



**DİETİLNİTROZAMİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL
HEPATOSELÜLER KARSİNOM MODELİNDE
N-ASETİLSİSTEİN VE LİKOPENİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Nurcan GÖKTÜRK
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Doktora Tezi – 2026**

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİETİLNİTROZAMİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL
HEPATOSELÜLER KARSİNOM MODELİNDE N-ASETİLSİSTEİN VE
LİKOPENİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurcan GÖKTÜRK

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ**

**Tez Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ
Prof. Dr. A. Şebnem ERENLER
Doç. Dr. Cihat UÇAR**

**Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TDK-
2021-2650 Proje numarası ile desteklenmiştir**

**MALATYA
2026**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “ Dietilnitrozamin ile Oluşturulan Deneysel Hepatoselüler Karsinom Modelinde N-Asetilsistein ve Likopenin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması “ başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

30/01/2026

Nurcan GÖKTÜRK

İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer	3
2.2. Kanser	4
2.3. Karsinogenez	5
2.4. Karaciğer Kanseri	5
2.5. Hepatoselüler Karsinoma	5
2.5.1. Karaciğer Fibrozu	7
2.5.2. Karaciğer Sirozu	8
2.5.3. Hepatoselüler Karsinoma Tanı ve Tedavi Protokolleri	8
2.6. Hepatoselüler Karsinom Kanseri Modelleri	9
2.6.1. Kimyasal İndüklü Modeller	10
2.6.2. İmplantasyon Modelleri	11
2.6.3. Viral Modeller	12
2.6.4. Genetiği Düzenlenmiş Fare Kanseri Modelleri	12
2.6.5. İnsanlaştırılmış Fare Modelleri	12
2.6.6. İn vitro HCC Modelleri	13
2.7. Hepatoselüler Karsinomada Önemli Sinyal Yolakları ve İlgili Proteinler ...	13
2.8. Matriks Metalloproteinaz-2	14
2.9. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	15
2.10. Nükleer Faktör Kappa B	16
2.11. Glutatyon S-Transferaz Pi	17
2.12. Glipikan-3	18
2.13. Apoptotik ve Antiapoptotik Proteinler (Bcl-2, Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9)	19
2.14. Nrf2 Sinyal Yolu ve Antioksidan Savunma Mekanizması	21
2.15. Tümör Büyüme Faktörü β 1	24
2.16. Dietilnitrozamin (DEN)	24

2.17. Tiyoasetamid (TAA)	27
2.18. Sorafenib.....	27
2.19. Likopen.....	28
2.20. N-Asetilsistein	30
3.MATERYAL ve METOT	32
3.1. Balb/c Farelerinin Temini.....	32
3.2. Deneyisel HCC Modelinin Oluşturulması, Deney Grupları ve Uygulamalar.....	32
3.3. Fare Canlı Ağırlıkları, Yem ve Su Tüketimleri.....	34
3.4. Numunelerin Alınması ve Muhafaza Edilmesi	34
3.5. Western Blot Analizi	35
3.5.1. Numunelerden Protein Ekstraksiyonu ve Protein Miktar Tayini	35
3.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	
Stoklama ve Ayırma Jeli	36
3.5.3. Numunelerin Hazırlanması ve Yürütme.....	37
3.5.4. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi	37
3.5.5. Bloklama.....	38
3.5.6. Primer Antikor ile İnkübasyon	38
3.5.7. Sekonder Antikor ile İnkübasyon.....	39
3.5.8. Görüntüleme ve Analiz.....	39
3.5.9. Hafif Sıyırma (stripping) ve Tekrar Proplama	40
3.6. GSH Miktar Tayini.....	40
3.7. Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivite Tayini.....	40
3.8. Malondialdehit (MDA) Miktar Tayini	41
3.9. Katalaz Aktivite Tayini	41
3.10. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini	41
3.11. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivite Tayini.....	41
3.12. Protein Karbonil (PC) Tayini	42
3.13. Hidroksiprolin Miktar Tayini	42
3.14. İnterlökin-6 (IL-6) ve Nrf2 Miktar Tayini.....	42
3.14. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler.....	42
3.15. İstatistiksel Analizler	43
4. BULGULAR	44
4.1. Farelerin Canlı Ağırlık, Karaciğer Ağırlıkları ve Rölatif Karaciğer	
Ağırlıkları.....	44

