner ve Hiatt 2014). Portal aralığı peri portal hepatositler çevirir (1.Bölge) ve bu bölgedeki hücreler damarlara yakın olması sebebiyle gelen kan, oksijen, besin, toksin ve safra kanalı tıkanmalarından ilk etkilenen bölgedir (Özer 2008, Ross ve Pawlina 2016). İkinci bölge (Mid Zonal) kana ikinci derecede yanıt veren bölgedir ve bu bölgedeki kan oksijen ve besin maddeleri bakımından da orta derecededir (Özer 2008, Ross ve Pawlina 2016). Üçüncü bölgedeki (Periasiner) hücreler ise oksijen yönünden en

yetersiz olan bölgedir ve bu bölgedeki hepatositler detoksifikasyon işleminde görev alırlar (Özer 2008, Ross ve Pawlina 2016).

1.1.2. Karaciğer Hücreleri

1.1.2.1.Hepatositler

Karaciğerin fonksiyonel hücreleri olup karaciğer dokusunda hücre popülasyonunun ortalama % 80'ini oluştururlar (Ross ve Pawlina 2016). Hepatositlerin sinüzoidal boşluğa bakan kısımlarında çok sayıda düzensiz mikrovillus bulunur. Bu şekilde temas yüzeyi artırılmış olup kanla maddeler arasındaki geçişe olanak sağlanır (Özer 2008). Hepatositlerin geniş, yuvarlak şekilli ve merkezde yer alan çekirdekleri vardır. Bazen iki çekirdekli hepatositlere rastlanabilir. Her çekirdekte bir ya da daha fazla sayıda çekirdekçik bulunabilir. Hepatositler metabolik olarak aktif hücrelerdir. Golgi aygıtı, lizozom, peroksizom, mitokondriyon ile granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum gibi organellere sahiptirler. Hepatositlerde çok sayıda 200 ile 300 arasında peroksizom vardır. Peroksizomlar fazla miktarda oksidaz enzimi içerirler ve oksidaz da hidrojen peroksit oluşumunu sağlar. Peroksizomlarda yer alan bir diğer önemli enzim katalazdır ve bu enzim hidrojen peroksidi yıkımlayarak oksijen ve su açığa çıkarır. Bu reaksiyonlar karaciğerde meydana gelen pek çok detoksifikasyon işlemlerinde yer alır. Ayrıca peroksizomlar yağ asitlerinin yıkımlanması ve pürin metabolizmasında yer alırlar. Hepatositler de 800 ile 1000 arasında mitokondri vardır (Ross ve Pawlina 2016). Hepatositlerin sitoplazmalarında granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulumlar oldukça yaygındır ve bunların metabolik aktiviteleri çeşitlilik gösterir. Granüllü endoplazmik retikulum plazma proteinlerinin sentezlenmesinde görev alır. Granülsüz endoplazmik retikulum toksinler ve ilaçların yıkımlanması ve konjugasyonunda yer alan enzimleri içerir. Bu enzimler; kolesterol ve safra tuzlarının sentezi, bilirubin, steroidler ve ilaçların glukronid ile konjugasyonu, glikojenin glukozaya parçalanması, yağ asitlerinin esterleştirilerek trigliseritlere dönüştürülmesi ve tiroid hormonlarından iyotun ayrılmasında görev alırlar (Özer 2008, Mescher 2016). Golgi aygıtı lizozomal enzim türlerinin yönlendirilmesi ve sentezlenen proteinlerin glikolizasyonunda görev yapar. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) ile yapılan incelemelerde, golgi

aygıtının üçü beşi bir arada bulunan irili ufaklı 50'ye yakın kesecik olduğu saptanmıştır. Golgi aygıtının bu ünitelerinin safra kanalcıklarının yakınına lokalize olanlarının safranin ekzokrin salgınımıyla alakalı olduğu sinüzoidal yüzeylere yakın konumda olanların ise çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL) ve diğer lipoproteinleri sentezlediği düşünülmektedir. Hepatosit lizozomları safra kanalcıklarının yakınına yoğunlaşmış konumdadırlar. Lizozomlar oldukça heterojen olup, TEM incelemelerinde normal lizozomal enzimlere ilaveten, pigment granülleri (lipofüskin), kısmen sindirilmiş sitoplazmik organeller ve myelin figürlerini içerirler. Lizozomların sayıları basit safra kanalı tıkanmalarından, viral hepatitler ve anemiye kadar değişen çeşitli patolojik durumlarda artabilir. Hepatosit lizozomları aynı zamanda demirin ferritin kompleksi olarak depolandığı bir alandır (Krause 2005, Ross ve Pawlina 2016).

1.1.2.2.Kupffer Hücreleri

Kupffer hücreleri mononükleer fagositik sisteme dahil olan hücreler olup fagositoz yönünden çok aktiftirler. Sinüzoidal endotel hücreleri arasında yer alırlar (Lee 2014, Mescher 2016). Fagositoz ve pinositoz yoluyla portal kandaki yabancı unsurları sitoplazmalarına alırlar, böylece kan ve karaciğer parankimi arasında bariyer oluşturan savunma sistemini şekillendirirler. Kandaki zararlı maddeleri, ölmüş ve yıpranmış eritrositleri fagosite ederler (Krause 2005). Eritrositler bu hücreler tarafından fagosite edildiklerinde, bu hücrelerin içinde hemolize uğrarlar ve hemoglobin ile birlikte diğer proteinler ve membran lipitleri katabolize edilirler. Hemoglobinden uzaklaştırılan demir bu hücrelerde ferritin ve hemosiderin şeklinde depolanır daha sonra plazmaya verilir bu bölgede apotransferrin ile birleşerek transferrin şeklinde taşınır. Transferrin kemik iliğine ulaşarak orada yeni hemoglobin sentezlenmesi amacıyla demiri bırakır (Yıldız 2008, Ross ve Pawlina 2016). Bu hücreler ayrıca yangının ayarlanması ve çeşitli sitokinlerin salgınımından (İnterlökin-6 (IL-6), Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)) sorumludur. (Maxie 2016).

1.1.2.3.Ito Hücreleri

Ito hücreleri perisinüzoidal alanda yer alan yağ ve vitamin A depolayan mezenkimal kökenli hücrelerdir (Gartner ve Hiatt 2014). Patolojik durumlarda miyofibroblastlara dönüşürler ve kollajen sentezlerler (Ross ve Pawlina 2016).

1.1.3. Karaciğerin Fonksiyonları

Karaciğerin endokrin ve ekzokrin olmak üzere çok sayıda fonksiyonu vardır. (Eroschenko 2008, Maxie 2016)

1-Plazma Proteinlerinin Sekresyonu: Albümin, fibrinojen ve protrombin gibi plazma proteinlerinin % 90'ı karaciğerde üretilmektedir (Çavuşoğlu ve Yeğen 2007, Noyan 2011). Bu karaciğerin önemli endokrin fonksiyonudur (Yıldız 2008).

2-Fötal Hayatta Kan Yapımı: Karaciğer fötal hayatın ilk yarısında alyuvar yapımından sorumludur ve hemopoizeis merkezidir (Yıldız 2008, Noyan 2011).

3-Safra Yapımı: Yağların sindiriminde önemli bir rol oynayan safra karaciğer hepatositleri tarafından üretilmektedir (Noyan 2011). Hepatositlerde yapılan safra intraselüler safra kanalcıkları vasıtasıyla ekstraselüler safra kanalcıklarına aktarılır (Eroschenko 2008). Duktus sistikus ile safra kesesine ulaştırılan safra burada yoğunlaştırılır ve duktus koledokus ile duodenumun başlangıç kısmına aktarılır (Ross ve Pawlina 2016).

4-Savunma Sistemine Katkıları: Hepatositlerin immun sistem içerisinde önemli katkıları vardır. İntestinal lamina propriadaki plazma hücreleri tarafından sentezlenen antikorlar (IgA) hepatositler tarafından kana alınır ve safra kanalcıkları ile safraya taşınır. Böylece antikorlar intestinal lumene giriş yaparlar ve burada intestinal bakteriyel florayı korurlar (Krause 2005, Eroschenko 2008).

5-Vitaminlerin Depolanması: A, D, K vitaminleri karaciğerde depolanır (Çavuşoğlu ve Yeğen 2007). Karaciğerde en fazla depo edilen A vitaminidir (Ross ve Pawlina 2016).

6-Karbonhidrat Metabolizmasındaki Fonksiyonlar: Karaciğer glikojeni depo eden ana organlardan birisidir (Krause 2005). Kan glukoz düzeyi yükseldiğinde, glukozun bir kısmı glikojene çevrilerek karaciğerde depo edilir. Kan glukoz düzeyi düştüğünde ise karaciğerdeki glikojen glukozu parçalanır (glikojenoliz) ve kana glukoz verilir. Buna karaciğerin glikoz tamponlanma işlevi adı verilir ve bu mekanizma sayesinde karaciğer, kan glukoz düzeyinin kontrol altında tutulmasında etkin rol oynar (Çavuşoğlu ve Yeğen 2007, Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 2008). Buna ilaveten karaciğer; amino asitler, yağlar ya da basit karbonhidratların glukozu çevrilmesi (glikoneogenez) olayında rol oynar (Yıldız 2008, Mescher 2016).

7-Yağ Metabolizmasındaki Fonksiyonlar: Enerji elde etmek amacıyla nötral yağlar gliserol ve yağ asitlerine ayrıştırılır. Takibinde yağ asitleri beta oksidasyon ile iki karbonlu asetil köklerine ayrılır. Oluşan ürünler de Asetil Koenzim A'yı meydana getirir. Asetil Koenzim A, sitrik asit döngüsüne katılarak okside olur ve fazla miktarda enerji elde edilir. Vücuttaki bütün hücrelerde beta oksidasyon yapılmasına karşın karaciğer hücrelerinde bu olay daha hızlı gelişmektedir. Karaciğer oluşan Asetil Koenzim A'nın tamamını kullanamaz, fakat iki molekül Asetil Koenzim A'nın birleşmesiyle meydana gelen asetoasetik asit çok kolay eriyen bir asittir ve karaciğer hücrelerinden hücre dışı sıvılara geçerek tüm vücuda taşınarak dokular tarafından emilirler. Dokular da asetoasetik asidi yeniden Asetil Koenzim A'ya dönüştürerek normal yoldan okside ederler. Bu sebeplerden ötürü, karaciğer yağ metabolizmasında merkezi bir görev üstlenmektedir. Karaciğer hücreleri aynı zamanda VLDL yapar ve salgırlar. VLDL'ler daha sonra diğer tür serum lipoproteinlerine dönüştürülürler. Bu lipoproteinler kolesterol ve trigliseritlerin başlıca kaynaklarıdır (Çavuşoğlu ve Yeğen 2007, Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 2008). Bunlara ilaveten karaciğer serum kolesterol seviyelerinin düzenlenmesine önemli görev üstlenir. Vücutta karbonhidrat ve proteinlerden yağ sentezi ağırlıklı

olarak karaciğerde yapılır. Karaciğerde sentezlenen yağ, daha sonra lipoproteinler içerisinde yağ dokusuna taşınarak depolanırlar (Ross ve Pawlina 2016).

8-Protein Metabolizmasındaki Fonksiyonlar: Plazma proteinlerinin sentezlenmesine ek olarak karaciğer bazı amino asitleri sentezler ve amino asitlerden önemli kimyasal bileşikleri meydana getirir. Karaciğerin, karaciğer dışındaki dokulara değişik tipte ve miktarda amino asit sağlanmasında önemli bir rolü vardır. Esansiyel olmayan amino asitlerin tamamı karaciğerde sentezlenmektedir. Amino asitlerin enerji için kullanılmadan ya da karbonhidrat veya yağlara dönüştürülmeden önce deaminasyonu gerekmektedir. Aminoasitlerin deaminasyonu birincil olarak karaciğerde meydana gelir. Proteinler yıkıldıklarında aminoasitler amonyak haline çevrilir (Çavuşoğlu ve Yeğen 2007). Amonyak çoğu dokuda parçalanamaz ve bu nedenle amonyak seviyeleri toksik oranlara kadar artış gösterebilir. Karaciğer, amonyağı üreye dönüştürerek zararsız hale getirir ve vücut sıvılarından uzaklaştırır (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 2008, Yıldız 2008).

9-Demirin Depolanması: Vücutta alyuvardaki hemoglobine ilave olarak, demirin en önemli depolandığı yer karaciğerdir (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 2008). Karaciğer demirin transferi ve metabolizmasında yer alan hemen hemen bütün proteinleri (transferin, haptoglobin ve hemopeksin gibi) sentezler. Demir, ferritin şeklinde karaciğerde depolanır. Karaciğer hücrelerinde fazla miktarda yer alan apoferritin adlı protein demirle az ya da çok miktarda birleşebilir. Vücut sıvılarında demir miktarının arttığı durumlarda, apoferritinle birleşerek ferritini meydana getirirler ve gerekli görülen durumlarda farklı bir yerde kullanılmak üzere hepatositlerde depo edilir (Çavuşoğlu ve Yeğen 2007, Ross ve Pawlina 2016).

10-İlaçlar, Hormon ve Diğer Maddelerin Uzaklaştırılması: Vücuda giren çeşitli ilaçlar, kimyasal toksik maddeler metabolize edilirler ve biyolojik değişikliklere maruz kalırlar. Fakat detoksifikasyon en çok karaciğerde gerçekleşir. Hepatositlerin sitoplazmasındaki düz endoplazmik retikulumda yer alan çeşitli enzim ve kofaktörler birçok kimyasal maddenin dönüşümünden sorumludur. İlaçlar, hormonlar ve diğer maddeler çoğunlukla hepatositlerde meydana gelen dönüşümlerle

etkisiz hale getirilir. Pek çok ilaç ve toksin suda çözünebilir formda değildir bundan dolayı böbreklerin sirkülasyonu vasıtasıyla etkili bir biçimde vücuttan elimine edilemezler (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 2008, Noyan 2011). Hepatositler bu tür maddeleri daha çözünebilir formlara dönüştürür ve yapılan bu işlemler faz 1 (oksidasyon) ve faz 2 (konjugasyon) olmak üzere iki aşamada meydana getirilir (Ross ve Pawlina 2016).

11-Lenf Üretimi: Karaciğer vücuttaki en büyük lenf üretim merkezidir (Maxie 2016).

1.2.Kanser

Yaşamın sürdürülmesi için hücrelerin sürekli yenilenmesi gerekmektedir. Yaşam süresini dolduran hücreler vücuttan uzaklaştırılırken, bunların yerine yeni hücreler getirilir. Oluşturulan bu hayati denge belirli genlerin kontrolündedir. Bu genlerin bazıları hücrelerin bölünüp çoğalmasını sağlarken, bazıları kontrolsüz hücre çoğalmasını engeller (Aliustaoğlu 2009). Kanser olgularında ise organizmadaki hücrelerden herhangi biri sözü edilen kontrol mekanizmalarının etkisinde kalmadan sınırsız olarak çoğalma özelliği kazanır. Oluşan yeni hücreler komşu dokulara ve uzak bölge organlarına yayılabilirler (Erer ve Kıran 2009).

Kanser hem dünyada hem de ülkemizde %22'lik oran ile insanlarda ölüm sebepleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır (Tuncer ve ark. 2009).

Kanserlerin % 10-15'inin kalıtsal, % 85-90'ının ise canlı hücre DNA' sının, mutajenlere maruz kalması sonucunda DNA' daki ilerleyici değişiklikler ve replikatif hatalar sonucu olduğu düşünülmektedir (Yokuş ve Çakır 2012). Buna ek olarak epigenetik değişiklikler de söz konusudur. Genetik ve epigenetik değişiklikler; hücrelerin büyüme, hayatta kalma ve yaşlanma gibi temel süreçlerini düzenleyen, genlerin salınımında veya fonksiyonunda değişikliklere sebep olur. Meydana gelen

bu genetik değişiklikler kalıtsal olup yavru hücelere aktarılır. Mutasyonların birikmesiyle kanser bir dizi karakteristik özellik kazanır. Bunlar;

- 1-Kanser hücelerinin büyüme sinyallerinden ayrı olarak bağımsız ve fizyolojik kurallara uymaksızın çoğalması
- 2-Büyüme inhibitörü sinyallere yanıt vermezler
- 3-Apoptozu gerektiren koşullarda dahi yaşamaya devam etmeleri
- 4-Sınırsız çoğalma kapasiteleri nedeniyle kanser hücelerinin ölümsüz olması
- 5-Anjiyogenez geliştirmeleri
- 6-Dokuları istila etmeleri ve uzak bölgelere yayılma yetenekleri
- 7-Metabolik yolları tekrar programlamaları
- 8-Bağışıklık sisteminden kurtulma yetenekleridir (Kumar ve ark. 2013)

1.2.1. Hücre Siklusu ve Kanser

Kanser oluşumuna neden olan mutajenlerin büyük bir kısmı, etkilerini hücrenin mutasyonlara karşı daha kırılgan oldukları hücre siklusu esnasında gösterir. Bu sebepten dolayı, kanseri ve kanser oluşumunu anlayabilmek için ilk olarak normal hücre siklusu ve regülasyonu incelenmelidir. (Aliustaoğlu 2009).

Hücre siklusu; prolifer olmak için etkinleştirilmiş bir hücrede meydana gelen ve bir dizi biyokimyasal olaylar ile morfolojik değişikliklerin gözleendiği bir süreçtir. Hücrenin siklusu, morfolojik ve genetik yönden birbirine tıpatıp benzeyen iki hücre oluşumuyla sonuçlanır (Boyle ve Levin 2008).

Vücuttaki hücelerin büyük bir kısmı Gap 0 (G_0) adı verilen dinlenme safhasındadır (Aliustaoğlu 2009). Bu hüceler normal şartlar altında bölünmezler fakat uygun bir uyarım aldıklarında hücre siklusuna girerler (Vermeulen ve ark. 2003a). Hüceler bu aşamada spesifik bir fonksiyonu yerine getirmek üzere programlanırlar (Lowitz ve Casciato 2000).

Hücre siklusu dört aşamada gerçekleşir (Cassidy ve ark. 2002). Bunlar; Sentez (S) aşaması: DNA replikasyonu, kromom duplikasyonu, RNA ve protein

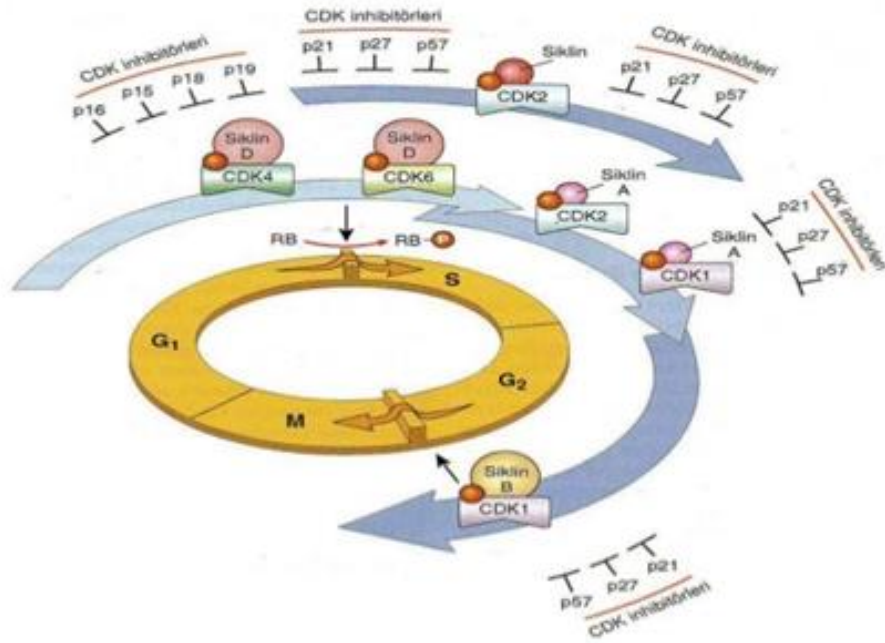
sentezinin gerekleŖtiđi safhadır. Gap 2 (G_2) aŖaması: S ile Mitoz (M) aŖamaları arasında yer alır. DNA replikasyonunun olmadığı fakat RNA ve protein sentezinin devam ettiği aŖamadır. M aŖaması: Mitoz ve sitokinezin gerekleŖtiđi aŖamadır. Gap 1 (G_1) aŖaması: M ile S aŖamaları arasında yer alır. İlk bölünmede oluŖan eŖ hücrelerin tekrar hücre bölünmesine girmeden önce S aŖamasına hazırlandığı safhadır. DNA replikasyonu gerekleŖmez fakat RNA ve protein sentezi devam eder (YokuŖ ve akır 2012).

Hücre siklusunda bir aŖama tamamlanmadan bir sonraki aŖamaya geilirse genetik materyal düzgün ve eksiksiz bir Ŗekilde kopyalanmadığı iin hücrede hasar oluŖabilir (Cabadak 2008). Hücre siklusunda G_1 -S, G_2 -M ve metafaz-anafaz geiŖlerinde kontrol noktaları mevcuttur ve bu kontrol noktalarının fonksiyonları sayesinde siklusun devam edip etmeyeceğine karar verilir. Kontrol noktaları hücresel koŖullar sağlanana kadar geiŖleri erteleyebilir (PazarbaŖı ve Kasap 2003).

Hücre siklusunun ilerleyiŖi siklinler, siklin bağlı kinazlar ve siklin bağlı kinaz inhibitörleri tarafından düzenlenir (Vermeulen ve ark. 2003a). Bu proteinlerin seviyeleri hücre siklusunun farklı safhalarında deđiŖkenlik gösterir (Cabadak 2008). Örneğin G_1 'den S fazına geiŖte siklin D, G_2 'den M fazına geiŖte siklin B'ler baskındır (Yetim ataroğlu 2008).

Siklin bağlı kinazlar normalde inaktif halde bulunurlar fakat sikline bağlandıklarında aktif hale gelirler ve bu sayede aktif siklin - siklin bağlı kinaz kompleksleri oluŖur. Siklinler regülatör, siklin bağlı kinazlar ise katalitik olarak bu kompleks ierisinde faaliyet gösterirler (Longo 2008). Siklin bağlı kinazlar siklinlerle interaksiyon sonucu aktifleŖirken, siklin bağlı kinaz inhibitörleri ile interaksiyon yapmaları durumunda inhibe olurlar (Yetim ataroğlu 2008). Siklin bağlı kinazların aktif formları substratları fosforile ederek onları aktive eder. Bunun sonucunda hücre siklusu ya engellenir ya da bir sonraki aŖamaya ilerler (Ekmeki ve ark. 2008).

Siklin proteinleri arasında siklin A,B,C,D ve siklin bağılı kinaz proteinleri arasında ise Siklin Bağılı Kinaz (CDK) 1,2,3,4,5,6 yer almaktadır. G₁ fazının orta ve son aşamalarında Siklin D-CDK4 kompleksi ve Siklin D-CDK 6 ile kompleksi, son aşamalarında ise Siklin E-CDK2 kompleksi ve S fazında Siklin A - CDK 2 kompleksi görev almaktadır (Yokuş ve Çakır 2012). Çok sayıda Siklin Bağılı Kinaz inhibitör ailesi bulunmaktadır. Bunlar; Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1A (p21), Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1B (p27), Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1C (p57) adı verilen üç proteinden oluşan bir aile olup siklin bağılı kinaz enzimlerinin çoğunluğunu inhibe ederler (Sherr ve McCormick 2002). Geri kalan inhibitör aileler ise selektif olarak siklin CDK4 ile siklin CDK6 üzerinde etki gösterir. Bu ailenin üyeleri Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2B (p15), Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A (p16), Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2C (p18) ve Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2D (p19)'dur (Şekil 2) (Kumar ve ark. 2009)



Şekil 2. Hücre Siklus Düzenlenmesinde Siklinler, Siklin Bağımlı Kinazlar ve Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörlerinin Rollerinin Şematik Görünümü (Tuzlalı ve ark. 2013).

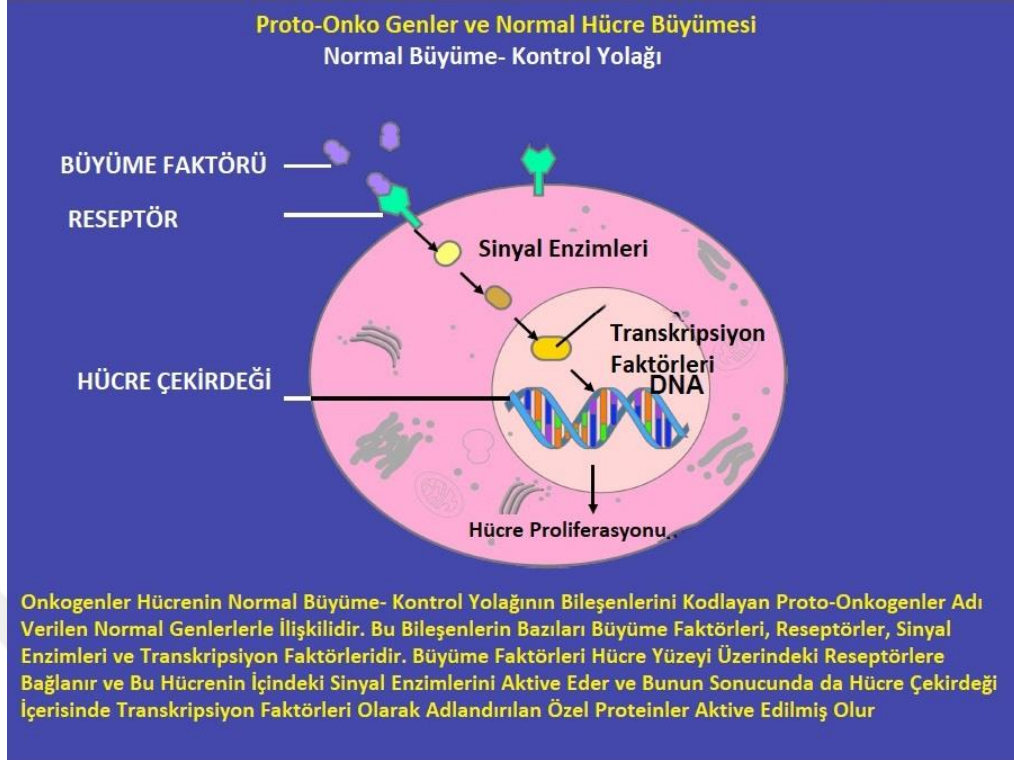
Siklinler ve Siklin Bağılı Kinaz enzimlerinin aktivitelerinde bozukluklara neden olan mutasyonlar kanser gelişiminde etkili olmaktadır. Meme, özofagus ve karaciğer kanserlerinde, Siklin D'nin aşırı salındığı, melanom, sarkom ve

glioblastomlarda CDK4 geninin çoğaldığı, pankreas, glioblastomlar, özofagus kanserlerinde ise p16 geninde mutasyonlarına rastlanmıştır (Kumar ve ark. 2013).

Hücre siklusunun her aşaması spesifik genlerin denetimindedir. Protoonkogenler hücre bölünmesi, gelişmesi ve farklılaşmasını düzenlerken, tümör süpresör genler apoptozisi düzenler. Tüm bu biyolojik faaliyetler özgün genlerin koordineli bir şekilde çalışmasıyla kontrol edilir (Vermeulen ve ark. 2003a). Söz konusu genlerde düzensizliklere yol açabilecek mutasyonlar, bu genlerin denetimi altındaki biyolojik faaliyetleri etkileyerek kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açarlar (Oğur 2005).

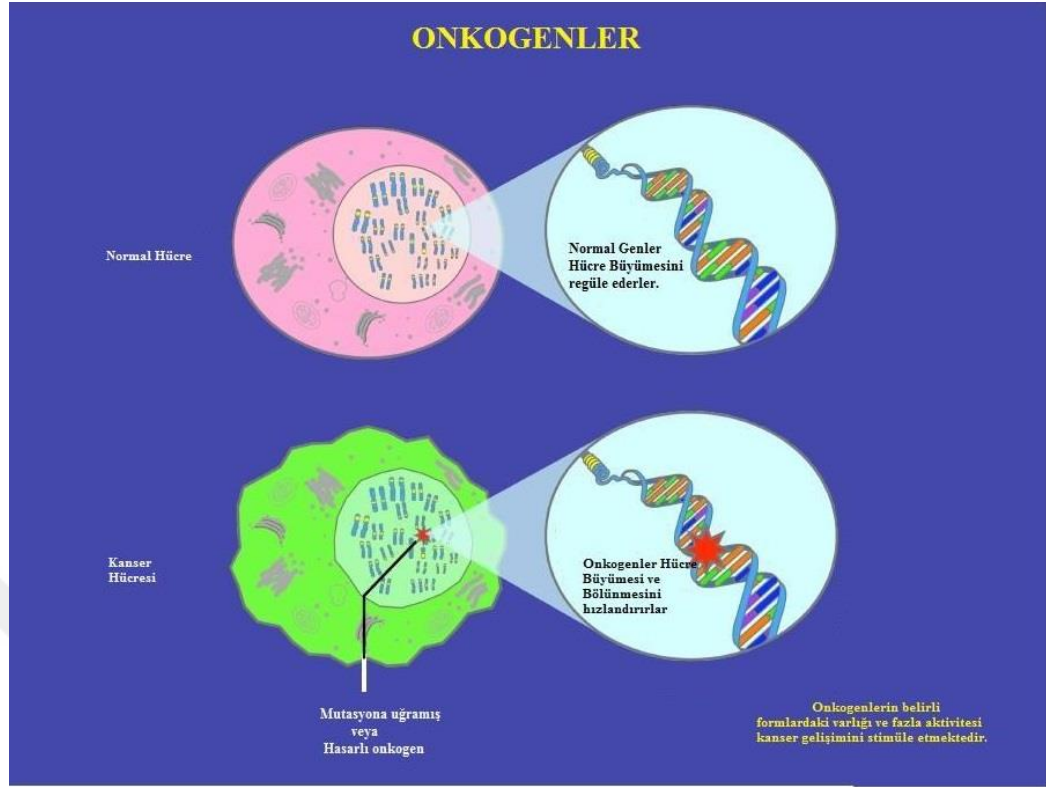
1.2.2. Onkogenler ve Kanser

Protoonkogenler hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan genlerdir (Çefle 2009). Protoonkogenler büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, tirozin kinaz inhibitörleri, sinyal ileticileri ve transkripsiyon faktörleri gibi hücre fonksiyonları düzenleyen çeşitli proteinleri kodlarlar (Şekil 3). Protoonkogenlerdeki mutasyon; büyüme faktörlerinin fazla üretimine, transkripsiyon faktörlerinin fazla sentezlenmesine ve hücre bölünmesinin kontrol edilememesine neden olmaktadır (Longo 2008). Onkogenler protoonkogenlerin mutant biçimleridir (Weinberg 1994).



Şekil 3. Proto-Onkogenler ve Hücre Proliferasyonu (<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch10D2.htm>) (Erişim tarihi 29.09.2017).

Onkogenler; otozomal dominant etki göstermekte olup kanser oluşumunun pozitif regülatörleridir (Devi 2005). Onkogenlerin malign transformasyon yapabilmesi için genin tek alelindeki mutasyon yeterli olmaktadır (Şekil 4) (Cassidy ve ark. 2002). Aktivasyon mekanizmalarının başlıcaları; nokta mutasyonu, kromozomal yeniden düzenlemeler ile gen amplifikasyonudur (Çefle 2009).



Şekil 4. Onkogenlerin Malign Transformasyondaki Rolü (<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch10D2.htm>) (Erişim tarihi 29.09.2017).

Nokta mutasyonları; Rat Sarkoma Virus (RAS) protoonkogeni hücre proliferasyonunda görev alan p21 isimli bir proteini kodlamaktadır (Çefle 2009). RAS protoonkogeninin spesifik kodonlarında (12, 13 veya 61) meydana gelen mutasyonların etkisiyle protein sürekli olarak aktif halde kalmakta olup devamında hücreyi çoğalma yönünde etkileyen sinyal yolu sürekli olarak açık tutulmaktadır (Longo 2008, Telkoparan ve Tazebay 2011). Ras genlerinde aktivasyona yol açan mutasyonlar insanlarda kanser vakalarının % 30'unda görülmektedir ve bu oran spesifik kanser tiplerinde daha da artmaktadır (Telkoparan ve Tazebay 2011). Örneğin pankreas kanserlerinin % 85'inde kolon kanserlerinin % 50'sinde ras mutasyonları mevcuttur (Kumar ve ark. 2013).

Kromozomal yeniden düzenlemeler onkogen aktivasyon mekanizmalarından bir diğeridir (Weinberg 1994). Kromozomal yeniden düzenlemeler etkilerini iki şekilde göstermektedir. Birincisi; kromozom kırık noktalarındaki 2 gen arasında spesifik DNA bölgeleri füzyonu sonucu kimerik proteinler oluşturmak ikincisi ise

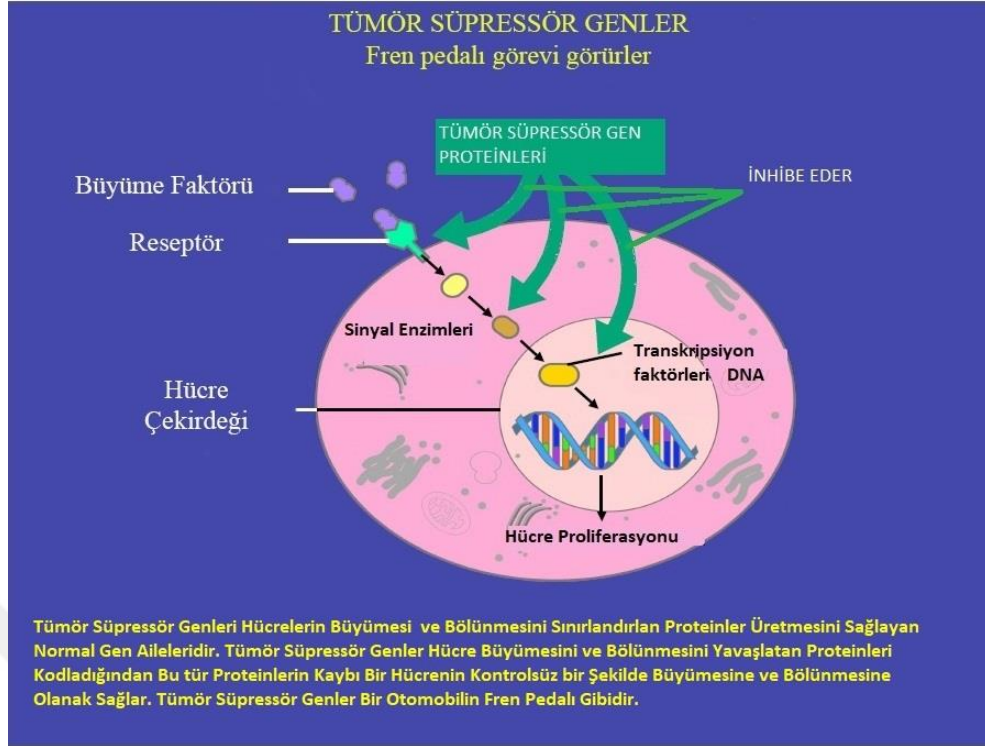
aktif gene, örneğin immunglobulin genlerine bitişik lokalize olan genin aktivasyonu ile ilgili proteinin aşırı yapımına neden olurlar. Her iki şekilde de protoonkogenler, mutasyon sonucu onkogen haline dönüşürler. Kromozomal yeniden düzenlemeler pek çok kanser vakasında belirlenmiştir (Longo 2008). Burkitt lenfomasında görülen t(8;14) translokasyonunda, kromozom 8q24'te bulunan Miyelositomatozis Onkogeni (MYC) kromozom 14q32'de bulunan immunglobulin ağır zincir mevkisinin distaline lokalize olmaktadır. MYC bu yeni bölgede, transkripsiyon artırıcı bazı dizilerin etkisi altında kalır ve ekspresyonu artar. MYC 'nin kendisi de bir transkripsiyon faktörüdür ve hücre çoğalmasında görevli bazı genlerin ekspresyonu üzerinde etkilidir. Tüm bu olayların etkisiyle hücrede aşırı çoğalma eğilimi ortaya çıkmaktadır. Akut ve kronik lösemilerde kromozomal translokasyonlara sıklıkla rastlanılmaktadır. Örneğin kronik miyelösiter lösemide (KML), kromozom 9 ile 22 arasında gelişen ve Philadelphia kromozomu oluşumu ile sonuçlanan t(9;22) translokasyonunda, Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (ABL) geni, kromozom 22q'da yer alan " breakpoint cluster region" (BCR) geniyle birleşmektedir. Oluşan kimerik genden tirozin kinaz aktivitesi yüksek bir füzyon proteini sentezlenmektedir ve KML gelişimindeki temel rolü bu artmış protein kinaz aktivitesi üstlenmektedir (Çefle 2009).

Gen amplifikasyonu; Kanser oluşumunda bazen bir DNA segmenti çoğalır ve o segment içinde yer alan bir protoonkogenin yüzlerce yeni kopyası genoma eklenmektedir (Çefle 2009). Basit ökaryotik canlıların gelişimi için programlı biyolojik bir olay olan gen amplifikasyonu, memelilerde kontrol dışı bir bozukluktur. Replikasyon alan DNA, mikroskop altında iki karyotipik anormallik-çift nokta kromozom (DMs= Double minutes) ve homojen boyanmış bölgeler (HSRs=Homogeneous staining regions) olarak gözlenir. İnsan tümörlerinde, gen amplifikasyon olgularının büyük bir çoğunluğu (%95) DMs, geri kalan kısmı ise HSRs'dir. En fazla amplifiye olan onkogenler Hücrel Miyelositomatozis Onkogeni (c-myc), Hücrel Abelson mürin lösemi viral onkogen proteini (c-abl) , Hücrel östrojen reseptörü 2 (c-erbB), Hücrel Kirsten rat sarkomu viral onkogen homologu (c-K-ras) ve Murine Double Minutes (MDM2)'dir (Pazarbaşı ve Kasap 2003). MYC, siklin D1, Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR) ve RAS gibi protoonkogenlerin küçük hücreli

akciğer kanseri, meme, özofagus, serviks ve over kanserinde amplifiye oldukları saptanmıştır. Bir epidermal büyüme faktörü reseptörü olan İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2 (ERBB2-HER2/neu) meme kanserlerinde ve ayrıca akciğer, over ve tükürük bezi adenokarsinomlarının % 25-30'unda amplifiye olduğu tespit edilmiş olup bu durum da meme kanserlerinde kötü prognoza işaret etmektedir. Kötü prognoza işaret eden bir diğer gen amplifikasyon örneği ise nöroblastoma vakalarında görülen Nöronal Miyelositomatozis Onkogeninin (n-myc) amplifikasyonudur (Longo 2008, Kumar ve ark. 2013).

1.2.3. Tümör Süpresör Genler ve Kanser

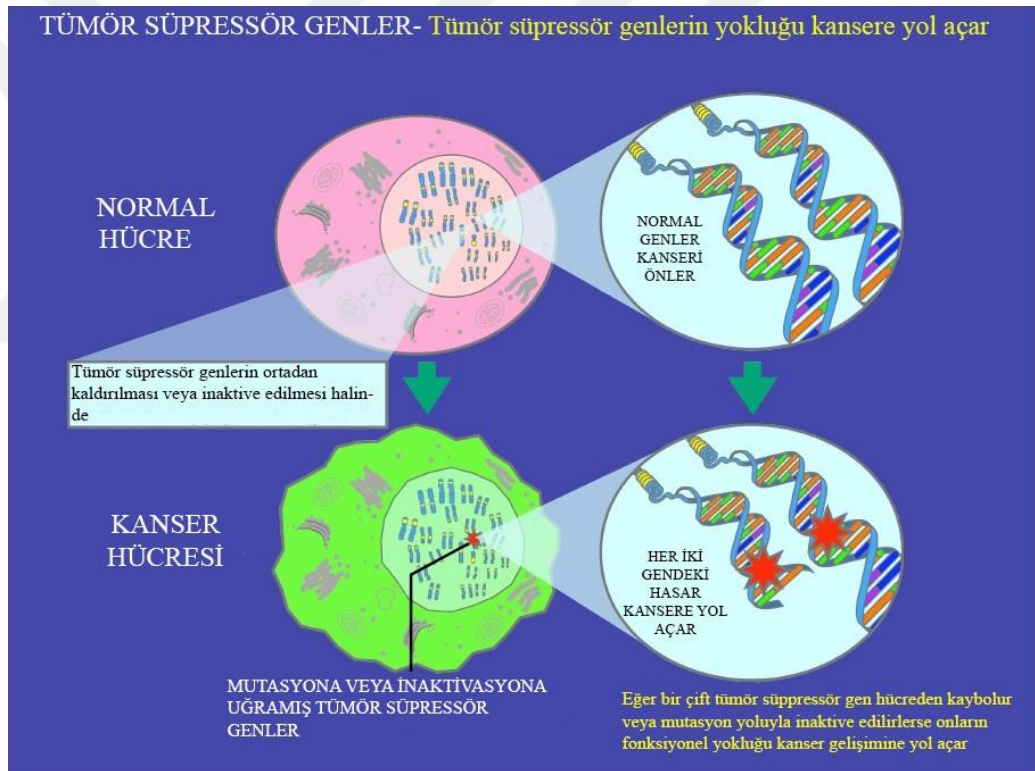
Tümör süpresör genler, normal şartlar altında kontrolsüz hücre büyümesini engelleyen, mutasyona uğradıklarında ise fonksiyonlarını kaybedip transforme fenotipin oluşmasını sağlayan genlerdir (Şekil 5). Transformasyonun gerçekleşebilmesi için tümör süpresör genlerin her iki alelinin de kaybolması gerekmektedir (Şekil 6). Tümör süpresör genler kendi içlerinde "yöneticiler" ve "gardiyanlar" olarak ikiye ayrılır (Kumar ve ark. 2013). Yönetici tümör süpresör genler, mutasyona uğradıklarında hücre büyümesindeki frenleme mekanizmasını kaybederler. Bu gruba örnek olarak Retinoblastom (Rb) tümör süpresör geni verilebilir (Devi 2005). Gardiyan tümör süpresör genler, hücredeki genom hasarının tespit edilmesinden sorumludur. Genomdaki hasarı algıladıktan sonra kompleks bir yanıt başlatırlar. Oluşturulan yanıt ya hücre büyümesini durdurur ya da hasar onarılamayacak kadar büyükse apoptozu tetiklerler. Bu gruba örnek olarak Tümör Protein 53 (TP53) tümör süpresör geni verilebilir. Bu genler kanser oluşumunun negatif regülatörüdür (Boyle ve Levin 2008).



Şekil 5. Tümör Süpresör Genlerin Görevleri (<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch10D2.htm>) (Erişim tarihi 29.09.2017).

Protoonkogenlerden onkogenleri transforme eden mutasyonların aksine, tümör süpresör genler kanser oluşumunda fonksiyon kayıpları ile yer alırlar. Buna ilaveten onkogenlerin aksine mutant tümör süpresör genlerden kaynaklı kontrolsüz hücre büyümesi resesiftir ve etkili olabilmesi için her iki kromozom çiftinin de hasarlı geni içermesi şarttır. Kromozom çiftlerinden biri sağlamsa hastalık ortaya çıkmaz fakat bu bireyin her hücresinde genin defektif bir kopyası yer alır. Tümör süpresör genler, ilk kez ailesel kanser vakalarında ortaya konulmuştur. İlk keşfedilen tümör süpresör gen, Retinoblastoma genidir (Yokuş ve Çakır 2012). Bu durum çift vuruş hipotezi (Knudson Hipotezi) ile açıklanmaktadır. Daha önce de bahsettiğimiz gibi tümör süpresör genlerin kansere yol açması için her iki allelinin de mutasyona uğrayıp işlevlerini kaybetmesi gerekmektedir. Bu hipoteze göre ilk vuruş ailesel olarak aktarılmış bir mutasyondur. İkinci vuruş ise diğer alleldeki sonradan kazanılmış mutasyondur. Bu durum heterozigosite kaybına (LOH) sebebiyet verir. Bu hipotez ilk olarak 1953’de Carl O. Nordling ve 1971’de Alfred G. Knudson tarafından ortaya konulmuştur. Alfred Knudson’un ailesel ve sporadik retinoblastomaya yönelik epidemiyolojik verileri doğrultusunda ortaya koyduğu bir

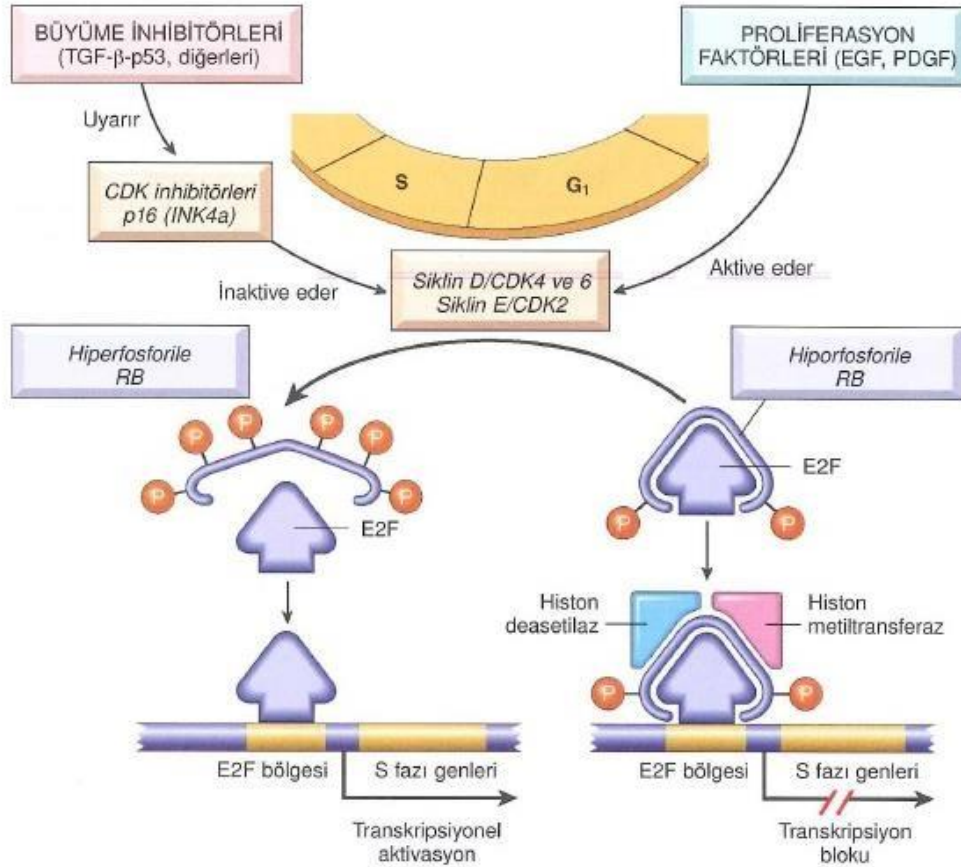
kavramdır (Şahin ve ark. 2013). Pek çok kanser tipinde Retinoblastoma tümör süpresör gen yolağı mutant formdadır. Rb geni hücre siklusunda anahtar bir rol oynar (Giacinti ve Giordano 2006). Retinoblastoma tümör süpresör proteini (pRb) hücre siklusunun G₁-S geçişinde kontrol noktası olarak görev almaktadır. Hücre siklusundaki fonksiyonlarına ek olarak Rb gen ailesi DNA replikasyonu, mitoz, kromatin yapısı, hücre metabolizması, hücrel farklılaşma ve hücre ölümü gibi fonksiyonları da regüle etmektedirler. Rb proteinlerinin görevlerinin ayarlanmasında fosforilasyon önemli bir role sahiptir ve SiklinD/cdk4/6, SiklinE/cdk2 ile SiklinA/cdk2 kinazları için spesifik fosforilasyon bölgeleri vardır (Akdeniz ve ark. 2014).



Şekil 6. Malign Transformasyon ve Tümör Süpresör Genler Arasındaki İlişki (<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch10D2.htm>) (Erişim tarihi 29.09.2017).

G₁ safhasının başında Rb aktif formu hipofosforile biçimdedir. Elongation Factor II (E2F) transkripsiyon faktörleri ailesine bağlanarak onları inhibe eder böylece siklin E transkripsiyonunu engeller (Giacinti ve Giordano 2006). Bu durum büyüme faktörleri sinyallerinin gelmesiyle değişir. Bu sinyaller siklin D

ekspresyonuna ve siklin D-CDK4/6 komplekslerinin aktifleşmesine yol açar. Bu kompleksler de Rb'yi fosforile ederek inaktive hale getirir (Kumar ve ark. 2009). Rb'nin fosforilasyonu E2F transkripsiyon faktörleri ailesinin baskılanmasını ortadan kaldırır (Vermeulen ve ark. 2003b). Bunun sonucunda hücreler S fazına girerler (Şekil 7) (Cabadak 2008).



Şekil 7. RB'nin G₁-S Kontrol Noktasını Düzenlenmesindeki Rolü (Tuzlalı ve ark. 2013).

G₁-S geçişindeki Rb aracılı kontrol noktası pek çok kanser tipinde bozukluğa uğramıştır. Bu bozukluk Rb'nin fosforilasyonunu sağlayan siklin ve CDK'larda görülen onkojenik mutasyonlardan kaynaklanır (Akdeniz ve ark. 2014). Rb fosforilasyonundaki düzensizlikler nedeniyle G₁-S safhaları arasındaki geçişlerde meydana gelen değişiklikler hücre çoğalmasını olumsuz yönde etkileyebilir. Retinoblastoma ve glioblastoma gibi bazı kanser vakalarında Rb gen mutasyonları saptanmıştır (Cabadak 2008).

Hücre döngüsü kontrolünün kaybının malign transformasyonunun kilit noktası olduğu ve hücre döngüsünde önemli rol oynayan dört regülatörden (Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A (CDKN2A), siklin D, CDK4, Rb) en az birinin bu süreçte mutasyona uğraması gerektiği giderek daha fazla kabul gören bir görüştür (Kumar ve ark. 2013).

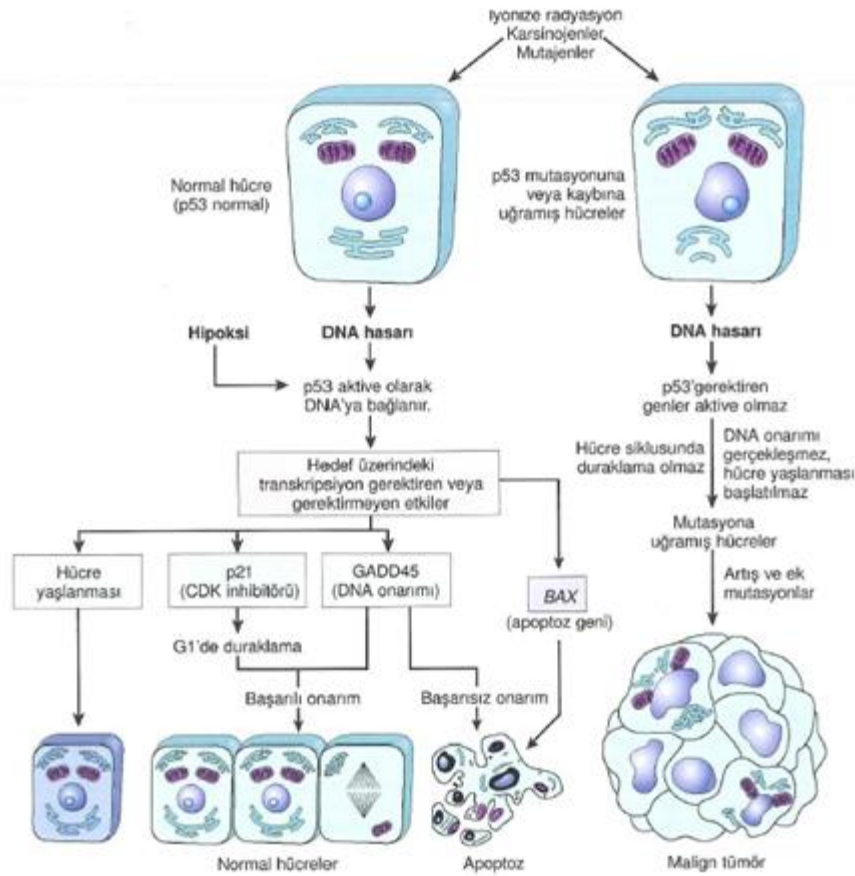
p53 geni bir transkripsiyon faktörüdür ve on yedinci kromozomun p kolunda yerleşir ve 17q13.1'de lokalize olmuştur (Giono ve Manfredi 2006, Yılmaz ve Altunok 2011). p53 geninin kodladığı protein 393 aminoasitten oluşmakta olup 53 Kilo Dalton (kDa) ağırlığındadır. Hücre içinde bir tetramer biçiminde yer almaktadır (Çefle 2003). p53 geni önceleri bir onkogen olarak yorumlanmış fakat takibinde yapılan çalışmalar ile p53 geninin primer olarak tümör süpresör gen fonksiyonu gösterdiği anlaşılmıştır (Ekmekçi ve ark. 2000).

p53 proteininin pek çok aktivitesi vardır. Bunlar arasında; DNA onarımı, hücre siklusunun denetlenmesi, genomik kararlılığın sağlanması, kromozom ayrılması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre yaşlanmasının başlatılması ve programlı hücre ölümünün tetiklenmesi sayılabilir (Koçak ve ark. 2011). p53, bu fonksiyonlarını ya transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek ya da diğer proteinler ile veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşime girerek yerine getirmektedir (Lowitz ve Casciato 2000, Devi 2005, Koçak ve ark. 2011).

p53 geni "Genomun Gardiyanı" olarak adlandırılmaktadır (Longo 2008). Bunun en önemli sebebi hücre DNA'sında herhangi bir hasar oluştuğunda veya tümöre neden olabilecek herhangi bir uyarımda p53 geninin ürünü olan p53 proteini aktif hale gelir, DNA replikasyonunu ve hücre siklusunu durdurur (Ekmekçi 2000).

Hücre siklusunun p53 vasıtasıyla engellenmesi, DNA hasarına yönelik verilen ilk yanıtıdır (Şekil 8). Bu yanıt; hücre siklusunun G₁ fazının geç döneminde p21 geninin p53'e dayalı transkripsiyonu sonucu şekillenir (Vermeulen ve ark. 2003b).

Bu sayede DNA hasarının onarımı için hücreye dinlenme fırsatı verilmiş olur. p53 aynı zamanda DNA onarımını başlatan bir protein olan The Growth Arrest and DNA Damage-Inducible 45 (GADD45)'i de aktive eder (Ekmekçi ve ark. 2000, Kumar ve ark. 2013). Eğer hasar başarıyla onarılırsa p53, MDM2 proteininin transkripsiyonu üzerinden hücre siklusundaki engeli ortadan kaldırır (Giono ve Manfredi 2006). Eğer hasar büyükse ve DNA onarılamazsa hücre siklusu p53 tarafından yönlendirilen sessizlik durumuna ya da apoptozis sürecine yönlendirilir (Boyle ve Levin 2008). DNA tamiri yetersiz olduğunda hasarlı hücre apoptozis yoluyla kontrollü bir şekilde ortadan kaldırılır. Bu neoplastik transformasyon karşısındaki en son koruyucu mekanizmadır ve Bcl-2-Associated X (BAX) ile p53 Upregulated Modulator of Apoptosis (PUMA) gibi pro-apoptotik genler vasıtasıyla gerçekleşir (Çefle 2003).



Şekil 8. Genom Bütünlüğünün Korunmasında p53'ün Görevi (Tuzlalı ve ark. 2013).

p53 geninin homozigot olarak kaybı DNA'nın onarılmasını imkansız hale getirir ve mutasyonlar hücrelerde birikir, bunun sonucunda malign transformasyon gerçekleşir (Yetim Çataroğlu 2008). p53, kanser vakalarında mutasyonu en sık

görülen proteindir ve tüm kanserlerin yaklaşık olarak % 50-55'inde mutant'tır (Altunok 2011). p53 geninde sıklıkla rastlanan bozukluklar delesyon ve nokta mutasyonlarıdır. Karaciğer, kolon, beyin, meme ve akciğer karsinomu gibi pek çok tümörde mutant p53 genine rastlanmaktadır (Ekmekçi ve ark. 2000). Mutant p53, Li Fraumeni Sendromu adı verilen kalıtsal bir hastalığın karakteristik bulgusudur (Longo 2008).

1.2.4. Apoptozis ve Kanser

Hücre ölümü iki farklı şekilde gerçekleşir. Bunlar nekroz ve apoptozistir. Nekroz fiziksel, kimyasal, enfeksiyöz gibi nedenlerden dolayı doku ve hücrelerin yersel olarak ölümüne denir. Apoptozis ise nekrozdaki farklı olarak; yangı olmaksızın hücrelerin kendi kendilerini imha ettikleri, genlerle regüle edilen, RNA, protein sentezi ve enerjiye ihtiyaç duyan, organizmadaki dengenin (homeostazis) korunmasında önemli olan programlı hücre ölümüdür (Tomatır 2003). Apoptozis normal hücre ölümünün yanı sıra mutant hücre çoğalmasını engeller, anormal DNA'lı hücreleri ortadan kaldırır ve kromozom sayısının o türe özgü sayıda tutulmasını böylece anöploidinin engellenmesini sağlar. Bunun sonucunda DNA'sını sağlıklı olarak replike etmiş hücrelerin mitozaya girmesine müsaade edilir (Lowitz ve Casciato 2000). "Apoptosis" terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie isimli patoloğlar tarafından kullanılmıştır. Yunancada 'apo' =ayrı, 'ptosis' =düşen anlamına gelir (Öztürk 2002).

Homeostazis, apoptozis ve proliferasyon arasındaki dengenin sağlıklı bir şekilde yürütülmesine gereksinim duyar (Cabadak 2008). Örneğin kemik iliğinde kan hücreleri üretiminin yapım ve yıkımının dengede tutulması, memelilerde el ve ayak parmak taslaklarının arasındaki ara dokunun ortadan kalkması, merkezi sinir sisteminin şekillenmesi, menstruasyon sırasında endometriyumdaki değişiklikler, menstruel siklus sonunda korpus luteumun involusyonu, self reaktif T hücrelerin yok edilmesi apoptozis yoluyla gerçekleştirilmektedir (Lowitz ve Casciato 2000). Apoptozisin artması nörodejeneratif hastalıklara, AIDS'de görülen lenfosit

yetersizliğine; azalması ise kanser oluşumuna ve otoimmün hastalıklara neden olabilir (Öztürk 2002).

