



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**RATLARDA DENEYSEL OLARAK DİETİLNİTROZAMİN İLE
İNDÜKLENEN HEPATOSELLÜLER KARSİNOGENEZİS
SÜRECİNDE *URTICA DIOİCA*'NİN ANTİTÜMÖR
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Ömer Faruk KELEŞ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Zabit YENER

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Zübeyir HUYUT

VAN-2020

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK DİETİLNİTROZAMİN İLE
İNDÜKLENEN HEPATOSELLÜLER KARSİNOGENEZİS
SÜRECİNDE *URTICA DIOİCA*'NİN ANTİTÜMÖR
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Ömer Faruk KELEŞ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Zabit YENER

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Zübeyir HUYUT
VAN-2020

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TDK-2020-8887 nolu proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında Araş. Gör. Vet. Hek. Omer Faruk KELEŞ tarafından hazırlanan “*Ratlarda Deneyisel Olarak Dietilnitrozamin ile İndüklenen Hepatosellüler Karsinogenezis Sürecinde Urtica Dioica’nin Antitümör Etkinliğinin Araştırılması*” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:2020

Prof. Dr. Zabit YENER
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ramazan BAL
Gaziantep Üniversitesi
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Özgür ÖZYİĞİT
Uludağ Üniversitesi
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Turan YAMAN
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Mevlüt ARSLAN
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Semiha DEDE
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Ratlarda Deneysel Olarak Dietilnitrozamin ile İndüklenen Hepatosellüler Karsinogenezis Sürecinde Urtica Dioica'nın Antitümör Etkinliğinin Araştırılması*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Tarih:2020

Öğrencinin Adı Soyadı

Vet. Hek.

Ömer Faruk KELEŞ

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden akademik hayatıma kadar tüm süreçlerimde, her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, bilimsel eğitimimin yanında her zaman beşerî eğitimime önem veren kıymetli danışman hocam ve Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Zabit YENER'e en samimi duygularıyla müteşekkirim. Tez çalışmalarım esnasında yardımını esirgemeyen ve biyokimyasal verileri titizlikle elde eden Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Zübeyir HUYUT'a teşekkürlerimi sunarım. Hem tez çalışmamda hem de akademik hayatımda her türlü desteğini gösteren Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Sayın Doç. Dr. Turan YAMAN'a, tezimde yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Yıldray BAŞBUĞAN'a, Sayın Öğr. Gör. Abdulbaki DEMİR'e, Sayın Araş. Gör. Kenan YILDIZHAN'a ve laboratuvar çalışmalarında desteklerinden dolayı Sayın Lab. Tek. Abdullah KATILDI'ya en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım. Çalışmama mali destek sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Her daim sevgiyle, saygıyla ve sabırla yanımda olan çok muteber aile bireylerime şükranlarımı sunuyorum.

Veteriner Hekim Ömer Faruk KELEŞ

ÖZET

Ayna E. Ratlarda Deneyisel Olarak Dietilnitrozamin ile İndüklenen Hepatosellüler Karsinogenezis Sürecinde *Urtica Dioica*'nin Antitümör Etkinliğinin Araştırılması. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Patoloji Anabilim Dalı, Veteriner Programı Doktora Tezi, Van, 2019.

Kanser, kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra en çok ölüme sebep olan bir hastalıktır. Karaciğerin primer malign tümörlerinin çok büyük bir kısmını hepatosellüler karsinom oluşturmaktadır. Dietilnitrozamin (DEN), genetik etkili kimyasal kansorejenlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. DEN; sigara dumanında, kürlenmiş ve kızartılmış yemeklerde, kozmetik ürünlerde, alkollü içkilerde, işlenmiş et ürünlerinde, tarımda kullanılan kimyasallarda, çeşitli endüstriyel ürünlerde bulunmaktadır. Nitrozaminler karaciğerde metabolize edilmektedir. Nitrozaminler karsinojenik, teratojenik, toksik ve mutajenik etkilere sahiptir. DEN, bilim dünyasında deney hayvanlarında karaciğer tümöründe indükleyici olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Günümüzde alternatif tıpta yaygın bir şekilde kullanılan ısırgan otunun birçok medikal (antikanserojen, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antitoksik, antioksidan, hepatoprotektif, antidiyabetik ve hipoglisemik) özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada ratlarda deneyisel olarak dietilnitrozamin ile indüklenen hepatosellüler karsinogenezis sürecinde *Urtica dioica* tohumu ekstraktının (UDTE) antitümör etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla; toplam 40 rat, her biri 8'erli 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubu; normal rat yemi, UDTE grubu; 1 ml/rat/orogastrik/UDT eter yağ ekstresi, DEN grubu; 200 mg DEN/kg/rat, DEN+UDTE-1 grubu; 200 mg DEN/kg/rat+50 ml/kg/ rat / orogastrik /UDTE (etil alkol ekstresi), DEN+UDTE-2 grubu; 200 mg DEN/kg/rat DEN+1 ml/rat/orogastrik/UDTE yağ eter yağ ekstresi aldı. 16 haftalık deneme sonunda nekropsileri yapılan ratlardan biyokimyasal ve histopatolojik analizler için örnekler alındı. Biyokimyasal olarak; DEN uygulaması AST, ALT ve LDH aktiviteleri ile TOS ve MDA düzeylerini artırırken, TAS, GSH, CAT, SOD ve GSH-Px düzeylerini ise azaltmıştır. Ancak DEN ile birlikte UDTE kullanımının antioksidan kapasiteyi artırdığı ve oksidatif stresi baskıladığı, karaciğer harabiyetini önlediği gözlenmiştir. Diğer taraftan DEN uygulamasının, tümör markırlarından özellikle CA 15-3, CA 19-9 ve CA 125-II aktivitelerini ve apoptotik faktörlerden özellikle kaspaz 3 seviyelerini önemli ölçüde artırdığı, DEN ile birlikte UDTE kullanımının ise bu artışları azalttığı saptanmıştır. Patolojik olarak DEN grubunda karaciğerde ince granüler bir görünüm; histopatolojik olarak ise hepatositlerde yaygın olarak büyük ve küçük hücre değişimleri ile karakterize displaziler ile dejenerasyon, safra kanalı hiperplazisi, yangısal hücre infiltrasyonları, fibrozis ve kolestazis gözlemlendi. DEN+UDTE gruplarında bu morfolojik değişikliklerden büyük hücre değişimlerinin, kistik dejenere hepatositlerin ve fibrozisin oluşmadığı, diğerlerinin ise hafif düzeylerde kaldığı gözlemlendi. Bu bulgulara göre; dietilnitrozamin ile indüklenen hepatosellüler karsinogenezis sürecinde UDTE ekstraktı, güçlü antioksidan kapasitesi sayesinde doku hasarını engelleyerek çok belirgin düzeyde antitümör etkinliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Rat, Dietilnitrozamin, *Urtica Dioica*, Histopatoloji, İmmunohistokimya, Biyokimya.

ABSTRACT

AYNA, A. Investigation of Antitumor Efficacy of *Urtica Dioica* in Experimentally Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Carcinogenesis Process in Rats. Van Yuzuncu Yil University, Health Sciences Institute, Department of Pathology, Ph. D Thesis, Van, 2020. Cancer is a disease that causes the most death after the cardiovascular system diseases. A large part of the primary malignant tumors of the liver are hepatocellular carcinoma. Diethylnitrosamine (DEN) constitutes a large part of genetically effective chemical carcinogens. DEN is found in cigarette smoke, cured and fried foods, cosmetic products, alcoholic beverages, processed meat products, chemicals used in agriculture, various industrial products. Nitrosamines are metabolized in the liver. Its have carcinogenic, teratogenic, toxic and mutagenic effects. DEN is widely used in the scientific world as an inducer in liver tumor in experimental animals. It is known that nettle, which is widely used in alternative medicine today, has many medicinal (anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial, antitoxic, antioxidant, hepatoprotective, antidiabetic and hypoglycemic) properties. In this study, the antitumor activity of *Urtica dioica* was investigated in the process of hepatocellular carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in rats. For this purpose; 40 rats in total were divided into 5 groups of 8 each. The control group was fed with normal rat food. UDSE group received of 1 ml / rat / orogastric / UDSE ether oil extract. DEN group received of 200 mg DEN / kg / rat. DEN + UDSE-1 group received of 200 mg DEN/ kg / rat + 50 ml / kg / orogastric / rat / UDSE ethil alcohol extract. DEN + UDS-2 group received of 200 mg DEN / kg / rat + 1 ml / rat / orogastric / UDSE ether oil extract. At the end of the 16-week trial, samples for biochemical and histopathological analysis were taken from in rats undergoing necropsy. Biochemically; DEN application increased TOS and MDA levels, and AST, ALT and LDH activities, while decreasing TAS, GSH, CAT, SOD and GSH-Px levels. However, it has been observed that the use of UDS together with DEN increased antioxidant capacity and suppresses oxidative stress and prevents liver damage. On the other hand, it has been determined that DEN administration significantly increased CA 15-3, CA 19-9 and CA 125-II activities, especially caspase 3 levels from tumor markers, and the use of UDSE together with DEN decreased these increases. Pathologically, In the DEN group, there was a fine granular appearance on the surface of the livers. Histopathologically, the dysplasias in the form of large and small cell changes were commonly observed in hepatocytes. Additionally, bile duct hyperplasia, inflammatory cell infiltrations, fibrosis and cholestasis were seen. In the groups UDSE-treated with DEN, dyspalastic large cell changes, cystic hepatocytes and fibrosis were not observed, while the other findings were determined at mild levels. According to these results; in the process of hepatocellular carcinogenesis induced by diethylnitrosamine, it was concluded that UDS extract has a very significant antitumor activity by preventing tissue damage thanks to its strong antioxidant capacity.

Keywords: Rat, Diethylnitrosamine, *Urtica Dioica*, Histopatology, immunohistochemistry, Biochemistry

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ETİK BEYAN	III
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
TABLolar LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer	3
2.1.1. Karaciğerin anatomisi	3
2.1.2. Karaciğerin histolojisi	4
2.1.3. Karaciğerin görevleri	6
2.1.4. Karaciğer fonksiyon testlerinin değerlendirilmesi	8
2.1.5. Karaciğerin rejenerasyonu	8
2.2. Neoplazi (Tümör)	9
2.2.1. Karsinogenezis	10
2.2.2. Apoptoz kanser ilişkisi	11
2.2.3. Karaciğerin primer malign tümörleri (karaciğer kanseri)	12
2.3. Nitrozaminler ve Dietilnitrozamin	13
2.4.1. Dietilnitrozamin ile Yapılan Deneysel Hepatokarsinogenezis Çalışmaları	16
2.4. Isırgan Otu (<i>Urtica dioica</i>)	20
2.4.1. <i>U. dioica</i> L.'nin biyolojik ve morfolojik özellikleri	20
2.4.2. <i>U. dioica</i> L.'nin kimyasal bileşimi ve etkileri	21
2.4.3. <i>Urtica dioica</i> 'nın farmakolojik etkileri	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Deney Hayvanları	26
3.1.1. Gruplandırma ve uygulama programı	26

3.1.2. Deneyin sonlandırılması ve örneklerin alınması	27
3.2. Bitki Materyali	27
3.3. Biyokimyasal Analizler	28
3.3.1. Kimyasallar.....	28
3.3.2. Biyokimya tüplerine alınan kandan serum örneklerinin ayrılması	28
3.3.3. Karaciğer örneklerinden lizat temini	28
3.3.4. Rutin biyokimya parametrelerinin ölçümü	28
3.3.5. Apoptoz, oksidatif stres ve antioksidan parametrelerin ölçümü	29
3.3.6. Yüksek basınçlı likid kromatografisi (HPLC) yöntemi ile MDA ölçümü	29
3.4. Histopatolojik İnceleme.....	29
3.5. İmmunohistokimyasal İnceleme	30
3.6. İstatiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR.....	32
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	32
4.2. Canlı Ağırlık Sonuçları	39
4.3 Makroskobik Bulgular.....	40
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	44
4.4.1. Grup A (Kontrol).	44
4.4.2. Grup B (DEN).	44
4.4.3. Grup C (UDTE).	45
4.4.4. Grup D (DEN+UDTE-1).	45
4.4.5. Grup E (DEN+UDTE-2).	45
4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular	52
4.5.1. Hepatosit spesifik antijen (HSA).	52
4.5.2. Alfa fetoprotein (AFP).	55
4.5.3. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz.	59
4.5.4. Kaspaz-3.	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	67
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	98
EKLER	99
Ek 1. Kesin Sonuç Raporu	99
Ek 2. Tez Orijinallik Raporu	100

SİMGELER VE KISALTMALAR

DEN	: Dietilnitrozamin
CA 15-3	: Karbohidrat antijen 15-3
CA 19-9	: Karbohidrat antijen 19-9
CA 125-	: Karbohidrat antijen 125-II
AFP	: Alfa fetö protein
CEA	: Karsino embriyonik antijen
LDH	: Laktat dehidrogenaz
HSA	: Hepatosit Spesifik Antijen
ALT	: Alanin transferaz
AST	: Aspartat transferaz
ASMA	: Alpha-smooth muscle actin
GGT	: Gama glutamil transferaz
GSH-px	: Glutatasyon peroksidaz
GST	: Glutatasyon-S-transferaz
GR	: Glutatasyon reduktaz
HE	: Hematoksilen-eozin
MDA	: Malondialdehit
TAS	: Total antioksidan statü
TOS	: Total oksidatif stres
CAT	: Katalaz
UDT	<i>Urtica dioica</i> tohumu
UDSE	: <i>Urtica dioica</i> seed ekstraktı- Isırgan otu tohumu ekstraktı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Karaciğerin şematik lobül yapısı	5
Şekil 2.	<i>U. dioica</i> türüne ait bitkinin çiçek ve tohumlu görünümü.	14
Şekil 3.	Karaciğer fonksiyon testlerine ait ortalama ve standart sapma değerlerinin toplu olarak karşılaştırılması	32
Şekil 4.	Serum kanser ve apoptoz markırlarına ait ortalama ve standart sapma değerlerinin karşılaştırılması.	33
Şekil 5.	Serum örneklerinde antioksidant kapasite, oksidatif stres, bazı antioksidan enzim ve protein seviyeleri ile lipid peroksidasyonu seviyelerine ait ortalama ve standart sapma değerlerinin toplu olarak karşılaştırılması.	35
Şekil 6.	Karaciğer dokusunda apoptoz ve bazı oksidant/antioksidant parametrelere ait ortalama ve standart sapma değerlerinin toplu olarak karşılaştırılması.	37
Şekil 7.	Gruplar arası canlı ağırlık ortalaması.	38
Şekil 8.	Kontrol grubu: Karaciğerin normal görünümü izlenmekte.	39
Şekil 9.	DEN Grubu: Karaciğerde kısmen büyüme, kenarlarında kütleşme, daha koyu renk ve yüzeyinde ince granüler bir görünüm izlenmekte. ...	35 40
Şekil 10.	DEN+UDTE-1 grubu: Karaciğer çoğunlukla normal görünmekle birlikte bazı bölgelerinde DEN grubundakine benzer, fakat hafif ince granüler bir yüzey (*) izlenmekte.	41
Şekil 11.	Kontrol grubu: Karaciğerin normal histolojik görünümü. H&E. Bar; 100 µm.	44
Şekil 12.	Kontrol grubu: Karaciğerin normal histolojik görünümü. H&E. Bar; 100 µm.	44
Şekil 13.	DEN grubu: Vena sentralisler (VS) çevresindeki hepatositlerde displastik küçük hücre değişimleri izlenmekte. H&E. Bar; 100µm.	45
Şekil 14.	DEN grubu: Vena sentralis çevresindeki hepatositlerde displastik küçük hücre (oklar) değişimleri, periğortal bölgelerde ise normal hepatositler (*) izlenmekte. H&E. Bar; 50µm.	45

Şekil 15.	DEN grubu: Hepatositlerde (oklar) displastik küçük hücre (oklar) ve megakaryositik büyük hücre değişimleri, dejenere-nekrotik (*) ve hiyalinize dejenere-nekrotik (oklar) hepatositler izlenmekte. H&E. Bar; 50µm.	46
Şekil 16.	DEN grubu: Karaciğer parnkiminde çok sayıda hepatositleri kapsayan hidropik dejenerasyon odağı (oklar). H&E. Bar; 50µm.	46
Şekil 17	DEN grubu: Karaciğer yüzeyindeki kapsüler çöküntü (ok) bölgesinden vena sentralise kadar uzanan hafif fibrozis, mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde dejenerasyon (*). H&E. Bar; 100µm.	47
Şekil 18.	DEN grubu: Karaciğerde vena sentralisler (VS) çevresinde fibrozis, kolestazis, mononükleer hücre infiltrasyonu, kistik dejenere hepatositler (*), hiyalin cisimciği (ok) ve farklı aşamalarındaki dejenere nekrotik hepatositler (ok başları). H&E. Bar; 50µm.	47
Şekil 19	DEN grubu: Karaciğerde portal bölgede yeni proliferatif safra kanalları, portal ven çevresinde gevşek bağ doku artışı (fibrozis), kolestazis (ok başı), az sayıda eozinofil lökositler de içeren yangısal hücre infiltrasyonu. H&E. Bar; 100µm.	48
Şekil 20	Vena sentralis çevresindeki hepatositlerde displastik küçük hücre (oklar) değişimleri, periportal bölgede ise normal hepatositler (*) ve az sayıdaki hepatositleri kapsayan dejenerasyon odağı (kalın oklar arası alan) izlenmekte. H&E. Bar; 50µm.	48
Şekil 21.	DEN+UDTE-2 grubu: Vena sentralis çevresindeki hepatositlerde displastik küçük hücre değişimleri, periportal bölgede normal hepatositler (*) ve az sayıdaki hepatositleri kapsayan dejenerasyon odağı (oklar arası alan) izlenmekte. H&E. Bar; 100µm.	49

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Karaciğer fonksiyon testleri ait ortalama ve standart sapma değerleri. .	31
Tablo 2.	Serum kanser ve apoptoz markırlarına ait ortalama ve standart sapma değerleri.	33
Tablo 3.	Serum örneklerinde antioksidant kapasite, oksidatif stres, bazı antioksidan enzim ve protein seviyeleri ile lipid peroksidasyonu seviyelerine ait ortalama ve standart sapma değerleri.	34
Tablo 4.	Karaciğer dokusunda apoptoz ve bazı oksidant/antioksidant parametrelere ait ortalama ve standart sapma değerleri.	36
Tablo 5.	Gruplar arası canlı ağırlık ortalaması	38
Tablo 6.	Karaciğerde gözlenen lezyonlar ve bunların karşılaştırılması.	49

1. GİRİŞ

Kanser, dünyada ve ülkemizde kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra en çok ölüme sebep olan bir hastalıktır. Dünyada ölümlerin 5'te 1'i kanser ilişkilidir (Tuncer ve ark., 2009). Dünya Sağlık Örgütü'nün açıklamasına göre kansere yakalanan ve en az beş yıl tedavi olan yaklaşık 33 milyon kişi bulunmaktadır. En çok rastlanılan kanser türleri sırasıyla akciğer kanseri, meme kanseri, kolon kanseri ve karaciğer kanseridir. En çok ölüme sebep olan kanser türleri ise sırasıyla akciğer, kolon, karaciğer ve mide kanseri olduğu kaydedilmektedir. Bu verilerin ışığında yapılan tahminlere göre önümüzdeki yıllarda dünya geneli yıllık yaklaşık 20 milyon insanın kansere yakalanma riski olduğu bildirilmiştir (www.losev.org.tr).

Karaciğerin primer malign tümörlerinin çok büyük bir kısmını hepatosellüler karsinom (HSK) ile intrahepatik kolangiyosellüler karsinom oluşturmaktadır. Her yıl dünyada 800.000 civarı yeni HSK vakası teşhis edilmektedir (Tuncer ve ark., 2009). Mortalite oranı çok yüksek olan HSK erkeklerde kadınlara kıyasla daha fazla görülmektedir. HSK; özellikle hepatit B ve C enfeksiyonlarının yoğun olduğu bölgelerde (Batı ve Güney Afrika, Uzak Doğu) daha fazla görülmektedir (Bosch ve ark., 2004). HSK'nın oluşumunda aflatoksin B1, hepatit B ve C enfeksiyonları, alkol, phenobarbital, 2-asetilaminofloran, thioacetamide ve nitrozaminler etkili olduğu bilinmektedir (Rostkowska ve ark., 1998; Thirunavukkarasu ve Sakthisekaran, 2001).

Dietilnitrozamin, N-Nitrozodialkilamin yapısında olup insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen kansorejen bir kimyasaldır (Paula ve ark., 2014). Dietilnitrozamin; sigara dumanında, kürlenmiş ve kızartılmış yemeklerde, kozmetik ürünlerde, insektisitlerde, alkollü içkilerde, işlenmiş et ürünlerinde, tarımda kullanılan kimyasallarda, çedar peynirinde, yüksek miktarda nitrat içeren yeraltı sularında ve kauçuk- elyaf gibi endüstriyel ürünlerde bulunmaktadır (Akyuz ve ark., 2001; Rezaie ve ark., 2013; Patial ve ark., 2015).

Dünyada insanlar, hayvanlar ve bitkiler muntazam bir denge içindedirler. İnsanların hizmetine sunulmuş bitkiler, insanlığın varoluşundan beri ciddi bir öneme sahiptir. Yapılan birçok arkeolojik çalışmalar sonucunda insanların sağlık sorunları ile

bitkiler arasındaki ilişkinin önemi vurgulanmıştır (Lewin, 2000; Heinrich ve ark., 2004; Koçyiğit, 2005).

Modern tıbbın temelini oluşturan bitkiler; geçmişte ve günümüzde insanlık için birçok hastalıkta koruma ve tedavi amacıyla kullanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre; dünyada sağlık sorunlarında tedavi maksatlı bitkisel drogları kullanan 4 milyara yakın insan olduğu bildirilmiştir. Günümüzde tıbbi ve aromatik bitkilerin hastalıklarda kullanılması çok ciddi oranda artarak bu durum ile ilgili çok sayıda bilimsel çalışmalar mevcuttur (Farnsworth ve ark., 1985; Kumar, 2009).

Dünyada medikal maksatlı kullanılan binlerce bitki türlerinden biri de ısırgan otu (*Urtica dioica*)'dur. Ülkemizde ve dünyada alternatif tıpta yaygın bir kullanım alanına sahip olan ısırgan otunun birçok tıbbi özelliği (antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antitoksik, antioksidan, hepatoprotektif, antidiyabetik ve hipoglisemik) yapılan bilimsel çalışmalarda ortaya konulmuştur (Gülçin ve ark., 2004). Bu çalışmada ratlarda deneysel olarak dietilnitrozamin ile indüklenen hepatosellüler karsinogenezis sürecinde *Urtica dioica*'nin antitümör etkinliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Karaciğer

2.1.1. Karaciğerin anatomisi

Karaciğer, insan vücudunun deriden sonra en büyük organıdır. Vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Erişkin bir insanda ortalama 1200-1600 gr ağırlığındadır (Dere, 1994; John, 2001).

Çok önemli fonksiyonlara sahip olan karaciğer, embriyolojik süreçte *mesenterium ventrale* (periton, karın zarı) ile karın duvarına yapışık durumdadır (Unur ve ark., 2002). Abdominal boşluğun büyük oranda üst sağ ve kısmen de üst sol kısmında bulunan karaciğer, Glisson kapsülü (kapsula fibroza) olarak adlandırılan periton ile örtülüdür (Kuran, 1983). Fakat Glisson kapsülü, vena kava inferior'un diyafram ile kesiştiği bölgede, hepatik venler ve safra kesesi yatağında bulunmamaktadır, yani bu alanlar periton ile örtülü değildir (Moore, 1992; D'Angelica ve Fong, 2004). Hem ekzokrin hem de endokrin olarak çalışan karaciğerin, diyaframatik (diyafram ile komşu) ve viseral (hepatik fleksura, safra kesesi, mide, özofagus, transversus kolon, duodenum ile komşu) olmak üzere 2 yüzü vardır (Dere, 1994; Blumgart ve Fong, 2000; Emre, 2002; Yıldırım, 2004).

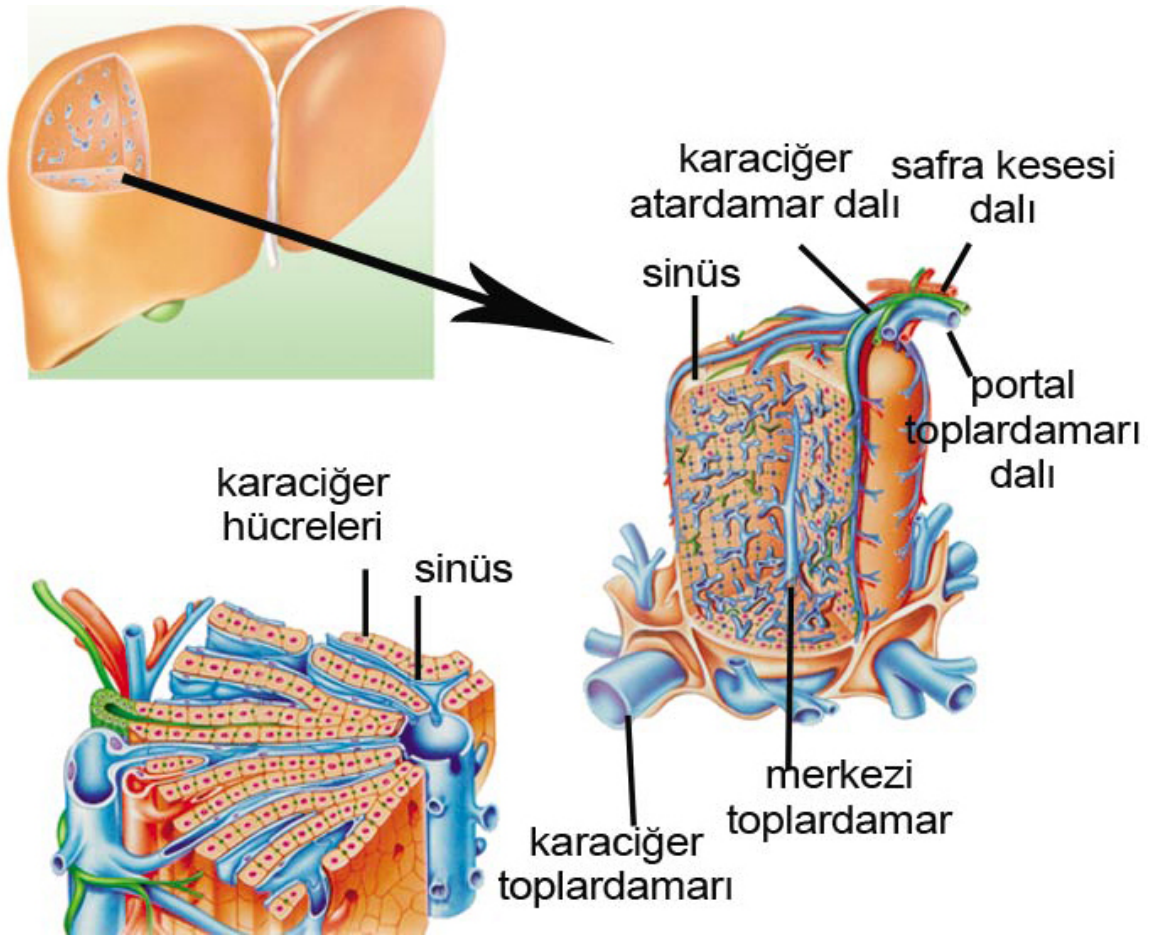
Vücudun en büyük bezi olan karaciğerde, kan akımı volümünün yaklaşık %75-80'nını portal ven, %25-30'unu ise hepatik arter sağlanmaktadır (Orrego ve ark., 1987). Sağ ve sol olmak üzere ikiye ayrılan portal ven; gastrointestinal sistemden, dalaktan ve pankreastan toplanan venöz kanı karaciğere getiren damardır. Portal ven; splenik ven, süperior ve inferior mezenterik venin pankreasın arkasında birleşmesi ile oluşmaktadır. Hepatik arter; *arteria hepatica communis*'in karaciğere gelen kısmıdır. Karaciğerin besleyici damarıdır. Sağ ve sol olmak üzere ikiye ayrılarak karaciğerin segmentlerine göre dallanma gösterir. Portal ven ve hepatik arterlerdeki kan akımı sinüzoidlerden terminal hepatik venüle doğrudur (Nakamura ve Tsuzuki, 1981; Bookstein, 1982). Karaciğere gelen portal ven ve hepatik arter, karaciğerden çıkarken birleşerek vena hepatica'yı oluştururlar. Hepatik venlerdeki kan akımı sağ atriuma doğru devam etmektedir (Ratych ve Smith, 1996; Feliciano ve ark., 2000).

2.1.2. Karaciğerin histolojisi

Karaciğer parankimi; hepatositler, biliyer epitelyum hücreleri ve Kupffer hücrelerinden oluşmaktadır. Karaciğerin fonksiyonel ve yapısal ünitesi üç farklı lobüller halindedir. Bunlar; klasik hepatik lopçuk, portal lopçuk ve portal asinusü olarak adlandırılır (Roose ve ark., 1995; Ratych ve Smith, 1996; Abraham ve Kierszen, 2006).

Klasik hepatik lobül: Merkezinde sentral ven'in (terminal hepatik venül) bulunduğu hekzagonal şekilli lopçuklardan oluşan birimlere klasik karaciğer lopçuğu denir. İnsan ve bazı hayvan türlerinde, bağ dokunun az olması nedeniyle, lopçukların hekzagonal yapısını ayırt etmek zordur (Aytekin, 1993). Karaciğerdeki toplam hücrelerin %80'inini oluşturan hepatositler, bir veya iki nukleolus içeren yuvarlak nükleuslu ve düşük mitotik aktiviteye sahip olup karaciğerin temel yapı elemanıdır. Hepatositler, vena santralisten periferine doğru kordonlar oluştururlar. Hepatositlerin yaptıkları bu radyer dizilere Remark kordonları denir. Remark kordonlarının arasında kapillerlerin oluşturduğu alanlar, sinüzoid olarak adlandırılmaktadır (Ranek ve ark., 1975; Ross ve ark., 1995; Junqueira ve Carneiro, 2003; Abraham ve Kierszen, 2006). Portal ven ve hepatik arterden sinüzoidlere doğru ilerleyen kan santral ven'e dökülür. Sinüzoidlerde endotel hücrelerinin lümene bakan kısmında Kupffer hücreleri denilen karaciğerin makrofajları bulunmaktadır. Kupffer hücrelerinin; immün sistemdeki bazı proteinleri salgılamak, hemoglobini ve yaşlı eritrositleri yakalayarak metabolize etmek gibi görevleri vardır (Burtis ve Ashwood, 1999; Junqueira ve Carneiro, 2003). Sinüzoidlerdeki endotel hücreleri ile hepatositler arasındaki boşluğa Disse aralığı (perisinuzoidal aralık) denir. Bu aralıktaki mikrovilluslar aracılığı ile kan, hepatositlere daha kolay şekilde ulaşır (Aytekin ve Solakoğlu, 2006; Özer, 2008; Ross ve Pawlina, 2016). Disse aralığında, sitoplazmasında bol miktarda yağ bulunan ve yıldız şekilli olan hücreler bulunmaktadır. Bu hücrelere "Stellat (Ito) hücreleri" denir. Ito hücreleri dışarıdan alınan A vitaminini, lipid damlalarında retinil esterler halinde depolarlar. Ayrıca *Disse* aralıklarında yer alan *Ito* hücreleri, karaciğerdeki kronik parankim hücre kayıpları sonrasında oluşan fibrozis gelişme sürecinde miyofibroblastik değişime uğrayarak proliferer olur ve kollajen üretirler. *Ito* hücreleri bu özellikleri nedeniyle, karaciğer fibrozisin oluşumunda önemli rolleri vardır (Burtis ve Ashwood, 1999; Junqueira ve Carneiro, 2003).

Portal lobül: Birbirine komşu klasik hepatik lopçukların arasındaki alan “portal triad” olarak adlandırılır. Bu alanda vena porta, arteria hepatica ve duktus biliferus yer almaktadır. Bu üçlü yapıya Glisson üçgeni veya Kiernan aralığı denilmektedir. Portal lobül modelinde Glisson üçgeni (Kiernan aralığı) merkez olarak kabul edilir. Bu merkezin çevresindeki üç klasik karaciğer lopçuğunun sentral venlerinin birleştirilmesi ile oluşan üçgen alana portal lopçuk denir. Portal lopçukta safra akış yönü periferden merkeze doğrudur. Fakat kan akımı safra akışının zıt yönündedir (Aytekin, 1993; Eroscheno, 2000; Bataller ve Brenner, 2005; Krause, 2005; Özer, 2008).



Şekil 1. Karaciğerin şematik lobül yapısı Anonim, 1).

Karaciğer asinüsü: Karaciğer asinüsü; iki komşu klasik lopçuk arasındaki alanda, aynı vena porta ve hepatik arter ile kanlanan hepatosit gruplarını tanımlar. Bu lobül baklava dilimi veya elipsoid şeklindedir (Maxie, 2016). Karaciğer asinüsü 3 zona ayrılır. Damarlara en yakın hücrelerin bulunduğu alana “periferik zon” (1. bölge) denir. Bu alandaki hücreler; sinuzoidlerden gelen kandaki oksijenden, toksinlerden, besinlerden ve safra kanalı tıkanmalarından ilk etkilenen hücrelerdir (Özer, 2008; Ross ve Pawlina, 2016). Periasiner zon (3. bölge)’daki hepatositler, kanın pozitif/negatif etkilerine en son maruz kalırlar. Bu alandaki hepatositlerde, iskemik nekroz ve yağlanma erken gözlemlenir (Ross ve ark., 1995; Abraham ve Kierszen, 2006). Mid zonal (2. bölge)’daki hepatositlerin kandan etkilenmeleri, periferik zon ile periasiner zon’daki hücelere göre orta dereceli olur. Loplara bu şekilde zonlara ayrılması hastalık durumlarında, hepatositlerin etkilenmesine bakılarak patogeneze üzerine daha anlamlı yorumlar yapılmasını sağlamaktadır (Carnerio ve Kelley, 1998; Eroschenko, 2008; Özer, 2008; Eşrefoğlu, 2009; Ross ve Pawlina, 2016).

2.1.3. Karaciğerin görevleri

Karaciğer, vücutta metabolik faaliyetlerin merkezi konumunda olan ve hem ekzokrin hem de endokrin olarak çalışan hayati bir organdır (Karaöz, 2002; Eroschenko, 2008; Maxie, 2016). Karaciğerin belirlenebilen 400 civarında görevinin olduğu bilinmektedir. Bunlardan başlıcaları şunlardır;

Protein sentezi: Gama globülinler hariç albümin, fibrinojen ve protrombin gibi proteinler başta olmak üzere hemen hemen çoğu protein karaciğerde sentezlenir (Çavuşoğlu ve Yeğen, 2007; Güzel, 2007; Noyan, 2011).

Karbonhidrat metabolizması: Karaciğer, kanda fazla bulunan glikozu alıp glikojen şeklinde depo ederek ve gerektiğinde tekrar glikoza çevirip (glikojenoliz) kana vererek, kan glikoz düzeyini kontrol altında tutmaktadır (Güzel, 2007). Ayrıca, vücut dışarıdan alınan früktoz, galaktoz ve mannoz gibi karbonhidratların glikoza dönüştürülmesini (glikoneogenez) gerçekleştirir (Burroughs ve Westaby, 2005).

Lipit metabolizması: Karaciğer, karbonhidrat ve proteinlerden yağ sentezinin yapıldığı önemli bir organdır. Karaciğerde özellikle fosfolipit, kolesterol ve lipoprotein

sentezi yapılmaktadır. Sentezlenen yağlar lipoprotein aracılığı ile yağ dokusuna taşınmaktadır (Ross ve Pawlina, 2016). Diğer taraftan yağ asitlerinin oksidasyonu ile enerji ihtiyacı sağlanmaktadır (Güzel, 2007).

Safra sentezi ve salgılanması: Hepatositlerde üretilen safra çözeltisinde; safra asitleri, safra boyası, kolesterol, fosfolipidler, proteinler ve elektrolitler bulunmaktadır. Yetişkin insanlarda günde salınan safra miktarı yaklaşık 600 ile 1000 ml'dir. Hepatositlerin kandaki maddelerden sentezlediği safra kanaliküllere aktarılır. Sonra safra kesesine gelerek duktus koledokus aracılığı ile duodenuma akıtılır (Ross ve Pawlina, 2016). Safra; ince bağırsaklardan yağların ve vitaminlerin emiliminde önemli bir rol oynar (Redinger, 2003; Trauner ve Boyer, 2003).

Detoksifikasyon: Vücuda alınan çeşitli toksik maddeler, hormonlar ve ilaçlar karaciğerde metabolize edilerek detoksifikasyona uğrarlar. Bu maddelerin çoğu suda çözünemediği için karaciğerde oksidasyon (faz 1) ve konjugasyon (faz 2) reaksiyonları ile suda çözünür forma dönüştürülür, sonra safra ve idrar yoluyla vücuttan uzaklaştırılır (Çapan ve Yalçın, 2010; Ross ve Pawlina, 2016).

İmmunolojik fonksiyonu: Karaciğer, bağırsaklardan portal venler aracılığı ile gelen birçok bakteriye maruz kalmaktadır. Bu bakteriler sinüzoidlerdeki makrofajlar (Kupffer hücreleri) tarafından fagosite edilmektedir (Burroughs ve Westaby, 2005; Güzel, 2007).

Karaciğerin diğer bazı fonksiyonları: Kanın pıhtılaşmasında etkin rol oynayan protrombin, fibrinojen, globülin, faktör V, VII, IX ve X gibi faktörlerin sentezi de karaciğerde üretilen K vitamini ile mümkün olmaktadır (Güzel, 2007). Ayrıca, karaciğerde en fazla A vitamini, D ve B12 vitaminleri depo edilmektedir (Çavuşoğlu ve Yeğen, 2007). Demir, vücutta hemoglobin dışında karaciğerde ferritin şeklinde depolanır. Karaciğerde bulunan apoferritin (protein), demirle az ya da çok miktarlarda birleşebilmektedir. Demir, vücut sıvılarında arttığı zaman apoferritinle birleşerek ferritini oluşturmaktadır. Ferritin gerektiğinde kullanılmak üzere karaciğerde depolanır (Guyton ve Hall, 2006). Karaciğer fetal hayatta eritrosit üretiminde (eritropoiezis) ciddi bir rol almaktadır (Yıldız, 2008; Noyan, 2011). Ayrıca lenf üretiminde de önemli bir yere sahiptir (Maxie, 2016).

2.1.4. Karaciğer fonksiyon testlerinin değerlendirilmesi

Alanin aminotransferaz (ALT): Alanin aminotransferaz enzimi pirüvik asit ile glutamik asit arasındaki reaksiyonu katalize eder (Gözükara, 1989; Mert, 1996; Keha ve Küfrevioğlu, 2010). ALT karaciğerde bol miktarda bulunan bir enzimdir. Karaciğer hasarlarında ALT seviyesi yükselmektedir (Goldie ve McConnell, 1990; Bizzaro ve ark., 1992).

Aspartat aminotransferaz (AST): Karaciğer, iskelet ve kalp kasında yoğun olarak bulunmaktadır (Gözükara, 1989; Keha ve Küfrevioğlu, 2010). Karaciğer hastalıklarında AST düzeyinde artış meydana gelmektedir (Lawrence ve ark., 1996; Henry, 2001).

Alkalen fosfataz (ALP): Karaciğer (hepatositlerin kanaliküler yüzünde), kemik (osteoblastlarda), böbrek (proksimal tübülde), ileal mukaza ve plasentada yüksek düzeyde bulunan bir enzimdir. Karaciğer hastalıklarında serumdaki miktarında artış olmaktadır (Moss, 1997).

Gama glutamiltransferaz (GGT): Böbrek (renal proksimal tubuluslarda), karaciğer, prostat, dalak, pankreasta, kemik iliği hücreleri ve ince bağırsaklar gibi birçok organda bulunan bir enzimdir. Kolestazda, GGT miktarında artış meydana gelmektedir (Price ve Alberti, 1979).

Laktat dehidrogenaz (LDH): Sitoplazmik bir enzim olup karaciğer hasarlarında aktivitesi artmaktadır (Gerdes ve ark., 1983; Bomhard ve ark., 1990).

Serum proteinleri: Albumin, globulin, fibrinojen ve pıhtılaşma faktörlerinin büyük kısmı karaciğerde üretilmektedir. Albümin üretimi, karaciğerin kronik hastalık durumlarında azalmaktadır. Sirozda ise albümin düzeyinde azalma gözlenirken, globülin düzeyinde artış görülmektedir (Musaoğlu, 1997; Abdullah, 2007).