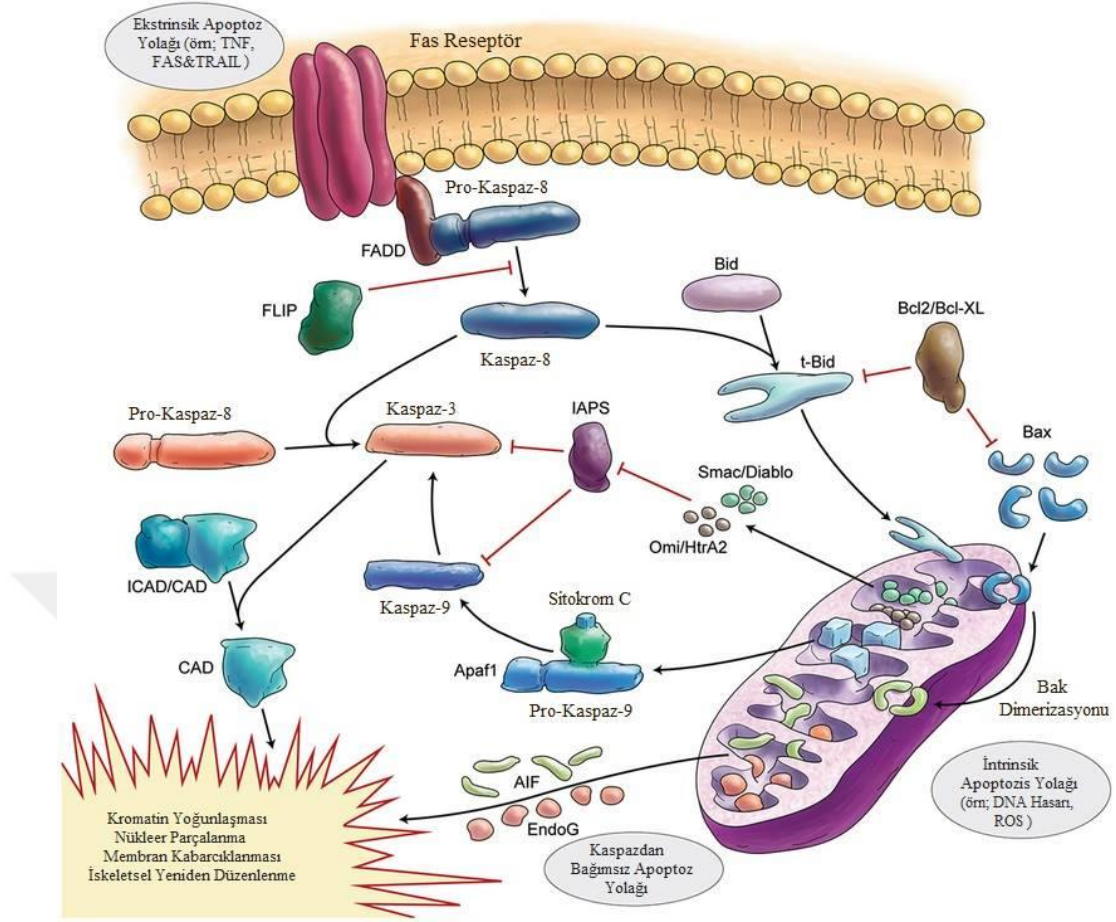
Hücrede apoptozun regülasyonunda sistein proteazlar (Sistein Aspartat Spesifik Proteazlar (kaspazlar); kaspaz 8, 9 ve 3), B-hücre lenfoma protein-2 (Bcl-2) / Bax gen ailesi ve p53 rol oynamaktadır (Yokuş ve Çakır 2012). Bcl-2 / Bax gen ailesinin 20 üyesi tanımlanmıştır ve bunlardan bazıları apoptozu inhibe eder (Bcl-2, Bcl-2 bağlantılı protein, uzun izoform (Bcl-xL), BCL2L2 (Bcl-w), BCL2L10 (Boo), Myeloid Hücre Lösemisi 1 (Mcl-1)), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır. Proapoptotik genler; Bcl-2-Associated X (Bax) (Bax, Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer (Bak) ve Bcl-2 Related Ovarian Killer (Bok)) ve BCL2 Homolog 3 Alanı (BH3) (Bcl-2 ile etkileşen katil (Bik), BH3 Interacting Domain Death Agonist (Bid), Harakiri, BCL2 Interacting Protein (Hrk), BCL2 Interacting Protein 3 (BNIP3), BCL2 Associated Agonist of Cell Death (Bad), BH3 Etkileşen Domine Sahip Ölüm Antagonisti (Bid) vs) olmak üzere iki alt aileye ayrılır (Tomatır 2003, Akşit ve Bildik 2008). Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler sebebiyle sitokrom c ve Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF doğrudan çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom c apoptozun en son aşamasında görev alır. Sitokrom c Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1 (Apaf-1)'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptozom' olarak adlandırılır. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır. Bcl-2 ise sitokrom-c salınımını bloke ederek mitokondri membranında permeabilite artışını engeller. Bu sayede apoptoz inhibe edilir. Bcl-2 nin Bax ile olan etkileşiminde, Bcl-2 lehine oranın daha yüksek olması hücrenin hayatını devam ettirmesini sağlarken, bu oran Bax lehine artarsa hücre ölüme sürüklenir (Coşkun ve Özgür 2011).

p53, hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı belirledikten sonra hücre döngüsünü G₁ safhasında durdurup hücreye DNA onarımı için zaman kazandıran transkripsiyon faktörüdür (Tomatır 2003). Hasar onarılamayacak kadar şiddetli ise Bax, Apaf-1 ve Fas Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptörü

(Fas) yapımını artırarak Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılar ve bu sayede apoptozun indüksiyonunu gerçekleştirir (Coşkun ve Özgür 2011). MDM2 proteini, p53 proteininin fonksiyonlarını düzenleme konusunda önemli bir rol oynar. MDM2 proteini p53'ün negatif kontrolünü sağlar (Giono ve Manfredi 2006). p53'ün hücre döngüsünü G₁-S geçişinde durdurmasını ve apoptozu indüklemesini engeller. Radyasyon ve benzeri faktörlerle hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde MDM2 ile p53 proteini arasındaki bağlanma bölgesinde yapısal değişiklikler oluşur. Böylece MDM2 p53'ü bağlayamaz ve serbest kalan p53 yukarıda bahsi geçen fonksiyonlarını yerine getirir (Eren 2006).

Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağımlı kırarlar. Hücrede inaktif olarak bulunurlar, aktiviteleri proteolitik Anayol Proteaz Dizisi (kaskad) yoluyla gerçekleştirilir ve DNA onarımı ile replikasyonu için ihtiyaç duyulan enzimleri inaktive ederler (Coşkun ve Özgür 2011). Kaspazlar 3 kategoriye ayrılır. Bunlar; Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2,8,9,10), Efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7) ve İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14)'dır (Gültekin ve ark. 2008, Coşkun ve Özgür 2011).

Apoptoz iki yolla gerçekleşir; Bunlar; İntrinsik yol (Mitokondri Yolu) ve Ekstrinsik yolu (Ölüm Reseptörü Yolu)'dur. İntrinsik yolu hücre içi sinyaller aktifleştirirken, ekstrinsik yolu hücre dışı sinyaller devreye sokmaktadır (Coşkun ve Özgür 2011). DNA hasarı, hücre içi Kalsiyum (Ca⁺⁺) düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre döngüsü bozuklukları ve hipoksi apoptozu tetikleyen hücre içi sinyallerdir. Büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand aracılığı ile apoptoz, Tümör Nekroz Faktörü (TNF) aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (İskemi, toksinler, Ultraviyole (UV), kemoterapötik ilaçlar, radyasyon) hücre dışı sinyallerdir. Her 2 sinyal yolunda da kaspazlar görev yapmaktadır (Şekil 9) (Kumar ve ark. 2013).



Şekil 9. Apoptoz yolakları (https://www.researchgate.net/figure/271213260_fig4_Figure-3-Schematic-Representation-of-Apoptosis-In-general-apoptosis-divides-into) (Erişim Tarihi: 26.09.2017).

İntrinsik yol; Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden Bid; Bcl-2'nin inaktivasyonunu sağlar, Bax ve Bak'ı aktive eder. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondriyon membranında por oluşturur ve zar potansiyelini değiştirir. Bu sayede mitokondriyon membranındaki porlardan sitokrom-c, Mitokondri kökenli ikinci kaspaz aktivatörü (Smac), Endonukleaz-G (Endo-G), Ca^{++} ve AIF gibi moleküller serbest bırakılmış olur (Coşkun ve Özgür 2011). Bu sürecin sonunda kaspazların zincirleme aktivasyonu sonucunda çekirdek parçalanır (Longo 2008).

Ekstrinsik yol; Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR), Ölüm Reseptörü 5 (DR5)) ölüm sinyallerinin (Fas Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptör Ligandı (FasL), TNF- α , Tümör nekroz

faktörü ilgili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL)) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Bu şekilde trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek Ölümü İndükleyen Sinyal Kompleksi (DISC) adı verilen yapıyı meydana getirir. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşumu gerçekleştirilir. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olacak şekilde kaspaz-3'ü aktif duruma getirir. Ya doğrudan kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktifleştirir ya da Bid'i keserek dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz-9'u etkinleştirdikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her iki şekilde de aktive olan kaspaz-3 yine Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz (CAD) aktivasyonu ile DNA'nın fragmente olmasına neden olur (Coşkun ve Özgür 2011).

Apoptozisi regüle eden genlerdeki mutasyonlar (apoptozisin kısıtlanması), onkogen aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonu ile beraber kanser oluşumunda rol oynamaktadır (Yokuş ve Çakır 2012). Hücrelerin normal apoptotik süreçten kaçmalarını sağlayan bir özellik kazanmaları neredeyse tüm kanser hücrelerinde saptanan bir bulgudur. Tümör hücreleri ya antiapoptotik proteinlerin aşırı yapımı ya da proapoptotik proteinlerin yapımlarının ya da etkilerinin azalması nedeniyle apoptoza karşı bir direnç geliştirirler. Örneğin foliküler B hücreli lenfomada kromozomal translokasyon sonucu apoptozun regülasyonunda önemli bir fonksiyonu olan Bcl-2 proteininin yapımı artmaktadır (Solakoğlu 2009). Proapoptotik genler Bax ve Bak'ın ekspresyonundaki eksiklikler kolon kanseri ve hematolojik maligniteler gibi çeşitli kanserlerde gösterilmiştir. p53'ün mutasyona uğraması ya da delesyonu kanserde en sık rastlanan genetik anomalidir. p53 yoluyla başlatılan apoptoz yolağındaki proteinlerin yapımları ya da fonksiyonlarındaki bozuklukların insanlardaki kanserlerin neredeyse yarısında etkin bir rol oynadığı belirlenmiştir (Eröz ve ark. 2012).

1.2.5. Telomer, Telomeraz ve Kanser

Kromozomların DNA ve protein içeren terminal bölgelerine telomer adı verilir (Çefle 2009). Diğer kromozomal DNA dizilerinden yapısal ve işlevsel olarak

maksimum hücre bölünme sayısını ifade eder. Normal hücreler bu sınıra ulaştıklarında morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler geçirirerek proliferasyon sürecinden uzaklaşırlar. Buna replikatif yaşlanma denir. Burada devreye telomerler girer. Telomer uzunluğu hücrelerin replikatif yaşama süresini belirler ve her hücre bölünmesi sonrasında telomerler belirli bir miktarda kısalır (Bolat ve ark. 2007). Telomerler kritik bir uzunluğa kadar kısalıdıklarında p53 ve Rb aracılığıyla yaşlanma programı aktifleşir. Bu aşamadan sonra hücre bölünmesi sekteye uğrar (Kumar ve ark. 2013). Hayflick limitinin belirlenmesinde telomerler önemli bir kıstastır (Güneri Yıldız ve ark. 2009).

Hüresel ölümsüzlük sürecinde, M1 ve M2 olarak tanımlanan iki aşama vardır (Güzelgöl ve Aksoy 2010). M1 yani, yaşlanma aşamasını aşan hücreler yaşam süreleri uzun olmakla beraber ölümsüz değildirler. M1 aşamasında p53 ve/veya p16/Rb mutasyonu sonucunda hücreler M2 aşamasına girerler ve bunun sonucunda telomeraz enziminin regülasyonu veya reaktivasyonu sonucunda kontrolsüz bir şekilde çoğalır (Bolat ve ark. 2007).

Telomer kısalması, önemli bir tümör baskılayıcı mekanizmadır. Telomeraz adı verilen enzim telomerlerin kısalmasını engellemektedir. Bu enzim katalitik bir protein (hTERT) ve kısa bir RNA molekülünden (hTER) meydana gelir. hTERT, RNA-bağımlı bir ters transkriptazdır ve hTER'den DNA sentezleyerek telomerik kısalmayı engeller (Çefle 2009).

Embriyonik hücreler ve erişkin kök hücrelerinde telomeraz aktivitesi mevcut iken normal somatik hücrelerde yoktur (Güneri Yıldız ve ark. 2009). Fakat kanser hücrelerinde ise telomeraz aktivitesi tespit edilmiş olup hücre yaşlanması ve kanser oluşumunda etkili oldukları saptanmıştır (Güzelgöl ve Aksoy 2010). İnsan kanser hücrelerinin % 85'inde yüksek telomeraz aktivitesi saptanmıştır (Dikmen ve Doğan 2003). Nakatani ve ark. (1997) beyin tümörlerinde telomeraz aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmada, normal beyin dokusunda telomeraz aktivitesi saptamazken beynin malign tümörlerinde % 81, beynin metastatik tümörlerinde %100 aktivite saptamışlardır. Bunun yanı sıra telomeraz pozitif olan hastaların prognozunun,

telomeraz negatif olan hastalara göre daha kötü olduğu ve bunların yaşam sürelerinin ise daha kısa olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun sonucunda telomeraz aktivitesinin beyin tümörlerinin teşhisinde ve prognoz tayininde kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

1.2.6. MikroRNA'lar ve Kanser

MikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda fonksiyonel kısa RNA molekülleridir ve gen ekspresyonunun kontrolünde önemli görevler üstlenirler (Bağcı 2014). Ayrıca hücre tipinin belirlenmesi, hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi pek çok biyolojik süreçte etkili anahtar moleküller olarak rol alırlar (Aşçı Çelik ve ark. 2013). MikroRNA'lar, hedefledikleri Mesajcı RNA (mRNA)'nın moleküler düzeydeki özelliklerine göre onkogenik veya tümör süpresör karakter alabilirler (Saydam ve ark. 2011). Bu miRNA'ların kanser hücrelerinin farklılaşması, tümör gelişimi ve metastazında önemli fonksiyonları olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Karagün ve ark. 2014). Lee ve ark. (1993) *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*)'ın gelişimi alanında yaptıkları araştırmalarda lin-4 adlı ilk miRNA'yı saptamışlardır. Günümüzde 1872 tane insan miRNA sekansı belirlenmiştir (Bağcı 2014).

1.2.6.1. Tümör Süpresör MikroRNA'lar

miR 15a ve miR 16-1 genleri: Cimmino ve ark. (2005) kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalarında yaptığı çalışmada, miR 15a ve miR 16-1 ekspresyonlarının BCL-2 üretimi ile ters orantılı olduğu saptamışlardır. Sözü edilen miRNA'ların düşük seviyelerinin kontrolsüz hücre büyümesine neden olduğu, yüksek seviyelerinin ise apoptotik etki gösterdiği ortaya konulmuştur.

let-7 geni: Akciğer kanserli hastaların akciğer dokusu, normal akciğer dokusu ile karşılaştırıldığında bu dokularda düşük let-7 seviyeleri saptanmıştır. Bu oran akciğer tümörlerinde % 44'dür. Yapılan çalışmalar sonucunda let-7'nin RAS genini

negatif olarak etkilediği ve bu etkileşim ile akciğer kanserini başlattığı düşünülmektedir (Johnson ve ark. 2005).

miR-29: Bu miRNA'nın KLL (Calin ve ark. 2005), akciğer kanseri (Lin ve ark. 2010), invaziv meme kanseri (Iorio ve ark. 2005) ve akut myeloid lösemi (AML)'de (Calin ve ark. 2005) tümör süpresör olarak görev aldığı yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur.

miR-143: Meme (Slaby ve ark. 2008), serviks (Lui ve ark. 2007), kolorektal (Slaby ve ark. 2008), mesane (Lin ve ark. 2009) ve hipofiz tümörlerinde (Amaral ve ark. 2009) yapılan çalışmalar bu miRNA'nın tümör baskılayıcı olarak fonksiyon yaptığını belirtmektedir. Serviks kanserinde miR-143'ün hücre proliferasyonunu baskıladığı, kolorektal kanser hücrelerinde ise Kirsten rat sarkomu viral onkogen homolog (KRAS) ile KRAS sinyal yolunu direkt olarak inhibe ettiği bulunmuştur (Slaby ve ark. 2008).

1.2.6.2. Onkogenik MikroRNA'lar

miR-155: B-hücreli lenfoma (Kluiver ve ark. 2005), meme (Iorio ve ark. 2005), pankreas (Gironella ve ark. 2007), akciğer (Lin ve ark. 2010) ve Hodgkin lenfoma (Kluiver ve ark. 2005) gibi kanserlerde miR-155'in ekspresyon seviyelerinin yüksek olduğu saptanmıştır.

miR-21: AML, KLL, glioblastoma, akciğer, meme ve karaciğer gibi pek çok kanser tipinde bu miRNA'nın ekspresyonun yüksek olduğu saptanmıştır. miR-21 onkogenik fonksiyonunu bir tümör süpresör protein olan Fosfataz ve Tensin Homolog (PTEN)'un mRNA'sını hedef alarak ortaya koymaktadır (Calin ve ark. 2005, Volinia ve ark. 2006).

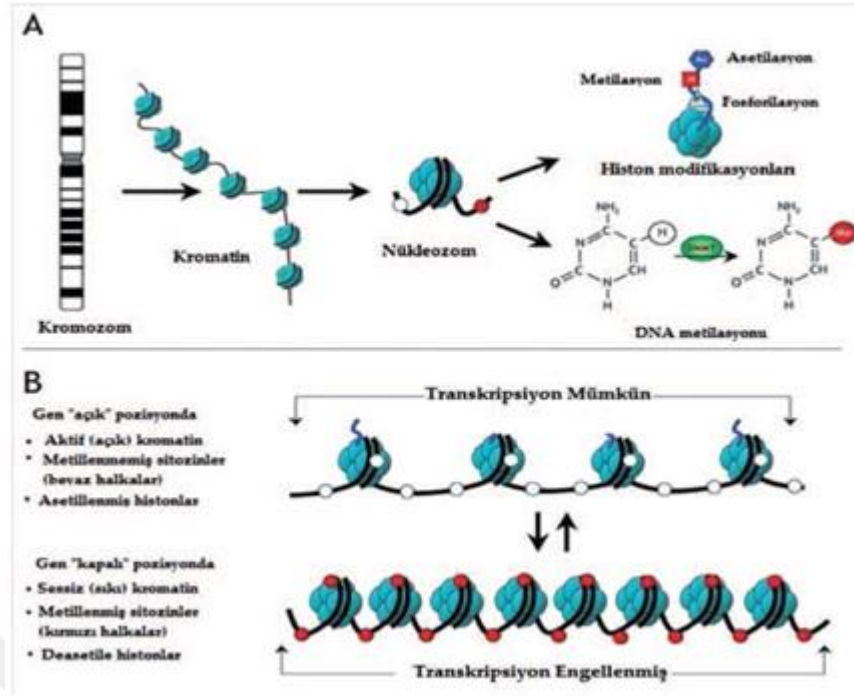
miR 17-92 genleri: Küçük hücreli akciğer kanseri, insan B hücre lenfoması, meme, kolon, pankreas gibi kanser tiplerinde bu miR 17-92 genlerinin ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır (O'Donnell ve ark. 2005).

miR17-92 genleri onkogenik etkisini PTEN ve Retinoblastoma Benzeri Protein 2 (RB2) gibi tümör süpresör genleri inaktive ederek gerçekleştirir (Hayashita ve ark. 2005). Burkitt lenfomanın gelişiminde MYC onkogeninin mir-17-92 grubuna direkt olarak bağlanıp bunların ekspresyonunu aktifleştirdiği gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2006).

1.2.7. Epigenetik ve Kanser

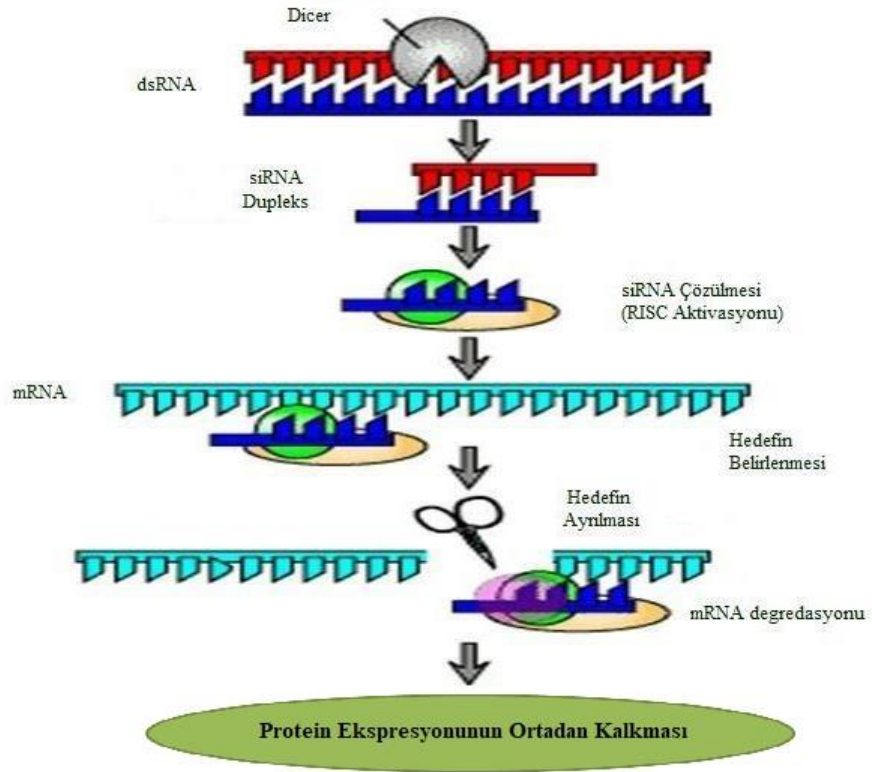
Epigenetik, gen ekspresyonunda mutasyon olmaksızın oluşan kalıtsal ve reversibl değişiklikleri ifade eder (Kumar ve ark. 2013). İnsan genomunda yaklaşık 23.000 gen bulunmaktadır. Bu genler belirli bir hücre tarafından belirli zaman dilimlerinde ekspresse edilmelidir. Hücreler gen ekspresyonunun kontrolünü sağlamak amacıyla, DNA'larını globüler histon protein oktamerleri etrafına sararak oluşturdukları nükleozom yapılarını kullanır. DNA ve histon proteinlerinden meydana gelen nükleozomlar kromatin şeklinde organize edilir. Kromatin yapısında oluşan değişiklikler gen ekspresyonunun kontrolünü sağlar. Kromatin yapısı sessiz ise genler inaktif, kromatin yapısı aktif ise genler aktif hale gelir. Kromatin yapısındaki bu dinamizm epigenetik paternler vasıtasıyla gerçekleştirilir (Rodenhiser ve ark. 2006).

Epigenetik mekanizmalar üç alt sınıfa ayrılmaktadır; DNA metilasyonu (Şekil 11), histon modifikasyonları (Şekil 11) ve RNA ile indüklenen sessizleşmedir (Şekil 12) (Bora ve Yurter 2007).



Şekil 11. DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları (Gürel ve ark. 2016).

DNA düzeyindeki modifikasyonların en çok bilineni DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu, omurgalılarda Sitozin-Fosfat-Guanin (CpG) dinükleotidlerinin sıklıkla bulunduğu bölgelerde sitozine bir metil grubunun bağlanması sonucu oluşur (Güngör ve Ünal 2015). Metilasyon DNA'nın inaktivasyonuna neden olarak protein ekspresyonunu engeller (İzmirli 2013). DNA'nın paketlenmesinde görev alan histon proteinlerine metil ve asetil gibi yapıların bağlanmasıyla asetilasyon ve metilasyon gibi histon modifikasyonları oluşmaktadır (Plass 2002). Bu modifikasyonların neticesinde kromatin yapısı değişir ve epigenetik etkiler ortaya çıkar (Güngör ve Ünal 2015). Asetilasyon ve metilasyon dışında fosforilasyon, s-nitrozilasyon, ubiquitinasyon ve sumolasyon gibi histon modifikasyonları da vardır (İzmirli 2013). RNA'ların, histon modifikasyonlarının ve DNA metilasyonunun başlaması için tetikleyici bir güç ortaya koyar. Bu sayede heterokromatin bölgenin oluşumuna etki eder ve kalıtsal olarak bu bölgenin sessizleştirilmesini sağlar (Bora ve Yurter 2007).



Şekil 12. RNA ile İndüklenen Sessizleşme (https://utcd.org.tr/wp-content/uploads/2017/09/epigenetik_modifikasyonlar_ve_erkek_infertilitesi.ppt) (Erişim Tarihi: 27.09.2017).

Epigenetik mekanizmalar birlikte çalışarak gen ekspresyonunu belirler ve hücrenin kaderinin çizilmesinde önemli rol oynarlar (Murrell ve ark. 2005). Bu mekanizmalar vasıtasıyla genomik baskılanma (imprinting), gametogenezis, yaşlanma, embriyoda gen aktivasyonu veya inaktivasyonu, erişkinlerde hücre yenilenmesi gibi epigenetik olaylar regüle edilmektedir (Güngör ve Ünal 2015).

Kanser oluşumunda DNA'da yalnızca nokta mutasyonu, delesyon ve insersiyonlar gibi değişikliklerin olmadığı, bunun yanı sıra DNA düzeyindeki bazı kimyasal modifikasyonların da gen ekspresyonunu etkilediği belirlenmiştir (Çefle 2009). Bu süreç genetik ve epigenetik bozuklukların birikimiyle ortaya çıkar ve çok basamaktır (Bird 2002).

DNA metilasyonu ve kanser arasındaki bağlantı ilk olarak 1983 yılında ortaya konulmuş olup kanser hücre genomlarının normale göre hipometile olduğu

saptanmıştır. Hipometilasyon genomik instabilite ve anormal gen aktivasyonuna neden olmaktadır (Çefle 2009). Kolon, karaciğer, prostat ve serviks kanserlerinde hipometilasyona rastlanmıştır (Plass 2002). Kanser hücrelerinde gene-spesifik hipermetilasyonlar da gözlenmektedir. Hipermetilasyon genellikle CpG adacıklarında oluşur ve böylece kromatin yapısında değişime neden olarak gen ekspresyonunu baskılar (Rountree ve ark. 2001). Hücre siklusu, sinyal iletimi, DNA onarımı ve apoptoziste faaliyet gösteren tümör süpresör genlerin promotor alanlarındaki hipermetilasyon nedeniyle bu genlerin ekspresyonunu baskılanmaktadır. Bu durum kanser hücrelerine büyüme ve çoğalma avantajı kazandırıp, metastazı kolaylaştırmaktadır (Bora ve Yurter 2007). Kalıtsal kanserlerde yapılan araştırmalar, Knudson'ın iki vuruş modeline uyumlu olarak tümör süpresör genlerin diğer alelinin hipermetilasyon sonucu baskılandığını göstermektedir (Jones ve Baylin 2002). Baskılanmış (imprinted) genlerdeki DNA metilasyon kaybı ve ya kazanımı da kanser oluşumuna etki yapmaktadır. Hücre büyümesi ve çoğalmasında faaliyet gösteren baskılanmış bir genin normal şartlar altında sessiz olan aleli, metilasyon kaybı nedeniyle aktifleşerek gen ekspresyonunu arttırabilmektedir. Bunun aksine, hücre büyümesinin durdurulmasında görevli baskılanmış bir genin normal şartlar altında aktif olan alleli, metilasyon artışı nedeniyle inaktif hale gelerek gen ekspresyonunu baskılayabilmektedir (Bora ve Yurter 2007).

1.3.Karaciğerin Benign ve Malign Tümörleri

Karaciğerin benign ve malign tümörleri primer ve sekonder tümörler adı altında incelenir. Karaciğer kanseri, kanser nedenli ölümlerde erkeklerde ikinci, kadınlarda altıncı sırada yer alır (Kim ve ark. 2015). Hepatoselüler Karsinoma (HCC), karaciğerin primer malign tümörlerinin % 70-85'ini oluşturur (Shirakami ve ark. 2012).

HCC, insanlarda rastlanılan en sık rastlanan malign tümörlerden biridir (Zhang ve ark. 2013). Dünya genelinde gözlenen kanser vakalarında beşinci sırada olup kansere bağlı ölüm sebeplerinde üçüncü sırada yer almaktadır (Medhat ve ark. 2017). Her yıl HCC nedenli 500.000'den fazla ölüm meydana gelmektedir (Fan ve

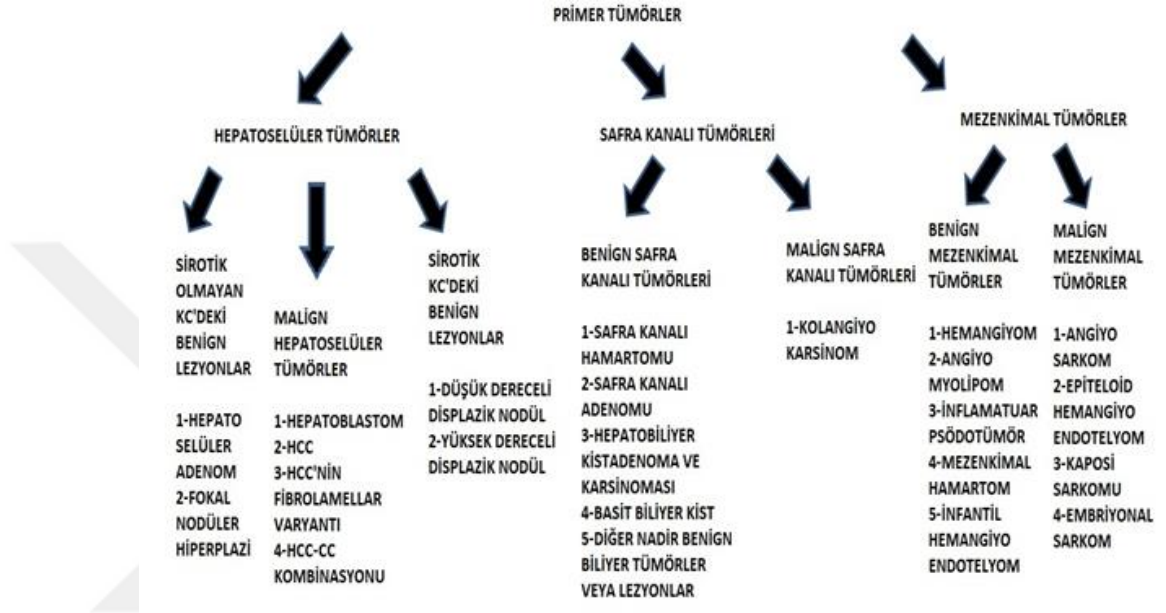
ark. 2015). HCC'nin etiyolojisinde kronik Hepatit B ve C, uzun süreli fazla alkol tüketimi, aflatoksin alımı, steato hepatit, nitrozaminler gibi çevresel karsinojenler, kötü beslenme ve obezite gibi faktörler gösterilmiştir (Bishayee ve ark. 2010, Ferrell ve Kakar 2011). HCC prevalansı dünyanın çeşitli bölgelerinde giderek artmaktadır. Prevalans Hepatit B virüs enfeksiyonunun endemik olduğu Afrika (Sahra-altı) ve Asya gibi (Güneydoğu) bölgelerde daha yüksek olmasına rağmen, başta alkolik karaciğer hastalığı ve hepatit C enfeksiyonunun artan oranları nedeniyle Batı ülkelerinde (Kuzey ve Güney Avrupa, Kuzey Amerika) prevalansı giderek artmaktadır (Rajasekaran ve ark. 2011, Luther ve ark. 2011). HCC erkeklerde kadınlardan daha sık görülmekte ve insidans oranı yaklaşık olarak 3:1'dir. HCC'nin prognozu kötüdür ve beş yıllık hayatta kalma oranı % 9'un altındadır. Bunun nedeni ise HCC'nin çoğunlukla ilerlemiş safhalarda teşhis edilmesidir (Rajasekaran ve ark. 2011).

HCC moleküler açıdan oldukça karmaşık ve heterojen bir kanser olup genetik ve epigenetik değişikliklerin yer aldığı çok aşamalı bir süreç sonucu meydana gelir (Akkız 2014). HCC gelişimindeki en önemli olay karaciğerde meydana gelen rejenerasyondur. Etki ne olursa olsun karaciğerde ilk önce inflamasyon daha sonra sırasıyla nekroz, fibrozis ve rejenerasyon oluşur (Taş 2010). Hücre dışı uyarım sonucu olgun hepatositler veya kök hücrelerde değişiklik meydana gelir ve süreç apoptozis, hücre çoğalması, displazi ve neoplaziye doğru evrilir. Preneoplastik evrede mitotik sinyal yollarının aktive edilmesiyle progresyon avantajı elde edilir ve displastik klonların seçilmesine neden olabilir. Klonlar bağ dokusu ile sarılan displastik nodüller içinde organize olurlar, nokta mutasyonları, kromozomal kazanım gibi ilave genomik hasarlar sonucunda malign fenotipe dönüşürler (Akkız 2014).

HCC gelişiminde yer alan çeşitli genetik değişimlerin en karakteristik olanı p53 tümör süpresör genidir. Bu gende yer alan mutasyonlar HCC'li hastaların % 29'unda yer almaktadır. Retinoblastoma ve tümör süpresör gen Axis Inhibition Protein 1 (AXIN1) hastaların % 50'sinde görülmektedir (Tüzün ve ark. 2015). DNA hipermetilasyonu, histon modifikasyonları, kromatinin yeniden modellenmesi ve mikro RNA'lar da HCC gelişiminde yer alan diğer önemli faktörlerdendir (Doğan ve Aktaş 2016).

1.3.1. Primer Karaciğer Tümörleri

Primer karaciğer tümörleri hepatoselüler tümörler, safra kanalı tümörleri ve mezenkimal tümörler olmak üzere üçe ayrılır (Şekil 13).



Şekil 13. Karaciğerin Primer Tümörleri

1.3.1.1. Hepatoselüler Tümörler

1.3.1.1.1. Sirotik Olmayan Karaciğerdeki Benign Lezyonlar

1.3.1.1.1.1. Hepatoselüler Adenom

Makroskopik Özellikler

Hepatoselüler adenomalar sıklıkla soliter (% 70) olmakla birlikte multifokal da olabilirler. Çoklu olduklarında multiple hepatoselüler adenomatozis adını alırlar (Odze ve Goldlum 2009, Rosai 2011). Makroskopik değerlendirmede adenomlar; yumuşak, yuvarlak, sarı veya bronz renkli kitleler halinde görülür ve sıkça nekroz, hemorajik alanlar içerir (Hamilton ve Aaltonen 2000). Tipik olarak komşu parankim dokunun kompresyonundan dolayı iyi sınırlanmış olup kapsüler yüzeyden çıkıntı

yapmaya meyilli olurlar (Maxie 2016, Meuten 2017). Normalde hepatik adenomlar kapsül içermezler (Odze ve Goldlum 2009).

Mikroskobik Özellikler

Hepatoselüler adenomlar; 1 ila 3 hücre kalınlığında remark kordonu oluşturan nispeten uniform hepatositlerden oluşur (Suriawinata ve Thung 2011). Hücre tabakaları düzensizdir ve linear değildir. Hepatoselüler adenomların önemli bir özelliği, hücre tabakalarının retikülün çatısının tam ya da sadece fokal olarak azalmasıdır. Tümör hücrelerinin boyutu normal hepatositlere benzerlik göstermekle birlikte, fakat hafif şekilde daha küçük ya da büyük olabilirler. Çekirdek-sitoplazma oranı normaldir (Odze ve Goldlum 2009). Tümör hücrelerinin sitoplazması eozinofilik veya şeffaf olabilirler ya da yağ damlaları, safra, lipofüskin pigmenti, ender olarak da Mallory hiyalini içerebilirler (Hamilton ve Aaltonen 2000, Rosai 2011). Çok çekirdekli tümör hücreleri veya pleomorfik hepatositler gözlemlenebilir, ancak bunlar genellikle fokaldır (Odze ve Goldlum 2009). Mitotik figürler oldukça nadir veya yoktur (Meuten 2017). Tümör hücreleri asinus oluşturabilirler fakat sayıları sınırlıdır. Asinar yapılar olduğunda safra içerebilirler. Sinüzoidler dilate ya da daralmış olabilirler, daralmış olan sinüzoidler tümörün uniform ve solid görünmesine neden olurlar (Odze ve Goldlum 2009). Alternatif olarak, sinüzoidal dilatasyon ve peliozis hepatis bazı adenomlarda yer alabilir. Geniş arteriyel damarlar sıklıkla belirgindir. Kupffer hücreleri normale oranla az sayıdadır. Portal kanallar normal olarak bulunmazlar, fakat telangiyektatik tipte portal kanalları taklit eden duktular yapılar gözlenebilir. İnfarksiyon ve hemoraji alanları nispeten yaygın bulgulardandır (Fletcher 2013).

1.3.1.1.1.2.Fokal Nodüler Hiperplazi

Makroskobik Özellikler

Hepatik adenomlar gibi, Fokal Nodüler Hiperplazi de genellikle soliterdir, fakat vakaların % 20-30'unda multifokal olabilmektedir. (Odze ve Goldblum 2009,

Rosai 2011). Fokal Nodüler Hiperplazi normal karaciğer parankiminden iyi sınırlanmış nodüler görünüme sahip olup normal dokulardan daha açık renktedir (Suriawinata ve Thung 2011). Karaciğer kapsülü yakınına lokalize olur ve genellikle fibröz bir kapsül içermez. Ender olarak da pedünküllü olabilir (Fletcher 2013). Fokal nodüler hiperplazinin kenarları normal karaciğer parankiminden iyi sınırlanmıştır, fakat fibröz bir kapsül genellikle yer almaz. Fokal nodüler hiperplazi lezyonlarının çoğunun merkezinde fibrovasküler özellikte skar dokusu mevcuttur (Hamilton ve Aaltonen 2000).

Mikroskopik Özellikler

Fokal Nodüler Hiperplazinin klasik tipinde, tümörün merkezi fibröz bölgesinden periferik doğru uzayan fibröz doku ile ayrılmış normal görümlü hepatositlerden oluşan tam olmayan nodüler görünüm hakimdir. Safra kanalları değişken sayıda olup normal olarak fibröz stromada ve özellikle nodüllerin kenarında yer alırlar. Hücre yapısı normal karaciğer hücrelerine benzer tıpkı rejeneratif nodüller de olduğu gibi daha kalın (2 ila 3 hücre kalınlığında) hücre tabakaları oluştururlar (Odze ve Goldblum 2009). Hiperplastik hepatositlerin sitoplazmalarında glikojen artışı veya yağ değişimleri gözlemlenebilir (Rosai 2011, Suriawinata ve Thung 2011). Bunun yanında safra ve demir pigmenti, lipofüskin, bakır ve Mallory cisimcikleri içerebilirler (Hamilton ve Aaltonen 2000). Bazı vakalarda büyük çekirdek ve hiperkromazi içeren atipik hepatosit odakları görülebilir. Tanı açısından önemli özelliklerinden biri; miyointimal mikzoid veya fibromusküler hiperplastik değişiklikler sergileyen orta ve büyük çaplı kalın duvarlı musküler damarların varlığıdır (Odze ve Goldblum 2009). Fokal Nodüler Hiperplazide lezyonun periferi haricinde portal kanallar yoktur. Sinüzoidler dilate olabilirler ve Kupffer hücreleri de belirginleşebilirler. Ağırlıklı lenfositler olmakla birlikte nötrofil ve eozinofilleri de içeren akut veya kronik hücre infiltrasyonu görülebilir. Nadir olarak gözlenen telangiektatik tip bazı yazarlar tarafından hepatoselüler adenomunun alt varyantı olarak vurgulanmıştır (Fletcher 2013).

1.3.1.1.2. Sirotik Karaciğerdeki Benign Lezyonlar

1.3.1.1.2.1. Geniş Rejeneratif Nodül (Makrorejeneratif Nodül) - Düşük Dereceli Displazik Nodül

Makroskobik Özellikler

Makro Rejeneratif Nodüller veya Düşük Dereceli Displazik Nodüller genel olarak 0.8 ila 3 cm çapındadır. Nodüler yapılar organın kesit yüzeyinden çıkıntı yapar, yuvarlak şekilli ve keskin sınırlıdır. Nodüller soluk renkli veya safra ile boyanmış olabilirler (Odze ve Goldblum 2009).

Mikroskobik Özellikler

Histolojik olarak, bu nodüller sirotik nodüllere benzerlik gösterirler (Park 2011). Normal karaciğer dokusuna benzer şekilde sağlam bir retikülün çatısına sahip olup 1 ila 2 hücre kalınlığına sahip hücre tabakalarından oluşur. Geniş rejeneratif nodüllerde hepatositler tipik olarak belirgin bir sitolojiye sahip olsalar da hücre boyutunda farklılıklar ve büyük hücre değişiklikleri gösterebilirler (Roncalli ve ark. 2011). Düşük Dereceli Displazik Nodüllerde hepatositlerin uniform olduğu gözlenebilir ancak bu spesifik özellikleri net değildir. Mallory cisimcikleri, safra stazı, şeffaf hücreler, demir veya bakır depoları, fokal veya diffuz yağ değişiklikleri, hücre boyutunda küçülme de yer alabilir (Fletcher 2013). Portal kanallar genellikle mevcut olup, safra kanalı proliferasyonu gözlenir (Schlageter ve ark. 2014).

1.3.1.1.2.2. Yüksek Dereceli Displazik (Sınır Çizgisi) Nodül

Makroskobik Patoloji

Yüksek Dereceli Displazik Nodüller temel olarak, Makro Rejeneratif Nodüller veya Düşük Dereceli Displazik nodüller ile aynı makroskobik özelliğe sahiptir. Ancak Yüksek Dereceli Displazik Nodüllerden bazılarının az

sınırlandırılmış ya da düzensiz bir sınıra sahip olmaları ile diğer ikisinden ayrımı yapılır (Odze ve Goldblum 2009).

Mikroskobik Patoloji

Nodül normal karaciğer dokusuna kıyasla mikroskobik olarak birim alanda hepatosit sayısı ve çekirdek/sitoplazma oranında artış ile küçük hücre değişimlerini içerir (Park 2011, Roncalli ve ark. 2011). Yüksek Dereceli Displazik Nodüllerde büyük hücreli değişim nadir de olsa gözlemlenebilir ve nodül içerisinde ayrı bir bölge olarak fokal yerleşimlidir. Üç hücre kalınlığında hücre tabakaları, retikülün çatısındaki fokal azalma, sinüzoidlerde hafif dilatasyon Yüksek Dereceli Displazik Nodüllerde sıkça rastlanan özelliklerdir (Paradis 2013). Nodüllerde Mallory Cisimcikleri, yağ ve şeffaf hücre değişiklikleri, sitoplazmik bazofili gözlenir. Safra kanalları içerebilir ve nadir olarak mitoz görülebilir (Fletcher 2013). Düşük Dereceli Nodüllerde demir depoları yaygın olarak gözlenirken Yüksek Dereceli Displazik Nodüllerde demir depoları eksikliğine eğilim vardır. Bu nodüllerin sınırları düzensiz olabilir ve nodüller fokal olarak psödogland yapıları içerebilir (Schlageter ve ark. 2014).

1.3.1.1.3. Malign Hepatoselüler Tümörler

1.3.1.1.3.1. Hepatoselüler Karsinom (HCC)

Makroskobik Özellikler

Hepatoselüler Karsinomaların (HCC) makroskobik görüntüsü; tümörün büyüklüğü ve sirozunun varlığına bağlı olarak değişir. Karaciğer sirozuyla ilişkili olan HCC genellikle fibröz kapsül ve tümoral kitle içinde bağ doku septumları içermekte olup genişleyip yayılma eğilimindedir. Sirotik olmayan HCC'ler ise kapsüllenmeme eğiliminde olup masiftir. Tümörlerde nadir olarak pedünkül gözlenebilir (Hamilton ve Aaltonen 2000). HCC'ler makroskobik olarak soliter, multi-nodüler, diffuz ve masif formlara ayrılır (Rosai 2011, Suriawinata ve Thung

2011). HCC’de tümöral odaklar boz beyaz-soluk sarı renkli, safra ile boyanmış alacalı yeşil renkli olabilir (Mills 2010, Suriawinata ve Thung 2011). Fibrolamellar ve Sirotik varyantlar dışında genellikle kıvamı yumuşaktır (Salomao ve ark. 2012, Fletcher 2013). Vasküler invazyon yaygın olup portal, hepatik venler ile vena cava da tutulabilir (Paradis 2013, Maxie 2016). Büyük safra kanallarının tutulumu yaygın olmamakla birlikte biliyer obstrüksiyon görülebilir (Burt ve ark. 2012).

Mikroskobik Patoloji

HCC’de dört histolojik patern tanımlanmıştır. Bunlar; trabeküler, psödoglandüler, solid ve sirotik paternlerdir (Meuten 2017).

a- Trabeküler Patern (Sinüzoidal, Tabaka Benzeri): En yaygın olarak görülen patern olup sinüzoidal patern olarak da adlandırılır (Geller ve Petrovic 2009). Bu paternde hücre tabakaları 3 veya daha fazla hücre kalınlığındadır (Mills 2010). Hatta 5 ila 10 hücre kalınlığından nadir de olsa 20 hücre kalınlığına varan trabeküller oluşabilir (Meuten 2017). İyi diferensiyasyon olmuş tümörler ince trabeküler paterne sahipken diferensiyasyon derecesi düştükçe ve trabeküller daha da kalınlaşır. Sinüzoid benzeri yapılarda değişik derecelerde dilatasyon görülür ve ilerlemiş HCC’lerde peliozis hepatis benzeri değişim görülebilir (Hamilton ve Aaltonen 2000). Normal karaciğer dokusunda olduğu gibi, tümör hücre tabakaları endotel hücreleri tarafından kaplanırlar. Retikülün çatısı genel olarak azalmış veya hiç yoktur. Tümör hücreleri küçük hücre değişimi gösterir. Yüksek dereceli tümörler haricinde büyük hücre değişimi nadirdir (Fletcher 2013). Tipik olarak Kupffer hücreleri HCC’lerde yer almazlar (Rosai 2011).

b- Psödoglandüler Patern (Asiner, Adenoid): HCC’nin asiner paterni, psödoglandüler veya adenoid patern olarak da isimlendirilir. Trabeküler paterne kıyasla daha az yaygındır. Psödoglandüler paternin belirleyici özelliği bez benzeri yapılar veya asinidir (Odze ve Goldblum 2009). Asiner yapılar safra kanallıklarının dilatasyonu ile oluşur ve genellikle safra içerir (Ferrell ve Kakar 2011, Paradis 2013). Daha az olarak, boşluklar sentral bir nekrozun sonucu oluşur ve protein, hücresel

yıkıntı veya makrofaj içerir (Fletcher 2013). Orta derecede diferensiyasyon olmuş tümörlere kıyasla iyi diferensiyasyon olan tümörlerde glandüler yapılar daha küçüktür. Asiner patern sıklıkla trabeküler paternle miks olarak görülebilir (Hamilton ve Aaltonen 2000).

c- Solid Patern: Bu paternde neoplastik hepatositler sinüzoidlerden yoksun solid bir kitle oluşturur ve yoğun tümör hücre agregatları ile karakterizedir (Salomao ve ark. 2012, Meuten 2017). Tipik olarak retikülün çatının kaybı görülür (Fletcher 2013).

d- Sirotik Patern: Sirotik tip nadir olarak görülür (Hamilton ve Aaltonen 2000). Sinüzoidal boşluklar boyunca belirgin fibrozis mevcuttur ve tümör hücrelerinin oluşturduğu trabeküllerde farklı derecelerde atrofi gözlenir (Ferrell ve Kakar 2011, Schlageter ve ark. 2014). Diğer paternlerin herhangi birine eşlik edebilir (Odze ve Goldblum 2009).

Sitolojik Görünüm ve Varyantlar

HCC'lerde tümör hücreleri genellikle poligonal olmakla birlikte küboidal hatta kolumnar olabilirler. İnce granüler eozinofilik sitoplazmaları vardır. İyi ve orta derecede diferensiyasyon olmuş tümörlerde safra kanalikülleri kolayca görülürken yüksek dereceli HCC'lerde gözlenmez. Çekirdek-sitoplazma oranında artış görülür. Çekirdek yuvarlak-oval olup, belirgin çekirdekçik içerir ve çekirdek membranı düzensizdir. İntranükleer sitoplazmik invaginasyonlar spesifik bir bulgu olmamakla birlikte yaygın olarak görülür. Tümör hücrelerinde çeşitli sitoplazmik inklüzyonlar saptanabilir. Yağ damlacıkları tümörlerin üçte ikisinde görülür. Yağ veya glikojenin diffuz birikimi sitoplazmanın şeffaf görünmesine neden olur. Bu değişiklikler nedeniyle tümör şeffaf hücreli karsinoma olarak isimlendirilir. Mallory hiyalini vakaların yaklaşık olarak % 20' sinde bulunur ve ara filamentlerin kümelenmesini ifade eder (Burt ve ark. 2012). Globüler proteinöz eozinofilik inklüzyonlar vakaların % 20' sinde görülür. Vakaların % 8'inde gözlenen ve açık renkte boyanan inklüzyonlar soluk cisimcikler olarak adlandırılırlar ve fibrinojen birikimini ifade

ederler. Bakır bağlayıcı protein veya bakır HCC'lerde % 28 oranında belirlenmiştir ve tümördeki safra varlığı ile ilişkilendirmiştir. HCC'nin nadir olarak gözlenen sitolojik varyantları aşağıda detaylandırılmıştır (Mills 2010).

Pleomorfik (Dev Hücre)

Tümör hücrelerinde belirgin pleomorfizm vardır (Mills 2010). Nadir olarak gözlenen bu varyantta bizar (tuhaf) dev hücreleri sıkça görülür (Geller ve Petrovic 2009). Pleomorfizm sergileyen hücreler organizasyondan yoksun olup belirli bir trabeküler patern göstermezler. Pleomorfik hücreler zayıf şekilde diferensiyel olmuş tümörlerde yaygındırlar (Hamilton ve Aaltonen 2000).

Şeffaf Hücre

Adından da anlaşılacağı üzere, bu varyant sitoplazmik glikojen ve/veya yağ birikiminden köken alan belirgin şeffaf sitoplazmalı tümör hücreleriyle karakterizedir (Mills 2010, Rosai 2011).

Sarkomatöz Değişim (Sarkomatoid, İğsi Hücre, Psödosarkomatöz)

Bu varyant; iğsi hücreler veya bizar (tuhaf) dev hücre proliferasyonu ile karakterizedir (Rosai 2011, Schlageter ve ark. 2014). Sarkomatöz özellikler baskın olduğunda, tümör Sarkomatoid HCC veya Sarkomatöz HCC olarak adlandırılır. Bununla birlikte genellikle sarkomatöz değişiklikler tümörün sadece bir kısmında yer alır. Trabeküler HCC ve sarkomatöz komponentler arasındaki geçiş özellikleri sıktır (Hamilton ve Aaltonen 2000).

1.3.1.1.3.2.Hepatoselüler Karsinomunun Fibrolamellar Varyantı

Makroskobik Özellikler

Fibrolomellar varyantta tümör dokusu sert kıvamda, bronz-beyaz veya kahverenkli, kapsüllenmemekle birlikte iyi sınırlanmıştır (Burt ve ark. 2012, Paradis 2013). Büyük olan tümörlerde hemoraji ve nekroz alanları görülür. Tümörlerin % 60 - 70'i solidtir. Multiple tümör odaklarında lezyonlar yıldız şekilli şeklindedir. Tümörün merkezinde fibrözis olabilir (Fletcher 2013).

Mikroskobik Özellikler

Tümör karakteristik olarak lamellar tarzda hiyalinize olmuş kollagen demetleri ile ayrılmış tabakalar veya küçük trabeküller halinde gözlenir (Burt ve ark. 2012, Schlageter ve ark. 2014). Tümör hücreleri büyük, poligonal şekilli, eozinofilik granüler sitoplazmaya ve belirgin bir çekirdekçiğe sahiptir (Rosai 2011, Suriawinata ve Thung 2011). Eozinofilik granüler görünümün nedeni mitokondri sayısının fazlalığından kaynaklanmaktadır (Hamilton ve Aaltonen 2000, Suriawinata ve Thung 2011). Tümör hücrelerinin çekirdekleri belirgin çekirdekçik içerir ve çekirdeklerde intrasitoplazmik invaginasyon ve kromatin marjinasyonu görülür (Paradis 2013). İntrasitoplazmik olarak; fibrinojen ve/veya albumin içeren soluk cisimcikler gözlenir. Nadir olarak asiner yapılar, safra ve musin sekresyonu, çok çekirdekli tümör hücreleri, epiteloid granuloamlar ve peliozis hepatitis görülebilir (Fletcher 2013).

1.3.1.1.3.3. Hepatoselüler ve Kolangiyolar Karsinom Kombinasyonu

Hepatoselüler-Kolangiyokarsinom (HCC-CC), hem HCC (hepatik) hem de CC (duktular veya glandular)'ye ait unsurları içinde barından bir tümördür (Odze ve Goldblum 2009, Burt ve ark. 2012). Bu tümörlerin bipotansiyel hepatik progenitör hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Schlageter ve ark. 2014) Bu iki tümör iç içe görülebildiği gibi ayrı odaklar halinde de görülebilir (Meuten 2017). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) hepatoselüler bileşeni; trabeküller, safra üretimi veya

interselüler safra kanaliküllerinin varlığına dayandırarak tanımlamaktadır (Fletcher 2013). Glanduler bileşen ise musin üreten bezlerin varlığıyla ortaya konulmaktadır (Odze ve Goldblum 2009).

1.3.1.1.3.4.Hepatoblastom

Makroskobik Özellikler

Hepatoblastom; sirotik olmayan karaciğerde meydana gelen, tek olduğu gibi multinodüler de olabilen hemorajik ve nekrotik alanlara sahip bir tümördür (Fletcher 2013, Maxie 2016). Miks olmayan fetal hepatoblastomlar normal karaciğer rengindedir. Miks hepatoblastomlar ise kahverenginden yeşile, yeşilden beyaza kadar değişik renklerde olabilir (Hamilton ve Aaltonen 2000).

Mikroskobik Özellikler

Hepatoblastomun iki morfolojik alt tipi mevcuttur. Birincisi sadece epitelyal bileşenlerden (%55) oluşurken, diğeri epitelyal ve mezenkimal unsurları içerir (%45). Epitelyal tip genellikle hem embriyonal hem de fetal paternlerin kombinasyonu şeklindedir (Fletcher 2013). Nadir olarak da sadece fetal bir alt tip meydana gelebilir. Epitelyal ve mezenkimal kökenli olan tipte iğsi hücreler ile birlikte her iki epitelyal paternde mevcuttur. Yaygın olan diğeri bir bulgu ise osteoid dokunun varlığıdır (Odze ve Goldblum 2009).

Epitelyal alt tipte, embriyonal patern olgun olmayan formu temsil eder. Tümör hücreleri yuvarlak-oval çekirdekli ve hafif bazofilik sitoplazmaya sahiptir. Hücreler tübüler, asiner veya rozet benzeri yapıları oluşturma eğilimi gösterir (Fletcher 2013). Fetal patern, olgun formu temsil eder ve tümör dokusu fetal karaciğer dokusuna nispeten daha fazla benzerlik gösterir. Fetal tümör hücreleri normal hepatositlerden daha küçüktür, fakat embriyonal tümör hücrelerinden hafif de

olsa daha büyüktür. Fetal tümör hücreleri eozinofilik veya şeffaf bir sitoplazmaya sahip olup, şeffaf sitoplazma lipid veya glikojen birikimi nedeniyle meydana gelir. Eozinofilik ve şeffaf sitoplazmalı hücreler aynı tümörde gözlenir (Odze ve Goldblum 2009). Hem embriyonal hem fetal paternlerde mitotik figürlere nadir olarak rastlanır (Meuten 2017). Ekstramedüller hematopoiezis sıkça görülen bulgulardan olup fetal komponentle daha fazla ilişkilidir (Rosai 2011).

Daha az sıklıkla görülen hepatoblastom alt tipleri; Küçük Hücreli İndiferansiye Tip, Makrotrabeküler Tip ve Teratoid Tiptir (Fletcher 2013). Küçük hücreli tip, hepatoselüler indiferansiye küçük hücre tabakalarından meydana gelir (Odze ve Goldblum 2009). Makrotrabeküler tip; 10 hücre kalınlığından daha geniş trabeküllerden oluşur (Hamilton ve Aaltonen 2000, Rosai 2011). Teratoid alt tipi hepatoblastom olgularında tümör dokusunda bağırsak bezleri, skuamöz epitel, kıkırdak, iskelet kası, sinir dokusu gibi farklı dokulara ait epitelyal ve mezenkimal bileşenler bulunur (Ferrell ve Kakar 2011, Fletcher 2013).

1.3.1.2. Safra Kanalı Tümörleri

1.3.1.2.1. Benign Safra Kanalı Tümörleri

1.3.1.2.1.1. Safra Kanalı Hamartomu

Makroskobik Özellikler

Von Meyenburg veya Moschowitz Kompleksi olarak da bilinen Safra Kanalı Hamartomu, multiple, küçük-orta boylu beyaz renkli düzensiz nodüler lezyonlar tarzındadır (Rosai 2011).

Mikroskobik Patoloji

Mikroskobik olarak küçük-orta boyutlu duktuler yapılardan oluşurlar. Tipik olarak bu yapılar normal kanallardan daha fazla dilate olmuştur ve kollagen doku ile ayrılmışlardır. Lezyonlar genellikle portal bölgede veya periferinde lokalize olur. Duktuller yuvarlak veya oval çekirdekleri olan küboidal ya da yassı hücreler ile

kaplanmıştır (Odze ve Goldblum 2009). Lumenleri eozinofilik döküntü veya safra içerir. Bu lezyonların malign potansiyeli yoktur (Hamilton ve Aaltonen 2000).

1.3.1.2.1.2.Safra Kanalı Adenomu

Makroskopik Özellikler

Safra Kanalı Adenomları küçük boyutlu, sıkı kıvamlı beyaz-gri-bronz renkli, iyi sınırlandırılmış fakat kapsüllenmemiş lezyonlardır (Fletcher 2013). Vakaların % 80'inden fazlası tek odak şeklindedir (Odze ve Goldblum 2009). Genellikle subkapsüler yerleşimli olmakla birlikte parankim içinde de gelişebilir (Rosai 2011, Maxie 2016). Özellikle sirozun meydana geldiği alanlarda oluşur (Hamilton ve Aaltonen 2000).

Mikroskopik Özellikler

Mikroskopik olarak; küçük ya da hiç lumeni bulunmayan tubuler yapılardan oluşmuşlardır. İnflamasyon ve/veya fibrozis sıklıkla görülür (Rosai 2011). Duktüller, yuvarlak-oval şekilli çekirdekleri olan küboidal tarafından kaplanmıştır (Hamilton ve Aaltonen 2000, Meuten 2017). Mitotik aktivite görülmez (Maxie 2016). Metastatik renal karsinomaya benzeyen ve şeffaf hücrelerden oluşan bir varyantı tanımlanmıştır. Ayrıca belirgin fibröz stromaya sahip olan Biliyer Adenofibroma tipi de saptanmıştır (Rosai 2011).