2.1.5. Karaciğerin rejenerasyonu

Vücutta harabiyete uğramış doku ve hücrelerin yerine, aynı fonksiyonu gösteren ve aynı morfolojik yapıda olan yeni doku ve hücrelerin oluşturulmasına rejenerasyon denilmektedir (Kocatürk, 1991). Karaciğer normal boyutlarına ulaştığında büyümesi

durmaktadır, normal şartlar altında hepatositlerde çok nadir mitoz görülmektedir (Ethier, 1990). Karaciğerin çok ciddi bir rejenerasyon yeteneği vardır. Karaciğer dokusunun cerrahi yol ile bir kısmının alınması veya karaciğer dokusunu dejenerasyona/nekroza uğratacak herhangi bir hastalık (toksik olaylar, siroz, bakteriyel ve viral hepatitis) durumlarında, karaciğer hızlı bir rejenerasyon yeteneği gösterebilmektedir (Hardell, 1993).

Rejenerasyon olayı tam manasıyla aydınlatılamamıştır. Fakat Chalon olarak adlandırılan maddelerle kontrol edildiği düşünülmektedir. Chalon'lar bazı hücrelerde mitozu inhibe ederler. Doku hasarında, dokudaki mevcut Chalon'ların miktarı azalır. Sonrasında dokuda mitotik aktivite artar. Rejenerasyon sürecinde Chalon'ların miktarı zamanla artar ve mitoz azalarak dengede kalır (Ranek ve ark., 1975). Yapılan bir araştırmada, karaciğerde rezeksiyon sonrasında erişkinlerde 3-6 ayda, çocuklarda ise 3 aya kadar normal boyutuna ulaştığı tespit edilmiştir (Nagasue ve ark., 1987).

Karaciğerin rejenerasyonunu artıran faktörler: Tümör nekroz faktörü- α , interlökin-6 (TNF- α ve IL-6), hepatosit büyüme faktörü (HGF), transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α), norepinefrin, hepatosit uyarıcı madde (HSS), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin ve östrojen (Noguchi ve ark., 1991; Van ve ark., 1991; Michalopoulos ve Zarnegar 1992; Francavilla ve ark., 1993; Hashimoto ve ark., 1993; Michalopoulos ve DeFrances, 1997). Ayrıca fibroblast büyüme faktörü, büyüme hormonu, vazopressin, vasküler endotel büyüme faktörü, retinoik asit gibi bazı faktörlerin de rejenerasyonu artırdığı bildirilmiştir (Ekberg ve ark., 1992; Tsujii ve ark., 1993). Karaciğer rejenerasyonunu, transforming büyüme faktörü- β 1 ve interlökin-1 faktörleri inhibe etmektedir (Goss ve ark., 1993; Hopf ve ark., 1994).

2.2. Neoplazi (Tümör)

Tümör (neoplazi); organizmadaki hücrelerden herhangi birinin otonomi kazanmasıyla birlikte kontrolsüz biçimde bölünmesi ve sınırsız çoğalması sonucu oluşan yeni doku oluşumlarıdır.

2.2.1. Karsinogenezis

Kanseri oluşturan etkenlere karsinojen (kanserojen) denir. Bir hücrenin kanserleşmesi sürecinde geçirdiği aşamalara ise karsinogenezis denilmektedir (Erer ve Kıran, 2009). Karsinogenezis çok aşamalı bir süreçtir, ancak temelinde ölümcül olmayan genetik hasarlar (mutasyonlar) yatmaktadır. Karsinogenezis sürecinde, hücrede çok sayıda genetik değişikliklerin (mutasyonlar) meydana geldiği ve buna bağlı olarak da fenotipik transformasyonların olduğu bilinmektedir. Diğer bir ifadeyle, organizmada normal hücreler kanserojen etkenlere maruz kalınca mutasyona uğrarlar ve fenotipik değişiklikler kazanırlar. Kanserlerin çoğu, öncü lezyonlardan gelişmektedir, bu lezyonlarda kanserin gelişebilmesi için ihtiyaç duyulan mutasyonların (genetik hasarın) bazılarının bulunduğu bilinmektedir (Kumar ve ark., 2017).

Tümörlerin oluşumunda 3 basamaklı karsinogenez modeli kabul edilmektedir. Bunlar;

İnisiyasyon: Bir karsinojenin hücrede DNA hasarı oluşturmak suretiyle meydana getirdiği irreverzibl ve hızlı gelişen bir bozukluktur. İnisiyasyonda hedef hücrede mutasyon meydana gelir. İnisiye olan hücreye progenitör denir. Bu evrede kalıcı DNA hasarı oluşmaktadır. Tek başına inisiyatör verildiğinde tümör oluşmaz (Schulte ve ark., 1994; Oliviera ve ark., 2007; Klauning ve ark., 2010; Klaunig ve ark., 2011).

Promosyon: Karsinogenez özelliği az veya çok az olan kimyasal maddelerin bazı ajanlarla artırılması olayına promosyon denir. Bu ajanlar promotör (kokarsinogenz) olarak adlandırılır. Promotörler DNA’da değişiklik yapmadan, hücrede proliferasyonu indükler. Proliferatif lezyonların malign özellikte olması için, promotör sürekli ve belli bir süreç içerisinde verilmelidir. Promosyon yavaş gelişir ve reverzibl bir süreçtir. Promotörler doğrudan DNA’yı etkilemedikleri için inisiyatörlerden önce verilmesi kansere neden olmazlar. İnisiyatör verildikten belli bir süre sonra promotörün belli aralıklarla verilmesi tümör ile sonuçlanır (Oliviera ve ark., 2007; Erer ve Kıran, 2009; Klauning ve ark., 2010; Klaunig ve ark., 2011).

Progresyon: Bu evrede inisiye edilmiş veya promosyona uğramış bir hücre, preneoplastik dönemden malign karakterde bir hücreye dönüşmesi gerçekleşmektedir. Bu

basamak ile bening karakterde bir tümör hücresi malign özellik kazanabilir. Progresyon evresi irreverzib bir değişikliktir. Ayrıca progresyon evrede, inisiyasyon evresine göre daha şiddetli genetik bozukluk meydana gelir (Oliviera ve ark., 2007; Erer ve Kıran, 2009; Klauning ve ark., 2010; Klaunig ve ark., 2011).

2.2.2. Apoptoz kanser ilişkisi

Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak artık gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan, genetik olarak kontrol edilen bir olaydır (Öktem ve ark., 2001). Bazı genler (bim, bad, bid, bax, bak, p53, BCL-XS) apoptozisi artırırken, bazıları da (bcl-2, bcl-XL, MCL-1) azaltmaktadır (Kumar ve ark., 2017).

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik bir süreçtir. Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynar (Cooper, 1994). Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir. Apoptozis, mitozisden 20 kat daha hızlı gerçekleşmektedir. Mitozis (yapım) ve apoptozis (yıkım) dokuda sürekli bir denge halindedir (Öztürk, 2002). Örneğin, kemik iliğinden devamlı olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir (Cooper, 1994).

Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (Perkins ve Stern, 1997).

Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürler. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozisdir. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptozis ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz

patolojik bir olaydır. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir (Thompson, 1999).

Malign karakterdeki hastalıklar (kanser), klasik olarak kontrolsüz hücre artışının olduğu hastalıklar olarak bilinmektedir. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen, dolayısıyla beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında biriktirdikleri mutasyonların etkisiyle malign hücrelere dönüşürler. Kansere neden olan bazı virüsler, enfekte ettikleri hücrelerde fizyolojik apoptozisi engeller. Bu şekilde davranan iki tip Human papilloma virüsünün (HPV) serviks kanseri (rahim ağzı kanseri) oluşturdukları saptanmıştır. HPV virüslerinden biri E6 adında protein üreterek apoptozisi başlatan p53'e bağlanır ve apoptozisi inaktive eder. Bazı kanser türlerinde ise apoptozisin aktive olmasını sağlayan proteinleri etkileyerek apoptozis oluşumunu engellerler (lenfomada olduğu gibi). Kanser hücreleri virüsler olmadan da apoptozisi engelleyebilir (B hücre lösemisi). Akciğer kanserinde ise p53 geni mutasyona uğramış veya kayıp olduğu, pek çok hastada gözlenmiştir (Schuler ve Gren, 2001).

2.2.3. Karaciğerin primer malign tümörleri (karaciğer kanseri)

Karaciğerin primer malign tümörlerinin hemen tamamına yakınına hepatosellüler karsinom ile intrahepatik kolangiyosellüler karsinom oluşturmaktadır. Ancak en sık gözlenen malign tümörleri metastatik olanlardır. Kanseri; dünyada ölüm sebepleri arasında kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sıradadır. Her 5 ölümden biri kanser ile ilişkilidir (Tuncer ve ark., 2009). Dünyada en fazla görülen malign tümörlerden biri olan karaciğer kanseri, ölüm ile sonuçlanan kanserler arasında akciğer ve kolon kanserinden sonra 3. sıradadır (Parkin ve ark., 2005; Glauert ve ark., 2010).

Hepatosellüler karsinom (HSK): Karaciğerde en sık gözlenen (%70-85) ve hepatositlerden köken alan primer malign tümördür (Shirakami ve ark., 2012). Dünyada her yıl yaklaşık 800.000 yeni HSK teşhisi yapılmaktadır (Tuncer ve ark., 2009). HSK'nın en yaygın risk faktörleri; Hepatit B ve C viral enfeksiyonları, postnekrotik sirozlar, kronik alkol tüketimi, sigara kullanımı, diabetes mellitus, aflatoksinlere maruziyet, Wilson hastalığı, obezite, herediter hemakromatozis ve nitrozaminler grubu kimyasallardır (Bruix ve Sherman, 2005; Lau ve Lai, 2008; Bishayee ve ark., 2010; Ferrell ve Kakar,

2011). İnsanlarda HSK'ların %70-85'i viral hepatitlerle (Hepatit B ve C virüs enfeksiyonları) ilişkilidir. HSK'ların çoğunluğunda siroz ve kronik hepatitin bulunduğu, ancak kanser gelişmesi için siroz oluşmasının şart olmadığı kaydedilmektedir. Söz konusu çeşitli risk faktörlerine maruziyet sonucunda karaciğerde oluşan kronik inflamasyon ve nekroz, fibrozis ve sirozla sonuçlanabilmektedir. Bu süreçlerde karaciğerde rejenerasyon çabaları da görülmektedir, bu tekrarlayan rejenerasyonlar sürecinde hepatositler sürekli hücre dışı uyarımlara maruz kalırlar ve hücrelerin DNA'sında hasar meydana gelir. Bunun sonucunda hepatositlerde ya apoptoz şekillenir ya da proliferasyon olarak neoplaziye dönüşürler (Kumar ve ark., 2017). HSK'nın oluşumunda hepatositlerde erken gözlenen genetik değişikliğin, beta katenin aktivasyonu ve p53 inaktivasyonu olduğu vurgulanmaktadır. HSK'nın histolojik prekürsörlerinin ise, büyük ve küçük hücre değişimleri şeklinde gözlenen hücresel displaziler ile düşük ve yüksek dereceli olabilen displastik nodüllerin olduğu kaydedilmektedir. Klinik olarak hastalığın tanısında ve takibinde alfa fetoprotein (AFP)'inin çok önemli bir tümör belirteci olduğu, ancak çok spesifik olmadığı belirtilmektedir (Kumar ve ark., 2017).

HSK'da malignite gösteren hücreler; lenf damarlarıyla, kan damarlarıyla, implantasyon, kontakt ve kanaliküler metastaz yolu ile diğer doku ve organlara ulaşarak yayılabilirler (Hanahan ve Weinberg, 2000; Erer ve Kıran, 2009). Karaciğer kanserlerinde en fazla metastaz; akciğer, kolon, pankreas, meme ve mide de görülmektedir (Sica ve ark., 2000). Hepatosellüler karsinom, genelde kötü prognoza sahiptir ve kemoterapiye dirençlidir (Riaz ve ark., 2009). Ayrıca HSK, kadınlara nazaran erkeklerde görülme oranı (2-8 kat) daha fazladır (Bosch ve ark., 2004).

2.3. Nitrozaminler ve Dietilnitrozamin

Nitrozaminler, nitrozo bileşiklerden olup karsinogenik, teratojenik, toksik ve mutajenik etkilere sahiptir. Bu etkileriyle insanlarda ve hayvanlarda tümör oluşumuna sebep olabilmektedirler (Atalay, 1989). Nitrozo bileşikler; gıda maddelerinde, ilaçlar, kozmetik ürünleri ve pestisitlerde çok fazla bulunan genetik etkili kimyasal kansorejenlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadırlar. Bu bileşikler nitrit veya nitrat'tan üretilmektedir. Ya da bu bileşiklere (nitrit veya nitratlara) maruz kalan insan ve hayvan

vücudundaki organlarda tersiyer aminler tarafından üretilmektedir (IARC, 1978; Bartsch ve Spiegelhandler, 1996).

Nitrozaminin ilk oluşum yeri ağızdır. Tükürük salgısı bol miktarda nitrat ihtiva eder ve bu nitrat, nitrat redüktaz enzimi ile nitrite indirgenir. Oluşan nitrit, nitrozamin oluşumuna neden olur. Tükürük salgısının içerdiği nitrit ve nitrat miktarı alınan gıdalara bağlı olarak değişmektedir. Nitrozaminler genellikle vücuttan idrar ile atılmaktadır (Hall ve ark., 1987; Levallois ve ark., 2000). Oral yol ile alınan nitrozaminler, sindirim kanalından emilerek yarım saatte kana geçmektedirler. Bir defada alınan dozun %70'i ilk sekiz saatte, geri kalanı da 24 saat içinde vücuttan atılır. Nitrozaminler karaciğerde metabolize olurlar. Metabolize olan ürünlerin %40-65'i CO₂'e dönüşerek solunum yoluyla, %7'si de idrarla değişmeksizin atılır ve geri kalan kısmı dokulara dağılır (Dağoğlu ve ark., 1995).

Nitrozaminler; gıdalar, beslenme malzemeleri, ilaçlar, kozmetik ürünler, kauçuk ürünler, pestisitler, lateks ürünler, sigara ve sigara dumanında bulunurlar. Vücuda solunum, sindirim ve deri yolu ile girerler (Rostkowska ve ark., 1998; Kujawska ve ark., 2011; Subramaniyan ve ark., 2014; Atakişi ve Merhan, 2017). Gıdalarla ve sigara kullanımıyla vücuda alınabilmelerine ilaveten midenin asidik durumlarında (özellikle 2,0-3,4 pH aralığında) nitrit ve aminlerin reaksiyonu ile mide de oluşabilirler. Ayrıca vücuda alınan nitratın, gastrointestinal sistemdeki bazı bakteriler tarafından nitrite dönüştürülmesiyle de nitrozaminler meydana gelebilmektedir (Walters ve Smith, 1981; Hinuma ve ark., 1990; Bartsch ve Spiegelhandler, 1996).

Gıda maddelerinin kızartma, dumanlama ve kavurma gibi ısı işlemlere maruz kalması, nitrozaminler gibi bazı kanserojen maddelerin oluşumuyla sonuçlanabilmektedir. Bu da insan sağlığını olumsuz şekilde etkilemektedir (Byun ve ark., 2004; Yurchenko ve Molder, 2006). Bazı mikroorganizmalar gıdalarda, nitratı nitrite dönüştürerek veya proteinlerin yapısına zarar vererek nitrozaminlerin oluşumuna neden olmaktadır (Rostkowska ve ark., 1998). Ayrıca gıda maddelerinin depolanmasında, hazırlanmasında ve ambalajında kullanılan bazı plastik malzemelerin nitrozamin oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Rywotycki, 2007; Feng ve ark., 2009).

Nitrozaminler; N-Nitrozamidler ve N-Nitrozodialkilaminler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Dietilnitrozamin (DEN), N-Nitrozodialkilamin yapısında olup insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen kansorejen bir kimyasaldır (Paula Santos ve ark., 2014). N-Nitrozodietilamin olarak da bilenen DEN; yapısında karbon, amid ve üreaz bulunan, moleküler formülü: $(C_2H_5)_2NNO$, kaynama noktası: 177°C, molekül ağırlığı: 102,14 g/mol ve yoğunluğu: 0,95 g/ml olan hepatotoksik ve hepatokarsinojen bir bileşiktir (Pradeep ve ark., 2007, Ramakrishnan ve ark., 2009). DEN; sigara dumanında, kürlenmiş ve kızartılmış yemeklerde, kozmetik ürünlerde, insektisitlerde, alkollü içkilerde, işlenmiş et ürünlerinde, tarımda kullanılan kimyasallarda, çedar peynirinde, yüksek miktarda nitrat içeren yeraltı sularında ve kauçuk- elyaf gibi endüstriyel ürünlerde bulunmaktadır. Ayrıca, besinlerde bulunan nitratın midede sekonder ve tersiyer aminlerle birleşmesi ve bazı ilaçların karaciğerde metabolizasyonu sonucunda da oluşabilmektedir (Akyuz ve ark., 2001; Rezaie ve ark., 2013, Patial ve ark., 2015).

Nitrozo bileşiğindeki karbon (C) atomu, sitokrom P-450'ye bağlanarak hidroksillenir ve α -hidroksinitrozamin oluşur. C-N (karbon-azot) bağının kopmasıyla oluşan alkildiazo hidroksitin parçalanmasıyla elektrofilik alkildiazonyum iyonu meydana gelir. Bu iyon, hücrelerin nükleofilik bölgelerinde reaksiyona girerek tümörün meydana gelmesinde önemli olan ürünleri oluşturmaktadır (Mallik ve ark., 1981; Hecht, 1999). Nitrozaminlerden oluşan nitrozoüre, hücrelerin DNA'sındaki baz yapılarını bozarak mutasyonlara sebep olmakta ve böylece tümör oluşum riskini yükseltmektedir (karsinogenezis mekanizması) (Farombi ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda; nitrozaminler genelde karaciğerde metabolize oldukları için, başta karaciğer olmak üzere böbrek, akciğer, pankreas, özefagus, idrar kesesi, beyin, mide ve dilde kanser oluşumuna neden olabilecekleri bildirilmiştir (Magee, 1971; Lijinsky, 1990; Sasazuki ve ark., 2002).

DEN; karaciğerde hepatositlerde sitokrom P-450 izoenzimleri tarafından hidroksile edilmekte ve alkilasyon mekanizmasıyla aktif hale gelmektedir. Bu aktivasyon sonucunda bazı radikaller (etil radikali gibi) oluşmaktadır. Bu radikaller karsinogenez sürecinin stimülatörleridir (Janani ve ark., 2010). Biyoaktif durumdaki DEN, DNA ile etkileşime girerek O4- ile O6-etil deoksi timidin ve O6-etil deoksi guanozin gibi promutajenik ürünler oluştururlar. Bu ara ürünler, DNA baz yapılarından etilasyona sebep olarak mutasyonlara, p53 gibi tümör süpresör genlerin inhibisyonuna ve proto-

onkogenlerin aktivasyonuna sebep olabilir. Dolayısıyla bu reaksiyonlar sonucunda DNA’da zincir kırıkları, depürinasyon, hasar ve kodlayıcı gen dizilerinde bozulmalar meydana gelmektedir. Bu durum genellikle hepatosellüler karsinoma ile sonuçlanmaktadır (Matsuda ve ark., 2005; Janani ve ark., 2010). Ayrıca DEN; reaktif oksijen türlerini (ROT) artırmasıyla oksidatif stres ve hücre hasarına da neden olabilmektedir. ROT üretimi, DEN’in karsinojenik etkilerinden ileri geldiği bildirilmiştir (Shaarawy ve ark., 2009). ROT’un hücre içi miktarlarında artış olması hücrede; DNA hasarı, protein karbonilasyonu, mitokondriyal hasar ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit ve 4-hidroksinonenal gibi toksik ürünler DNA’ya zarar vererek mutajenite ve karsinojeniteyi tetiklemektedir. Bu durumlar kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığa sebep olabilmektedir (Kang ve ark., 2007; Babu ve ark., 2012; Ali ve ark., 2014).

DEN ile reaksiyona giren hücrelerde inflamatuvar yanıt olarak sitokin ve büyüme faktörü gibi mediyatörler salgılanır. Bunlar mutasyona maruz kalmış hücrelerde proliferasyona neden olur. Ayrıca yeni hücrelerin genetik değişimlerin transmisyonunu sağlar. Bu süreç sonunda hücrelerde kromozom anomalileri, displazi, aplazi, neoplastik progresyon gibi bir dizi olaylar meydana gelerek kanser oluşabilmektedir (Yamada ve ark., 2006; Kang ve ark., 2007).

DEN, bilim dünyasında deney hayvanlarında karaciğer tümöründe indükleyici olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Thirunavukkarasu ve Sakthisekaran, 2001; Vendemiaie ve ark., 2001; Wood ve ark., 2001; Waddell, 2003; Finnberg ve ark., 2004; Arora ve Shukla, 2005).

2.3.1. Dietilnitrozamin (DEN) ile yapılan deneysel hepatotoksisite ve hepatokarsinogenezis çalışmaları

DEN’nin toksisitesi ve karsinogenezisi hakkında, rat ve farelerde çok sayıda deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda aşağıda görüleceği gibi uygulanan süre ve doza bağlı olarak karaciğerlerde farklı lezyonlar kaydedilmiştir.

DEN, ratlara tek doz olarak 200 mg/kg/ip verilmiş, 2 hafta sonra da her gün sularına phenobarbital katılmıştır. 24 haftalık deneme sonunda nekropsi yapılan ratların

karaciğer doku örneklerinde histopatolojik olarak; hepatositlerde makroveziküler yağlanma, hidropik dejenerasyon, multifokal nekroz, berrak hücre odakları ve karyositomegali, Kupffer hücrelerinde hiperplazi, sinüzoidlerde dilatasyon ve sinüzoidlerin kavernöz genişlemesi (angiektazi), parankimde lenfositik ve eozinofilik hücre infiltrasyonlarından oluşan granülomlar, safra kanallarında hiperplazi ve periportal bölgelerde hücresel infiltrasyon saptanmıştır. Yapılan immunohistokimyasal boyamada da hepatositlerde PCNA'nın pozitif olduğu tespit edilmiştir (Usama ve ark., 2015).

DEN, ratlara tek doz olarak 200 mg/kg/ip verilmiş, 2 hafta sonra da 6 hafta boyunca her gün sularına tiyoasetamid (TAA) katılarak yapılan 8 haftalık çalışma sonunda nekropsi yapılan ratların karaciğer doku örneklerinde histopatolojik olarak; hepatositlerde apoptozisde artış, hepatosit çekirdeklerinde hiperkromazi ve sinüzoidlerde dilatasyon kaydedilmiştir. Yapılan immunohistokimyasal boyamada da hepatositlerde PCNA'nın pozitif olduğu tespit edilmiştir (Yuta ve ark., 2013).

DEN, ratlara tek doz olarak 200 mg/kg/ip verilmiştir. 2 hafta sonra da haftada iki kez 3 hafta boyunca TAA 200 mg/kg/ip uygulaması yapılan 5 haftalık çalışma sonunda, makroskopik olarak karaciğerde nodüler yapılar görülmüştür. Histopatolojik olarak ise hepatosellüler adenom, trabeküler görünümü ile karakterize hepatosellüler karsinom ve kolanjiyosellüler karsinom tespit edilmiştir (Guilherme ve ark., 2017).

DEN, 14 günlük ratlara tek doz olarak 25 mg/kg/ip verilmiştir. 4 hafta sonra da 24 hafta boyunca her gün sularına TAA 300 mg/L katılarak uygulanan 7 aylık çalışma sonrasında nekropside alınan karaciğer doku örneklerinde histopatolojik olarak; hepatositlerde steatozis, parankimde fibrozis ve yangısal hücre infiltrasyonu gözlenmiştir (James ve ark., 2018).

İki haftalık farelere 5 mg/kg/ip DEN uygulamasından 44 hafta sonra yapılan nekropsilerde makroskopik olarak; hepatosellüler adenom ve iyi diferansiye hepatosellüler karsinom ile karakterize multiple tümör odakları tespit edilmiştir (Xi ve ark., 2015).

Sıçanlara 50 mg/kg/ip dozunda DEN enjeksiyonundan 8 hafta sonra alınan karaciğer doku örneklerinde histopatolojik olarak; hafif derecede inflamasyon, lökosit infiltrasyonu ve hepatosit rejenerasyonu fibrozis tespit edilmiştir. 11. haftada ise bu bulguların şiddetli hali görülmüştür (Rajeev ve ark., 2018).

Ratlara 28 gün boyunca her gün 8 mg/kg/ip dozunda DEN uygulaması ile birlikte sularına fenobarbital katılmıştır. Deneme sonunda alınan karaciğer doku örneklerinde histopatolojik olarak; hepatositlerde ve Kupffer hücrelerinde dejenerasyon ve tümör anaplastik hücreleri gözlenmiştir (Pranesh ve ark., 2017).

Ratlara tek doz 200 mg/kg/ip DEN verildikten 2 hafta sonra, sularına fenobarbital katılmıştır. 27 haftalık deneme sonunda alınan karaciğer doku örneklerinde histopatolojik olarak; hepatoselüler adenom ve hepatoselüler karsinom görüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca hepatositlerde dejeneratif değişiklikler, portal alanlarda az sayıda mononükleer ve eozinofilik hücre infiltrasyonu ve safra kanalı hiperplazisi, beyaz hücreler, spongiosis hepatis ve peliosis hepatis gözlenmiştir (Hala ve ark., 2017).

Ratlara oral yolla 5ml/kg dozunda 0.3% DEN 12 hafta boyunca günlük uygulanmıştır. Deneme sonunda alınan karaciğer doku örneklerinde histopatolojik olarak; 9 ratta toplam 33 adet sirotik nodül, 17 adet ise hepatoselüler karsinom nodülü tespit edilmiştir (Jie ve ark., 2010).

4 haftalık ratlara 3 hafta, haftada bir kez 38 mg/kg DEN (i.p.) enjeksiyonundan sonra, 3 hafta daha 50 mg/kg DEN (i.p.) enjeksiyonu yapılmıştır. 6 haftalık deneme sonunda alınan karaciğer doku örneklerinde histopatolojik olarak; normal parankim ile çevrili hepatositik nekroz odakları görülürken, 10. haftada hepatositik hasarın merkezi bölgelerinde artış, 18. haftada ise bulanık hepatosit ana hatları, nükleoller ve sinüzoidal dilatasyonlar tespit edilmiştir (Kaiser ve ark., 2015).

Ratlara 150 mg/kg dozunda DEN (i.p.) verilmiştir. 1 ay sonra alınan karaciğer doku örneklerinde histopatolojik olarak; hepatositlerde sitoplazmik vakuolizasyon, parankimde yangısal hücre infiltrasyonu ile ilişkili fokal hepatik nekroz odakları, portal damarlarda konjesyon ve fokal hemorajik alanlar gözlenmiştir (Abdelgawad ve ark., 2019).

Ratlara 150 mg/kg dozunda DEN (i.p.) verilmiştir. 8 haftalık deneme sonunda alınan karaciğer doku örneklerinde histopatolojik olarak; hepatositlerde yaygın çift çekirdekli görünüm, hafif konjesyon, periportal alanda yangısal hücre infiltrasyonu ve sinüzoidal dilatasyon tespit edilmiştir (Özeren, 2018).

Erkek ve dişi ratlara tek doz 200 mg/kg DEN ip olarak verildikten 2 gün sonra yapılan nekropside, erkek sıçanlardan alınan karaciğer doku örneklerinde histopatolojik

olarak; sentral ven çevresinden başlayarak, midzonal alanlara ve hatta portal alanlara kadar uzanan geniş odaklar halinde parankim nekrozu; nötrofil, lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu ile birlikte ödem ve kanamalar görülmüştür. Çevredeki ve tanımlanan alan içindeki hepatositlerde vakuoler dejenerasyon, sitoplazmalarının bulanık görünümü ve şişkin oldukları tespit edilmiştir. Dişi sıçanların histopatolojik incelemesinde ise hepatositlerdeki nekrozun erkeklere oranla daha az olduğu, nekrozun çoğunlukla periasiner bölgelerde sınırlı kaldığı, portal alanların ise tamamen sağlam kaldığı kaydedilmiştir (Bingöl, 2011).

Ratlara 175 mg/kg dozunda DEN (i.p.) verildikten 2 hafta sonra, içme sularına Fenobarbital katılmış ve 11 haftalık deneme sonunda, nekropside karaciğerde makroskopik olarak nodüler yapılar saptanmış, histopatolojik olarak ise hepatositlerde dejenerasyon, nekroz, parankimde yangısal hücre infiltrasyonu ve proneoplastik odaklar gözlenmiştir (Tekin, 2013).

Ratlara DEN 100 mg/kg dozunda haftada 1 kez olmak üzere 3 hafta verilmiştir, 1 hafta sonra da haftada iki kez 2 ml/kg dozunda 8 hafta CCl₄ uygulaması yapılmıştır. Deneme sonunda makroskopik olarak diffuz, multi nodüler ve masiv lezyonlar tespit edilmiştir (Anindita ve ark., 2018).

Ratlara 175 mg/kg dozunda DEN (i.p.) verildikten sonraki 7., 8. ve 9. günlerde, 20 mg/kg dozunda 2-AAF (2-Acetylaminofluorene) uygulanmıştır. 5 haftalık deneme sonunda karaciğerde histopatolojik olarak; hepatositlerde orta şiddetli karyomegali ve dejenerasyon, parankimde yangısal hücre infiltrasyonu ve preneoplastik odaklar gözlenmiştir (Üstüner, 2006).

Ratlara 50 mg/kg dozunda DEN haftada bir kez olmak üzere 20 hafta boyunca intra peritoneal olarak uygulanmıştır. Makroskopik olarak; karaciğerlerin yüzeyinde 3-4mm çapında multifokal gri-sarı renkli ve yumuşak kıvamda nodüller ile yer yer de kanama alanları tespit edilmiştir. Mikroskopik olarak; iyi diferansiye, küboidal, hatta kolumnar şekilli hepatositlerden oluşan tümör hücre odakları gözlenmiştir. Tümöral hepatositlerin sitoplazmasının eozinofilik, çekirdeklerini büyük, hiperkromatik, yuvarlak ya da oval, bir kısmının atipik olduğu gözlenmiştir. Çekirdekçiklerin ise eozinofilik, çoğunlukla tek ve belirgin, ancak bazen çok sayıda olduğu gözlenmiştir. Tümör hücrelerinin çoğunlukla trabeküler ve asiner yapılar oluşturduğu kaydedilmiştir.

Trabeküler yapıların; endotel hücreli sinüzoidal boşluklarla ayrılan 3-10 hücre kalınlığında hepatositlerden oluştuğu, asiner yapıların ise psödoglandlardan oluştuğu belirtilmiştir. Ayrıca parankimde etrafı fibröz kapsülle çevrili ve içi kanla dolu olan geniş alanlar görülmüştür. Safra duktus proliferasyonu, perisinüzoidal, portal ve periasiner alanlarda hafif bağ doku artışı, hepatositlerde; makro-mikroveziküler yağ dejenerasyonu, safra pigmenti birikimi, şeffaf sitoplazmalı görünüm, soluk cisimcikler ve hiyalin damlacıkları da tümör dokusunda gözlemlendiği kaydedilmiştir (Karakurt, 2018).

2.4. Isırgan Otu (*U. dioica* L.)

2.4.1. Morfolojik ve biyolojik özellikleri

Urtica dioica L. (ısırgan otu); Urticaceae familyasına ait olup Urticales takımı içerisinde yer alan bir bitkidir. Dünyanın her iki yarım küresinin tropik ve subtropik bölgelerinde yetişen, genelde çok yıllık gelişim gösteren, çoğu türü otsu formda olmakla birlikte çalı formu da olan bir bitkidir (Ayan ve ark., 2006). Bu bitki ülkemizde; “Acı Isırgan Otu, Büyük Isırgan Otu, Agdalak, Daladiken, Cımbar, Cızlangaç, Cızgan, Geznik, Gendiskên, Çınçar, Sırgan Otu ve Dalagan” olmak üzere çeşitli isimlerle bilinmektedir (Erdemir, 2001; Treben, 2001; Koç, 2002). Ayrıca bitkinin ülkemizde; *U. pilurifera*, *U. urens*, *U. dioica*, *U. membranacea* ve *U. haussknechtii* olmak üzere 5 türünün bulunduğu, ancak en yaygın olarak ilk 3 türünün yetiştiği kaydedilmektedir (Davis, 1982).

Urtica, Latince yakmak anlamında kullanılan urere kelimesinden gelmektedir. Isırgan otunun yaprak yüzeyinde, bu bitkiye yakıcı özelliği veren asetilkolin, histamin ve 5-hidroksitriptamin (serotonin) kimyasalları bulunmakatdır. Dolayısıyla yaprağına dokunulduğunda yakıcı etkisi ile ciltte kaşıntı ve kızarıklar oluşturur (Ayan ve ark., 2006; Fu ve ark., 2006, Taylor, 2006). *U. dioica* dış görünüş olarak büyük, uzun ve iri görünümde olup iki evcikli özellik göstermektedir. Bu nedenle bu türe Latince de iki evcikli anlamına gelen “Dioica” ismi verilmiştir (Baytop, 1963). *U. dioica*; boyu 50-150 cm, 4 köşeli ve yabancı tozlaşma gösteren çok yıllık bir bitkidir (Tutin ve ark., 1964, Öztürk ve ark., 1991; Mbwanbo ve ark., 1996). Yaprakları yaklaşık 10 cm uzunluğunda olup gövdedeki boğumlarda karşılıklı bulunur; yakıcı tüyleri küresel, çubuksu ve yıldızsı görünüme sahip olup bitkinin geneline yayılmıştır (Cronquist, 1981, Zeybek ve ark.,

1994; Baytop, 1999; Calderone ve ark., 2001; Karakaş, 2003). En çok Haziran – Eylül ayları arasında yetişen Isırganotu; ılıman bölgelerde, otluk alanlarda, kültür bitkileri arasında, bataklık kenarlarında, yol ve su arkalarında doğal olarak yetiştiği için yıl boyunca rahatlıkla bulunabilmektedir. Böylece halk hekimliğinde yaprak, kök, çiçek ve tohumları sıklıkla kullanılabilmektedir (Zeybek ve ark., 1994; Koç, 2002; Ayan ve ark., 2006).

2.4.2. Kimyasal bileşimi ve etkileri

U. dioica'da yaygın olarak bilinen fitokimyasal bileşikler; flavonoidler, taninler, uçucu bileşikler ve sterollerdir (Gül ve ark., 2005; Krystofova ve ark., 2010). *U. dioica*'da düz kas uyarıcı özellikte asetilkolin, histamin ve 5-hidroksitriptamin (5-HT) adlı üç kimyasal madde tanımlanmıştır (Collier ve Chesher, 1959). Ayrıca *U. dioica*'nın tüylerinde bulunan formik asit, histamin ve serotonin ağrıyı tetikleyen ajanlar olarak bilinmektedir (Fu ve ark., 2006). *U. dioica*'nın esansiyel yağının ana bileşenleri olarak; Carvacrol (%38,2), carvone (%9,0), naftalen (%8,9), (E) -anetil (%4,7), heksahidrofarneşil aseton (%3,0), (E) -geranil aseton (%2,9), (E)- β -iyonon (%2,8) ve fitol (%2,7) tanımlanmıştır (Gül ve ark., 2005). *U. dioica*'nın rizomları; skopoletin, steroller, yağ asitleri, polisakaritler ve izolektinler gibi diğer biyolojik aktif bileşikler içermektedir (Krystofova ve ark., 2010). Bu rizomlarda ayrıca amino asit kompozisyonlarına göre kesinlikle farklı olan karmaşık bir aglütinin izolektin bulunmaktadır (Van Damme ve ark., 1988).

Isırgan otunun kuru maddesi; %18 protein, %14,5-17 albüminli maddeler, %2,5 yağlı maddeler ihtiva etmektedir. 1 kg taze bitki 130 mg C vitamini, 730 mg karoten ve oksalat ihtiva etmektedir. Bitkinin yaprakları; vitamin K, vitamin B1, provitamin A, urtisin glükoziti, sistosterin, sepi maddeleri, ksantofil yanında aynı zamanda 14,4 mg/100 gr tokoferol, 0,23 mg/100 gr riboflavin, 13 mg/100 gr demir, 0.95mg/100 gr çinko, 873 mg/100 gr kalsiyum, 75 mg/100 gr fosfor ve 532 mg/100 gr potasyum içermektedir (Wetherilt, 1989; Koç, 2002; Öngün, 2002). Isırgan otu tohumu ise %8,5 su, %25 yağ, %21,9 protein, %26,4 azot, %11,4 lif ve %6,8 kül içerir (Wetherilt, 2003).

Urtica dioica'nın yaprakları; kafeik asit esterleri, özellikle kafeik malik asit gibi fenolik asitler, flavonoidler, çeşitli vitamin (α -tokoferol ve C vitamini) ve mineraller (Se, Zn, Fe ve Mg), terpenler (mono- ve di-terpen diol ve terpen glikozitleri), tanenler, yağ asitleri, klorofil, aminoasitler ve steroller gibi maddelerce zengindirler (Booth ve

Bradford 1963; Adamski ve Bieganska, 1980; Hughes ve ark., 1980; Chaurasia, 1987; Kraus ve Spiteller, 1991; Gravel ve ark., 1994; Rzemkowska ve Ostrowska, 1994; Anikina, 1996; Schomaker ve ark., 1995; Salamon ve ark., 2001; Ji ve ark., 2007).

2.4.3. *Urtica dioica*'nın farmakolojik etkileri

Antioksidan etkisi

U. dioica ekstraktında bol miktarda flavanoid bileşiklerin bulunduğu, bu fenolik komponentlerin güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu, bu sayede lipid peroksidasyonu engelledikleri ve serbest radikallere karşı inhibitör görevi gördükleri belirtilmiştir (Fijalek ve ark., 2003; Gülçin ve ark., 2004; Çetinus ve ark., 2005). *U. dioica* 'nin sahip olduğu antioksidan fenol bileşikleri sayesinde; SOD GSH, CAT ve GSH-Px 'in reaktif serbest radikalleri temizlemesini regüle edebildiği kaydedilmiştir (Hoşbaş, 2008). Isırganotu ekstraktlarının antioksidan özellikleri yanında; ayrıca antikanser, antiinflamatuvar, immun stimulan, antialerjik ve östrojenik etkilerinin de bulunduğu rapor edilmiştir (Tanakol, 1998).

Anti-İnflamatuvar etkisi

U. dioica 'nın hem yapraklarından hem de köklerinden hazırlanan ekstraktların, proinflamatuvar sitokinlerin stimülasyonunu önlediği bildirilmiştir (Obertreis ve ark.,1996). Anti-inflamatuvar etkinin, *U. dioica* 'daki aktif bileşiklerin; hücrelerdeki nuklear faktor kappa B (NF-κB; enfeksiyona karşı immun cevabın regülasyonunda anahtar rol oynar) aktivasyonunu inhibe etmesiyle ve makrofajlarda, enflamasyonu şiddetlendiren nitrik oksit radikalının üretimini baskılamasıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Riehemann ve ark. 1999, Harput ve ark., 2005). *U. dioica* ekstraktında bulunan serotonin ve histaminin, nosiseptif ağrı nöronlarının aktivasyonunu artırdığı ve sinir büyüme faktörü seviyelerini etkileyen stimülasyon kaskadında yer aldığı belirtilmiştir (McMahon, 1996).

U. dioica 'nın 50 mg ekstresi ile diklofenak'ın 50mg'lik kombinasyonu, 200 mg diklofenak'a çok yakın bir etki göstermiştir. Isırgan otunun bu etkisi, non-steroidal anti-inflamatuvar ilaç kullanamayan hastalar için çok önemli olduğu vurgulanmıştır (Chrubasik ve ark., 1997).

Yapılan bir araştırmada; Tip 2 diyabet hastalarına ısırganotu ekstresinin, 100 mg/kg dozunda 2 ay süresince her gün 3 kez uygulamasıyla interlökin 6 ve yüksek duyarlı C-Reaktif proteinde anlamlı bir düşüş gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu veriler sonucunda, bu hastalıktan muzdarip olan hastalarda *U. dioica*'nın hidro alkolik ekstresinin bazı inflamatuvar indikatörler üzerinde önemli bir etkisi olduğu kanısına varılmıştır (Namazi ve ark., 2007).

Hepatoprotektif etkisi

U. dioica, güçlü bir antioksidan kapasitesi sayesinde serbest radikalleri temizlemesi nedeniyle, sıçanların hepatik iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu bir etki gösterdiği bildirilmiştir. *U. dioica*; paraoksonaz, arilesteraz ve karaciğer dokusu katalaz aktivitesini artırarak hepatoprotektif bir etki sergilediği tespit edilmiştir. *U. dioica*, seruloplazmin seviyesini ve lipid hidroperoksit aktivitesini azaltmasıyla, karaciğerde iskemi-reperfüzyonu sağlamayla oksidan ajanların oluşumunu önlediği bildirilmiştir (Kandis ve ark., 2010).

CCl₄ uygulamasıyla karaciğerde hasar oluşturulan tavşanlarda, *U. dioica* ekstrakti uygulamasının; hepatoselüler dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin oluşumunu engelleyerek, fibrozis ve sirotik değişimlerin ortaya çıkmasına engel olduğu, dolayısıyla önemli bir hepatoprotektif etkinin meydana geldiği ifade edilmiştir (Türkdoğan ve ark., 2003). Ayrıca ratlarda yapılan benzer bir çalışmada da, sıçanlarda CCl₄ ile indüklenen karaciğer hasarında *U. dioica* ekstresinin lipid peroksidasyonunu azaltarak ve antioksidan savunma sistemi aktivitesini artırarak hepatotoksiteyi önlediği tespit edilmiştir (Kanter ve ark., 2005).

Yine yapılan deneysel bir çalışmada da, *U. dioica* ekstresinin, ratlarda toplam kolesterol ve LDL seviyelerini önemli ölçüde azalttığı ve yüksek kolesterol diyetine sahip hayvanlarda karaciğer enzimlerini belirgin şekilde düşürdüğu bildirilmiştir (Nassiri-Asl ve ark., 2009). *U. dioica*, fagositlerdeki *kemilüminesansı* (bir kimyasal reaksiyon sonucu ışık salınması) baskılamak suretiyle hepatositlerde oksidatif hasara karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Daba ve Abdel-Rahman, 1998). *U. dioica* ekstresi, antioksidan özellikleri sayesinde, STZ'nin toksik etki mekanizmalarını etkileyebileceği

ve diyabetin karaciğer dokusu üzerindeki etkilerini modüle edebileceği veya sınırlayabileceği rapor edilmiştir (Golalipour ve ark., 2010).

Antiviral etkisi

Isırgan otunun köklerinden elde edilen süper lektin denen küçük molekül ağırlıklı N-asetilglukozamin spesifik lektinin; human immunodeficiency virus (HIV) ve influenza virusleri invitro olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir (Balzarini ve ark., 1992). HIV'in hücre zarında bulunan bir glikoprotein (GP120), virüsün hücre içerisine girmesini sağlamakta ve aynı zamanda antijenik yapısını belirlemektedir.

GP120'nin glikozilasyonu (karbonhidratla örtülmesi) sayesinde virüsün antijenik yapısı değişmekte ve aynı zamanda nötralize edici antikordardan kaçmasına ve yeni konak hücrelerin enfeksiyonuna neden olmaktadır. GP120'nin glikozilasyon bölgelerinde oluşan delesyonlar ki bu durum karbonhidratla örtünmenin azalmasıyla sonuçlanır, bu da virüsün nötralize edici antikordardan korunmasını sağlamaktadır. İşte UDS'nin N-asetilglukozamin bağlayıcı proteini (NBP) sayesinde, HIV'in GP120 üzerindeki zorunlu glikanları silerek (delesyona uğratarak) ilaç baskısından kaçmaya zorladığını; bunun da virus zarının saklanmış antijenik yapılarının ortaya çıkmasına olanak tanıdığı, bu nedenle de UDS'nin karbonhidrat bağlayan ajanların yeni konseptel sınıfının prototipini temsil ettiği belirtilmektedir (Balzarini ve ark., 2005).

Antimikrobiyal etkisi

U. dioica ekstraktının; *Pseudomonas aeruginosa*, *Eschericia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus* ve *Staphylococcus epidermis* etkenleri üzerinde etkili bir antibakteriyel aktivite gösterdiği ve ülser insidansını önemli derecede azalttığı bildirilmiştir. (Gülçin ve ark., 2004; Silan ve Rahmanlar, 2008). Aksu ve Kaya (2004)'nın yaptıkları araştırmaya göre; Türk sucuklarına *U. dioica* ekstraktı katıldığında, sucuklarda enterobakter, maya ve küf miktarlarında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

Diğer etkileri

U. dioica ekstraktının; romatoid artrit başlamasını indükleyen dendritik hücrelerin stimülasyonunu sağladığı bildirilmiştir (Setty ve Sigal, 2005). *U. dioica*'nın iktiva ettiğı aktif komponentlerin, insülin sekresyonunu artırarak kan glikoz seviyesini azaltıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir (Farzami ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda, *U. dioica*'nın etkili bir antidiyabetik etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Petlevski ve ark., 2001, Swatson ve ark., 200; Gülçin ve ark., 2004). Kardiyovasküler sistem üzerine etkisi üzerine yapılan çalışmalarda da güçlü bir hipotansif etkisinin olduğu vurgulanmıştır (Tahri ve ark., 2000, Testai ve ark., 2002). *U. dioica*'nın yakıcı tüylerinde bulunan histaminin, alerjik rinit üzerine terapötik etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir (Mittman, 1990; Silan ve Rahmanlar, 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulun'un 31.01.2019 Tarihli 2019/01 kararı ile yapılmıştır.

Bu çalışmada Wistar Albino ırkı ratlar kullanıldı. Deney hayvanları, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve aynı merkezde deneysel çalışma yürütüldü. Ratlar, 12 saat ışık 12 saat karanlık ritminde ışıklandırılan, 22 ± 2 °C sıcaklık ve %60 nem bulunan odalarda muhafaza edildi. Deneme süresince hayvanlara standart yem ve içme suyu ad libitum olarak verildi. Çalışma gruplarına yedirilen yem karışımları bu standart pelet yemlerden hazırlanıp, yem ve su alımı tüm gruplar için serbest bırakıldı. Deney hayvanları standart plastik kafeslerde barındırıldı. Ratlar çalışma başlangıcında tartılarak ve mümkün olabildiğince ağırlık bakımından eşit dağılımlı olacak şekilde gruplara ayrıldı. Tartım sonucunda ağırlıkları genel ortalamanın çok altında ya da çok üstünde kalan hayvanlar gruplara dâhil edilmedi.

3.1.1. Gruplandırma ve uygulama programı

Toplam 40 adet rat her grupta 8'er adet olacak şekilde beş gruba ayrıldı. Gruplar, DEN ve *Urtica dioica* ekstraktı uygulaması aşağıdaki gibi gerçekleştirildi. Kanserojen lezyonların oluşabilmesi için toplam deneme süresi 16 hafta olarak planlandı. Tüm gruptaki ratlar denemenin 0. gününden itibaren her 15 günde bir tartılarak kilo değişimleri belirlendi. Gelişebilecek komplikasyonlar açısından tüm gruptaki ratlar günlük takip edildi.

1. Grup A (Kontrol): Ratlar üzerinde hiçbir uygulama yapılmadı. 16 hafta boyunca pelet yem ve içme suyu verildi.

2. Grup B (DEN): DEN, denemenin ilk günü 200 mg/kg dozunda (Sigma, N 0756) intra peritoneal olarak bir kez uygulandı ve 16 hafta boyunca pelet yem ve içme suyu verildi.

3. Grup C (UDS): 16 hafta boyunca *Urtica dioica* eter yağ ekstraktı 1 ml / rat dozunda orogastrik sondayla her gün verildi.

4. Grup D (DEN+UDS-1): Denemenin ilk günü 200 mg/kg dozunda DEN (Sigma, N 0756) intra peritoneal olarak bir kez uygulandı ve 16 hafta boyunca *Urtica dioica* etil alkol+su ekstraktı 50 mg/kg dozunda her gün orogastrik sondayla verildi.

5. Grup E (DEN+UDS-2): Denemenin ilk günü 200 mg/kg dozunda DEN (Sigma, N 0756) intra peritoneal olarak bir kez uygulandı ve *Urtica dioica* eter yağ ekstraktı 16 hafta boyunca 1 ml/rat dozunda her gün orogastrik sondayla verildi.

3.1.2. Deneyin sonlandırılması ve örneklerin alınması

Uygulama sonunda, 50 mg/kg Ketamine hidroklorit + 10mg/kg dozunda Xylazine hidroklorit ile ratlar anestezide alınarak servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Tüm hayvanların intrakardiyak yoldan kanları alınarak serum ve plazmaları çıkarılıp ilgili analizler gerçekleştirilinceye kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edildi. Sonrasında ratların sistemik nekropsileri yapılarak karaciğer dokusu makroskopik olarak incelendi, fotoğraflandı ve histopatolojik inceleme için doku örnekleri alındı.

3.2. Bitki Materyali

Bitki materyali olarak ısırgan otu (*Urtica dioica*) tohumu kullanıldı. Liyofilize salin ekstraktı Dalar ve Konczak (2013) metodunun modifiye şekline göre hazırlandı. Aktarlardan temin edilen ısırganotu (*Urtica dioica*) tohumu elektrikli bir değirmende öğütüldü. Daha sonra ısırganotu tohumu numunesinden 50 gr tartılarak bir cam behere konuldu. 250 ml saf su ve 250 ml etil alkol ile karışımı sağlandı. Beherin üzeri alüminyum folyo ile kapatılıp 2 saat çalkalayıcıda homojenize edildi, daha sonra süzgeçten geçirilen homojenize karışım posası atıldı ve altta kalan homojenat 10 ml'lik falkon tüplerine pipetlenip 5 dakika 3500 rpm'de (~1160 g) santrifüj edildi. Elde edilen tüm supernatantlar aynı kaba konuldu. Santrifüj ile elde edilen sıvıdan 400 ml alınıp evaporatöre bırakılarak +37°C'de yaklaşık 1 saat 45 dakika buharlaştırmak suretiyle çözücünden arındırıldı. İşlem sonunda yoğunlaştırılan ekstrakt falkon tüplerine konularak -80°C'de 48 saat bekletildi. Sonra dondurulan numuneler liyofilizatörde 0.030 mBar basınç ve -54°C'de 3 gün boyunca kurutuldu. Elde edilen liyofilize salin fraksiyonu, analiz işlemlerine başlanana

dek, -20 °C’de muhafaza edildi. Böylece ekstraksiyon işlemi tamamlanmış oldu. Tüm bu işlemler Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde yapıldı.

3.3. Biyokimyasal Analizler

Deneme süresi sonunda servikal dekapitasyon yapılan ratlardan biyokimyasal analizler için usulüne uygun olarak tüplere kan alındı. Biyokimyasal analizler için kan örnekleri 3000 rpm 15 dak. +4 °C de santrifüj edilerek serumlar elde edildi.

3.3.1. Kimyasallar

Fosfat tampon hazırlamak için kullanılan Na₂HPO₄ Sigma Aldrich Company’den satın alındı. Karaciğer ve serum örneklerinde ölçülen tüm biyokimyasal parametreler için ELISA kitleri YL Biotech Co., Ltd.’den ticari olarak satın alındı.

3.3.2. Biyokimya tüplerine alınan kandan serum örneklerinin ayrılması

İntrakardiyak olarak alınan kanlar sarı kapaklı biyokimya tüplerine konuldu ve 3500 xg’de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan serum başka bir tüpe alınarak çalışılncaya kadar -80 °C’de bekletildi.

3.3.3. Karaciğer örneklerinden lizat temini

Karaciğer dokusundan 0.2 g’lık örnek, pH:7.4’lük ve 50 mM’lık 1.8 mL fosfat tamponuna ilave edildi. Yaklaşık 15 saniye ultraturraks ile homejenize edildikten sonra 3000 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant başka bir tüpe alındı ve çalışılncaya kadar -80 °C’de bekletildi.

3.3.4. Rutin biyokimya parametrelerinin ölçümü

Serum örneklerinde AST, ALT, LDH, CA-15-3, CA-19-9, CA-125 II, AFP, CEA aktiviteleri Abott Architect I6200 SR cihazında kemilüminesans mikropartikül immünolojik yöntem ile, her parametre için cihaza uygun kalibratör, kontrol ve kit kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen AST, ALT ve LDH aktiviteleri U/L olarak, diğer parametrelerin sonuçları ise U/mL veya U/dL olarak ifade edildi.

3.3.5. Apoptoz, oksidatif stres ve antioksidan parametrelerin ölçüm yöntemi

Kaspaz 3, Bcl2, TAS, TOS, GSH, SOD, CAT ve GSH-Px değerleri ticari olarak satın alınan ve enzim bağlı immünosorbent assay (ELISA) ile çalışan kitler (ELISA, YL biont, Shanghai YL Biotech Co., Ltd) ile kit prospektüsüne uygun olarak ELISA cihazında ölçüldü.

3.3.6. Yüksek basınçlı likid kromatografisi (HPLC) yöntemi ile MDA ölçümü

Serum veya doku süpernatant'ından 50 µL alınarak bir tüpe konuldu. Üzerine 750 µL 0.44 M H₃PO₄, 250 µL TBA ve 450 µL distile su ilave edildi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak 60 dk. kaynar su banyosunda bekletildi. Sonra buzda veya çeşme suyunda soğutuldu. Üzerine alkalin metanolden (50 ml metanol + 4.5 mL ve 1 M NaOH) 1:1 oranında (1.5 mL) ilave edildi. 2500 g'de 3 dk. santrifüj edildi. Üst bölümde kalan süpernatant'dan 200 µL alınarak bir vial kondu ve HPLC cihazına verildi.

HPLC için ölçüm kolonu olarak partikül genişliği 150x4.6 mm ve 5µm olan RP18 kolon kullanıldı. Mobil faz için 50 mM'lık 400 mL fosfat tamponu (pH:6.8) ile 600 mL metanol birbirine karıştırılarak hazırlandı. Cihazın akış hızı 0.8 mL/dk'ya enjeksiyon hacmi 20 µL'ye ayarlandı. 527 nm eksitasyon 551 nm emisyon dalga boylarında floresan dedektörde farklı konsantrasyonda 1,1,3,3-tetraetoksipropan ile hazırlanan standart numunelere karşı okuma yapıldı.

Yapılan tüm bu biyokimyasal analizler Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı.

3.5. Histopatolojik İnceleme

Deneme sonunda hayvanların nekropsileri yapılarak AF toksisitesi için esas hedef organ olarak kabul edilen karaciğerden doku örnekleri alındı ve gözlemlenen makroskopik değişiklikler kaydedildi. Alınan doku parçaları %10'luk formalin solusyonunda tespit edildikten sonra rutin takip yapılarak parafin bloklara gömüldü ve rotary mikrotomla 4 µm'lik kesitler alındı. Kesitler hematoksilin-eozin (HE), gerekli görülenler ise Masson's trichrom ve Sudan black boyaları ile boyanarak mikroskopta incelendi.

3.6. İmmunohistokimyasal İnceleme

Karaciğer dokusundaki karsinogenezis sürecindeki değişimlerin daha net olarak ortaya konması için hazırlanan kesitler hepatosit Bax, düz kas aktin, Ki-67, kaspaz-3, Bcl-2, P53 ve alfa fetoprotein (AFP) antikorlarıyla immünperoksidaz yöntemine göre (Enzan ve ark., (1994) göre boyanarak araştırma mikroskopunda incelendi.

İmmunohistokimyasal boyama, streptavidin-peroksidase metoduna (ABC) göre streptavidin/biotin immünperoksidaz kit (Histostain-Plus Bulk Kit; Zymed, South San Francisco, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan kesitler adezivli lamalar üzerine alındıktan sonra, ksilen ve alkol serilerinden geçirildi. Kesitler PBS (phosphate buffer solution) ile yıkandıktan sonra %3'lük H_2O_2 de 20 dakika tutularak endojen peroksidaz inaktive edildi. Antijen retrieval solüsyonuna (sitrat buffer) konulup üzeri kapatıldıktan sonra 20 dakika süreyle ikişer kez ısıya tabi tutuldu. Fırından çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Dokular yeniden PBS ile yıkandıktan sonra 20 dakika protein bloking (nonimmun serum) ile bloke edildi. Dokular AFP (1/100 sulandırma), HSA, kaspaz-3, inos, Ki-67 ve Bax poliklonal antikorları damlatılıp +4°C de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Kesitler PBS ile yıkanıp biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidaz da 20 dakika bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra diaminobenzidine (DAB) damlatılıp 1-2 dakika bekletildi. Daha sonra tüm dokular Mayer's hematoksilende 1-2 dk bekletilip musluk suyunda yıkandı. Tekrar alkol ve ksilen serilerinden geçirilen kesitler entellan kullanılarak kapatıldı. Boyama işlemini doğrulamak için negatif kontroller kullanıldı. Bu slaytlar primer antikorlar yerine PBS ile reaksiyona sokuldu. Kesitler ışık mikroskopunda (Nikon 80i-DS-RI2) incelendi ve fotoğraflandı. Bu boyamaların sonucunda her bir örnek mikroskopta 20'lik büyütmede, 10 farklı alan incelenerek pozitif boyanan hücrelerin sayımı yapıldı ve ortalamaları hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Biyokimyasal analizlerin istatistiksel sonuçları için SPSS paket programı kullanıldı (versiyon 21). Gruplara ait tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma

olarak verildi. Verilerin normal dağılıp dağılmadığına Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. Veriler normal dağıldığı için aynı parametre içinde gruplar arasında farkların anlamlı olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Farkların hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için, post hock analizi yapıldı. 0.05 ve daha küçük p değerine sahip sonuçlar anlamlı kabul edildi. Grupların canlı ağırlıkları arasındaki fark One way ANOVA testine göre gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

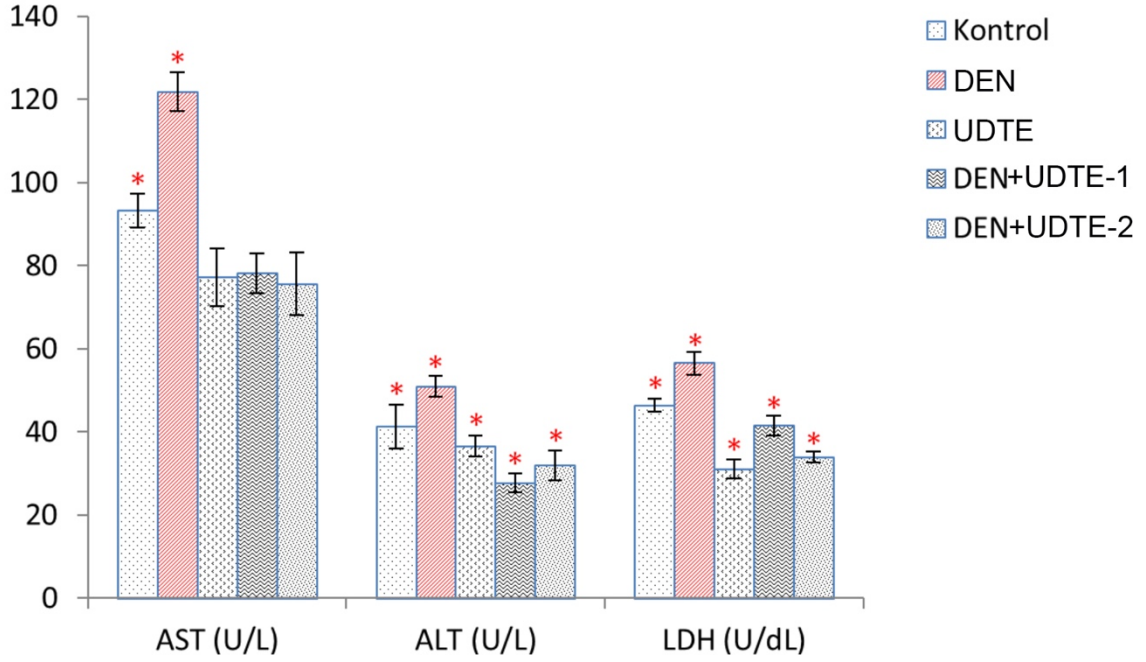
Karaciğer fonksiyon testlerine ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 1 ve Şekil 3’de görülmektedir. DEN verilen pozitif kontrol grubunda AST, ALT ve LDH değerleri diğer gruplara göre oldukça yüksekti ($p=0.001$). Ancak DEN ile birlikte UDTE verilen gruplarda AST, ALT ve LDH değerleri DEN grubuna göre oldukça düşüktü ($p=0.001$). Ayrıca UDTE grubunda AST, ALT ve LDH aktiviteleri hem kontrol hem de diğer gruplara göre oldukça düşüktü ($p=0.001$).

Tablo 1. Karaciğer fonksiyon testlerine ait ortalama ve standart sapma değerleri

	Kontrol	DEN	UDTE	DEN+ UDTE-1	DEN+ UDTE-2	P değeri
CA 15-3 (U/dL)	28.83±1.30	39.84±2.88*	29.13±2.18	32.54±3.62	29.39±1.69 ^o	0.001
CA 19-9 (U/mL)	1.70±0.11	2.11±0.10*	1.75±0.09	1.78±0.20	1.85±0.05	0.001
CA 125-II (U/dL)	34.98±3.95	58.63±1.23*	31.83±2.92	45.67±3.39 ^z	34.27±3.15	0.001
AFP (ng/dL)	19.51±0.14	21.48±0.92 ^z	19.82±0.99	20.34±1.04	19.80±1.70	0.029
CEA (ng/dL)	13.57±1.01	16.38±1.70 ^o	13.96±1.43	16.64±1.32 ^o	16.78±0.78 ^o	0.001
Kaspaz 3 (ng/mL)	0.57±0.04	0.67±0.05*	0.53±0.04	0.64±0.05 ^z	0.57±0.06	0.002
Bcl2 (ng/mL)	0.98±0.05	0.86±0.07 ^o	1.03±0.09 ^z	0.90±0.08	0.91±0.10	0.010

*p: Diğer gruplara göre anlamlı ($p=0.001$).

Serum örneklerinde kanser markırları karşılaştırıldığında, özellikle DEN grubunda CA 15-3, CA 19-9 ve CA 125-II aktivitelerinin diğer gruplara göre oldukça yüksek olduğu görüldü ($p=0.001$). Ayrıca DEN grubunda AFP ve CEA değerlerinin hem kontrol hem de UDS grubuna göre yüksek olduğu gözlemlendi (CEA için $p=0.001$, AFP için $p=0.029$). Ancak, DEN ile birlikte UDS kullanılan gruplarda DEN grubuna göre CA 15-3, CA 19-9 ve CA 125-II aktivitelerinin DEN grubuna göre oldukça düştüğü görüldü ($p=0.001$). Ayrıca DEN ile birlikte UDTE kullanılan gruplarda DEN grubuna göre AFP ve CEA değerleri kısmen düşmüş olsa da sonuçlar anlamlı değildi ($p>0.05$).



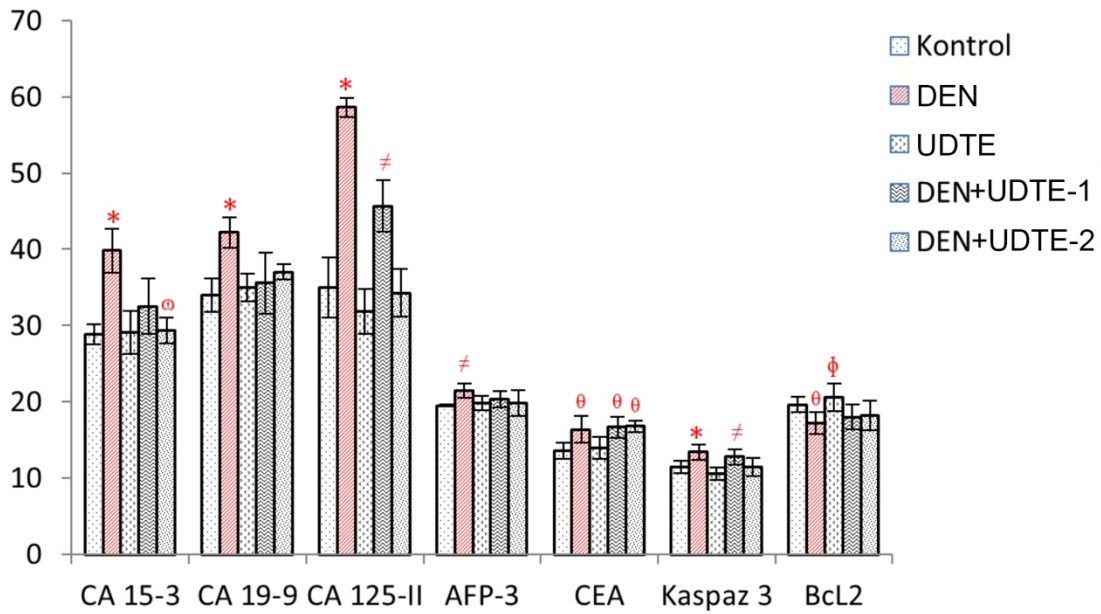
Şekil 3. Karaciğer fonksiyon testlerine ait ortalama ve standart sapma değerlerinin toplu olarak karşılaştırılması. ALT: Alanin transaminaz, AST: Aspartat transaminaz, LDH: laktat dehidrogenaz, *p: Diğer gruplara göre anlamlı (p=0.001).

Serum örneklerinde apoptotik markırlardan kaspaz-3 değerlerinin DEN grubunda diğer gruplara göre oldukça yüksek olduğu gözlemlendi (p=0.002). Ancak, DEN ile birlikte UDS verilen gruplardan özellikle DEN+UDS-2 grubunda Kaspaz-3 değerleri DEN grubuna göre oldukça düşmüştü (p=0.002). Antiapoptotik markırlardan Bcl2 düzeyleri, DEN grubunda kontrol ve UDSE gruplarına göre oldukça düşmüştü (p=0.010). Ancak, DEN+UDSE gruplarında Bcl2 düzeyleri DEN grubuna göre kısmen yüksek olsa da anlamlı değildi (p>0.05). Serum kanser markırları ve pro- ve anti-apoptotik markırlar ile ilgili diğer ayrıntılı sonuçlar Tablo 2 ve Şekil 4’de görülmektedir.

Tablo 2. Serum kanser ve apoptoz markırlarına ait ortalama ve standart sapma değeri.

	Kontrol	DEN	UDTE	DEN+ UDTE-1	DEN+ UDTE-2	P değeri
CA 15-3 (U/dL)	28.83±1.30	39.84±2.88*	29.13±2.18	32.54±3.62	29.39±1.69 ^o	0.001
CA 19-9 (U/mL)	1.70±0.11	2.11±0.10*	1.75±0.09	1.78±0.20	1.85±0.05	0.001
CA 125-II (U/dL)	34.98±3.95	58.63±1.23*	31.83±2.92	45.67±3.39 ^z	34.27±3.15	0.001
AFP (ng/dL)	19.51±0.14	21.48±0.92 ^z	19.82±0.99	20.34±1.04	19.80±1.70	0.029
CEA (ng/dL)	13.57±1.01	16.38±1.70 ^o	13.96±1.43	16.64±1.32 ^o	16.78±0.78 ^o	0.001
Kaspaz 3 (ng/mL)	0.57±0.04	0.67±0.05*	0.53±0.04	0.64±0.05 ^z	0.57±0.06	0.002
Bcl2 (ng/mL)	0.98±0.05	0.86±0.07 ^o	1.03±0.09 ^z	0.90±0.08	0.91±0.10	0.010

*p: Diğer gruplara göre anlamlı (p<0.05). ^zp: Kontrol, UDTE ve DEN+UDTE-2 gruplarına göre anlamlı (p<0.05). ^op: Kontrol ve UDTE gruplarına göre anlamlı (p<0.05). ^zp: DEN+UDTE-1 ve DEN+UDTE-2 gruplarına göre anlamlı (p<0.05). ^op: DEN+UDTE-1 grubuna göre anlamlı (p<0.05).



Şekil 4. Serum kanser ve apoptoz markırlarına ait ortalama ve standart sapma değeri karşılaştırılması.

CA 15-3: karbohidrat antijen 15-3 (U/dL), CA 19-9: karbohidrat antijen 19-9 (U/20 mL), CA 125-II: karbohidrat antijen 125-II (U/dL), AFP-3: alfa fetoprotein 3 (ng/dL), CEA: karsino embriyonik antijen (ng/dL), Kaspaz 3 (ng/20 mL), Bcl2 (ng/20 mL), *p: Diğer gruplara göre anlamlı (p<0.05). ^zp: Kontrol, UDSE ve DEN+UDSE2 gruplarına göre anlamlı (p<0.05). ^op: Kontrol ve UDSE gruplarına göre anlamlı (p<0.05). ^{phi}p: DEN+UDSE-1 ve DEN+UDSE-2 gruplarına göre anlamlı (p<0.05). ^op: DEN+UDSE-1 grubuna göre anlamlı (p<0.05).

Serum örneklerindeki oksidatif stres ve antioksidan parametreler ait sonuçlar Tablo 3 ve Şekil 5’ de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. TAS değerleri incelendiğinde, DEN grubunun TAS değerleri kontrol, UDS ve UDS2 grubuna göre düşüktü. Ancak DEN ile birlikte UDS verilen gruplarda TAS düzeyleri DEN grubuna göre yüksekti ($p=0.049$). Fakat bu değerler yalnızca DEN+UDS-2 için anlamlıydı ($p=0.049$). Ayrıca DEN grubunun TOS değerleri diğer gruplara göre kısmen artsa da anlamlı değildi ($p=0.399$).

Serum GSH değerleri incelendiğinde, DEN grubunun GSH değerleri diğer gruplara göre kısmen düşük, UDSE kullanılan tüm gruplarda hem kontrol hem de DEN grubuna göre kısmen yüksek olsa da anlamlı değildi ($p>0.05$).

DEN grubunda SOD seviyeleri diğer gruplara göre anlamlı olmasa da kısmen düşük iken, DEN+UDS-2 grubunda DEN grubuna göre oldukça yüksekti ($p=0.078$). UDS kullanılan diğer gruplarda SOD seviyeleri hem kontrol hem de DEN gruplarına göre kısmen artmış olsa da anlamlı değildi ($p>0.05$).

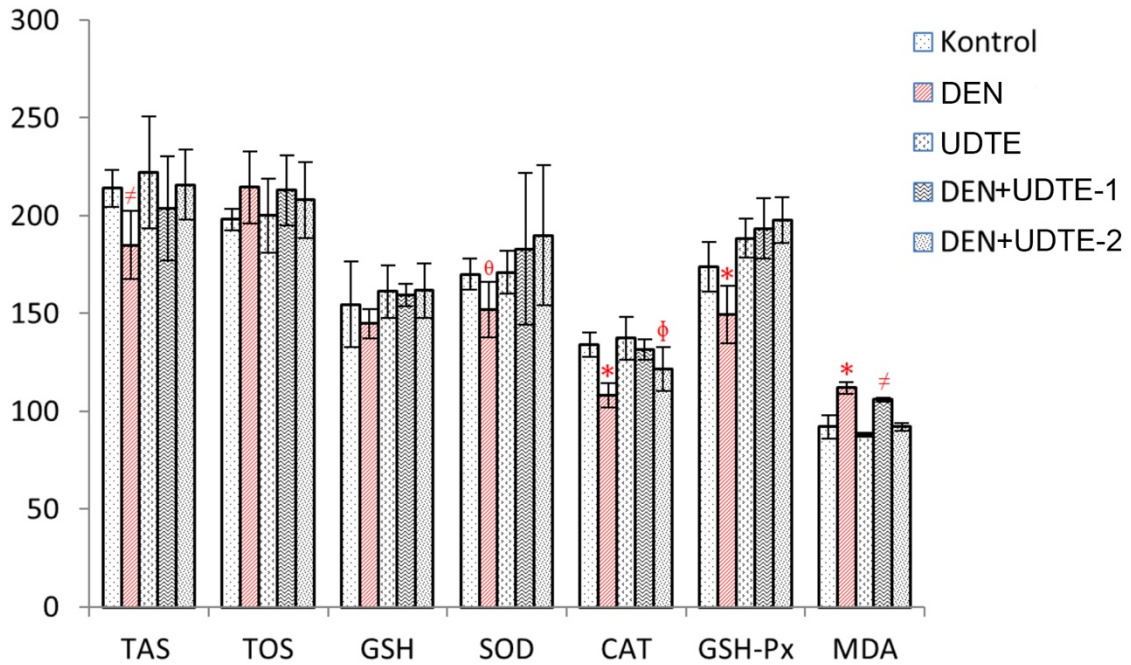
Tablo 3. Serum örneklerinde antioksidant kapasite, oksidatif stres, bazı antioksidan enzim ve protein seviyeleri ile lipid peroksidasyonu seviyelerine ait ortalama ve standart sapma değerleri.

	Kontrol	DEN	UDTE	DEN+UDTE-1	DEN+UDTE-2	P değeri
TAS (pg/mL)	21.40±0.94	18.50±1.73 [*]	22.20±2.87	20.38±2.66	21.58±1.78	0.049
TOS (U/mL)	3.96±0.11	4.29±0.37	4.00±0.38	4.26±0.36	4.16±0.39	0.399
GSH (ng/mL)	154.57±21.78	144.88±7.48	61.19±13.42	159.55±5.81	161.79±13.92	0.309
SOD (ng/mL)	1.70±0.08	1.52±0.14 ⁰	1.71±0.11	1.83±0.39	1.90±0.36	0.078
CAT (ng/mL)	26.80±1.24	21.65±1.22 [*]	27.47±2.20	26.30±1.03	24.34±2.26 [‡]	0.002
GSH-Px (ng/mL)	17.38±1.26	14.94±1.48 [*]	18.84±0.99	19.35±1.52	19.78±1.17	0.001
MDA (nmol/mL)	0.92±0.06	1.12±0.03 [*]	0.88±0.01	1.06±0.01 [‡]	0.92±0.02	0.001

^{*}p: Diğer gruplara göre anlamlı ($p<0.05$). ^{*}p: Kontrol, UDTE ve DEN+UDTE-2 gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$). ⁰p: DEN+UDSE2 grubuna göre anlamlı ($p<0.05$). [‡]p: Kontrol, DEN ve UDSE gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$).

DEN grubunun serum CAT ve GSH-Px değerleri diğer gruplara göre en düşük seviyede idi. Ancak DEN ile birlikte UDS verilen gruplarda CAT ve GSH-Px değerleri oldukça yüksekti ve kontrol değerlerine benzerdi (CAT için $p=0.002$, GSH-Px için $p=0.001$). Fakat bu benzerlik yalnızca DEN+UDTE-1 için anlamlıydı.

Serum lipid peroksidasyon seviyeleri incelendiğinde DEN grubunun MDA düzeylerinin diğer gruplara göre en yüksek ($p=0.001$), UDTE grubunda ise en düşük olduğu görüldü. Ek olarak DEN+UDTE-2 grubunda MDA değerleri kontrol grubuna benzerdi. Diğer ayrıntılı sonuçlar Tablo 3 ve Şekil 5’de verilmiştir.



Şekil 5. Serum örneklerinde antioksidant kapasite, oksidatif stres, bazı antioksidan enzim ve protein seviyeleri ile lipid peroksidasyonu seviyelerine ait ortalama ve standart sapma değerlerinin toplu olarak karşılaştırılması.

TAS: total antioksidan kapasite (pg/10 mL), TOS: total oksidatif stres (U/50 mL), GSH: redükte glutatyon (ng/mL), SOD: süperoksid dismutaz (ng/dL), CAT: katalaz (ng/5 mL), GSH-Px: glutatyon peroksidaz (ng/10 mL), MDA: malondialdehit (nmol/dL). *p: Diğer gruplara göre anlamlı ($p<0.05$). #p: Kontrol, UDTE ve DEN+ UDTE-2 gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$). ^p: DEN+UDTE-2 grubuna göre anlamlı ($p<0.05$). phi p: Kontrol, DEN ve UDTE gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$).

Karaciğer dokusunda ölçülen antioksidan ve oksidatif stres parametre değerleri serum örneklerinde ölçülen aynı parametreler ile büyük ölçüde paralellik gösterdi. DEN grubunda TAS değerleri diğer gruplara göre düşük iken, TOS aktiviteleri ise kontrol, UDTE ve DEN+ UDTE-2 gruplarına göre yüksekti ($p=0.004$). DEN+ UDTE-1 grubunda TOS değerleri DEN grubuna göre kısmen düşük olsa da anlamlı değildi ($p>0.05$).

Antioksidan enzim değerleri incelendiğinde DEN grubunun GSH, SOD ve CAT değerleri diğer gruplara göre oldukça düşüktü ($p<0.05$). Ancak UDTE verilen tüm gruplarda ve özellikle de DEN+ UDTE-1 grubunda GSH, SOD ve CAT değerleri DEN grubuna göre yüksekti ($p<0.05$).

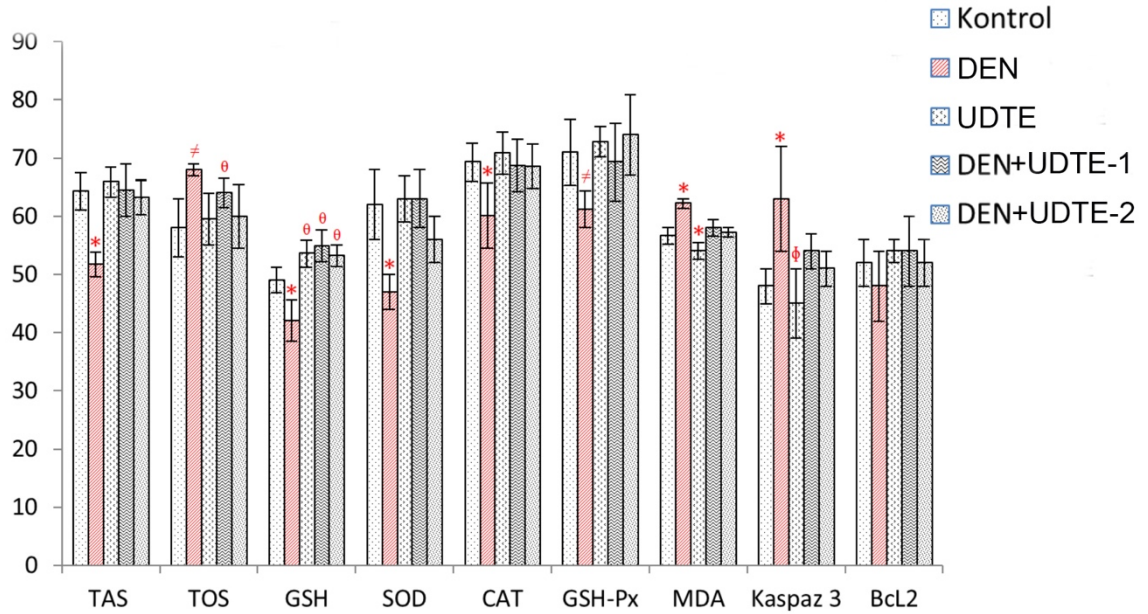
Karaciğer lipid peroksidasyon seviyeleri de serum MDA seviyeleri seviyeleri ile benzerlik gösterdi. DEN grubunun MDA seviyeleri diğer gruplara göre artmış iken, UDS verilen tüm gruplarda DEN grubuna göre azalmıştı ($p=0.001$).

DEN grubunun karaciğer kaspaz-3 değerlerinde de TOS ve lipid peroksidasyon seviyelerine benzer durum söz konusuydu. DEN grubunun karaciğer kaspaz 3 değerleri diğer gruplara göre artmış iken ($p=0.001$), Bcl2 seviyeleri ise azalmıştı. Ancak sonuçlar yalnızca kaspaz 3 değerleri için anlamlıydı ($p=0.001$). Ayrıca, DEN ile birlikte UDTE verilen gruplarda kaspaz-3 değerleri DEN grubuna göre düşüktü ($p=0.001$) ve kontrol değerlerine benzerdi. Diğer ayrıntılı sonuçlar Tablo 4 ve Şekil 6'da ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Tablo 4. Karaciğer dokusunda apoptoz ve bazı oksidant/antioksidant parametrelere ait ortalama ve standart sapma değerleri.

	Kontrol	DEN	UDT	DEN+UDT-1	DEN+UDT-2	P değeri
TAS (pg/mg protein)	6.43±0.32	5.17±0.21*	6.59±0.26	6.45±0.45	6.32±0.30	0.004
TOS (U/mg protein)	1.16±0.10	1.36±0.02 [‡]	1.19±0.09	1.28±0.05 ^θ	1.25±0.11	0.005
GSH (ng/mg protein)	49.02±2.15	42.03±3.53c*	53.59±2.32 ^θ	54.93±2.75 ^θ	53.19±1.88 ^θ	0.001
SOD (ng/mg protein)	0.62±0.06	0.47±0.03*	0.63±0.04	0.63±0.05	0.56±0.04 ^θ	0.002
CAT (ng/mg protein)	6.93±0.33	6.01±0.56*	7.08±0.36	6.87±0.45	6.86±0.38	0.024
GSH-Px (ng/mg protein)	7.10±0.57	6.12±0.32 [‡]	7.28±0.26	6.93±0.67	7.40±0.69	0.030
MDA (nmol/mg protein)	2.83±0.07	3.11±0.04*	2.70±0.07*	2.90±0.07	2.86±0.04	0.001
Kaspaz-3 (ng/mg protein)	0.16±0.01	0.21±0.03*	0.15±0.02	0.18±0.01 ^φ	0.17±0.01	0.001
Bcl2 ng/mg protein)	0.26±0.02	0.24±0.03	0.27±0.01	0.27±0.03	0.26±0.02	0.338

*p: Diğer gruplara göre anlamlı (p<0.05). [‡]p: Kontrol, UDTE ve DEN+UDTE-2 gruplarına göre anlamlı (p<0.05). ^θp: Kontrol grubuna göre anlamlı (p<0.05). ^φp: UDTE grubuna göre anlamlı (p<0.05).