1.3.1.2.1.3.Hepatobiliyer Kistadenoması ve Kistadenokarsinoması

Makroskopik Özellikler

Hepatobiliyer kistadenomalar hemen hemen daima multilokülerdir (Geller ve Petrovic 2009). Kistler seröz, musinöz, jelatinöz, kan veya purulent materyal

içerebilir (Rosai 2011). Genellikle kistadenomalar normal biliyer kanalla bağlantı kurmazlar (Odze ve Goldblum 2009).

Mikroskopik Özellikler

Musinöz ve seröz tip olmak üzere iki histolojik varyant tanımlanmıştır. Müsinöz tip daha yaygındır (Hamilton ve Aaltonen 2000). Kistler tipik olarak musinöz tipteki tek sıralı epitel hücre tabakası ile kaplanır. Hücreler düz, küboidal veya kolumnar olabilir. Kistlerin iç yüzeyine doğru küçük papiller uzantılar şekillenebilir. Epitel hücrelerinin çekirdekleri bazal lokalizasyonda olup mitotik aktiviteleri yoktur. Kist duvarlarında makrofaj infiltrasyonu, kalsifikasyon veya skar dokusu görülebilir (Fletcher 2013). Seröz tipte duktuller, glikojen içeren şeffaf sitoplazmalı kübik hücreler tarafından kaplanmıştır. Kistadenomlardan köken alan kistadenokarsinomlar genellikle tubulopapiller tarzda histolojik görünüm sergilerler. Nükleer pleomorfizm, mitotik figürler, epitelin çok katlı olması gibi özellikler malign transformasyonu işaret eder ve in situ kistadenokarsinomların göstergesidir. Bununla birlikte, tümör hücrelerinin stromal invazyonu invaziv karsinomun kuvvetli bulgusudur (Odze ve Goldblum 2009).

1.3.1.2.1.4.Basit Biliyer Kist

Makroskopik Özellikler

Tipik olarak berrak sarı sıvı içeren basit biliyer kistler karaciğer kapsülünün altına yerleşmekle birlikte parankimin derinlerinde de bulunabilir (Fletcher 2013).

Mikroskopik Özellikler

Basit kistler, küboidal ya da kolumnar epitel ile kaplanmış olup fibröz duvarı vardır. Epitel yapısı düz duvarı ise kalın şekillenebilir (Odze ve Goldblum 2009).

1.3.1.2.1.5. Diğer Nadir Benign Biliyer Tümörler veya Lezyonlar

Nadir olarak gözlenen biliyer adenofibrom yeni tanımlanmıştır ve benign özellik taşır. Lezyon solid ve mikrokistik alanlara sahip duktuler ve stromal elementler içerir. Kanalları döşeyen epitel hücreleri küboidal, kolumnar ya da düz olabilir. Bazı kistlerin lumeninde eozinofilik sıvı olabilir. Kanallar arasında fibröz bir septum mevcuttur. Seröz kistadenomlar da karaciğerde nadir olarak gözlenir. Bu tümörler sitoplazmalarında glikojen içeren küboidal epitel hücreleri tarafından kaplanan çok sayıda mikrokistten oluşur. (Fletcher 2013).

1.3.1.2.2. Malign Safra Kanalı Tümörleri

1.3.1.2.2.1. Kolangiyokarsinom

Makroskobik Özellikler

Kolangiyokarsinom safra kanalından köken alan bir adenokarsinomdur (Burt ve ark. 2012). Tümörün periferik, hilar ve ekstrahepatik varyantlarında bulunan yoğun fibröz doku nedeniyle kıvamı sert rengi ise beyaz-bronzdur (Suriawinata ve Thung 2011). İntraduktal papillomatöz varyantında ise tümörün kıvamı yumuşak olup karnabahar görünümündedir (Odze ve Goldblum 2009).

Mikroskobik Özellikler

İyi diferensiyel olmuş tümörler tubuler, papiller ve kord benzeri paternler gösterir ve sitolojik atipi minimal düzeydedir (Fletcher 2013). Bununla birlikte fokal olarak atipi alanları (artmış çekirdek-sitoplazma oranı, belirgin çekirdekçik, polarite kaybı vb) görülebilir (Geller ve Petrovic 2009). İntrasitoplazmik lumen oluşumu, fokal kribriform yapı, nükleer tabakalaşma ve intraluminal hücrel döküntü karsinom tanısını destekleyen bulgulardır. Belirgin bir fibröz stromaları vardır. Stroma bazen neoplastik bezlerin çevresinde dairesel olarak yer alır (Meuten 2017). İyi diferensiyel tümörlerde epitel hücreleri kolumnardan küboidal şekle kadar değişiklik gösterebilir. Hücreler hafif granüler eozinofilik sitoplazma içerebilirler

(Maxie 2016). Çekirdekler genellikle küçük olup HCC'yi oluşturan hücrelerden farklı olarak belirgin eozinofilik çekirdekçiklerden yoksundur. Tümör hücreleri sinüzoidler boyunca büyüme gösterir ve karaciğerde intravasküler olarak yayılır (Burt ve ark. 2012). Musin çoğu vakada belirlenebilir. Desmoplastik stroma önemli özelliklerinden biridir. Mitoz seyrekdir. Bazen tümör hücreleri duktulleri veya Hering kanallarını andıran küçük dar tubuler yapılar oluşturabilir. Bu patern kolanjiyoselüler karsinom olarak isimlendirilmiş fakat daha sonra kombine HCC-CC'nin kök hücre varyantı olarak kabul edilmiştir (Odze ve Goldblum 2009). Nadir olarak gözlenen diğer mikroskobik varyantları ise şeffaf hücreli, adenoskuamöz, musinöz, taşlı yüzük, sarkomatöz, mukoepidermoid ve Epstein-Barr Virus (EBV) ile ilişkili lenfoepitelyoma benzeri karsinomadır (Rosai 2011).

1.3.1.3. Mezenkimal Tümörler

1.3.1.3.1. Benign Mezenkimal Tümörler

1.3.1.3.1.1. Hemangiyom

Makroskobik Özellikler

Hemangiyomlar iyi sınırlanmış, kırmızı veya kırmızı-kahverenginde ve genelde süngerimsi yapıya sahip tümörlerdir (Hamilton ve Aaltonen 2000, Rosai 2011).

Mikroskobik Özellikler

Bu tümörün tipik özelliği kavernöz vasküler yapıların varlığıdır (Rosai 2011). Kavernöz yapıların duvarı endotelial hücrelerle kaplı olup fibröz bantlarla birbirlerinden ayrılır (Fletcher 2013).

1.3.1.3.1.2.Angiyomyolipom

Makroskopik Özellikler

Lezyon; adipöz doku, düz kas ve kan damarlarından oluşan benign bir tümördür (Suriawinata ve Thung 2011). İyi sınırlanmakla birlikte kapsül yoktur. Et kıvamında veya serttir. Kesit yüzünde nekroz ve hemorajiye rastlanır. Renk ise sarı, sarı-bronz veya bronzdur (Hamilton ve Aaltonen 2000).

Mikroskopik Özellikler

Tümör epiteloid veya iğ şekilli hücrelerden oluşur ve bu hücreler kan damarlarını çevreler. Epiteloid hücreler poligonal şekilli ve eozinofilik sitoplazmaya sahiptir. Çekirdekleri büyük ve belirgin bir çekirdekçik içermekle birlikte görünüşleri değişkenlik sergileyebilir. İğsi hücrelerin eozinofilik sitoplazmaları ve oval küçük çekirdekçikleri vardır. Epiteloid hücrelerden oluşan trabeküller bulunabilir. Epiteloid veya iğsi hücrelerden biri tümörde baskın olabilir. Vasküler bileşen tipik olarak kalın duvarlı arteriyel veya ince duvarlı venöz kanallardan oluşur. Tümör kitlesinde adipöz doku hücrelerine tek tek ya da kümeler halinde rastlanabilir. Köpük hücrelerine de sıklıkla rastlanabilir (Odze ve Goldblum 2009). Ekstramedüller hematopoizeis karakteristiktir (Hamilton ve Aaltonen 2000).

1.3.1.3.1.3. İnflamatuvar Psödötümör

Makroskopik Özellikler

Bu tümörlerin boyutu değişkenlik gösterir. Sıklıkla soliter (% 81) olmakla birlikte multiple de (%19) olabilir. Soliter tümörlerin yaklaşık yarısı sağ loba yerleşir. Tümör kitlesi 1 cm'den tüm lobu kaplayacak şekilde olabilir. Bronz, sarı-beyaz veya beyaz renkli sert tümörlerdir (Hamilton ve Aaltonen 2000).

Mikroskopik Özellikler

İnflamatuvar Psödötümör mikroskopik olarak inflamatuvar hücreler ile fibröz dokudan oluşur. Tümör dokusunda sözü edilen hücrelerin oranı değişkenlik gösterebilir (Odze ve Goldblum 2009). Her iki İnflamatuvar Psödötümör tipinde de inflamatuvar hücrelerin büyük bir kısmı plazma hücrelerinden oluşmaktadır. Bunun yanında nötrofil, eozinofil ve lenfositler (ağırlıklı olarak T lenfositler) de bulunabilir (Hamilton ve Aaltonen 2000). Makrofajlar görülür. Sklerotik odaklar yaygındır. Mitoza rastlanabilir (Fletcher 2013).

1.3.1.3.1.4.Mezenkimal Hamartom

Makroskopik Özellikler

Makroskopik olarak kistik yapı gözlenir ve bronz renktedir (Rosai 2011). Tümör büyük boyutlara ulaşabilir. Kistler şeffaf bir sıvı veya jelatinöz bir materyal içerebilir ve gevşek mezenkimal dokunun dejenerasyonu sonucu gelişir (Hamilton ve Aaltonen 2000). Kistik yapılardaki sıvı birikimi sebebiyle tümör genişler (Odze ve Goldblum 2009).

Mikroskopik Özellikler

Mezenkimal Hamartomlar mikroskopik olarak epitelyal ve stromal unsurları içerir (Ferrell ve Kakar 2011). Epitelyal unsurlar nispeten normal görünümlü hepatositlerden ve safra kanallarından meydana gelmekte olup bunlar da mikzoid veya fibröz stroma ile kuşatılmıştır (Hamilton ve Aaltonen 2000). Stromada küçük vasküler yapılar, iğsi hücreler ve inflamatuvar hücreler bulunur. Tipik olarak normal görünümlü portal kanallar bulunmaz. Ekstramedüller hematopoiezise sıkça rastlanır (Odze ve Goldblum 2009).

1.3.1.3.1.5.İnfantil Hemangiyoendotelyom

Makroskopik Özellikler

Tümörler soliter ya da multiple olabilir. Büyük ve soliter tümör odakları kırmızı-kahverengi veya kırmızı-bronz rengindedir. Sıkça hemorajik fibrotik merkeze ve fokal kalsifikasyon alanlarına sahiptir. Küçük lezyonların kesit yüzü süngerimsi görüntüde olup kırmızı-kahverengindedir (Hamilton ve Aaltonen 2000).

Mikroskopik Özellikler

Mikroskopik olarak, iki histolojik alt tipi tanımlamış olup bu tipleri birbirinden ayırmak oldukça zordur. Birinci histolojik alt tipi; küçük vasküler yapılar ve düzensiz şekilli kavernöz boşluklar gösterir. Vasküler yapılar endotelial hücrelerle döşenmiş olup dağınık kollagen ve retikülin iplikçikleri içeren düzensiz bir stroma ile birbirinden ayrılır. Tümörün periferinde küçük safra kanalları ve hepatositler görülebilir. Fokal nekroz, hemoraji, fibrozis ve kalsifikasyona sıkça rastlanır. İkinci histolojik alt tipinde atipik endotelial hücreler, artmış mitotik aktivite ve belirgin olarak nükleer hiperkromazi görülür. Bu tipte tümör hücreleri tomurcuklanma veya dallanma şeklinde gelişim gösterirler (Odze ve Goldblum 2009).

1.3.1.3.2. Malign Mezenkimal Tümörler

1.3.1.3.2.1.Angiyosarkom

Makroskopik Özellikler

Angiyosarkomlar sıklıkla belirgin sınırlara sahip olmayan büyük hemorajik tümörlerdir (Fletcher 2013). Tüm karaciğeri etkileyebilirler (Hamilton ve Aaltonen 2000).

Mikroskopik Özellikler

Tümör; sinüzoidal, solid, papiller ve kavernoöz tipte gelişim gösteren mikroskopik histolojik paterne sahiptir (Odze ve Goldblum 2009). Sinüzoidal paternde hepatik hücre kordonlarının parçalanması ve sinüzoidal genişleme gözlenir (Hamilton ve Aaltonen 2000). Hücre kordonlarını saran endotel hücreleri normal endotel hücrelerinden daha büyük, sayıca daha fazla ve hiperkromatiktir. Tümörün periferine yerleşen sinüzoidal patern daha sonra solid veya papiller forma dönüşebilir bu nedenle sinüzoidal patern tümörün erken gelişim evresini temsil edebilir. Solid patern fasiküler bir görünüme sahip olabilir ya da fibrosarkomu andırabilir. Papiller paternde tümör hücreleri lumene doğru çıkıntı yaparlar. Kavernoöz paternde ise geniş, kanla dolu kavernoel şekillenir. Mikroskopik tümör olgularında en sık görülen paterndir (Odze ve Goldblum 2009). Tümör hücreleri iğ şeklinde veya yuvarlaktır. Sınırları belirgin olmamakla birlikte sitoplazmaları hafif eozinofilik, çekirdekleri hiperkromatik ve eozinofilik bir çekirdekçik içerir (Hamilton ve Aaltonen 2000). Çok çekirdekli büyük hücreler görülebilir bunun yanı sıra mitotik figürlere rastlanabilir (Geller ve Petrovic 2009).

1.3.1.3.2.2.Epiteloid Hemangiyoendotelyom

Makroskopik Özellikler

Tümör odakları genelde multifokaldir (Geller ve Petrovic 2009). Her iki hepatik lobta da görülebilir (Rosai 2011). Sert kıvamlı ve bronz-beyaz renktedir. Belirgin sınırları yoktur (Hamilton ve Aaltonen 2000). Kalsifikasyon içerebilir (Ferrell ve Kakar 2011).

Mikroskopik Özellikler

Mikroskopik olarak, tümör hücreleri dendritik veya epiteloid olabilir (Geller ve Petrovic 2009). Dendritik hücreler düzensiz şekilli ya da yıldız görünümünde hücrelerdir. Epiteloid tümör hücreleri dendritik hücrelere göre daha yuvarlak ve bol

sitoplazmaya sahiptir. Nükleer atipi ve mitoz genellikle epiteloid hücrelerde görülür (Hamilton ve Aaltonen 2000). Bu hücrelerin sıkça vasküler boşluklar küçük papiller üremeler gösterdiği gözlenir (Rosai 2011). Her iki hücre tipi de mikzoid veya fibröz stroma ile kuşatılır. Stromada kalsifikasyon gözlenebilir. Tümör dokusunda özellikle perifer alanlarda safra kanalları görülebilir (Odze ve Goldblum 2009).

1.3.1.3.2.3.Kaposi Sarkomu

Makroskopik Özellikler

Kaposi sarkomu; düzensiz, farklı boyutlarda, multifokal, sıkça portal triad yerleşimli, hemorajik kırmızı-kahverengi odaklarla karakterizedir (Hamilton ve Aaltonen 2000, Fletcher 2013).

Mikroskopik Özellikler

Mikroskopik olarak tümör iğsi hücrelerden oluşur ve yarık benzeri boşluklar, solid veya fibrosarkomatöz tipte gelişme paternleri görülebilir. Pleomorfizm ve mitoz en alt seviyededir (Fletcher 2013). Karaciğer kaposi sarkomunun tipik bir paterni; tümör hücrelerinin sinüzoidal boşluklara doğru gelişmesidir. Bu paternde normal sinüzoidlerin yerini içleri eritrositlerle dolu dilate kanallar alır bu da karaciğere peliotik bir görünüm kazandırır. Tümör aynı zamanda portal kanalları kuşatma ve istila etme eğilimindedir (Odze ve Goldblum 2009).

1.3.1.3.2.4.Andiferansiye (Embriyonal) Sarkom

Makroskopik Özellikler

Embriyonal sarkomlar genelde büyük ve yumuşak bir yapı sergileyen, kistik ve solid alanlara sahip tümörlerdir. Beyaz renkli, parlak, jelatinöz yüzeye sahiptir. Bunun yanında nekroz ve hemoraji alanları da sıkça görülür (Fletcher 2013).

Genellikle sağ loba yerleşir, iyi sınırlandırılmış olup kapsül görülmez (Hamilton ve Aaltonen 2000).

Mikroskobik Özellikler

Mikroskobik olarak mikzoid stromada kompakt veya gevşek olarak yerleşmiş iğsi ve yıldız şekilli hücrelerden oluşur. Tümör hücreleri hiperkromatik olup anizonükleozis görülür. Tümör dokusunda çok çekirdekli dev hücrelerine rastlanır (Ferrell ve Kakar 2011). Tümör hücrelerinin sitoplazmasındaki eozinofilik globüller karakteristik bir özellik olup mitoz sıkça görülür. Tümörün periferinde hepatosit ve safra kanallarına rastlanır (Hamilton ve Aaltonen 2000).

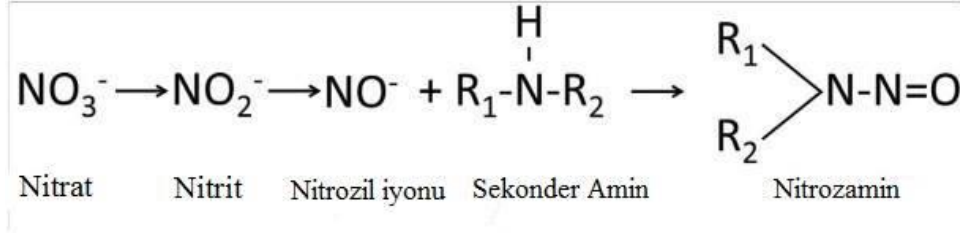
1.3.2. Sekonder Karaciğer Tümörleri (Metastatik Tümörler)

Karaciğerde metastatik tümörler primer tümörlerden daha sık görülür ve bu oran 1/20'dir. Lenf nodundan sonra metastazın en sık görüldüğü organdır (Varolüneş ve ark. 1997). Karaciğer metastazı, primer tümör odağına ve venöz drenaja bağlı olarak değişir. Kava ve porta tipi olmak üzere iki tip metastaz vardır. Kava tipinde (örn: kemik, meme, prostat ve böbrek kanserleri) hepatik arter metastaz yoludur. Direkt tümör odağından ya da akciğer filtresine maruz kaldıktan sonra gelebilirler (akciğer ve meme kanseri gibi). Bu sebeplerden ötürü izole karaciğer metastazı daha az gözlenir. Portal tipte ise, gastrointestinal organ kanserlerinden metastaz söz konusudur ve yüksek oranda görülür. Bu tipte izole metastaz ağırlıktadır. Kolon, rektum ve pankreas kanserlerinde izole tutulum siktir, fakat az da olsa multiple metastaz da gözlenir (Göksoy ve Kapan 2002). Tüm kanser vakalarının yaklaşık olarak üçte birinde karaciğer metastazı gözlenmektedir. Mide, meme, akciğer, özofagus, pankreas, kolon, melanom, genital kanserler ve malign lenfomalar karaciğer tutulumu yapabilirler (Tözün 1989).

1.4.Nitrozaminler ve Dietilnitrozamin (DEN)

Nitrit (NO_2^-); karsinogenik etki gösteren N-nitrozo bileşiklerinin prekürsör maddesidir. NO_2^- , asidik ortamda azotlu asite dönüşür ve azotlu asitler de sekonder aminler ile reaksiyona girerek nitrozamin bileşiklerini oluştururlar (Yerlikaya ve Gökoğlu 2002, Ekici ve ark. 2008). Nitrozaminler bazı kozmetiklerde, böcek öldürücü ilaçlarda ve kauçuk ürünlerinin çoğunun üretiminde kullanılır (Kujawska ve ark. 2011, Atakişi ve Merhan 2017). Nitrozaminler lateks ürünlerinde, tahıllarda, çayda, birçok gıdada, sigarada ve sigara dumanında bulunur (Subramaniyan ve ark. 2014, Atakişi ve Merhan 2017). Aynı zamanda, doğada bol miktarda bulunan Nitrat (NO_3^-)'ın bakteriler tarafından NO_2^- 'e indirgenmesiyle (Şekil 14) oluşur (Özdestan ve Üren 2010). N-nitrozaminler belirli bir oranda gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmakla birlikte belirli bir seviyenin üstündeki alımı ciddi sağlık problemlerine yol açar (Rezaie ve ark. 2013, Atakişi ve Merhan 2017). Nitrozaminler çoğunlukla et ve süt ürünlerinde bulunur (Ayar ve Özdemir 2002, Turp ve Sucu 2016). Et ve süt ürünlerindeki bu nitrozaminlerin ilk oluşumu ağız boşluğunda görülür. Tükürük salgıları bol miktarda NO_3^- içerir ve bu NO_3^- nitrat redüktaz enzimi tarafından NO_2^- 'e indirgenir. Bu NO_2^- nitrozaminlerin oluşumuna neden olur. Bu bileşikler mideye sindirim veya sigara içmek gibi çeşitli şekillerde alınabilir veya asidik koşullardaki NO_2^- ve aminlerin tepkimesiyle oluşturulabilir (Ata 2010). Midede ve bağırsaktaki bazı bakteriler, NO_3^- 'ın NO_2^- 'e dönüşümünü kolaylaştırarak nitrozaminlerin oluşumunu arttırır (Öztürk ve ark. 2015). NO_2^- midenin asidik ortamında nitröz aside dönüşür ve nitröz asit, nitrozaminleri oluşturmak için ortamdaki aminler ile reaksiyona girer (Palamutoğlu ve Sarıçoban 2012).

Nitrozaminler mutajenik, kanserojenik ve teratojenik özelliklerinden dolayı önemli bir ekolojik kaygı kaynağıdır ve bu bileşenlerin insanlar için büyük sağlık problemlerine neden olduğu kabul edilmektedir (El-Shahat ve ark. 2012, Subramaniyan ve ark. 2014).



Şekil 14. NO₃⁻'dan Nitrozamin oluşumu (Atakişi ve Merhan 2017).

Nitrozaminlerin metabolizması primer olarak karaciğerde meydana gelmektedir. Başta DEN olmak üzere bazı nitrozaminler zararlı etkilerini ilk olarak kanda fakat özellikle karaciğerde gerçekleştirir. Böbrek gibi kan akımının fazla olduğu organlar daha az düzeyde etkilenir. İnsan ve hayvanlarda ağız yoluyla alınan nitrozaminler, sindirim kanalından emilerek yarım saat içerisinde kana geçer. Bir defada alınan dozun % 70'i ilk 8 saatte, geri kalan kısmı ise 24 saat içerisinde vücuttan uzaklaştırılır. Metabolize olan ürünlerin % 40-65 'i solunum yoluyla, % 7'si idrar yoluyla herhangi bir değişime uğramaksızın vücuttan atılırken, geri kalan kısmı dokulara dağılır (Tekin 2013).

Nitrozaminler yapısal olarak N-Nitrozamidler ve N-Nitrozodialkilaminler olarak ikiye ayrılır. Her iki bileşik de DNA hasarı oluşturabilecek alkilasyon yeteneğindedir. N-Nitrozamidlerin aksine, N-Nitrozodialkilaminler DNA hasarını indüklemek için sitokrom p450'ye bağlı monooksijenaz sistemi enzimlerinin aracılık ettiği metabolik aktivasyona (α -hidroksilasyon) ihtiyaç duyar (Paula Santos ve ark. 2014).

Bir N-Nitrozo alkil bileşeni olan DEN (DNA, NDEA, C₄H₁₀N₂O) en önemli çevresel karsinojenlerden biri olup güçlü bir hepatotoksin ve hepatokarsinojen olarak hayvan deneyi modellerinde kullanılmaktadır (Pradeep ve ark. 2007, Ramakrishnan ve ark. 2009, Kumar ve Vijayalakshmi 2015).

Ratlarda DEN ile deneysel olarak oluşturulan HCC modeli, hepatokarsinogenezi incelemek için yaygın olarak kullanılmakta olup oldukça kabul görür (Bishayee ve Dhir 2009). İnsan karaciğeri rat karaciğerine benzer şekilde nitrozaminleri metabolize etmekte olup morfolojik ve genomik değişikliklerin

yanında gen ekspresyonu bakımından da benzer değişikliklere neden olur (Ghosh ve ark. 2012).

DEN, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından insanlarda önemli karsinojenlerinden biri olarak kategorize edilmiştir (Kujawska ve ark. 2011). İki aşamalı (inosiyasyon ve promosyon) hepatokarsinogenik çalışma protokollerinde inisiye edici bir ajan olarak kullanılmakta olan DEN, rat karaciğerinde kromozomal bozukluklulukları, mikronükleus oluşumunu ve kardeş kromatid değişimlerini indüklemektedir (Sreepriya ve Bali 2005).

DEN, DNA onarımı ve replikasyonunda yer alan nükleer enzimlerde pertürbasyonlara neden olur (Jayakumar ve ark. 2012). DEN birçok hayvan türünde; karaciğer, mide, akciğer ve hematopoietik organlar gibi çeşitli organlarda tümör oluşumuna neden olan önemli bir karsinojendir (Aiub ve ark. 2011, Santos ve ark. 2014).

DEN, sigara dumanında, yüksek nitrat seviyesine sahip yeraltı sularında, çedar peynirinde, soya fasülyesinde, kürlenmiş ve kızartılmış yemeklerde, tuzlanmış ve kurutulmuş balıklarda, alkollü içeceklerde, kozmetik ürünlerde, tarımsal kimyasallarda ve endüstriyel ürünlerde (örn : elyaf, copolymerler ve yağ üretiminde) bulunmaktadır (Rezaie ve ark. 2013, Patial ve ark. 2015). Buna ek olarak bazı ilaçların metabolizması sonucunda da üretilmektedir. Sigara dumanında (1-28 ng/adet sigara ve biberon emziğinde (10 ppb seviyesinde) bulunmaktadır (Pradeep ve ark. 2007).

DEN'in karsinogenik etkisi; başlıca sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) olmak üzere faz I sitokrom p450 enzimleri (CYP) ile hidroksile edilmesi ve alkilasyon mekanizması ile biyoaktif hale dönüştürülmesiyle mümkündür (Bingül ve ark. 2013). Biyoaktifleşme sonrası oluşan ara ürünler (06-etil deoksi guanozin ve 04- ile 06-etil deoksi timidin) çeşitli enzimlerin bağlanma bölgelerine düşük affinite gösterirler, bu nedenle idrarla atılım yerine hücrelerin önemli bileşikleri ile kovalent bağlar oluştururlar. Sonuç olarak mutasyonlara, nekroza ve kansere neden olurlar (Merhan

ve ark. 2016). Biyoaktivasyon süreci karsinogenezisi başlatmak için önemli bir adımdır (Bingül ve ark. 2013). Biyoaktif hale gelen DEN, DNA ile reaksiyona girer ve bazların etilasyonuna sebep olur. Etil DNA adüktleri baz çiftlerini keser, mutasyonlara, protonkogenlerin aktivasyonuna (örn: RAS) ve tümör süpresör genlerin inhibisyonuna (örn: p53) yol açar. Bu durum çoğunlukla hepatoselüler karsinoma ile sonuçlanmaktadır (Matsuda ve ark. 2005).

DEN'in reaktif elektrofillere metabolize (CH_3CH_2^+) olmasının yanı sıra, oksidatif stres ve hücrel hasarla sonuçlanan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olduğu ileri sürülmüştür. ROS üretimi DEN'in karsinojenik etkilerinden sorumlu tutulmaktadır (Shaarawy ve ark. 2009). DEN metabolizması sırasında oluşan ROS farklı biyomoleküllerle (nükleik asit, protein, lipid vb) reaksiyona girer (Aparicio-Bautista ve ark. 2013). ROS varlığı protein karbonilasyonuna, lipidlerin peroksidasyonuna ve DNA hasarına yol açarak sitotoksisite, karsinojenite ve mutajeniteye yol açar (Ali ve ark. 2014).

Oksidatif stres; aşırı ROS varlığı, antioksidanların tükenmesi veya her ikisi nedeniyle kritik denge bozulduğunda meydana gelir (Ghosh ve ark. 2012). Hücrelerdeki biyomoleküller ve makromoleküller oksidatif stresin başlıca hedef noktası olup, membran ve nükleer parçalanmaya, kromozom anomalilerine ve karsinogenezisi tetikleyen lipid peroksidasyonuna neden olur (Gupta ve ark. 2013b). DEN tarafından meydana getirilen hepatotoksisitede oksidatif stres merkezi bir rol oynamaktadır (Kumar ve Vijayalakshmi 2015).

Lipid peroksidasyonu (LPO) karsinogeneziste önemli rol oynar. Biyolojik açıdan çalışılan en önemli serbest radikal zincir reaksiyonudur. LPO, hidroksil radikalının metilen grubundan bir hidrojen kopartmasıyla başlar (Ramakrishnan ve ark. 2006). LPO, serbest radikal reaksiyonlarının zararlı bir sonucu olup biyomoleküllerin parçalanmasına, hücre ve dokuların işlev bozukluklarına yol açar. LPO, MDA (Malondialdehit) ile 4-hidroksinonenal gibi çok sayıda toksik ürünün oluşumuna neden olabilir. Bu ürünler, DNA dahil olmak üzere pek çok hücrel hedeflere saldırır, mutajeniteyi ve karsinojeniteyi indükler (Babu ve ark. 2012).

Yapılan çalışmalarda DEN nedenli hepatokarsinogenezis modelinin esas alındığı araştırmalarda LPO seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir (Ramakrishnan ve ark. 2006).

1.5.Silimarin

Silybum marianum; Asteraceae (Papatyagiller) ailesine ait yıllık veya iki yıllık otsu bir bitkidir (Bosch-Barrera ve Menendez 2015, Abouzid ve ark. 2016). Deve Dikeni, yabani enginar, Blessed Milk Thistle, Chardon de Marie, Holy Thistle, Lady's Thistle, Marian Thistle, Mary Thistle, Shui Fei Jei, St. Mary's Thistle gibi farklı isimlerle de anılmaktadır (Mastron ve ark. 2015). Silimarin, *Silybum marianum* bitkisinin tohumlarından ve meyvelerinden elde edilen bir polifenolik flavonoiddir (Bosch-Barrera ve Menendez 2015). Karaciğer ve safra hastalıklarının tedavisinde 2000 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır (Haddadi ve ark. 2014, Madrigal-Santillán ve ark. 2014). *Silybum Marianum*'un dikenli dalları ve oval yaprakları vardır. Boyu 30 cm'e kadar ulaşır. Çiçekleri parlak pembedir ve çapları 8 cm'e kadar ulaşabilir. Olgunlaşmış bitki mor çiçeklere ve bol dikenlere sahiptir. Deve dikeni, Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve Orta Dođu'da doğal olarak yetişmektedir. Ek olarak Macaristan, Çin, Arjantin, Venezuela ve Ekvador gibi Güney Amerika ülkelerinde yetiştirilmektedir (Resim 1) (Vargas-Mendoza ve ark. 2014).



Resim 1. Silybum marianum bitkisinin dış görünüşü (<http://naturewatch.org.nz/photos/8625246>) (Erişim Tarihi: 28.09.2017).

Eresoslu Theoraptus (M.Ö 4. Yy), Pedanios Dioscorides (M.S 50) ve Yaşlı Plinius (M.S İlk Yy) bitkinin tıbbi yararlarını bildiren ilk kişilerdir (Bosch-Barrera ve Menendez 2015). Eski Yunan ve Roma'da yılan ısırıklarının tedavisinde deve dikeninden yararlanılmıştır. Bitki ayrıca gastrointestinal sistem bozuklukları, menstrüel komplikasyonlar ve varis tedavisinde yüzyıllar boyunca kullanılmıştır (Mastron ve ark. 2015).

1960'lı yıllarda Alman bilim adamları, deve dikenini bitkisinden Silimarin adını verdikleri ham ekstraktları kimyasal yöntemlerle izole ettiler. 1975 yılına gelindiğinde Silimarin'in ana bileşenlerinin Silibin A, Silibin B, İzosilibin A, İzosilibin B, Silikristin A, Silikristin B ve Silidianin olduğu ortaya konuldu. Günümüzde Silimarin'in kimyasal bileşenlerinin, flavonolignanlar, yani flavonoidler ve lignin yapılarının kombinasyonundan oluştuğu bilinmektedir (Madrigal-Santillán ve ark. 2014). 1986 yılında, Almanya'daki Komisyon E tarafından kronik hepatit ve

siroz hastalarında destekleyici ilaç olarak kullanılması onaylanmıştır (Hirayama ve ark. 2016).

Deve dikenini tohumu ürünleri diyet takviyelerinde kullanılmaktadır ve 2005 yılında yaklaşık 8.3 milyon dolarlık satış rakamına ulaşması ile diyet takviye ürünleri sıralamasında ilk ona girmiştir (Keshavarz Afshar ve ark. 2015). 2012 ve 2014 yılında ABD'deki satış rakamları içerisinde deve dikenini ekstraktları en çok satılan bitkisel diyet takviyeleri arasında altıncı sırada yer almıştır (Kawaguchi-Suzuki ve ark. 2014, Abouzid ve ark. 2016).

Silimarin veya Silibini içeren ürünler Avrupa'da Legalon, Hepatron, Thisilyn, Siliphos ve Silipide isimleriyle kullanılmaktadır (Evren ve Yurtcu 2015, Suh ve ark. 2015). Oral ürün (Legalon) hepatik destek diyet takviyesi olarak kullanılırken, damar içi ürün ise öncelikli olarak Amanita phalloides (A.phalloides – Köygöçüren Mantarı) kaynaklı karaciğer hasarının azaltılmasında ve önlenmesinde kullanılmaktadır (Mastron ve ark. 2015).

1.5.1. İçerik

Deve dikeninin tohumları yaklaşık olarak % 70-80 oranında Silimarin içermektedir. Geri kalan yaklaşık olarak % 20-30 oranında bulunan kısım kimyasal olarak tanımlanmamıştır. Silimarin; Silibini, İzosilibini, Silidianini ve Silikristini adı verilen dört adet flavonolignan izomerinden oluşan bir karışımdır. İzomerlerin oranı; Silibini % 60-70, Silikristini % 20, Silidianini % 10 ve İzosilibini % 5'dir (Ashraf ve ark. 2015). Buna ek olarak 2,3-Dehidrosilibini (DHSB), Kuersetini, Taksifolini ve Kaempferol gibi flavonoidler az bir oranda bulunur (Zholobenko ve Modriansky 2014). Tohumları betamin, trimetilglisin ve esansiyel yağ asitleri de içermektedir (Ashraf ve ark. 2015). Silimarin'in moleküler formülü ve molar kütlesi sırasıyla $C_{25}H_{22}O_{10}$ ve 482.44 g mol'dür (Shakeel ve Anwer 2015).

1.5.2. Farmakolojik Özellikler

Farmakolojik araştırmalar, Silimarin'in yüksek fizyolojik dozlarda bile toksik etkiye sahip olmadığını göstermiştir (Ramakrishnan ve ark. 2009). İyi tolere edilir ve hafif yan etkilere sahiptir. İnsanlarda kullanılan yüksek dozlarının (41500 mg/gün) güvenilir olduğu klinik araştırmalarla gösterilmiştir. Baş ağrısı, şişkinlik, hazımsızlık, bulantı, diyare gibi gastrointestinal sistemle ilişkili ve dermatolojik yan etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Fan ve ark. 2014). Deney hayvanlarında yürütölen çalışmalarda Silimarin veya Silibinin'in herhangi bir toksik etki göstermediği belirtilmiştir (Gu ve ark. 2015).

Silimarin doğal bir lipofilik ajan olup, zayıf enterik absorpsiyona, kötü çözünürlüğe ve mide sıvısı etkisiyle bozulması nedeniyle düşük biyoyararlanıma (%23-47) sahiptir (Adhikari ve Arora 2015). Silimarin suda çözünmez ve %70-80 oranında Silimarin ekstresi içeren kapsüllerde üretilir. Oral yoldan alındığında yavaş bir emilime sahiptir. Maksimum plazma düzeyine 4-6 saatte ulaşır, 10 saat içerisinde vücuttan uzaklaştırılır. Büyük bir kısmı vücuttan safra yoluyla uzaklaştırılırken az bir kısmı ise idrar yoluyla uzaklaştırılır. Safra yolu ile uzaklaştırılırken bağırsak florasının etkisiyle hidrolize olur ve tekrar emilir (Bektur 2012). Silimarin'in çözünürlüğünü arttırmak amacıyla etanol, propilen glikol gibi çeşitli çözücüler kullanılmaktadır (Shakeel ve Anwer 2015).

1.5.3. Etki Mekanizması

Silimarin'in etki mekanizmaları henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bununla birlikte literatür verileri doğrultusunda Silimarin ve Silibinin'in dört farklı etki mekanizmasından söz edilmiştir.

a-Antioksidan olarak; intraselöler glutatyon içeriğinin düzenleyicisi ve serbest radikal temizleyicisi

b-Hücre membranı stabilizatörü ve permeabilite düzenleyicisi olarak, hepatotoksik ajanların hepatositlere girişini engellemek

c-Ribozomomal RNA sentezini arttırarak karaciğer rejenerasyonunu stimöle etmek

d-Stellat hepatositlerin miyofibroblastlara dönüşümünü inhibe ederek siroza neden olan kollajen fibrillerin depozisyon sürecini baskılamak (Ashraf ve ark. 2015).

1.5.4. Etkileri

1.5.4.1. Antioksidan Etkileri

Silimarin, siklooksijenaz ve lipoksijenaz yolları vasıtasıyla arasinodik asit kaskadındaki çeşitli basamakları etkileyen serbest radikal temizleyicisidir (Hassani ve ark. 2015). Silimarin, hidroksil, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi serbest radikalleri temizler, lipid peroksidasyonunu azaltır ve Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini artırır. Glutasyon (GSH) homeostazını muhafaza ederek hücrel glutasyon içeriğini düzenler (Razavi-Azarkhiavi ve ark. 2014). Silimarin antioksidan savunma mekanizmasına farklı yollarla katkı sunar. Birinci olarak serbest radikal temizliği yapabilir. İkinci olarak serbest radikal oluşumundan sorumlu spesifik enzimleri inhibe edebilir veya stres koşullarında mitokondrinin elektron taşıma zincirinin bütünlüğünü koruyarak serbest radikal oluşumunu engeller. Üçüncü ve son olarak da çoğunlukla Nükleer Faktör-Eritroid 2-ilişkili Faktör-2 (Nrf2) ve Nükleer Faktör-Kappa B (NF-κB)'yi de kapsayan transkripsiyon faktörleri vasıtasıyla bir dizi antioksidan enzim ve enzimatik olmayan antioksidanların aktivasyonunu sağlar. Bu sayede hücrenin optimal redoks durumunun korunmasına katkıda bulunur (Surai 2015).

1.5.4.2. Membran Stabilizasyonu Üzerine Etkileri

Silimarin hücrel membranları stabilize eder ve membran geçirgenliğini düzenleyerek toksinlerin veya ksenobiyotiklerin girişini engeller (Abdel-Moneim ve ark. 2015, Faedmaleki ve ark. 2016).

1.5.4.3. Rejenerasyon ve Protein Sentezi Üzerine Etkileri

Silimarin nükleolar polimeraz A'nın aktivitesini arttırır ve ribozomal protein sentezinde artışa neden olur, bu sayede karaciğerin rejeneratif kapasitesi ve yeni hepatosit oluşumunu stimüle eder (Neha ve ark. 2014, Abdel-Moneim ve ark. 2015).

1.5.4.4. Anti-Enflamatuar ve İmmun Modülatör Etkileri

Silimarin; lökotrien ve prostaglandin sentezinin inhibisyonu, Kupffer hücreleri ile nötrofil göçünün inhibisyonu, mast hücrelerinin immobilizasyonu yoluyla anti-enflamatuar ve immün modülatör etki gösterir (Moayedı Esfahani ve ark. 2015). Silimarin'in anti-enflamatuar ve immün modülatör etkisini İnterlökin 1 (IL-1), IL-6, TNF- α , granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ve interferon gama (IFN- γ) gibi çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen NF- κ B'yi inhibe ederek gösterir (Neha ve ark. 2014).

1.5.4.5. Antifibrinojenik Etkileri

Silimarin, stellat hücrelerin çoğalmasını ve bu hücrelerin miyofibroblastlara dönüşmesini inhibe ederek karaciğerde antifibrinojenik etki gösterir (Faedmaleki ve ark. 2016).

1.5.4.6. Sitokrom p450 Üzerine Etkileri

Sitokrom p450 enzim sistemi; ilaçlar, kimyasal kanserojenler, steroidler ve yağ asitleri de dahil olmak üzere geniş bir moleköl dizisinin oksidatif metabolizmasını katalize eden faz I enzimleridir (Kawaguchi-Suzuki ve ark. 2014).

Yapılan in vitro çalışmalarda Silimarin'in ve onun ana bileşeni Silibinin'in sitokrom p450 inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark. 2015).

1.5.4.7. Anti-Proliferatif Etkileri

Silibinin'in antiproliferatif etkisi, CDK ve bunlarla ilişkili olan siklinlerin kinaz etkinliğindeki düşüşle ilgili olarak G₁ hücre döngüsünün durdurulmasından kaynaklanır (Nilsson ve ark. 2016). Silibinin'in meme kansinimleri üzerinde farklı mekanizmalarla anti-proliferatif etkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır. Silibinin'in kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmesinde NF-κB büyük önem taşır. İnsan prostat kansinomu ve hepatoselüler kansinoma olgularında Silibinin'in NF-κB üzerindeki inhibe edici rolü ortaya konulmuştur (Yousefi ve ark. 2014).

1.5.4.8. Apoptoz Üzerine Etkileri

Silimarin ve / veya Silibinin, hücre döngüsü düzenleyicilerinin ve apoptozda rol oynayan proteinlerin ekspresyonlarını etkileyerek hücre çoğalması ve apoptoz arasındaki dengeyi düzenler (Noori-Dalooi ve ark. 2014). Silibinin, hücre döngüsünü düzenleyen CDK ekspresyonunu düşürerek ve CDK'yı inhibe ederek bu sayede G₁ ve G₂ safhasında hücre döngüsünü durdurabilen p21 ve p27'nin ekspresyonunda artışa neden olarak apoptozu indükler (Gu ve ark. 2015). Silibinin çeşitli kanser türlerinde apoptoz mekanizmasını harekete geçirmektedir. Silibinin'in tetiklediği apoptoz mekanizması kanser tedavisinde kritik öneme sahiptir (Kim ve ark. 2015).

Literatür verilerine göre Silimarin hepatik kanser hücre hattı HepG2'de, prostat kanser hücre hattı PC-3'de, serviks kanser hattı C-33 A ve Henrietta Lacks (HeLa) Servikal kanser hücreleri ve ağız kanserinde FaDu hücrelerinde apoptozisi indükler. Buna ek olarak Silimarin uygulamasının yumurtalık kanserinde A2780 ve PA-1 hücrelerinde apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Fan ve ark. 2014).

1.5.4.9. Metastaz ve Angiyogenezis Üzerine Etkileri

Silibinin angiyogenezisi ve metastazı baskılar (Gu ve ark. 2015). Pre-klinik araştırmalar Silibinin uygulamasının, kanser hücrelerinin migrator ve invaziv özelliklerini, metastaz yapma kapasitelerini engellediğini göstermektedir. Silibinin; büyüme inhibisyonu, angiyogenezis inhibisyonu, kemosenitizasyon, epitelyal / mezenkimal geçişin düzenlenmesi, adezyon ve motilite invazyonunun düzenlenmesi de dahil olmak üzere kanser hücresinde çoklu sinyal yolaklarını baskılar ve böylece metastazı inhibe eder (Bosch-Barrera ve Menendez 2015). Silibinin'in bu etkisinde metalloproteinazları (MMP), ürokinaz plazminojen faktörünü (uPA), Mitojen ile Aktive Edilen Protein Kinaz (MAPK) yolağı proteinlerini ve Epitelyal-kaderin (E-kaderin)'i regüle etmesi önem taşır (Gándara ve ark. 2014).

1.5.4.10. Kanser Üzerine Etkileri

Araştırmacılar kanserin on önemli özelliğini tanımlamışlardır. Bunlar; büyümede kontrolsüzlük, ölüme karşı direnç, replikatif ölümsüzlük, angiyogenezisin indüksiyonu, invazyon, metastaz, genomik istikrarsızlık, tümör enflamasyonu, bağışıklık sisteminden kaçma ve enerji metabolizmasının yeniden programlanmasıdır. Araştırmalar Silibinin'in insanlarda gözlenen kanserlerde yukarda bahsi geçen özelliklerin hepsini etkileyebilecek kapasitede olduğunu göstermektedir (Bosch-Barrera ve Menendez 2015). Silimarin ve / veya Silibinin anti kanser etkisini, hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz indüksiyonu, angiyogenezis inhibisyonu, invazyon-metastaz ve hücre proliferasyonu inhibisyonu ve anti enflamasyon gibi farklı mekanizmalarla gösterir (Eo ve ark. 2015). Bu regülasyon Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), VEGF reseptörleri, Transkripsiyonun Sinyal İleticileri ve Aktivatörleri (STAT), NF-κB, MAPK, Fosfoinositid-3 Kinaz (PI3K), Protein Kinaz B (Akt), Beta-katenin (β-katenin) üzerinden gerçekteşmektedir (Liang ve ark. 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, Silimarin ve Silibinin'in meme, deri, kolon, serviks, yumurtalık, prostat, akciğer ve karaciğer kanserlerinde anti kanser özellik gösterdiğini bildirmiştir (Fan ve ark. 2014, Ben Rahal ve ark. 2015).

1.5.4.11. Sitoprotektif Etkileri

Silimarin; rejeneratif ve antioksidan özelliklerinden dolayı hepatoprotektif, kardiyoprotektif, nefropotektif ve nöropotektif bileşen olarak etki eder (Surai 2015).

Silimarin, akut ve kronik viral hepatitte, mantar zehirlenmesinde (A.phalloides), etanol, DEN ve karbontetraklorür (CCl₄) toksikasyonlarında, alkolizmde ve sirozda hepatoprotektif etkilidir (Moayedı Esfahani ve ark. 2015, Csupor ve ark. 2016, Kim ve ark. 2016). Silimarin'in hepatoprotektif özelliği antioksidan ve immun sistemi düzenleyici etkisinden kaynaklanmaktadır. Silimarin, lipid peroksidasyonunu inhibe eder, GSH oksidasyonunu azaltır, hepatosit yenilenmesini sağlar, karaciğeri detoksifiye eder, glukuronidasyonun artırılmasına yardımcı olur, GSH tükenmesini önler. Antifibrotik, antiinflamatuvar ve membran stabilizatör etkileri de hepatoprotektif özelliğini destekler (Moayedı Esfahani ve ark. 2015).

Silimarin güçlü antioksidan, sitoprotektif ve anti-enflamatuvar etkileri nedeniyle kardiyoprotektif özelliklere sahiptir (Khezri ve ark. 2016). Endojen antioksidan enzimleri yeniler, nötrofil infiltrasyonunu baskılar, serum malondialdehid (miyokardial lipid peroksitlerin son ürünü) ve laktat dehidrogenaz (LDH) düzeylerini azaltır. Böylece kardiyotoksisite modellerine ve iskemik reperfüzyon (I/R) hasarına karşı koruyucu etki gösterir (Moayedı Esfahani ve ark. 2015). Silimarin ayrıca kuvvetli bir hipolipidemik ajandır (Ramakrishnan ve ark. 2009). Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunda önleyici etki gösterir. Bu özelliği sayesinde anti aterosklerotik özelliktedir (Dabak ve Kocaman 2015).

Silimarin; DNA'ya bağı RNA polimeraz A'yı uyararak gen ekspresyonunu, SOD ve Glutasyon Peroksidaz (GPX) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini indükler ve bu sayede hücrede protein sentezi ile glutasyon miktarı artar. Yüksek glutasyon seviyeleri, DNA sentezi için gerekli olan sülfidril gruplarının ve pankreas hücreleri tarafından salınan antioksidan enzim sentezinin restorasyonunu sağlar. Bu da serbest radikal kaynaklı hasarın önlenmesine katkıda bulunur (Ebrahimpour Koujan ve ark. 2015). Ratlarda yürütülen bir çalışmada Alloksan nedenli pankreatik hasarın düzeltilmesinde Silimarin'in etkili olduğu ortaya konulmuştur (Dabak ve Kocaman 2015). Silimarin ayrıca anti hiperglisemik, anti diabetik, anti obezite özellikleri taşımakta olup diabetik nöropati olgularının önlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Kazazis ve ark. 2014, Oufi ve Al-Shawi 2014).

Silimarin, Sisplatin, Adriamisin ve Gentamisin nedenli nefrotoksisiteye karşı koruyucudur (Dabak ve Kocaman 2015). Farelerde yapılan çalışmalar Silimarin uygulamasının renal (I/R) hasarı azalttığını, malondialdehit düzeylerini düşürdüğünü, süperoksit dismutaz ekspresyonunu artırdığını ve bir antioksidan olarak etki ettiğini göstermiştir. Benzer şekilde serum kreatinin seviyelerini ve kan üre nitrojen (BUN) düzeylerini düşürerek böbrek fonksiyonlarını düzelttiği gözlenmiştir (Tan ve ark. 2015).

Silimarin'in nöroprotektif etkisini ortaya koyan çok sayıda çalışma vardır. Silimarin TNF- α gibi enflamatuvar mediatörlerin üretimini inhibe ederek dopaminerjik nöronları hasara karşı korur. Ayrıca NF-kB aktivasyonunu inhibe ederek İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) üretimini azaltır (Pérez-H ve ark. 2014). Silimarin, marjinal serotonerjik, dopaminerjik ve noradrenerjik etkilere sahiptir (Khoshnoodi ve ark. 2015). Silimarin uygulamasının farelerde Streptozotosin nedenli hafıza kaybını ve dopamin toksisitesine bağlı davranış bozukluğunu önlediği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise 6 haftalık Silimarin uygulamasının farelerde D-galaktoz nedenli beyin yaşlanmasını azalttığı öne sürülmüştür. Bir diğer çalışmada ise ratlarda 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) kaynaklı Parkinson Hastalığı modelinde Silimarin'in nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (Joshi ve ark. 2014). Silimarin'in Bunama ve Alzheimer gibi hastalıklarda, Metamfetamin kaynaklı

zihinsel bozukluklarda koruyucu etkili olduğu vurgulanmıştır (Baluchnejadmojarad ve ark. 2010, Raza ve ark. 2011). Silimarin'in farelerde yurütülen bunama hastalığı modellerinde glutatyon düzeylerini ve Amiloid Beta (A β) plak birikimini azalttığı, Alzheimer hastalığında ise A β plak birikimi azaltarak ve Amiloid Prekürsör Protein (APP) mRNA düzeylerini düşürerek nöronları koruduğu ve hafıza kaybını iyileştirdiği gösterilmiştir (Lee ve ark. 2015). A β plak birikimini engelleyici özelliği kadar önemli olan bir diğer özelliği ise, beyin yaşlanması ve Alzhemier hastalığının patofizyolojisinde önemli rolü olan APP'nin artmış olan ekspresyonu üzerine negatif etkiye sahip olmasıdır (Yaghmaei ve ark. 2014).

Silimarin'in kontakt dermatit, cilt hiperpigmentasyonu (melazma), UV kaynaklı cilt kanseri, fotoaging (dermatoheliozis) gibi durumlarda yararlı etkileri ortaya konulmuştur (Rajnochová Svobodová ve ark. 2016). Bu nedenle Silimarin diyet takviyelerinde, kozmetik ve dermatolojik preparatlarda kullanılır (Pientaweeratch ve ark. 2016).

1.5.4.12. Antibakteriyel ve Antiparaziter Etkileri

Silimarin, *Leishmania spp.* ve *Tripanosoma spp.*'lara karşı anti paraziter ve *Staphylococcus aureus*'a karşı ise antibakteriyel etki göstermektedir (Moayedi Esfahani ve ark. 2015).

1.5.4.13. Kemoterapi, İmmunoterapi ve Radyoterapi Üzerine Etkileri

Silimarin; kemoterapi, immunoterapi ve radyoterapi uygulanan hastalarda olası yan etkileri azaltır (El Sherif ve ark. 2013, Gándara ve ark. 2014).

1.6 Amaç

Bu çalışmada; DEN uygulanarak oluşturulan deneysel karaciğer kanser modelinde Silimarin'in karaciğer koruyucu etkisi biyokimyasal parametreler ile (ALT, AST, ALP ve TOS) ve oksidatif-nitrozatif stres üzerine olan etkisi, antiproliferatif, antikanserojenik, antimetastatik etkilerinin immunohistokimyasal yöntemlerle ortaya konulması amaçlanmış olup, proapoptotik kapasitesi TUNEL metoduyla belirlenmiştir. Bu amaçla; 50 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanılmış olup, ratlar 10'arlı olmak üzere 5 gruba (Kontrol, Sham, DEN, DEN+Silimarin, Silimarin grubu) ayrılmıştır. 21 haftalık deneme süresi sonunda sistemik nekropsileri yapılan ratlardan kan ve karaciğer doku örnekleri alınmış olup, Silimarin'in karaciğer koruyucu etkileri biyokimyasal, histopatolojik, immunohistokimyasal yöntemlerle araştırılmıştır.

2. MATERİYAL VE METOT

2.1. Deney Hayvanlarının Temin Edilmesi ve Bakımı

Çalışmada, Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü Deney Hayvanları Birimi'nden temin edilen 50 adet 2 aylık erkek Wistar ratları kullanıldı. Deneme hayvanları 5 gruba ayrıldı. Uygun şartlarda (23 ± 2 °C, % 55'lik nem oranı, 12'şer saatlik gece gündüz döngüsü) Kafkas Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında barındırıldı. Deneme süresince hayvanlara standart yem ve içme suyu ad libitum olarak verildi.

Çalışmanın etik kurul raporu Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KAÜ-HADYEK-2015-095)'ndan alındı.

2.2. Deney Grupları

Çalışmamızda 5 gruba ayrılan 50 adet 2 aylık erkek Wistar ratlara ait deney düzeneği Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Oluşturulan Deney Grupları ve Özellikleri

Gruplar	Grublardaki Ratların Özellikleri
Grup 1: Kontrol Grubu	Deneklere 20 hafta boyunca pelet yem ve içme suyu verildi.
Grup 2: Sham Grubu	% 0.9 NaCl içerisinde çözdürülmüş propilen glikol (75/25) haftada üç kez 20 hafta boyunca intra peritoneal yolla uygulandı.
Grup 3: DEN ile oluşturulan Hepatokarsinogenezis Grubu	50 mg/kg dozunda DEN (Sigma, N 0756) haftada bir kez olmak üzere 20 hafta boyunca intra peritoneal olarak uygulandı.
Grup 4: DEN + Silimarin Grubu	50 mg/kg dozunda DEN haftada bir kez olmak üzere 20 hafta boyunca intraperitoneal olarak uygulandı. DEN uygulamasından 1 hafta önce başlamak üzere 100 mg/kg dozunda Silimarin (Sigma-Aldrich, N 0292) haftada üç kez olmak üzere 21 hafta boyunca intra peritoneal olarak uygulandı.
Grup 5: Silimarin Grubu	100 mg/kg dozunda Silimarin 20 hafta boyunca intra peritoneal yolla haftada üç kez uygulandı.

2.3. Deney Hayvanlarından Çalışılacak Örneklerin Alınması

Çalışmanın sonunda ratların vücut ağırlıkları ölçüldü. Biyokimyasal analizler için, pentobarbital anestezisi altındaki hayvanların kuyruk veninden kan örnekleri alındı. Takibinde alınan kan örneklerinin 3000 devirde 10 dakika santrifüje edilmesiyle serumları elde edildi. Ardından sistemik nekropsileri yapılan tüm deneme grubu hayvanlarının karaciğerleri makroskopik değişiklikler yönünden incelendi ve tartıldı.

2.4.Yapılan Analiz ve İncelemeler

2.4.1. Biyokimyasal Analizler

Alanin Aminotrasferaz (ALT), Aspartat Aminotransferaz (AST) ve Alkalen Fosfataz (ALP) aktiviteleri ve Total Oksidan Kapasite (TOS) düzeyi ticari kit (Erba-Rellassay) yardımıyla belirlendi. Tüm analizler, Epoch, Biotek marka Plate okuyucusu ile spektrofotometrik olarak yapıldı.

2.4.2. Histopatolojik İncelemeler

Ratlardan alınan karaciğer örnekleri % 10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda (Merck) tespit edildi. Rutin işlemlerin ardından hazırlanan parafin bloklardan, Hematoksilen Eozin (H&E) boyaması için 5 µm kalınlığında, immunohistokimyasal boyamalar için ise Poly-L-lysin ile kaplanmış lamlara 4 µm kalınlığında olmak üzere kesitler alındı.

Histopatolojik değişikliklerin belirlenmesi amacıyla kesitler H&E ile boyanarak ışık mikroskopunda (Olympus Bx53) incelendi ve Cell ^P programı (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4) vasıtasıyla fotoğraflandı.

2.4.3. İmmunohistokimyasal İncelemeler

Çalışmamızda Avidin-Biotin Peroksidaz metodu immunohistokimyasal yöntem olarak kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyamalar için parafin bloklardan 4 µm kalınlığında alınan kesitler rehidratasyon işleminden geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla kesitler % 3'lük hidrojen peroksit solüsyonu ile 15 dakika muamele edildi. Daha sonra antijenik reseptörlerin açığa çıkarılması amacıyla kesitlere mikrodalga yöntemi uygulandı (Citrat Buffer Solüsyonu pH 6, 25 dk süreyle). Nonspesifik boyamaları engellemek amacıyla kesitler 30 dakika süreyle non immun serum (Genemed Biotechnologies REF 54-0003) inkübe edildi. Takibinde Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)'nde değişik oranlarda sulandırılmış primer antikorlar ile 1 saat süresince oda ısısında inkübe edildi (bkz. Tablo 2). PBS solüsyonunda 5'er dakika olmak üzere 3 kez yıkanan kesitlere biyotinize sekonder antikor (Genemed Biotechnologies REF 54-0003) 30 dakika süresince oda ısısında uygulandı. PBS'de yıkama işleminin ardından (3*5 dakika) tüm kesitler peroksidaz bağlanmış Strep Avidin (Genemed Biotechnologies REF 54-0003) ile 30 dakika süresince inkübe edildi. Renk ortaya çıkarıcı substrat olarak 3.3-diaminobenzidin tetra hidroklorid (DAB) solüsyonu (Genemed Biotechnologies REF 10-0048) kullanıldı. Kesitler Mayer Hematoksilen ile boyandı ve immun mount ile kaplandı.

Kapatma işleminin ardından hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Olympus Bx53) altında incelendi ve Cell ^P programı (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4) vasıtasıyla fotoğrafları çekildi. Fotoğrafların analizleri Image J programı (1.51j8) ile yapıldı.

İmmunohistokimyasal boyama sonuçlarının analizi; Glutasyon S-transferaz Pi (GSTPi), Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA), Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9), Hematopoietic PBX-Interacting Protein (HPIP), Nitrotirozin (NT) ve İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) immunoreaktivitesi incelenen ve boyanma karakterini en iyi yansıtan alanlardaki pozitif hücre sayısı baz alınarak oluşturulan derecelendirme sistemi ile yapılmıştır. Dokudaki immun boyamanın kantifikasyonu

için analize yüksek yoğunlukta reaksiyon alanları baz alınarak başlandı. Her örnek için toplam 200'lük büyütmede 10 ayrı alan incelendi. Her alanda pozitif boyanan hücrelerin sayıları kaydedildi ve bu 10 sahanın ortalaması o hayvanın verisi olarak alındı.