Şekil 6. Karaciğer dokusunda apoptoz ve bazı oksidant/antioksidant parametrelere ait ortalama ve standart sapma değerlerinin toplu olarak karşılaştırılması.

TAS: total antioksidan kapasite (pg/10 mg protein), TOS: total oksidatif stres (U/50 mg protein), GSH: redükte glutasyon (ng/mg protein), SOD: süperoksid dismutaz (ng/100 mg protein), CAT: katalaz (ng/10 mg protein), GSH-Px: glutasyon peroksidaz (ng/10 mg protein), MDA: malondialdehit (nmol/20 mg protein), Kaspaz 3 (ng/300 mg protein), Bcl2 (ng/200 mg protein).

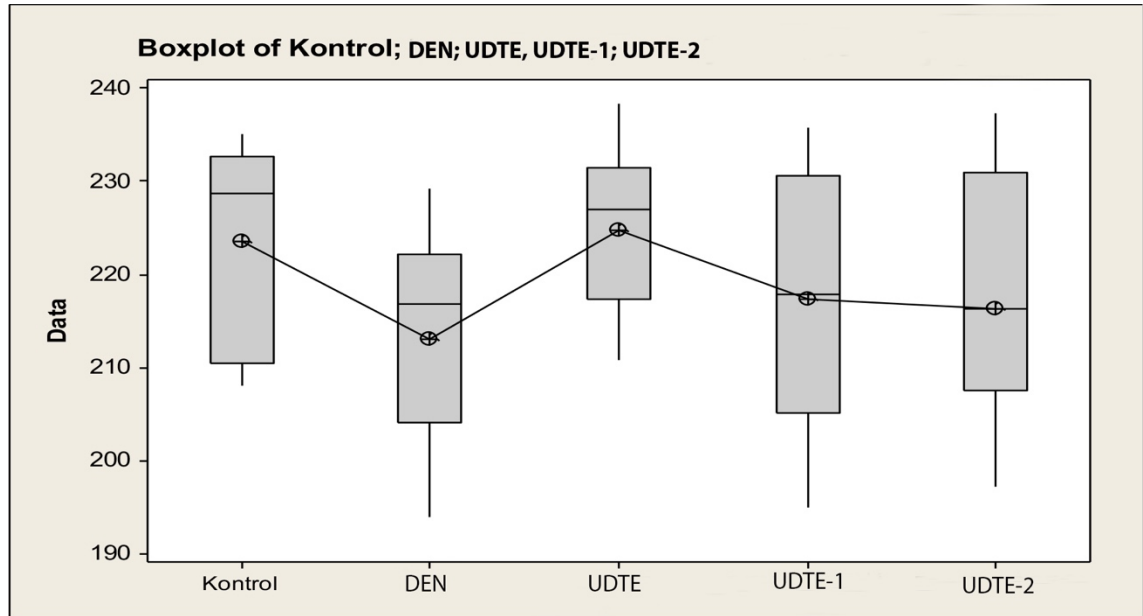
4.2. Ratların Canlı Ağırlık Sonuçları

Kontrol ve çalışma gruplarının canlı ağırlık ortalamaları standart hataları ile birlikte Tablo 5’de verildi. Kontrol grubuna göre DEN grubunun ağırlık artışında azalma meydana gelmiştir. DEN ile birlikte UDTE verilen gruplarda ise DEN’in olumsuz etkilerini restore ederek vücut ağırlıklarını muhafaza ettiğini tespit edilmiştir. Ancak bu oranlar istatistik olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Tablo 5. Gruplar arası canlı ağırlık ortalaması.

Gruplar	Kontrol	DEN	UDTE	DEN+UDTE-1	DEN+UDTE-2
Vücut Ağırlığı (g)	223.4 ± 11.3 ^a	213.1 ± 12.2 ^a	224.7 ± 9.1 ^a	217.2 ± 14.3 ^a	216.3 ± 13.9 ^a

Not: ^a yazan gruplar arasında istatistiki açıdan fark yoktur ($p>0.05$).

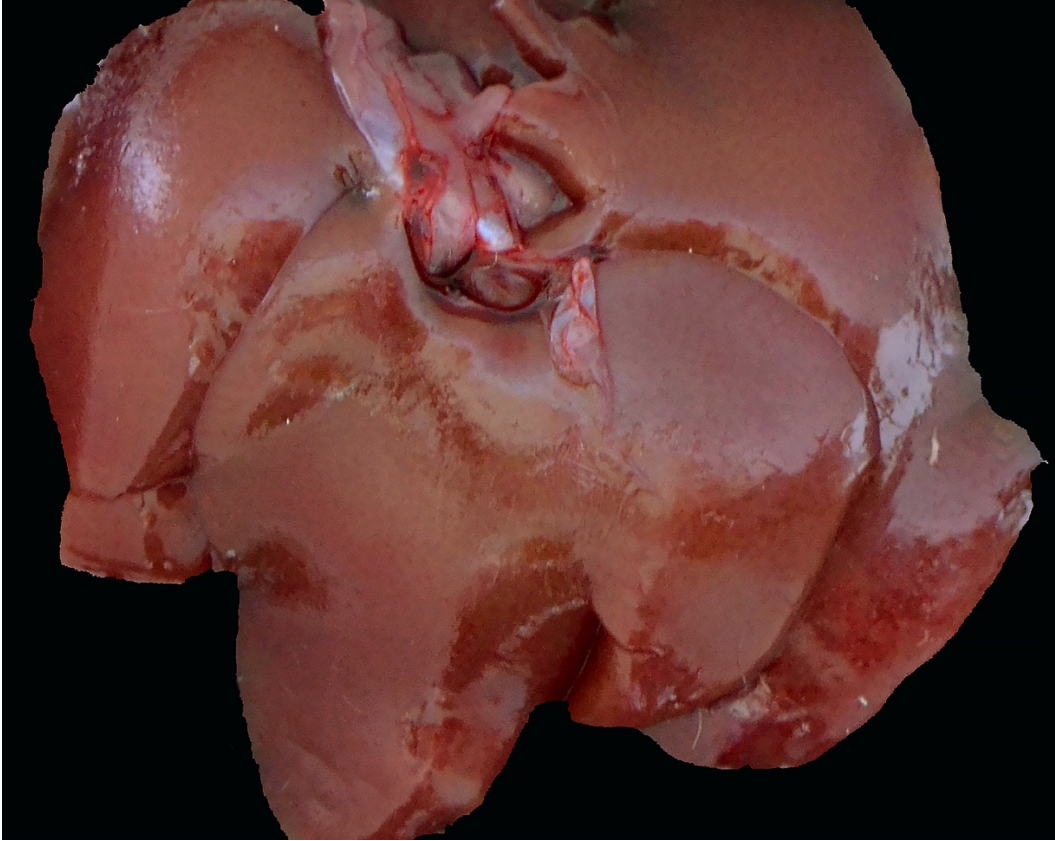
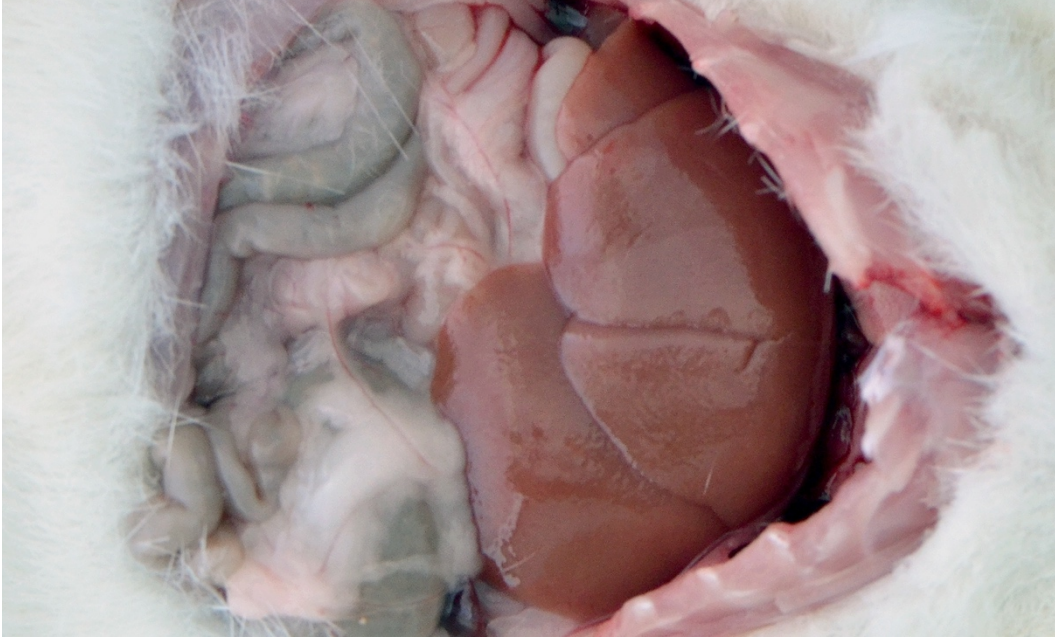


Şekil 7. Gruplar arası canlı ağırlık ortalaması.

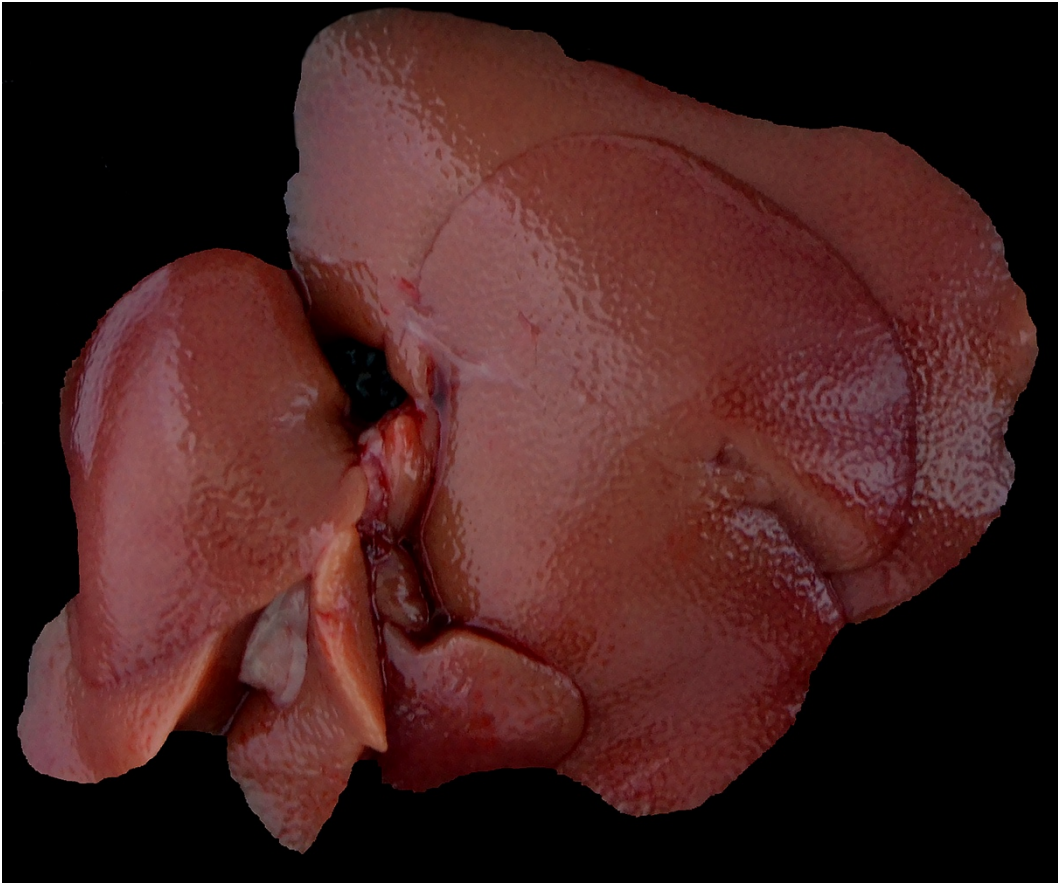
4.3. Makroskopik Bulgular

Kontrol (Şekil 8) ve UDTE grubu ratların karaciğerlerinin normal görünümde oldukları saptandı. Ancak DEN grubundaki ratların karaciğerleri kısmen daha büyük, kenarları kütleşmiş, daha koyu renkte ve yüzeyi ince granüler bir görünümdeydi (Şekil 9). DEN+UDTE-1 grubundaki ratların karaciğerleri hemen hemen kontrol grubuna benzer bir görünümde oldukları, DEN+UDTE-2 rat karaciğerleri de çoğunlukla normal görünmekle birlikte bazı karaciğerlerin bazı bazı bölgelerinde DEN grubundakine benzer şekilde fakat daha hafif düzeyde ince granüler bir görünüm dikkati çekti (Şekil 10).

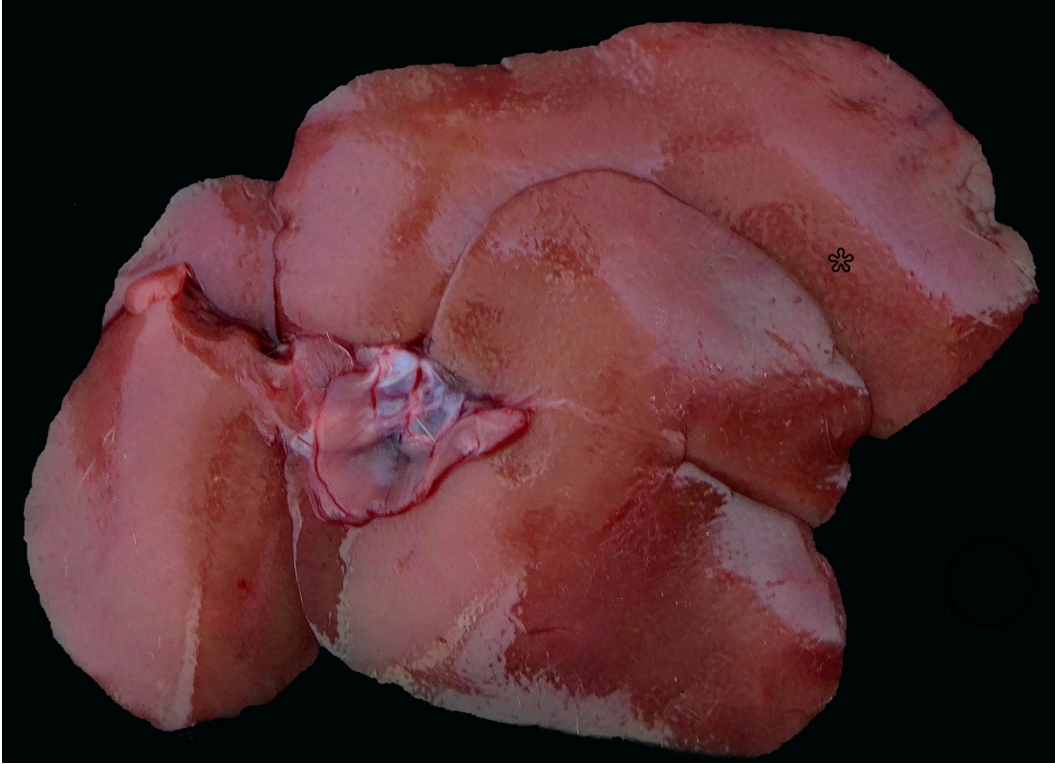
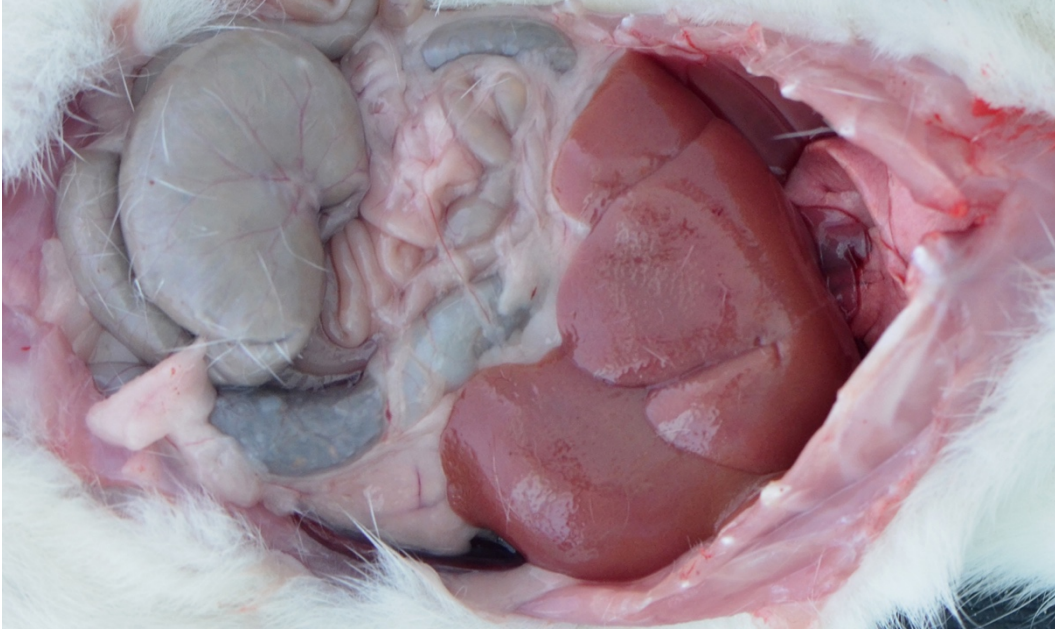
Makroskopik şekiller



Şekil 8. Kontrol grubu: Karaciğerin normal görünümü izlenmekte.



Şekil 9. DEN Grubu: Karaciğerde kısmen büyüme, kenarlarında kütleşme, daha koyu renk ve yüzeyinde ince granüler bir görünüm izlenmekte.



Şekil 10. DEN+UDTE-1 grubu: Karciğer çoğunlukla normal görünmekle birlikte bazı bölgelerinde DEN grubundakine benzer, fakat hafif ince granüler bir yüzey (*) izlenmekte.

4.4. Histopatolojik Bulgular

İncelemeler sonucunda, grupların karaciğerlerinde gözlenen morfolojik değişiklikler Tablo 6’da özetlendi ve gruplar arasındaki farklar belirtildi.

4.4.1. Grup A (Kontrol): Bütün ratlarda karaciğerin normal histolojik görünümü gözlemlendi (Şekil 11-12).

4.4.2. Grup B (DEN): Rat karaciğerlerinde tümöral hücre proliferasyonlarına rastlanmadı, ancak hepatosellüler karsinomların histolojik prokürsörleri (öncü lezyonları) olarak kabul edilen büyük ve küçük hücre değişimleri ile karakterize displazik hepatositler yaygın olarak görüldü. Ayrıca hidropik ve/veya yağ dejenerasyonu, safra kanalı hiperplazisi, yangısal hücre infiltrasyonları, fibrozis ve kolestazis en sıklıkla gözlenen lezyonlardı.

Hepatositlerdeki displazik değişiklikler özellikle vena sentralislerin çevresinde daha belirgin olduğu ve çoğunlukla midzoanal bölgeleri, hatta bazen portal alanları da kapsadığı görüldü (Şekil 13). Vena sentralislerin çevresindeki bu displaziler çoğunlukla küçük hücre değişimleri şeklinde olduğu dikkati çekti. Küçük hücre değişimleri, hepatositlerin çekirdeğinde daha büyük ve koyu bazofilik boyanmış çekirdekçik oluşması, marjinal hiperkromazi ve belirgin veziküler görünümün ortaya çıkmasıyla, sitoplazmalarında ise sitoplazmanın koyu bazofilik ya da soluk boyanması ve sitoplazmik yapıların ince toz haline gelmesiyle (sitoplazmalizis) karakterizedydi (Şekil 14). Büyük hücre değişimi gösteren hepatositlerde; çekirdek sitoplazma oranının çekirdek lehine bozulmuş olduğu, çekirdeğin değişen oranlarda daha büyük ve farklı morfolojik yapılarda (karyositomegali) olduğu, daha koyu boyandığı ve çok sayıda farklı büyüklüklerde çekirdekçiğe sahip olduğu belirlendi (Şekil 15). Karaciğer parankiminde bir ya da birkaç hepatositde veya çok sayıda hepatosit topluluklarında hidropik dejenerasyonuna rastlandı. Dejenerasyonlar sonucunda, hepatositlerin oluşturduğu remark kordonlarının dizilişi bozulmuş ve sinüzoidler daralmıştı (Şekil 16). Bu alanlarda ayrıca yer yer intrahepatik kolestazis dikkati çekti. Vena sentralisler çevresinde ve portal bölgelerde bağ doku artışı (fibrozis) saptandı. Portal ve periasiner fibrozis alanlarının çevresinde tek tük olarak hepatositlerin şiddetli balonumsu dejenerasyona uğradığı ve sonuçta bunların büyük kistik boşluklar haline geldiği dikkati çekti (Şekil, 15, 17, 18). Bu bölgelerde ayrıca

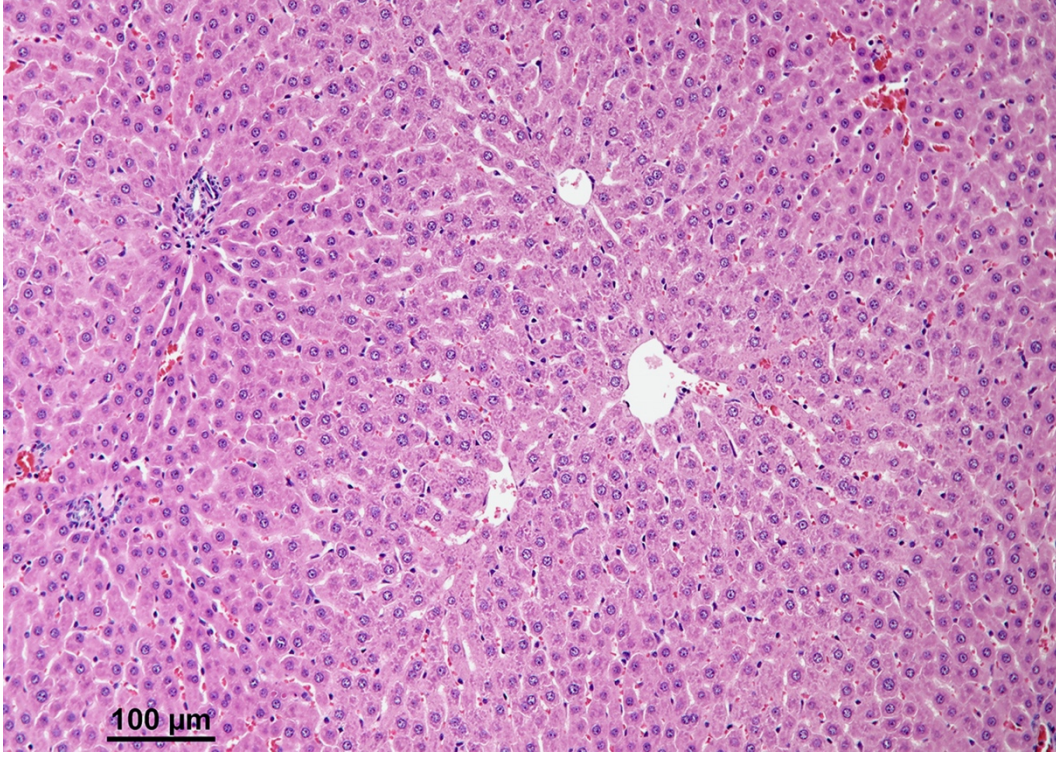
farklı aşamalarda dejenere-nekrotik hepatositlere de rastlandı. Bu dejenere-nekrotik değişikliklerin bir kısmı hiyalinizasyon veya tipik olarak hiyalin cisimcikleri şeklindeydi (Şekil 15, 18). Portal ve periasiner fibrozis bölgelerinden bazen, karaciğer kapsulasına kadar uzanan ince fibroz bantlar görüldü. Fibroz bantların ulaştığı karaciğer kapsulasında hafif ya da belirgin olabilen çöküntü gözlemlendi (Şekil 15, 17). Fibrozis gelişen portal bölgelerde safra kanallarında hiperplazi ve intrahepatik kolestazis belirlendi (Şekil 19). Ayrıca özellikle portal ve periasiner fibrozis bölgelerinde, daha az olarak ta parankimde lenfositik-eozinofilik hücre infiltrasyonları görüldü. İlaveten seyrek olmakla birlikte hepatositlerde makro ve mikroveziküler yağlanma, Kupffer hücrelerinde hiperplazi ve bazı sinüzoidlerde de dilatasyon belirlendi.

4.4.3. Grup C (UDTE): Kontrol Grubunda olduğu gibi karaciğerin normal histolojik yapısı saptandı.

4.4.3. Grup D (DEN+UDTE-1): Bu grup ratların tamamının karaciğerlerinde morfolojik değişikliklere rastlandı, fakat bu değişikliklerin Grup B (DEN) ile oranlandığında önemli ölçüde azaldığı görüldü. Bu grup ratların karaciğerlerinde geniş hidropik dejenerasyon alanlarının ve nekrotik değişikliklerin oluşmadığı saptandı. Lezyonların bazı lobüllerde olduğu ve daha az sayıda hücreden oluşan dejeneratif hücre odakları şeklinde olduğu belirlendi (Şekil 20). Fakat lobüllerin remark kordon yapısı bozulmamıştı. Ayrıca displastik değişimlerin daha çok küçük hücre değişimleri şeklinde ve özellikle periasiner bölgelerle sınırlı kaldığı dikkat çekti. Çok seyrek olmakla birlikte megakaryositik displastik hepatositlere de rastlandı. Ancak DEN Grubunda özellikle portal ve periasiner bölgelerde gözlenen hepatositlerin kistik boşluklar halindeki dejenarasyonu ve hiyalinize dejenere-nekrotik hepatositlere bu grup ratlarda rastlanmadı. Ayrıca safra kanalı proliferasyonu ve portal fibrozis görülmedi.

4.4.4. Grup E (DEN+UDTE-2): Bu grup ratların tamamında, Grup D ratlarının karaciğerlerinde gözlenen morfolojik değişikliklere hemen hemen benzer değişimler kaydedildi (Şekil 21) Ancak displastik değişimler ve dejenerasyonlar biraz daha belirgindi. fakat bu değişikliklerin Grup B (DEN) ile kıyaslandığında önemli ölçüde azaldığı görüldü. Ayrıca iki olguda safra kanalı proliferasyonuna rastlanırken, bir olguda da hafif portal fibrozis şekillendiği görüldü.

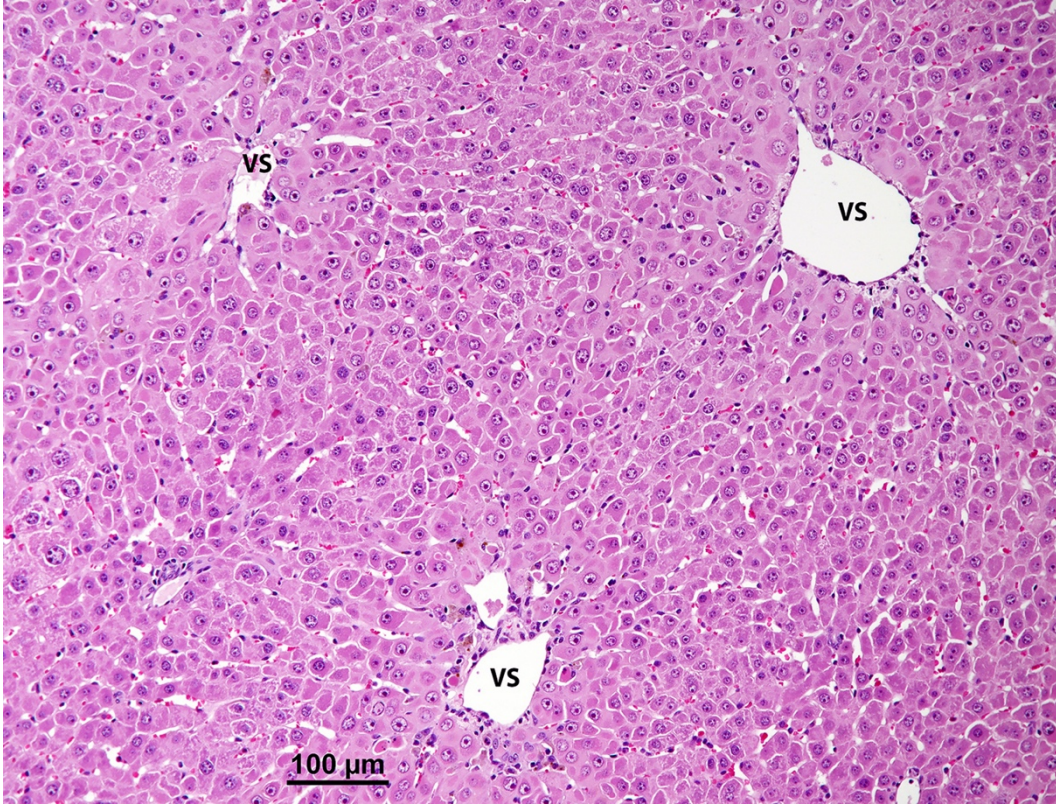
Mikroskopik şekiller



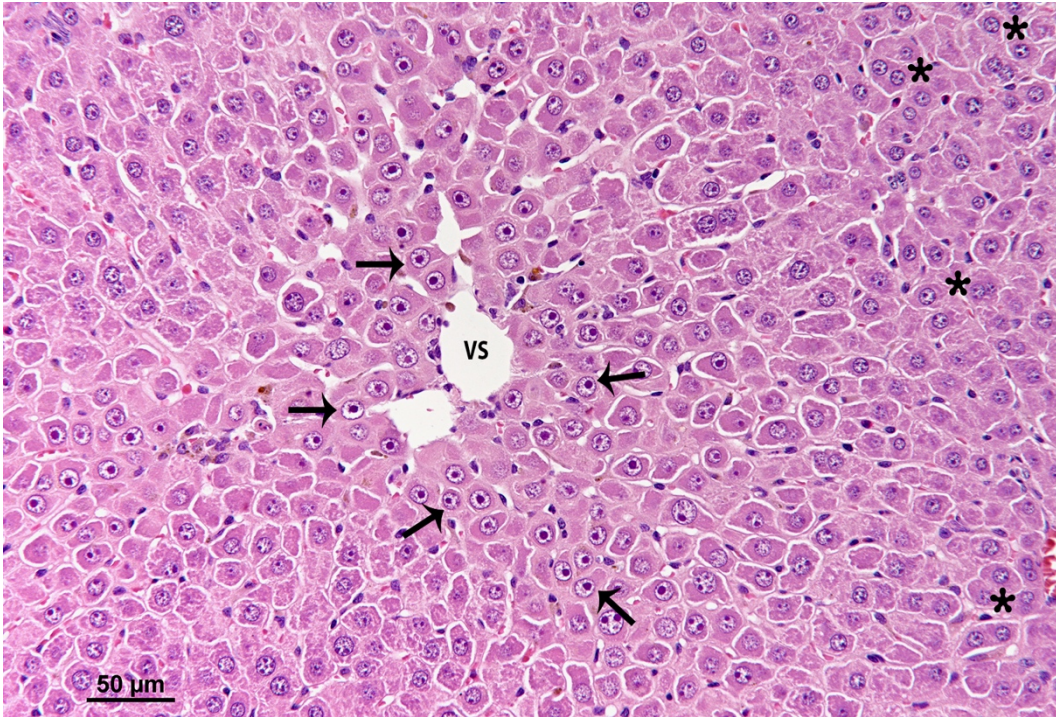
Şekil 11. Kontrol grubu: Karaciğerin normal histolojik görünümü. H&E. Bar; 100µm.



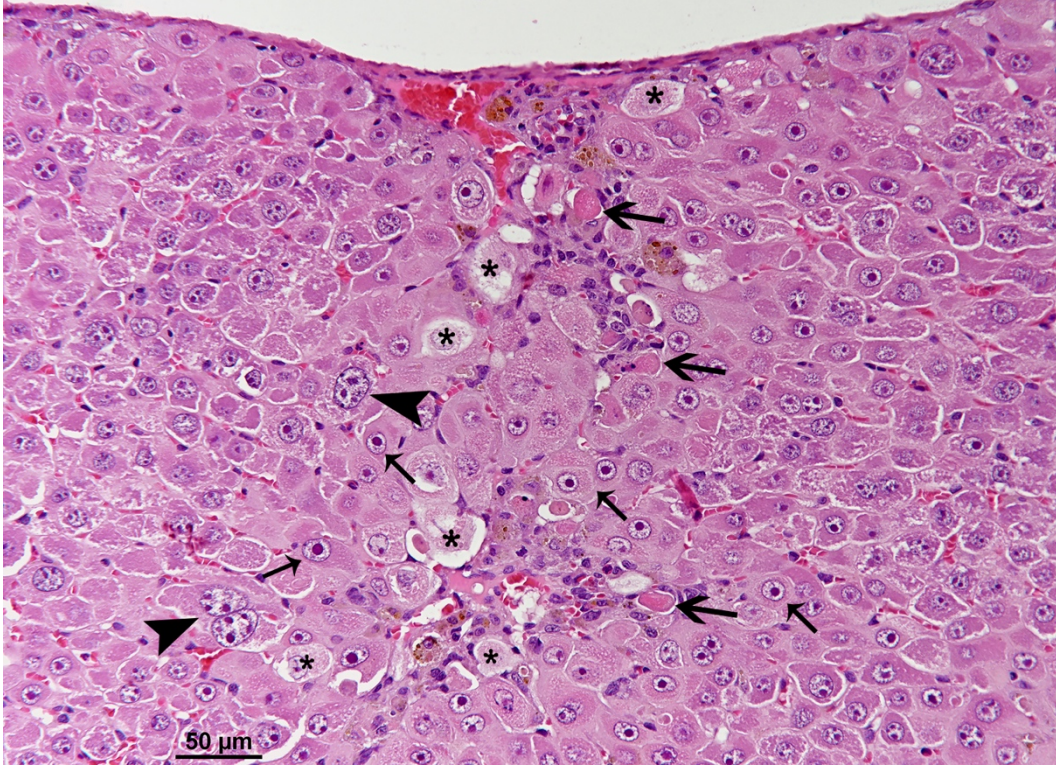
Şekil 12. Kontrol grubu: Karaciğerin normal histolojik görünümü. H&E. Bar; 100µm.



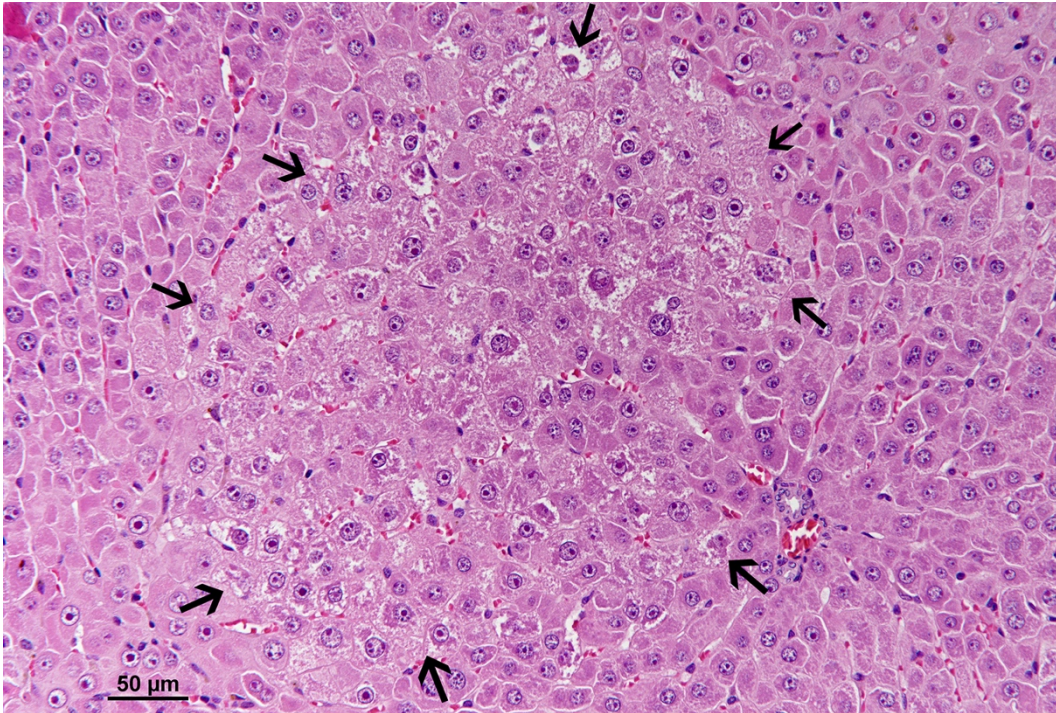
Şekil 13. DEN grubu: Vena sentralisler (VS) çevresindeki hepatositlerde displastik küçük hücre değişimleri izlenmekte. H&E. Bar; 100µm.



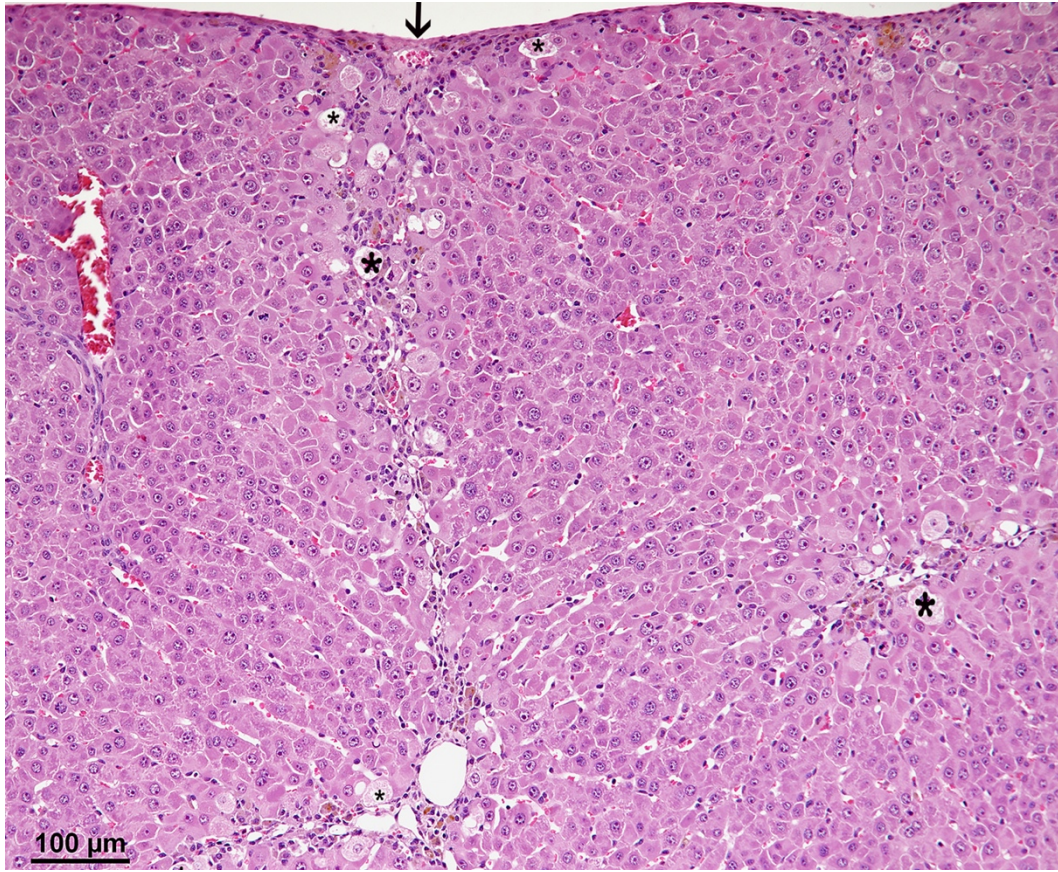
Şekil 14. DEN grubu: Vena sentralis çevresindeki hepatositlerde displastik küçük hücre (oklar) değişimleri, periğortal bölgelerde ise normal hepatositler (*) izlenmekte. H&E. Bar; 50µm.