Tablo 2. Primer Antikorlar ve Dilüsyon Oranları.

Spesifite	Klon – Firma	Dilüsyon Oranları
GSTPi	GSTPi Antibody, NCL-L-GSTPi-438, Novocastra	1:100
PCNA	PCNA Antibody (PC 10) Sc-56, Santa Cruz	1:100
MMP-9	MMP-9 Antibody (E-11) sc-393859, Santa Cruz	1:100
HPIP	HPIP IHC Antibody, (Rabbit Anti-HPIP IHC Antibody, Affinity) Bethyl Lab, IHC-00327	1:100
NİTROTİROZİN	NITROTYROSINE Antibody Sc-32731, Santa Cruz	1:250
iNOS	NOS-2 Antibody (C-11) sc-7271, Santa Cruz	1:100

2.4.4. TUNEL Metodu

Apoptotik hücreleri tespit etmek için Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (TUNEL) yönteminden yararlanıldı ve bu amaçla In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche 11684817910) kullanıldı. Kesitler 37° C'deki etüvde bir gece tutulduktan sonra ksilol solüsyonundan geçirildi. Daha sonra azalan yüzdeleri alkol serisi ile rehidre edildi ve distile su ile yıkandı. Bunu takiben kesitler proteinaz K çözeltisi (Sigma) ile 37° C'de 25 dakika inkübe edildi. Kesitler daha sonra PBS ile 3'er kez 3 dakika süresince yıkandı. PBS ile yıkanma işleminden sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için kesitlere 15 dakika süresince % 3'lük hidrojen peroksit solüsyonu uygulandı. Kesitler tekrardan PBS ile yıkandı ve 37° C'de 60 dakika boyunca TUNEL çözeltisi (Roche 11684817910) ile inkübe edildi. Dokular daha sonra PBS ile 3'er kez 3 dakika süresince yıkandı. Ardından, kesitler 37° C'de 30 dakika boyunca Peroksidaz (POD) solüsyonu (Roche 11684817910) ile inkübe edildi. Daha sonra kesitler 3'er kez 3 dakika süresince PBS ile tekrar yıkandı. Yıkama işlemi takiben kesitlere DAB solüsyonu (Genemed Biotechnologies) damlatıldı ve Mayer Hematoksilen ile boyandı. Kesitler daha sonra

artan yüzdeli alkol serisinden ve son olarak da ksilol solüsyonundan geçirildikten sonra entallen ile kapatıldı (Tayman ve ark. 2011).

Kapatma işleminin ardından hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Olympus Bx53) altında incelendi ve Cell ^P programı (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4) vasıtasıyla fotoğrafları çekildi. Fotoğrafların analizleri Image J programı (1.51j8) ile yapıldı.

TUNEL Boyama Sonuçlarının Analizi; boyanma karakterini en iyi yansıtan alanlardaki pozitif hücre sayısı baz alınarak oluşturulan derecelendirme sistemi ile yapılmıştır. Dokudaki boyamanın kantifikasyonu için analize yüksek yoğunlukta reaksiyon alanları baz alınarak başlandı. Her örnek için toplam 200'lük büyütmede 10 ayrı alan incelendi. Her alanda pozitif boyanan hücrelerin sayıları kaydedildi ve bu 10 sahanın ortalaması o hayvanın verisi olarak alındı.

2.4.5. İstatistiksel Analizler

Grupların normal dağılım gösterme durumu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren grupların değerlendirilmesinde T-Testinden, normal dağılım göstermeyen grupların değerlendirilmesinde ise Mann-Whitney-U testinden yararlanılmıştır. İstatistik testlerde Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 20 programı kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Ratların Vücut ve Karaciğer Ağırlıkları ile Karaciğer / Vücut Ağırlık Oranları

Deneme sonunda tüm gruplara ait hayvanların vücut ve karaciğer ağırlıkları ile karaciğer / vücut ağırlık oranı Tablo 3’de verildi. DEN, DEN + Silimarin, Sham ve Silimarin grubu hayvanları Kontrol grubu hayvanları ile istatistiki olarak karşılaştırıldı. DEN ve DEN + Silimarin uygulanan hayvanlar Kontrol grubu hayvanları ile karşılaştırıldığında vücut ağırlığında düşüş, karaciğer ağırlığı ile karaciğer / vücut ağırlık oranında ise artış gözlemlendi ($p < 0.05$). DEN ve DEN + Silimarin grubu hayvanları arasında vücut ağırlığındaki kayıp ve karaciğer ağırlığı ile karaciğer / vücut ağırlık oranları açısından istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p > 0.05$).

Tablo 3. Tüm Gruplara ait Son Vücut ve Karaciğer Ağırlıkları ile Karaciğer / Vücut Ağırlık Oranları

Gruplar	Grup 1 (Kontrol) n = 10	Grup 2 (Sham) n = 10	Grup 3 (DEN) n = 10	Grup 4 (DEN + Silimarin) n = 10	Grup 5 (Silimarin) n = 10
Vücut Ağırlığı (g)	380,69 ± 1,13 ^a	378,41 ± 1,27 ^a	273,54 ± 0,56 _{b,x}	274,70 ± 0,81 ^{b,x}	373,73 ± 0,82 ^b
Karaciğer Ağırlığı (g)	11,40 ± 0,09 ^a	11,24 ± 0,10 ^a	15,70 ± 0,25 _{b,x}	15,40 ± 0,24 ^{b,x}	11,28 ± 0,09 ^a
Karaciğer / Vücut Ağırlık Oranı (%)	2,99 ^a	2,97 ^a	5,73 ^{b,x}	5,6 ^{b,x}	3,01 ^a

Dipnot: Kontrol grubu ile diğer gruplar sırasıyla ikili olarak karşılaştırılmıştır. ^b yazan grupların kontrol grubu ile arasında istatistiki açıdan fark vardır ($p < 0.05$). ^a yazan grupların kontrol grubu ile arasında ise istatistiki açıdan fark yoktur ($p > 0.05$). ^{x,y} DEN ve DEN+Silimarin grupları arasında istatistiki açıdan fark vardır ($p < 0.05$).

3.2.Biyokimyasal Bulgular

Tablo 4 'de tüm gruplara ait biyokimyasal analiz sonuçları verilmiştir. DEN grubundaki ratlarda ALT, AST ve ALP aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı derecede artış gözlemlendi ($p<0.05$). DEN ve DEN + Silimarin grubu hayvanlarının ALT, AST ve ALP aktiviteleri karşılaştırıldığında istatistiki yönden anlamlı bir düşüş görüldü ($p<0.05$).

TOS seviyelerinin istatistiki olarak karşılaştırılmasında kontrol grubuna kıyasla DEN grubunda anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0.05$). DEN + Silimarin grubunda ise TOS seviyesi önemli ölçüde azalmıştır ($p<0.05$).

Tablo 4. Tüm gruplara ait AST, ALT, ALP aktiviteleri ve TOS seviyeleri

	Grup 1 (Kontrol) n=10	Grup 2 (Sham) n=10	Grup 3 (DEN) n=10	Grup 4 (DEN+Silimarin) n=10	Grup 5 (Silimarin) n=10
AST IU/L	32,10 ± 0,95 ^a	32,42 ± 0,61 ^a	75,53 ± 1,69 ^{b,x}	51,38 ± 1,70 ^{b,y}	30,36 ± 0,92 ^a
ALT IU/L	84,20 ± 2,32 ^a	86,89 ± 1,92 ^a	130,64 ± 4,84 ^{b,x}	118,85 ± 2,31 ^{b,y}	89,89 ± 0,70 ^b
ALP IU/L	39,46 ± 0,66 ^a	39,10 ± 0,80 ^a	57,40 ± 1,89 ^{b,x}	43,95 ± 0,85 ^{b,y}	37,37 ± 0,32 ^b
TOS $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L	0,73 ± 0,02 ^a	0,78 ± 0,02 ^b	1,09 ± 0,04 ^{b,x}	0,85 ± 0,02 ^{b,y}	0,43 ± 0,03 ^b

Dipnot: Kontrol grubu ile diğer gruplar sırasıyla ikili olarak karşılaştırılmıştır. ^b yazan grupların kontrol grubu ile arasında istatistiki açıdan fark vardır ($p<0.05$). ^a yazan grupların kontrol grubu ile arasında ise istatistiki açıdan fark yoktur ($p>0.05$). ^{x,y} DEN ve DEN+Silimarin grupları arasında istatistiki açıdan fark vardır ($p<0.05$).

3.3.Makroskobik Bulgular

Kontrol grubu (Resim 2) hayvanlarının karaciğerlerinin yüzeylerinin düz, pürüzsüz, keskin kenarlı, parlak, renginin ise kahverengi olduğu gözlemlendi. Sham grubu (Resim 3) ve Silimarin grubundaki (Resim 4) ratların karaciğerlerinin

makroskopik görüntüsü kontrol grubuna benzer şekilde idi. DEN grubundaki (Resim 5) ratlarda ise makroskopik olarak karaciğerlerin yüzeyinde multifokal, değişik çaplarda (3-4 mm), gri-sarı renkli yumuşak kıvamda nodüller gözlemlendi. Bunun yanında yer yer kanama alanları da tespit edildi. DEN + Silimarin grubundaki (Resim 6) hayvanlarda DEN grubundaki hayvanlara benzer şekilde nodüler yapılar gözlemlendi.



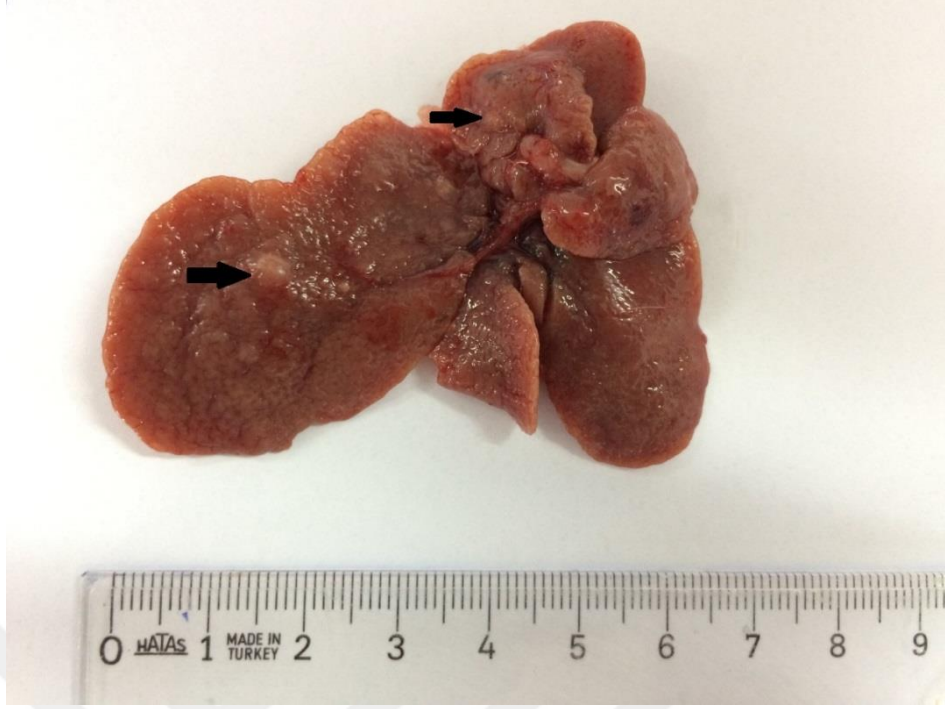
Resim 2. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu.



Resim 3. Sham grubuna ait karaciğer dokusu.



Resim 4. Silimarin grubuna ait karaciğer dokusu.



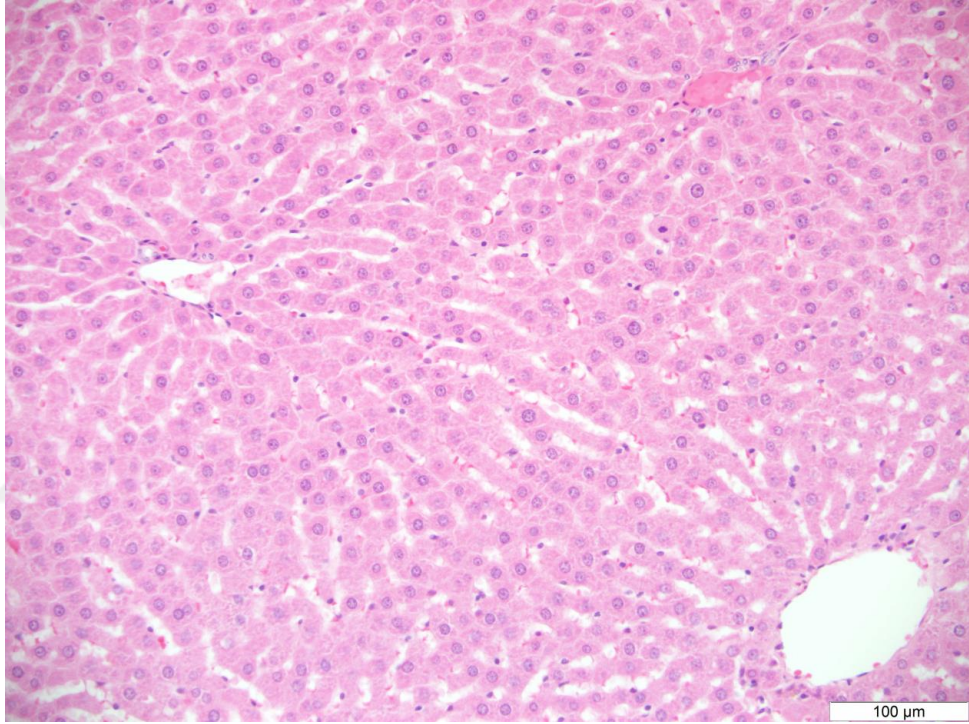
Resim 5. DEN grubuna ait karaciğer dokusu, multifokal nodüller (oklar).



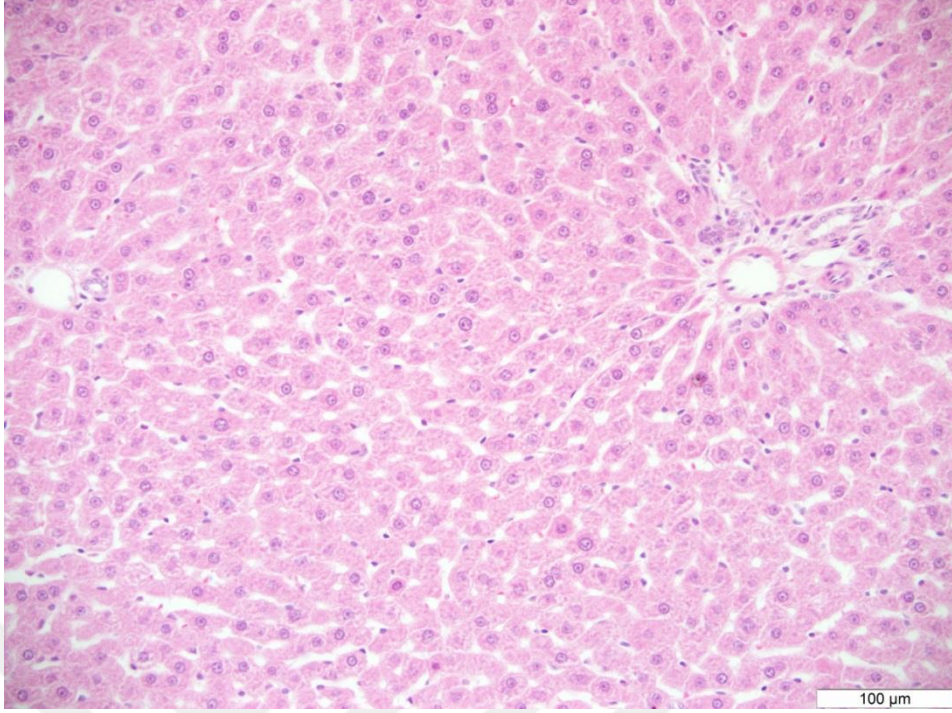
Resim 6. DEN + Silimarin grubuna ait karaciğer dokusu, multifokal nodüller (oklar).

3.4.Histopatolojik Bulgular

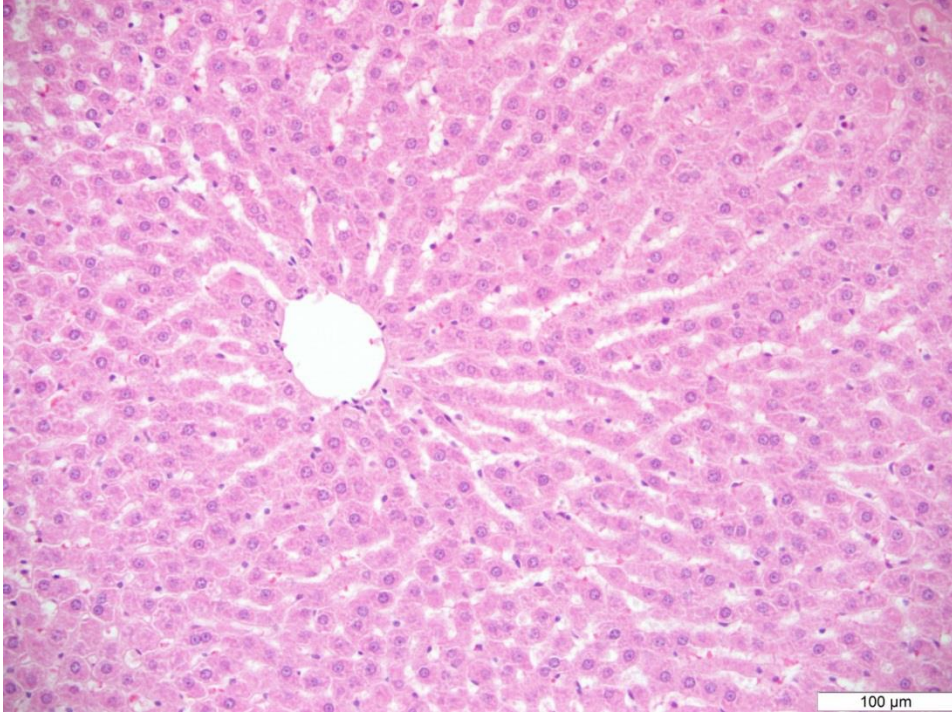
Kontrol (Resim 7), Sham (Resim 8) ve Silimarin (Resim 9) grubu karaciğerlerinin histopatolojik incelemesinde karaciğer dokusunun normal lobüler ve sinüzoidal yapısını koruduğu, hepatosit kordonlarının düzgün bir dizilime sahip olduğu gözlemlendi. Hepatositlerin boyut ve şekil bakımından birbirlerine benzer olduğu tespit edildi.



Resim 7. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, H&E, Bar= 100 µm.

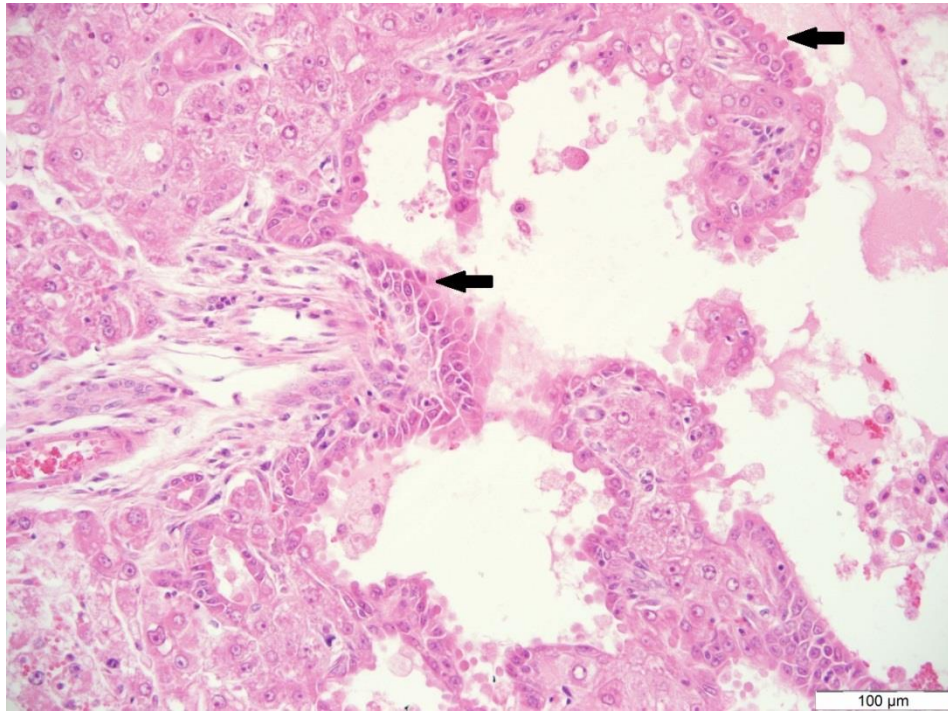


Resim 8. Sham grubu, karaciğer dokusu, H&E, Bar= 100 µm.



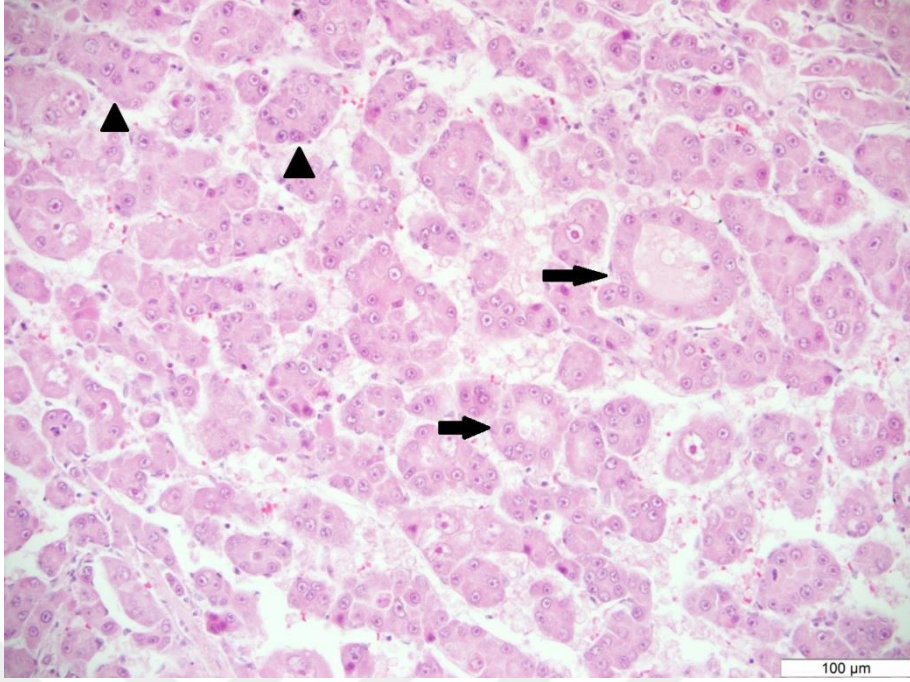
Resim 9. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, H&E, Bar= 100 µm.

DEN grubuna ait hayvanlarda hepatoselüler karsinoma gözlemlendi. Tümör hücrelerinin morfolojik bakımdan normal hepatositlere benzerlik gösterdiği, diferansiyasyonunun iyi olduğu gözlemlendi. Bazı alanlarda ise hepatositlerin küboidal hatta kolumnar şekillerde olduğu belirlendi. Tümör hücrelerinin sitoplazmasının eozinofilik, çekirdek-sitoplazma oranının çekirdek lehine artmış ve atipik olduğu gözlemlendi. Çekirdeklerin yuvarlak, oval veya irregüler olabildiği ve yer yer hiperkromazi gösterdiği belirlendi. Bazı alanlarda çekirdekçiklerin eozinofilik, tek ve belirgin iken bazı alanlarda ise sayılarının artmış olduğu gözlemlendi.



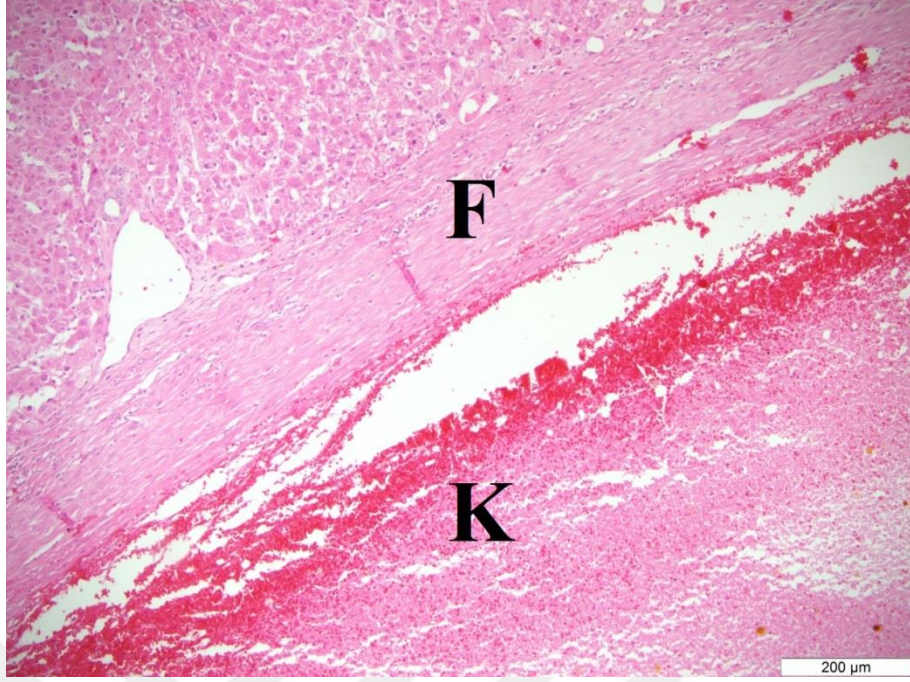
Resim 10. DEN grubu, karaciğer dokusu, Atipik tümör hücreleri (oklar), H&E, Bar= 100 µm.

Tümör dokusunda trabeküller ve asiner paternin hakim olduğu gözlemlendi. Bazı alanlarda sadece trabeküller yapılar gözlenirken, bazı alanlarda ise sadece asiner yapılara rastlamak mümkün idi. Bu iki paternin miks olarak gözlemlendiği alanlar da mevcut idi. Trabeküller yapılar 3-10 hücre kalınlığında olup endotel hücrelerinin döşediği sinüzoid benzeri boşluklarla ayrılmıştı. Asiner paternde oluşan psödoglandüler yapılarda lumende yer yer hafif eozinofilik boyanmış içerik mevcut idi.

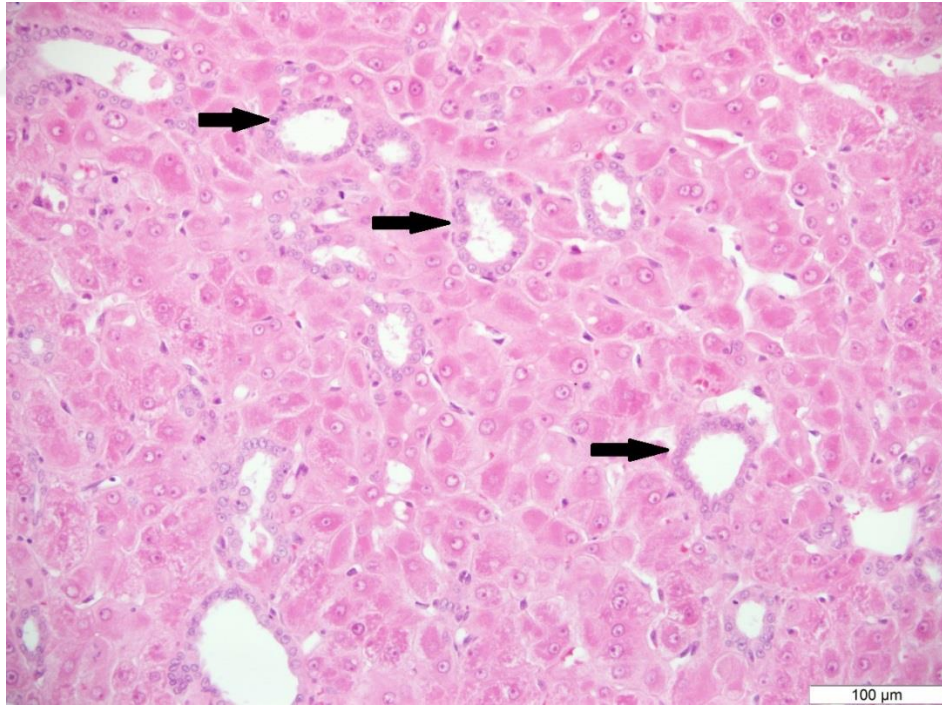


Resim 11. DEN grubu, trabeküler (ok başları) ve asiner (oklar) yapılar sergileyen tümör dokusu, H&E, Bar= 100 µm.

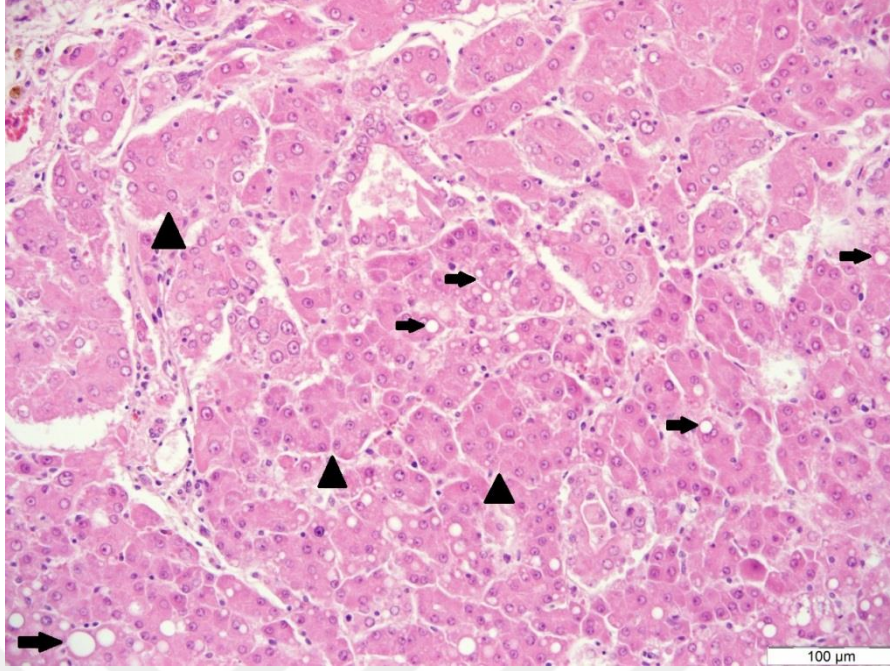
Bunlara ilaveten karaciğer dokusunda içi kanla dolu etrafı fibröz kapsülle çevrili geniş alanlar, safra kanalı hiperplazisi, irili ufaklı vakuoller tarzında yağ dejenerasyonu, hafif bağ doku artışı, safra pigmenti, şeffaf sitoplazmalı hücreler, soluk cisimcikler ve hiyalin damlacıkları da tümör dokusunda gözlenen histopatolojik değişikliklerdendi. Mitoz bazı alanlarda fazla sayıda gözlenmekle beraber bazı alanlarda yok denecek kadar azdı.



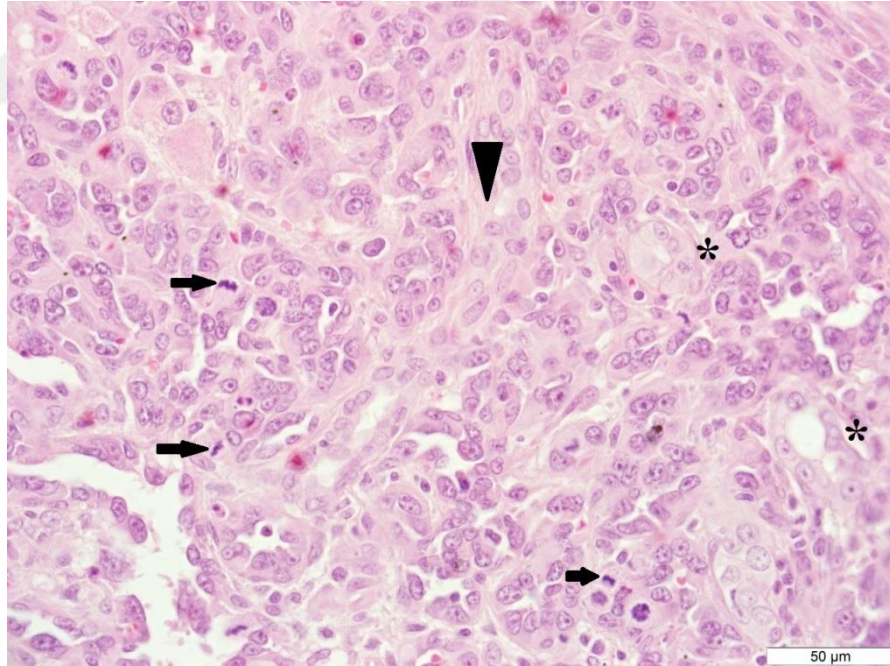
Resim 12. DEN grubu, karaciğer dokusu, etrafı fibröz kapsülle (F) çevrili kavern (K), H&E, Bar= 200 µm.



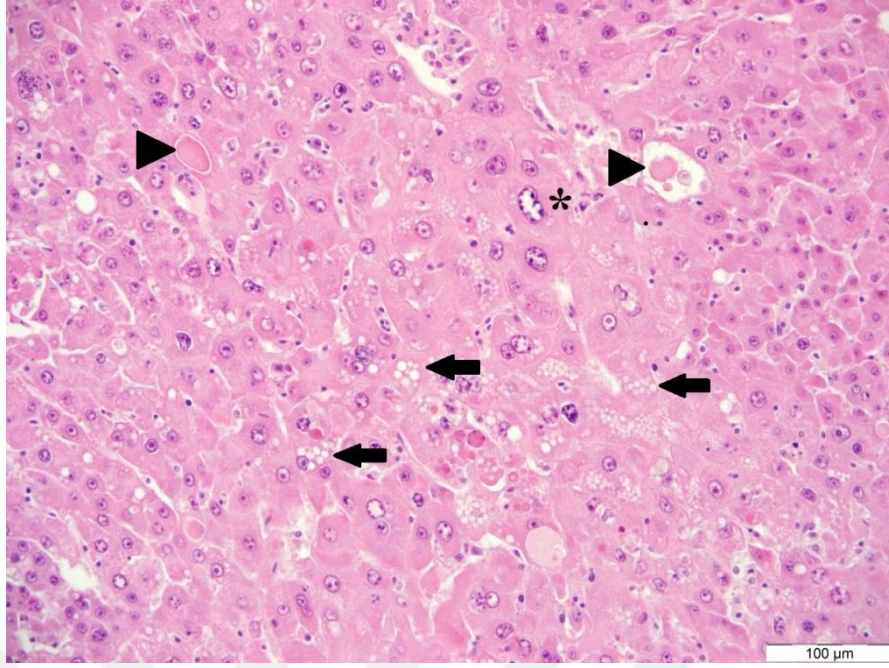
Resim 13. DEN grubu, karaciğer dokusu, safra kanalı hiperplazisi (oklar), H&E, Bar= 100 µm.



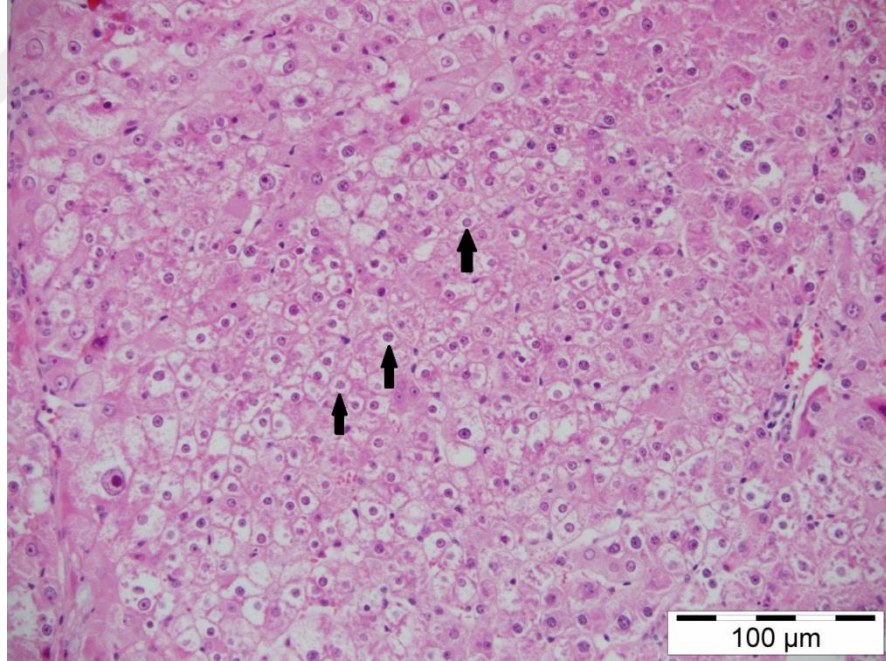
Resim 14. DEN grubu, hepatositlerde irili ufaklı yağ vakuelleri (oklar) ve trabeküler yapılar (ok başları), H&E, Bar= 100 µm.



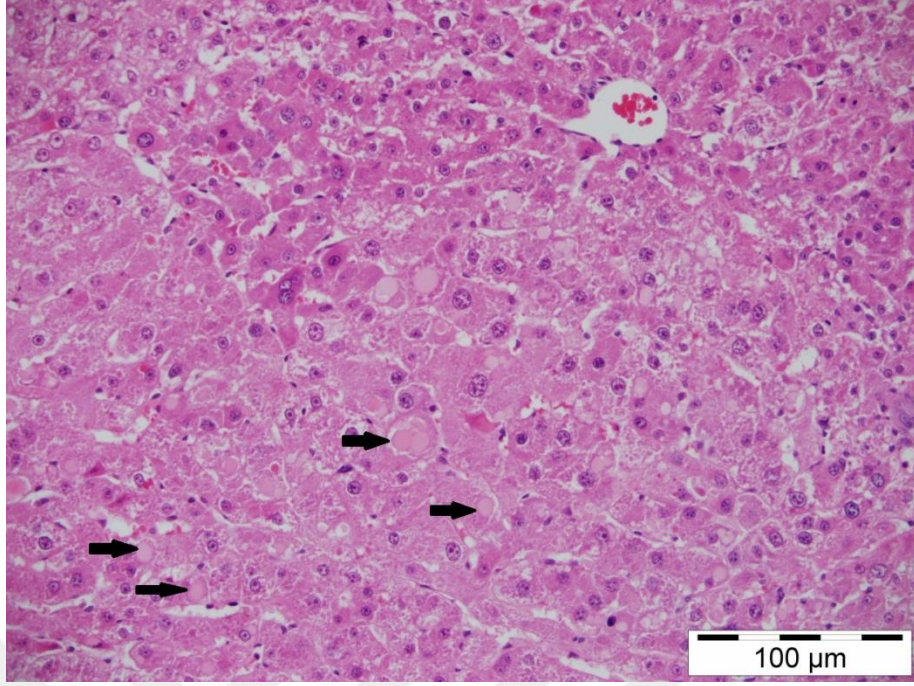
Resim 15. DEN grubu, tümör dokusu, çok sayıda mitoz (oklar), asiner yapılar (yıldızlar) ve hafif bağ doku artışı (ok başı), H&E, Bar= 50 µm.



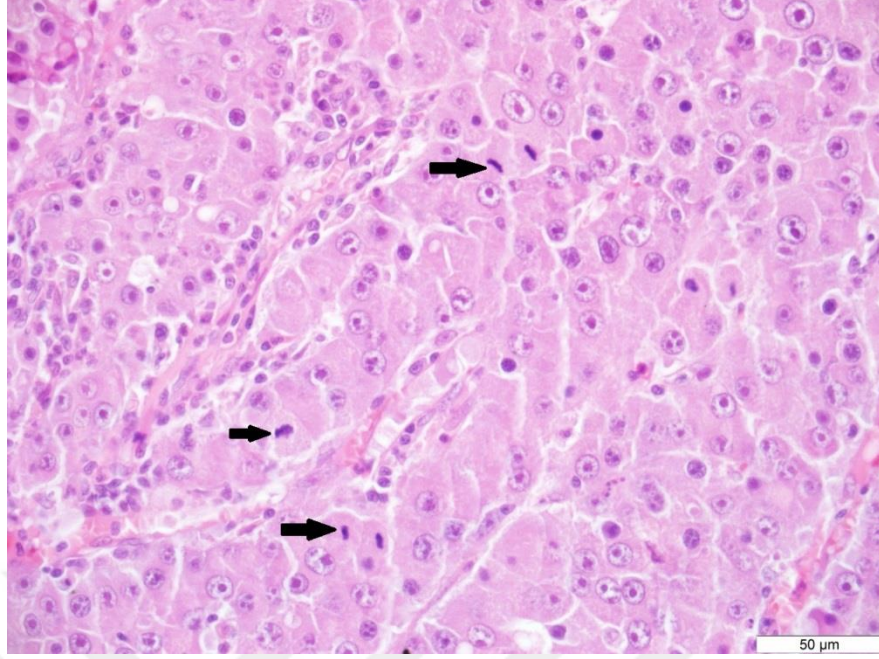
Resim 16. DEN grubu, tümör dokusu, hepatositlerde yağ vakuelleri (oklar), hiyalin damlaları (ok başları), çekirdekte pleomorfizm (yıldız), H&E, Bar= 100 µm.



Resim 17. DEN grubu, karaciğer dokusu, şeffaf sitoplazmalı hücreler (oklar), H&E, Bar= 100 µm.

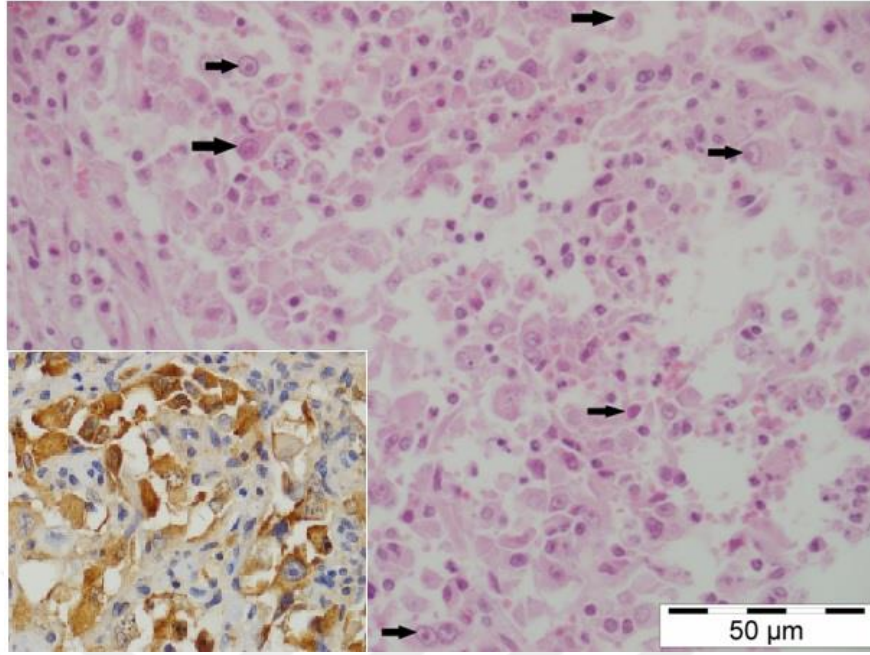


Resim 18. DEN grubu, karaciğer dokusu, soluk cisimcikler (oklar), H&E, Bar= 100 μm.



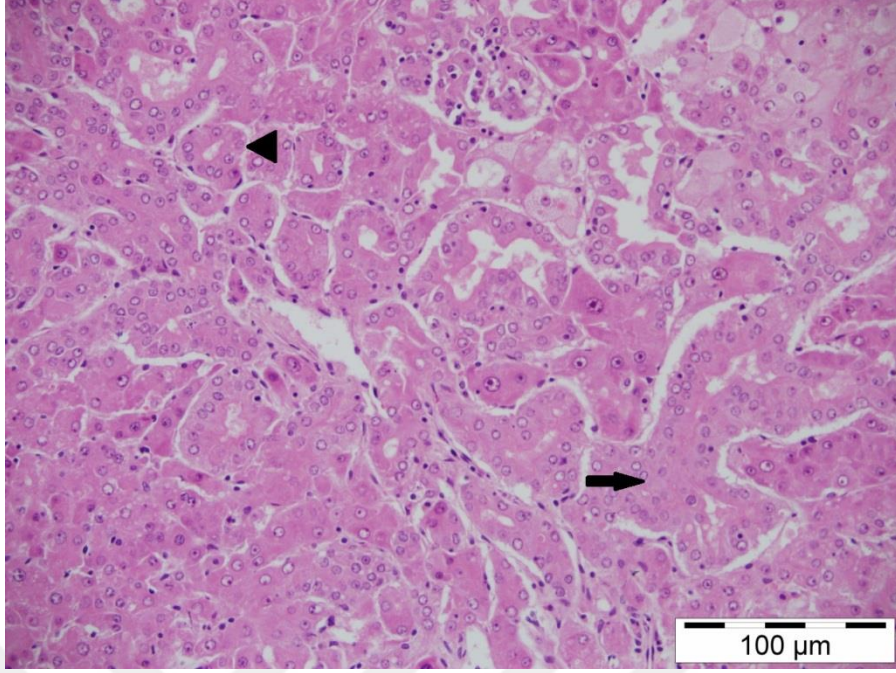
Resim 19. DEN grubu, karaciğer dokusu, mitotik figürler (oklar), H&E, Bar= 50 µm.

DEN grubuna ait bir hayvanın akciğer dokusunda etrafı ince fibröz kapsülle çevrili çok sayıda metastaz odağı tespit edildi. Bu odakların etrafında şiddetli kanama, hemosiderin pigmenti, yangısal hücre infiltrasyonu ve alveoler makrofajların varlığı gözlemlendi. Tümör odaklarının içerisinde az sayıda mitotik figüre ve eozinofilik çekirdekçikli tümör hücrelerine rastlandı. Bunlara ilaveten hücrelerin şekil ve büyüklükleri arasında farklılık olduğu saptandı. Erzurum Bölge Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarında yapılan Hepatosit Spesifik Antijen (Hep Par-1) (Sigma-Aldrich, OCH1E5) immunohistokimyasal boyamasında tümör hücrelerinin Hep Par-1 pozitif immun reaksiyon gösterdiği gözlemlendi ve bu hücrelerin karaciğer kökenli olduğu saptandı.

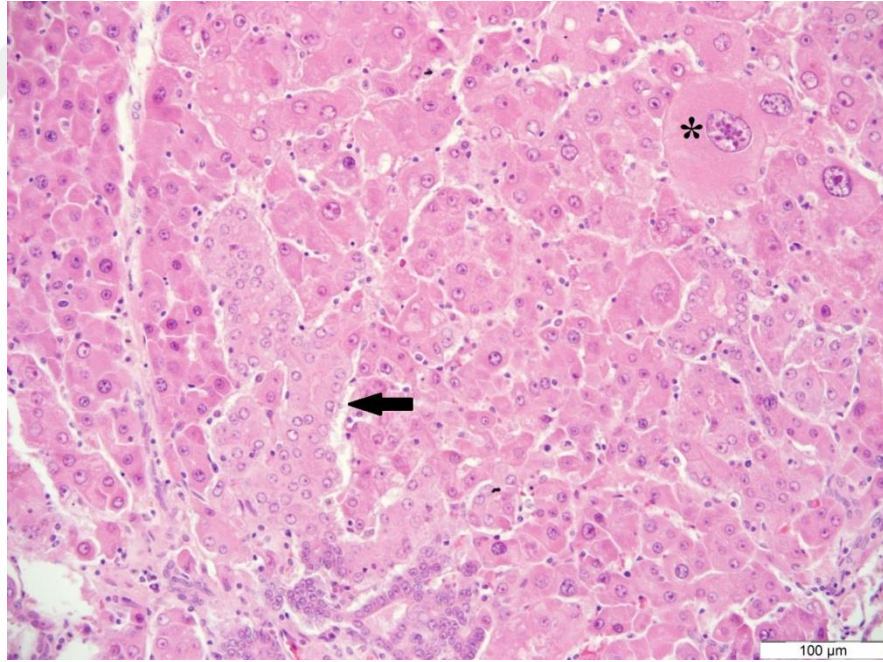


Resim 20. DEN grubu, Büyük resim: akciğer dokusu, metastatik odak, eozinofilik çekirdekçikli tümör hücreleri (oklar), H&E, Bar= 50 µm, Küçük resim: akciğer dokusu, Hep Par-1 pozitif hücreler, IHC, Bar=25 µm.

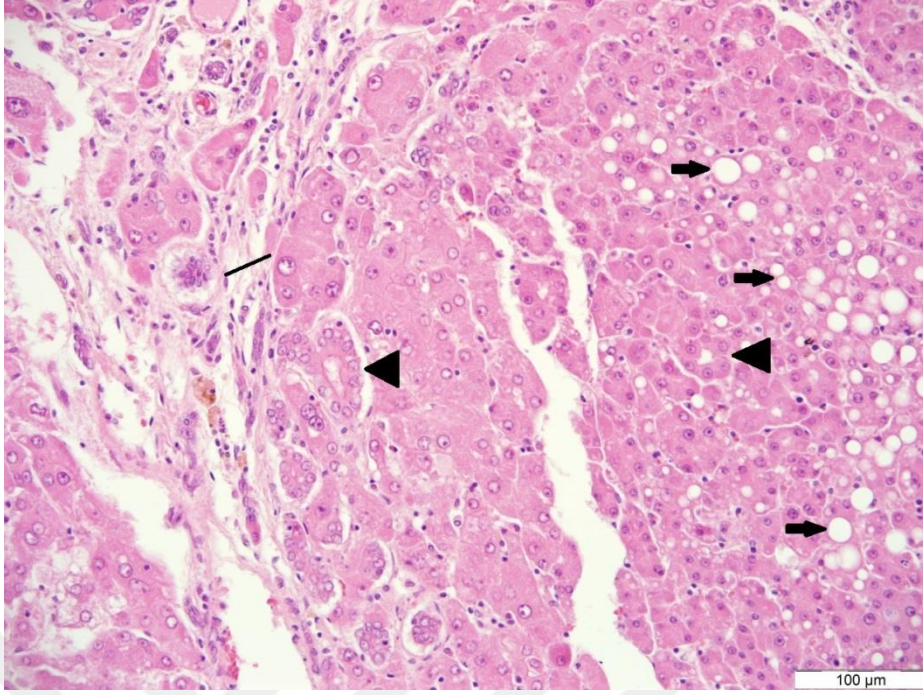
DEN+Silimarin uygulaması yapılan hayvanlarda da hepatoselüler karsinoma tanısı konuldu. DEN grubuna benzer şekilde yaygın histopatolojik patern trabeküler ve asiner yapıları içeren miks patern şeklinde idi. Bunun yanında farklı derecede atipi, nükleer düzensizlik, artmış çekirdek-sitoplazma oranı, hiperkromazi, kan ile dolu kavernoöz alanlar, hiyalin dejenerasyonu, hepatositlerde yağ vakuelleri, safra kanalı hiperplazisi, safra pigmenti, şeffaf sitoplazmalı hücreler, soluk cisimcikler ve mitotik figürler tümör dokusunda gözlenen bulgular arasında idi.



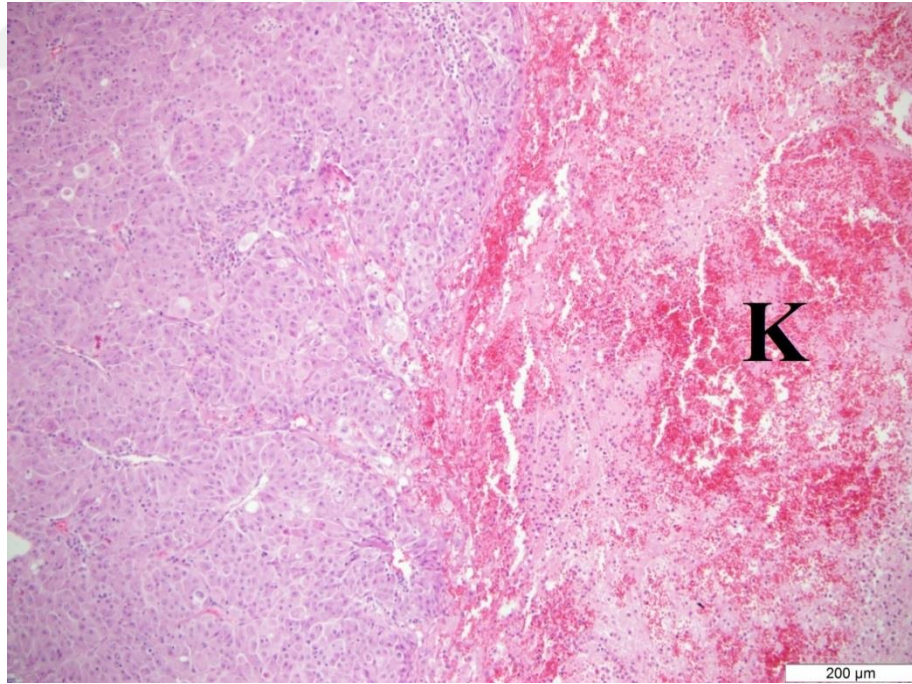
Resim 21. DEN + Silimarin grubu, tümör dokusunda trabeküler (ok) ve asiner yapılar (ok başı), H&E, Bar= 100 µm.



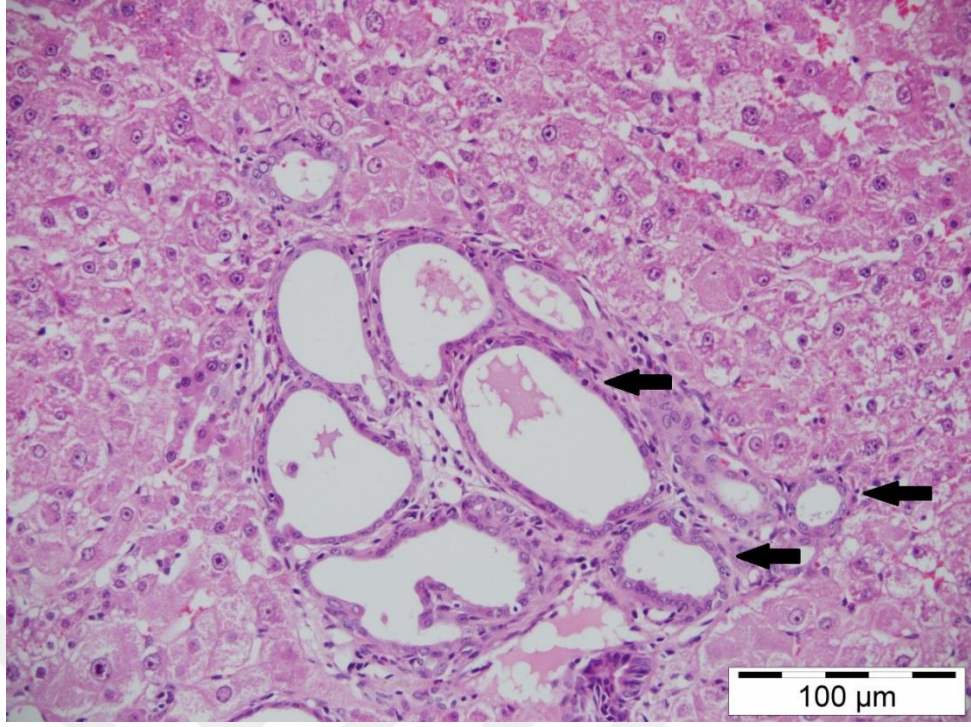
Resim 22. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, megakaryosit (yıldız) ve trabekül yapısı (ok), H&E, Bar= 100 µm.



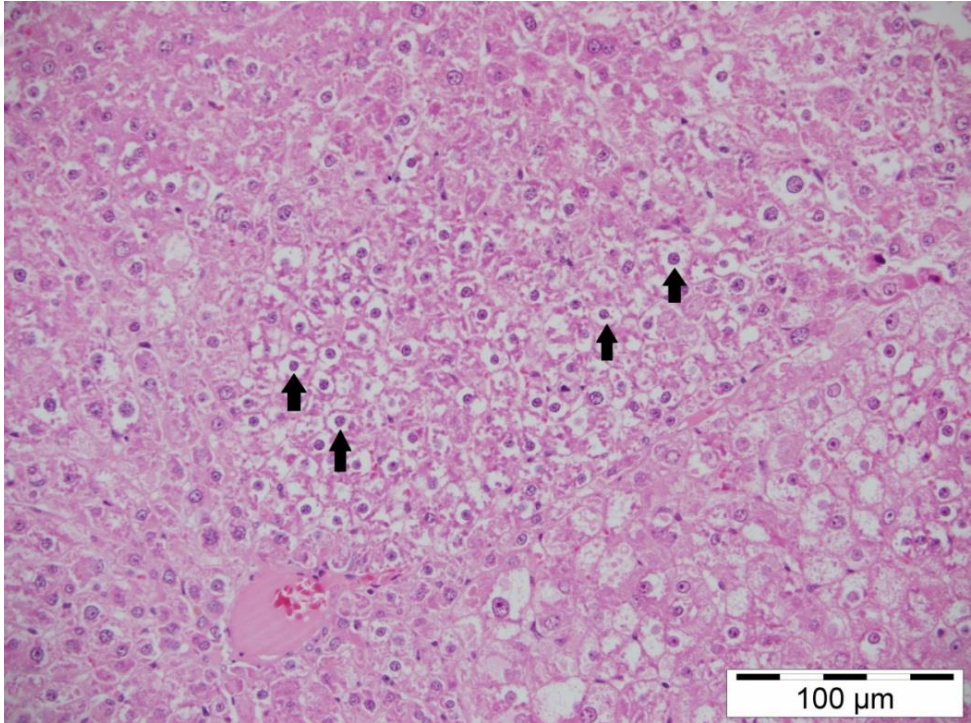
Resim 23. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, ince fibröz doku (çizgi) ile çevrili nodüler yapı, asiner yapılar (ok başları) ve hepatositlerde yağ vakuolleri (oklar), H&E, Bar= 100 µm.