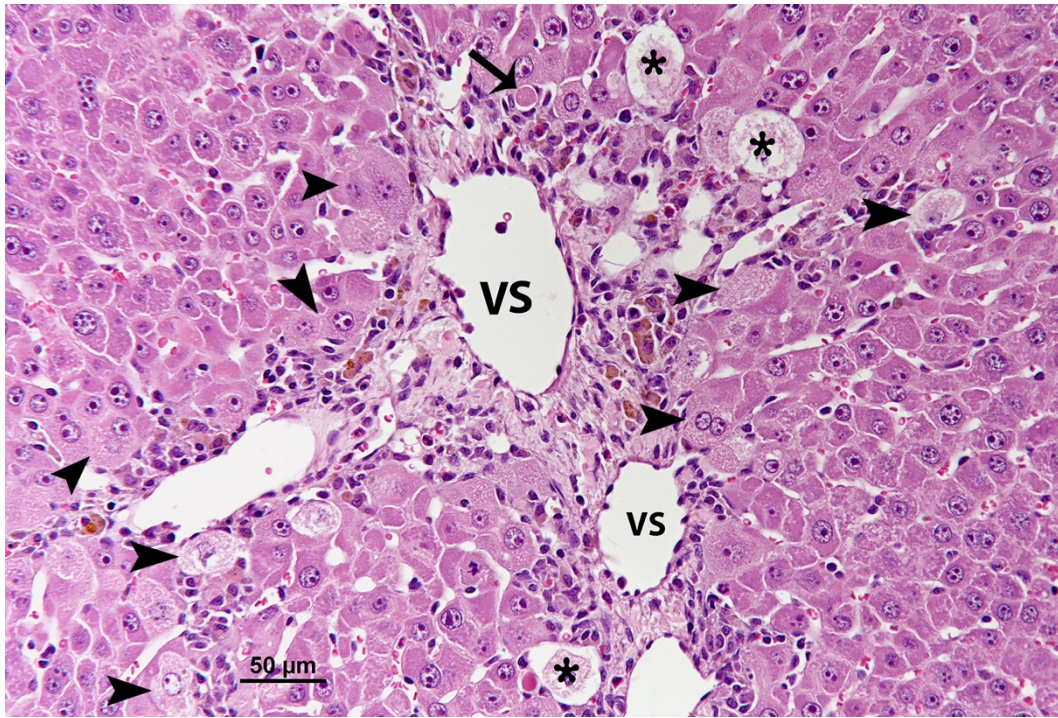
Şekil 15. DEN grubu: Hepatositlerde (oklar) displastik küçük hücre (oklar) ve megakaryositik büyük hücre değişimleri, dejenere-nekrotik (*) ve hiyalinize dejenere-nekrotik (oklar) hepatositler izlenmekte. H&E. Bar; 50µm.



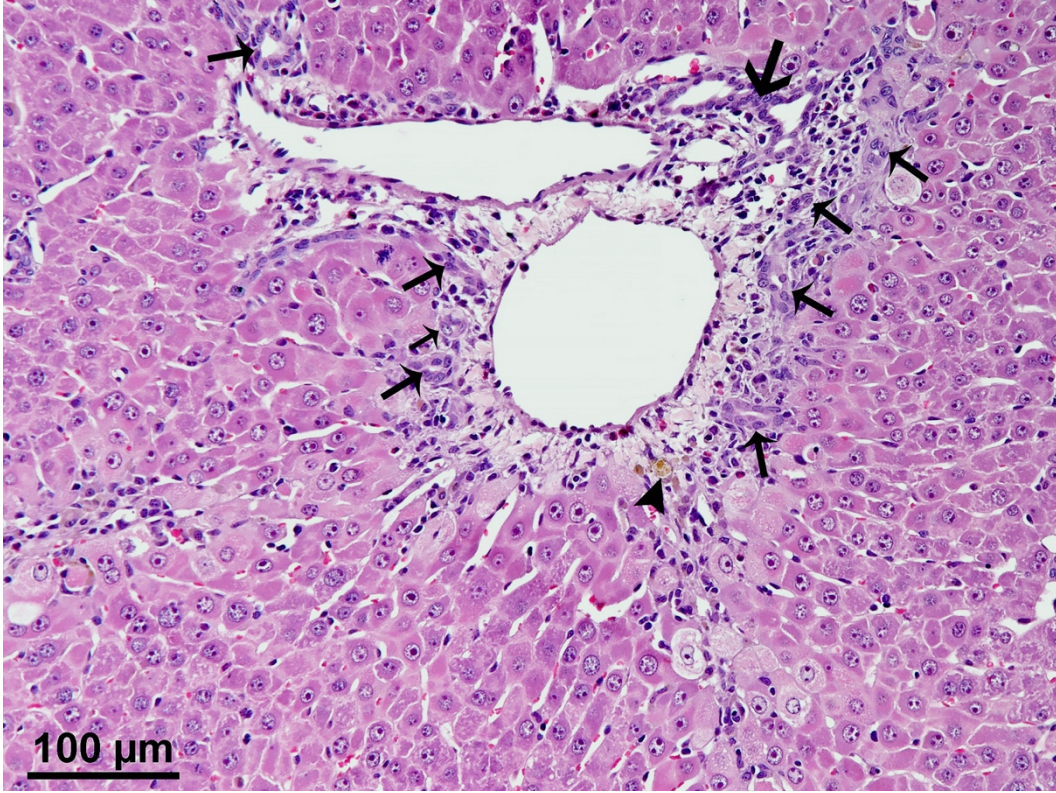
Şekil 16. DEN grubu: Karaciğer parnkiminde çok sayıda hepatositleri kapsayan hidropik dejenerasyon odağı (oklar). H&E. Bar; 50µm.



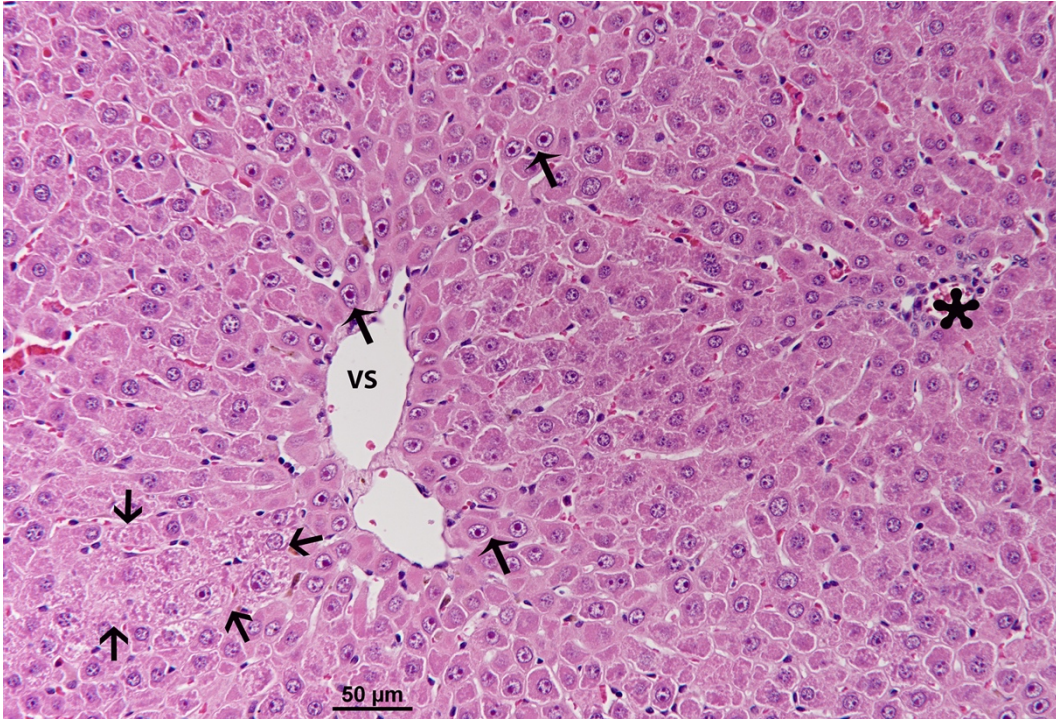
Şekil 17. DEN grubu: Karaciğer yüzeyindeki kapsül çöküntü (ok) bölgesinden vena sentralise kadar uzanan hafif fibrozis, mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde dejenerasyon (*). H&E. Bar; 100µm.



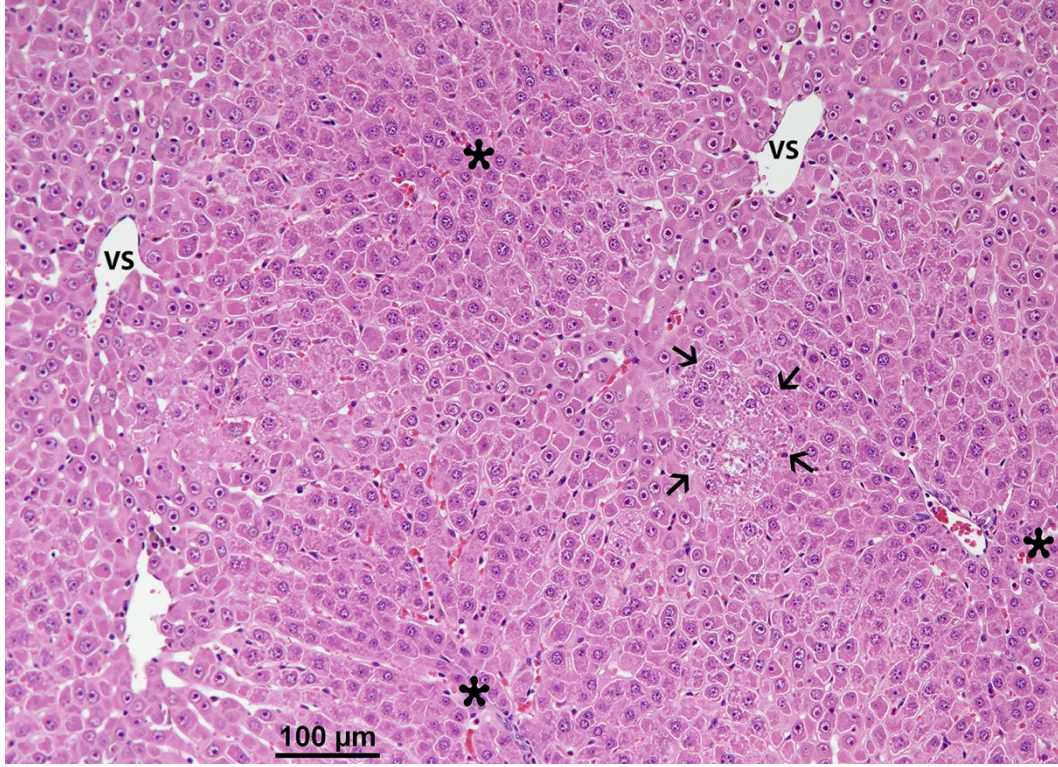
Şekil 18. DEN grubu: Karaciğerde vena sentralisler (VS) çevresinde fibrozis, kolestazis, mononükleer hücre infiltrasyonu, kistik dejenere hepatositler (*), hiyalin cisimciği (ok) ve farklı aşamalarda dejenere nekrotik hepatositler (ok başları). H&E. Bar; 50µm.



Şekil 19. DEN grubu: Karaciğerde portal bölgede yeni proliferatif safra kanalları, portal ven çevresinde gevşek bağ doku artışı (fibrozis), kolestazis (ok başı), az sayıda eozinofil lökositler de içeren yangısal hücre infiltrasyonu. H&E. Bar; 100µm.



Şekil 20. DEN+UDTE-1 Grubu: Vena sentralis çevresindeki hepatositlerde displastik küçük hücre (oklar) değişimleri, periportal bölgede ise normal hepatositler (*) ve az sayıdaki hepatositleri kapsayan dejenerasyon odağı (kalın oklar arası alan) izlenmekte. H&E. Bar; 50µm.



Şekil 21. DEN+UDTE-2 grubu: Vena sentralis çevresindeki hepatositlerde displastik küçük hücre değişimleri, periportal bölgede normal hepatositler (*) ve az sayıdaki hepatositleri kapsayan dejenerasyon odağı (oklar arası alan) izlenmekte. H&E. Bar; 100µm.

Tablo 6. Karaciğerde gözlenen lezyonlar ve bunların karşılaştırılması.

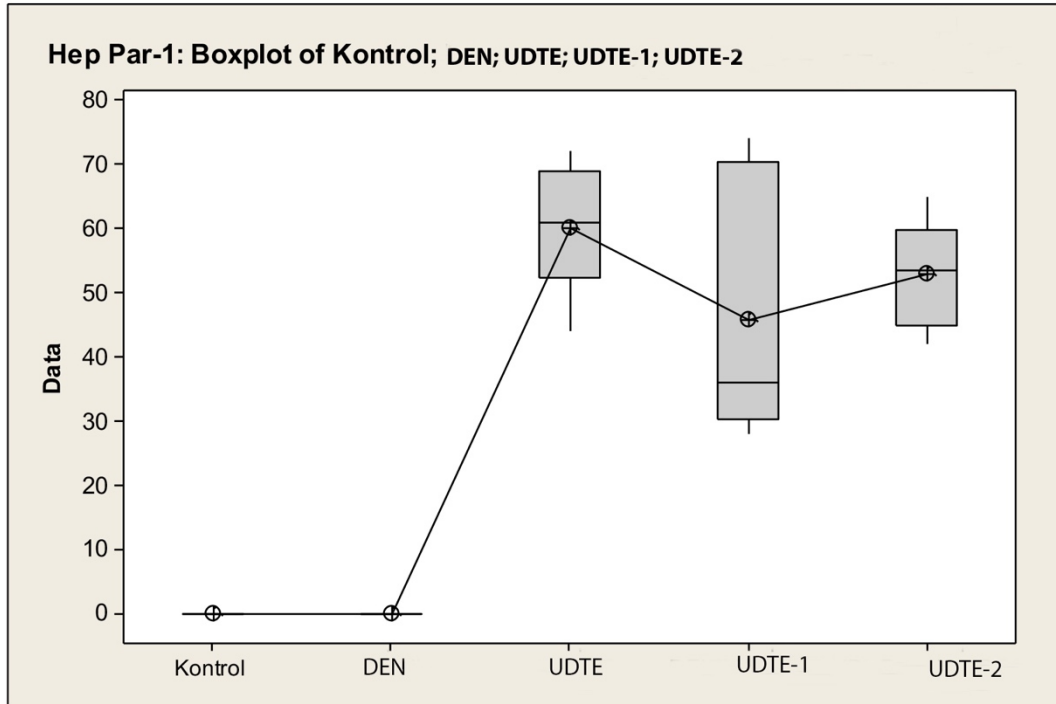
Lezyonlar	Kontrol	DEN	DEN+UDTE-1	DEN+UDTE-2	P Değeri
Büyüme ve granüler yüzey	-/8 ^b	7/8 ^a	1/8 ^b	2/8 ^b	
Hafif	*	7	2	2	*
Orta	*		*	*	
Şiddetli	*		*	*	
<i>Hidropik dejenerasyon</i>	-/8 ^b	8/8 ^a	8/8 ^c	8/8 ^c	
Hafif	*	1	7	6	**
Orta	*	5	1	2	
Şiddetli	*	2	*	*	
<i>Displazi</i>	-/8 ^b	8/8 ^a	8/8 ^c	8/8 ^c	
Hafif	*	3	8	6	**
Orta	*	3	*	2	
Şiddetli	*	2	*	*	
<i>Portal fibrozis</i>	-/8 ^b	8/8 ^a	-/8 ^b	-/8 ^b	
Hafif	*	1	*	*	*
Orta	*	7	*	*	
Şiddetli	*	*	*	*	
<i>Duktus proliferasyonu</i>	-/8 ^b	8/8 ^a	1/8 ^b	2/8 ^b	
Hafif	*	5	1	2	*
Orta	*	3	*	*	
Şiddetli	*	*	*	*	

a, b: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$). * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

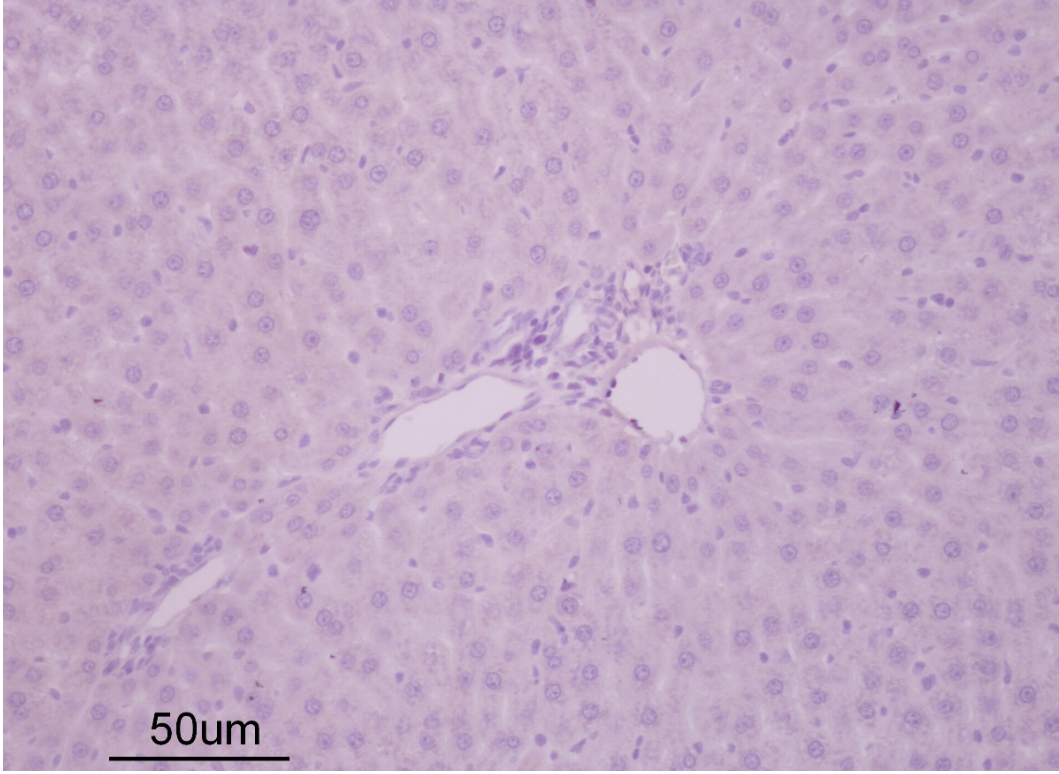
4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.5.1. Hepatosit spesifik antijen (HSA) / Hepatosit parafin-1 (Hep Par-1)

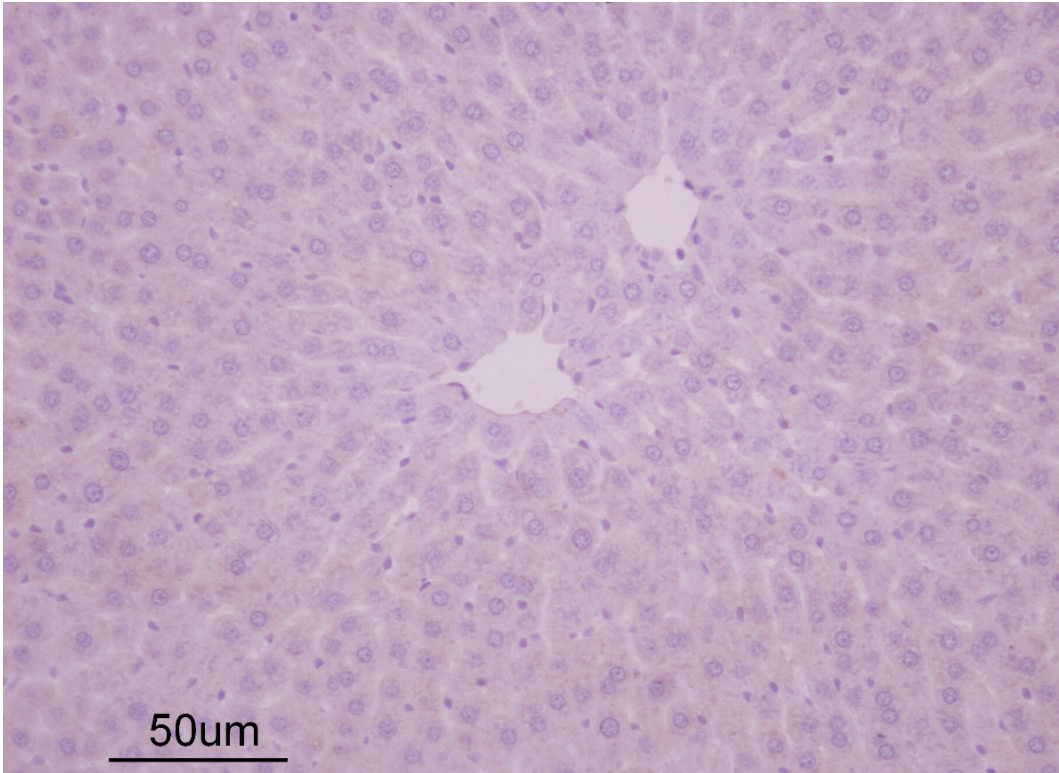
Tüm gruplara ait Hep Par-1 immunohistokimya boyamaları incelendi. DEN grubunda tespit edilen (60.1 ± 9.1) Hep Par-1 pozitif hücre sayısının ortalama değerinin DEN + UDTE-1 (45.6 ± 20.3) ve DEN+UDTE-2 (53 ± 8.2) gruplarına kıyasla daha fazla olduğu saptandı (Şekil 22). Kontrol (Şekil 23) ve UDTE (Şekil 24) gruplarında herhangi bir immun pozitif boyanma gözlenmedi. DEN (Şekil 25), DEN + UDTE-1 (Şekil 26) ve DEN + UDTE-2 (Şekil 27) gruplarında hepatosit sitoplazmasında Hep Par-1 pozitif immun boyanma gözlemlendi.



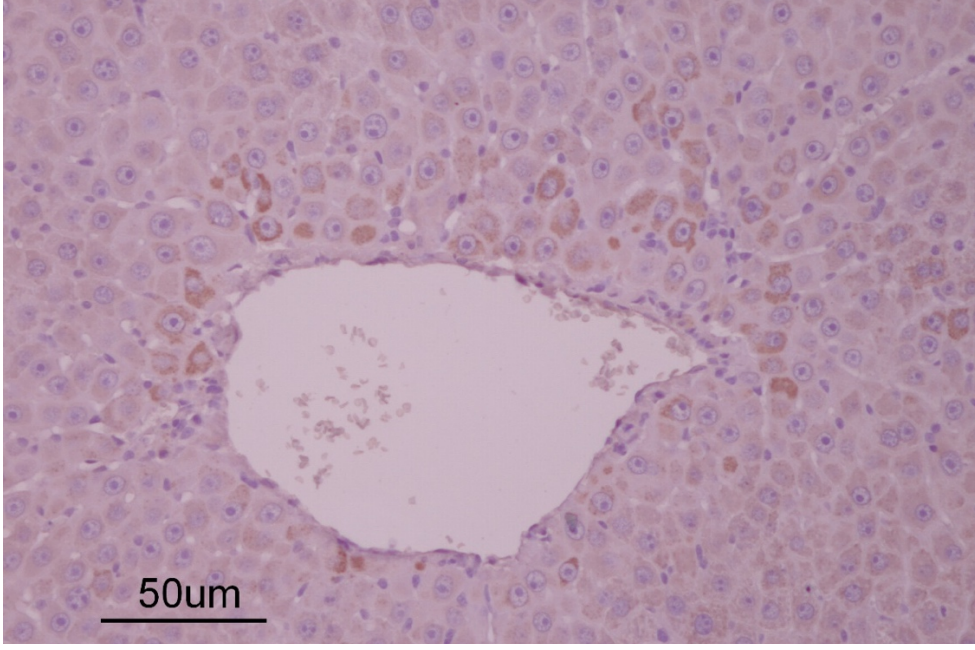
Şekil 22. Tüm gruplara ait ortalama Hep Par-1 pozitif hücre grafiği.



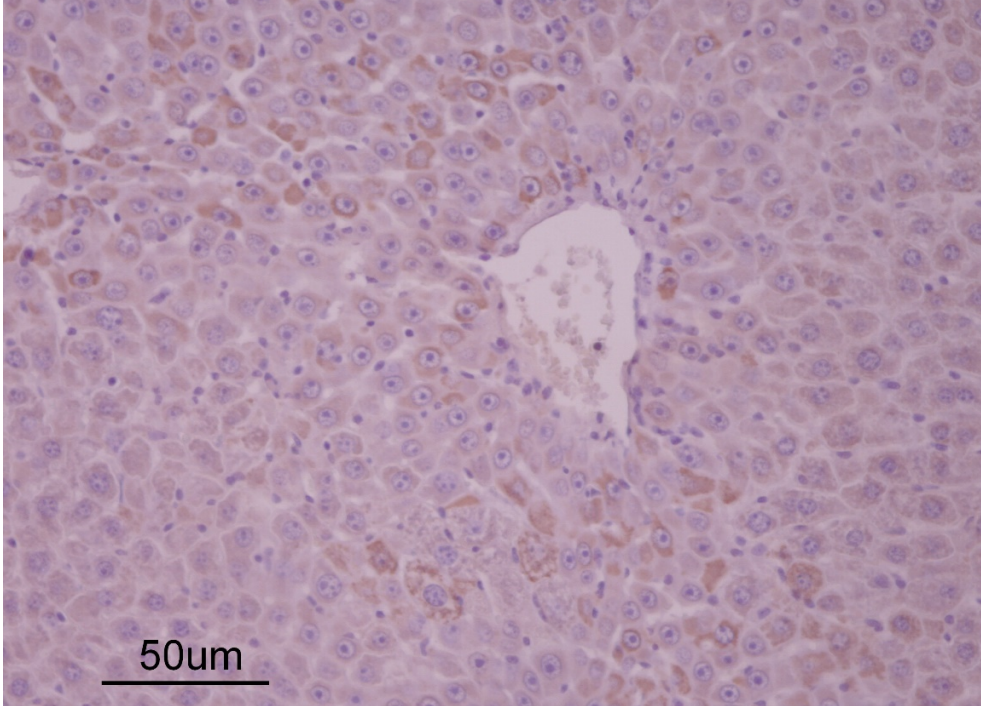
Şekil 23. Kontrol Grubu; karaciğer dokusu, Hep Par-1, IHK, Bar=50 µm.



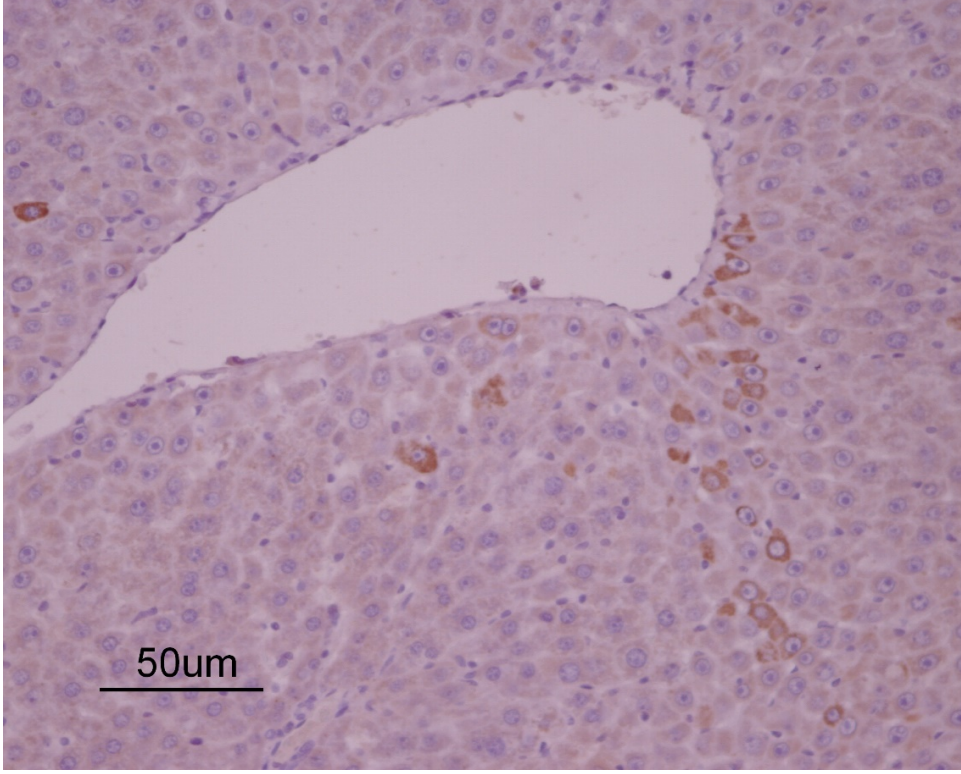
Şekil 24. UDTE grubu; karaciğer dokusu, Hep Par-1, IHK, Bar=50 µm.



Şekil 25. DEN grubu, karaciğer dokusu, Hep Par-1 pozitif hücreler, IHK, Bar=50 µm.



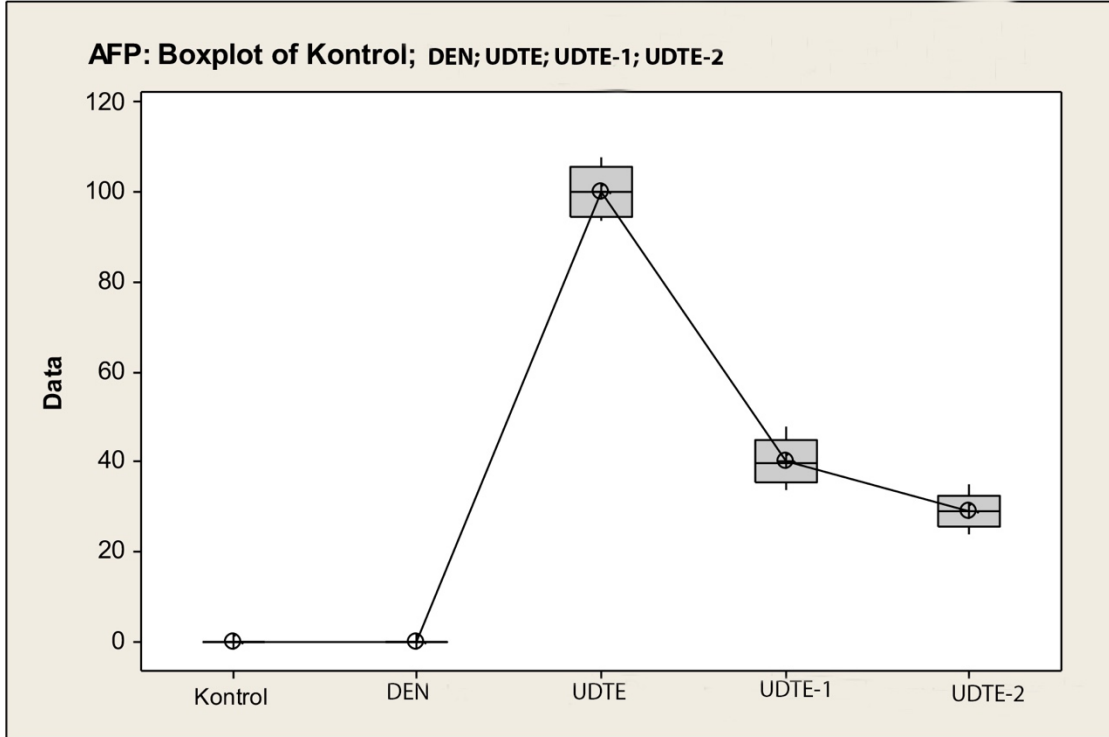
Şekil 26. DEN+UDTE-1 Grubu; karaciğer dokusu, Hep Par-1 pozitif hücreler, IHK, Bar=50µm.



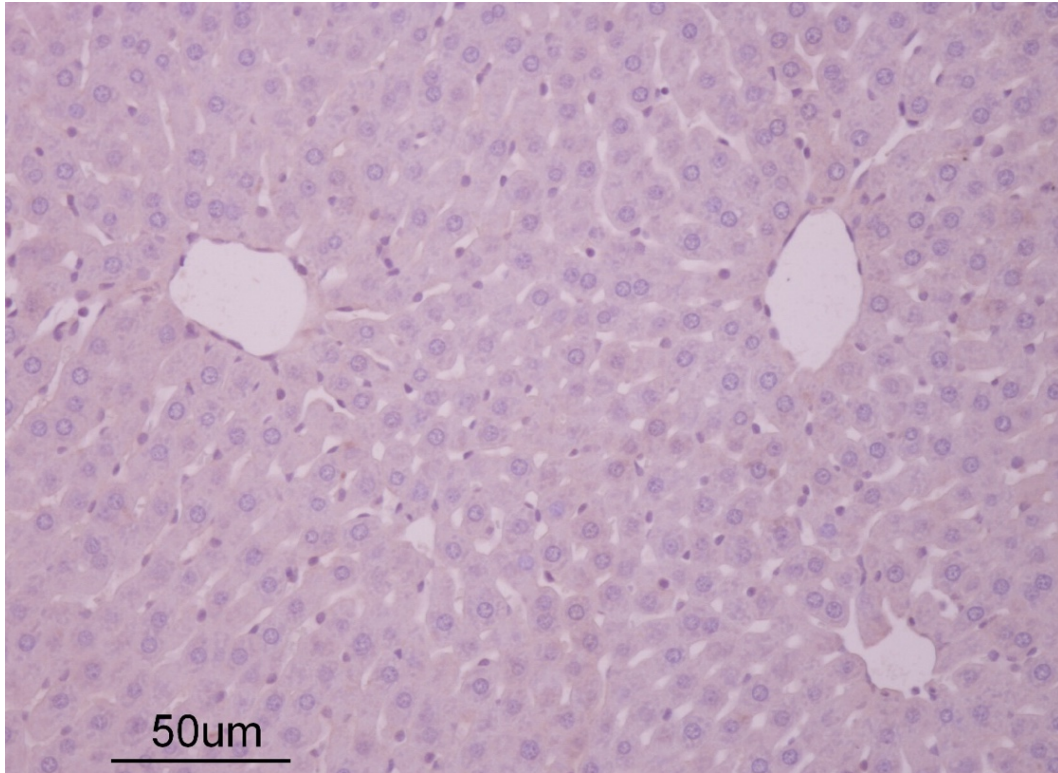
Şekil 27. DEN+UDTE-2 Grubu; karaciğer dokusu, Hep Par-1 pozitif hücreler, IHK, Bar=50 μm.

4.5.2. Alfa feto protein (AFP)

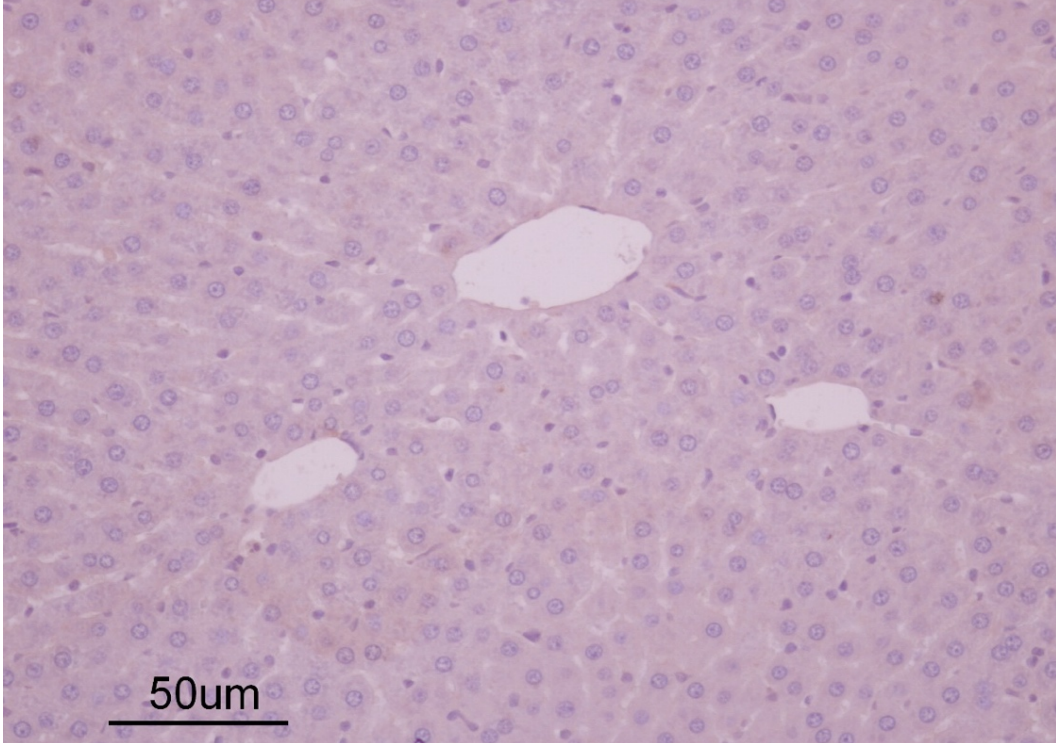
Tüm gruplara ait AFP immunohistokimya boyamaları incelendi. DEN grubunda tespit edilen (100.5 ± 5.5) AFP pozitif hücre sayısının ortalama değerinin DEN+UDTE-1 (40.3 ± 5.1) ve DEN+UDTE-2 (29.1 ± 4) grup değerlerine kıyasla daha fazla olduğu saptandı (Şekil 28). Kontrol (Şekil 29) ve UDTE (Şekil 30) gruplarında herhangi bir immun pozitif boyanma gözlenmedi. DEN (Şekil 31), DEN + UDTE-1 (Şekil 32) ve DEN + UDTE-2 (Şekil 33) gruplarında hepatosit sitoplazmasında AFP pozitif immun boyanma görüldü.



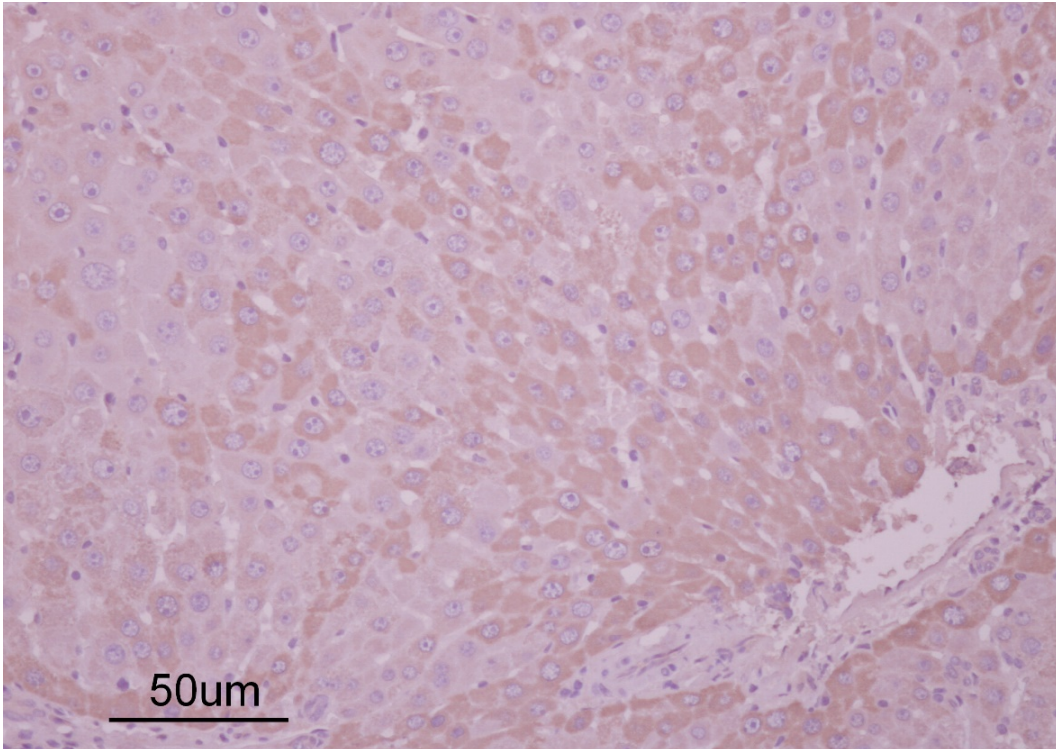
Şekil 28. Tüm gruplara ait ortalama AFP pozitif hücre grafiği.



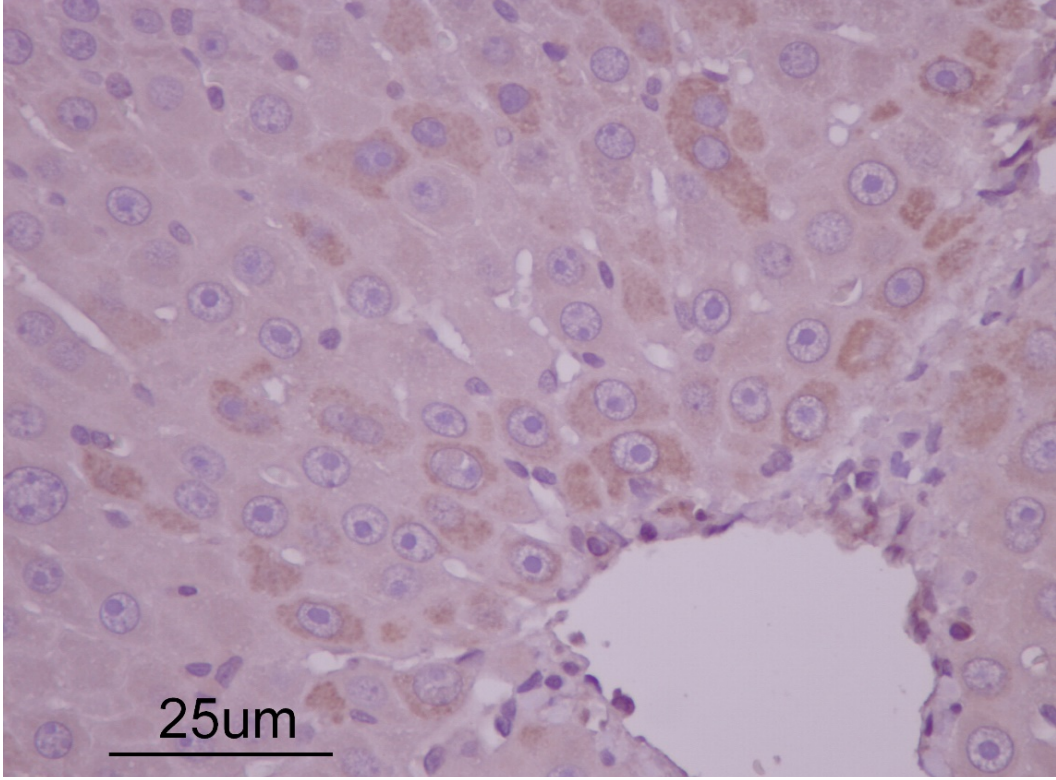
Şekil 29. Kontrol Grubu; karaciğer dokusu, AFP, IHK, Bar=50 µm.



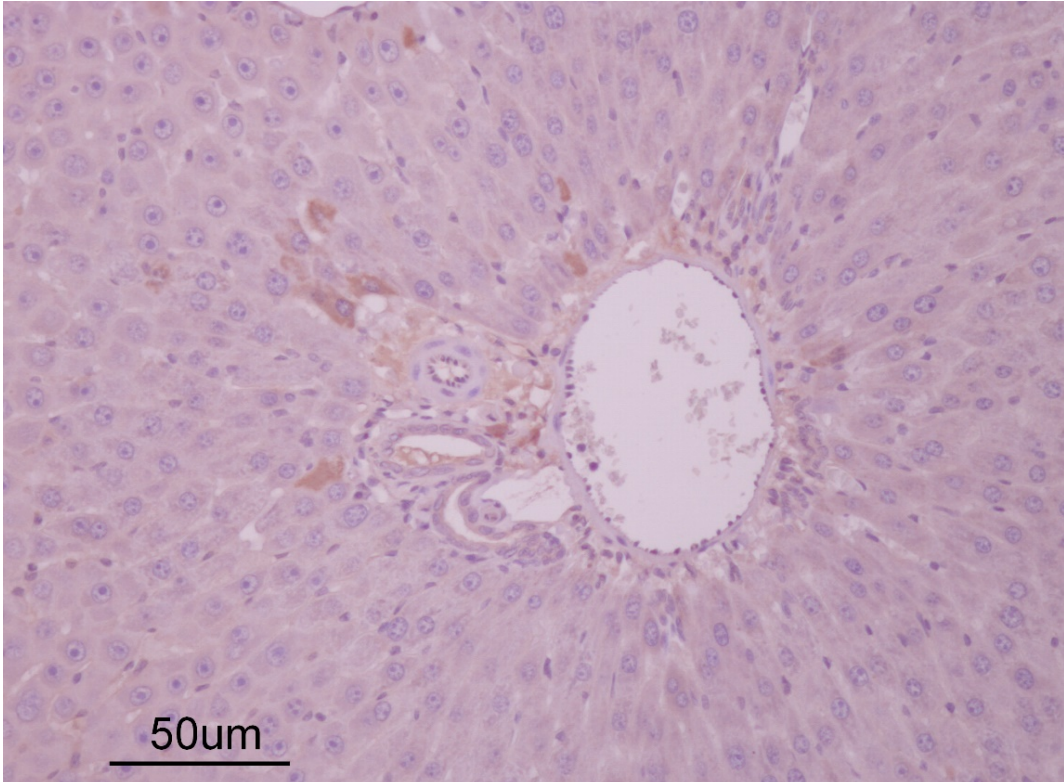
Şekil 30. UDTE Grubu; karaciğer dokusu, AFP, IHK, Bar=50 μ m.



Şekil 31. DEN Grubu; karaciğer dokusu, AFP pozitif hücreler, IHK, Bar=50 μ m.



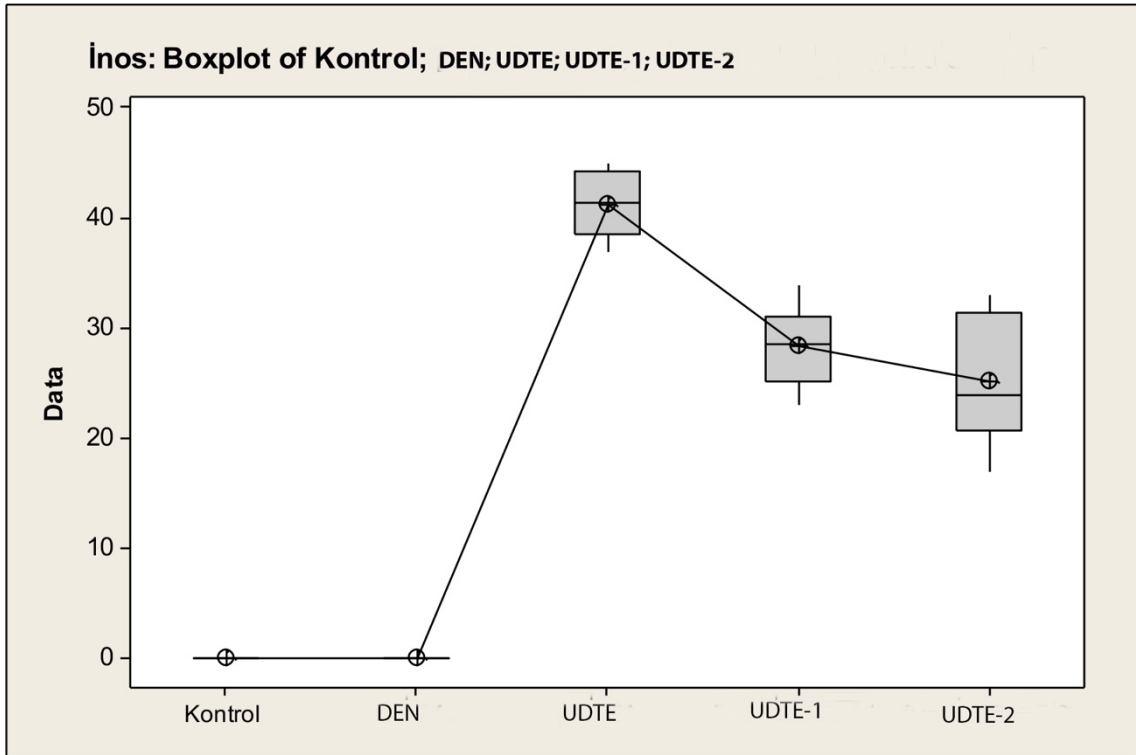
Şekil 32. DEN+ UDTE-1 Grubu; karaciğer dokusu, AFP pozitif hücreler, IHK, Bar=25 µm.



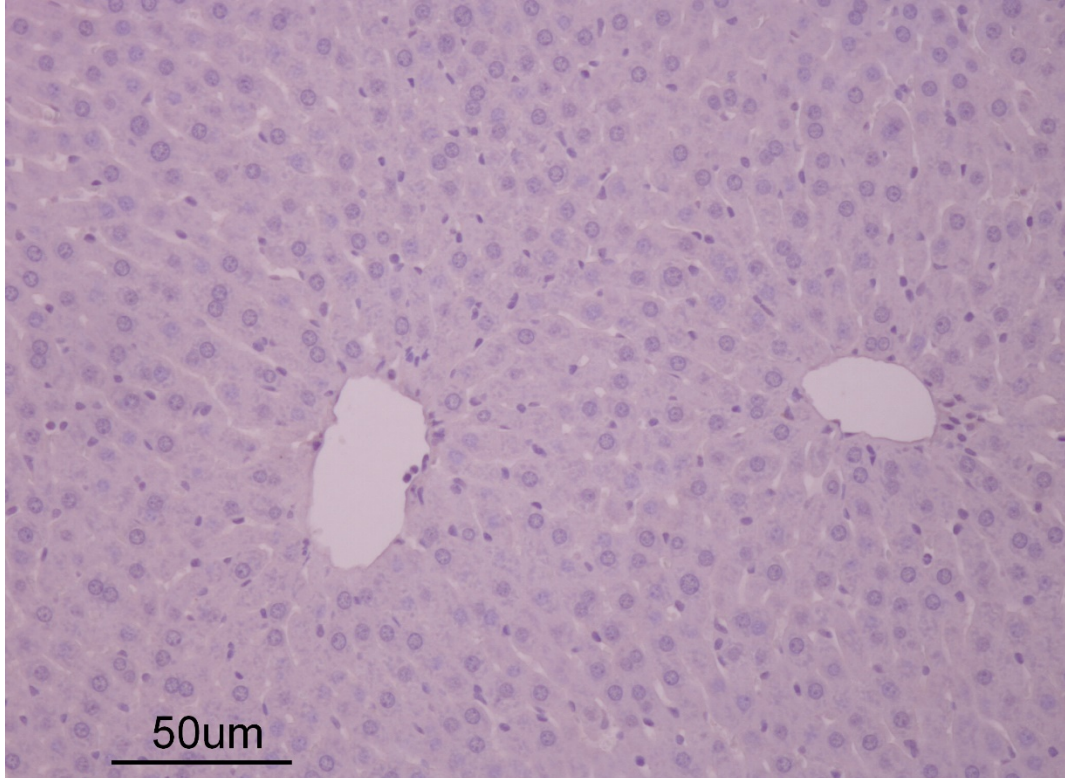
Şekil 33. DEN+UDTE-2 Grubu; karaciğer dokusu, AFP pozitif hücreler, IHK, Bar=50 µm.

4.5.3. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (İNOS)

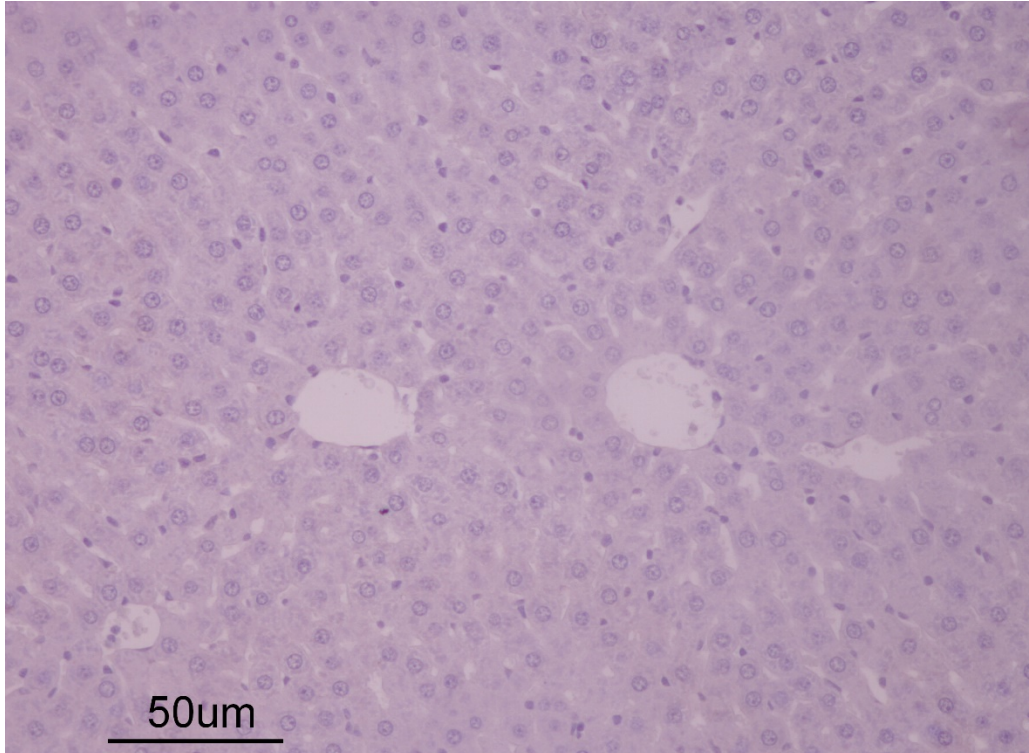
Tüm gruplara ait iNOS immunohistokimya boyamaları incelendi. Kontrol (Şekil 26) ve UDTE (Şekil 27) gruplarında herhangi bir immün pozitif boyanma gözlenmedi. DEN (Şekil 28), DEN+UDTE-1 (Şekil 29) ve DEN+UDTE-2 (Şekil 30) gruplarında hepatosit sitoplazmasında iNOS pozitif immün boyanma gözlemlendi. DEN grubunda (41.3 ± 3) tespit edilen iNOS pozitif hücre sayısının ortalama değerinin DEN+UDTE-1 (28.3 ± 3.7) ve DEN+UDTE-2 (25.7 ± 5.9) gruplarına kıyasla daha fazla olduğu saptandı (Şekil 34).



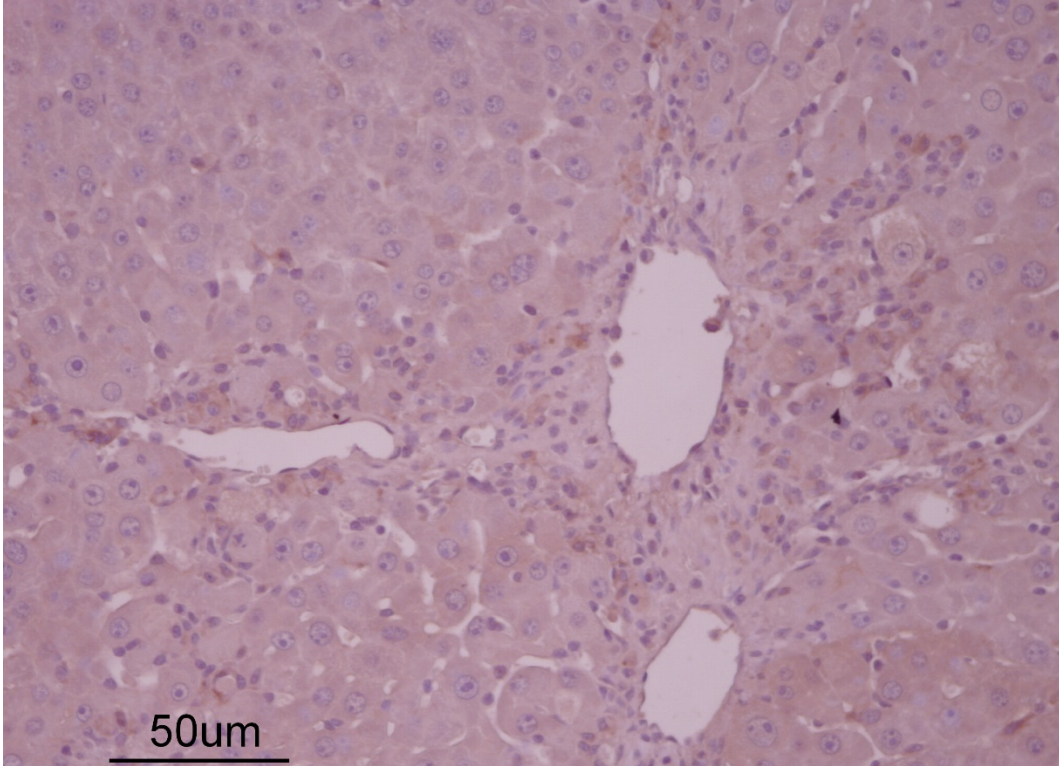
Şekil 34. Tüm gruplara ait ortalama iNOS pozitif hücre grafiği.



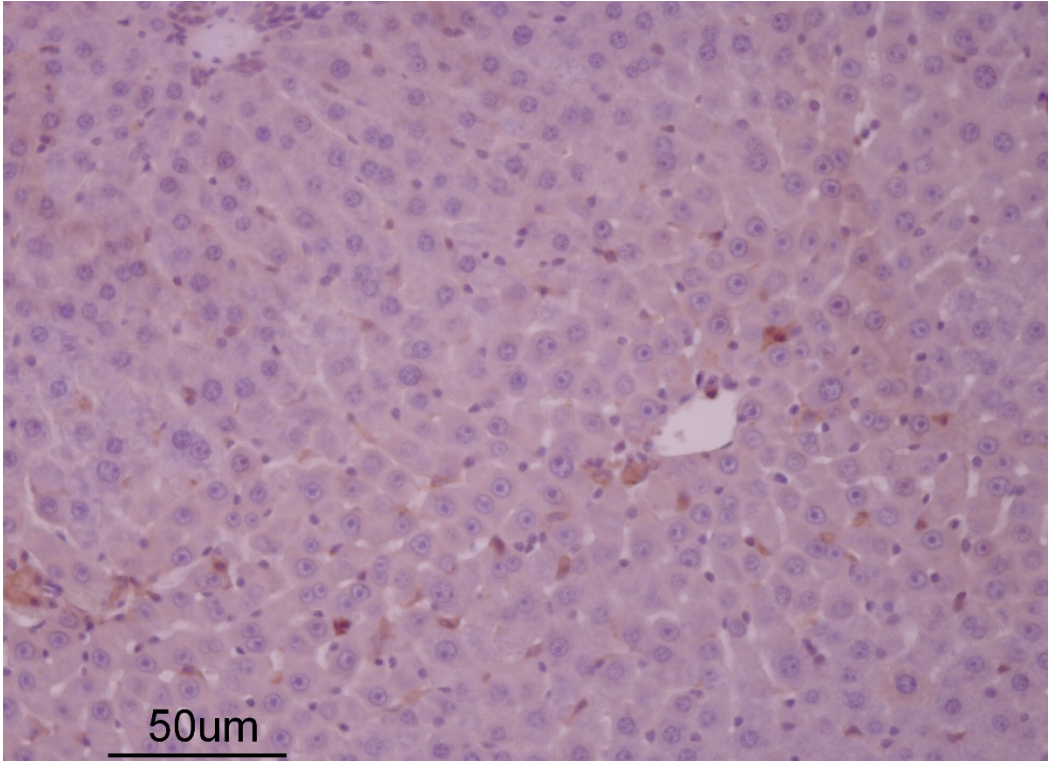
Şekil 35. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, iNOS, İHK, Bar=50 µm.



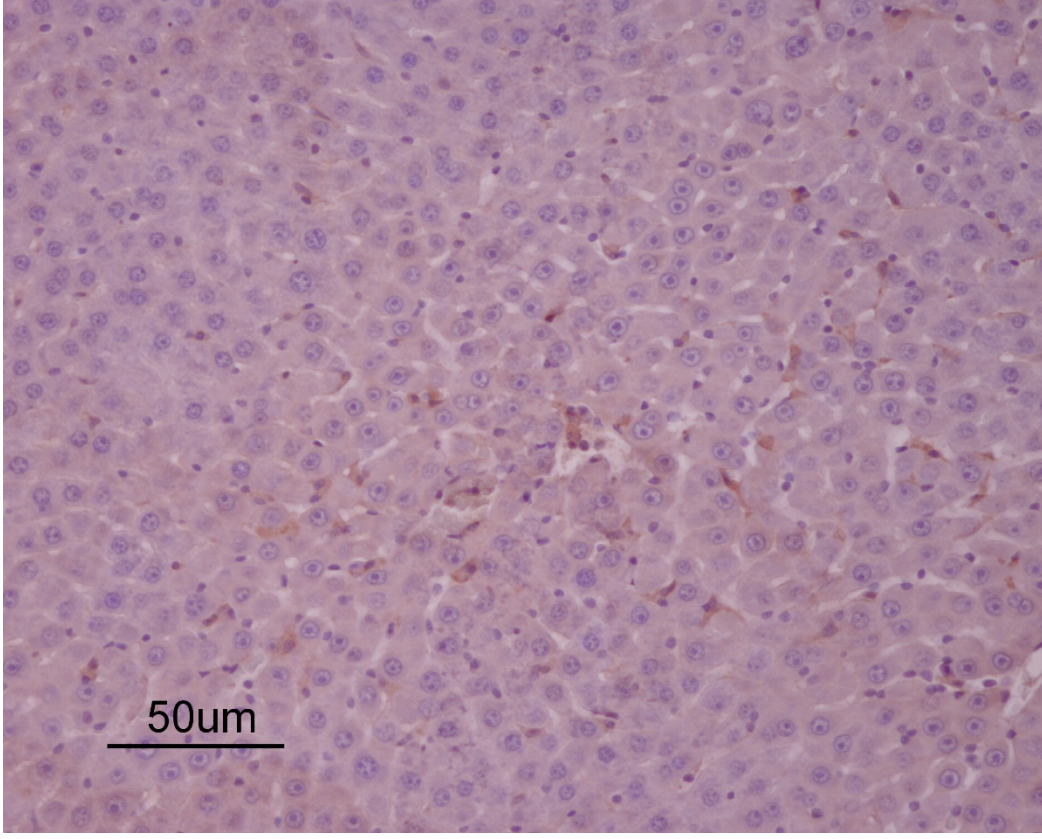
Şekil 36. UDTE grubu, karaciğer dokusu, iNOS, İHK, Bar=50 µm.



Şekil 37. DEN grubu, karaciğer dokusu, iNOS pozitif hücreler, İHK, Bar=50 μm.



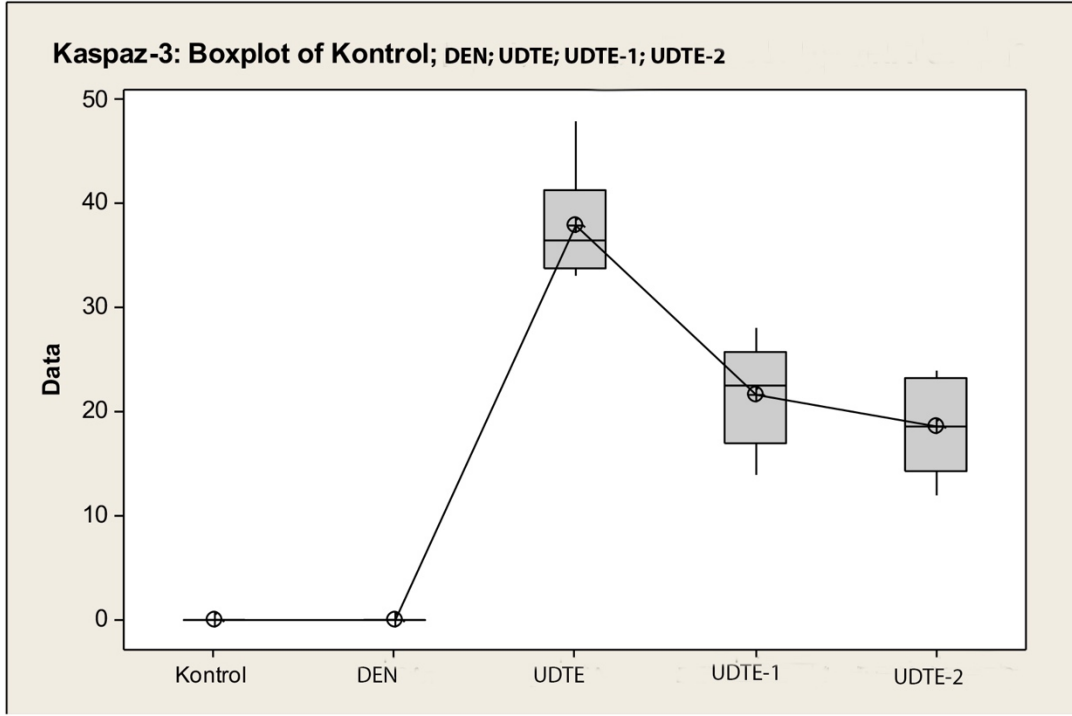
Şekil 38. DEN+ UDTE-1 grubu, karaciğer dokusu, iNOS pozitif hücreler, İHK, Bar=25 μm.



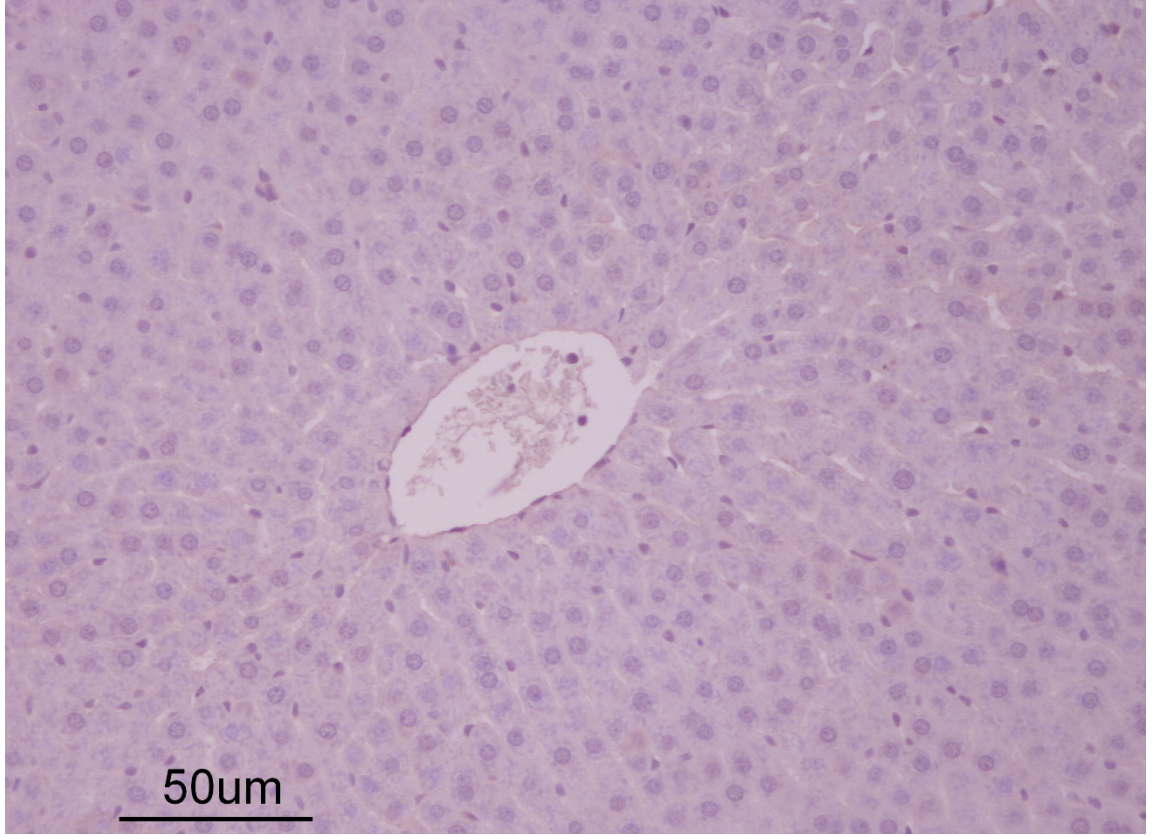
Şekil 39. DEN+UDTE-2 grubu, karaciğer dokusu, iNOS pozitif hücreler, İHK, Bar=50 µm.

4.5.4. Kaspaz-3

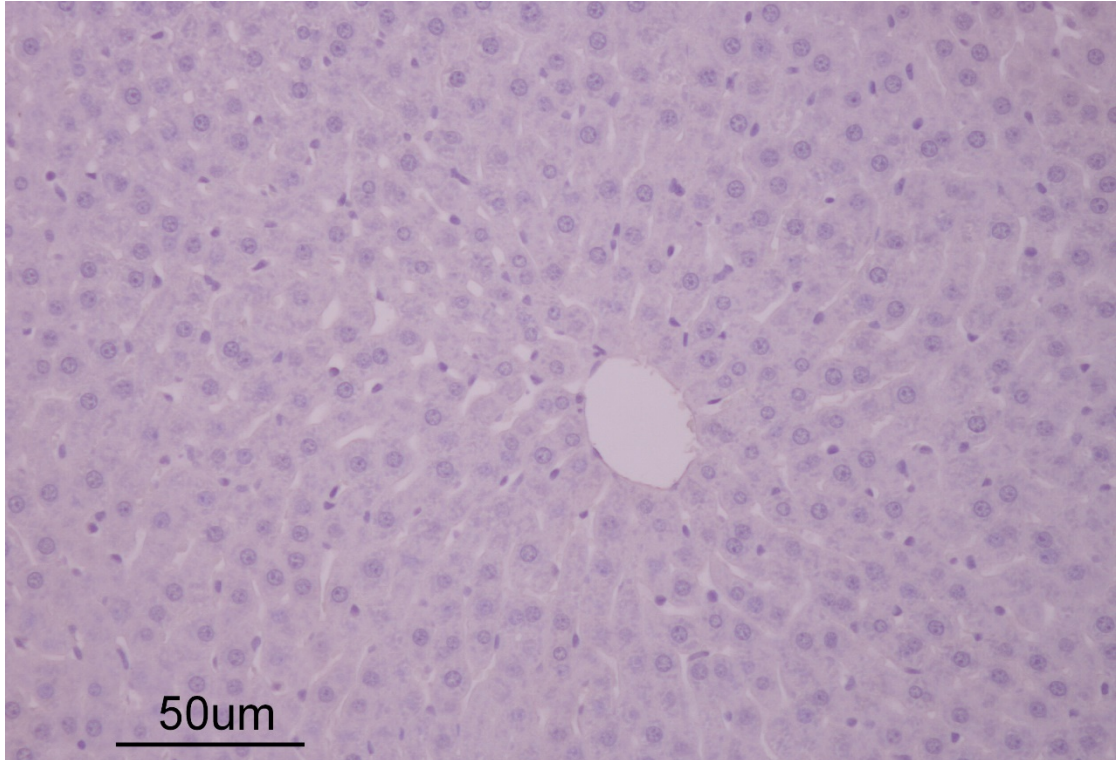
Tüm gruplara ait Kaspaz-3 immunohistokimya boyamaları incelendi. Kontrol (Şekil 31) ve UDTE (Şekil 32) gruplarında herhangi bir immun pozitif boyanma gözlenmedi. DEN (Şekil 33), DEN+UDTE-1 (Şekil 34) ve DEN+UDTE-2 (Şekil 35) gruplarında hepatosit sitoplazmasında iNOS pozitif immun boyanma gözlendi. DEN grubunda (37.8 ± 5.4) tespit edilen Kaspaz-3 pozitif hücre sayısının ortalama değerinin DEN+UDTE-1 (21.6 ± 5) ve DEN+UDTE-2 (18.5 ± 4.5) gruplarına kıyasla daha fazla olduğu saptandı (Şekil 40).



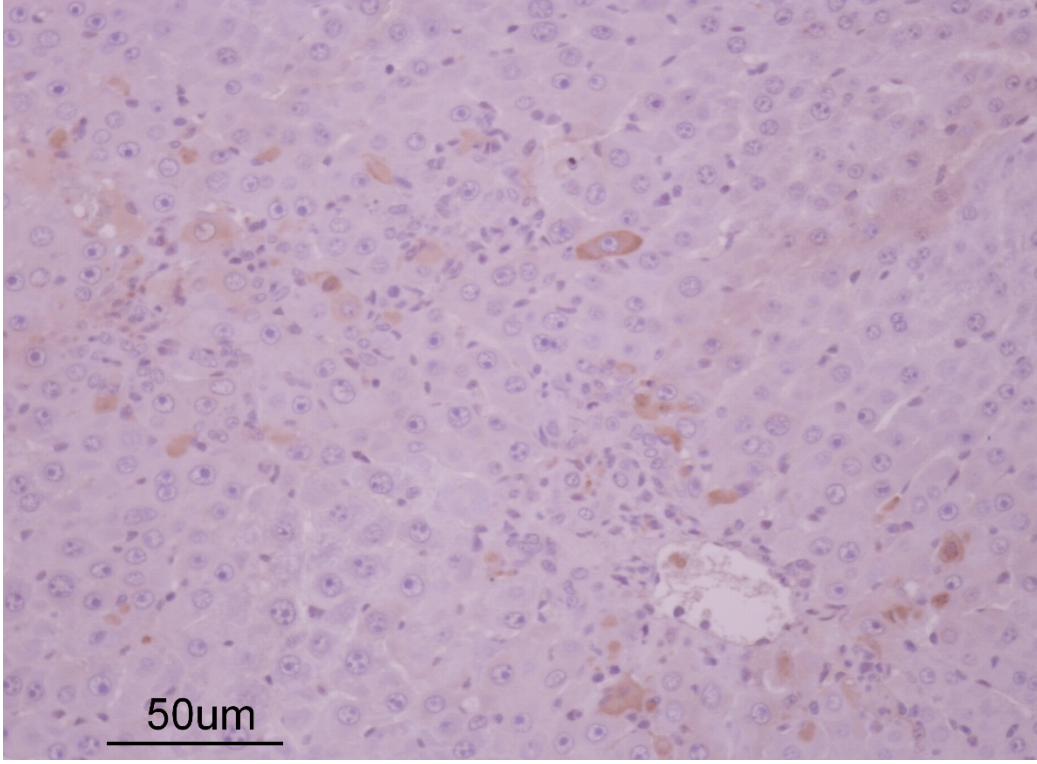
Şekil 40. Tüm gruplara ait ortalama Kaspaz-3 pozitif hücre grafiği.



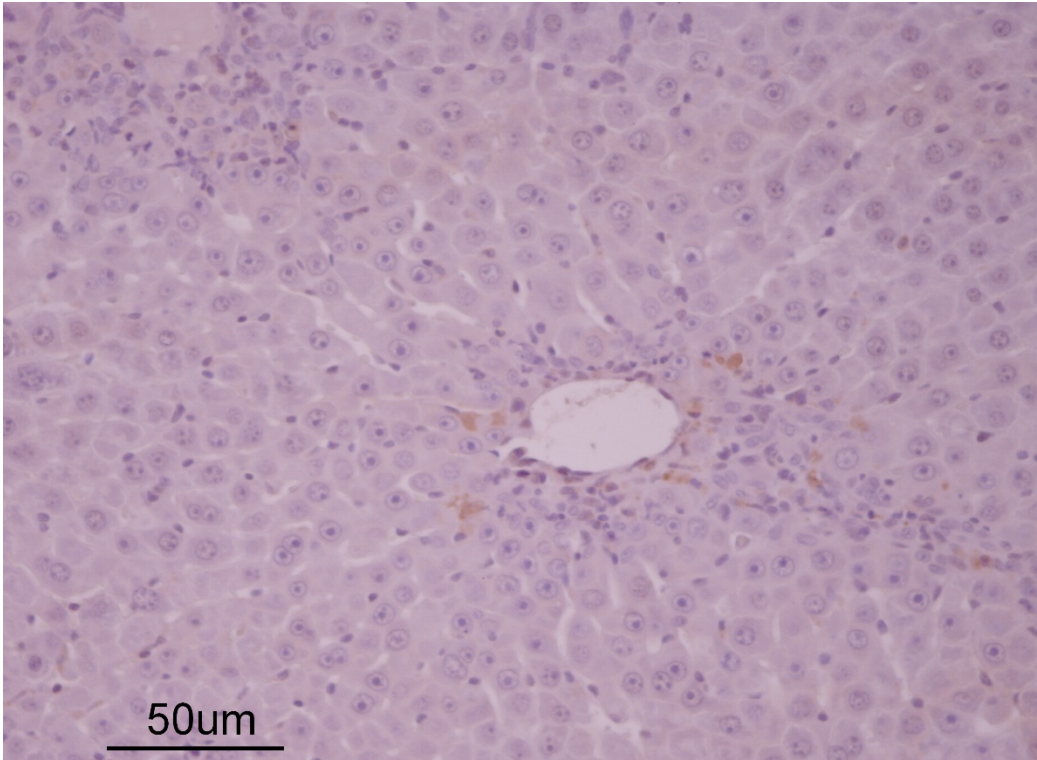
Şekil 41. Kontrol grubu, karaciğer dokusu, kaspaz-3, İHK, Bar=50 µm.



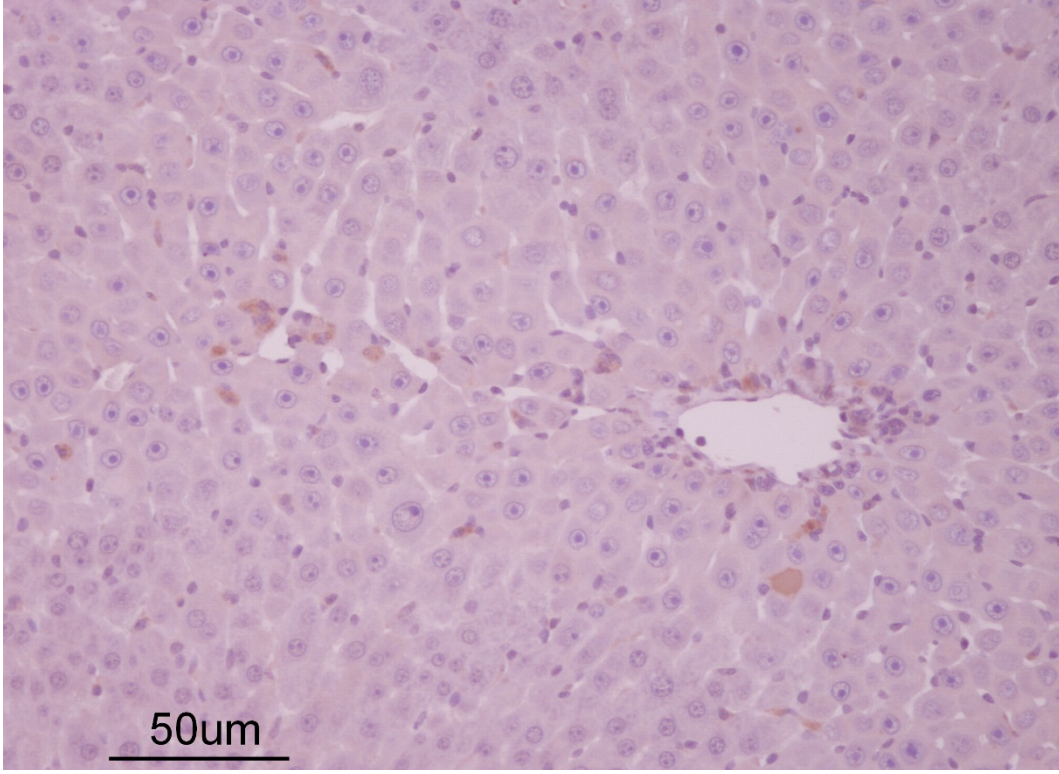
Şekil 42. UDTE grubu, karaciğer dokusu, Kaspaz-3, İHK, Bar=50 µm.



Şekil 43. DEN grubu, karaciğer dokusu, kaspaz-3 pozitif hücreler, İHK, Bar=50 μm.



Şekil 44. DEN+UDTE-1 grubu, karaciğer dokusu, kaspaz-3 pozitif hücreler, İHK, Bar=25 μm.



Şekil 45. DEN+UDTE-2 grubu, karaciğer dokusu, Kaspaz-3 pozitif hücreler, İHK, Bar=50 μm.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hepatosellüler karsinom; dünya genelinde ciddiyetini koruyan, ölüm oranlarının ve sayısının fazla olduğu bir kanser çeşididir (Shirakami ve ark., 2012). Hepatit B ve C viral enfeksiyonları, postnekrotik sirozlar, kronik alkol tüketimi, sigara kullanımı, diabetes mellitus, aflatoksinlere maruziyet, obezite ve nitrozaminler grubu kimyasallar HSK riskini artırmaktadır (Bruix ve Sherman, 2005; Lau ve Lai, 2008; Bishayee ve ark., 2010; Ferrell ve Kakar, 2011).

Günümüzde insanoğlu sürekli olarak kimyasallara ve ksenobiyotiklere (steroidler, eikosanoidler, farmasötikler, böcek ilaçları, çeşitli kirleticiler ve kanserojenler) maruz kalmaktadır. Karsinojenik, teratojenik, toksik ve mutajenik etkilere sahip olan nitrozaminler; gıda maddelerinde, ilaçlarda, kozmetik ürünlerde, pestisitlerde, kozmetik ürünlerde, sigara ve sigara dumanında bulunmaktadır (Rostkowska ve ark., 1998; Kujawska ve ark., 2011; Subramaniyan ve ark., 2014; Atakişi ve Merhan, 2017).