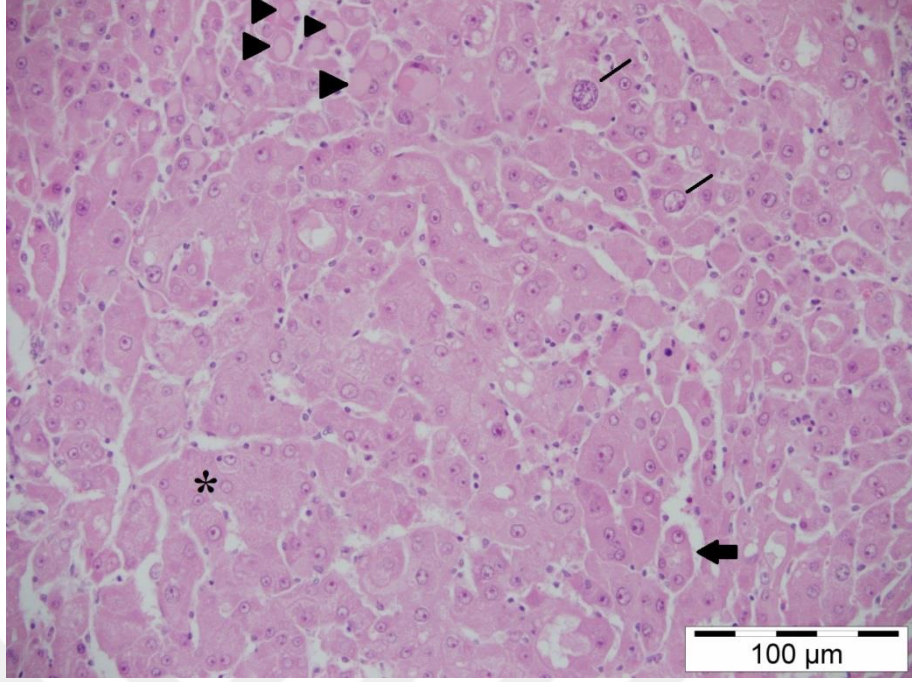
Resim 24. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, kanama alanı (K), H&E, Bar= 200 µm.



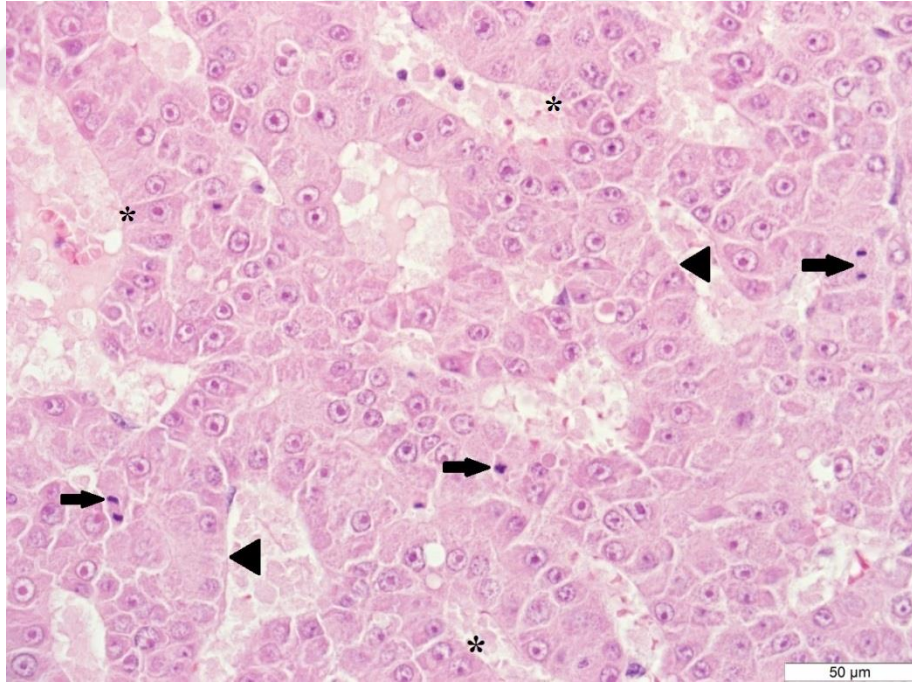
Resim 25. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, safra kanalı hiperplazisi (oklar), H&E, Bar= 100 µm.



Resim 26. DEN + Silimarin grubu, şeffaf sitoplazmalı hücreler (oklar), H&E, Bar= 100 µm.



Resim 27. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, soluk cisimcikler (ok başları), çekirdeklerde atipi (çizgiler), asiner yapı (ok), trabeküler yapı (yıldız), H&E, Bar= 100 µm.



Resim 28. DEN + Silimarin grubu, karaciğer dokusu, tümör hücrelerinde pleomorfizm (yıldızlar), mitoz (oklar) ve trabeküler yapılar (ok başları), H&E, Bar= 50 µm

3.5.İmmunohistokimyasal Bulgular

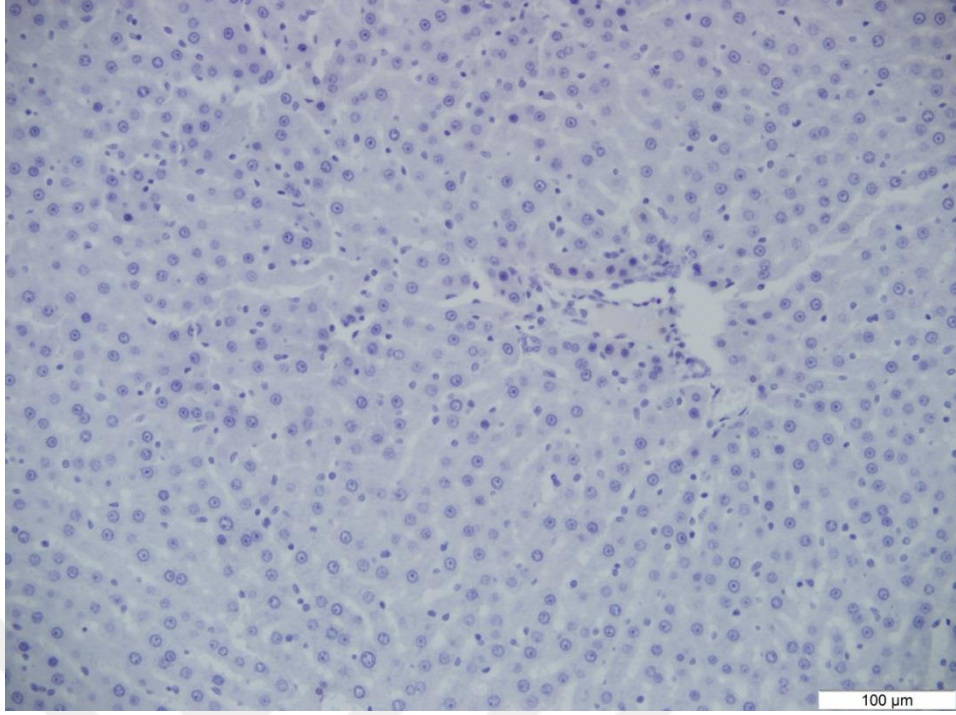
3.5.1. iNOS

Tüm gruplara ait iNOS immün pozitif hücre sayılarının ortalama değeri Tablo 5’de verildi. Kontrol (Resim 29), Sham (Resim 30) ve Silimarin (Resim 31) gruplarında herhangi bir immün pozitif boyanma gözlenmedi. DEN (Resim 32) ve DEN + Silimarin (Resim 33) gruplarında hepatosit sitoplazmasında iNOS pozitif immün boyanma gözlendi. DEN grubunda tespit edilen iNOS pozitif hücre sayısının ortalama değerinin DEN + Silimarin grubuna kıyasla daha fazla olduğu saptanmakla birlikte aradaki farkın istatistiki açıdan önem arz etmediği tespit edildi ($p>0.05$).

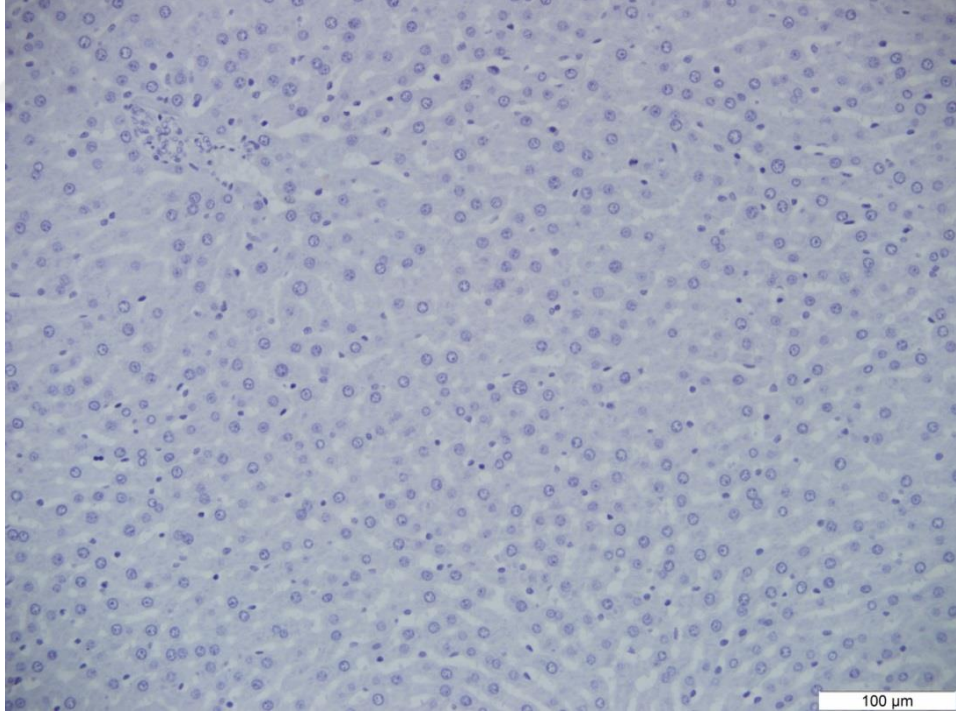
Tablo 5. Tüm gruplara ait ortalama iNOS pozitif hücre sayıları

Gruplar	Grup 1 (Kontrol) n = 10	Grup 2 (Sham) n = 10	Grup 3 (DEN) n = 10	Grup 4 (DEN + Silimarin) n = 10	Grup 5 (Silimarin) n = 10
iNOS	---	---	55.3 ± 7.46 ^a	42.9 ± 4.84 ^a	---

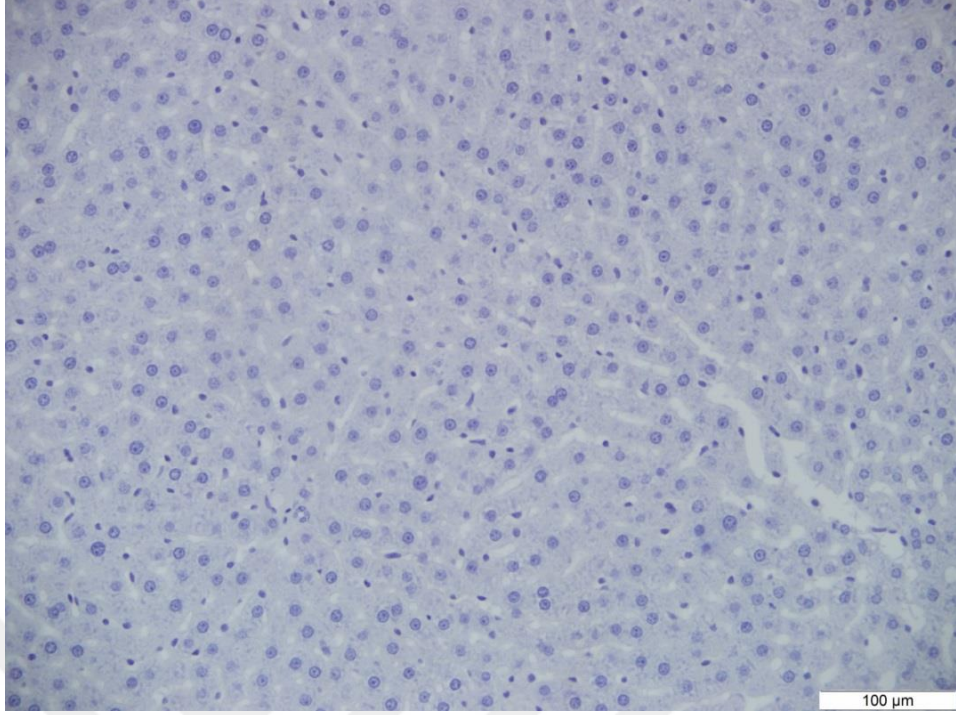
Dipnot: * 0 değerini ifade etmektedir. ^a DEN ve DEN+Silimarin grupları arasında istatistiki açıdan fark yoktur ($p>0.05$).



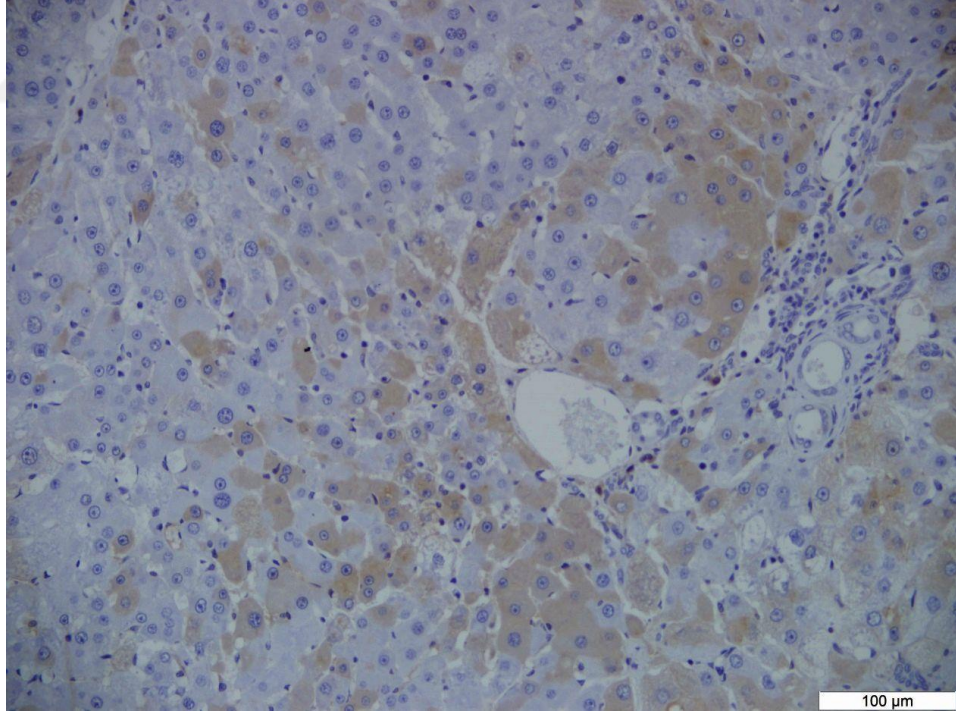
Resim 29. Kontrol Grubu, karaciğer dokusu, iNOS, IHK, Bar =100 µm.



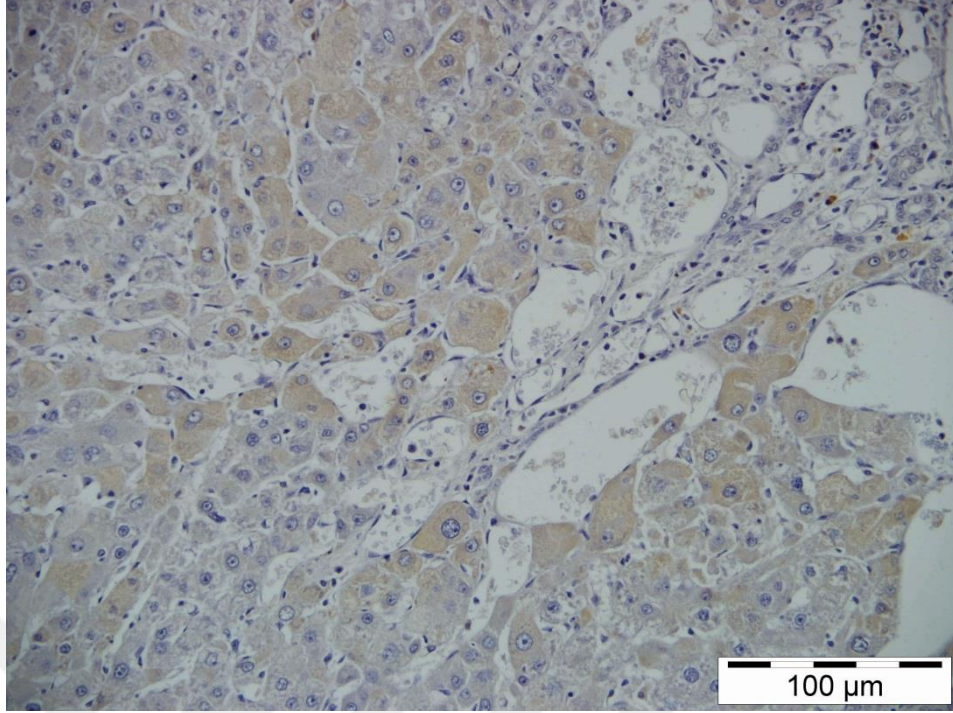
Resim 30. Sham grubu, karaciğer dokusu, iNOS, IHK, Bar=100 µm.



Resim 31. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, iNOS, IHK, Bar=100 µm.



Resim 32. DEN grubu, karaciğer dokusu, iNOS pozitif tümör hücreleri, IHK, Bar=100 µm.



Resim 33. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, iNOS immunreaktivitesi, IHK, Bar=100 µm.

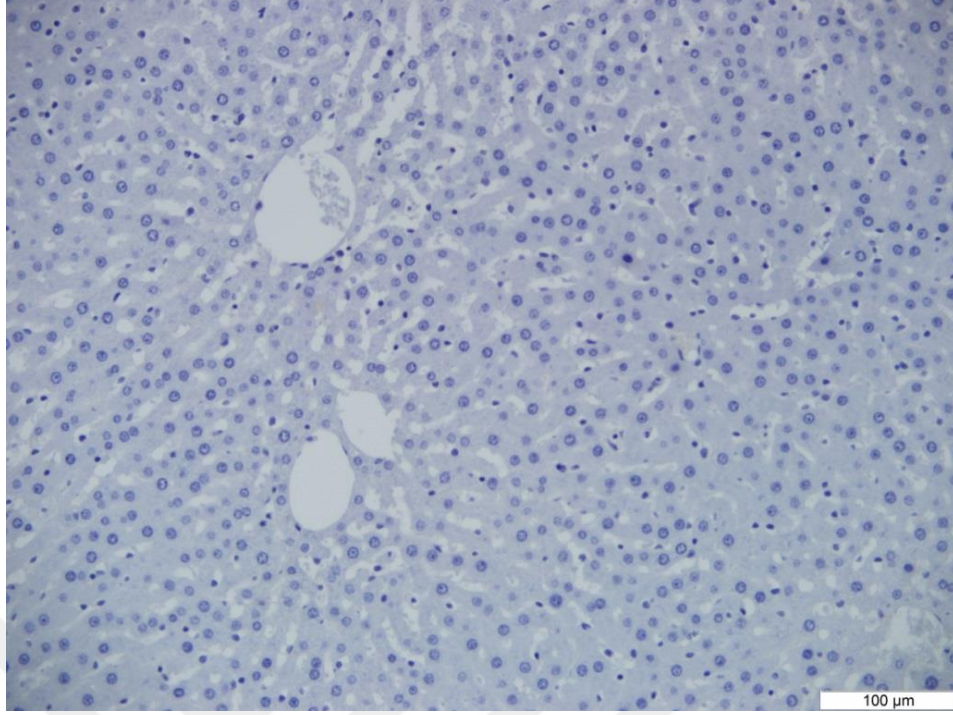
3.5.2. Nitrotirozin

Tüm gruplara ait Nitrotirozin immun pozitif hücre sayılarının ortalama değeri Tablo 6'da verildi. Kontrol (Resim 34), Sham (Resim 35) ve Silimarin (Resim 36) gruplarında Nitrotirozin immun reaktivitesi gözlenmedi. DEN grubunda (Resim 37) intrasitoplazmik yerleşimli nitrotirozin immun pozitif hücre sayısının ortalama değerine göre, DEN+Silimarin grubunda (Resim 38) düşüş gözlenmekle birlikte bu düşüş istatistiki açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

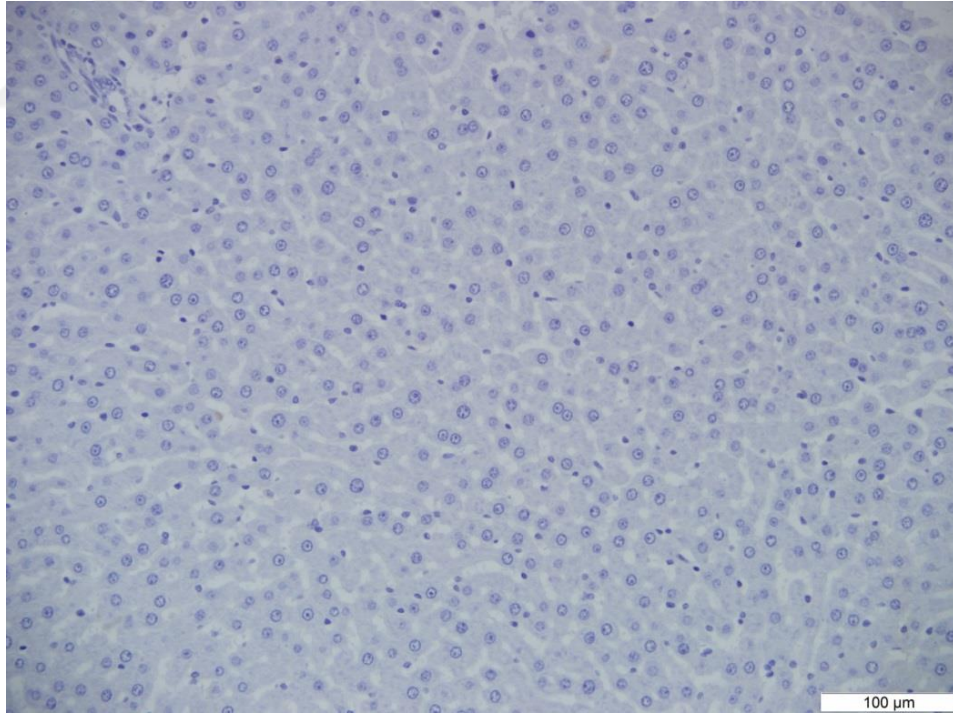
Tablo 6. Tüm gruplara ait ortalama Nitrotirozin pozitif hücre sayıları

Gruplar	Grup 1 (Kontrol) n = 10	Grup 2 (Sham) n = 10	Grup 3 (DEN) n = 10	Grup 4 (DEN + Silimarin) n = 10	Grup 5 (Silimarin) n = 10
Nitro tirozin	---*	---*	52.9 ± 8.73 ^a	51.3 ± 9.26 ^a	---*

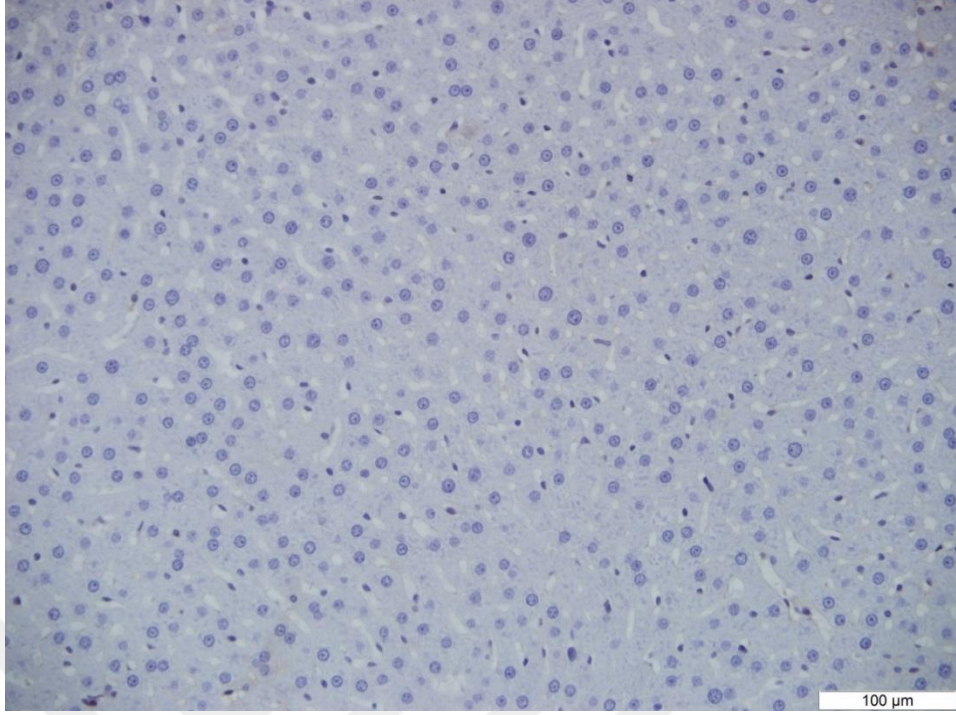
Dipnot: * 0 değerini ifade etmektedir. ^a DEN ve DEN+Silimarin grupları arasında istatistiki açıdan fark yoktur ($p>0.05$).



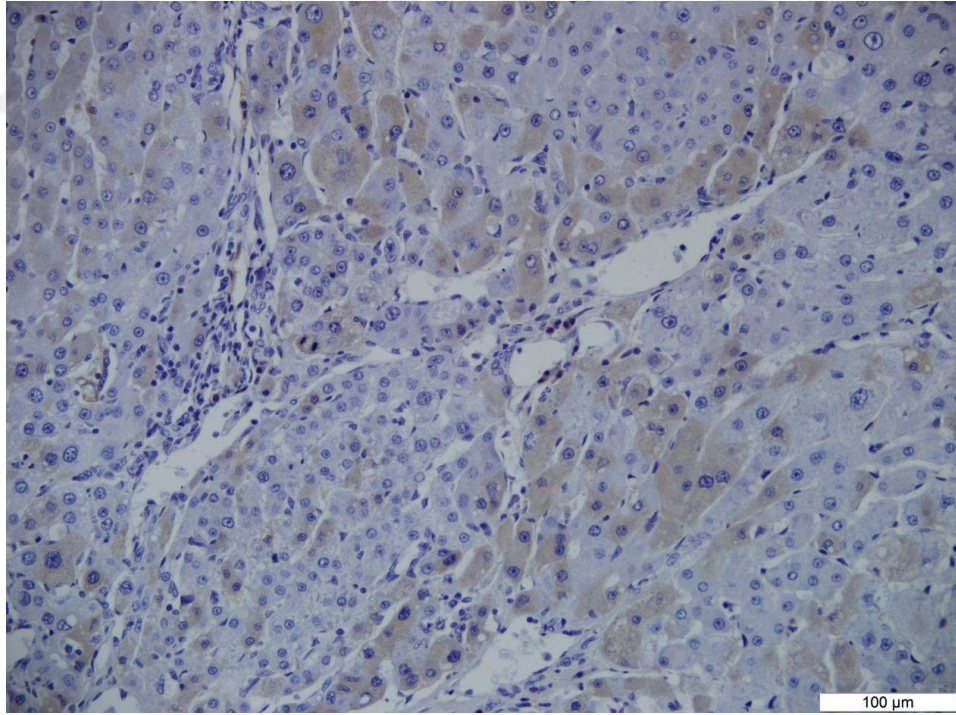
Resim 34. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, Nitrotirozin, IHK, Bar=100 µm.



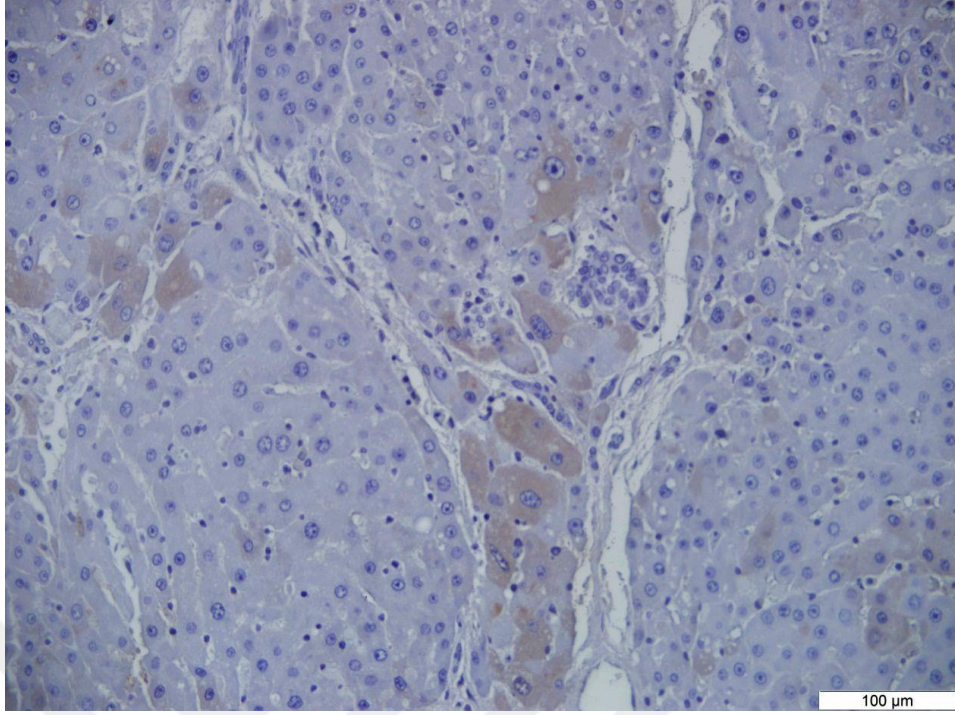
Resim 35. Sham grubu, karaciğer dokusu, Nitrotirozin, IHK, Bar=100 µm.



Resim 36. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, Nitrotirozin, IHK, Bar=100 µm.



Resim 37. DEN grubu, karaciğer dokusu, Nitrotirozin immunpozitif hücreler, IHK, Bar=100 µm.



Resim 38. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, Nitrotirozin immunpozitif hücreler, IHK, Bar=100 µm.

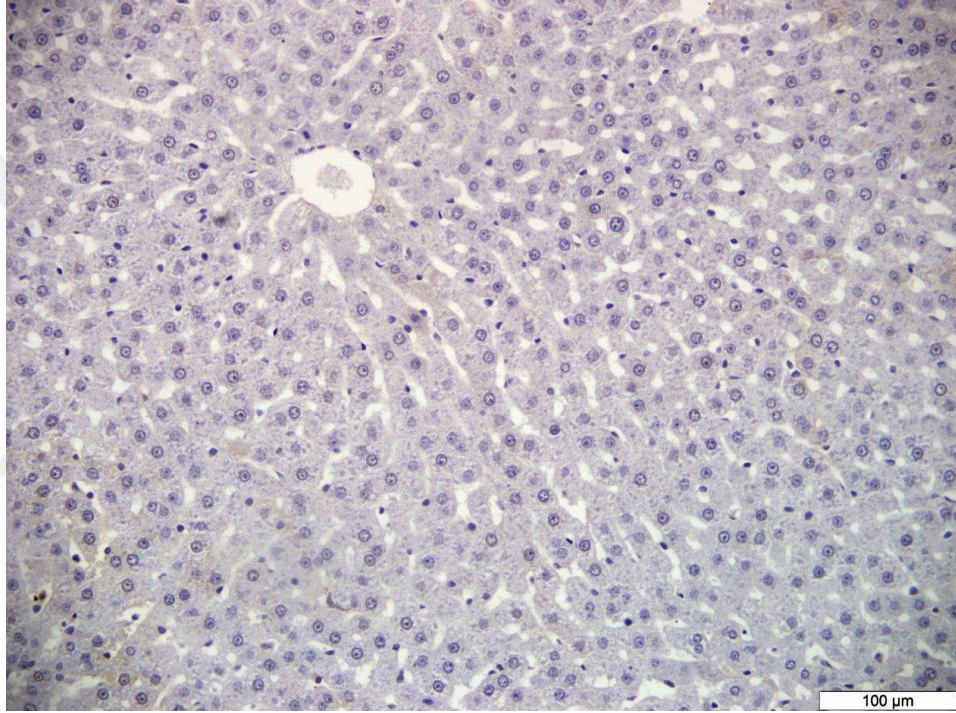
3.5.3. PCNA

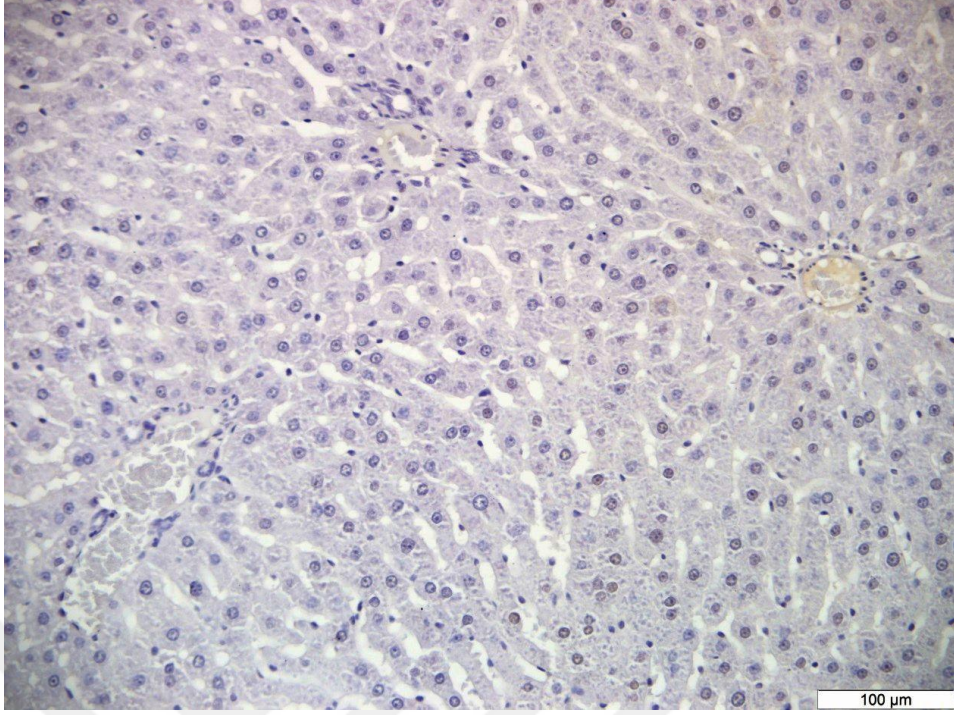
Tüm gruplara ait PCNA immun pozitif hücre sayılarının ortalama değeri Tablo 7’de verilmiştir. Kontrol (Resim 39), Sham (Resim 40) ve Silimarin (Resim 41) gruplarında PCNA yönünden immun pozitif reaksiyona rastlanmadı. DEN (Resim 42) ve DEN+Silimarin (Resim 43) gruplarında hepatosit çekirdeklerinde PCNA pozitif immun boyanma gözlemlendi. DEN grubunda DEN + Silimarin grubuna kıyasla pozitif boyanan ortalama hücre sayıları yüksek bulunmakla birlikte aralarındaki fark pozitif hücre ortalaması açısından istatistiki olarak anlamlı bulunamadı ($p>0.05$).

Tablo 7. Tüm gruplara ait ortalama PCNA pozitif hücre sayıları

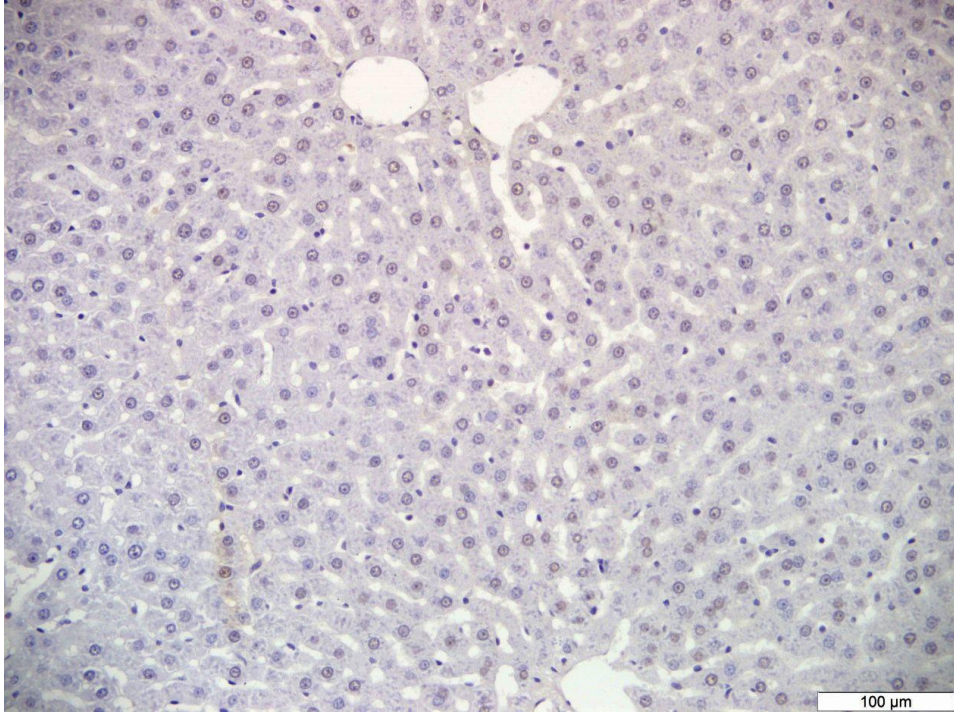
Gruplar	Grup 1 (Kontrol) n = 10	Grup 2 (Sham) n = 10	Grup 3 (DEN) n = 10	Grup 4 (DEN + Silimarin) n = 10	Grup 5 (Silimarin) n = 10
PCNA	---*	---*	82.9 ± 6.17 ^a	79.8 ± 6.74 ^a	---*

Dipnot: * 0 değerini ifade etmektedir. ^a DEN ve DEN+Silimarin grupları arasında istatistiki açıdan fark yoktur (p>0.05).

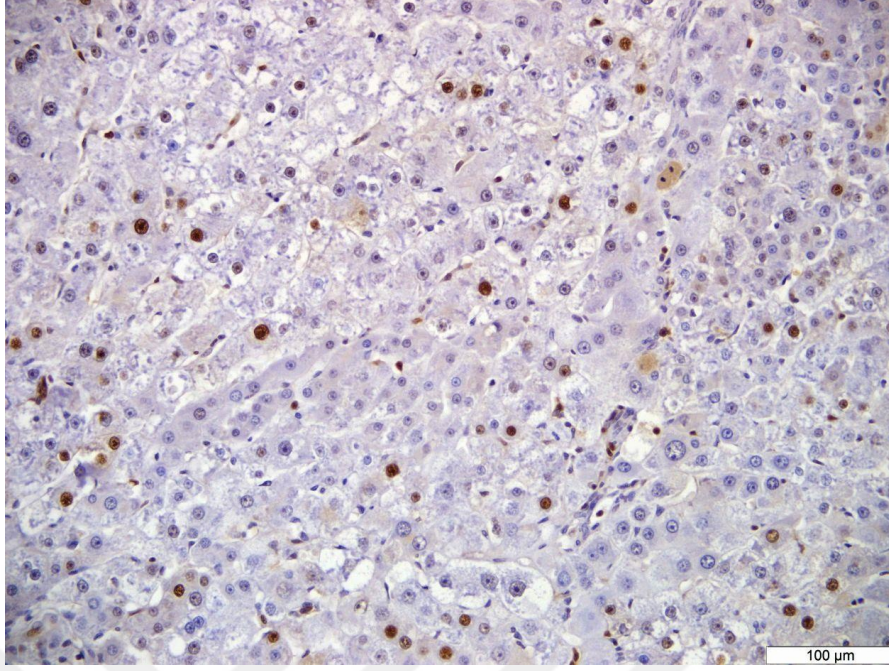
**Resim 39.** Kontrol grubu, karaciğer dokusu, PCNA, IHK, Bar=100 µm.



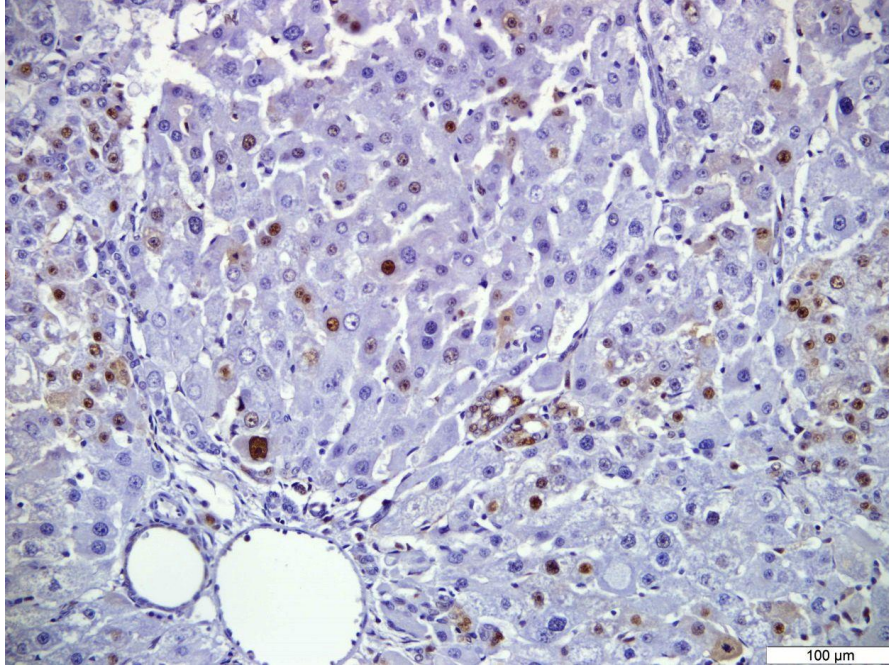
Resim 40. Sham grubu, karaciğer dokusu, PCNA, IHC, Bar=100 µm.



Resim 41. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, PCNA, IHC, Bar= 100 µm.



Resim 42. DEN grubu, karaciğer dokusu, hepatosit çekirdeklerinde PCNA pozitif immun reaksiyon IHK, Bar= 100 µm.



Resim 43. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, hepatosit çekirdeklerinde PCNA pozitif immun reaksiyon, IHK, Bar= 100 µm.

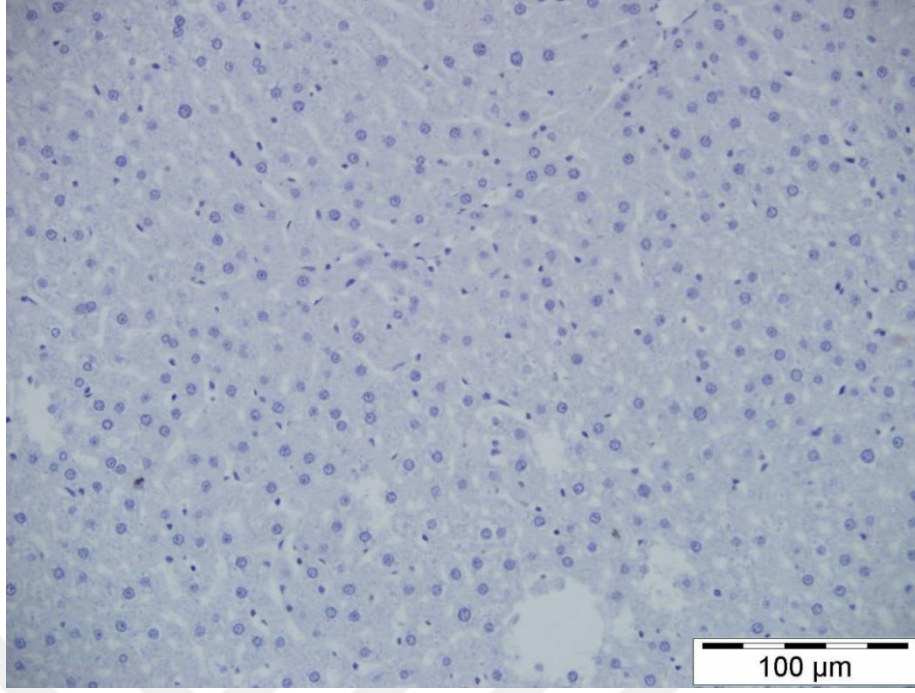
3.5.4. GSTPi

Tüm gruplara ait GSTPi immun pozitif hücre sayılarının ortalama değeri Tablo 8’de verildi. Kontrol (Resim 44), Sham (Resim 45) ve Silimarin (Resim 46) gruplarında GSTPi ekspresyonuna rastlanılmazken DEN (Resim 47) ve DEN+Silimarin (Resim 48) gruplarında immunoreaktiviteye rastlandı. DEN ve DEN+Silimarin gruplarında hem sitoplazmada hem de çekirdekte kahverengi boyanmış geniş alana yayılmış immun pozitif boyanmalar gözlemlendi. DEN grubunda ortalama pozitif hücre sayısı $176,1 \pm 7.52$ iken DEN+Silimarin grubunda bu sayının 154.3 ± 11.54 ’e düştüğü gözlemlendi. Bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0.05$).

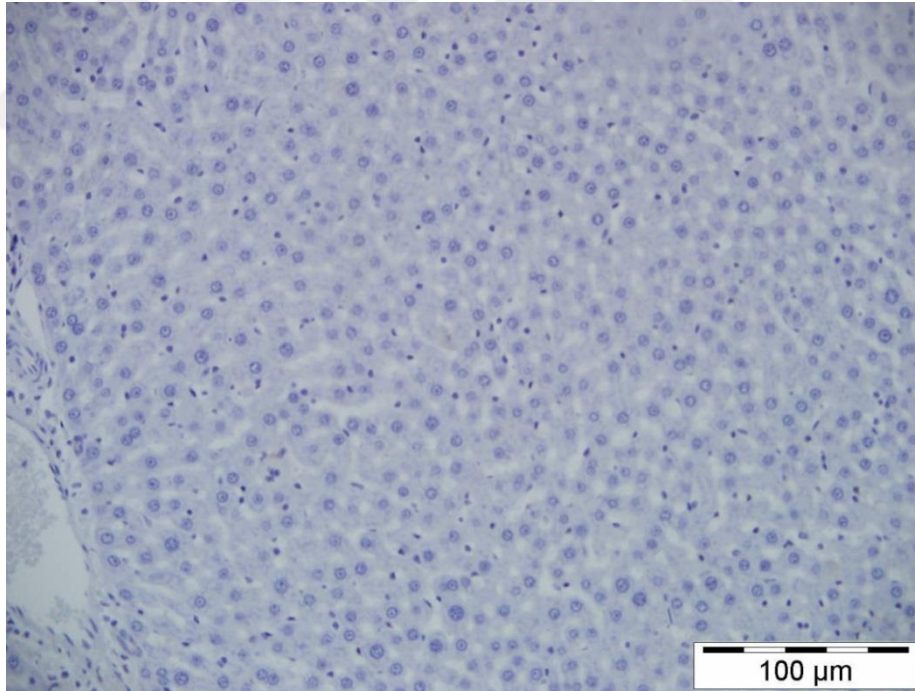
Tablo 8. Tüm gruplara ait ortalama GSTPi pozitif hücre sayıları

Gruplar	Grup 1 (Kontrol) n = 10	Grup 2 (Sham) n = 10	Grup 3 (DEN) n = 10	Grup 4 (DEN + Silimarin) n = 10	Grup 5 (Silimarin) n = 10
GSTPi	---*	---*	$176,1 \pm 7.52^a$	154.3 ± 11.54^a	---*

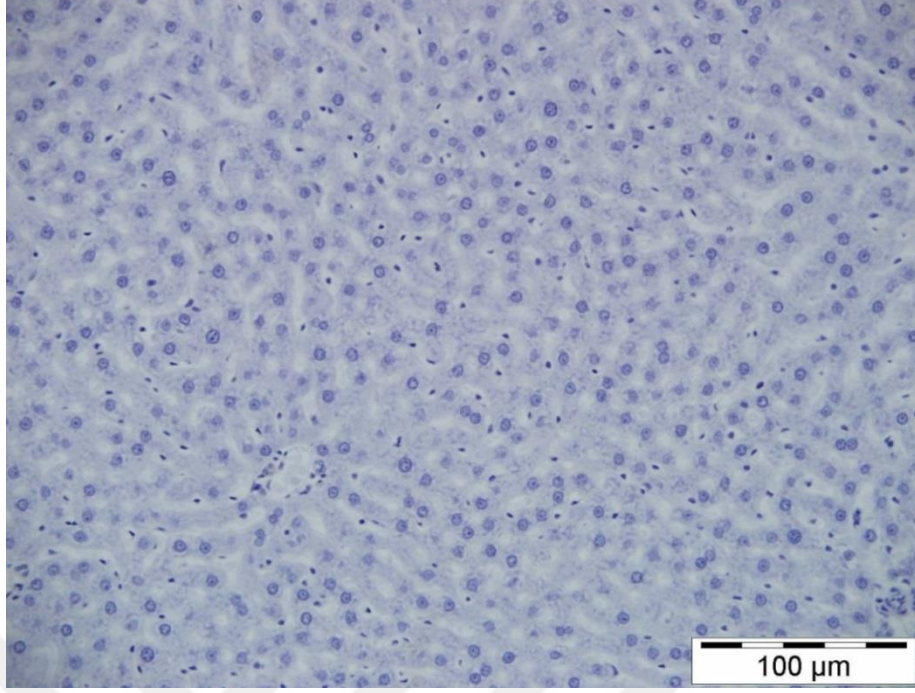
Dipnot: * 0 değerini ifade etmektedir. ^a DEN ve DEN+Silimarin grupları arasında istatistiki açıdan fark yoktur ($p > 0.05$).



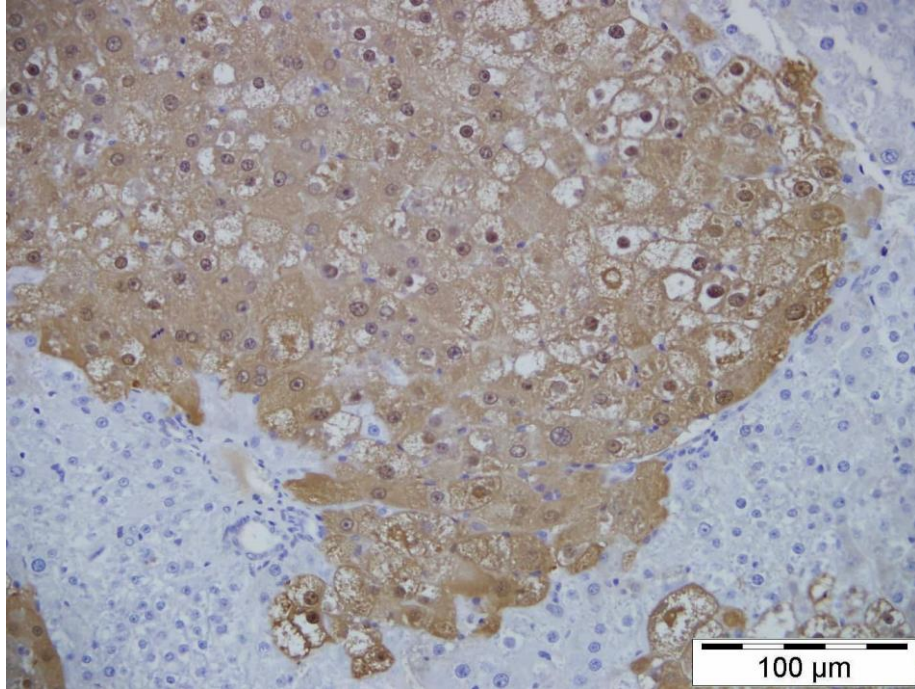
Resim 44. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, GSTPi, IHK, Bar= 100 µm.



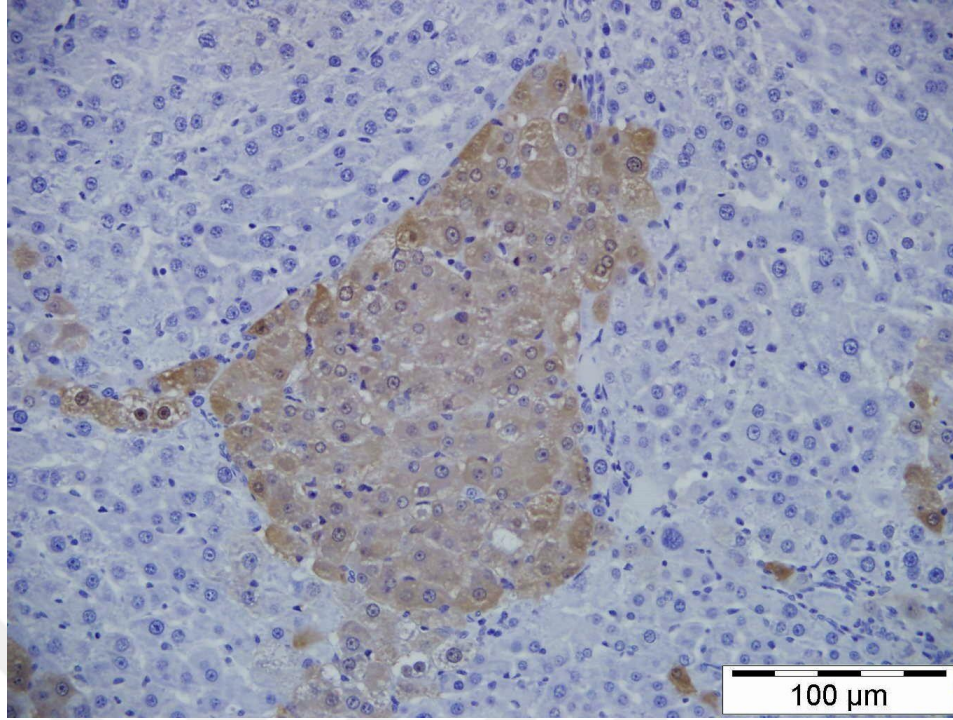
Resim 45. Sham grubu, karaciğer dokusu, GSTPi, IHK, Bar= 100 µm.



Resim 46. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, GSTPi, IHC, Bar= 100 µm.



Resim 47. DEN grubu, karaciğer dokusu, GSTPi immun pozitif alan, IHC, Bar= 100 µm.



Resim 48. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, GSTPi immün pozitif alan, IHK, Bar= 100 μm.

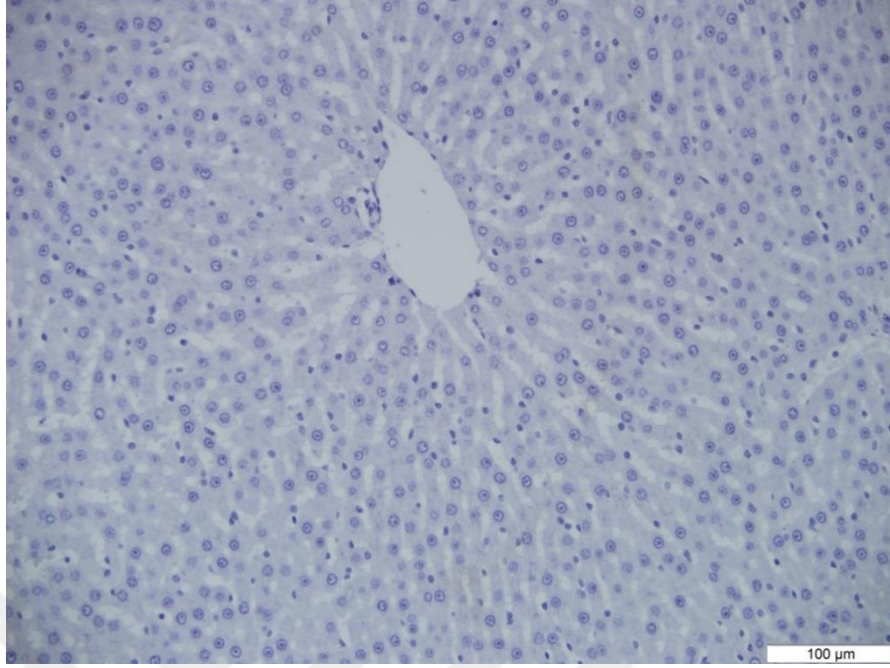
3.5.5. MMP-9

Tüm gruplara ait MMP-9 immün pozitif hücre sayılarının ortalama değeri Tablo 9’da verildi. Kontrol (Resim 49), Sham (Resim 50) ve Silimarin (Resim 51) gruplarında MMP-9 immün reaktivitesine rastlanılmadı. DEN (Resim 52) ve DEN+Silimarin (Resim 53) gruplarında MMP-9 immün pozitif boyanması hücre sitoplazmasında belirlendi. DEN+Silimarin grubunda DEN grubuna göre MMP-9 pozitif hücre sayısının ortalama değerlerinde azalma olmakla birlikte bu azalma istatistiki olarak anlamlı değil idi ($p>0.05$).

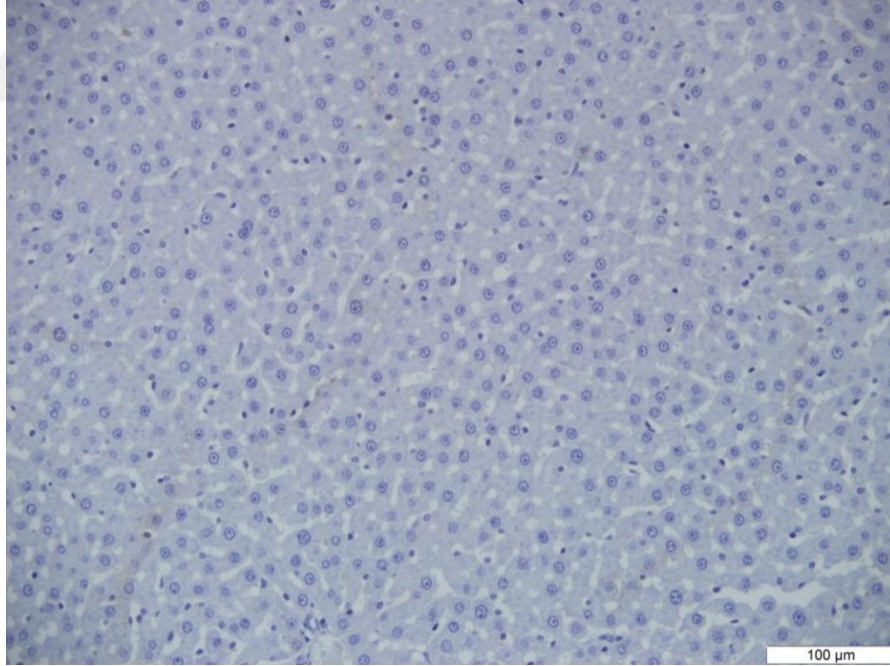
Tablo 9. Tüm gruplara ait ortalama MMP-9 pozitif hücre sayıları

Gruplar	Grup 1 (Kontrol) n = 10	Grup 2 (Sham) n = 10	Grup 3 (DEN) n = 10	Grup 4 (DEN + Silimarin) n = 10	Grup 5 (Silimarin) n = 10
MMP-9	---*	---*	32.5 ± 4.84 ^a	29.5 ± 3.21 ^a	---*

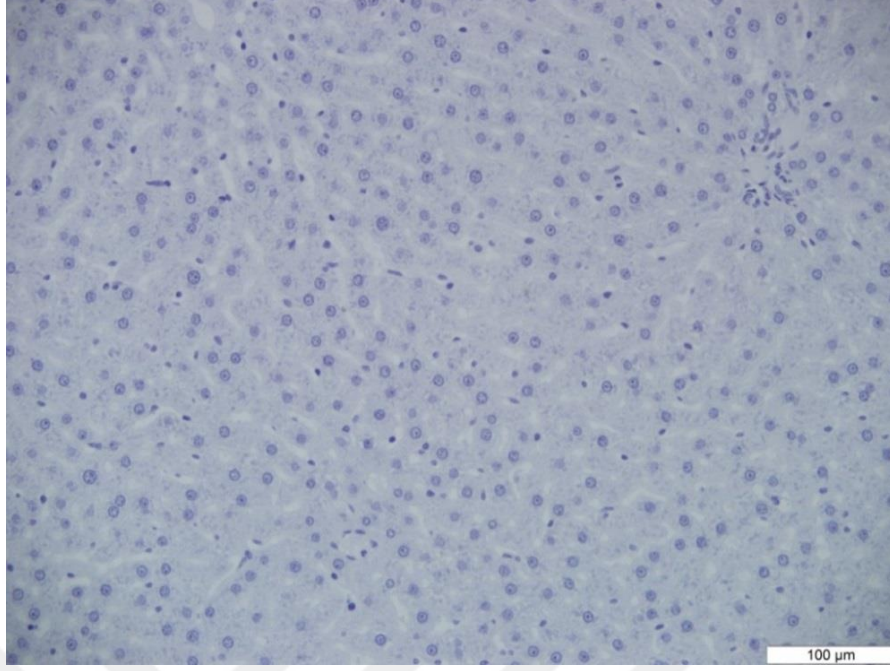
Dipnot : * 0 değerini ifade etmektedir. ^a DEN ve DEN+Silimarin grupları arasında istatistiki açıdan fark yoktur ($p>0.05$).