Urtica dioica; anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal, anti-toksik, antioksidan, hepatoprotektif, antidiyabetik ve hipoglisemik gibi özelliklere sahip olan ve dünyada alternatif tıpta yaygın olarak kullanılan bir bitkidir (Gülçin ve ark., 2004).

DEN ile oluşturulan hepatosellüler karsinom çalışmalarında, ratların vücut ağırlıklarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durum karsinojenite ve toksisiteye bağlı yem tüketiminde azalma sonucu olarak yorumlanmıştır (Dai ve ark., 2013; Karakurt, 2018). Yaptığımız bu çalışmada; DEN grubunun ağırlık artışında azalma, DEN ile birlikte UDTE verilen gruplarda ise DEN'in olumsuz etkilerini restore ederek vücut ağırlıklarını muhafaza ettiği tespit edilmiştir. Ancak bu oranlar istatistik olarak anlamlı değildi.

Vücutta bazı doku ve organlarda bulunan alaninaminotransferaz (ALT), aspartat-transaminaz (AST) ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzimlerinin aktivitelerindeki değişiklik hücre proliferasyonlarını yorumlamada önemli bir parametredir (Jaruga ve ark., 2001).

AST enzimi başta karaciğer ve böbrek olmak üzere beyin, akciğer, iskelet kası, kalp kası ve pankreas gibi organlarda bulunmaktadır. AST enzimi hücrenin hem

sitoplazmasında hem de mitokondrisinde bulunur. ALT ve AST enzimlerinin serum aktiviteleri bulundukları doku ve organların hasar alması durumunda artmaktadır. LDH enzimi ise hemen hemen vücuttaki tüm dokularda mevcuttur. Laktat üretimini katalize eden ve glikolizin anahtar enzimi olan LDH'nin beş izoenzimi bulunmaktadır. Bunlardan LDH5 enzimi karaciğerde çok fazla oranda bulunmaktadır (Büyükbaş ve İnal, 2006).

Aminotransferazlar karaciğer hastalıklarının teşhisinde sık kullanılan enzimlerdir. Bu enzimler, karaciğerde herhangi bir nedenle meydana gelen yangısal süreçte hücrelerden plazmaya geçerler ve serumdaki seviyelerinde artış olmaktadır (Ajith ve Janardhanan, 2006). Aynı şekilde LDH da karaciğer hasarlarında kana geçerek serumdaki miktarında artış meydana gelmektedir (Chu ve ark., 2005).

Birçok araştırmacı; ratlarda ya sadece DEN ile ya da DEN ile birlikte bir promotör ajan kullanarak oluşturduğu hepatotoksik etki ve hepatosellüler karsinoma çalışmalarında serumdan ALT, AST ve LDH seviyelerini analiz etmiştir. Yapılan bu çalışmalarda; DEN veya DEN ve promotör verilen ratların serumlarında ALT, AST ve LDH enzim seviyelerinde artış meydana geldiği bildirilmiştir. Bu enzimlerin düzeylerindeki artış; karaciğer dokusunda meydana gelen hasar sonucu serbest radikal üretiminin artması ile hücrelerin membran bütünlüğü bozularak bu enzimlerin sistemik sirkülasyona geçmesi olarak yorumlanmıştır (Shaarawy ve ark., 2009; Taha ve ark., 2010; El Mesallamy ve ark., 2011; Jahan ve ark., 2011; Sun ve ark., 2012; Karakurt, 2018).

Ratlarda CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı kullanılan *Urtica dioica* ekstraktının lipid peroksidasyonu, karaciğer enzimlerinden AST ve ALT'yi önemli derecede azalttığı bildirilmiştir (Kanter ve ark., 2005). Yapılan başka bir çalışmada *Urtica dioica*'nın AST, ALT ve LDH'ı olumlu yönde düzenlendiği vurgulanmıştır (Oto, 2007).

Yaptığımız bu çalışmada; DEN grubundaki ratlarda AST, ALT ve LDH düzeylerinin kontrol grubundaki ratlara göre yüksek olduğu görülmüştür. UDS grubundaki ratlarda kontrol grubu ratlarına göre daha düşük düzeyde olan bu enzimler, DEN ile birlikte UDS verilen ratlarda ise DEN grubundaki ratlara göre düşük düzeyde kaldığı görülmüştür. DEN grubunda AST, ALT ve LDH aktivitelerinin diğer bütün gruplardan daha yüksek olması, DEN'in karaciğer harabiyeti oluşturduğunu göstermektedir. UDS grubunda AST, ALT ve LDH aktivitelerinin hem kontrol hem de

diğer gruplardan daha düşük olması ve ayrıca DEN ile birlikte UDS verilen gruplarda AST, ALT ve LDH aktivitelerinin DEN grubuna göre düşük olması UDS'nin karaciğer harabiyetini önlediğine güçlü bir şekilde işaret etmektedir.

Antioksidanlar, serbest radikalleri metabolize ederek veya oluşumunu önleyerek hücrel redoks homeostazını koruyan maddelerdir (Poprac ve ark., 2017). Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit oksijen radikalini kullanarak hidrojen peroksit'e çeviren bir enzimdir. SOD hücrelerdeki süperoksit seviyesini dengede tutar ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederek oksidatif strese karşı savunma oluşturur (Gitto ve ark., 2009). SOD reaksiyonu sonucunda oluşan hidrojen peroksit katalaz aracılığı ile vücutta birikmesi engellenir. Dolayısıyla SOD enzimi ile katalaz enziminin beraber incelenmesi daha sağlıklı olacağı belirtilmiştir (Süleyman ve ark., 2018). SOD'un hücre dışı aktivitesi düşüktür ve fazla oksijen kullanan dokularda aktivitesi fazladır. Bu enzimin karaciğer hasarlarında serbest radikal artışına karşı koruyucu bir rol üstlendiği bildirilmektedir (Natio ve ark., 2010).

Katalaz (CAT), SOD enziminin aktivasyonu sonucu oluşan toksik hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırır. CAT özellikle karaciğer, böbrek, kan, kemik iliği ve müköz membranlarda bulunur ve oksidatif strese karşı hücreyi korumaktadır (Scandalios, 2002).

Glutasyon (GSH), karaciğer hücrelerini redoks durumunu belirleyen hücre içi bir enzimdir. GSH metabolik regülatör olarak ve detoksifikasyonda önemli işlevleri olan bir antioksidan metabolittir (Gressner ve Gressner, 2019).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Oksidatif strese karşı güçlü bir antioksidan olan GSH-Px, solunum patlaması sürecinde serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engelleyen bir enzimdir. Bu enzimin aktivasyonunda azalma meydana geldiğinde, hidrojen peroksidin artar ve şiddetli bir hücre hasarına neden olur (Akkuş, 2005).

Total antioksidan statünün (TAS) belirlenmesi antioksidanların tek tek ölçümünden daha belirleyicidir. Askorbik asit, ürik asit ve albümin plazmadaki total antioksidan kapasitenin %85'ini oluşturmaktadır. TAS, genel antioksidan durumunu

belirlemek için kullanılır. Aynı şekilde total oksidan statü (TOS); vücudun genel oksidasyon durumunu belirlemek için kullanılır (Hubel, 1999).

Malondialdehid (MDA), lipid peroksitlerin aldehid formudur. Araşidonik asidin (doymamış bir omega-6 yağ asidi) oksijenasyonu veya poliansature yağ asitlerinin enzimatik olmayan oksidatif yıkımı ile açığa çıkmaktadır (Bianchi ve ark., 1997). MDA, mutajenik ve karsinojenik özelliklere sahiptir. MDA'nın belirlenmesi; oksidatif stresin seviyesini, hücresel hasar ve lipid peroksidasyonun durumu hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar (Bernabucci ve ark., 2005).

DEN'in farklı sürelerde ve dozlarda uygulanmasıyla yapılan birçok çalışmada; karaciğer hasarında antioksidan kapasite, oksidatif stres, bazı antioksidan enzim ve protein seviyeleri ile lipid peroksidasyonunu yorumlamak için SOD, CAT, GSH, GSH-Px, TAS, TOS ve MDA değerleri incelenmiştir. Kan ve karaciğer dokusunda prooksidan durumu gösteren MDA seviyesinde artış (Al-Rejaie ve ark., 2009; Janani ve ark., 2010; Sayed-Ahmed ve ark., 2010) olduğu görülmüştür. Antioksidan sistemi belirlemek amacıyla GSH (Ramakrishnan ve ark., 2006; Al-Rejaie ve ark., 2009; Sayed-Ahmed ve ark., 2010), SOD (Ramakrishnan ve ark., 2006; Janani ve ark., 2010; Amin ve ark., 2011), CAT (Ramakrishnan ve ark., 2006, Al-Rejaie ve ark., 2009; Janani ve ark., 2010; Sayed-Ahmed ve ark., 2010; Amin ve ark., 2011), GSH-Px (Ramakrishnan ve ark., 2006; Al-Rejaie ve ark., 2009; Janani ve ark., 2010; Sayed-Ahmed ve ark., 2010; Amin ve ark., 2011) aktiviteleri incelenmiştir. Araştırmacılar bu sonuçlara göre DEN'in antioksidan sistemde baskılanmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Karakurt'un yaptığı çalışmada DEN verilen ratlarda TOS seviyesinin kayda değer ölçüde arttığı belirtilmiştir. TOS seviyesinin artmasını, DEN metabolizması sonucunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı sebebiyle oluşan oksidatif strese bağlı olduğu belirtilmiştir (Karakurt, 2018).

Çeşitli çalışmalarda *Urtica dioica*'nın güçlü antioksidan özelliklerine dikkat çekilmiştir. Ratlara CCl₄ verilerek oluşturulan karaciğer hasarına karşı *Urtica dioica* ekstratının GSH ve CAT aktivelerini arttırdığı bildirilmiştir (Joshi ve ark., 2015). Ratlarda doksorubisin verilerek oluşturulan karaciğer hasarına karşı kullanılan *Urtica dioica*'nın SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini önemli derecede artırdığı kaydedilmiştir (Erboğa ve ark., 2016). Aflatoksin uygulaması ile birlikte verilen *Urtica dioica*'nın, rat karaciğerlerinde GSH düzeyi ile SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde olumlu yönde

değişikliklere neden olduğu vurgulanmıştır (Yener ve ark., 2009). Yapılan başka bir çalışmada ise ratlara, CCl₄ ile *Urtica dioica* ekstraktı verildiğinde, sadece CCl₄ verilen gruba kıyasla TAS düzeylerinin arttığı ve TOS düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (Bitiren ve ark., 2010). Yapılan diğer çalışmalarda da *Urtica dioica*'nın MDA düzeyini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir ((Kanter ve ark., 2005; Genç, 2009).

Yaptığımız bu çalışmada hem serumdan hem de karaciğer dokusundan SOD, CAT, GSH, GSH-Px, TAS, TOS ve MDA değerleri analiz edilmiştir. Karaciğerde kanseri indüklemek için kullanılan DEN hem karaciğer hem de serum örneklerinde TAS, GSH, CAT, SOD ve GSH-Px düzeylerini azaltmış ve TOS ve MDA seviyelerini ise aktive etmiştir. Ancak DEN ile birlikte kullanılan UDS, antioksidan kapasiteyi artırmış ve oksidatif stresi ise baskılayabileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar DEN'nin antioksidan kapasiteyi azalttığını ve oksidatif stresi artırdığını, ancak DEN ile birlikte UDS kullanımının antioksidan kapasitenin artırılarak oksidatif stresi azaltılabileceğini göstermiştir.

Tümör markırları kanser hücreleri tarafından sentezlenen maddelerdir. Bunlardan CA 15-3, CA 125, CA 19-9, CEA ve AFP gibi markırlar, kanserli hastalara verilen ilacın tedavi tepkisini yorumlamada ve hastalığın sürecini belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır (Sarandakou ve ark., 2007).

Karbohidrat antijeni 15-3 (Ca-15-3), meme epitelyumunda bulunur. Ca-15-3 episialin olarak da bilinir ve yüksek moleküler ağırlıklı glikoprotein yapısında polimorfik bir epitelyal müsendir. Ca-15-3; meme tümörlerinde, karaciğer, pankreas, kolorektal ve akciğer kanseri hastalarında artmaktadır. Ca-15-3 gebelik ve laktasyon döneminde kan seviyesini etkilemez (Tatar, 1997). Karbohidrat antijeni 125 (Ca-125); OC 125 isimli monoklonal antikor özelliğinde bir glikoproteindir. Ca-125 molekülü karmaşık yapılıdır. Ca-125 müsinlerden daha az miktarda karbohidrat içerir. 7./5/ Ca-125 serumdaki seviyesi; karaciğer (%40-70), pankreas (%45-60), biliyer sistem (%35-46) ve kolorektal (%23) kanseri olgularında artmaktadır (Jacobs ve Bast, 1997). Ayrıca Ca-125 kronik aktif hepatit ve karaciğer sirozunda serumdaki seviyesi artmaktadır. Ca-125'in antijenik yapısı glikoproteindir. Karaciğer, dolaşımdaki glikoproteinlerin büyük kısmını metabolize eder. Dolayısıyla Ca-125'in karaciğer hastalıklarındaki yükselmesinin nedeni; Ca-125'in

karaciğerden metabolizma eliminasyonunun azalması olarak yorumlanmaktadır (Crvickshank ve ark., 1997).

Karbohidrat antijeni 19-9 (Ca-19-9); serumda, karbonhidrattan zengin bir müsin olarak bulunur. Gastrointestinal sistem ve adeno kanserli hastalarda tanı ve tedavi amacıyla yapılan çalışmalarda pankreas kanserinde yüksek oranda (%71-93) tespit edilmiştir. Ayrıca biliyer kanserlerde %70-90'ında, Mide ve kolorektal kanserlerde ise %20-40'ında yükseldiği görülmüştür (Koprowski ve ark., 1981). Ca-19-9, kanserli vakalar haricinde hepatitis, pankreatitis, pnömoni, pulmoner fibrozis, endometriozis gibi durumlarda serum seviyeleri yükselebildiği bildirilmiştir (Goonetilleke ve Siriwardena, 2007).

Alfa fetoprotein (AFP); fetal dokuda yüksek oranda bulunan ve %95'i protein, %5'i ise karbonhidrattan oluşmuş bir glikoproteindir. AFP, gebeliğin 12-15. haftalarında pik yapan, 16. haftadan sonra seviyesi giderek azalan ve sağlıklı bireylerde hayatının 1. yılından sonra serumda gözlenmeyebilir. AFP; HSK, terato karsinomlarında, testis ve overin tümörlerinde %75 oranında yüksektir (Mitry ve ark., 2005). Hepatosellüler kanserlerde erken evrelerde AFP yükselir ve sensitivitesi %70-90'dır. Hepatosellüler kanserde en iyi tümör belirleyicisidir (Bergstrand, 1957).

Karsinoembriyonik antijen (CEA); gebeliğin ilk altı ayına kadar fetusün karaciğer, bağırsak ve pankreasında bulunan bir fetal glikoproteindir (Mitry ve ark., 2005). CEA çok sık olarak araştırılan ve en çok kullanılan tümör markırıdır (Antony ve ark., 2000). Kolorektal karsinomların % -90'ında yüksek seviyede bulunur (Marchand, 1999). CEA hepatitis, alkolik siroz, benign prostat hipertrofisi, obstrüktif sarılık, ülseratif kolit gibi hastalıklarda da yükseldiği belirlenmiştir (Humphrey, 1989).

Ratlarda DEN ile oluşturulan HCC çalışmasında karaciğerde AFP ve CEA markırlarında artış meydana geldiği bildirilmiştir (Priya ve ark., 2018). HCC ile muzdarip insanlardan doku serum çalışmaları sonucunda CA 15-3, CA 125, CA 19-9, CEA ve AFP kanser markırlarında yükselme kaydedildiği tespit edilmiştir (He ve ark., 2013; Kuang ve ark., 2018; Abdelgawad, 2019). Yaptığımız bu çalışmada serumdan yapılan analizlerde; DEN ile birlikte UDS kullanılan gruplarda DEN grubuna göre AFP ve CEA değerleri kısmen düşmüş olsa da sonuçlar anlamlı değildi. Fakat DEN ile birlikte UDS verilen

gruplarda kanser markırlarından özellikle CA 15-3, CA 19-9 ve CA 125-II aktivitelerinin DEN grubuna göre oldukça düşük olması, DEN'nin kanser markırlarını indükleyici etkisini UDS'nin baskılayabileceğini göstermektedir.

Çok hücreli organizmalarda homeostazın düzenlenmesi, apoptozis ve yeni hücrelerin proliferasyonu arasındaki dengenin kontrollü bir şekilde yürütülmesiyle olabilmektedir. (Messmer ve Pfeilschifter, 2000). Apoptozun hücrelerde indüklenmesi ya hücre dışından gelen uyarıcılar (TNFR-1, Fas) veya hücre içinden gelen uyarılar (Bcl-2 ailesi, p53 geninin aktivasyonu, kalsiyum miktarındaki artış, sitokinler, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve onkojenler) ile olmaktadır (Kumar ve ark., 2005).

Apoptozun başlamasında mitokondrinin aktivasyonuna neden olan en önemli faktör Bcl-2 ailesidir. Bcl-2 ailesinin mitokondriyi aktive etmesi, iki farklı şekilde sonuçlanır. Ya sitoplazmaya sitokrom c'nin salınımı gerçekleşir ve apoptoz başlar ya da sitoplazmaya sitokrom c'nin salınımı baskılanır ve apoptozis inhibe edilir (Fan ve ark., 2005). Yani Bcl-2 proteinlerinin bazıları (Bax, Bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bid gibi) pro-apoptotiktir. Bazıları ise anti-apoptotiktir (Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-1 gibi). Eğer pro-apoptotik proteinleri anti-apoptotik proteinler daha fazla eksprese edilirse hücreler apoptozise geçer veya tam tersi ekspresyon durumunda, hücreler apoptozise daha dirençli olur (Alnemri ve ark., 1996). Hücrede hasar meydana geldiğinde sitozolde bulunan pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri, mitokondri yüzeyinde bulunan anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine doğru giderek etkileşime girerler. Bunun sonucunda mitokondride porlar oluşarak sitokrom-c ve Bcl-2 proteinleri zarlar arasından dışarı çıkar. Böylece apoptoz başlar ve kaspaz kaskadı aktive olur (Fan ve ark., 2005).

Kaspazların bu şekilde aktive olmalarına mitokondriyel yolak veya intrinsik yolak ta denilmektedir. Ayrıca kaspazlar hücre dışından gelen uyarımlar ile de aktive olurlar ve buna ekstrinsik yolak (Ölüm Reseptörü Yolu) denilmektedir. Başlatıcı kaspazlar (2, 8, 9, 10) ölüm sinyallerini efektör kaspazlara (3, 6, 7) ileterek hücresel substratları kırarak apoptotik morfolojinin meydana gelmesini sağlamaktadırlar (Alnemri ve ark., 1996). Efektör kaspazlarından biri olan kaspaz 3, apoptotik uyarı geldiği zaman proteolitik yıkıma uğrar ve iki üniteye ayrılır. Bu reaksiyon sonucunda aktif duruma geçen kaspaz 3 apoptoz mekanizmasında görevini yürütür (D'Amelio ve ark., 2012).

Ratlarda yapılan çalışmalarda, DEN ile oluşturulan HCC 'larda, apoptotiklerden kaspaz-3 seviyesinin artışı ve anti apoptotiklerden ise total Bcl-2 seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (Moreira ve ark., 2015; Ahmed ve ark., 2018; Badr ve ark., 2020). Yaptığımız bu çalışmada, serumdan elde ettiğimiz sonuçlar, DEN'nin özellikle kaspaz-3 seviyelerini önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuştur. Ancak DEN ile beraber kullanılan UDS'nin, DEN tarafından indüklenen kaspaz-3 seviyelerini baskıladığını ve anlamlı olmasa da total Bcl-2 seviyelerini önemli ölçüde restore ettiğini göstermiştir.

Dünya Sağlık Örgütü hepatoselüler karsinom için erken HSK ve ilerlemiş HSK olarak sınıflandırma yapmıştır. Erken HSK; iyi diferansiye, 2 cm'den küçük displazik nodüller ve kenarları kütleleşmiş ve belirsiz nodüler tipte olmak üzere üç kısma ayrılmıştır. İlerlemiş HSK ise boyutları 2 cm'den büyük displazik odaklar ve 2 cm'den küçük belirgin nodüler tipte odaklar olmak üzere iki kısma ayırmışlardır (WHO, 2010).

Belirsiz nodüler tipteki HKS'ler sirozda daha sık görülür, genellikle daha küçüktür. Çok nadir intrahepatik metastaz yaparlar. İlerlemiş HSK makroskopik olarak nodüler, masif ve yaygın olmak üzere üç şekilde sınıflandırılabilir. Nodüler tip; tek veya birden fazla nodülden oluşabilir. Tek nodüller genellikle kapsüllüdür ve birincil nodülün çevresinde ekstrakapsüler büyüme gösterebilir. Multinodüler tip; değişen miktarda küçük nodüllerin bir araya gelmesidir. Masif tip; düzensiz sınırları olan büyük bir tümör olarak tanımlanır. Bu morfolojik görünüm ileri evre nodüler HKS'de de görülebilir. Yaygın tipte ise bir karaciğer lobunda veya tüm organda birçok küçük nodüle sahip olduğu tarif edilmektedir. Nadir olsa da saplı veya çıkıntılı bir büyüme gözlenebilir. Eğer HSK bir pedinkül ile ekstrahepatik olarak büyürse, buna "pedinküle" adı verilmelidir. Bir pedinkül yoksa "çıkıntı" terimi kullanılmaktadır (Kojiro, 2009).

Ratlara tek doz 200 mg/kg DEN ip olarak verildikten 2 hafta sonra haftada iki kez 3 hafta boyunca TAA 200 mg / kg i.p. uygulamasından 6 hafta sonra nekropsilerinde karaciğerde makroskopik olarak nodüler yapının olduğu görülmüştür (Guilherme ve ark., 2017). Anuradha ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; ratlara tek doz 200 mg/kg DEN ip olarak verildikten 2 hafta sonra 6 hafta boyunca her gün sularına TAA verildikten yapılan uygulamada karaciğerlerde tümöral odak oluştuğu bildirilmiştir (Anuradha ve ark., 2006; Yuta ve ark., 2013). 2 haftalık farelere DEN (5 mg/kg, i.p.) uygulamasından 44 hafta sonra yapılan nekropsilerinde makroskopik olarak multiple tümör odakları

(hepatosellüler adenom ve iyi diferansiye HKS özelliklerine sahip hepatosit tümörleri) tespit edilmiştir (Xi ve ark., 2015). 150 gr ağırlığındaki ratlara haftada 1 kez olmak üzere 3 hafta boyunca 100 mg / kg dozunda DEN verildi. 1 hafta sonra haftada iki kez 2 ml / kg dozunda 8 hafta boyunca CCI4 uygulaması yapılarak 2 hafta aralıklarla nekropsileri yapılmıştır. Makroskopik lezyonlar sırasıyla diffuz, multi nodüler ve massive olarak tespit edilmiştir (Anindita ve ark., 2018). Ratlara 50 mg/kg dozunda DEN haftada bir kez olmak üzere 20 hafta boyunca intra peritoneal olarak uygulanmış. Makroskopik olarak karaciğerlerin yüzeyinde multifokal, değişik çaplarda (3-4 mm), gri-sarı renkli yumuşak kıvamda nodüller gözlenmiş (Karakurt, 2018).

Yaptığımız çalışmada; ratlara tek doz 200 mg/kg DEN ip olarak verildikten 16 hafta yaptığımız nekropsilerinde, karaciğerde makroskopik olarak kontrol grubuna nazaran kısmen daha büyük, kenarları kütleşmiş, daha koyu renkte ve yüzeyi ince granüler bir görünümdeydi.

HSK'un klasik histomorfolojik özellikleri; geniş trabeküller, belirgin asiner patern, küçük hücre değişiklikleri, sitolojik atipi, mitotik aktivite, vasküler invazyon, Kupffer hücrelerinin yokluğu ve retikülün ağının kaybı (Shafzadeh ve Kakar, 2011).

En yaygın histolojik büyüme paternleri; normal karaciğer dokusuna benzeyen trabeküller, olası safra veya fibrin içeriğine sahip psödoglandüler/asiner ve kompakt/katı patern. Safra üretimi sıklıkla gözlenir. Tümör hücreleri içinde Mallory cisimleri ve soluk cisimler de bulunabilir (WHO, 2010).

HSK'da en yaygın kullanılan derecelendirme sistemi 4-ölçekli Edmondson ve Steiner sistemidir. 1. derece; normal karaciğer dokusundan neredeyse ayırt edilemeyen minimal nükleer düzensizliğe sahip bol sitoplazmalı ve trabekül düzenli küçük tümör hücrelerinden oluşur. 2. derece tümörler; belirgin nükleollere, hiperkromatizme ve nükleer düzensizliğe sahiptir. 3. derece tümörler; 1. derece'den daha fazla pleomorfizm gösterir ve açılı çekirdeğe sahiptir. 4. derece tümörler ise belirgin pleomorfizme ve sıklıkla anaplastik dev hücrelere sahiptir (Edmondson ve Steiner, 1954).

Ratlarda farklı doz ve sürelerde DEN ile oluşturulan karaciğer hasarı ve hepatosellüler karsinom süreçlerinde tespit edilen histopatolojik değişiklikler: Hepatositlerde hidropik dejenerasyon (Bingöl, 2011; Usama ve ark., 2015; Hala ve ark., 2017; Pranesh ve ark., 2017), multifokal nekroz alanları (Bingöl, 2011; Tekin, 2013;

Kaiser ve ark., 2015; Usama ve ark., 2015; Abdelgawad ve ark., 2019), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (Hala ve ark., 2017; James ve ark., 2018; Özeren, 2018; Abdelgawad ve ark., 2019), fokal hemorajik alanlar (Karakurt, 2018; Abdelgawad ve ark., 2019), makroveziküler yağlanma (Usama ve ark., 2015); sinüzoidlerde dilatasyon (Anuradha ve ark., 2006; Yuta ve ark., 2013; Kaiser ve ark., 2015; Usama ve ark., 2015; Özeren, 2018), safra kanalları hiperplazisi ve proliferasyonu (Usama ve ark., 2015; Karakurt, 2018), fibrozis (James ve ark., 2018; Rajeev ve ark., 2018), şeffaf sitoplazmalı hücreler (Usama ve ark., 2015; Hala ve ark., 2017; Karakurt, 2018), hiperkromazi (Anuradha ve ark., 2006; Yuta ve ark., 2013), hiyalin globülleri (Karakurt, 2018), mitotik figürler (Usama ve ark., 2015; Karakurt, 2018), Kupffer hücreleri hiperplazisi (Usama ve ark., 2015; Pranesh ve ark., 2017), hücrelerde atipi (Hala ve ark., 2017; Karakurt, 2018), karyomegali (Üstüner, 2006), preneoplastik fokus (Üstüner, 2006; Tekin, 2013; Usama ve ark., 2015; Guilherme ve ark., 2017), apoptoz (Anuradha ve ark., 2006; Yuta ve ark., 2013; Karakurt, 2018), trabeküler yapılar (Guilherme ve ark., 2017; Karakurt, 2018) bildirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada; karaciğerlerde tümöral hücre proliferasyonlarına rastlanmadı, ancak hepatosellüler karsinomların histolojik prekürsörleri olarak kabul edilen büyük ve küçük hücre değişimleri ile karakterize displazik hepatositler yaygın olarak görüldü. Küçük hücre değişimleri, marjinal hiperkromazi ve sitoplazmalizis ile karakterizeydi. Büyük hücre değişimleri, hepatositlerde çekirdek sitoplazma oranının çekirdek lehine bozulmuş olduğu ve karyositomegali tespit edildi. Hepatositlerde meydana gelen dejenerasyonlar sonucunda remark kordonlarının dizilişi bozulmuş ve sinüzoidler daralmıştı. Portal ve periasiner fibrozis alanlarının çevresinde tek tük olarak hepatositlerin şiddetli balonumsu dejenarasyona uğradığı ve sonuçta bunların büyük kistik boşluklar haline geldiği dikkati çekti. Bu bölgelerde ayrıca farklı aşamalarda dejenere-nekrotik hepatositlere de rastlandı. Bu dejenere-nekrotik değişikliklerin bir kısmı hiyalinizasyon veya tipik olarak hiyalin cisimcikleri şeklindeydi. Portal ve periasiner fibrozis bölgelerinden bazen, karaciğer kapsulasına kadar uzanan ince fibroz bantlar görüldü. Fibroz bantların ulaştığı karaciğer kapsulasında hafif ya da belirgin olabilen çöküntü gözlemlendi. Fibrozis gelişen portal bölgelerde safra kanallarında hiperplazi ve intrahepatik kolestazis belirlendi. Ayrıca özellikle portal ve periasiner fibrozis bölgelerinde, daha az olarak ta parankimde lenfositik-eozinofilik hücre infiltrasyonları

görüldü. İlaveten seyrek olmakla birlikte hepatositlerde makro ve mikroveziküler yağlanma, Kupffer hücrelerinde hiperplazi ve bazı sinüzoidlerde de dilatasyon belirlendi.

Hepatosit spesifik Antijen (HSA); Hepatosit parafin 1 (Hep Par-1) olarak da bilinen ve hepatosellüler karsinomlar için spesifik bir monoklonal antikordur. Hep Par-1, karaciğerde mitokondride bulunur (Wennerberg ve ark., 1993). Hep Par-1, ekspresyonu az differansiye HSK'larda genelde fokal olarak görülmekte ve aynı tümör dokusunda heterojen dağılım gösterebilmektedir (Lamps ve Folpe, 2003). Hep Par-1, hepatosellüler karsinomu, intrahepatik kolanjiyokarsinom ve metastatik karsinomlardan ayırt etmek için yaygın olarak kullanılmıştır (Wee, 2006; Kakar ve ark., 2007). Son zamanlarda Hep Par 1 normal ince bağırsak epitelinde, bağırsak metaplazisinde ve kronik gastritte bulunmuştur. Ayrıca mide, yumurtalık, adrenal korteks, akciğer, endoserviks, pankreas ve meme adenokarsinomlarında da eksprese edilmiştir (Villari ve ark., 2002; Chu ve ark., 2003; Lugli ve ark., 2007). Hep Par-1, hepatositlerde intrasitoplazmik, belirgin ve granüler boyanma gösterdiği bildirilmiştir (Wennerberg ve ark., 1993). Yapılan araştırmalarda HSK' larda %95 oranına varan Hep Par-1 immünreaksiyonu tespit edilmiştir (Wennerberg ve ark., 1993; Leong ve ark., 1998). Farklı bir araştırmada; HSK'ların %92'sinde Hep Par-1 ekspresyonu tespit edilmiştir. Ayrıca nükleer grade 1 ve 2 tümörlerde %100, grade 3 tümörlerde %84 ve grade 4 tümörlerde ise %50 ekspresyon kaydedilmiştir (Chu ve ark., 2003).

Yaptığımız çalışmada, Hep Par-1 immunohistokimya boyamada kontrol ve UDTE gruplarında boyanma gözlenmedi. DENA grubunda özellikle vena sentralisin periferinde olmak üzere hepatositlerde intrasitoplazmik yoğun boyanma gözlemlendi. DEN ile urtica dioica verilen gruplarda ise Hep Par-1 pozitif hücre sayısı daha düşük olduğu tespit edildi.

Ratlarda DEN ile indüklenen karaciğer hasarı ve hepatosellüler karsinom çalışmalarında AFP'nin immunohistokimyasal yöntemle değerlendirildiği çalışmalarda DEN'in AFP ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Xi ve ark., 2015; Aditya ve ark., 2016).

Yaptığımız çalışmada, immunohistokimyasal yöntem ile AFP ekspresyonu kontrol ve UDTE gruplarında yoktu. DENA grubunda ise hepatositlerde intrasitoplazmik yoğun boyanma tespit edildi. DEN ile birlikte urtica dioica verilen gruplarda ise DEN

grubuna nazaran düşük boyanma gözlemlendi. Yüksek doz verdiğimiz DEN + UDTE-2 grubu DEN + UDTE-1 grubuna nispeten daha az pozitif hücre olduğunu belirledik.

Yapılan çalışmalarda ratlarda DEN ile indüklenen HSK'da kaspaz-3 aktivitesinin immunhistokimyasal yöntemle arttığı belirlenmiştir (Shang ve ark., 2018).

Yaptığımız çalışmada, immunohistokimyasal yöntem ile kaspaz 3 ekspresyonu kontrol ve UDTE gruplarında yoktu. DEN grubunda ise hepatositlerde intrasitoplazmik yoğun boyanma tespit edildi. DEN ile birlikte ortalama verilen gruplarda ise DEN grubuna nazaran düşük boyanma gözlemlendi. Yüksek doz verdiğimiz DEN + UDTE 2 grubu DEN + UDTE-1 grubuna nispeten daha az pozitif hücre olduğunu belirledik.

Nitrik oksit (NO), vücutta birçok biyolojik aktivasyonu olan serbest bir radikaldir. Etkili bir immunsupresan olan NO, NO sentaz (NOS) enzimi ile katalize olarak L- arjinin'i L-sitrulin'e dönüşümü ile oluşmaktadır (Geller ve Billiar, 1998). NO, üç farklı sentezlenir. Bunlar; nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS)'dır (Alderton ve ark., 2001). NO tek başına toksik etkisi yoktur ancak diğer reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini artırmaktadır. NO in situ karsinomlarda yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir (Thomsen ve ark., 1995). NO karsinogenez durumlarında; onkogen aktivasyonu, DNA hasarı, tümör supresan genlerin inhibisyonu, metastazın ve apoptozun ayarlanması gibi rollere sahiptir (Lala ve Orucevic, 2001). NO'nın tümöral süreçte kan akışı ve anjiyogenezi artırdığı için, tümör şiddeti ile NO üretiminin arasındaki pozitif pozitif korelasyonu göstermektedir (Thomsen ve ark., 1995).

İndüklenabilir NOS (iNOS) normal durumlarda hücrelerde ekspresyonu yoktur. İNOS öncelikle makrofajlarda tespit edilmesine rağmen, herhangi bir hücre dokudan indüklenebilmektedir. İNOS ayrıca makrofajların sitotoksin etkilerini düzenlemektedir (Wink ve ark., 1991). NOS en fazla iNOS'dan sentezlenir ve anjiogenez, hücre migrasyonunu, metastaz, invazyon üzerine etki göstererek karsinogenezin başlamasına neden olmaktadır (Jadeski ve ark., 2000).

Ratlarda DEN ile indüklenen karaciğer hasarı ve hepatosellüler karsinom çalışmalarında immunohistokimyasal yöntem ile iNOS ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Ahn ve ark., 1999; Bishayee ve ark., 2013). Yaptığımız çalışmada immunohistokimyasal yöntem ile iNOS ekspresyonu kontrol ve UDTE gruplarında

yoktu. DEN grubunda ise hepatositlerde ve Kupffer hücrelerinde intrasitoplazmik yoğun boyanma tespit edildi. DEN ile birlikte *U. dioica* verilen gruplarda ise DEN grubuna nazaran düşük boyanma gözlemlendi. Yüksek doz verdiğimiz DEN + UDTE-2 grubu DEN + UDTE-1 grubuna nispeten daha az pozitif hücre olduğunu belirledik.

Ki-67 proteini; hücre proliferasyonunda ciddi bir role sahip nonhiston bir nükleer proteindir (Gerdes ve ark., 1983). Mitoz sürecinde sitoplazmik kompleksler, Ki-67 için pozitif olduğu tek dönemdir. Mitozun başlangıç fazlarında organize olan Ki-67 proteini, metafaz sırasında kromozomların yüzeyini kaplayarak en yüksek oranda boyanmanın gerçekleştiği fazdır. Çekirdek zarı hasar almasıyla Ki-67 proteini diffüz şekilde sitoplazmda görülmeye başlar. Antijen, mitozun son fazlarında (anafaz ve telofaz) boyanma azalmaya başlar ve tanecikli boyanma özelliği gösterir. Ki-67 proteini, hücre siklusu sürecinde G0 fazında yoktur ve G1, S, M ve G2 fazında görülmektedir. Proliferatif hücrelerde mitotik indeks ve tümör derecelendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir proteindir (Scholzen ve Gerdes, 2000). Yaptığımız çalışmada hepatosellüler karsinom oluşmadığı için Ki-67 immunohistokimyasal olarak boyanma gözlenmemiştir.

Sunulan bu çalışmada; ratlara tek doz 200 mg/kg dozunda intraperitoneal yolla DENA verilerek 16 hafta süre sonrasında hepatosellüler karsinom oluşmadığı ancak karaciğerde karsinogenez sürecini başlatarak ciddi hasara neden olduğu görülmüştür. Yaptığımız çalışmada; karaciğer üzerine ciddi olumsuz etkisi olan DEN'a karşı kullandığımız *U. dioica* ekstresinin pozitif etkisi birbirini teyit eden biyokimyasal, histopatoloji ve immunohistokimyasal verilerle açıklanmıştır. Ayrıca yapılan literatür taramalarımızda; ratlarda DEN ile oluşturulan karaciğer hasarı veya hepatosellüler karsinom üzerine *U. dioica* ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla yaptığımız bu çalışma; *Urtica dioica*'nın hepatosellüler karsinom üzerine hepatoprotektif etkisi, daha uzun süreli ve yüksek doz DEN kullanarak oluşturulan hepatosellüler karsinom çalışmalarına ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdelgawad I. Epithelial cell adhesion molecule mrna can be a potential marker to predict metastasis in hepatocellular carcinoma patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019; 21: 861-866.
- Sonsuz A. Karaciğer Fonksiyon Bozukluklarına Klinik Yaklaşım. Sempozyum Dizisi. 2007; 58: 69-78.
- Abraham L, Kierszen B. MD, NAD, Sindirim Bezleri, Arbak S. (Çev. Ed. Demir R), *Histoloji ve Hücre Biyolojisi 1. Baskı*, Ankara: Palme Yayıncılık. 2006; 447-74.
- Adamski, R. ve Bieganska, J., “Studies of chemical substances present in *Urtica dioica* leaves. Part I Trace element. *Herba Pol.* 1980, 26; 177–80.
- Aditya A, Abhishek S, Benedek G, Patrick L, Gyongyi S. Adult mouse model of early hepatocellular carcinoma promoted by alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2016; 22: 4091–108.
- Ahmed HH, Galal AF, Shalby AB, Abd-Rabou AA, Mehaya FM. Improving Anti-Cancer Potentiality and Bioavailability of Gallic Acid by Designing Polymeric Nanocomposite Formulation. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018; 19: 3137-46.
- 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.* 1999; 20 (7):1337-44.
- Ajith TA, Janardhanan KK. Chemopreventive activity of a macrofungus *Phellinus rimosus* against N-nitrosodiethylamine induced hepatocellular carcinoma in rat. *J Exp Ther Oncol.* 2006; 5: 309-21.
- Akkuş D. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza yayınları*, Kuzucular. 1995; 3-25.
- Aksu M and Kaya M. Effect of usage *Urtica dioica* L. on microbiological properties of sucuk, a Turkish dry-fermented sausage, *Food Control.* 2004, 15: 591–5.
- Akyuz F, Inal M, Baycu C, Kanbak G. Changes in antioxidant status and lipid peroxidation at liver and kidney tissues of the rats that were given diethylnitrosamine. *Ann Med Sci.* 2001; 10: 50-54.
- Al-Rejaie SS, Aleisa MA, Al-Yahya AA. Progression of diethylnitrosamine-induced hepatic carcinogenesis in carnitine-depleted rats. *World J Gastroenterol.* 2009; 15: 1373-380.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal.* 2001; 357(3): 593-615.

- 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*. 2014; 767:13-20.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*. 1996; 87: 171.
- Amin A, Hamza AA, Bajbouj K, Ashraf SS, Daoud S. Saffron. A potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011; 54: 857- 67.
- Anikina E.V. Physicochemical characteristics of extracts from some medicinal plant species as food additives. *Rastitel'nye Resurs*. 1996; 32: 30–6.
- Antony WB, Nicole AM, Alex AP. Tumor Markers. In: *Clinical Chemistry. Principles, Procedures, correlations*. Michael L. Bishop, Janet L. Duben, Engel Kirk Edward P. Fody, Eds. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA. 2000; 522-36.
- Arora A, Shukla Y. Induction of Preneoplastic Altered Hepatic Foci Following Dietary Sulphur Supplementation. *Hum Exp Toxicol*. 2005; 23: 227-32.
- 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*. 2013; 17 (4): 467-71.
- Atalay A. Nitrozaminlerin proteinlerle etkileşimi *Biyokimya Dergisi*. 1989; 14: 30-3.
- Ayan A, Çalışkan Ö, Çırak C. Isırganotu (*Urtica spp.*)’nun ekonomik önemi ve tarımı. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*. 2006; 21: 357-63.
- Aytekin Y. Temel Histoloji. İstanbul, Barış Kitabevi. 1993; 380-396.
- Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel Histoloji. 10. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri. 2006; 332-344.
- Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115: 209-31.
- 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*. 2012; 369 (1-2):183-93.
- Badr NK, DA A, Othman R, French SW, Ghoneum M. Chemopreventive role of arabinoxylan rice bran, MGN-3/Biobran, on liver carcinogenesis in rats. *Biomed Pharmacother*. 2020; 126:110064.
- Balzarini J, Van Laethem K, Hatse S, Froeyen M, Peumans W, Van Damme E, Schols D. Carbohydrate-binding agents cause deletions of highly conserved glycosylation sites in HIV GP120. *J Biol Chem*. 2005; 280(49):41005-14.
- Bartsch JM, Spiegelhander B. Environmental exposure to N-nitroso compounds (NNOC) and precursors: an overview. *Eur J Cancer Prev*. 1996; 5: 11-7.

Baytop T. Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları, 1963.

Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Nobel Tıp Kitabevleri Yayını. 1999; 231-2.

Bergstrand B. Paper electrophoretic study of human fetal serumprotein withdemonstration of a new protein fraction. Scand J Clin Lab Invest. 1957; 9: 277-81.

Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. J Dairy Sci. 2005; 88, 6: 2017-26.

Blumgart L H, Fong Y. Surgery of the liver and biliary tract, 3.baskı. Edinburg: Churchill. 2000; 1-33.

Bianchi G, Marchesini G, Fabbri A, et al. Lipoperoxide plasma levels in patients with liver cirrhosis. Hepatogastroenterology. 1997; 44: 784-8.

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. 2010; 3: 753-763.

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. 2013; 24 (1):178-87.

Bizzaro N, Tremolada F, Casarin C, Bonetti P, Noventa F, Diodati G, at el. Serum alanine aminotransferase levels among volunteer blood donors, effect of sex, alcohol intake and obesity. Ital J Gastroenterol. 1992; 24: 237-41.

Bomhard E, Maruhn D, Vogel O, Mager H. Determination of urinary glutathione S-transferase and lactate dehydrogenase for differentiation between proximal and distal nephron damage. Arch Toxicol. 1990; 64: 269-78.

Bookstein N. Arterioportal communications, observations and hypotheses concerning transsinusoidal and transyal types. Radiology. 1982; 142: 581.

Booth, V. H. ve Bradford, M. P. Tocopherol contents of vegetables and fruits. Br. J. Nutr. 1963, 17: 575-81.

Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. Gastroenterology. 2004; 127: 5-16.

Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2005; 42: 1208-36.

Burroughs AK, Westaby D. Liver, biliary tract and pancreatic disease. Kumar P, Clark M (Eds). Clinical Medicine (6th ed), Elsevier Saunders. 2005; 347-417.

Burtis CA., Ashwood ER. Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company, (3rd Edition), Philadelphia, London, Toronto; 1999. 1125-77.

B y kbaş S, İnal A. İlmli alkol alan erkeklerde laktat dehidrogenaz izoenzim değişiklikleri, Van Tıp Derg. 2006; 13: 3, 85-9.

Bnouham M, Merhfour FM, Ziyat A, Mekhfi H, Aziz M and Legssyer A. Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*, Fitoterapia. 2003; 74: 677–81.

Byun MW, Ahn HJ, Kim JH. Determination of volatile N-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to a thermal energy analyzer. J Chromatogr. 2004; 1054: 403-7.

Calderone V, Nencioni G, Nieri P. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. roots extracts: In vitro and In vivo pharmacological studies, Universita di Pisa. Italy. 2001.

Carnerio J, Kelley RO. Sindirim kanalına bağlı bezler. Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışalı B (eds). Temel Histoloji, 1. Baskı, İstanbul: Barış Kitabevi. 1998; 307-19.

Chaurasia, N. ‘‘Phytochemische Untersuchungen Flora *Urtica dioica* L.’’ Inaugural Dissertation zur Erlangung der Doktorwurde des Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universitat Marburg/Lahn. 1987.

Chu I, Bowers WJ, Caldwell D, Nakai J, Pulido O, Yagminas A, Wade MG, Moir D, Gill S, Mueller R. Toxicological effects of gestational and lactational exposure to a mixture of persistent organochlorines in rats: systemic effects. Toxicol Sci. 2005; 88, 2: 645-655.

Chu PG, Jiang Z, Weiss LM. Hepatocyte antigen as a marker of intestinal metaplasia. Am J Surg Pathol. 2003; 27: 952–9.

Chrubasik S, Enderlein W, Bauer R, Grabner W. Evidence for anti-rheumatic effectiveness of herba *Urtica dioica* in acute arthritis: a pilot study. Phytomed. 1997; 4: 05-08.

Collier HOJ, Chesher GB. Identification of 5-hydroxytryptamine in the stinging nettle (*Urtica dioica*). Brit. J. Pharmacol. 1959; 11: 186.

Cooper GM. Programmed cell death. The cell. In, Cooper GM ed. Washington, ASM Pres. 1994; 14: 592–596.

Cronquist A. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Colombia Univ Pres, NY. 1981; 1262.

Crvickshank Dj, Fullerton WT, Kloppe A. The clinical significance of preoperative serum CA 125 in ovarian cancer. Br J Obstet Gynecol. 1987; 94, 7: 692-5.

Çapan Z, Yalçın ÖF. Karaciğer hastalıklarıI ve anestezi. Organ Sistemleri ve Anestezi. Teltik Başar H, Baltacı B, Kaymak Ç (eds). Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri. 2010; 125-142.

Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ. Tıbbi Fizyoloji. 11.Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 2007; 859-64.

Çetinus E, Kilinc M, Inanc F, Kurutas EB and Buzkan. The role of *Urtica dioica* (urticaceae) in the prevention of oxidative stress caused by tourniquet application in rats. *Tohoku J Exp Med*. 2005; 205: 215–21.

D'Amelio M, Sheng M, Cecconi F. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis, *Trends Neurosci*. 2012; 35: 11, 700-9.

D'Angelica M, Fong Y. The liver. Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL (Ed). *Sabiston Textbook of Surgery*. 17. Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2004; 1513-69.

Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett*. 199; 95: 23-29.

Dağoğlu G, Keleş O, Yıldırım M, Yılmaz O, Aksoy A. Van ve İstanbul Piyasasında Tüketime Sunulan Bazı Et Ürünlerinde Şekillenen Nitrozamin Türevlerinin Araştırılması. *İ. Ü. Vet. Fak. Derg*. 1995; 81: 318-326.

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*. 2013; 14: 261-265.

Davis PH. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. The University Press, Edinburg. 1982; 7: 633.

Dere F. Karaciğer anatomisi, 3.Baskı. Adana. 1994; 633-5.

Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*. 1954; 7: 462-503

Emre A. Karaciğerin Cerrahi Anatomisi: Genel Cerrahi/İ.Ü.T.F. Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2002; 1083-1086.

Ekberg S, Luther M, Nakamura T. Growth hormone promotes early initiation of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophysectomised rats after partial hepatectomy. *J Endocrinol*. 1992; 135: 59-67.

El Mesallamy HO, Metwally NS, Soliman MS, Ahmed AK, Abdel MM. The chemopreventive effect of *Ginkgo biloba* and *Silybum marianum* extracts on hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Cell Int*. 2011; 11: 38.

Erboga M, Dönmez YB, Şener U, Erboga ZF, Aktaş C, Kanter M. Effect of *urtica dioica* against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats through suppression of histological damage, oxidative stress and lipid peroxidation. *Eur J Gen Med*. 2016; 13: 139-144.

Erdemir AD. Şifalı Bitkiler – Doğal ilaçlarla geleneksel tedaviler, Alfa Yayınları. 2001; 928 (17): 211.

- Erer H, Kıran MM. Veteriner Onkoloji. Damla Ofset. 4.basım, Konya. 2009.
- Eroschenko VP. Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. 11th Edition, Wolters Kluwer Health-Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore-Philadelphia. 2008; 313-32.
- Eşrefoğlu M, Özel Histoloji, Malatya. Medipres Mat Yay. 2009; 106-120.
- Ethier C, Kestekian R, Christine B. Vitamin D depletion retards the normal regeneration process after partial hepatectomy in the rat. *Endocrinology*. 1990; 126, 2947-59.
- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2005; 37: 719-27.
- Farzami B, Ahmadvand D, Vardasbi S, Majin FJ and Khaghani Sh. Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats, *J Ethnopharmacol*. 2003, 89: 47-53.
- Feliciano DV, Burch JM, Graham JM. Abdominal vascular injury. Mattox KL, Feliciano DV, Moore EE (editors). *Trauma*. 4Baskı. New York: McGraw-Hill. 2000; 783-805.
- Feng D, Wang H, Cheng X. Detection and toxicity assessment of nitrosamines migration from latex gloves in the Chinese market. *Int J Hygiene Environ Health*. 2009; 212: 533-40.
- Ferrell LD, Kakar S. Consultant Pathology Volume 4 Liver Pathology. 1st Edition, Demos Medical, New York. 2011; 343-515.
- Finnberg N, Silins I, Stenius U, Hogberg J. Characterising The Role of MDM2 in Diethylnitrosamine Induced Acute Liver Damage and Development of Pre-Neoplastic Lesions. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 113-22.
- Fijalek Z, Soltyk K, Lozak A, Kominek and Ostapczuk P. Determination of some micro- and macroelements in preparations made from peppermint and nettle leaves. *Pharmazie*. 2003, 58: 480-2.
- Francavilla A, Polimeno L, Barone M. Hepatic regeneration and growth factors. *J Surg Oncol*. 1993; 13: 1-7.
- Fu, Y.H., Chen, S.J., Chen, R.F., Ding, W.H., Kuo-Huang, L.L., Huang, R.N. Identification of oxalic acid and tartaric acid as major persistent pain-inducing toxins in the stinging hairs of the nettle, *Urtica thunbergiana*. *Annals of Botany*. 2006, 98: 57-65.
- Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1998; 17(1): 7-23.
- Genç Z. Trinitrobenzen sülfonik asit ile oluşturulan deneysel kolitte ısırgan otu yağının koruyucu etkisinin incelenmesi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, [Doktora Tezi]. 2009.

- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a Mouse monoclonal antibody reactive with a human antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983; 31: 13-20.
- Gitto E, Pellegroni S, Gitto P, Barberi I, Reiter RJ. Oxidative stres of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J. Pineal Res*. 2009; 46: 128–39.
- Glauert HP, Calfee-Mason K, Stemm DN, Tharappel JC, Spear BT. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: A review. *Mol Nutr Food Res*. 2010; 54: 875-896.
- Goldie DJ, McConnell AA. Serum alanine transaminase (ALT) reference ranges estimated from blood donors. *J Clin Pathol*. 1990; 43(11): 929-31.
- Goonetilleke K, Siriwardena A. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology*. 2007; 33: 3, 266-70.
- Goss JA, Mangino MJ, Callery MP. Prostaglandin E2 down regulates kupffer cell production of IL-1 and IL-6 during hepatic regeneration. *Am J Physiol*. 1993; 601- 8.
- Gözükara E . Enzimler, Biyokimya. Ankara. Ofset Repromat Ltd. şti. 1989; 572-6.
- Gressner A, Gressner O. Glutathion. In: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Eds: Springer. 2019; 995.
- Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2006; 802-4.
- Gül S, Demirci B, Başer KH, Akpulat HA, Aksu P. Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. *Biol. Pharm. Bull*. 2005; 18(5): 523-7.
- Gülçin I, Küfrevioğlu OI, Oktay M and Büyükokuroğlu ME. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.), *J Ethnopharmacol*. 2004; 90: 205–15.
- Güzel C, Bir organ olarak karaciğer. *Tıbbi fizyoloji*, Guyton AC, Hall JE (eds), 11th ed. Ankara, Nobel Tıp. 2007; 859-64.
- Gravel IV, Yakovlev GP, Petrow NV, Stulovski SS, Listov SA. Content of heavy metals in some species of medicinal plants in the Altaiskii Krai. *Rastitel'nye Resursy*. 1994; 30 (1–2): 101–8.
- Hall CN, Kirkham JS, Northfield TC. Urinary N-nitrosoproline excretion: a further evaluation of the nitrosamine hypothesis of gastric carcinogenesis in precancerous conditions. *Gut*. 1987; 28: 216-220.
- Hanahan D ve Weinberg R A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100. 2000; 57-70.

Hardell L, Danell M, Engquist CA, Marklund SL, Frederickson M. Levels of Se in plasma and GSHpx in erythrocytes and the risk of breast cancer, a case control study. *Biol Trace Elem Res.* 1993; 3: 99-108.

Harput US, Saracoglu I ve Ogihara Y. Stimulation of lymphocyte proliferation and inhibition of nitric oxide production by aqueous *Urtica dioica* extract, *Phytother Res.* 2005; 19: 346-8.

Hashimoto M, Kothary BC, Raper S. The effects of transforming growth factor alpha and somatostatin on regenerating hepatocytes in the rat. *Regulatory peptides.* 1993; 44: 49.

He M, Huang Z, Yan X, Liao X, Yin G, Duan A, Gu J. Label-free detection of hepatocellular carcinoma markers based on photoluminescence of antibody-conjugated ZnO arrays. *J Biomed Nanotechnol.* 2013; 9: 2024-33.

Hecht SS. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res.* 1999; 424: 127-42.

Hinuma K, Matsuda J, Tanida N, et al. N-nitrosamines in the stomach with special referencetoin vitro formation, and kinetics after intragastric or intravenous administration in rats. *Gastroenterol Jpn.* 1990; 25(4): 417-24.

Hopf NJ, Brem J, Bohl J. İmage analysis of proliferating cells in tumors of the human nervous system: an immunohistological study with the monoclonal antibody Ki- 67. *Neurosurgery.* 1994; 35: 917-23.

Hoşbaş S. *Urtica dioica* L. bitkisi üzerinde farmakognozik araştırmalar. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, [Doktora Tezi]. 2008.

Huang X, Li J, Wang F, Hao M. CT combined with tumor markers in the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *JBUON.* 2018; 23, 4: 985-91.

Hubel CA. Oxidative stres in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc exp Biol Med.* 1999; 222, 222-35.

Hughes RE, Ellery T, Harry V, Jones E. The dietary potential of the common nettle. *J. Sci. Food Agric,* 1980; 31: 1279–85.

Humphrey PA. The role of tumor markers in early detection of cancer. *Semin Surg Oncol.* 1989; 5: 186-193.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some N-nitroso compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Risks to Humans. 1978; 17.

Jacobs I, Bast RC Jr. The CA 125 tumor-associated antigen. Areview of the literature. *Hum Repord.* 1989; 4:1-12.

Jadeski LC, Hum KO, Chakraborty C, Lala P K. Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis. *International Journal of Cancer.* 2000; 86(1), 30-9.

Jahan MS, Vani G, Shyamaladevi AS. Anti-carcinogenic Effect of Solanum trilobatum in Diethylnitrosamine Induced and Phenobarbital Promoted Hepatocarcinogenesis in Rats. Asian J Biochem. 2011; 6 (1): 74-81.

Janani P, Sivakumari K, Geetha A, Ravisankar B, Parthasarathy C. Chemopreventive effect of bacoside A on N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. J Cancer Res Clin Oncol. 2010; 136: 759-70.

Jaruga P, Rodriguez H, Dizdaroğlu M. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine in DNA by liquid chromatography/mass spectrometry. Free Radical Biol Med. 2001; 31: 336-44.

Ji TF, Lu CH, Wang J, Su, YL, Yuan L, Feng XZ. Studies on the constituents of Urtica dioica L. Grown in the Tibet Autonomous Region. Zhong Yao Cai, 2007; 30; 662-4.

John L. Cameron: Liver, Anatomy. Current Surgery. 2001; 309.

Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology 10th Edition. New York: McGraw Hill Companies Incorporated. 2003.

Joshi B, Prakash A, Kalia A. Hepatoprotective potential of antioxidant potent fraction from Urtica dioica Linn. (whole plant) in CCl₄ challenged rats. Toxicology Reports. 2015; 2, 1101-10.

Kakar S, Gown AM, Goodman ZD, Ferrell LD. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: hepatocellular carcinoma versus metastatic neoplasms. Arch Pathol Lab Med. 2007; 131: 1648-54.

Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K. Role of CYP2E1 in Diethylnitrosamine-Induced hepatocarcinogenesis in vivo. Cancer Res. 2007; 67, 23, 11141-6.

Kandis H, Karapolat S, Yildirim U, Saritas A, Gezer S, Memisogullari R. Effects of Urtica dioica on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Clinics. 2010;65(12):1357-61.

Kanter M, Coskun O, Budancamanak M. Hepatoprotective effects of Nigella sativa L and Urtica dioica L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. World J Gastroenterol. 2005;11(42):6684-8.

Karakaş S. Isırgan otu toprak altı ve toprak üstü kısımlarından ısırgan otu ekstraktının eldesi ve özelliklerinin incelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, [Yüksek Lisans Tezi]. 2003.

Karaöz E. Sindirim sistemi histolojisi. Özel Histoloji. Isparta: SDÜ Basımevi. 2002. Krause WJ. Krause's Essential Human Histology For Medical Students. 3rd Edition, Universal Publishers, California. 2005; 192-7.

Keha EE, Küfrevioğlu ÖĞ. Biyokimya. Erzurum. Aktif Yayınevi. 2010.

- Klauning JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stres and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2010; 38: 96-109.
- Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 254: 86-99.
- Kocatürk U. Açıklamalı Tıp terimleri sözlüğü. 5. baskı, Ankara Üniv. Basımevi. 1991; 651-2.
- Koç AY. RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrik oksit sentezi üzerine L-karnitinin etkisi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, [Doktora Tezi]. 2011.
- Koç H. Doğrudan, doğadan bitkilerle sağlıklı yaşama. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi. 2002; 189-92.
- Kojiro M. Pathology of Hepatocellular Carcinoma. Hoboken. Wiley, 2009;1-184.
- Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF. Spesific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science.* 1981; 212(4490): 53-5.
- Kuang Z, Huang R, Yang Z, Lv Z, Chen X, Xu F, Yi YH, Wu J, Huang RP. Quantitative screening of serum protein biomarkers by reverse phase protein arrays. *Oncotarget.* 2018; 9, 66: 32624-41.
- Kujawska M, Ignatowicz E, Ewertowska M, Markowski J, Jodynys-Liebert J: Cloudy apple juice protects against chemical-induced oxidative stress in rat. *Eur J Nutr.* 2011; 50 (1): 53-60.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins basic pathology e-book: Elsevier Health Sciences. 2017.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Cellularadaptations, cellinjury, and celldeath. Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier. 2005; 3-46.
- Kuran O. Sistematik Anatomi. Filiz Kitabevi, İstanbul 1983; 429–43.
- Kraus, R. ve Spiteller, G., “Terpene diols and Terpene diol glucosides from roots of *Urtica dioica*”, *Phytochemistry.* 1991; 30 (4): 1203–5.
- Krystofova O, Adam V, Babula P, Zehnalek J, Beklova M, Havel L, Kizek R. Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2010; 7, 3804-15.
- Lala PK, Orucevic A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer and Metastasis Reviews.* 1998; 17(1), 91-106.
- Lamps LW, Folpe A. The diagnostic value of hepatocyte paraffin antibody 1 in differentiating hepatocellular neoplasms from nonhepatic tumors: a review. *Adv Anat Pathol.* 2003; 10: 39-43.

Lau WY, Lai EC. Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2008; 7, 237-57.

Leong AS, Sormunen RT, Tsui WM, Liew CT. Hep Par 1 and selected antibodies in the immunohistological distinction of hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma, combined tumours and metastatic carcinoma. *Histopathology.* 1998; 33: 318-24.

Levallois P, Ayotte P Van, Maanen JMS. Excretion of volatile nitrosamines in a rural population in relation to food and drinking water consumption. *Food Chem Toxicol.* 2000; 38: 1013-19.

Lijinsky W. In vivo testing for carcinogenicity. In: Grover PL, Cooper CS. (Editors).

Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis. Berlin: Springer. 1990: 179-209.

Lugli A, Tornillo L, Mirlacher M, Bundi M, Sauter G, Terracciano LM. Hepatocyte paraffin 1 expression in human normal and neoplastic tissues: tissue microarray analysis on 3,940 tissue samples. *Am J Clin Pathol.* 2004; 122: 721–7.

Mallik MAB, Tesfai K, Pancholy SK. Formation of carginogenic nitrosamines in soil treated with pesticides, and in sewage amended with nitrogen compounds. *Pro Oklahoma Acad Sci.*1981; 61: 31-5.

Marchand LL. Combined influence of genetic and dietary factors on colorectal cancer incidence in Japanese Americans. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1999; 26: 101-5.

Magee PN. Toxicity of nitrosamines: Their possible human health hazards. *Food Cosm Toxicol.* 1971; 9: 207-18.

Matsuda M, Nakamoto Y, Suzuki S, Kurata T, Kaneko S. Interferon-c-mediated hepatocarcinogenesis in mice treated with diethylnitrosamine, Laboratory Investigation. 2005; 85, 655–63.

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

Mbwambo ZH, Luyengi L, Kinghorn AD. Phytochemicals: a glimpse into their structural and biological variation. *International Journal of Pharmacognosy.* 1996, 34, 335-43.

McMahon SB. NGF as a mediator of inflammatory pain. *Phil Trans R Soc B.* 1996, 351:431-40.

Mert N. Veteriner Klinik Biyokimya, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Derg. 1996; 12, 232-35.

Messmer UK, Pfeilschifter J. New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *BioEssays.* 2000; 22, 878-88.

Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997; 60-6.

- Michalopoulos GK, Zarnegar R. Hepatocyte growth factor. *Hepatology*. 1992; 15, 149-55.
- Mitry E, Bouvier AM, Esteve J, Faivre J. Improvement in cancer survival. *Eur J Cancer*. 2005; 41, 2297-303.
- Mittman P. Randomized, double-blind study of freeze-dried *Urtica dioica* in the treatment of allergic rhinitis, *Planta Med*, 1990, 56, 1, 44-7.
- Musaoğlu A. Karaciğer Hastalıklarında Laboratuvar Testleri, Temel İç Hastalıkları. Ed. G. İliçin, S. Ünal, K. Biberoglu, S. Akalın ve G. Süleymanlar. Güneş Kitabevi, Ankara. 1997; 1, 1096-109.
- Moore KL. Clinically Oriented Anatomy. The abdomen. 3rd Edition, Baltimore: Williams & Wilkins. 1992; 127-242.
- Moreira AJ, Ordoñez R, Cerski CT, Picada JN, García-Palomo A, Marroni NP, Mauriz JL, González-Gallego J. Melatonin Activates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Rats with Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis. *Plos one*. 2015; 11, 10, 1-17.
- Moss DW. Physicochemical and pathophysiological factors in the release of membrane-bound alkaline phosphatase from cells. *Clin Chim Acta*. 1997; 257, 133-140.
- Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y. Human liver regeneration after major hepatic resection. *Ann Surg*. 1987; 206, 309.
- Nakamura S, Tsuzuki T. Surgiq. I anatomy of the hepatic veins and the inferior vena cava. *Surg Gynecol Obstet*. 1981; 152, 43-50.
- Namazi N, Esfanjani AT, Heshmati J, Bahrami A. The effect of hydro alcoholic Nettle (*Urtica dioica*) extracts on insulin sensitivity and some inflammatory indicators in patients with type 2 diabetes: a randomized double-blind control trial. *Biol Pharm Bull*. 2007;14(3): 70-5.
- Naito Y, Lee MC, Kato Y, Nagai R, Yonei Y. Oxidative stress markers. *Anti-Aging Medicine*. 2010; 7, 5, 36- 44.
- Nassiri-Asl M, Zamansoltani F, Abbasi E, Daneshi MM, Zangivand AA. Effects of *Urtica dioica* extract on lipid profile in hypercholesterolemic rats. *J Chinese Integ Med*. 2009;7(5): 428-33.
- Noguchi S, Ohba Y, Oka T. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Endocrinol*. 1991; 128, 425-31.
- Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 19.BaskıPalme Yayıncılık, Ankara. 2011; 882-5.
- Obertreis B, Ruttkowski T, Teucher T, Behnke B and Schmitz H. İn-vivo and in-vitro inhibition of lipopolysaccharide stimulated tumor necrosis factor-alpha and interleukin-

1 beta secretion in human whole blood by extractum urticae dioicae foliorum. *Arzneimittel forschung*, 1996, 46, 389–94.

Oliviera PA, Colaco A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La Cruz LF, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *Ann Acad Bras Cienc*. 2007; 79, 593-616.

Orrego H, Blake JE, Blendis LM, Medline A. *Gastroenterology*. 1987; 92, 208-14.

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

Öngün A (2002). Isırgan Otu: Her Derde Deva, <http://www.bianet.org/2003/04/09>.

Oto G. Isırgan otu (*Urtica dioica* L.)’nun dimetilbenzantrasen (dmbs) uygulanan tavşanlarda biyokimyasal, hematolojik parametreler ve bazı tümör markırları üzerine etkisi. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, [Doktora Tezi]. 2007.

Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniv. Tıp Fakültesi Dergisi. 2002; 9, 2, 143- 8.

Öztürk M, Özçelik H. Doğu Anadolu’nun Faydalı Bitkileri. SİSKAV (Siirt İlim, Spor, Kültür ve Araştırma Vakfı) yayınları, 1991, Ankara.

Özer A. Veteriner Özel Histoloji. 1.Baskı, Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi, Ankara. 2008; 191-6.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55, 74-108.

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*. 2015; 40 (2): 445-52.

Paula SN, Colaço A, Gil da Costa RM, Manuel OM, Peixoto F, Alexandra OP. N-diethylnitrosamine mouse hepatotoxicity: Time-related effects on histology and oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol*. 20014; 66 (9-10): 429-36.

Perkins AS, Stern DF. Apoptosis. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer Principle and Practice of Oncology*. Philadelphia.Lippincott-Raven. 1997; 96–100.

Petlevski R, Hadzija M, Slijepcevic M and Juretic D. Effect of 'antidiabetis' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. *J Ethnopharmacol*. 2001; 75, 181.

Pradeep K, Mohan CV, Gobianand K, Karthikeyan S. Silymarin modulates the oxidant–antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol*. 2007; 560 (2-3), 110–16.

Price CP, Alberti KGMM: Biochemical Assessment of Liver Function. in Wright R, Alberti KGMM, Karran S, Millward-Sadler GH (eds.): *Liver and Biliary Disease – Pathophysiology, Diagnosis, Management*. London: W.B. Saunders. 1979; 381-416.

Priya V, Jainu M, Mohan SK. Biochemical Evidence for the Antitumor Potential of *Garcinia mangostana* Linn. On Diethylnitrosamine-Induced Hepatic Carcinoma. *Pharmacogn Mag.* 2018; 14, 54, 186-90.

Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences.* 2017; 38, 7, 592-607.

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.* 2009; 27(3): 233-40.

Ramakrishnan G, Raghavendran HRB, Vinodhkumar R, Devaki T. Suppression of Nnitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chem Biol.* 2006; 101, 104-14.

Ranek L, Keiding N, Jensen ST. A morphometric study of normal human liver cell nuclei. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1975; 83, 467-76.

Ratych RE, Smith GW. Anatomy and physiology of the liver. GD Zuidema. (editor). Shackelford's Surgery Of The Alimentary Tract.4.bask1. Philadelphia: Saunders. 1996; 357-73.

Redinger RN. The coming of age of our understanding of the enterohepatic circulation of bile salts. *Am J Surg.* 2003; 185 (2);168-72.

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.* 2013; 8 (2): 60–4.

Riaz A, Ryu RK, Kulik LM, Mulcahy MF, Lewandowski RJ, Minocha J. Alphafetoprotein response after locoregional therapy for hepatocellular carcinoma: oncologic marker of radiologic response, progression, and survival. *J Clin Oncol.* 2009; 27, 5734-742.

Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica* L.), an anti-rheumatic remedy, inhibit the pro-inflammatory transcription factor NF-Kappa. *B Febs Lett.* 1999; 442:94.

Ross MH, Pawlina W. Histology A Text And Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology. 7th Edition, Wolters Kluwer Health, Philadelphia. 2016; 626-39.

Roose MH, Romrell LJ, Kage GI, Histology. A text and atlas. Third edition. 1995; 496-507.

Rostkowska K, Zwierz K, Rozanski A, Moniuszko-Jakoniuk J, Roszczenko A. Formation and metabolism of n-nitrosamines. *Pol J Environ Stud.* 1998; 7: 321-25.

Rywotycki R. The effect of baking of various kinds of raw meat from different animal species and meat with functional additives on nitrosamine contamination level. *Food Chem.* 2007; 01: 540-48.

Rzemykowska, Z. ve Ostrowska, B., “The method of quantitative determination of magnesium in the juice from the fresh nettle (*Urtica dioica*)”, *Herba Polonica*, 1994, 40 (3), 95–8.

Scandalios JG. The rise of ROS. *Trends in biochemical sciences.* 2002; 27, 9, 483-86.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182:311-22.

Shaarawy SM, Tohamy AA, Elgendy SM, Elmageed ZYA, Bahnasy A, Mohamed MS, Kandil E, Matrougui K. Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity. *Int J Biol Sci.* 2009; 5, 6, 549-57.

Shafzadeh N, Kakar S. Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques. *Adv Anat Pathol.* 2011; 18: 438-45.

Salamon, I., Hecl, J. ve Haban, M., “Heavy metal determination of several medicinal plant in the central Zemplin. World Conference on Medicinal and Aromatic plants”, 2001, Hungary, Abs. no. 187.

Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S. Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type. *Int J Cancer.* 2002; 101: 560-66.

Sarandakou A, Protonotariou E, Rizos D. Tumor markers in biological fluids associated with pregnancy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences.* 2007; 44, 2, 151-78.

Sayed-Ahmed MM, Aleisa AM, Al-Rejaie S. Thymoquinone attenuates diethylnitrosamine induction of hepatic carcinogenesis through antioxidant signaling: *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3, 254-61.

Schuler M and Gren DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis, *Biochem. Soc. Trans.* 2001; 29, 684–88.

Schulte HR, Grasl KB, Bursch W. Tumor development and apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994; 105: 363-67.

Schomaker, V. J., Bollbach, F. D. ve Hagels, H., “Brennesselkraut”, *Deutsche Apotheker Zeitung*, 1995, 135 (7), 40–5.

Setty AR, and Sigal, LH. Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy and Side Effects *Semin Arthritis, Rheum*, 2005, 34, 773-84.

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.* 2009; 5 (6):549-57.

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.* 2012; 33, 68-74.

Sica GT, Ji H, Ros PR. CT and MR imaging of hepatic metastases. *American Journal of Roentgenology.* 2000; 174(3), 691-98.

Silan C ve H. Rahmanlar. *Urtica dioica*'nın fitokimyasal, farmakolojik ve toksikolojik etkileri, A.İ.B.Ü. İzzet Baysal Tıp Fak Derg 2008, 3, 29-35.

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.* 2014; 395 (1-2):65-76.

Sun H, Yu L, Huailing W, Liu G. A novel antihepatitis drug, bicyclol, prevents liver carcinogenesis in diethylnitrosamine-initiated and phenobarbitalpromoted mice tumor model. 2012; doi:10.1155/2012/584728.

Süleyman H, Gül V, Erhan E. Oksidatif stres ve doku hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi.* 2018; 1, 1, 1-4.

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.* 2010; 186, 3, 295-305.

Tahri A, Yamani S, Legssyer A, Aziz M, Mekhfi H, Bnouham M and Ziyyat A. Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat, *J Ethnopharmacol*, 2000, 73, 95-100.

Tanakol R. Antioksidan vitaminler, hastalıkta ve sağlıkta önemleri, *Klinik Gelişim*, 1998, 11, 347–56.

Tatar G. Kolon tümör markırları ve GGK taramaları. *Güncel Gastroenteroloji Ocak.* 1997; 12, 56-9.

Taylor L. *The Healing Power of Rainforest Herbs.* New York. 2006. ISBN: 07570-01440

Testai L, Chericoni S, Calderone V, Nencioni G, Nieri P, Morelli I and Martinotti E. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts, In vitro and in vivo pharmacological studies, *J Ethnopharmacol*, 2002, 81, 105–109.

Thirunavukkarasu C, Sakthisekaran D. Effect of selenium on Nnitrosodiethylamine-induced multistage hepatocarcinogenesis with reference to lipid peroxidation and enzymic antioxidants. *Cell Biochem.* 2001; 19, 1, 27-35.

Thompson CB. Apoptosis. In. Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers. 1999; 342-46.

Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *British Journal of Cancer.* 1995; 72(1), 41.

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

Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: Molecular characterization, function and regulation. *Physiol Rev.* 2003; 83, 633-71.

Treben Maria. *Gesundheit aus der Apotheke Gottes (Tanrı’nın Eczanesinden Sağlık)*. Çeviren: Gülelgül Giray, Ruh ve Madde Yayıncılık ve Sağlık Hizmetleri A.Ş., Kurtiş Matbaacılık, ikinci baskı, 2001, 48-52.

Tsujii H, Okamoto Y, Kikuchi E. Prostaglandin E2 and liver regeneration. *Gastroenterology.* 1993; 105, 495-99.

Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europa ea*, Cambridge, At the University Press, 1964, 1: 67 – 68.

Türkdoğan MK, Özbek H, Yener Z, Tuncer İ, Uygan İ and Ceylan E. The role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* in the prevention of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats, *Phytother Res*, 2003, 17, 942-46.

Unur E, Ulger H, Ekinci N. *Anatomi*, 1. Baskı, 2002; 152-56.

Upton R, Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine, *J Herb Med.* 2013, 3: 9-38.

Van Damme EJM, Broekaert WF, Peumans WYJ. The *Urtica dioica* Agglutinin Is a Complex Mixture of Isolectins. *Plant Physiol.* 1988, 86: 598-601.

Van Thiel DH, Stauber R, Gavalier JS. Hepatic regeneration, Effects of age, sex hormone status, prolactine and cyclosporine. *Dig Dis Sci.* 1991; 36, 1309-12.

Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, Serviddio G, Valentini AM, Pirrelli M, Altomare E. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine induced liver fibrosis in the rat: effect of nactylcysteine and interferonalph. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;175, 2, 130-39.

Villari D, Caruso R, Grosso M, Vitarelli E, Righi M, Barresi G. Hep Par 1 in gastric and bowel carcinomas: an immunohistochemical study. *Pathology.* 2002; 34:423–426.

- Waddell WJ. Threshold for Carcinogenicity of N-Nitrosodiethylamine for Esophageal Tumors in Rats. *Food Chem Toxicol.* 2003; 41: 739-41.
- Walters CL, Smith PLR. The effect of water-borne nitrate on salivary nitrite. *Food Chem Toxicol.* 1981; 19: 297-302.
- Wee A. Diagnostic utility of Immunohistochemistry in hepatocellular carcinoma, its variants and their mimics. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006; 14:266–272.
- Wennerberg AE, Nalesnik MA, Coleman WB. Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *Am J Pathol.* 1993; 143: 1050-1054.
- Wetherilt H. Isırgan otu yaprak ve tohumlarının besleyici özellikleri ve antitümoral Etkileri. PhD Thesis, (Turkish). Hacettepe Univ. Graduate Institute of Health Science, 1989, Ankara, Turkey.
- Wetherilt H. Nutritional evaluation of *Urtica* species. Kavalalı GM (Editör), *Urtica, Therapeutic and nutritional aspects of stinging nettles*, Taylor and Francis Ltd. 2003;6.
- WHO Classification of Tumours of the Digestive System (IARC WHO Classification of Tumours). 4th ed. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. Publisher: World Health Organization, 2010: 1-418.
- Wood GA, Archer MC. Matrix Metalloproteinases-2 And 9 do not Play a Role in the Growth of Preneoplastic Liver Lesions in F344 Rats. *Exp. Biol. Med.* 2001; 226 (8): 799-803.
- Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, Keefer JK. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science.* 1991; 254: 1001–3.
- Yamada K, Yamamiya I, Utsumi H. In vivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40: 2040-046.
- Yener Z, Çelik İ, İlhan F, Bal R. Effects of *Urtica dioica* L. Seed on lipid peroxidation, antioksidants and liver pathology in aflatoxin-injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47, 418-24.
- Yıldırım M. Topografik Anatomi. 2. Baskı, İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri. 2004; 251-253.
- Yıldız S. Dukes Veteriner Fizyoloji. 12.Baskı, Medipres Yayıncılık, Malatya. 2008; 340-521.
- Yurchenko S, Molder U. Volatile N-Nitrosamines in various fish products. *Food Chem.* 2006; 96: 325-333.

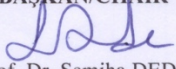
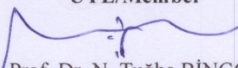
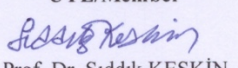
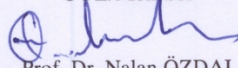
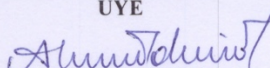
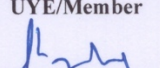
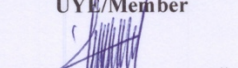
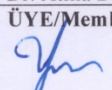
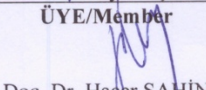
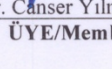
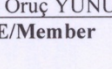
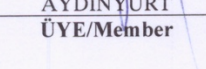
Zeybek N and Zeybek U. Farmasötik Botanik Ders Kitabı. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 1994, 2: 175.

ÖZ GEÇMİŞ

Ömer Faruk KELEŞ, 1987 yılında Zonguldak'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Kocaeli'nde tamamladı. 2007 yılında Van Yüzüncü Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazanarak 2012 yılında Veteriner Hekim olarak mezun oldu ve aynı yıl Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak atanarak 2016 yılında yüksek lisans eğitimini bitirdi ve aynı yıl doktora eğitimine başladı. Halen Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

EKLER

5.1. Ek 1. Kesin Sonuç Onay Belgesi

	VAN YÜHADYEK VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu	
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ VAN YUZUNCUYIL UNIVERSITY (TURKEY) ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE		
Araştırmanın Adı <i>Research Title</i>	Ratlarda Deneyisel Olarak Dietilnitrozamin ile İndüklenen Hepatosellüler Karsinogenezis Sürecinde <i>Urtica Dioica</i>'nin Antitümör Etkinliğinin Araştırılması Investigation of Antitumor Efficacy of <i>Urtica Dioica</i> in Experimentally Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Carcinogenesis Process in Rats.	
Araştırmacı(lar) <i>Investigator(s)</i>	Yürütücü / Chief investigator: Prof. Dr. Zabit YENER Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Doç. Dr. Zübeyir HUYUT Araş. Gör. Ömer Faruk KELEŞ	
Araştırmanın Başlama Tarihi / Research Starting Date: 02. 07. 2019		
Araştırmanın Bitiş Tarihi / Research Completion Date: 03.10.2019		
Proje Süresi / Total Time of Project: 21 ay		
Proje No / Project Number:		
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / Funding institution(s) (if available):		
Destek Şekli ve Miktarı / Type and amount of funding:		
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 28/05/2020 tarih ve 2020/05-09 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Van Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 28/05/2020 (decision number 2020/05-09).		
BAŞKAN/CHAIR  Prof. Dr. Semiha DEDE		
ÜYE/Member  Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	ÜYE/Member  Prof. Dr. Sıddık KESKİN	ÜYE/Member  Prof. Dr. Nalan ÖZDAL
ÜYE  Prof. Dr. Atilla DURMUŞ	ÜYE/Member  Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ	ÜYE/Member  Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
ÜYE/Member  Doç. Dr. Canser Yılmaz DEMİR	ÜYE/Member  Dr. Öğr. Üyesi Oruç YUNUSOĞLU	ÜYE/Member  Doç. Dr. Hacer ŞAHİN AYDINYURT
ÜYE/Member  Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ÖNALAN	ÜYE/Member  Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET	ÜYE/Member  Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU

5.2. Ek 2. Tez Orijinallik Raporu

RATLARDA DENEYSEL OLARAK DİETİLNİTROZAMİN İLE İNDÜKLENEN HEPATOSELLÜLER KARSİNOGENEZİS SÜRECİNDE URTİCA DİOİCA'NİN ANTİTÜMÖR ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%8

BENZERLİK ENDEKSİ

%5

İNTERNET
KAYNAKLARI

%3

YAYINLAR

%6

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
2	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Yüzüncü Yıl Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
4	dergi.omu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.odevsel.com İnternet Kaynağı	<%1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	BİNGÖL, Seyit Ali, DEPREM, Turgay, TAŞÇI, Serap Koral and KOCAMIŞ, Hakan. "Immunohistochemical localization of catalase in	<%1

Prof.Dr. Zabit YENER
YYÜ Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı