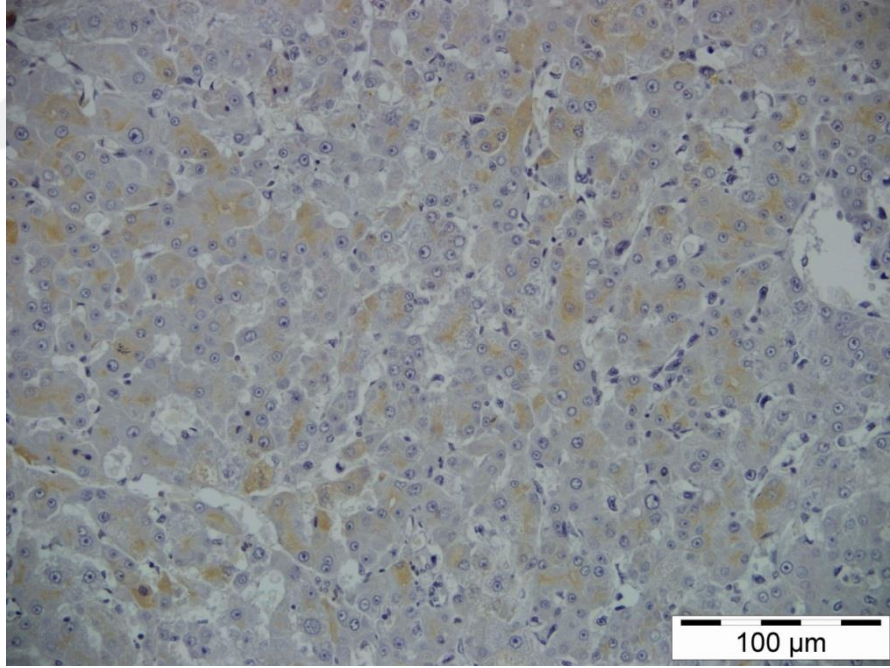
Resim 49. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, MMP-9, IHK, Bar= 100 μm.



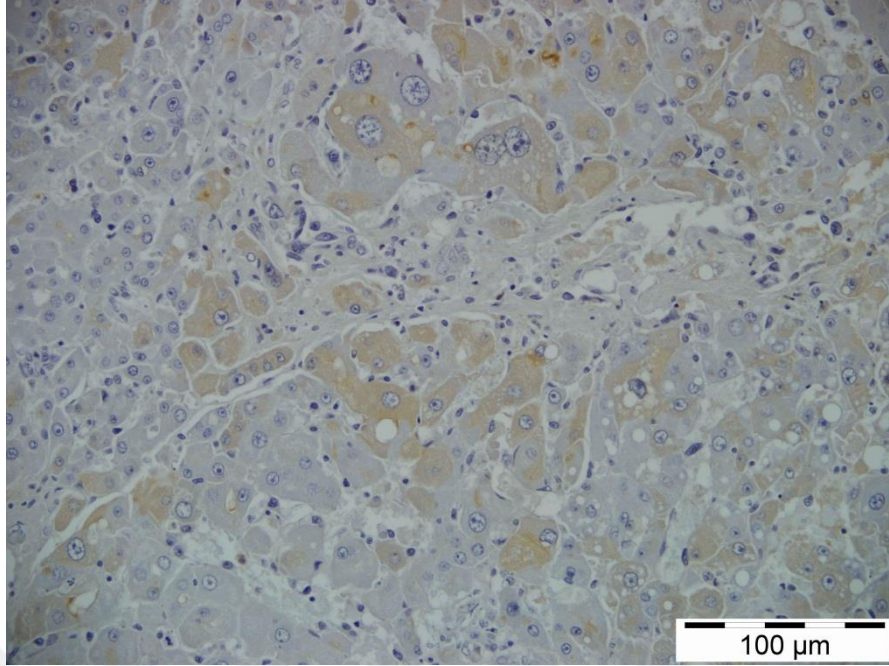
Resim 50. Sham grubu, karaciğer dokusu, MMP-9, IHK, Bar= 100 μm.



Resim 51. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, MMP-9, IHK, Bar= 100 μm.



Resim 52. DEN grubu, karaciğer dokusu, intrasitoplazmik MMP-9 immun boyanma, IHK, Bar= 100 μm.



Resim 53. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, intrasitoplazmik MMP-9 immün boyanma, IHK, Bar= 100 µm.

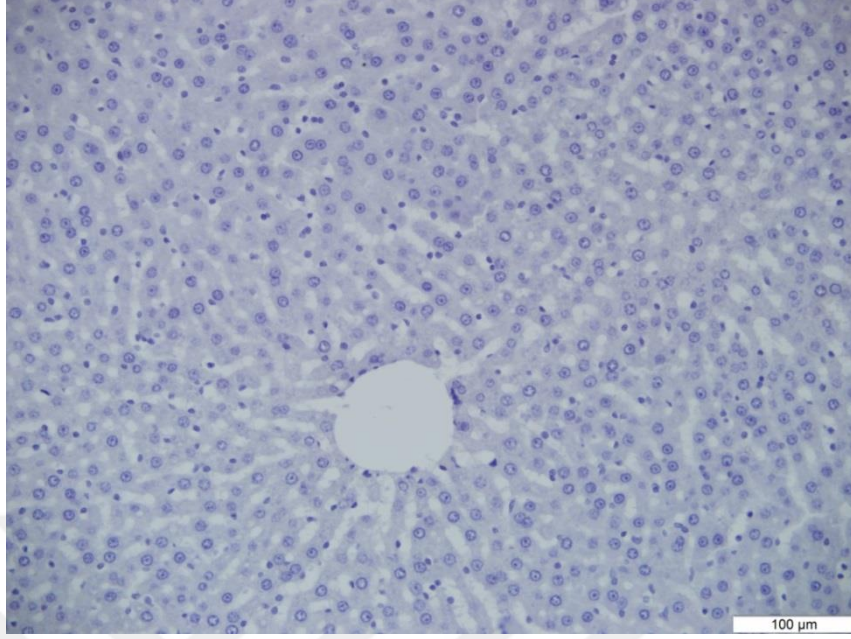
3.5.6. HPIP

Tüm gruplara ait HPIP immün pozitif hücre sayılarının ortalama değeri Tablo 10'da verilmiştir. Kontrol (Resim 54), Sham (Resim 55) ve Silimarin (Resim 56) gruplarında HPIP ekspresyonuna rastlanılmadı. DEN (Resim 57) ve DEN + Silimarin (Resim 58) gruplarında intrasitoplazmik yerleşimli immün pozitif boyanma gözlemlendi. DEN grubunda HPIP pozitif hücre sayılarının ortalama değerinde artış gözlenirken, Silimarin uygulamasının HPIP pozitif hücre sayısında azalmaya neden olduğu ama bu düşüşün istatistiksel olarak önem arz etmediği saptandı ($p>0.05$).

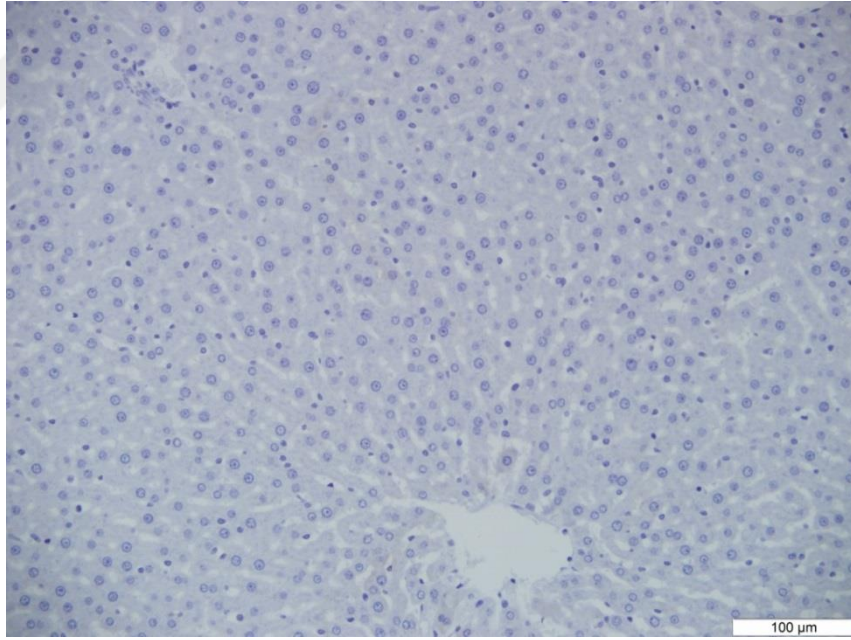
Tablo 10. Tüm gruplara ait ortalama HPIP pozitif hücre sayıları

Gruplar	Grup 1 (Kontrol) n = 10	Grup 2 (Sham) n = 10	Grup 3 (DEN) n = 10	Grup 4 (DEN + Silimarin) n = 10	Grup 5 (Silimarin) n = 10
HPIP	---*	---*	60.5 ± 7.46 ^a	50 ± 5.45 ^a	---*

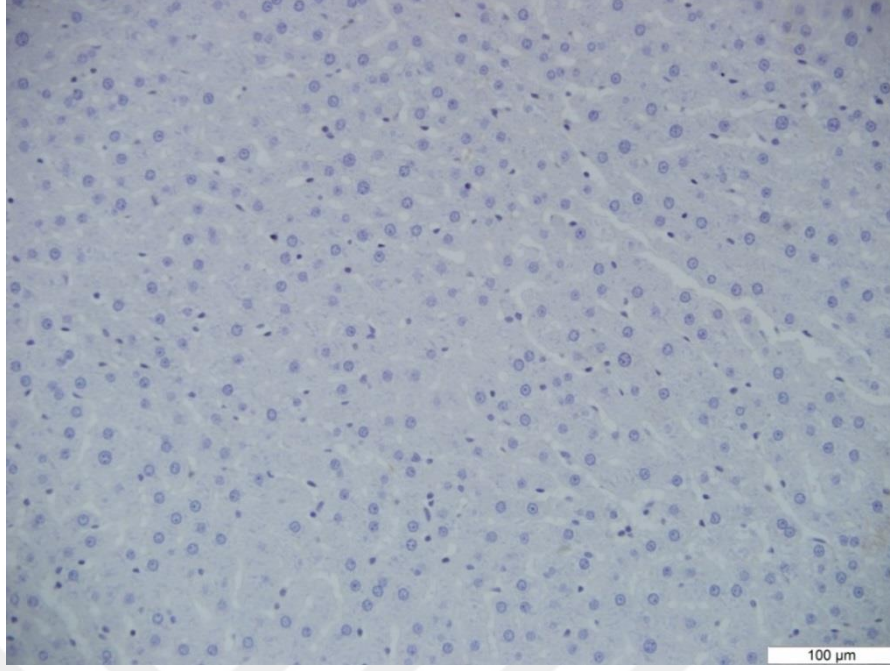
Dipnot: * 0 değerini ifade etmektedir. ^a DEN ve DEN+Silimarin grupları arasında istatistiksel açıdan fark yoktur ($p>0.05$).



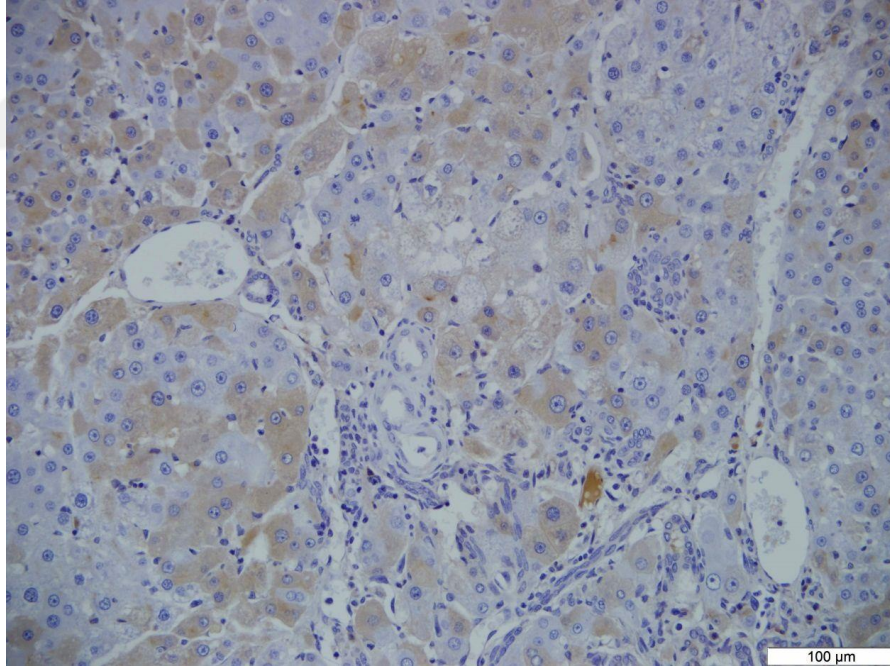
Resim 54. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, HPIP, IHK, Bar= 100 μm.



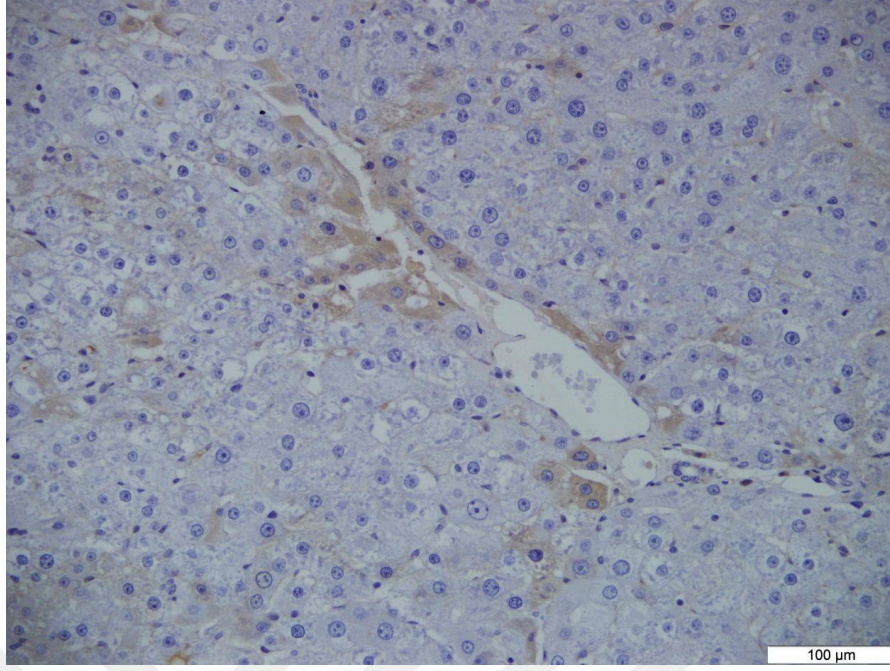
Resim 55. Sham grubu, karaciğer dokusu, HPIP, IHK, Bar= 100 μm.



Resim 56. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, HPIP, IHC, Bar= 100 µm.



Resim 57. DEN grubu, karaciğer dokusu, hepatosit sitoplazmasında immun pozitif HPIP boyanması, IHC, Bar= 100 µm.



Resim 58. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, hepatosit sitoplazmasında immun pozitif HPIP boyanması, IHK, Bar= 100 µm.

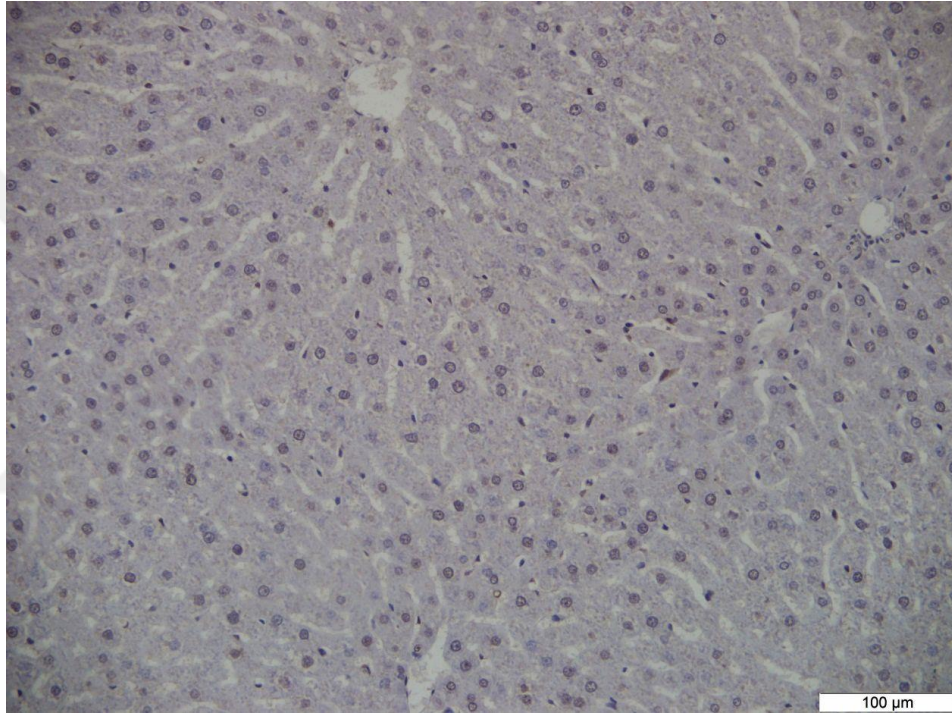
3.6.TUNEL Bulguları

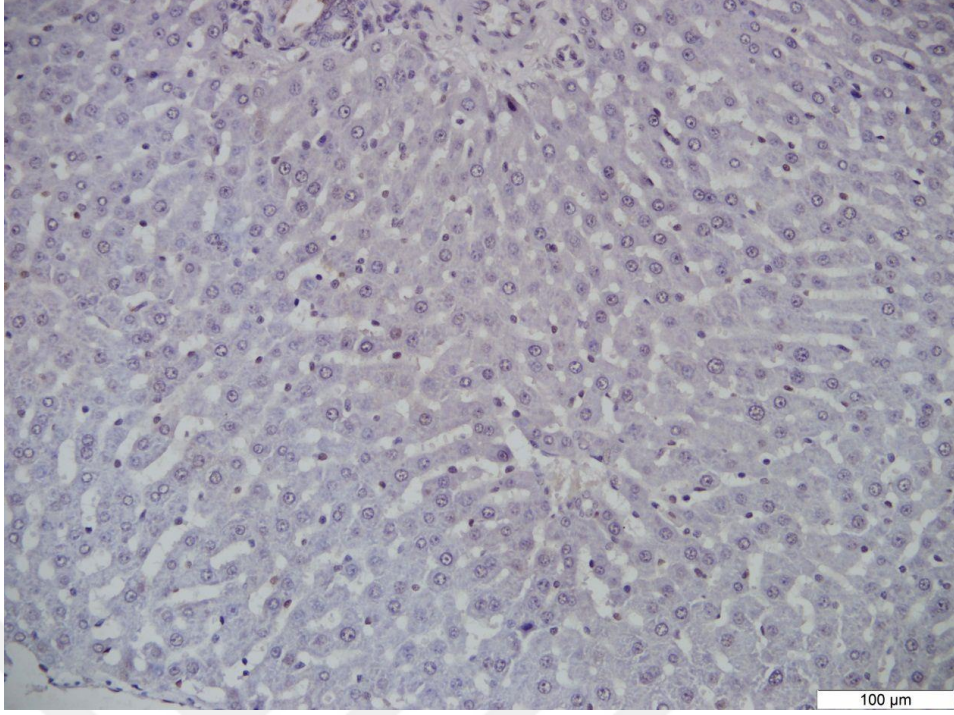
Tüm gruplara ait TUNEL pozitif hücre sayılarının ortalama değerleri Tablo 11’de verildi. Kontrol (Resim 59), Sham (Resim 60) ve Silimarin (Resim 61) gruplarında TUNEL pozitif boyanma gözlenmedi. DEN (Resim 62) ve DEN+Silimarin (Resim 63) gruplarında hepatosit çekirdeklerinde TUNEL pozitif boyanmalar belirlendi. Silimarin uygulamasının TUNEL pozitif hücre sayısının ortalama değerini DEN grubuna kıyasla arttırdığı gözlenmekle birlikte gözlenen bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Kahverengi boyanmış çekirdekli pozitif hücrelerin dışında hem sitoplazmik hem de çekirdek boyanması gösteren hücreler de DEN ve DEN + Silimarin gruplarında gözlenmiş olup bunlar nekrotik hücreler olarak kabul edilmiş olup değerlendirmeye tabi tutulmamıştır.

Tablo 11. Tüm gruplara ait ortalama TUNEL pozitif hücre sayıları

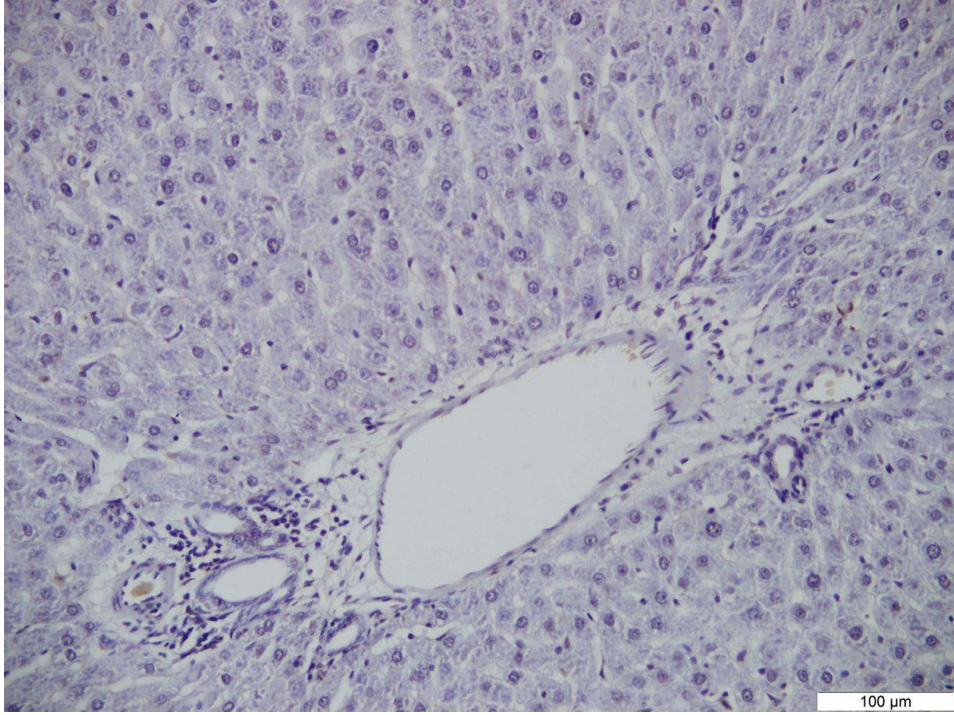
Gruplar	Grup 1 (Kontrol) n = 10	Grup 2 (Sham) n = 10	Grup 3 (DEN) n = 10	Grup 4 (DEN + Silimarin) n = 10	Grup 5 (Silimarin) n = 10
TUNEL	---	---	51.6 ± 5.27 ^a	59.8 ± 6.77 ^a	---

Dipnot: * 0 değerini ifade etmektedir. ^a DEN ve DEN+Silimarin grupları arasında istatistiki açıdan fark yoktur (p>0.05).

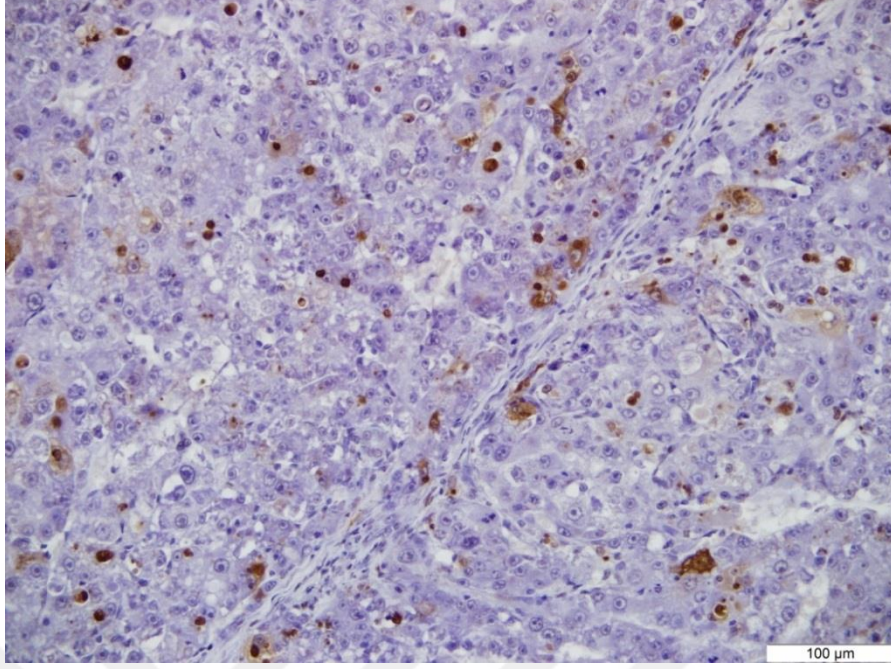
**Resim 59.** Kontrol grubu, karaciğer dokusu, TUNEL metodu, Bar= 100 µm.



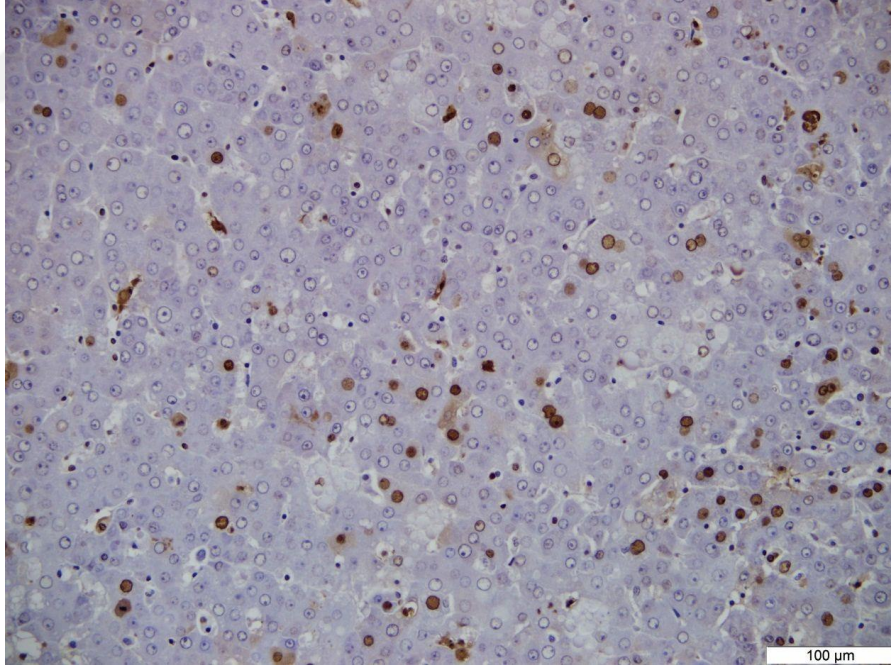
Resim 60. Sham grubu, karaciğer dokusu, TUNEL metodu, Bar= 100 µm.



Resim 61. Silimarin grubu, karaciğer dokusu, TUNEL metodu, Bar= 100 µm.



Resim 62. DEN grubu, karaciğer dokusu, hepatosit çekirdeklerinde TUNEL pozitif boyanma, Bar= 100 μm.



Resim 63. DEN+Silimarin grubu, karaciğer dokusu, hepatosit çekirdeklerinde TUNEL pozitif boyanma, Bar= 100 μm.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer kanseri, kanser nedenli ölümlerde erkeklerde ikinci, kadınlarda altıncı sırada yer alır (Kim ve ark. 2015). Hepatoselüler Karsinom (HCC), karaciğerin primer malign tümörlerinin % 70-85'ini oluşturur (Shirakami ve ark. 2012). HCC, insanlarda en sık rastlanan malign tümörlerden biri olup, Dünyada gözlenen kanser vakalarında beşinci sırada, kansere bağlı ölümlerde ise üçüncü sırada yer almaktadır (Zhang ve ark. 2013, Medhat ve ark. 2017). Her yıl HCC nedeniyle 500.000'den fazla ölüm meydana geldiği bildirilmiştir (Fan ve ark. 2015). HCC erkeklerde kadınlardan daha sık görülmekte olup insidans oranı yaklaşık olarak 3:1'dir. HCC oldukça kötü bir prognoza sahip olup beş yıllık hayatta kalma oranı % 9'un altındadır. Bunun temel nedeni ise HCC'nin sıklıkla ilerlemiş safhalarda teşhis edilmesidir (Rajasekaran ve ark. 2011).

DEN birçok hayvan türünde; karaciğer, mide, akciğer ve hematopoyetik organlar gibi çeşitli organlarda tümör oluşumuna neden olan önemli bir karsinojendir (Aiub ve ark. 2011, Santos ve ark. 2014). DEN, sigara dumanında, yüksek nitrat seviyesine sahip yeraltı sularında, çedar peynirinde, soya fasülyesinde, kürlenmiş ve kızartılmış yemeklerde, tuzlanmış ve kurutulmuş balıklarda, alkollü içeceklerde, mesleki ortamlarda, kozmetik ürünlerde, tarımsal kimyasallarda ve sanayi endüstrisi ürünlerinde (örn: elyaf, copolymerler ve yağ üretiminde) bulunmaktadır (Rezaie ve ark. 2013, Patial ve ark. 2015). Buna ek olarak bazı ilaçların metabolizması sonucunda da üretilmektedir. Sigara dumanında (1-28 ng/adet sigara ve biberon emziğinde (10 ppb seviyesinde) bulunmaktadır (Pradeep ve ark. 2007). Ratlarda DEN ile deneysel olarak oluşturulan HCC modeli, hepatokarsinogenezi incelemek için yaygın olarak kullanılır ve kabul görür (Bishayee ve Dhir 2009).

Silimarin, Silybum marianum bitkisinin tohumlarından ve meyvelerinden elde edilen bir polifenolik flavonoiddir (Bosch-Barrera ve Menendez 2015). Karaciğer ve safra hastalıklarının tedavisinde 2000 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır (Haddadi ve ark. 2014, Madrigal-Santillán ve ark. 2014). Silimarin anti oksidatif,

anti enflamatuar, antifibrotik, immunomodulatör ve proapoptotik etkiye sahip önemli bir antikanserojendir (Luper 1998, Kren ve Walterová 2005). Deneysel çalışma sonuçları, Silimarin'in ethanol, DEN ve CCl₄ gibi toksik kimyasallara karşı koruyucu etki gösterdiğini vurgulamaktadır (Kim ve ark. 2016).

DEN uygulanarak oluşturulan deneysel karaciğer kanser modeli çalışmalarında DEN uygulamasının hayvanların vücut ağırlıklarında düşüğe (Dai ve ark. 2013, Arul ve Subramanian 2013), karaciğer ağırlığında artışa (Dai ve ark. 2013, Arul ve Subramanian 2013, Shilpa ve ark. 2012) ve karaciğerde farklı büyüklüklerde multifokal nodüler yapıların oluşumuna (Liu ve ark. 2015, Cui ve ark. 2014, Dai ve ark. 2013, Arul ve Subramanian 2013, Shilpa ve ark. 2012) neden olduğu tespit edilmiştir.

DEN verilerek deneysel olarak oluşturulan deneysel karaciğer hasarı ve kanser modellerinde koruyucu olarak uygulanan Silimarin'in, DEN uygulamasının neden olduğu vücut ağırlığındaki düşüşü önlediği (Linza ve ark. 2013, Hussain ve ark. 2012, Ramakrishnan ve ark. 2006), karaciğerde tespit edilen ağırlık artışını azalttığı (Hussain ve ark. 2012, Ramakrishnan ve ark. 2006) ve oluşan nodüler yapıların sayısını ve boyutunu azalttığı (Hussain ve ark. 2012, Ramakrishnan ve ark. 2006) yapılan farklı çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Yürüttüğümüz bu çalışmada; literatür verilerine uygun olarak DEN grubunda vücut ağırlıklarında düşüş, karaciğer ağırlıklarında ise artış tespit edildi. Vücut ağırlık kaybı hepatokarsinojenite ve hepatotoksisitenin en önemli semptomlarından biridir. Vücut ağırlığındaki azalma tekrarlayan karsinojen maruziyeti sonrası meydana gelen iştahsızlık ve yem tüketimindeki düşüşe atfedilmiştir. DEN ve DEN + Silimarin grubunda gözlenen karaciğer ağırlık artışının ise şekillenen hepatik nodüller ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada DEN uygulamasının literatür verilerine paralel şekilde vücut ağırlığını azalttığı, karaciğer ağırlığını arttırdığı gözlenmekle birlikte konusunda beklenen etkiyi sağlamasına rağmen Silimarin'in, vücut ağırlığı ve karaciğer-vücut ağırlığı oranları konusunda literatür verilerinin aksine beklenen olumlu etkiyi göstermediği saptandı. DEN ve

DEN + Silimarin grubu son vücut, karaciğer ağırlıkları ile karaciğer / vücut ağırlık oranları bakımından birbirine paralellik göstermekte idi. Çalışmamızda; literatür verilerine uyumlu olarak DEN uygulanan grupta karaciğerde irili ufaklı (3-4 mm) gri sarımsak renkte yumuşak kıvamlı çok sayıda nodül görüldü. DEN+Silimarin grubunda da DEN grubuna benzer şekilde nodüler lezyonlar gözlemlendi. Hepatoprotektif ve anti kanser etkili Silimarin'in nodüler yapıların azaltılması konusunda literatür verilerinin aksine beklenen olumlu etkiyi sağlamadığı tespit edildi.

DEN uygulaması sonucunda oluşturulan karaciğer kanser modelinde meydana gelen değişikliklerin histopatolojik olarak değerlendirildiği çok sayıda literatür verisi mevcuttur. Yapılan çalışmalarda, DEN uygulaması sonucu; HCC (Liu ve ark. 2015, de Guadalupe Chávez-López ve ark. 2015, Zúñiga-García ve ark. 2015, Cui ve ark. 2014, Song ve ark. 2014, Arul ve Subramanian 2013, Hussain ve ark. 2012, El Mesallamy ve ark. 2011, Ramakrishnan ve ark. 2006) ve kolangiyoadenokarsinom (Kadasa ve ark. 2015) oluşturulmuştur. Yapılan çalışmalarda DEN uygulaması sonucu karaciğer lopçuk yapısının bozulduğu (Arul ve Subramanian 2013, Hussain ve ark. 2012), trabeküler yapıların oluştuğu (Ramakrishnan ve ark. 2006), hücrelerde atipi (Cui ve ark. 2014, Song ve ark. 2014, Hussain ve ark. 2012, Ramakrishnan ve ark. 2006), çekirdek-sitoplazma oranında farklılıklar (Cui ve ark. 2014, Song ve ark. 2014), hiperkromazi (Arul ve Subramanian 2013, Hussain ve ark. 2012, El Mesallamy ve ark. 2011), megalositozis ve köpük sitoplazmalı hücre görünümü (El Mesallamy ve ark. 2011), mitotik figürler (Cui ve ark. 2014, Arul ve Subramanian 2013, El Mesallamy ve ark. 2011), granüler sitoplazmalı tümör hücreleri (Arul ve Subramanian 2013, Hussain ve ark. 2012) ve çok çekirdekli dev hücreleri (Song ve ark. 2014), hiyalin globülleri (Hussain ve ark. 2012), apoptoz (El Mesallamy ve ark. 2011), safra kanalı proliferasyonu (Hussain ve ark. 2012) ve yangısel hücre infiltrasyonu (Hussain ve ark. 2012) kaydedilmiştir.

DEN uygulanarak oluşturulan deneysel karaciğer kanseri ve karaciğer hasarı modellerine karşın Silimarin'in koruyucu etkilerinin histopatolojik olarak değerlendirildiği çalışmalar da mevcuttur. DEN uygulaması sonucu karaciğer

dokusunda meydana gelen bozuklukların Silimarin uygulamasıyla düzeltildiği ve Silimarin'in karaciğer koruyucu etki gösterdiği yapılan bazı çalışmalarla ortaya konulmuştur (Linza ve ark. 2013, Hussain ve ark. 2012, El Mesallamy ve ark. 2011, Shaarawy ve ark. 2009, Ramakrishnan ve ark. 2006).

Yaptığımız çalışmada DEN uygulanan grupta; karaciğer dokusunda 3-10 hücre kalınlığında, endotel hücrelerinin döşediği sinüzoid benzeri boşluklarla ayrılan trabeküler yapılar ve lumende hücresel yıkım ürünleri ile safra benzeri içeriklere sahip asiner yapılar ile kendini gösteren HCC'nin miks paterni hakimdi. Tümör hücrelerinde atipi, çekirdek / sitoplazma oranında farklılıklar, hiperkromazi, mitoz, yağlı değişim ve bununla birlikte hiyalin damlacıkları, soluk cisimcikler, etrafları fibröz kapsülle çevrili geniş kanama alanları, safra kanalı hiperplazisi ve şeffaf sitoplazmalı hücrelere rastlandı. Daha çok kanser aşamalarının değerlendirildiği benzer çalışmalarda ise atipi, çekirdek-sitoplazma oranında gözlenen değişimler, hiperkromazi, mitotik figürler, tümör dev hücreleri, safra kanalı proliferasyonu, hiyalin globülleri ve trabeküler yapıların olduğu tespit edilmiştir (Liu ve ark. 2015, de Guadalupe Chávez-López ve ark. 2015, Zúñiga-García ve ark. 2015, Kadasa ve ark. 2015, Cui ve ark. 2014, Song ve ark. 2014, Arul ve Subramanian 2013, Hussain ve ark. 2012, El Mesallamy ve ark. 2011, Ramakrishnan ve ark. 2006). Bizim çalışmamızda da bu değişikliklerin büyük bir kısmı gözlenirken, bu çalışmalardan farklı olarak DEN uygulanan grupta HCC'nin miks paterni ağır basmakta idi. Bu bulgular ışığında DEN'in deneysel karaciğer kanser modeli oluşturmada oldukça kullanılabilir olduğu kanaatine varılmıştır. DEN+Silimarin grubunda da DEN grubuna benzer şekilde trabeküler ve asiner yapılar ile HCC'nin miks paterni gözlemlendi. Histopatolojik yoklamalarda tümör alanında hücrelerde atipi, hiperkromazi, mitoz, yağlı değişimler görmek mümkün idi. Bunun yanında hiyalin damlacıkları, soluk cisimcikler, etrafları fibröz kapsülle çevrili geniş kanama alanları, safra kanalı hiperplazisi ve şeffaf sitoplazmalı hücreler de tümör alanında saptanan diğer bulgulardandı. Bu bulgular ışığında çalışmamızda Silimarin'in literatür verilerinin aksine (Linza ve ark. 2013, Hussain ve ark. 2012, El Mesallamy ve ark. 2011, Shaarawy ve ark. 2009, Ramakrishnan ve ark. 2006) Silimarin'in anti kanserojenik etki göstermediği tespit edildi.

Aminotransferazlar amino asitteki amino grubunun bir α -ketoasite transferini katalizleyen ve prostetik grubu pridoksal 5-fosfat olan hücre enzimleridir. Bu grubun en önemli üyeleri aspartat aminotranferaz (AST) ve alanin amino transferazdır (ALT). Hücre içi organellerde sentezlenen aminotransferazların, hücre membran permeabilitesindeki değişiklik veya hücre hasarı gibi durumlarda serum aktiviteleri artmaktadır. Bu durum; doku ve organlardaki patolojik değişiklikleri işaret etmektedir. Hafif hücre hasarlarında sitoplazma enzimleri kana geçerken, şiddetli olan hücre hasarlarında mitokondri enzimlerinin serum aktiviteleri artmaktadır (Bulum ve Mengi 2000, Hasanein ve ark. 2017). ALT ve AST hepatoselüler hasarın göstergesi olan aminotransferaz grubu enzimlerdir (Feng ve ark. 2014). ALT sadece sitozolde yer alırken AST hem sitozolde hem de mitokondride yer almaktadır (Uygun ve Polat 2009). Bu nedenle ALT, AST'ye kıyasla hepatoselüler hasarın teşhis edilmesinde daha spesifikdir (Tekin ve ark. 2014, Ambade ve ark. 2016). Alkalen fosfataz (ALP), organizmada yüksek aktivite gösteren bir enzimdir (Bulum ve Mengi 2000). ALP başlıca osteoblastlar, hepatositlerin kanaliküler yüzü, biliyer epitelin lümenine bakan yüzü, ince barsakların fırçamsı kenarı ve böbrek proksimal tubuluslardan sentezlenmektedir. ALP aktivitesindeki artış kolestatik karaciğer hastalığı, hepatoselüler karaciğer hastalığı, viral hepatit ve tümörlerinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Uygun ve Polat 2009, Parveen ve ark. 2011).

DEN uygulanarak oluşturulan hepatotoksisite ve kanser modelinde meydana gelen karaciğer hasarının ortaya konulması amacıyla ALT, AST ve ALP aktivitelerinin değerlendirildiği çok sayıda çalışma mevcuttur. DEN uygulanan gruplarda ALT, AST ve ALP seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli derecede artış gösterdiği ve koruyucu madde uygulanan grupların ise bu seviyeleri düşürdüğü (Kadasa ve ark. 2015, Krajka-Kuźniak ve ark. 2015, Atakisi ve ark. 2013) biyokimyasal yöntemlerle belirlenmiştir.

Silimarin'in karaciğer koruyucu etkisinin ALT, AST ve ALP aktiviteleri üzerinden değerlendirildiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. DEN ve CCl₄ gibi hepatotoksik maddelerin uygulandığı gruplarda ALT (Abdel-Moneim ve ark. 2015,

Linza ve ark. 2013, Saleem ve ark. 2013, Pradeep ve ark. 2010, Shaarawy ve ark. 2009, Ramakrishnan ve ark. 2007, Pradeep ve ark. 2007), AST (Abdel-Moneim ve ark. 2015, Linza ve ark. 2013, Saleem ve ark. 2013, Pradeep ve ark. 2010, Shaarawy ve ark. 2009, Ramakrishnan ve ark. 2007, Pradeep ve ark. 2007) ve ALP (Abdel-Moneim ve ark. 2015, Saleem ve ark. 2013, Pradeep ve ark. 2010, Shaarawy ve ark. 2009, Ramakrishnan ve ark. 2007) seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı, Silimarin uygulanan koruyucu gruplarda ise bu seviyelerin düştüğü tespit edilmiştir.

Karaciğer hasarının tespitinde ALT, AST ve ALP aktiviteleri sıklıkla kullanılan biyokimyasal belirteçlerdir (Shaarawy ve ark. 2009). Bu nedenle çalışmamızda karaciğer hasarının oluşup oluşmadığının tespiti amacıyla ALT, AST ve ALP aktiviteleri belirlenmiştir. Literatür verilerine uyumlu olarak DEN grubunda, ALT, AST ve ALP aktivitelerinde kontrol grubuna göre önemli derecede artış belirlenmiş ve bu artış karaciğer hasarının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. DEN uygulaması sonucu oluşan karaciğer hasarının serbest radikal düzeyini arttırdığı, dolayısıyla hücrel hasarın plazma membran bütünlüğünü bozarak sitoplazmada veya mitokondride yer alan bu enzimlerin kan dolaşımına geçmesi sonucu serum aktivitelerinin arttığı öngörülmektedir. DEN grubunda bahsi geçen enzimlerin artan aktivitelerinin DEN+Silimarin grubunda ise dikkate değer derecede azaldığı tespit edilmiştir. Silimarin'in karaciğer koruyucu etkisi; serbest radikallerinin oluşumunu azaltmasına, membran bütünlüğünü korumasına ve sitoplazmik lokasyonlu bu enzimlerin dolaşıma sızmasını engellemesine bağlanmıştır.

Vücut sıvılarında bulunan bütün oksidanların toplam etkisini total oksidan kapasite – total oxidant statue (TOK-TOS) ifade eder (Kolkese Şahin ve ark. 2015). Serum ya da plazmadaki oksidanların konstrasyonlarını tespit edebilmek mümkündür. Ancak bu oksidanların etkileri birbiri üzerine etkiyebilir bu nedenle oksidanların ayrı ayrı ölçülmesi pratik bir yöntem değildir. TOS ölçümü tüm oksidanların seviyesini ortaya koyabilecek bir yöntem olarak belirlenmiştir (Yağcı ve ark. 2007). TOS için total peroksid (TP), serum oksidan aktivite (SOA) veya reaktif

oksijen metabolitleri (ROM) gibi isimler verilmektedir. Erel ve ark, TOS ölçümü için oldukça hassas, kolay ve ekonomik bir yöntem geliştirmiştir (Çobanoğlu 2011).

Vücutta serbest radikal üretimi ile serbest oksijen radikallerindeki artışı baskılayan antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur ve bu denge ortadan kalktığında oksidatif hasar ortaya çıkmaktadır (Yağcı ve ark. 2007).

DEN uygulanarak oluşturulan karaciğer kanser modeli çalışmalarında meydana gelen oksidatif hasarın TOS düzeyleri üzerinden değerlendirildiği herhangi bir literatür verisi bulunmamaktadır. Öte yandan Silimarin'in antioksidan etkisini ortaya koymak amacıyla TOS düzeylerinin değerlendirildiği az sayıda toksisite (Aziz ve ark. 2017, Ijaz ve ark. 2016, Verma ve ark. 2016, Javed ve ark. 2015) ve iskemik reperfüzyon hasar (Koçarslan ve ark. 2016, Turgut ve ark. 2008) çalışmaları mevcuttur. Deneysel olarak karaciğer, böbrek ve iskemik reseperfüzyon hasarı oluşturulan gruplarda artan TOS seviyesi, Silimarin uygulanan koruyucu gruplarda önemli ölçüde azaltılmıştır.

Çalışmamızda oksidan bir madde olan DEN ve antioksidan bir madde olan Silimarin'in kandaki oksidatif hasar üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla TOS seviyeleri ölçülmüştür. Çalışmamızda DEN uygulaması yapılan ratlarda TOS seviyeleri kontrol grubundaki sağlıklı ratlara göre kayda değer ölçüde artmıştır. Artan TOS seviyeleri DEN metabolizması sonucunda oluşan reaktif oksijen türlerine (ROS), dolayısıyla ROS artışı sebebiyle meydana gelen oksidatif strese atfedilmiştir. ROS protein karbonilasyonu, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarına yol açabilmektedir. DEN kaynaklı oluşan hepatoksisite ve karsinojenitenin temelinde ROS yer almaktadır (Ali ve ark. 2014). Bununla birlikte literatür verilerine uyumlu olarak Silimarin uygulamasının DEN grubuna nazaran TOS seviyesini önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. TOS seviyelerindeki bu düşüş Silimarin'in antioksidan özelliklerine atfedilmiştir. Silimarin'in bu koruyucu etkisi serbest radikal temizleme kapasitesine ve lipid peroksidasyonunu azaltmasına bağlanmıştır.

Nitrik oksit (NO), L-argininden sitrülün oluşumu sırasında, L-arginin guanidino nitrojen grubunun 5 elektron kaybı ile meydana gelir. Bu reaksiyonun katalizatörü nitrik oksit sentaz (NOS) enzimidir (Sayılan Özgün ve ark. 2014). NOS enzimleri, yapısal NOS (cNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere iki alt sınıfa ayrılır. cNOS enzimi, sentez ve etki yerlerine göre nöronal (nNOS) ve endotelial (eNOS) olmak üzere iki grupta incelenir (Çoban ve Durupınar 2001). eNOS ve nNOS 'un aktivitesi düşüktür ve kısa süreli NO sentezlerler. iNOS enzimi ise yüksek aktiviteye sahiptir ve indüklendiğinde NO üretimi kısa süreli olmayıp saatlerce hatta günlerce devam eder (Sayılan Özgün ve ark. 2014). NO'un süper oksit radikaliyle reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturabilmesi için iNOS aracılığıyla mikromolar konsantrasyonlarda üretilmesi gerekir (Cinel ve Oral 2000).

Bakteriyel lipopolisakkarit (LPS), inflamatuvar sitokinler (IL-1B, TNF- α , IFN γ)'in yanı sıra hipoksi ve oksidatif stres de iNOS ekspresyonunda artışa neden olur ve takibinde de NO sentezini sağlarlar (Koç 2011). İmmunolojik uyarılar sonucunda makrofaj, nötrofil, hepatosit, endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, astrositler ve mikroglia hücreleri immunolojik uyarım ile iNOS salgırlar. iNOS ekspresyonu ile meydana gelen nitrik oksit, tümör hücreleri, mantarlar, helmintler, bakteriler, protozoonlar, kısmen de vücut hücreleri üzerine sitostatik ve sitotoksik etkilidir. NO ayrıca güçlü bir immunsupresandır (Çoban ve Durupınar 2001).

DEN ile oluşturulan karaciğer kanser modelinde iNOS ekspresyonunun lokalizasyonunun immunohistokimyasal yöntemlerle ortaya konulduğu çalışmalar mevcuttur. Ahn ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada; DEN uygulanan ratlarda karaciğer dokularında iNOS ve 3-Nitrotirozinin ekspresyonu ve immunohistokimyasal lokalizasyonunu araştırmışlardır. Tümör dokusunda iNOS immün boyaması safra kanalı epitel hücrelerinde, duktal benzeri yapıları oluşturan hücrelerde ve safra kanalından köken alan benign karakterde epitel hücrelerde görülmüştür. Trabeküler HCC'de ve / veya psödoglandüler HCC'de immün reaktivite düşüklüğünün aksine, glandüler HCC olgularında epitel hücrelerinin sitoplazmasında yaygın boyanma saptanmıştır. iNOS'un hepatoselüler transizyonel veya kolangiyoselüler fenotipli hücrelerde yoğun şekilde ekspresse edildiği tespit

edilmiştir. HCC olgularında aynı zamanda yeni oluşmuş kapillar endotel hücreleri ve duktul benzeri yapıları oluşturan oval şekilli hücrelerin sitoplazmasında yüksek oranda boyanma görülmüştür. Yürüttüğümüz çalışmada, iNOS immunpozitif boyanmalara, trabeküler ve asiner yapılar oluşturan tümör hücrelerinin sitoplazmasında rastlanılmıştır. iNOS pozitif boyanma yoğunluğu açısından iki paternde herhangi bir fark gözlenmemiştir.

Yapılan diğer çalışmalarda DEN uygulamasının iNOS ekspresyonunda artışa neden olduğu yapılan immunohistokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir (Bishayee ve ark. 2013, Bishayee ve ark. 2010, Zao ve ark. 2008). Bishayee ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada DEN ile oluşturdukları HCC modelinde, DEN uygulamasının ratların karaciğer dokusunda iNOS immun pozitif hücre sayısında önemli ölçüde artışa neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Bishayee ve ark. (2010) yaptıkları diğer bir çalışmada ise DEN ile HCC modeli oluşturarak, Resveratrol'ün oksidatif stres ve enflamatuvar cevaba etkilerine bakmışlardır. İmmunohistokimyasal yöntemlerle yürüttükleri bu çalışmada, DEN uygulamasının iNOS ekspresyonunda artışa neden olduğunu, değişik dozlarda uygulanan (50, 100, 300 mg/kg) Resveratrol'ün ise iNOS ekspresyonunda DEN grubuna kıyasla düşüşe neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Yapılan diğer bir çalışmada ise Berberin'in DEN ve Fenobarbital uygulanmış ratlarda hepatosit proliferasyonu, iNOS ekspresyonu, sitokrom p450 2E1 ve 1A2 aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmış ve DEN ve DEN ile Fenobarbital uygulanan ratlarda, kontrol grubuna kıyasla iNOS immunreaktivitesinin yüksek düzeyde olduğu ortaya konmuştur (Zao ve ark. 2008).

Deneyel toksikasyon ve kanser modeli çalışmalarında Silimarin ve ana bileşenlerinin oksidatif stres üzerine etkilerinin immunohistokimyasal yöntemlerle incelendiği çok sayıda çalışma mevcuttur (Atawia ve ark. 2014, Prabu ve Muthumani 2012, Ramasamy ve ark. 2011, Domitrović ve ark. 2011, Kaur ve ark. 2010, Tunca ve ark. 2009).

Atawia ve ark. (2014), deneyel benign prostat hiperplazisinde, Prabu ve Muthumani (2012), arsenik ile oluşturdukları nefrotoksisitede, Ramasamy ve ark.

(2011), Üretan kaynaklı deneysel akciğer tümöründe, Domitrović ve ark. (2011), CCl₄ ile oluşturdukları karaciğer hasarında, Kaur ve ark. (2010), deneysel olarak oluşturdukları nefrotoksisite modelinde, Tunca ve ark. (2009), Piridin vererek oluşturdukları hepatotoksisitede Silimarin veya Silibinin'in antioksidatif etkilerini immunohistokimyasal yöntemlerle araştırmışlardır. Silimarin veya Silibinin uygulamasının iNOS ekspresyonunu azalttığı yapılan bu çalışmalarla ortaya konulmuştur.

İmmunohistokimyasal yöntemlerle yaptığımız çalışmamızda kontrol, sham ve Silimarin gruplarında iNOS immunboyanması gözlenmedi. DEN grubunda (55.3 ± 7.46) iNOS pozitif hücre sayısında önemli oranda artış gözlenirken DEN ile birlikte Silimarin uygulanan grupta (42.9 ± 4.84) ise iNOS pozitif hücre sayısında DEN grubuna göre düşüş tespit edildi. Bu düşüşün istatistiki açıdan anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$). iNOS tarafından üretilen NO enflamasyon sürecini tetikleyen önemli bir serbest radikaldir (Bishayee ve ark. 2010). HCC gelişiminde kronik enflamasyon ve oksidatif stresin önemli rol oynadığı bilinmektedir (Bishayee ve ark. 2013). Dolayısıyla iNOS oksidatif stresin önemli bir göstergesidir ve iNOS ekspresyonunun baskılanması HCC gelişiminin geriletmesinde etkili olabilir. iNOS'un immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesiyle karaciğer dokusundaki NO üretiminin ortaya konulması amaçlanmıştır. Literatür verilerine uyumlu olarak DEN uygulamasının iNOS ekspresyonunda artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu artış DEN uygulanarak oluşturulan HCC gelişiminde rol oynayan kronik enflamasyon ve oksidatif strese artışa yorumlanmıştır. Literatür verilerine uyumlu olarak önemli bir antioksidan ve antienflamatuar olan Silimarin uygulamasının iNOS ekspresyonunu DEN grubuna göre azalttığı saptanmakla birlikte, bu azalma istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bilgiler ışığında uyguladığımız Silimarin dozunun, oksidatif stresi önlemede yeterli kanaatine varılmıştır.

Nitrik oksit oldukça reaktif bir serbest radikal olup yarı ömrü sadece birkaç saniyedir. Nitrik oksit, süperoksit gibi serbest radikallerle hızlı bir şekilde birleşir. Biyolojik sistemlerde hızla nitrit ve nitrata parçalanır. Nitrik oksidin süperoksit

radikali ile in vivo reaksiyonu sonucunda peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit ise proteinlerdeki tirozin kalıntılarını nitratlayarak nitrotirozin yapısını meydana getirir (Sayılan Özgün 2013). Süper oksit ve nitrik oksit radikalleri peroksinitrite göre daha dirençli olmalarına karşın, peroksinitrit bu radikallere göre daha reaktiftir (Kayalı ve Çakatay 2004). Peroksinitrit yüksek derişimlerde sitotoksik olup protein, yağ ve DNA'da oksidatif hasara neden olur (Özkan ve Yüksekol 2003, Özen ve ark. 2014).

Nitrotirozin, peroksinitrit oksidasyonunun kararlı son ürünü olması nedeniyle Nitrotirozinin tespiti Nitrik oksit bağımlı in vivo ve oksidatif protein hasarının saptanmasında güncel olarak kullanılan başlıca marker'lardan biridir (Kaya ve ark. 2012, Mis ve Çilingir Yeltekin 2014).

DEN uygulaması yapılarak oluşturulan karaciğer kanseri ve alkolik olmayan hepatit modellemelerinde meydana gelen oksidatif ve nitrozatif hasarın saptanması ve dokulardaki peroksinitrit birikiminin tespiti amacıyla Nitrotirozin ekspresyonunun immunohistokimyasal yöntemlerle belirlendiği sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Mazo ve ark. 2013, Bishayee ve ark. 2013, Thuy ve ark. 2011, Bishayee ve ark. 2010).

Thuy ve ark. (2011) fareler üzerinde yaptıkları çalışmada 25 ve 36 haftalık DEN uygulaması ile oluşturdukları HCC modelinde Nitrotirozin'in tümör hücrelerinin sitoplazmasında ve çekirdeğinde ekspresse edildiğini immunohistokimyasal yöntemlerle tespit etmişlerdir. Biz de yaptığımız çalışmada, bu çalışmaya benzer şekilde tümör hücrelerinin sitoplazmasında Nitrotirozin immun pozitif reaksiyon gözledik.

Bishayee ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada DEN ile oluşturdukları karaciğer kanser modelinde DEN uygulamasının kontrol grubuna kıyasla 3-Nitrotirozin (3-NT) pozitif hücre sayısının arttırdığı immunohistokimyasal yöntemler ile tespit etmişler. Yaptıkları diğer bir çalışmada ise Bishayee ve ark. (2010) DEN ile oluşturdukları HCC modelinde farklı dozlarda (50, 100, 300 mg/kg) verilen Resveratrol'ün koruyucu etkilerini araştırmışlar. Yapılan 3-NT immun boyama sonuçlarına göre,

sadece DEN uygulaması yapılan deneme grubunda, kontrol grubu ve farklı dozda Resveratrol uygulanan koruyucu gruplarına (50, 100, 300 mg/kg) kıyasla immun pozitif hücre sayısının yüksek düzeyde olduğunu saptamışlar. DEN ile beraber Resveratrol uygulanan deneme gruplarında ise Resveratrol'ün dozuyla doğru orantılı olarak pozitif hücre sayılarında düşüş tespit etmişler. Mazo ve ark. (2013), DEN ve DEN uygulamasıyla birlikte kolinden yoksun yüksek yağlı diyet ile oluşturulan alkolik olmayan steatohepatit modeli (NASH) ve bu modelin S-nitrozo asetilsistein ile desteklenmiş versiyonunu (SNAC) oluşturdukları gruplarda Nitrotirozin sentezini immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirmişler. Normal grup hayvanlarında karaciğerde herhangi bir reaksiyon gözlenmezken, NASH grubunda SNAC grubuna nazaran daha zayıf bir reaksiyon belirlenmiştir. İmmunreaksiyon özellikle hepatositlerin sitoplazmasında saptanmıştır.

Silimarin'in nitrozatif ve oksidatif stres üzerindeki koruyucu etkisinin Nitrotirozin ekspresyonu üzerinden immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak değerlendirildiği az sayıda çalışma mevcuttur (Marcolino Assis-Júnior ve ark. 2017, Impellizzeri ve ark. 2015, Rajamanickam ve ark. 2009, Kaviarasan ve ark. 2008).

Marcolino Assis-Júnior ve ark. (2017) İrinotekan uygulanarak farelerde oluşturdukları alkolik olmayan steatohepatit modelinde, Impellizzeri ve ark. (2015) farelerde böbrek iskemi ve reperfüzyon hasarında (I/R), Rajamanickam ve ark. (2009) APC min/+ (Genetik olarak ailesel adenomatöz polipozise yatkın) fare modeli tümör çalışmasında, Kaviarasan ve ark. (2008) ratlarda alkol kaynaklı oluşturdukları karaciğer hasarına karşın Silimarin ve Silibinin'in koruyucu etkilerini araştırmışlar. Araştırmacılar Silimarin ve Silibinin uygulamasının Nitrotirozin ekspresyonunu azalttığını immunohistokimyasal yöntemlerle tespit etmişler. Sadece, Impellizzeri ve ark. (2015) Silimarin uygulamasının Nitrotirozin immunoreaktivitesinde dikkate değer oranda düşüşe neden olmadığını belirtmiştir.

Çalışmamızda kontrol, sham ve Silimarin gruplarında Nitrotirozin immun boyamasında herhangi bir pozitif reaksiyona rastlanmamıştır. DEN grubunda Nitrotirozin pozitif hücre sayısında artış (52.9 ± 8.73), Silimarin uygulamasının ise

DEN grubuna kıyasla Nitrotirozin pozitif hücre sayısında azalmaya neden olduğu saptanmıştır (51.3 ± 9.26). Fakat saptanan bu düşüşün istatistiki olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Nitrotirozin önemli bir oksidatif ve nitrozatif stres parametresidir. Nitrotirozinin immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesiyle karaciğer dokusundaki peroksinitrit varlığının ortaya koyulması amaçlanmıştır. Literatür verilerine paralel şekilde DEN grubunda meydana gelen karaciğer hasarına bağlı olarak nitrotirozin immun pozitif hücre sayısında dikkate değer oranda artış saptandı. Bu artış DEN uygulamasına bağlı oluşan oksidatif ve nitrozatif stres ile protein hasarına yorumlanmıştır. Silimarin kuvvetli bir antioksidandır. Literatür verilerine uyumlu olarak Silimarin uygulamasının, DEN grubuna kıyasla Nitrotirozin ekspresyonunda düşüşe neden olduğu ve nispeten karaciğer koruyucu etki gösterdiği fakat bu etkinin Impellizzeri ve ark. (2015) sonuçlarına benzer şekilde dikkate değer ölçüde düşüşe neden olmadığı ve oluşan bu düşüş oranının istatistiki olarak anlam ifade etmediğini tespit ettik. Silimarin'in bu koruyucu etkisi, NO ve süperoksit radikali üretimini azaltmasına dolayısıyla dokularda meydana gelen peroksinitrit oluşumunu engellemesi sonucu meydana gelmektedir.

Hücre bölünme hızının saptanması özellikle kanser gibi hastalıklarda önem arz etmektedir (Srigopalram ve ark. 2014). Kanser oluşum sürecine neden olan mutasyonların bir kısmı hücre proliferasyonunu kontrol eden sinyal yollarını hedef almaktadır (Terzioğlu ve ark. 2013). Proliferatif aktivitenin ölçümü tümör derecelendirmesi, rekürrens hızı ve malignitenin saptanması konusunda önemlidir (Şen ve ark. 2002).

Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA-Proliferating cell nuclear antigen), genomik DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve onarımında önemli rol üstlenen 36 kDa ağırlığında nükleer bir proteindir (Taha ve ark. 2010). PCNA, hücre döngüsünün G₁ fazında sentezlenmeye başlar ve S fazında pik seviyeye ulaşır, DNA polimeraz δ'ya yardımcı olur (Karahana ve ark. 2008, Abdulaziz Bardi ve ark. 2013). PCNA, DNA sentezi ve hücre proliferasyon oranı ile korelasyon gösterir (Çetinkaya ve ark. 1998, Abdel Salam ve ark. 2007).

PCNA'nın immunohistokimyasal yöntemlerle ortaya konulması hem aktif DNA replikasyonunu hem de karsinogenez ile sonuçlanan DNA hasarını işaret eder. PCNA hematolojik, gastrointestinal, meme, cilt, akciğer ve üriner sistem malignitelerinde önemli bir proliferasyon markeri olarak kullanılır (Abike ve Zengeroğlu 2010).

DEN uygulaması sonucu oluşturulan HCC ve hepatoksisite modeli çalışmalarında kontrolsüz hücre çoğalmasının değerlendirilmesi amacıyla önemli bir proliferasyon markeri olan PCNA'nın ekspresyonunun immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildiği çok sayıda çalışma mevcuttur. Zhao ve ark. (2014) DEN ile oluşturdukları hepatoselüler karsinom modelinde Hidrazinokurkumin'in koruyucu etkisini araştırmışlar. Bu amaçla Sprague Dawley cinsi erkek ratlara haftada 2 kez olacak şekilde 12 hafta boyunca DEN uygulaması yapmışlar. DEN uygulaması ile birlikte çeşitli hepatoprotektif maddelerin (Kurkumin, Hidrazinokurkumin) koruyucu etkisine bakılmış olup, yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda PCNA'nın hepatik hücrelerin çekirdeğinde ekspresse edildiği ve PCNA pozitif hücre sayısının ise sadece DEN uygulanan grupta en yüksek değerde olup, kontrol grubunda herhangi bir reaksiyon gözlenmediğini ortaya koymuşlardır. Koruyucu uygulanan deneme gruplarında ise pozitif hücre sayısının DEN grubuna nazaran düşük olduğu saptanmıştır. Yürüttüğümüz çalışmada PCNA immunpozitif boyanmalara bu çalışmaya benzer şekilde hepatositlerin çekirdeklerinde rastlanılmıştır. Yaptığımız çalışmada DEN ile birlikte uyguladığımız Silimarin'in PCNA ekspresyonu üzerine olumlu etkisini tespit etmedik.

Yapılan diğer çalışmalarda DEN uygulamasının PCNA ekspresyonunda artışa neden olduğu yapılan immunohistokimyasal çalışmalarla ortaya konulmuştur (Jo ve ark. 2016, Srigopalram ve ark. 2014, Song ve ark. 2013, Bingül ve ark. 2013, Raghunandhakumar ve ark. 2013, Khan ve ark. 2011, Shimuzu ve ark. 2011, Nagahara ve ark. 2010). DEN uygulanarak oluşturulan karaciğer kanseri (Jo ve ark. 2016, Srigopalram ve ark. 2014, Song ve ark. 2013, Raghunandhakumar ve ark. 2013), karaciğer preneoplazisi (Khan ve ark. 2011, Shimuzu ve ark. 2011, Nagahara ve ark. 2010) ve karaciğer hasar modellemelerinde (Bingül ve ark. 2013) PCNA

ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış gösterdiği ve koruyucu madde uygulanan grupların ise PCNA ekspresyonunu DEN gruplarına göre düşürdüğü çeşitli araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir.

Çeşitli araştırmacılar karaciğer hasarı, sirozu, HCC ve prostat hiperplazisi modeli çalışmalarında Silimarin'in anti proliferatif etkisinin immunohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amacıyla PCNA ekspresyonunu değerlendirmişlerdir (El-Lakkany ve ark. 2017, Kadir ve ark. 2014, Sozmen ve ark. 2014, Salama ve ark. 2013, Gopalakrishnan ve ark. 2013, Atawia ve ark. 2013). El-Lakkany ve ark. (2017) ile Salama ve ark. (2013), Tiyoasetamid (TAA) uygulayarak ratlarda oluşturdukları karaciğer hasarında, Sözmen ve ark. (2014) farelerde Fumonisin B₁ (FB₁) ile oluşturdukları karaciğer hasarında, Kadir ve ark. (2014) TAA uygulayarak ratlarda oluşturdukları fibrozis modelinde Gopalakrishnan ve ark. (2013) DEN vererek oluşturdukları HCC modelinde, Atawia ve ark. (2013) ratlarda testesteron uygulaması sonucunda deneysel olarak oluşturdukları prostat hiperplazilerinde toksik madde ile birlikte uygulanan Silimarin'in PCNA ekspresyonunu düşürdüğünü ortaya koymuşlardır.

Çalışmamızda kontrol, sham ve Silimarin gruplarında PCNA immün boyamasında herhangi bir pozitif reaksiyona rastlanmamıştır. DEN uygulamasının PCNA pozitif hücre sayısında artışa (82.9 ± 6.17), Silimarin uygulamasının ise DEN grubuna kıyasla PCNA pozitif hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (79.8 ± 6.74). Fakat saptanan bu azalmanın istatistiki olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). PCNA malignitenin tespitinde kullanılan önemli bir proliferasyon markerıdır. Kontrolsüz hücre çoğalması kanserin ayırıcı özelliklerinden biri olup kontrolsüz hücre çoğalmasının baskılanması kanser tedavisinde etkili bir stratejidir. PCNA'nın immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesiyle karaciğer dokusundaki hücre bölünme hızının belirlenmesi dolayısıyla malign transformasyonu ortaya koymak amaçlanmıştır. Literatür verilerine uyumlu olarak DEN grubunda meydana gelen malignite sonucunda PCNA pozitif hücre sayısı artmış olup bu artış DEN'in mutasyon yapma gücüne ve DNA hasarı oluşturma kapasitesine yorumlandı. Silimarin güçlü bir anti proliferatif ajandır. Silimarin uygulamasının PCNA pozitif

hücre sayısında azalmaya neden olduğu görülmekle birlikte, DEN ve DEN+Silimarin grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı. Silimarin uygulamasının kısmi olarak koruyucu etkisi antiproliferatif özelliğine yorumlanmıştır.

Glutasyon S-transferazlar (GST), endojen ve ekzojen kaynaklı elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak daha kolay atılabilen ve daha az toksik olan metabolitlerine transformasyonunu katalize eden Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir (Tozkoparan ve Aytaç 2007, David ve Kartheek 2016). GST'ler karsinojen veya mutajen özellikteki maddelerin detoksifikasyonunda görev alırlar. GST'ler α (alfa) bazik, (π) asidik, (u) nötral olmak üzere üç ana gruba ayrılır. GSTPi hepatomalarda, mide karsinomlarında ve kolonik karsinomlarda tespit edilmiştir ve GSTPi potansiyel tümör markeri olarak değerlendirilmektedir. Buna ilaveten primer hepatoselüler karsinomlu hastalarda GST seviyelerinin yüksek olduğu tespit edilmiş ve GST ölçümlerinin hepatoselüler karsinom teşhisinde kullanılabilir bir marker olduğu bildirilmektedir (Aköz ve ark. 2010).

DEN verilerek oluşturulan karaciğer kanser modeli çalışmalarında hücresel transformasyon alanlarının değerlendirilebilmesi amacıyla GSTPi immunboyamasının yapıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (Abdo ve ark. 2015, Vera ve ark. 2015, Stärkel ve ark. 2015, Thumvijit ve ark. 2014, Silva ve ark. 2012, Fujise ve ark. 2012, Khan ve ark. 2011, Shizuma ve ark. 2011, Khan ve ark. 2011, Ichikawa ve ark. 2010). Araştırmacılar DEN uygulaması sonucunda GSTPi immun pozitif alanların kontrol grubuna kıyasla hem sayı hem de alan ölçümleri açısından dikkate değer oranda artış gösterdiğini immunohistokimyasal yöntemlerle ortaya koymuşlardır. Bahsi geçen bu araştırmalarda DEN uygulamasına karşın çeşitli koruyucu maddeler denenmiş olup, koruyucu madde uygulanan grupların DEN grubuna kıyasla GSTPi immun pozitif alanları hem sayı hem de boyut bakımından belirgin derecede azalttığını tespit etmişlerdir. Biz de bu çalışmamızda, literatür verilerine uyumlu olarak GSTPi immunpozitif alanların kontrol grubuna kıyasla DEN uygulanan grupta hem sayı hem de boyut bakımından daha fazla olduğunu

tespit etmekle birlikte GSTPİ ekspresyonlarına özellikle değişime uğramış nodüler yapıları oluşturan hepatosit odaklarında daha yoğun şekilde rastladık.

Silimarin uygulamasının karaciğer kanser modeli üzerine olan koruyucu etkisinin GSTPİ ekspresyonu üzerinden immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildiği tek bir literatür verisine ulaşılmış olup bu çalışmaya ait veriler aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:

Imamoto ve ark. (2013) ratlarda 12 ve 18 haftalık DEN uygulaması sonucunda oluşturdukları karaciğer kanser modelinde Silimarin'in koruyucu etkilerini incelenmişler. İmmunohistokimyasal boyama sonuçlarına göre DEN uygulanan grupların karaciğer dokularında GSTPİ pozitif alanlar daha yoğun şekilde gözlenirken, Silimarin uygulanan koruyucu gruplarda ise GSTPİ'nin ekspresyon seviyelerinin DEN grubuna göre azaldığı fakat meydana gelen bu azalmanın kayda değer olmadığını belirtmişler.

Çalışmamızda kontrol, sham ve Silimarin gruplarında GSTPİ immun pozitif reaksiyon gözlenmedi. DEN uygulamasının GSTPİ pozitif hücre sayısında artışa ($176,1 \pm 7,52$), DEN ile birlikte uygulanan Silimarin'in GSTPİ pozitif hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ($154,3 \pm 11,54$). Fakat iki grup arasında yapılan istatistiksel analiz sonucunda saptanan bu azalma anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Çalışmamızda literatür verilerine uyumlu olarak DEN grubunda GSTPİ pozitif hücre sayısı kayda değer oranda artmıştır. GSTPİ ratlarda hepatokarsinogenezis modelinde spesifik olarak ekspresse edilen güvenilir ve etkili bir tümör markerıdır. GSTPİ'nin immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesiyle karaciğerdeki preneoplastik ve displastik odakların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu sayede hücresel transformasyon alanları da belirlenmiştir. Literatür verilerine uyumlu olarak DEN grubunda GSTPİ pozitif hücre sayısı dikkate değer oranda artmış olup bu artış DEN'in karsinojenik etki gösterdiği ve DEN uygulamasının karaciğer dokusunda karsinogenezis sürecini kuvvetli bir şekilde başlattığını göstermektedir. Silimarin etkili bir antikarsinojenik ajandır. Literatür verilerine uyumlu olarak (Imamoto ve ark. 2013) Silimarin uygulamasının GSTPİ pozitif hücre sayısında

azalmaya neden olduğu fakat bu azalmanın istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptandı.

Tümör invazyon ve metastazında rol oynayan kilit moleküllerden biri de ekstrasellüler matriks (ESM) elemanlarıdır. ESM, protein ve proteoglikanları içeren, organizmaya yapısal destek sağlamayan, aynı zamanda hücre çoğalması, diferansiyasyonu, migrasyonu, adezyonu ile doku morfogenezisi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde etkisi olan kompleks ve aktif bir oluşumdur. ESM, tümör dokusunun gelişimi ve yayılımını engelleyen doğal bir bariyer olarak görev yapar. Kanser hücreleri bu bariyeri ortadan kaldırmak için matriks metalloproteinazları kullanır (Öncel 2012).

Matriks metalloproteinazlar (MMP) kollajen ve elastin gibi ekstrasellüler matriks komponentlerini, jelatini ve bazal membranı parçalama yeteneğine sahip olan, 20'den fazla enzim içeren proteaz ailesidir. MMP'ler jelanitazlar (MMP2, MMP9), kollajenazlar (MMP1, MMP8, MMP13), stromelizinler (MMP3, MMP10, MMP11, MMP7) olmak üzere farklı alt gruplara ayrılır. MMP'ler lökosit, keratinosit, fibroblast, makrofaj gibi değişik hücreler tarafından sentezlenir (Şen ve ark. 2014). MMP'ler normal gelişimsel süreçte ve dokuların yeniden yapılanması ve yara iyileşmesinde rol oynadıkları gibi tümör hücrelerinin invazyonu, tümör dokusunun anjiyogenezisi ve metastazı gibi patolojik durumlarda da etki rol oynarlar (Görüroğlu Öztürk 2013, Mansour ve ark. 2014).

MMP-2 ve MMP-9 malign dokularda en fazla tespit edilen matriks metalloproteinazlardır (Ramakrishnan ve ark. 2009). Bunlar, bazal membran ve ekstrasellüler matriksin lokal olarak parçalanmasını sağlayarak metastatik süreçte kritik rol oynarlar (Şen ve ark. 2014). Bu olayı bazal membranın ana bileşeni olan tip IV kollajeni parçalayarak gerçekleştirirler (Sivaramakrishnan ve Devaraj 2009, Wu ve ark. 2014). Nitekim yürüttüğümüz bu çalışmada, DEN uygulanan gruptaki bir hayvanın akciğer dokusunda karaciğer dokusundan köken alan çok sayıda metastatik odak tespit edildi. MMP-2 ve MMP-9'un meme, kolorektal, pankreas, mesane, over, prostat, beyin ve akciğer kanser vakalarında ekspresyonu saptanmıştır (Öncel 2012).

MMP'ler sentezlerini takiben ekstraselüler alanda bulunmaları nedeniyle immunohistokimyasal yöntemlerle dokularda tespit edilebilir (Karayel ve ark. 2009).

DEN uygulanarak oluşturulan akciğer ve karaciğer kanseri gibi çeşitli kanser modellerinde MMP-9 immunoreaktivitesinin değerlendirildiği az sayıda çalışma mevcuttur (Man ve ark. 2015, Subramaniyan ve ark. 2014). Man ve ark. (2015) ratlarda DEN uygulaması ile oluşturdukları pulmoner adenom ve hepatom modelinde Rhizoma paridis saponins'in (RPS) koruyucu etkisini araştırmışlar. DEN uygulanan grupta MMP-9 ekspresyonuna tümör hücrelerinin sitoplazmasında rastlamışlar ve RPS uygulamasının MMP-9 ekspresyonunu DEN grubuna kıyasla düşürdüğünü ortaya koymuşlardır. Yapılan diğer bir çalışmada ise DEN ile oluşturulan karaciğer kanser modelinde Karvakrol'ün koruyucu etkisi araştırılmış olup DEN grubu ratlarında kontrol grubu ratlarına oranla MMP-9 ekspresyonunun daha yüksek olduğu immunohistokimyasal yöntemlerle saptanmıştır. (Subramaniyan ve ark. 2014). Biz de çalışmamızda bu çalışmalara benzer şekilde DEN uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla MMP-9 immunoreaktivitesinin daha yüksek olduğunu gözledik. Buna ek olarak MMP-9 ekspresyonuna özellikle hepatositlerin sitoplazmasında rastladık.

Silimarin ve Silibinin'in antimetastatik etkisinin ortaya konulması açısından MMP-9 ekspresyonunun immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildiği az sayıda kanser modeli çalışması olup bu çalışmalara ait sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

Beydogan ve Bolkent (2016); farelerde deneysel olarak oluşturdukları Ehrlich asites karsinom modelinde Silibinin'in koruyucu etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları immunohistokimyasal değerlendirmeler neticesinde Ehrlich asites karsinom grubunda, MMP-9 pozitif hücre sayısının kontrol grubuna kıyasla arttığını ortaya koymuşlardır. Silibinin uygulamasının Ehrlich asites karsinom oluşturulan gruba kıyasla MMP-9 immun pozitif hücre sayısını önemli derecede düşürdüğünü tespit etmişler. Yapılan diğer bir çalışmada ratlarda DEN uygulamasını takiben oluşturulan HCC modelinde Silimarin'in koruyucu etkileri araştırılmıştır. DEN grubunda

gözlenen yüksek MMP-9 seviyelerinin Silimarin uygulanan koruyucu deneme grubunda aşağı çekildiği immunohistokimyasal yöntemlerle ortaya konulmuştur (Ramakrishnan ve ark. 2009).

Yürüttüğümüz bu çalışmada; kontrol, sham ve Silimarin gruplarında MMP-9 yönünden herhangi bir immun pozitif boyanma gözlenmedi. DEN uygulamasının MMP-9 pozitif hücre sayısında artışa (32.5 ± 4.84), DEN ile birlikte Silimarin uygulamasının ise DEN grubuna oranla MMP-9 immun pozitif hücre sayısında düşüşe neden olduğu saptandı (29.5 ± 3.21). İki grubun istatistiksel açıdan karşılaştırılmasında ise aradaki bu fark anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Bilindiği üzere MMP'lerin tümör dokusunun invazyonu, anjiyogenezisi ve metastazında önemli rol oynadığı ve farklı kanser türlerinde ekspresyonun arttığı ortaya konulmuştur. Yaptığımız bu çalışmada karaciğer kanser modelinde MMP-9 ekspresyonu immunohistokimyasal yöntemlerle ortaya konmuştur. Literatür verilerine paralel bir şekilde DEN uygulamasının MMP-9 ekspresyonunu önemli düzeyde arttırdığı saptanmıştır. Ekspresyondaki bu artışın DEN uygulaması sonucunda ESM'lerin yıkımlanmasıyla alakalı olduğu kanısına varılmıştır. ESM'lerin yıkımlanması neticesinde, tümör dokusunun invazyonu ve migrasyonu önündeki engel kaldırılmış olur. Bu engelin kaldırılmasında matriks metalloproteinazların rolü oldukça önemlidir. DEN grubunda gözlenen pozitif hücre sayısındaki artış HCC'nin gelişiminde de matriks metalloproteinazların özellikle de MMP-9'un rolünün ortaya koyulması açısından önemlidir. Silimarin; matriks metalloproteinazları regüle ederek anjiogenezisi ve metastazı engeller ve kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon kapasitelerini baskılar. Silimarin uygulamasının MMP-9 pozitif hücre sayısını azalttığı ama tespit edilen bu azalmanın istatistiki olarak anlamlı olmadığı ortaya konulmuştur. Silimarin'in kısmi de olsa bu koruyucu etkisi antimetastatik özelliğine atfedilmiştir. Silimarin'in antimetastatik etkisinde MMP-9 üzerinden gerçekleştirilen regülasyonun önemli rol oynayabileceği kanısına varılmıştır.

HPIP, 731 aminoasitten oluşan, mikrotübüller ile etkileşime giren lösin yönünden zengin bir bölgeye sahip ve 80 kDA ağırlığında bir proteindir (Karamese ve ark. 2013). HPIP; hücre göçü, hormon bağımlı karsinogenezis ve östojen

reseptörlerinin sinyal transdüksiyonunda rol alan temel bir proteindir (Aksak Karameşe 2013).

Hematopoietik pre-B hücreli lösemi transkripsiyon faktörü (PBX)'yle etkileşen protein (HPIP), insanlarda gözlenen küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, HCC, spinal glioblastoma, tiroid kanseri, gastrik kanser, kolorektal kanser, meme infiltratif duktal karsinomu, oral karsinom ve melanom gibi değişik kanser tiplerinde aşırı ekspresye olan ve yakın zamanda tanımlanan bir onkogendir (Chen ve ark. 2016, Mai ve ark. 2016, Bugide ve ark. 2017). HPIP organogenezis ve tümörogeneziste yer alır (Xu ve ark. 2013). Son zamanlarda yapılan çalışmalar; transformasyon, apoptoz, invazyon ve metastaz gibi kanser progresyonu ile ilişkili yollarda HPIP'in çok yönlü rolünü ortaya koymuştur. HPIP; apoptozisin ve hücre döngüsü regülatörlerinin ekspresyonundaki değişiklikler eşliğinde, hücre döngüsünün ilerlemesinin aktivasyonunu, apoptozu ise inhibe ederek hücre büyümesini destekler (Feng ve ark 2015, Wang ve ark. 2017). Yapılan çalışmalar HPIP'in kanser gelişimini teşvik ettiği mekanizmaları ortaya koymaktadır. HPIP'in yüksek düzeydeki ekspresyonun, bazı hücre hatlarında siklin A, siklin B ve siklin D1 gibi karsinojenlerin aktivasyonuna yol açtığı ortaya çıkarılmıştır (Feng ve ark. 2015). Ayrıca yapılan çalışmalarla, HPIP'in sinyal transdüksiyon yollarında önemli bir rol oynadığı ve dolayısıyla hücre çoğalmasını ilerlettiğini tespit edilmiştir (Wang ve ark. 2017). HPIP'in, apoptoz, karsinogenezis ve hücrenin epitelyal mezenkimal transizyonu gibi biyolojik davranışlarını düzenleyen PI3K / AKT sinyal iletim yollarında hayati bir fonksiyona sahip olduğu yapılan farklı araştırmalarla ortaya konulmuştur (Manavathi ve ark. 2014, Wang ve ark. 2015). Bazı çalışmalar da, HPIP'in çeşitli kanser hücrelerinde spesifik östrojen reseptör sinyalizasyonuna aracılık edebileceğini vurgulamıştır (Wang ve ark. 2008, Bugide ve ark. 2015). Feng ve ark. (2015), HPIP'in kolorektal kanser hücresinde, MAPK / ERK yolağını aktive ettiğini, dolayısıyla tümör hücresi çoğalması ve migrasyonunu destekleyebileceğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmalar, HPIP'in karsinogenezis ve tümör gelişiminde rolünü ortaya koyan önemli bilgiler içerir. HPIP'in karsinogenezisteki rolü, bu onkogenin kanser tedavisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Xu ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, 52 karaciğer kanser hastasının çoğunda HPIP'in aşırı düzeyde eksprese edildiğini ortaya koymuşlardır. Xu ve ark. (2013) yaptıkları diğer bir çalışmayı ise; 328 karaciğer kanser hastasında yürütmüşler. HPIP'in karaciğer kanser hastalarının çoğunda sentezlendiğini tespit etmişler. HPIP'in etkisizleştirilmesi sonucunda genetik olarak bağışıklık sistemi bloke edilmiş farelerde karaciğer tümörü büyümesinin hem in vivo hem de in vitro olarak gerilediği ortaya konulmuştur. Bu çalışmada; HPIP'in hücre döngüsünde G₂-M geçişinin aktivasyonu yoluyla HCC'de hücre büyümesini teşvik ettiği saptanmıştır. Yaptıkları çalışmada; 328 karaciğer kanseri ve kontrol karaciğer dokuları immunohistokimyasal olarak incelenmiş olup karaciğer kanser hastalarında HPIP ekspresyonunun belirgin şekilde yükseldiği (>% 90'ında) saptanmıştır. HPIP ekspresyonu esas olarak sitoplazmada gözlenmiştir. Bu bilgilerin ışığında, HPIP'in karaciğer kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rolü olan onkogen olarak faaliyet gösterdiği vurgulanmıştır. HCC hücrelerinde HPIP'in inhibe edilmesinin karaciğer kanseri tedavisinde etkili bir strateji olabileceği araştırmacılar tarafından düşünülmektedir. Bizde çalışmamızda Xu ve ark. (2013) yaptıkları çalışmaya benzer şekilde, DEN uygulayarak oluşturduğumuz karaciğer kanser modeli grubunda HPIP ekspresyonunun özellikle hücrelerde intrasitoplazmik yerleşimli olduğunu tespit ettik.

DEN uygulanarak ratlarda oluşturulan deneysel karaciğer kanser modelinde veya Silimarin'in karaciğer koruyucu ve antikanserojenik etkilerinin HPIP ekspresyonu üzerinden immunohistokimyasal olarak değerlendirildiği herhangi bir literatür verisi bulunmamaktadır. HPIP, başta karaciğer kanseri olmak üzere pek çok kanser türünde ekspresyonu incelenen yeni keşfedilmiş bir onkogendir. HPIP'in hücre proliferasyonu ve transformasyonu, apoptoz, invazyon ve metastaz gibi kanser gelişiminde anahtar rol oynayan pek çok süreçteki etkileri incelenmektedir.

Immunohistokimyasal yöntemlerle yürüttüğümüz bu çalışmada kontrol, sham ve Silimarin gruplarında HPIP immunoreaktivitesi yönünden herhangi bir pozitif reaksiyon gözlenmedi. DEN uygulamasının, HPIP immun pozitif hücre sayısında artışa (60.5 ± 7.46), Silimarin uygulamasının ise DEN grubuna kıyasla HPIP pozitif

hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (50 ± 5.45). Fakat saptanan bu azalmanın istatistiki açıdan önem arz etmediği tespit edilmiştir ($p>0.05$). HPIP'in immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesiyle ratlarda deneysel olarak oluşturulan karaciğer kanserinin gelişiminde HPIP'in rolünün ortaya konulması tasarlanmıştır. Dolayısıyla HPIP ekspresyonunun inhibe edilmesinin karaciğer kanserinin geriletilmesindeki etkinliği de ortaya konulabilecektir. Beklenildiği üzere DEN uygulaması sonucunda rat karaciğerlerinde HCC oluşmuştur. Bununla birlikte apoptoz, invazyon, hücre proliferasyonu ve transformasyonu gibi kilit süreçlerde etkili olduğu ileri sürülen bir onkogenin de bu rat karaciğerlerinde kuvvetli şekilde ekspresye olması beklenmektedir. Beklenildiği üzere karaciğer kanser modeli grubunda HPIP ekspresyonunda artış gözlenmiş olup, bu artış DEN uygulaması sonucu meydana gelen mutasyonlara atfedilmiştir. Bu mutasyonlar sonucunda onkogenler veya tümör süpresör genler gibi önemli genlerde aktivasyonlar ya da inhibisyonlar meydana gelmektedir. Hücre proliferasyonunda önemli fonksiyonları olduğu bilinen HPIP temelde bir onkogendir. DEN'in biyoaktifleşmesi sonucu meydana gelen mutasyonlar HPIP'in aktivasyonuna sebep olup hücre çoğalmasını tetikleyebilir. Silimarin önemli bir anti kanserojenik ajandır. Silimarin'in anti kanserojenik etkisi antienflamatur, antiproliferatif, antimetastatik fonksiyonlarından ve apoptozu tetiklemesinden kaynaklanmaktadır. İstatistiki olarak anlamlı olmasa da, Silimarin uygulamasının HPIP ekspresyonunda düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Bu düşüşün Silimarin'in anti proliferatif kapasitesinden ileri geldiği düşünülmektedir.

Apoptozis, programlanmış hücre ölümüdür ve hücreler kendi kendini aktif olarak ortadan kaldırır (Güçer ve Tınaztepe 2001, Kelten 2005). Yunanca'da "ağaçların yapraklarını dökmesi" ifadesine karşılık gelen apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr tarafından dile getirilmiştir (Kaya ve ark. 2012). Gelişmiş organizmalarda embriyo döneminden itibaren tüm hayat süresince apoptotik mekanizma ve kontrollü hücre ölümü yer alır (Öktem ve ark. 2001). Embriyonik dönemde organ şekillenmesi, hücre sayısının kontrolü, immun sistemin gelişimi (T lenfositlerin ortadan kaldırılması) ve iltihabi olayların rezolusyonu gibi pek çok süreçte istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması için önemli bir olaydır (Balcan ve

ark. 2009, Coşkun ve Özgür 2011). İnflamasyona sebep olmaksızın hücreler elimine edilir (Çalışkan 2000, Kelten 2005).

Diyabet, Parkinson ve Alzheimer Hastalığı, AIDS, oksidatif stres ve tümör oluşumu gibi patolojik durumlar canlılarda apoptozu tetikler (Coşkun ve Özgür 2011, Eröz ve ark. 2012).

Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim meydana gelmektedir (Güleş ve Eren 2008). Bunlar nükleusda kromatin kondensasyonu, nükleer büzülme ve DNA fragmantasyonudur. Membran ve organel yapıları korunmaktadır (Kültürsay ve Kayıkçioğlu 2002, Kelten 2005). TUNEL yöntemi apoptotik süreçte endonükleazların aktivasyonu sonucu meydana gelen yaklaşık 180-200 baz çiftlik DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar (Balcan ve ark. 2009).

TUNEL yönteminin temel prensibi tek ve/veya çift zincir kırıklı DNA bölgesine, işaretli nükleotitlerin girmesi veya eklenmesidir. Bu yöntemin diğer yöntemlere nazaran daha duyarlı olmasının sebepleri; pepsin, protein K, S1 nükleaz ve DNA zincirlerinin içine girebilen özellikle proteazlarla zenginleştirilmesidir. Apoptozisteki kondanse kromatin yapıları ve nükleer proteinlerdeki çapraz bağlar bu proteazlar vasıtasıyla ortaya konulmaktadır. Bu sayede pek çok yöntemle gösterilemeyecek denli küçük boyut ve orandaki apoptotik hücreler tespit edilmektedir (Yavuzer 2008). Kültürü yapılmış hücrelerde ve frozen ile parafin bloklardan hazırlanan kesitlerde programlı hücre ölümünün ortaya konulması bu yöntemle mümkündür. Hem floresan hem de ışık mikroskobu altında TUNEL sonuçları değerlendirilmektedir (Dinçel ve Kul 2016).

DEN verilerek oluşturulan deneysel karaciğer kanser modellerinde, DEN uygulanan gruplarda TUNEL pozitif hücre sayısının oldukça az sayıda olduğu ve kontrol grubuna kıyasla dikkate değer oranda artış göstermediği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu çalışmalarda koruyucu madde uygulanan grupların DEN grubunda gözlenen oldukça az sayıdaki TUNEL pozitif hücre sayısını arttırdığı ve

programlı hücre ölümünü tetiklediği saptanmıştır (Gupta ve ark. 2013a, Zhang ve ark. 2013, Vásquez-Garzón ve ark. 2013, Xu ve ark. 2011).

Bu çalışmaların aksine, DEN ile oluşturulan deneysel karaciğer kanser modellerinde, kontrol gruplarına kıyasla DEN uygulanan deneme gruplarında TUNEL pozitif hücre sayısında önemli düzeyde artışın gözlemlendiği çalışmalar mevcuttur (Patial ve ark. 2015, Bharati ve ark. 2014). Bharati ve ark. (2014) farelerde DEN uygulayarak oluşturdukları karaciğer kanser modeli üzerine *Azadirachta indica* (Yalancı Tespih Ağacı)'nın koruyucu etkilerini incelemişler. Yapılan TUNEL boyaması verilerine göre, DEN grubunda pozitif hücre sayısı, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Çekirdekte olduğu gibi sitoplazmada da TUNEL pozitif boyanma gözlenmiş olup bu şekilde boyanan hücreler nekrotik hücre olarak değerlendirilmiştir. *Azadirachta indica* uygulamasının ise, apoptotik hücre sayısını DEN grubuna göre arttırdığı ortaya konmuş ve sadece çekirdek boyanma gözlenmiş olup, sitoplazmada TUNEL boyanması saptanmamıştır. Biz de çalışmamızda bu çalışmaya benzer şekilde DEN uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla TUNEL pozitif hücre sayısının arttığını tespit ettik. Buna ek olarak DEN uygulanan grupta TUNEL pozitif reaksiyonun hepatositlerin çekirdeğinin yanı sıra sitoplazmada da gerçekleştiğini gözlemledik.

Silimarin'in, apoptoz ile ilişkisinin TUNEL yöntemi ile değerlendirildiği bazı kanserlerde ve karaciğer hasarı oluşturularak yürütülen çalışmalarda Silimarin uygulamasının programlı hücre ölümünü tetiklediği ve pro apoptotik etki gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Farelerde oluşturulan deneysel akciğer kanseri (Wu ve ark. 2016) ve prostat kanser modellemelerinde (Deep ve ark. 2008) Silimarin'in apoptotik hücre sayısını kanser gruplarına kıyasla arttırdığı TUNEL metoduyla belirlenmiştir.

Bu çalışmaların aksine, Silimarin'in, apoptoz ile ilişkisinin TUNEL yöntemi ile araştırıldığı bazı kanser, iskemik reperfüzyon hasarı, hepatotoksisite, kardiyotoksisite ve nefrotoksisite çalışmalarında Silimarin'in TUNEL pozitif hücre sayısını düşürdüğü ve anti apoptotik etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Zhao ve ark.

(2017) CCl₄ uygulaması yaparak oluşturdukları karaciğer hasarında, Avcı ve ark. (2017) Siklofosfamid (CP) uygulaması sonucu oluşturdukları kardiyotoksisite modelinde, Dabak ve Kocaman (2015) Metotreksat (MTX) ile oluşturdukları rat nefrotoksisite modeli çalışmasında, Tan ve ark. (2015) farelerde oluşturdukları I/R hasarına karşın, Sözmen ve ark. 2014 farelerde FB₁ kaynaklı oluşturdukları karaciğer hasarında ve He ve ark. (2004) da yine FB₁ vererek farelerde meydana getirdikleri karaciğer hasarında Silimarin'in apoptoz üzerine olan etkilerini TUNEL metoduyla değerlendirmişler ve Silimarin uygulamasının bu modellemelerde artan apoptotik hücre sayısını düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Çalışmamızda kontrol, sham ve silimarin gruplarında TUNEL pozitif reaksiyona rastlanmamıştır. DEN uygulamasının TUNEL pozitif hücre sayısında artışa (51.6 ± 5.27), Silimarin uygulamasının ise DEN grubuna kıyasla TUNEL pozitif hücre sayısında artışa neden olduğu belirlenmiştir (59.8 ± 6.77). Fakat pozitif hücre sayısında saptanan bu artışın istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Yapılan çalışmada TUNEL pozitif boyanmalara hücrenin çekirdeğinde rastlanmıştır. Bazı hücrelerde gözlenen sitoplazmik boyanma nekroza yorumlanmıştır. TUNEL boyaması ile bu çalışmada apoptotik hücrelerin varlığı ortaya konulmuştur. Apoptozun indüklenmesi kanser tedavisinde önemlidir. Kanser hücrelerinin apoptoz mekanizmasından kurtulmasının karsinogenezis sürecinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Apoptozun baskılanması, kanser gelişimi ve progresyonunda itici bir güçtür. Dolayısıyla DEN uygulaması sonucunda meydana gelen kanser hücrelerinin apoptozdan kaçması ve TUNEL pozitif hücre sayısının oldukça az olması beklenmekteydi. Buna rağmen DEN grubunda TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubundaki sağlıklı ratlara göre oldukça artmıştır. Bu artış da HCC'de belli oranda programlı hücre ölümünün olabileceğini düşündürmektedir. Silimarin apoptozu tetikleyen önemli bir anti kanserojendir. Literatür verilerine uyumlu olarak Silimarin, DEN grubuna kıyasla TUNEL pozitif hücre sayısını arttırmış ve hafif şekilde de olsa koruyucu etki göstermiştir. Bu koruyucu etkinin Silimarin'in apoptozu tetiklemesinden ileri geldiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda DEN uygulaması ile oluşturduğumuz hepatokarsinogenezis modelinde DEN'in 20 hafta süresince haftada 1 kez olacak şekilde IP yolla uygulanmasının ratlarda deneysel karaciğer kanser modeli oluşturmada oldukça kullanılır bir yöntem olduğu ortaya konmuştur. Bunun yanında; önemli bir hepatoprotektif ve antikanserojenik ajan olan Silimarin'in karaciğerde verilen doz (100 mg/kg) ve uygulama şeklinde (IP) kısmi olarak koruyucu etki gösterdiği, ama bu etkinin istatistiki olarak anlamlı olmadığı ortaya konmuştur. Silimarin'in beklenen karaciğer koruyucu ve antikanserojenik etkiyi göstermemesinin nedeninin düşük biyoyararlanıma sahip olması, emilim ve çözünmesindeki zorluklarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Silimarin'in daha yüksek etki gösterebilmesi için uygulama şekli, dozu ve süresi ile çözdürücü madde değişikliğine ihtiyaç olduğu açıktır.

5. KAYNAKLAR

Abdel-Moneim AM, Al-Kahtani MA, El-Kersh MA, Al-Omair MA: Free Radical-Scavenging, Anti-Inflammatory/ Anti-Fibrotic and Hepatoprotective Actions of Taurine and Silymarin against CCl₄ Induced Rat Liver Damage. *PLoS One.*, 10 (12):1-16, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0144509

Abdel Salam OM, Sleem AA, Omara EA, Hassan NS: Effect of ribavirin alone or combined with silymarin on carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *Drug Target Insights.*, 2:19-27, 2007.

Abdo W, Hirata A, Shukry M, Kamal T, Abdel-Sattar E, Mahrous E, Yanai T: Calligonum comosum extract inhibits diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Oncol Lett.*, 10 (2): 716–722, 2015. doi: 10.3892/ol.2015.3313.

Abdulaziz Bardi D, Halabi MF, Abdullah NA, Rouhollahi E, Hajrezaie M, Abdulla MA: In vivo evaluation of ethanolic extract of *Zingiber officinale* rhizomes for its protective effect against liver cirrhosis. *Biomed Res Int.*, 2013:918460, 2013. doi: 10.1155/2013/918460.

Abike F, Zengeroğlu S: Epitelyal Over Karsinomlarında PCNA Ekspresyonu. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* 67 (4):173-178, 2010.

AbouZid SF, Chen SN, McAlpine JB, Friesen JB, Pauli GF: Silybum marianum pericarp yields enhanced silymarin products. *Fitoterapia.*, 112:136-143, 2016. doi: 10.1016/j.fitote.2016.05.012.

Adhikari M, Arora R: Nano-silymarin provides protection against γ -radiation-induced oxidative stress in cultured human embryonic kidney cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.*, 792:1-11, 2015. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.08.006.

Ahn B, Han BS, Kim DJ, Ohshima H: Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in rat liver tumors induced by N-nitrosodiethylamine. *Carcinogenesis.*, 20 (7):1337-1344, 1999.

Aiub CA, Gadermaier G, Silva IO, Felzenszwalb I, Pinto LF, Ferreira F, Eckl P: N-nitrosodiethylamine genotoxicity evaluation: a cytochrome P450 induction study in rat hepatocytes. *Genet Mol Res.*, 5;10 (4):2340-2348, 2011. doi: 10.4238/2011.

Akdeniz D, Tuncer ŞB, Yazıcı H: Retinoblastoma (RB) gen yolağı ve kanser. *Türk Onkoloji Dergisi*, 29(4):173-180, 2014. doi: 10.5505/tjoncol.2014.1067.

Akkız H: Hepatoselüler Karsinomunun Moleküler Patogenezi. *Türkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol-Special Topics*, 7 (2):7-13, 2014.

Aköz M, Vatansev H, Gürbilek M, Akkuş İ, Vatansev C, Kaptanoğlu B: Glutasyon S-transferaz (GST) izoenzimlerinin çeşitli kanser vakalarında araştırılması. *Genel Tıp Derg*, 10 (1), 2000.

Aksak Karamiş S: Östrojen Reseptörleri ile Mikrotübül Dinamiği Arasındaki İlişkinin İn-Vivo Olarak İncelenmesi. *Doktora Tezi. T.C. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, 2013.*

Akşit H, Bildik A: Apoptozis. *YYÜ Vet Fak Derg*, 19 (1): 55-63, 2008.

Ali F, Rahul, Naz F, Jyoti S, Siddique YH: Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.*, 767:13-20, 2014. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.04.006.

Aliustaoğlu M: Temel Kanser Fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim*, Cilt: 22 / No:3, s. 46-49, 2009.

Amaral FC, Torres N, Saggioro F, Neder L, Machado HR, Silva WA Jr, Moreira AC, Castro M: MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.*, 94 (1):320-323, 2009. doi: 10.1210/jc.2008-1451.

Ambade A, Satishchandran A, Gyongyosi B, Lowe P, Szabo G: Adult mouse model of early hepatocellular carcinoma promoted by alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.*, 22 (16):4091-4108, 2016. doi: 10.3748/wjg.v22.i16.4091.

Aparicio-Bautista DI, Pérez-Carreón JI, Gutiérrez-Nájera N, Reyes-Grajeda JP, Arellanes-Robledo J, Vásquez-Garzón VR, Jiménez-García MN, Villa-Treviño S: Comparative proteomic analysis of thiol proteins in the liver after oxidative stress induced by diethylnitrosamine. *Biochim Biophys Acta.*, 1834 (12):2528-2538, 2013. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.08.005.

Arul D, Subramanian P: Inhibitory effect of naringenin (citrus flavonone) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *Biochem Biophys Res Commun.*, 434 (2):203-209, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.039.

Ashraf M, Abid F, Riffat S, Bashir S, Iqbal J, Sarfraz M, Afzal A, Zaheer M: RATIONALIZED AND COMPLEMENTARY FINDINGS OF SILYMARIN (MILK THISTLE) IN PAKISTANI HEALTHY VOLUNTEERS. *Acta Pol Pharm.*, 72 (3):607-614, 2015.

Aşçı Çelik D, Aslan Koşar P, Özçelik N: MikroRNA'lar ve Kanser ile İlişkisi. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, 20 (3): 121-127, 2013.

Ata Ş: Biyolojik Gıda ve Çevre Örneklerindeki Nitrit, Nitrat, Sekonder Amin ve Nitrozaminler. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Zonguldak, 2010.

Atakisi O, Atakisi E, Ozcan A, Karapehlivan M, Kart A: Protective effect of omega-3 fatty acids on diethylnitrosamine toxicity in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 17 (4):467-471, 2013.

Atawia RT, Mosli HH, Tadros MG, Khalifa AE, Mosli HA, Abdel-Naim AB: Modulatory effect of silymarin on inflammatory mediators in experimentally induced benign prostatic hyperplasia: emphasis on PTEN, HIF-1 α , and NF- κ B. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 387 (12):1131-1140, 2014. doi: 10.1007/s00210-014-1040-y.

Atawia RT, Tadros MG, Khalifa AE, Mosli HA, Abdel-Naim AB: Role of the phytoestrogenic, pro-apoptotic and anti-oxidative properties of silymarin in inhibiting experimental benign prostatic hyperplasia in rats. *Toxicol Lett.* 219 (2):160-169, 2013. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.03.002.

Atlı K, Bozcuk AN: Telomer ve Hücrel Yaşlanma. *Geriatrici*, 5 (3) *Turkish Journal of Geriatrics*: 111-114, 2002.

Avcı H, Epikmen ET, Ipek E, Tunca R, Birincioglu SS, Akşit H, Sekkin S, Akkoç AN, Boyacioglu M: Protective effects of silymarin and curcumin on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Exp Toxicol Pathol.*, 69 (5):317-327, 2017. doi: 10.1016/j.etp.2017.02.002.

Ayar A, Özdemir M: Konya'da Satılan Beyaz Peynirlerin Nitrat ve Nitrit İçerikleri. *S. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16 (29):84-87, 2002.

Aytekin Y: Temel Histoloji. s. 380-396. Barış Kitabevi, İstanbul, 1993.

Aziz A, Khaliq T, Khan JA, Jamil A, Majeed W, Faisal MN, Aslam B, Atta K: Ameliorative effects of qurs-e-afsanteen on gentamicin induced hepatotoxicity and oxidative stress in rabbits. *Pak. J. Agri. Sci.*, 54 (1), 181-188, 2017. doi: 10.21162/PAKJAS/17.4939.

Babu LH, Perumal S, Balasubramanian MP: Myrtenal, a natural monoterpene, down-regulates TNF- α expression and suppresses carcinogen-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol Cell Biochem.*, 369 (1-2):183-193, 2012. doi: 10.1007/s11010-012-1381-0.

Bağcı Ö: mikroRNA'lar (miRNA) ve Kanser. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 40 (2):105-109, 2014.

Balcan C, Arslan Ö, Gümüş A, Şahin M: Tunikamisinin Embriyonik ve Yenidoğan Fare Dalak Dokularına Etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (5):651-660, 2009. doi: 10.9775/kvfd.2009.064-A.

Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Mafakheri M: Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress. *Neurosci Lett.*, 480 (3):206-210, 2010. doi: 10.1016/j.neulet.2010.06.038.

Bektur NE: Silymarin'in asetaminofen (parasetamol) kaynaklı karaciğer ve böbrek toksisitesi üzerine iyileştirici etkisi. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, 2012.

Ben Rahal N, Barba FJ, Barth D, Chevalot I: Supercritical CO₂ extraction of oil, fatty acids and flavonolignans from milk thistle seeds: Evaluation of their antioxidant and cytotoxic activities in Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol.*, 83:275-282, 2015. doi: 10.1016/j.fct.2015.07.006.

Beydoğan AB, Bolkent S: The effects of silibin administration for different time periods on mouse liver with Ehrlich ascites carcinoma. *Pharmacological Reports*, 68: 543-549, 2016. doi: 10.1016/j.pharep.2015.12.003.

Bharati S, Rishi P, Koul A: Azadirachta indica modulates electrical properties and type of cell death in NDEA-induced hepatic tumors. *Cell Biochem Biophys.*, 70 (1):383-390, 2014. doi: 10.1007/s12013-014-9923-6.

Bingül İ, Başaran-Küçükgergin C, Tekkeşin MS, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M: Effect of blueberry pretreatment on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and liver injury in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 36 (2):529-538, 2013. doi: 10.1016/j.etap.2013.05.014.

Bird A: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, 16 (1):6-21, 2002. doi: 10.1101/gad.947102.

Bishayee A, Barnes KF, Bhatia D, Darvesh AS, Carroll RT. Resveratrol suppresses oxidative stress and inflammatory response in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila.)*, 3 (6):753-763, 2010. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-09-0171.

Bishayee A, Dhir N: Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *Chem Biol Interact.*, 15;179 (2-3):131-144, 2009. doi: 10.1016/j.cbi.2008.11.015.

Bishayee A, Thoppil RJ, Darvesh AS, Ohanyan V, Meszaros JG, Bhatia D: Pomegranate phytoconstituents blunt the inflammatory cascade in a chemically induced rodent model of hepatocellular carcinogenesis. *J Nutr Biochem.*, 24 (1):178-187, 2013. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.04.009.

Bolat İ, Keklikoğlu N, İnce Akıncı S: Telomerlerin Hücrel Rolü. *İstanbul Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 41 (4):21-26, 2007.

Bora G, Yurter HE: Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. Hacettepe Tıp Dergisi, 38:48-54, 2007.

Bosch-Barrera J, Menendez JA: Silibinin and STAT3: A natural way of targeting transcription factors for cancer therapy. *Cancer Treat Rev.*, 41 (6):540-546, 2015. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.04.008.

Boyle P, Levin B: Molecular Hallmarks of Cancer, World Cancer Report. p. 190-222. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2008.

Bugide S, David D, Nair A, Kannan N, Samanthapudi VS, Prabhakar J, Manavathi B: Hematopoietic PBX-interacting protein (HPIP) is over expressed in breast infiltrative ductal carcinoma and regulates cell adhesion and migration through modulation of focal adhesion dynamics. *Oncogene.*, 34 (35):4601-4612, 2015. doi: 10.1038/onc.2014.389.

Bugide S, Gonugunta VK, Penugurti V, Malisetty VL, Vadlamudi RK, Manavathi B: HPIP promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer cells through PI3K/AKT pathway activation. *Cell Oncol (Dordr.)*, 40 (2):133-144, 2017. doi: 10.1007/s13402-016-0308-2.

Bulum KL, Mengi A: Normal ve Fascioliasis'li Sığırlarda Serum AST, ALT, GGT, ALP Aktiviteleri ile Total Protein, Albümin, Total Bilirubin Düzeyleri Üzerine Araştırmalar. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 26 (2), 311-324, 2000. (AAA 4)

Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD: MacSween's Pathology of the Liver. 6th edition, p. 761-851. Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh, 2012.

Cabadak H: Hücre Siklusu ve Kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9 (3):51-61, 2008.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM: A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.*, 353 (17):1793-1801, 2005. doi: 10.1056/NEJMoa050995.

Cassidy J, Bissett D, Obe RAJS: Oxford Handbook of Oncology. 1st Edition, p. 12-36. Oxford University Press, New York, 2002.

Chen B, Zhao J, Zhang S, Zhang Y, Huang Z: HPIP promotes gastric cancer cell proliferation through activation of cap-dependent translation. *Oncol Rep.*, 36 (6):3664-3672, 2016. doi: 10.3892/or.2016.5157.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102 (39):13944-13949, 2005. doi: 10.1073/pnas.0506654102.

Cinel İ, Oral U: Peroksinitrit ve Myokardium. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2:163-168, 2000.

Coşkun G, Özgür H: Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20 (3): 145-158, 2011.

Csupor D, Csorba A, Hohmann J: Recent advances in the analysis of flavonolignans of *Silybum marianum*. *J Pharm Biomed Anal.*, 130:301-317, 2016. doi: 10.1016/j.jpba.2016.05.034.

Cui LM, Zhang K, DJ Ma, Liu SP, Zhang XW: Protein expression under sustained activation of signal transducer and activator of transcription-3 in diethylnitrosamine-induced rat liver carcinogenesis. *Oncol Lett.*, 8 (2): 608–614, 2014. doi: 10.3892/ol.2014.2194.

Çalışkan M: Apoptosis: Programlanmış Hücre Ölümleri. *Turk J Zool*, 24 (Ek Sayı): 31-35, 2000.

Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ: Tıbbi Fizyoloji. 11.Baskı, s. 859-864. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2007.

Çefle K: Kanser Genetiği. *Klinik Gelişim*, Cilt: 22 / No:3, s. 50-59, 2009.

Çefle K: P53 Tümör Süpresör Geni. *İst. Tıp Fak. Mecmuası* 66:2,121-126, 2003.

Çetinkaya M, Aksoy F, Adsan Ö, Günçe S, Ulusoy E, Koşan M, Memiş A: Mesane Tümörünün Yüzeysel ve Derin Tabakalarında PCNA Ekspresyonu Farkı. *Ankara Patoloji Bülteni*, 15 (1):22-24, 1998.

Çoban AY, Durupınar B: Nitrik Oksit ve DNA Hasarı. *Mikrobiyol Bült*, 35:497-504, 2001.

Çobanoğlu S: Deneysel Ateroskleroz Oluşturulmuş Sıçanlarda L-argininin TAS, TOS ve Oksidatif Stres İndeksine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı, Edirne, 2011.

Dabak DO, Kocaman N: Effects of silymarin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail.*, 37 (4):734-739, 2015. doi: 10.3109/0886022X.2015.1012984.

Dai ZJ, Wu WY, Kang HF, Ma XB, Zhang SQ, Min WL, Kang WF, Ma XB, Zhang SQ, Min WL, Lu WF, Lin S, Wang XJ: Protective effects of *Scutellaria barbata* against rat liver tumorigenesis. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 14 (1):261-265, 2013.

David M, Kartheek RM: In vivo studies on hepato-renal impairments in freshwater fish *Cyprinus carpio* following exposure to sublethal concentrations of sodium cyanide. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 23 (1):722-733, 2016. doi: 10.1007/s11356-015-5286-9.

de Guadalupe Chávez-López M, Pérez-Carreón JI, Zuñiga-García V, Díaz-Chávez J, Herrera LA, Caro-Sánchez CH, Acuña-Macías I, Gariglio P, Hernández-Gallegos E, Chilinguina AJ, Camacho J: Astemizole-based anticancer therapy for hepatocellular carcinoma (HCC), and Eag1 channels as potential early-stage markers of HCC. *Tumour Biol.*, 36 (8):6149-6158, 2015. doi: 10.1007/s13277-015-3299-0.

Deep G, Raina K, Singh RP, Oberlies NH, Kroll DJ, Agarwal R: Isosilibinin inhibits advanced human prostate cancer growth in athymic nude mice: comparison with silymarin and silibinin. *Int J Cancer.*, 123 (12):2750-2758, 2008. doi: 10.1002/ijc.23879.

Devi PU: Basics of Carcinogenesis. *Health Administrator* Vol: XVII, Number 1: 16-24,pg, 2005.

Dikmen G, Doğan P: Telomeraz ve Kanser. *T Klin Tıp Bilimleri*, 23:334-341, 2003.

Diñçel GÇ, Kul O: Patolojik Apoptozis ve Tanı Yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi / Gümüşhane University Journal of Health Sciences*, 5 (1): 86-108, 2016.

Domitrović R, Jakovac H, Blagojević G: Hepatoprotective activity of berberine is mediated by inhibition of TNF- α , COX-2, and iNOS expression in CCl(4)-intoxicated mice. *Toxicology.*, 280 (1-2):33-43, 2011. doi: 10.1016/j.tox.2010.11.005.

Doğan AL, Güç D: Sinyal iletimi mekanizmalar ve kanser. Hacettepe Tıp Dergisi, 35:34-42, 2004.

Doğan R, Aktaş RG: Epigenetik Mekanizmalar ve Hepatosellüler Karsinoma. Maltepe Tıp Dergisi, 8 (3):029-035, 2016.

Ebrahimpour Koujan S, Gargari BP, Mobasseri M, Valizadeh H, Asghari-Jafarabadi M: Effects of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) extract supplementation on antioxidant status and hs-CRP in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine.*, 22 (2):290-296, 2015. doi: 10.1016/j.phymed.2014.12.010.

Ekici K, Alişarlı M, Sancak YC: Peynir Çeşitlerinde Nitrit ve Nitrozaminler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 19 (2):71-72, 2008.

Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ: Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. Marmara Medical Journal, 21(3):282-295, 2008.

Ekmekçi PK, Anadolu R, Erdem C: P53 Geni ve Dermatolojideki Önemi. T Klin Dermatoloji, 10:163-168, 2000.

El-Lakkany NM, El-Maadawy WH, Seif El-Din SH, Hammam OA, Mohamed SH, Ezzat SM, Safar MM, Saleh S: Rosmarinic acid attenuates hepatic fibrogenesis via suppression of hepatic stellate cell activation/proliferation and induction of apoptosis. *Asian Pac J Trop Med.*, 10 (5):444-453, 2017. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.05.012.

El Mesallamy HO, Metwally NS, Soliman MS, Ahmed KA, Abdel Moaty MM: The chemopreventive effect of *Ginkgo biloba* and *Silybum marianum* extracts on hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Cell Int.*, 11 (1):38, 2011. doi: 10.1186/1475-2867-11-38.

El-Shahat M, El-Abd S, Alkafafy M, El-Khatib G: Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats: myrrh (*Commiphora molmol*) vs. turmeric (*Curcuma longa*). *Acta Histochem.*, 114 (5):421-428, 2012. doi: 10.1016/j.acthis.2011.08.002.

El Sherif F, Khattab S, Ibrahim AK, Ahmed SA: Improved silymarin content in elicited multiple shoot cultures of *Silybum marianum*. *L. Physiol Mol Biol Plants.*, 19 (1):127-136, 2013. doi: 10.1007/s12298-012-0141-7.

Eo HJ, Park GH, Song HM, Lee JW, Kim MK, Lee MH, Lee JR, Koo JS, Jeong JB: Silymarin induces cyclin D1 proteasomal degradation via its phosphorylation of threonine-286 in human colorectal cancer cells. *Int Immunopharmacol.*, (1):1-6, 2015. doi: 10.1016/j.intimp.2014.11.009.

Eren E: Hepatoselüler Karsinomada MDM2 Gen Polimorfizmleri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 2006.

Erer H, Kıran MM: Veteriner Onkoloji. Damla Ofset A.Ş., 4.basım, s. 1-44, Konya, 2009.

Ergün L: Histoloji Atlası. 1.baskı, s. 83-85. Fenomen Yayıncılık, Ankara, 2012.

Eroschenko VP: diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. 11th Edition, p. 313-332. Wolters Kluwer Health-Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore-Philadelphia, 2008.

Eröz R, Karataş A, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S: Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması). *Düzce Tıp Dergisi*, 14 (2): 87-101, 2012.

Evren E, Yurtcu E: In vitro effects on biofilm viability and antibacterial and antiadherent activities of silymarin. *Folia Microbiol (Praha).*, 60 (4):351-356, 2015. doi: 10.1007/s12223-015-0399-6.

Faedmaleki F, Shirazi FH, Ejtemaeimehr S, Anjarani S, Salarian AA, Ahmadi Ashtiani H, Rastegar H: Study of Silymarin and Vitamin E Protective Effects on Silver Nanoparticle Toxicity on Mice Liver Primary Cell Culture. *Acta Med Iran.*, 54 (2):85-95, 2016.

Fan L, Ma Y, Liu Y, Zheng D, Huang G: Silymarin induces cell cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells. *Eur J Pharmacol.*, 743:79-88, 2014. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.09.019.

Fan X, He C, Jing W, Zhou X, Chen R, Cao L, Zhu M, Jia R, Wang H, Guo Y, Zhao J: Intracellular Osteopontin inhibits toll-like receptor signaling and impedes liver carcinogenesis. *Cancer Res.*, 75 (1):86-97, 2015. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0615.

Feng L, Mao W, Zhang J, Liu X, Jiao Y, Zhao X, Wang X, Zhang D, Cai D, Wang Y: Pharmacokinetic variations of tetramethylpyrazine phosphate after oral administration in hepatic precancerous mice and its hepatoprotective effects. *Drug Dev Ind Pharm.*, 40 (1):1-8, 2014. doi: 10.3109/03639045.2012.756513.

Feng Y, Li L, Zhang X, Zhang Y, Liang Y, Lv J, Fan Z, Guo J, Hong T, Ji B, Ji Q, Mei G, Ding L, Zhang S, Xu X, Ye Q: Hematopoietic pre-B cell leukemia transcription factor interacting protein is overexpressed in gastric cancer and promotes gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion. *Cancer Sci.*, 106 (10):1313-1322, 2015. doi: 10.1111/cas.12754.

Feng Y, Xu X, Zhang Y, Ding J, Wang Y, Zhang X, Wu Z, Kang L, Liang Y, Zhou L, Song S, Zhao K, Ye Q: HPIP is upregulated in colorectal cancer and regulates colorectal cancer cell proliferation, apoptosis and invasion. *Sci Rep.*, 5:9429, 2015. doi: 10.1038/srep09429.

Ferrell LD, Kakar S: Consultant Pathology Volume 4 Liver Pathology. 1st Edition, p. 343-515. Demos Medical, New York, 2011.

Fletcher CDM: Diagnostic Histopathology of Tumors. 4th Edition/Volume 1, p. 477-530. Elsevier Saunder, Philadelphia, 2013 (DV 4)

Fujise Y, Okano J, Nagahara T, Abe R, Imamoto R, Murawaki Y: Preventive effect of caffeine and curcumin on hepato-carcinogenesis in diethylnitrosamine-induced rats. *Int J Oncol.*, 40 (6):1779-1788, 2012. doi: 10.3892/ijo.2012.1343.

Gartner LP, Hiatt JL: Color Atlas and Text of Histology. 7th Edition, p.357-379. Wolters Kluwer Health-Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore-Philadelphia, 2014.

Gándara L, Sandes E, Di Venosa G, Prack Mc Cormick B, Rodriguez L, Mamone L, Batlle A, Eiján AM, Casas A: The natural flavonoid silybin improves the response to Photodynamic Therapy of bladder cancer cells. *J Photochem Photobiol B.*, 133:55-64, 2014. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.03.006.

Geller SA, Petrowic LM: Biopsy Interpretation of the Liver. 2nd Edition, p.319-368. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009.

Ghosh D, Choudhury ST, Ghosh S, Mandal AK, Sarkar S, Ghosh A, Saha KD, Das N: Nanocapsulated curcumin: oral chemopreventive formulation against diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rat. *Chem Biol Interact.*, 5;195 (3):206-214, 2012. doi: 10.1016/j.cbi.2011.12.004.

Giacinti C, Giordano A: RB and cell cycle progression. *Oncogene.*, 25 (38):5220-5227, 2006. doi: 10.1038/sj.onc.1209615.

Giono LE, Manfredi JJ: The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol.*, 209 (1):13-20, 2006. doi: 10.1002/jcp.20689

Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pébusque MJ, Dusetti NJ: Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104 (41):16170-16175, 2007. doi: 10.1073/pnas.0703942104

Gopalakrishnan R, Sundaram J, Sattu K, Pandi A, Thiruvengadam D: Dietary supplementation of silymarin is associated with decreased cell proliferation, increased apoptosis, and activation of detoxification system in hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem.*, 377(1-2):163-176, 2013. doi: 10.1007/s11010-013-1582-1.

Göksoy E, Kapan M: Karaciğerin Metastatik Tümörleri. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Hepato-Bilier Sistem ve Hastalıkları, Sempozyum Dizisi No:28, s. 183-190, 2002.

Görüroğlu Öztürk Ö: Matriks Metalloproteinaz Enzim Ailesi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 22 (2):209-220, 2013.

Gu HR, Park SC, Choi SJ, Lee JC, Kim YC, Han CJ, Kim J, Yang KY, Kim YJ, Noh GY, No SH, Jeong JH: Combined treatment with silibinin and either sorafenib or gefitinib enhances their growth-inhibiting effects in hepatocellular carcinoma cells. *Clin Mol Hepatol.*, 21 (1):49-59, 2015. doi: 10.3350/cmh.2015.21.1.49.

Gupta P, Bansal MP, Koul A: Evaluating the effect of lycopene from *Lycopersicon esculentum* on apoptosis during NDEA induced hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 434 (3):479-485, 2013a. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.099.

Gupta P, Bansal MP, Koul A: Lycopene modulates initiation of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis: studies on chromosomal abnormalities, membrane fluidity and antioxidant defense system. *Chem Biol Interact.*, 206 (2):364-374, 2013b. doi: 10.1016/j.cbi.2013.10.010.

Güçer Ş, Tınaztepe K: Böbrek hastalıklarında apoptozisin rolü. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 32 (2):160-168, 2001.

Güleş Ö, Eren Ü: Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2:73-78, 2008.

Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E: Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyol Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol* 36(2):120-130, 2008.

Güneri Yıldız M, Aras S, Cansaran Duman D: Telomerlerin Yaşlanma ve Kanser İlişkisindeki Rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66 (4): 187-195, 2009.

Güngör ÖF, Ünal N: Epigenetik ve Genomik Baskılanma. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 55 (2) 73-81, 2015.

Gürel Ç, Nursal AF, Yiğit S: Epigenetik ve Kanser. *Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topics*, 2 (1), 2016.

Güzelgül F, Aksoy K: Telomeraz Enziminin Tanı ve Tedavide Kullanım Alanı. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, Cilt: 20 Sayı: 2 16: 69-88, 2010.

Haddadi R, Nayebi AM, Farajniya S, Brooshghalan SE, Sharifi H: Silymarin improved 6-OHDA-induced motor impairment in hemi-parkinsonian rats: behavioral and molecular study. *Daru.*, 22:38, 2014. doi: 10.1186/2008-2231-22-38.

Hamilton SR, Aaltonen LA: World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC Press, p. 157-202, Lyon, 2000.

Hasanein P, Ghafari-Vahed M, Khodadadi I: Effects of isoquinoline alkaloid berberine on lipid peroxidation, antioxidant defense system, and liver damage induced by lead acetate in rats. *Redox Rep.*, 22 (1):42-50, 2017. doi: 10.1080/13510002.2016.1140406.

Hassani FV, Rezaee R, Sazegara H, Hashemzadeh M, Shirani K, Karimi G: Effects of silymarin on neuropathic pain and formalin-induced nociception in mice. *Iran J Basic Med Sci.*, 18 (7):715-720, 2015.

Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T: A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.*, 65 (21):9628-9632, 2005. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2352.

He Q, Kim J, Sharma RP: Silymarin protects against liver damage in BALB/c mice exposed to fumonisin B1 despite increasing accumulation of free sphingoid bases. *Toxicol Sci.*, 80 (2):335-342, 2004. doi: 10.1093/toxsci/kfh148.

Hirayama K, Oshima H, Yamashita A, Sakatani K, Yoshino A, Katayama Y: Neuroprotective effects of silymarin on ischemia-induced delayed neuronal cell death in rat hippocampus. *Brain Res.*, 1646:297-303, 2016. doi: 10.1016/j.brainres.2016.06.018.

Hussain T, Siddiqui HH, Fareed S, Vijayakumar M, Rao CV: Evaluation of chemopreventive effect of *Fumaria indica* against N-nitrosodiethylamine and CCl₄-induced hepatocellular carcinoma in Wistar rats. *Asian Pac J Trop Med.*, 5 (8):623-629, 2012. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60128-X.

Ichikawa K, Tagawa Y, Kawai M, Asamoto M, Shirai T: Promoting Effects of Streptozotocin-induced Diabetes on Induction of Hepatic Preneoplastic Lesions by Diethylnitrosamine in Rats. *J Toxicol Pathol.*, 23 (3):125-131, 2010. doi: 10.1293/tox.23.125.

Ijaz A, Javed I, Aslam B, Khan JA, Khaliq T, Rahman Z, Khan MZ, Iqbal Z, Naeem MA, Ashraf MM: Nephroprotective and Antioxidant Effects of *Moringa Oleifera* (Sohanjna) in Paracetamol Induced Nephrotoxic Albino Rabbits. *Pak Vet J*, 36 (3): 292-296, 2016.

Imamoto R, Okano JI, Sawada S, Fujise Y, Abe R, Murawaki Y: Null anticarcinogenic effect of silymarin on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Exp Ther Med.*, 7 (1):31-38, 2014. doi: 10.3892/etm.2013.1391.

Impellizzeri D, Bruschetta G, Ahmad A, Crupi R, Siracusa R, Di Paola R, Paterniti I, Prosdociami M, Esposito E, Cuzzocrea S: Effects of palmitoylethanolamide and silymarin combination treatment in an animal model of kidney ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol.*, 762:136-149, 2015. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.010.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.*, 65 (16):7065-7070, 2005.

İzmirli M: Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi*, 20 (1): 48-51, 2013.

Javed S, Khan JA, Khaliq T, Javed I, Abbas RZ: Experimental Evaluation of Nephroprotective Potential of *Calotropis procera* (Ait) Flowers against Gentamicin-Induced Toxicity in Albino Rabbits. *Pakistan Veterinary Journal.*, 35 (2), 222-226, 2015.

Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S, Raghunandhakumar S, Gokula dhas K, Kamaraj S, Divya MG, Devaki T: Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol Cell Biochem.*, 360 (1-2):51-60, 2012. doi: 10.1007/s11010-011-1043-7.

Jo W, Yu ES, Chang M, Park HK, Choi HJ, Ryu JE, Jang S, Lee HJ, Jang JJ, Son WC: Metformin inhibits early stage diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Mol Med Rep.*, 13 (1):146-152, 2016. doi: 10.3892/mmr.2015.4513.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ: RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.*, 120 (5):635-647, 2005. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.014

Jones AP, Baylin BS: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet.*, 3:415-418, 2002.

Joshi R, Garabadu D, Teja GR, Krishnamurthy S: Silibinin ameliorates LPS-induced memory deficits in experimental animals. *Neurobiol Learn Mem.*, 116:117-131, 2014. doi: 10.1016/j.nlm.2014.09.006.

Kadasa NM, Abdallah H, Afifi M, Gowayed S: Hepatoprotective effects of curcumin against diethyl nitrosamine induced hepatotoxicity in albino rats. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 16 (1):103-108, 2015.

Kadir FA, Kassim NM, Abdulla MA, Kamalidehghan B, Ahmadipour F, Yehye WA: PASS-predicted hepatoprotective activity of *Caesalpinia sappan* in thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Scientific World Journal.*, 2014:301879, 2014. doi: 10.1155/2014/301879.

Karagün BŞ, Antmen B, Şaşmaz İ, Kılınc Y: Mikro RNA ve Kanser. *Türk Klinik Biyokimya Derg.*, 12 (1): 45-56, 2014.

Karahan S, Çavuşoğlu K, Atmaca HT, Yalçın E: Albino Farelerde İyonlaştırıcı Radyasyonun Hepatosit Morfolojisi ve Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.*, 5 (2):61-66, 2008.

Karamese M, Aksak S, Gundogdu OB, Unal B: A new hypothesis about hematopoietic Pbx-interaction protein (HPIP): can it be a key factor in neurodegeneration in the post-menopausal period? *Med Hypotheses.*, 81 (3):470-476, 2013. doi: 10.1016/j.mehy.2013.06.013.

Karayel F, Pakiş I, Akçay Turan A, Öz B, Çelik S: Akciğerde sigaraya bağlı patolojik değişimler, MMP-9 ve TIMP-1 ekspresyonlarının değerlendirilmesi. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi.*, 57 (2):129-135, 2009.

Kaur G, Athar M, Alam MS: Dietary supplementation of silymarin protects against chemically induced nephrotoxicity, inflammation and renal tumor promotion response. *Invest New Drugs.*, 28 (5):703-713, 2010. doi: 10.1007/s10637-009-9289-6.

Kaviarasan S, Sundarapandiyar R, Anuradha CV: Protective action of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed polyphenols against alcohol-induced protein and lipid damage in rat liver. *Cell Biol Toxicol.*, 24 (5):391-400, 2008. doi: 10.1007/s10565-007-9050-x.

Kawaguchi-Suzuki M, Frye RF, Zhu HJ, Brinda BJ, Chavin KD, Bernstein HJ, Markowitz JS: The effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on human cytochrome P450 activity. *Drug Metab Dispos.*, 42 (10):1611-1616, 2014. doi: 10.1124/dmd.114.057232.

Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z: Apoptozis. *Mustafa Kemal Üniv. Tıp Derg.*, 3 (11), 2012.

Kaya S, Eskiocak S, Tezel HA, Soylu AR, Ümit HC, Özdemir S, Türkyılmaz Z: Kolorektal Kanserli Olgularda Oksidatif ve Nitrozatif Stres. *Türk Klinik Biyokimya Derg.*, 10 (2): 57-63, 2012.

Kayalı R, Çakatay U: Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35 (2), 83-89, 2004.

Kazazis CE, Evangelopoulos AA, Kollas A, Vallianou NG: The therapeutic potential of milk thistle in diabetes. *Rev Diabet Stud.*, 11 (2):167-174, 2014. doi: 10.1900/RDS.2014.11.167.

Kelten B: Bir Safra Asidi Olan Tauroursodeoxycholic Acid'in Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi. Uzmanlık Tezi. T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul, 2005.

Keshavarz Afshar R, Chaichi MR, Ansari Jovini M, Jahanzad E, Hashemi M: Accumulation of silymarin in milk thistle seeds under drought stress. *Planta.*, 242 (3):539-543, 2015. doi: 10.1007/s00425-015-2265-9.

Khan MS, Devaraj H, Devaraj N: Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced preneoplastic nodules in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 251(1):85-94, 2011. doi: 10.1016/j.taap.2010.12.004.

Khan MS, Halagowder D, Devaraj SN: Methylated chrysin, a dimethoxy flavone, partially suppresses the development of liver preneoplastic lesions induced by N-nitrosodiethylamine in rats. *Food Chem Toxicol.* 49 (1):173-178, 2011. doi: 10.1016/j.fct.2010.10.013.

Khan MS, Halagowder D, Devaraj SN: Methylated chrysin induces co-ordinated attenuation of the canonical Wnt and NF- κ B signaling pathway and upregulates apoptotic gene expression in the early hepatocarcinogenesis rat model. *Chem Biol Interact.*, 193 (1):12-21, 2011. doi: 10.1016/j.cbi.2011.04.007.

Khezri HD, Salehifar E, Kosaryan M, Aliasgharian A, Jalali H, Amree AH: Potential Effects of Silymarin and Its Flavonolignan Components in Patients with β -Thalassemia Major: A Comprehensive Review in 2015. *Advances in Pharmacological Sciences*, 1-8, 2016. doi: 10.1155/2016/3046373.

Khoshnoodi M, Fakhraei N, Dehpour AR: Possible involvement of nitric oxide in antidepressant-like effect of silymarin in male mice. *Pharm Biol.*, 53 (5):739-745, 2015. doi: 10.3109/13880209.2014.942787.

Kim H, Hong MK, Choi H, Moon HS, Lee HJ: Chemopreventive effects of korean red ginseng extract on rat hepatocarcinogenesis. *J Cancer.*, 1;6 (1):1-8, 2015. doi: 10.7150/jca.10353.

Kim SH, Kim KY, Yu SN, Park SK, Choi HD, Ji JH, Ahn SC: Autophagy inhibition enhances silibinin-induced apoptosis by regulating reactive oxygen species production in human prostate cancer PC-3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 468 (1-2):151-156, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.143.

Kim SH, Oh DS, Oh JY, Son TG, Yuk DY, Jung YS: Silymarin Prevents Restraint Stress-Induced Acute Liver Injury by Ameliorating Oxidative Stress and Reducing Inflammatory Response. *Molecules.* 21 (4):443, 2016. doi: 10.3390/molecules21040443.

Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, Kroesen BJ, van den Berg A: BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol*, 207 (2):243-249, 2005. doi: 10.1002/path.1825

Koç A: RAW 264.7 MAKROFAJ HÜCRELERİNDE NİTRİK OKSİT SENTEZİ ÜZERİNE L-KARNİTİNİN ETKİSİ. Doktora Tezi. T.C. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2011.

Koçak N, Yıldırım İH, Yıldırım SC: p53 ve p53 gen ailesi üyeleri olan p63 ve p73'ün hücrel işlevleri. *Dicle Tıp Dergisi*, 38 (4): 530-535, 2011. doi: 10.5798/diclemedj.0921.2011.04.0083.

Koçarslan A, Koçarslan S, Aydın MS, Gunay Ş, Karahan MA, Taşkın A, Üstünel M, Aksoy N: Intraperitoneal Administration of Silymarin Protects End Organs from Multivisceral Ischemia/Reperfusion Injury in a Rat Model. *Braz J Cardiovasc Surg.*, 31 (6):434-439, 2016. doi: 10.5935/1678-9741.20160072.

Kolkesen Şahin Ö, Çına Aksoy M, Uz E, Dağdeviren BH: Deneysel sigara modelinde resveratrolün total oksidan/antioksidan kapasite üzerine etkilerinin araştırılması. *SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6 (1), 10-14, 2015.

Krajka-Kuźniak V, Szaefer H, Ignatowicz E, Adamska T, Markowski J, Baer-Dubowska W: Influence of Cloudy Apple Juice On N-Nitrosodiethylamine- Induced Liver Injury And Phases I And II Biotransformation Enzymes In Rat Liver. *Acta Pol Pharm.*, 72 (2):267-276, 2015.

Krause WJ: Krause's Essential Human Histology For Medical Students. 3rd Edition, p. 192-197. Universal-Publishers, California, 2005.

Kren V, Walterová D: Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 149 (1):29-41, 2005.

Kujawska M, Ignatowicz E, Ewertowska M, Markowski J, Jodynis-Liebert J: Cloudy apple juice protects against chemical-induced oxidative stress in rat. *Eur J Nutr.*, 50 (1):53-60, 2011. doi: 10.1007/s00394-010-0114-y.

Kumar AK, Vijayalakshmi K: Protective effect of Punica granatum peel and Vitis vinifera seeds on DEN-induced oxidative stress and hepatocellular damage in rats. *Appl Biochem Biotechnol.*, 175 (1):410-420, 2015. doi: 10.1007/s12010-014-1276-5.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC: Robbins Basic Pathology. 9th Edition, p. 161-214. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2013.

Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M: Apoptozis ve Kardiyovasküler Hastalıklar. *Anadolu Kardiyol Derg*, 4, 323-329, 2002.

Lee LMJ: Lippincott's Pocket Histology. 1st Edition, p. 152-154 Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2014.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes 151 small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75:843-854, 1993.

Lee Y, Chun HJ, Lee KM, Jung YS, Lee J: Silibinin suppresses astroglial activation in a mouse model of acute Parkinson's disease by modulating the ERK and JNK signaling pathways. *Brain Res.*, ;1627:233-242, 2015. doi: 10.1016/j.brainres.2015.09.029.

Liang Z, Yang Y, Wang H, Yi W, Yan X, Yan J, Li Y, Feng Y, Yu S, Yang J, Jin Z, Duan W, Chen W: Inhibition of SIRT1 signaling sensitizes the antitumor activity of silybin against human lung adenocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.*, 13 (7):1860-1872, 2014. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0942.

Lin PY, Yu SL, Yang PC: MicroRNA in lung cancer. *British Journal of Cancer*, 103:1144-1148, 2010.

Linza A, Wills PJ, Ansil PN, Prabha SP, Nitha A, Latha B, Sheeba KO, Latha MS: Dose-response effects of Elephantopus scaber methanolic extract on N-nitrosodiethylamine-induced hepatotoxicity in rats. *Chin J Nat Med.*, 11 (4):362-370, 2013. doi: 10.1016/S1875-5364(13)60053-9.

Liu WH, Ren LN, Wang X, Wang T, Zhang N, Gao Y, Luo H, Navarro-Alvarez N, Tang LJ: Combination of exosomes and circulating microRNAs may serve as a promising tumor marker complementary to alpha-fetoprotein for early-stage hepatocellular carcinoma diagnosis in rats. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 141 (10):1767-1778, 2015. doi: 10.1007/s00432-015-1943-0.

Longo DL: *Harrison's Hematology and Oncology*, 17th Edition, p. 294-317. McGraw-Hill Education Medical, New York, 2008.

Lowitz BB, Casciato AD: *Manual of Clinical Oncology*. ??? edition, p. Wolters Kluwer Health-Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.

Luper S: A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. *Altern Med Rev.*, 3 (6):410-421, 1998.

Luther DJ, Ohanyan V, Shamhart PE, Hodnichak CM, Sisakian H, Booth TD, Meszaros JG, Bishayee A: Chemopreventive doses of resveratrol do not produce cardiotoxicity in a rodent model of hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs.*, 29 (2):380-91, 2011. doi: 10.1007/s10637-009-9332-7.

Madrigal-Santillán E, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, Sumaya-Martínez MT, Gutiérrez-Salinas J, Bautista M, Morales-González A, García-Luna y González-Rubio M, Aguilar-Faisal JL, Morales-González JA: Review of natural products with hepatoprotective effects. *World J Gastroenterol.*, 20 (40):14787-14804, 2014. doi: 10.3748/wjg.v20.i40.14787.

Mai H, Xu X, Mei G, Hong T, Huang J, Wang T, Yan Z, Li Y, Liang Y, Li L, Jin S, You W, Ma Y, Chen L, Ye Q: The interplay between HPIP and casein kinase 1 β promotes renal cell carcinoma growth and metastasis via activation of mTOR pathway. *Oncogenesis.* 5 (10):e260, 2016. doi: 10.1038/oncsis.2016.44.

Man S, Li J, Fan W, Chai H, Liu Z, Gao W: Inhibition of pulmonary adenoma in diethylnitrosamine-induced rats by *Rhizoma paridis* saponins. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 154:62-67, 2015. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.07.004.

Manavathi B, Lo D, Bugide S, Dey O, Imren S, Weiss MJ, Humphries RK: Functional regulation of pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1 (PBXIP1/HPIP) in erythroid differentiation. *J Biol Chem.*, 287 (8):5600-5614, 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.289843.

Mansour MA, Aljoufi MA, Al-Hosaini K, Al-Rikabi AC, Nagi MN: Possible role of selective, irreversible, proteasome inhibitor (carfilzomib) in the treatment of rat hepatocellular carcinoma. *Chem Biol Interact.*, 215:17-24, 2014. doi: 10.1016/j.cbi.2014.03.001.

Marcolino Assis-Júnior E, Melo AT, Pereira VBM, Wong DVT, Sousa NRP, Oliveira CMG, Malveira LRC, Moreira LS, Souza MHL, Almeida PRC, Lima-Júnior RCP: Dual effect of silymarin on experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by irinotecan. *Toxicol Appl Pharmacol.* 327:71-79, 2017. doi: 10.1016/j.taap.2017.04.023.

Mastron JK, Siveen KS, Sethi G, Bishayee A: Silymarin and hepatocellular carcinoma: a systematic, comprehensive, and critical review. *Anticancer Drugs.*, 26 (5):475-486, 2015. doi: 10.1097/CAD.0000000000000211.

Matsuda M, Nakamoto Y, Suzuki S, Kurata T, Kaneko S: Interferon- γ -mediated hepatocarcinogenesis in mice treated with diethylnitrosamine. *Lab Invest.*, 85 (5):655-663, 2005.

Maxie MG: *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals Volume 2*. 6th Edition, p. 258-353. Elsevier, St.Louis, 2016.

Mazo DF, de Oliveira MG, Pereira IV, Cogliati B, Stefano JT, de Souza GF, Rabelo F, Lima FR, Ferreira Alves VA, Carrilho FJ, de Oliveira CP: S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver

fibrosis in experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Des Devel Ther.*, 7:553-563, 2013. doi: 10.2147/DDDT.S43930.

Medhat A, Mansour S, El-Sonbaty S, Kandil E, Mahmoud M: Evaluation of the antitumor activity of platinum nanoparticles in the treatment of hepatocellular carcinoma induced in rats. *Tumour Biol.*, 39 (7):1010428317717259, 2017. doi: 10.1177/1010428317717259.

Merhan O, Atakisi E: Saravi SSS: Nitric Oxide Synthase - Simple Enzyme-Complex Roles, Chapter 11 (Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Involvement in Different Toxicities by Emine Atakisi and Oguz Merhan. InTech, p. 197-207, London, 2017. doi: 10.5772/63170.

Merhan O, Özcan A, Atakişi E, Öğün M, Kükürt A: The Effect of β -carotene on Acute Phase Response in Diethylnitrosamine Given Rabbits. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22 (4): 533-537, 2016. doi: 10.9775/kvfd.2016.14995.

Mescher AL: Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. 14th Edition, p. 335-345. McGraw Hill Education, New York, 2016.

Meuten DJ: Tumors in Domestic Animals. 5th Edition, p. 602-622. Wiley Blackwell, Iowa, 2017.

Mills SE: Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. 5th Edition, p. 1536-1594. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2010.

Mis L, Çilingir Yeltekin A: Apoptosis. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 3 (1), 102-112, 2014.

Moayedi Esfahani BA, Reisi N, Mirmoghtadaei M: Evaluating the safety and efficacy of silymarin in β -thalassemia patients: a review. *Hemoglobin.*, 39 (2):75-80, 2015. doi: 10.3109/03630269.2014.1003224.

Murrell A, Rakyan VK, Beck S: From genome to epigenome. *Hum Mol Genet.*, 14 Spec No 1:R3-R10, 2005. doi: 10.1093/hmg/ddi110.

Nagahara T, Okano J, Fujise Y, Abe R, Murawaki Y: Preventive effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on DEN-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Biomed Pharmacother.*, 64 (5):319-326, 2010. doi: 10.1016/j.biopha.2009.09.023.

Nakatani K, Yoshimi N, Mori H, Yoshimura S, Sakai H, Shinoda J, Sakai N: The significant role of Telomerase Activity in Human Brain Tumors. *Cancer*, 80 (3): 471-476, 1997.

Neha, Kumar A, Jaggi AS, Sodhi RK, Singh N: Silymarin ameliorates memory deficits and neuropathological changes in mouse model of high-fat-diet-induced experimental dementia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 387 (8):777-787, 2014. doi: 10.1007/s00210-014-0990-4.

Nilsson R, Mičić M, Filipović J, Šobot AV, Drakulić D, Stanojlović M, Jokić G: Inhibition by blueberries (bilberries) and extract from milk thistle of rat forestomach hyperplasia induced by oral smokeless tobacco (Swedish snus). *Regul Toxicol Pharmacol.*, 76:94-101, 2016. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.01.017.

Noori-Daloi MR, Saffari M, Raoofian R, Yekaninejad M, Dinehkabodi OS, Noori-Daloi AR: The multidrug resistance pumps are inhibited by silibinin and apoptosis induced in K562 and KCL22 leukemia cell lines. *Leuk Res.*, 38 (5):575-580, 2014. doi: 10.1016/j.leukres.2013.10.028.

Noyan A: Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 19.Baskı, s. 882-885. Palme Yayıncılık, Ankara, 2011.

Odze RD, Goldblum JR: Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas. 2nd Edition, p. 1291-1325. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2009.

Oğur G: Kanser, Kromozomlar ve Genler. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci*, 1 (2):73-92, 2005.

Oufi HG, Al-Shawi NN: The effects of different doses of silibinin in combination with methotrexate on testicular tissue of mice. *Eur J Pharmacol.*, 730:36-40, 2014. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.02.010.

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT: c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.*, 435 (7043):839-843, 2005. doi: 10.1038/nature03677.

Öktem S, Özhan MH, Özol D: Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2 (1): 91-95, 2001.

Öncel M: Matriks Metalloproteinazlar ve Kanser. *Eur J Basic Med Sci*, 2 (3):91-100, 2012.

Özdestan Ö, Üren A: Gıdalarda Nitrat ve Nitrit. *Akademik Gıda*, 8 (6):35-43, 2010.

Özen H, Kamber U, Karaman M, Gül S, Atakişi E, Özcan K, Atakişi O: Histopathologic, biochemical and genotoxic investigations on chronic sodium nitrite toxicity in mice. *Exp Toxicol Pathol.*, 66 (8):367-375, 2014. doi: 10.1016/j.etp.2014.05.003.

Özer A: Veteriner Özel Histoloji. 1.Baskı, s. 191-196. Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi, Ankara, 2008.

Özkan M, Yüksekol İ: Nitrik Oksit ve Akciğerler. *Toraks Dergisi*, 4 (1):88-94, 2003.

Öztürk B, Serdaroğlu M, Ergezer H: Et ve Et Ürünlerinde Nitrit-Nitrat; Kullanım Avantajları, Yasal Sınırlamalar ve Güncel Alternatif Yaklaşımlar. *Akademik Gıda*, 13 (3): 257-264, 2015.

Öztürk F: Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9 (2):143-148, 2002.

Palamutoğlu, R., Sarıçoban, C: Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrite Alternatif Doğal Kütleme Maddeleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7 (3):46-58, 2012.

Paradis V: Histopathology of hepatocellular carcinoma. *Recent Results Cancer Res.*, 190:21-32, 2013. doi: 10.1007/978-3-642-16037-0_2.

Park YN: Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. *Arch Pathol Lab Med.*, 135 (6):704-715, 2011. doi: 10.1043/2010-0524-RA.1.

Parveen R, Baboota S, Ali J, Ahuja A, Vasudev SS, Ahmad S: Effects of silymarin nanoemulsion against carbon tetrachloride-induced hepatic damage. *Arch Pharm Res.*, 34 (5):767-774, 2011. doi: 10.1007/s12272-011-0510-8.

Patil V, S M, Sharma S, Pratap K, Singh D, Padwad YS: Synergistic effect of curcumin and piperine in suppression of DENA-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 40 (2):445-452, 2015. doi: 10.1016/j.etap.2015.07.012.

Paula Santos N, Colaço A, Gil da Costa RM, Manuel Oliveira M, Peixoto F, Alexandra Oliveira P: N-diethylnitrosamine mouse hepatotoxicity: Time-related effects on histology and oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol*, 66 (9-10):429-436, 2014. doi: 10.1016/j.etp.2014.07.002.

Pazarbaşı A, Kasap M: Kanser Genetiği. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, cilt.12, ss.328-339, 2003.

Pérez-H J, Carrillo-S C, García E, Ruiz-Mar G, Pérez-Tamayo R, Chavarría A: Neuroprotective effect of silymarin in a MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Toxicology.*, 319:38-43, 2014. doi: 10.1016/j.tox.2014.02.009.

Pientaweeratch S, Panapisal V, Tansirikongkol A: Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and silymarin: an in vitro comparative study for anti-aging applications. *Pharm Biol.*, 54 (9):1865-1872, 2016. doi: 10.3109/13880209.2015.1133658.

Plasm C: Cancer Epigenomics. *Hum Mol Genet*, 11 (20): 2479-2488, 2002.

Prabu SM, Muthumani M: Silibinin ameliorates arsenic induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Mol Biol Rep.*, 39 (12):11201-11216, 2012. doi: 10.1007/s11033-012-2029-6.

Pradeep K, Raj Mohan CV, Gobianand K, Karthikeyan S: Protective effect of *Cassia fistula* Linn. on diethylnitrosamine induced hepatocellular damage and oxidative stress in ethanol pretreated rats. *Biol Res.*, 43 (1):113-125, 2010. doi: /S0716-97602010000100013.

Pradeep K, Mohan CV, Gobianand K, Karthikeyan S: Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. *European Journal of Pharmacology*, 560 (2-3), 110-116, 2007. doi:10.1016/j.ejphar.2006.12.023.

Raghunandhakumar S, Paramasivam A, Senthilraja S, Naveenkumar C, Asokkumar S, Binuclara J, Jagan S, Anandakumar P, Devaki T: Thymoquinone inhibits cell proliferation through regulation of G1/S phase cell cycle transition in N-nitrosodiethylamine-induced experimental rat hepatocellular carcinoma. *Toxicol Lett.*, 223 (1):60-72, 2013. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.08.018.

Rajasekaran D, Elavarasan J, Sivalingam M, Ganapathy E, Kumar A, Kalpana K, Sakthisekaran D: Resveratrol interferes with N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma at early and advanced stages in male Wistar rats. *Mol Med Rep.*, 4 (6):1211-7. 2011. doi: 10.3892/mmr.2011.555.

Rajamanickam S, Kaur M, Velmurugan B, Singh RP, Agarwal R: Silibinin suppresses spontaneous tumorigenesis in APC min/+ mouse model by modulating beta-catenin pathway. *Pharm Res.*, 26 (12):2558-2567, 2009. doi: 10.1007/s11095-009-9968-1.

Rajnochová Svobodová A, Zálešák B, Biedermann D, Ulrichová J, Vostálová J: Phototoxic potential of silymarin and its bioactive components. *J Photochem Photobiol B.*, 156:61-68, 2016. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.01.011.

Ramakrishnan G, Augustine TA, Jagan S, Vinodhkumar R, Devaki T: EFFECT OF SILYMARIN ON N-NITROSODIETHYLAMINE INDUCED HEPATOCARCINOGENESIS IN RATS. *Exp Oncol.*, 29 (1), 39-44, 2007.

Ramakrishnan G, Jagan S, Kamaraj S, Anandakumar P, Devaki T: Silymarin attenuated mast cell recruitment thereby decreased the expressions of matrix metalloproteinases-2 and 9 in rat liver carcinogenesis. *Invest New Drugs.*, 27(3):233-240, 2009. doi: 10.1007/s10637-008-9163-y.

Ramakrishnan G, Lo Muzio L, Elinos-Báez CM, Jagan S, Augustine TA, Kamaraj S, Anandakumar P, Devaki T: Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells. *Cell Prolif.*, 42 (2):229-240, 2009. doi: 10.1111/j.1365-2184.2008.00581.x.

Ramakrishnan G, Raghavendran HR, Vinodhkumar R, Devaki T: Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chem Biol Interact.*, 161 (2):104-114, 2006. doi: 10.1016/j.cbi.2006.03.007.

Ramasamy K, Dwyer-Nield LD, Serkova NJ, Hasebroock KM, Tyagi A, Raina K, Singh RP, Malkinson AM, Agarwal R: Silibinin prevents lung tumorigenesis in wild-type but not in iNOS-/- mice: potential of real-time micro-CT in lung cancer chemoprevention studies. *Clin Cancer Res.*, 17 (4):753-761, 2011. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2290.

Raza SS, Khan MM, Ashafaq M, Ahmad A, Khuwaja G, Khan A, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F: Silymarin protects neurons from oxidative stress associated damages in focal cerebral ischemia: a behavioral, biochemical and immunohistological study in Wistar rats. *J Neurol Sci.*, 309 (1-2):45-54, 2011. doi: 10.1016/j.jns.2011.07.035.

Razavi-Azarkhiavi K, Ali-Omrani M, Solgi R, Bagheri P, Haji-Noormohammadi M, Amani N, Sepand MR: Silymarin alleviates bleomycin-induced pulmonary toxicity and lipid peroxidation in mice. *Pharm Biol.*, 52 (10):1267-1271, 2014. doi: 10.3109/13880209.2014.889176.

Rezaie A, Fazlara A, Karamolah MH, Shahriari A, Zadeh HN, Pashmforosh M: Effects of *Echinacea purpurea* on Hepatic and Renal Toxicity Induced by Diethylnitrosamine in Rats. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*, 8 (2): 60–64, 2013.

Rodenhiser D, Mann M: Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ.*, 174 (3):341-348, 2006. doi: 10.1503/cmaj.050774.

Roncalli M, Terracciano L, Di Tommaso L, David E, Colombo M; Gruppo Italiano Patologia Apparato Digerente (GIPAD); Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica/International Academy of Pathology, Italian division (SIAPEC/IAP): Liver precancerous lesions and hepatocellular carcinoma: the histology report. *Dig Liver Dis.*, 43 (4):361-372, 2011. doi: 10.1016/S1590-8658(11)60592-6.

Rosai J: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 10th Edition, Volume 1, p. 942-980. Mosby Elsevier, Edinburgh, 2011.

Ross MH, Pawlina W: Histology A Text And Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology. 7th Edition, p. 626-639. Wolters Kluwer Health, Philadelphia, 2016.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB: DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene.*, 20 (24):3156-3165, 2001. doi: 10.1038/sj.onc.1204339.

Salama SM, Abdulla MA, AlRashdi AS, Hadi AHA: Mechanism of Hepatoprotective Effect of *Boesenbergia rotunda* in Thioacetamide-Induced Liver Damage in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. doi: 10.1155/2013/157456.

Saleem S, Shaharyar MA, Khusroo MJ, Ahmad P, Rahman RU, Ahmad K, Alam MJ, Al-Harbi NO, Iqbal M, Imam F: Anticancer potential of rhamnocitrin 4'-β-D-galactopyranoside against N-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol Cell Biochem.*, 384 (1-2):147-153, 2013. doi: 10.1007/s11010-013-1792-6.

Salomao M, McMillen E, Lefkowitz JH: Recent advances in the classification of hepatocellular carcinoma. *Diagnostic Histopathology*, 18 (1): 37-45, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpdhp.2011.12.001>.

Santos NP, Oliveira PA, Arantes-Rodrigues R, Faustino-Rocha AI, Colaço A, Lopes C, Gil da Costa RM: Cytokeratin 7/19 expression in N-diethylnitrosamine-induced mouse hepatocellular lesions: implications for histogenesis. *Int J Exp Pathol*, 95 (3):191-8, 2014. doi: 10.1111/iep.12082.

Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV: MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi / Dicle Medical Journal*, 38 (1): 113-120, 2011.

Sayılan Özgün G: Streptozotosin ile Diyabet Geliştirilmiş Sıçanlarda Nitrik Oksit Metabolizmasının İncelenmesi. Doktora Tezi. T.C. Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı, Edirne, 2013.

Sayılan Özgün G, Özgün E, Eskiocak S, Süt N: Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda L-karnitin nitrik oksit metabolizması üzerine etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*, 39(4):416–421, 2014. doi: 10.5505/tjb.2014.04934.

Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P: Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.*, 20 (43):15955–15964, 2014. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.15955.

Shaarawy SM, Tohamy AA, Elgendy SM, Elmageed ZY, Bahnasy A, Mohamed MS, Kandil E, Matrougui K: Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity. *Int J Biol Sci.*, 5 (6):549-557, 2009.

Shakeel F, Anwer MK: Dissolution thermodynamics and solubility of silymarin in PEG 400-water mixtures at different temperatures. *Drug Dev Ind Pharm.*, 41 (11):1819-1823, 2015. doi: 10.3109/03639045.2015.1009914.

Sherr CJ, McCormick F: The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.*, 2 (2):103-112, 2002. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00102-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00102-2).

Shilpa PN, Venkatabalasubramanian S, Devaraj SN: Ameliorative effect of methanol extract of *Rubia cordifolia* in N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma. *Pharm Biol.*, 50 (3):376-383, 2012. doi: 10.3109/13880209.2011.608073.

Shimizu M, Yasuda Y, Sakai H, Kubota M, Terakura D, Baba A, Ohno T, Kochi T, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H: Pitavastatin suppresses diethylnitrosamine-induced liver preneoplasms in male C57BL/KsJ-db/db obese mice. *BMC Cancer.*, 11:281, 2011. doi: 10.1186/1471-2407-11-281.

Shirakami Y, Gottesman ME, Blaner WS: Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis is suppressed in lecithin:retinol acyltransferase-deficient mice primarily through retinoid actions immediately after carcinogen administration. *Carcinogenesis*, vol. 33 (2) p. 268-74, 2012. doi: 10.1093/carcin/bgr275.

Shizuma T, Ishiwata K, Nagano M, Mori H, Fukuyama N: Protective effects of fermented rice vinegar sediment (Kurozu moromimatsu) in a diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma animal model. *J Clin Biochem Nutr.*, 49 (1):31-35, 2011. doi: 10.3164/jcbn.10-112.

Silva PR, Barbisan LF, Dagli ML, Saldiva PH: Sewage sludge does not induce genotoxicity and carcinogenesis. *Genet Mol Biol.*, 35 (3):657-663, 2012. doi: 10.1590/S1415-47572012005000054.

Sivaramakrishnan V, Niranjali Devaraj S: Morin regulates the expression of NF-kappaB-p65, COX-2 and matrix metalloproteinases in diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Chem Biol Interact.*, 180 (3):353-359, 2009. doi: 10.1016/j.cbi.2009.02.004.

Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R: Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology.*, 72 (5-6):397-402, 2007. doi: 10.1159/000113489.

Solakoğlu Z: Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni. *Klinik Gelişim, Cilt 22* (3):20-25, 2009.

Song Y, Jin SJ, Cui LH, Ji XJ, Yang FG: Immunomodulatory effect of *Stichopus japonicus* acid mucopolysaccharide on experimental hepatocellular carcinoma in rats. *Molecules.*, 18 (6):7179-7193, 2013. doi: 10.3390/molecules18067179.

Song S, Yuan P, Li P, Wu H, Lu J, Wei W: Dynamic analysis of tumor-associated immune cells in DEN-induced rat hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol.*, 22 (2):392-399, 2014. doi: 10.1016/j.intimp.2014.07.007.

Sozmen M, Devrim AK, Tunca R, Bayezit M, Dag S, Essiz D: Protective effects of silymarin on fumonisin B₁-induced hepatotoxicity in mice. *J Vet Sci.*, 15 (1):51-60, 2014. doi: 10.4142/jvs.2014.15.1.51.

Sreepriya M, Bali G: Chemopreventive effects of embelin and curcumin against N-nitrosodiethylamine/phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Fitoterapia.*, 76 (6):549-555, 2005. doi: 10.1016/j.fitote.2005.04.014.

Srigopalram S, Jayraaj IA, Kaleeswaran B, Balamurugan K, Ranjithkumar M, Kumar TS, Park JI, Nou IS: Ellagic acid normalizes mitochondrial outer membrane permeabilization and attenuates inflammation-mediated cell proliferation in experimental liver cancer. *Appl Biochem Biotechnol.*, 173 (8):2254-2266, 2014. doi: 10.1007/s12010-014-1031-y.

Stärkel P, De Saeger C, Delire B, Magat J, Jordan B, Konda VR, Tripp ML, Borbath I: Tetrahydro Iso-Alpha Acids and Hexahydro Iso-Alpha Acids from Hops Inhibit Proliferation of Human Hepatocarcinoma Cell Lines and Reduce Diethylnitrosamine Induced Liver Tumor Formation in Rats. *Nutr Cancer.*, 67 (5):748-760, 2015. doi: 10.1080/01635581.2015.1032429.

Subramaniyan J, Krishnan G, Balan R, Mgi D, Ramasamy E, Ramalingam S, Veerabathiran R, Thandavamoorthy P, Mani GK, Thiruvengadam D: Carvacrol modulates instability of xenobiotic metabolizing enzymes and downregulates the expressions of PCNA, MMP-2, and MMP-9 during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Mol Cell Biochem.*, 395 (1-2):65-76, 2014. doi: 10.1007/s11010-014-2112-5.

Suh HJ, Cho SY, Kim EY, Choi HS: Blockade of lipid accumulation by silibinin in adipocytes and zebrafish. *Chem Biol Interact.*, 227:53-62, 2015. doi: 10.1016/j.cbi.2014.12.027.

Surai PF: Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. *Antioxidants (Basel).*, 4 (1):204-247, 2015. doi: 10.3390/antiox4010204.

Suriawinata AA, Thung SN: *Liver Pathology An Atlas and Concise Guide*. 1st Edition, p.184-211. Demos Medical, New York, 2011.

Şahin F, Aras BD, Sayitoğlu MA: *Genetik Terimler Sözlüğü*. s. 26. Türk Hematoloji Derneği, İstanbul, 2013.

Şen A, Özkanlı Ş, Zemheri E, Yıldırım A, Turfanda E, Zenginkinet T: Radikal prostatektomi spesmenlerindeki MMP-2'nin, MMP-9'un ve TIMP 1'in immünohistokimyasal ekspresyonlarının prognostik değeri. *Göztepe Tıp Dergisi*, 29 (3):161-172, 2014. doi: 10.5222/J.GOZTEPETRH.2014.161.

Şen O, Kayaselçuk F, Zorludemir S, Aydın MV, Erdoğan B: Meningiomlarda Histopatolojik Tanının Flovositometrik DNA Analizi, PCNA ve Ki-67 ile Korelasyonu. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 12:48-53, 2002.

Taha MM, Abdul AB, Abdullah R, Ibrahim TA, Abdelwahab SI, Mohan S: Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and 2-acetylaminofluorene-promoted hepatocarcinogenesis by zerumbone from the rhizomes of the subtropical ginger (*Zingiber zerumbet*). *Chem Biol Interact.*, 186 (3):295-305, 2010. doi: 10.1016/j.cbi.2010.04.029.

Tan J, Hu J, He Y, Cui F: Protective role of silymarin in a mouse model of renal Ischemia-Reperfusion injury. *Diagn Pathol.*, 10:198, 2015. doi: 10.1186/s13000-015-0436-4.

Tanyolaç A: *Özel Histoloji*. s. 98-106. Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd Şti, Ankara, 1993.

Taş A: Hepatoselüler Karsinom Tanı ve Tedavisi. *Güncel Gastroenteroloji*, 14 (3):145-148, 2010.

Tayman C, Tonbul A, Kosus A, Hirfanoglu IM, Haltas H, Uysal S, Tatli MM, Andiran F: Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int.*, 27 (11):1179-1189, 2011. doi: 10.1007/s00383-011-2942-0.

Tekin N: Dietilnitrozamin ve Fenobarbital Uygulanan Ratlarda Dipyrido [3, 2-a:2', 3'- c] phenazine (dppz) Au (III) Kompleksinin Apoptotik proteinler ve Ubikuitin Sistem Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, T.C. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2013, Eskişehir.

Tekin N, Ustuner MC, Akyuz F, Ozbayer CS, Aydın O, Benkli K, Burukoglu D, Degirmenci I, Ozden H: Apoptotic effects of dipyrido [3,2-a:2',3'-c] phenazine (dppz) Au(III) complex against diethylnitrosamine/phenobarbital induced experimental hepatocarcinogenesis in rats. *Mol Biol Rep.*, 41 (8):5109-5121, 2014. doi: 10.1007/s11033-014-3376-2.

Telkoparan P, Tazebay UH: Ras Protein Ailesi: Hücresel İşlevi, Moleküler Kontrolü, Onkogenezdaki Rolü. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem]*, 36 (4):367-373, 2011.

Terzioğlu G, Keskin AÜ, Yanıkkaya Demirel G: Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Turk J Immunol*, 1 (3):74-89, 2013. doi: 10.5606/tji.2013.267.

Thumvijit T, Taya S, Punvittayagul C, Peerapornpisal Y, Wongpoomchai R: Cancer chemopreventive effect of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 15 (4):1611-1616, 2014. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.4.1611.

Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, Yoshizato K, Kawada N: Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am J Pathol.*, 179 (2):1050-1060, 2011. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.006.

Tomatır AG: Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin J Med Sci*, 23 (6):499-508, 2003.

Tozkoparan B, Aytaç SP: Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutasyon S-Transferazlar. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27 (2):139-164, 2007.

Tözün N: Karaciğer Kanseri. *Türk Patoloji Dergisi*, 5-2: 71-78, 1998.

Tunca R, Sozmen M, Cital M, Karapehlivan M, Erginsoy S, Yapar K: Pyridine induction of cytochrome P450 1A1, iNOS and metallothionein in Syrian hamsters and protective effects of silymarin. *Exp Toxicol Pathol.*, 61 (3):243-255, 2009. doi: 10.1016/j.etp.2008.05.011.

Tuncer AM, Özgül N, Olcayto E, Gültekin M: Türkiye'de Kanser Kontrolü. s. 35-51. T.C Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Ankara, 2009.

Turgut F, Bayrak O, Catal F, Bayrak R, Atmaca AF, Koc A, Akbas A, Akcay A, Unal D: Antioxidant and protective effects of silymarin on ischemia and reperfusion injury in the kidney tissues of rats. *Int Urol Nephrol.*, 40 (2):453-460, 2008. doi: 10.1007/s11255-008-9365-4.

Turp GY, Sucu Ç: Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit Kullanımına Potansiyel Alternatif Yöntemler. *CBÜ Fen Bil. Dergi.*, 12 (2):231-242, 2016.

Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevik U: Robbins Temel Patoloji. 9.Baskı, s. 164-214. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2013.

Türk Fizyolojik Bilimler Derneği: Fizyoloji. Beşinci Baskı, s. 585-593. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2008.

Tüzün S, Çakır M, Savaş OA, Tatar C: Hepatoselüler Karsinom-Karaciğer Rezeksiyonları. *Med Bull Haseki* 53: 1-9, 2015. doi: 10.4274/haseki.1999.

Uygun A, Polat Z: Viral Hepatit Dışı Serum Transaminaz Düzeyinde Artışa Neden Olan Hastalıklar. *Güncel Gastroenteroloji*, 13 (4), 211-224, 2009.

Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González A, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, García-Luna Y González-Rubio M, Gayosso-de-Lucio JA, Morales-González JA: Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol.*, 6 (3):144-149, 2014. doi: 10.4254/wjh.v6.i3.144.

Varoğlu H, İnan A, Kaptanoğlu E, Demirci S: Primer ve Metastatik Karaciğer Tümörlerinde Tedavi Yöntemleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, Cilt 50, Sayı 4, 1997.

Vásquez-Garzón VR, Macias-Pérez JR, Jiménez-García MN, Villegas V, Fattel-Fazenta S, Villa-Treviño S: The chemopreventive capacity of quercetin to induce programmed cell death in hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol.*, 41 (6):857-865, 2013. doi: 10.1177/0192623312467522.

Vera MC, Pisani GB, Biancardi ME, Bottai H, Alvarez Mde L, Quintana AB: Comparison of two chemical models to induce hepatic preneoplasia in male Wistar rats. *Ann Hepatol.*, 14 (2):259-266, 2015.

Verma PK, Raina R, Sultana M, Singh M, Kumar P: Acetaminophen Induced Oxidative and Histopathological Alterations in Hepatic Tissue: Protective Effects of *Alstonia Scholaris* Leaf Extracts. *Pharmacognosy Journal*, 8 (4), 385-391, 2016. doi:10.5530/pj.2016.4.12.

Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR: Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.*, 36 (3):165-175, 2003a. doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00267.x

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.*, 36 (3):131-149, 2003b. doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM: A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (7):2257-2261, 2006. doi: 10.1073/pnas.0510565103

Wang H, Yan T, Xie Y, Zhao M, Che Y, Zhang J, Liu H, Cao L, Cheng X, Xie Y, Li F, Qi Q, Wang G, Hao H: Mechanism-based inhibitory and peroxisome proliferator-activated receptor α -dependent modulating effects of silybin on principal hepatic drug-metabolizing enzymes. *Drug Metab Dispos.*, 43 (4):444-454, 2015. doi: 10.1124/dmd.114.061622.

Wang SC, Chai DS, Chen CB, Wang ZY, Wang L: HPIP promotes thyroid cancer cell growth, migration and EMT through activating PI3K/AKT signaling pathway. *Biomed Pharmacother.*, 75:33-39, 2015. doi: 10.1016/j.biopha.2015.08.027.

Wang X, Yang Z, Zhang H, Ding L, Li X, Zhu C, Zheng Y, Ye Q: The estrogen receptor-interacting protein HPIP increases estrogen-responsive gene expression through activation of MAPK and AKT. *Biochim Biophys Acta.*, 1783 (6):1220-1228, 2008. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.026.

Wang Y, Li M, Meng F, Lou G: HPIP expression predicts chemoresistance and poor clinical outcomes in patients with epithelial ovarian cancer. *Hum Pathol.*, 60:114-120, 2017. doi: 10.1016/j.humpath.2016.10.015.

Wang Y, Meng F, Liu Y, Chen X: Expression of HPIP in epithelial ovarian carcinoma: a clinicopathological study. *Onco Targets Ther.*, 10:95-100, 2017. doi: 10.2147/OTT.S114884.

Weinberg RA: Molecular Mechanisms of Carcinogenesis. In: Leder P, Clayton DA, Rubenstein E, eds. Introduction to Molecular Medicine. Scientific American, p. 253-276, New York, 1994.

Wu T, Liu W, Guo W, Zhu X: Silymarin suppressed lung cancer growth in mice via inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Biomed Pharmacother.*, 81:460-467, 2016. doi: 10.1016/j.biopha.2016.04.039.

Wu WY, Kim H, Zhang CL, Meng XL, Wu ZS: Loss of suppressors of cytokine signaling 3 promotes aggressiveness in hepatocellular carcinoma. *J Invest Surg.*, 27 (4):197-204, 2014. doi: 10.3109/08941939.2013.873098.

Xu X, Fan Z, Kang L, Han J, Jiang C, Zheng X, Zhu Z, Jiao H, Lin J, Jiang K, Ding L, Zhang H, Cheng L, Fu H, Song Y, Jiang Y, Liu J, Wang R, Du N, Ye Q: Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis. *J Clin Invest.*, 123 (2):630-645, 2013. doi: 10.1172/JCI64265.

Xu X, Jiang C, Wang S, Tai Y, Wang T, Kang L, Fan Z, Li S, Li L, Fu J, Liu J, Ji Q, Wang X, Wei L, Ye Q: HPIP is upregulated in liver cancer and promotes hepatoma cell proliferation via activation of G2/M transition. *IUBMB Life.*, 65 (10):873-882, 2013. doi: 10.1002/iub.1202.

Xu XM, Deng JJ, Yuan GJ, Yang F, Guo HT, Xiang M, Ge W, Wu YG: 5-Lipoxygenase contributes to the progression of hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.*, 4 (6):1195-1200, 2011. doi: 10.3892/mmr.2011.547.

Yaghmaei P, Azarfar K, Dezfulian M, Ebrahim-Habibi A: Silymarin effect on amyloid- β plaque accumulation and gene expression of APP in an Alzheimer's disease rat model. *Daru.*, 22(1):24, 2014. doi: 10.1186/2008-2231-22-24.

Yağcı R, Özyurt H, Akbaş A, Aydın B, Özlük E, Ekşioğlu M, Totan Y: Behçet Hastalığında Toplam Antioksidan Kapasite, Toplam Oksidan Durum ve Dehidroepiandrosteron Sülfat Düzeyleri. *Ret-Vit*, 15:263-266, 2007.

Yavuzer N: Karaciğerde İskemi Reperfüzyon ile İndüklenmiş Rejenerasyon Modelinde Kompleman İnhibitörünün Rolü. Uzmanlık Tezi. T.C. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara, 2008.

Yerlikaya P, Gökoğlu N: Gıdalarda Biyojen Aminler Ve Önemi. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, cilt.6, ss.24-30, 2002.

Yetim Çataroğlu E: Karsinogenezis. Bitirme Tezi, T.C. Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Patoloji Birimi, İzmir, 2008.

Yıldız S: *Dukes Veteriner Fizyoloji*. 12.Baskı, s. 340-521. Medipres Yayıncılık, Malatya, 2008.

Yılmaz E, Altunok V: Kanser ve p53 Geni. *AVKAE DERGİSİ*, 1:19-23, 2011.

Yılmaz Miroğlu Y, Dıraman E, Eren Z: Telomer ve Telomeraz. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4 (2):41-48, 2011.

Yokuş B, Ülker DÜ: Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1(2): 7-18, 2012.

Yousefi M, Ghaffari SH, Zekri A, Hassani S, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A: Silibinin induces apoptosis and inhibits proliferation of estrogen receptor (ER)-negative breast carcinoma cells through suppression of nuclear factor kappa B activation. *Arch Iran Med.*, 17 (5):366-371, 2014. doi: 10.141705/AIM.0011.

Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G: microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103 (24):9136-9141, 2006. doi: 10.1073/pnas.0508889103.

Zhang XL, Yu H, Xiong YY, Ma ST, Zhao L, She SF: Resveratrol Down-Regulates Myosin Light Chain Kinase, Induces Apoptosis and Inhibits Diethylnitrosamine-Induced Liver Tumorigenesis in Rats. *Int J Mol Sci.*, 14 (1): 1940–1951, 2013. doi: 10.3390/ijms14011940.

Zhao JA, Peng L, Geng CZ, Liu YP, Wang X, Yang HC, Wang SJ: Preventive effect of hydrazinocurcumin on carcinogenesis of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinoma in male SD rats. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 15 (5):2115-2221, 2014.

Zhao J, Zhang Y, Wan Y, Hu H, Hong Z: Pien Tze Huang Gan Bao attenuates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in rats, associated with suppression of p53 activation and oxidative stress. *Mol Med Rep.*, 16 (3):2611-2619, 2017. doi: 10.3892/mmr.2017.6936.

Zholobenko A, Modriansky M: Silymarin and its constituents in cardiac preconditioning. *Fitoterapia.*, 97:122-132, 2014. doi: 10.1016/j.fitote.2014.05.016.

Zúñiga-García V, Chávez-López Mde G, Quintanar-Jurado V, Gabiño-López NB, Hernández-Gallegos E, Soriano-Rosas J, Pérez-Carreón JI, Camacho J: Differential Expression of Ion Channels and Transporters During Hepatocellular Carcinoma Development. *Dig Dis Sci.*, 60 (8):2373-2383, 2015. doi: 10.1007/s10620-015-3633-9.

6. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Manisa'nın Turgutlu ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Turgutlu'da tamamladım. 2007 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazanarak 2012 yılında dönem üçüncüsü olarak mezun oldum. Aynı yıl Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın açmış olduğu Araştırma Görevliliği sınavını kazanarak göreve başladım. Şu anda aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.