4.2. Farelerin Haftalık Ortalama Su ve Yem Tüketimleri	48
4.3. Western Blot ile Protein Analiz Sonuçları	49
4.4. Analizi Yapılan Biyokimyasal Parametrelerin Sonuçları.....	57
4.5. Histolojik Bulgular	63
4.5.1. Histopatolojik Değerlendirme ile İlgili Bulgular	63
4.5.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme ile İlgili Bulgular.....	70
5. TARTIŞMA.....	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
KAYNAKLAR.....	95
EKLER	115
EK 1.ÖZGEÇMİŞ	115
EK 2. ETİK KURUL KARARI.....	116

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi, beceri ve tecrübelerinden yararlandığım, insanlığı ve akademisyenliğiyle örnek aldığım ve ömür boyunca örnek alacağım Danışman Hocam Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e,

Doktora eğitim sürecinde hem arkadaşlıkları hem de tecrübeleri ile yanımda olan, beni destekleyen arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Nuray ÜREMİŞ, Araş. Gör. Dr. Muhammed Mehdi ÜREMİŞ, Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer BULUT, Öğr. Gör. Dr. Esmanur ÇİÇEK ÇİĞ, Dr. Emine KOÇ, Uzm. Dr. Fatma ÖLMEZ BUDAK, Biyokimyager Nursena DEMİRCİGİL, Biyolog Sezin DEMİRTAŞ'a,

Hayatım boyunca her zaman desteklerini hissettiğim, varlıklarıyla güç bulduğum annem, babam, abim ve kız kardeşime,

TDK-2021-2650 numaralı tez projemin gerekli mali desteğini sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

En içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım...

ÖZET

Dietilnitrozamin ile Oluşturulan Deneysel Hepatoselüler Karsinom Modelinde N-Asetilsistein ve Likopenin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Amaç: HCC, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu gelişen çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreç, N-nitroso bileşiklerinin kullanıldığı deneysel HCC modelleriyle simüle edilebilmektedir. Karsinojenik N-nitroso bileşikler, insanlarda çevresel ve endojen oluşum yoluyla maruziyet oluşturabilmekte ve HCC'ye yol açabilmektedir. Son yıllarda HCC tedavisinde gelişmeler olmasına rağmen, mevcut tedavilere karşı gelişen direnç, yeni terapötik yaklaşımları gerekli kılmaktadır. Literatürde likopen ve NAC'ın kemopreventif etkileri bildirilmiş olsada, bunların kombinasyonunun hepatokarsinogenez sürecine etkileri değerlendirilmemiştir. Çalışmamızda, DEN/TAA indüklü HCC modelinde likopen ve DNA tamir mekanizmalarını destekleyen NAC'ın birlikte kullanımının, erken dönem karsinogeneze etki potansiyelinin biyokimyasal/histopatolojik yaklaşımlar aracılığıyla araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada 56 fare beş gruba ayrıldı (Kontrol, DEN, Likopen+DEN, Likopen+NAC+DEN, NAC+DEN). Kontrol grubu normal beslenirken, diğer gruplarda 3–10. haftalar arasında DEN ve 11–18. haftalar arasında TAA intraperitoneal uygulanarak HCC modeli oluşturuldu. Likopen ve/veya NAC uygulamasına DEN'den 3 gün önce başlanarak 24. haftaya kadar sürdürüldü. Çalışma sonunda karaciğer dokusunda inflamasyon (sitokinler, Nrf2, NF-κB p65, p-NF-κB p65), apoptozis (Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2) ve neoplastik/fibrotik (GST-pi, Glipikan-3, VEGF, MMP-2) biyoelirteçler analiz edildi.

Bulgular: NAC uygulaması, NF-κB, VEGF ve MMP-2 düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik oluşturmadı. Likopen uygulamaları NF-κB'yi azaltarak antiinflamatuvar etki gösterirken, VEGF ve MMP-2 ekspresyonunu artırarak anjiyogenez ve invazyonu destekledi. Likopen ve/veya NAC uygulaması Bax/Bcl-2 oranını azaltarak antiapoptotik etki gösterirken Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivasyonunun saptanmaması bu bulguyu destekledi. Likopen ve/veya NAC uygulaması, DEN grubuna kıyasla TGF-β1 düzeyini artırdı, HCC'ye özgü eksprese edilen glipikan-3 düzeylerini düşürdü, tümör nodül sayısında artışa neden oldu.

Sonuç: Antioksidan/antiinflamatuvar/antikanser özellikleriyle bilinen likopen ve NAC bileşiklerinin, etkili oldukları hücresel mekanizmalar bilinmemekle birlikte, karsinogenezi artırabilecekleri saptandı.

Anahtar Kelimeler: BALB/c fare, DEN, Glipikan-3, GST-pi, HCC, Likopen, MMP-2, NAC, NF-κB, TAA, VEGF

ABSTRACT

Investigation of the Protective Effects of N-Acetylcysteine and Lycopene in an Experimental Hepatocellular Carcinoma Model Induced by Diethylnitrosamine

Aim: HCC is a multistep disease arising from the accumulation of genetic and epigenetic alterations. This process can be reproduced in experimental models using N-nitroso compounds, which may also cause environmental and endogenous exposure in humans and contribute to HCC development. Despite advances in HCC treatment, therapeutic resistance remains a major challenge, highlighting the need for novel strategies. Although lycopene and NAC have been reported to exert chemopreventive effects, the impact of their combined use on hepatocarcinogenesis has not yet been clarified. Therefore, this study aimed to investigate the effects of combined lycopene and NAC administration, known to support DNA repair mechanisms, on early-stage hepatocarcinogenesis in a DEN/TAA-induced HCC model using biochemical and histopathological analyses.

Materials and Methods: Fifty-six mice were divided into five groups: Control, DEN, Lycopene+DEN, Lycopene+NAC+DEN, and NAC+DEN. Except for the Control group, HCC was induced by intraperitoneal DEN (weeks 3–10) and TAA (weeks 11–18). Lycopene and/or NAC were administered three days before DEN initiation and continued until week 24. Hepatic inflammatory (cytokines, Nrf2, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65), apoptotic (Caspase-3, Caspase-9, Bax, Bcl-2), and neoplastic/fibrotic (GST-pi, Glypican-3, VEGF, MMP-2, TGF- β 1) biomarkers were evaluated.

Results: NAC didn't significantly alter NF- κ B, VEGF, or MMP-2 levels. Lycopene reduced NF- κ B but increased VEGF and MMP-2 expression. Lycopene and/or NAC exerted an antiapoptotic effect by decreasing the Bax/Bcl-2 ratio without Caspase-3 or Caspase-9 activation, and compared to DEN, increased TGF- β 1, decreased glypican-3, and increased tumor nodules.

Conclusion: Despite their recognized antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties, lycopene and NAC may paradoxically enhance carcinogenesis under certain conditions.

Key words: BALB/c mouse, DEN, Glypican-3, GST-pi, HCC, Lycopene, MMP-2, NAC, NF- κ B, TAA, VEGF.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKT	: Protein Kinaz B
APS	: Amonyum Per Sülfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bax	: Bcl-2 İlişkili X
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma 2
CYP	: Sitokrom P450
DEN	: Dietilnitrozamin
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK	: Ekstraselüler Sinyal Regüle Kinaz
GPC-3	: Glipikan-3
GSH	: Redükte Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
GST-pi	: Glutasyon S-transferaz pi
GST P1	: Glutasyon S-transferaz pi Geni
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCC	: Hepatoselüler Karsinoma
HCV	: Hepatit C Virüsü
HGDN	: Yüksek Dereceli Displastik Nodüller
HGF	: Hapatosit Büyüme Faktörü
HIF	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
HSC	: Hepatik Yıldız Hücreleri
IL	: İnterlökin
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
JAK	: Janus kinaz
JNK	: c-Jun N-terminal Kinaz
LGDN	: Düşük Dereceli Displastik Nodüller

MAP	: Mitojen Aktive Protein
MAPK	: MAP Kinaz
MDA	: Malondialdehit
MEK	: Mitojen Aktive Protein
MET	: HGF Kodlayan Gen
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
mTOR	: Memeli Rapamisin Hedefi
NAC	: N-Asetilsistein
NAFLD	: Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH	: Alkolsüz Steatohepatit
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
p- NF-κB	: Fosforile Nükleer Faktör Kappa B
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDGFR	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
PI3K	: Fosfoinositid-3 Kinaz
RAF	: Hızla Düzenlenen Fibrosarkom
RAS	: Rat Sarkom Virüsü
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon Assay
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
STAT	: Sinyal Transdüserleri ve Transkripsiyon Aktivatörleri
TAA	: Tiyoasetamid
TBS	: Tris-Tamponlu Salin
TBST	: Tris-Tamponlu Salin, Tween 20
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil Etilendiamin
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Karaciğer lobülü	3
Şekil 2.2. DEN'in kimyasal yapısı (15).....	25
Şekil 2.3. TAA'nın kimyasal yapısı	27
Şekil 2.4. Sorafenibin kimyasal yapısı (152).....	28
Şekil 2.5. L -sistein, N -asetil- L -sistein ve glutatyonun kimyasal yapıları (14).....	30
Şekil 3.1. Deneysel hepatokarsinogenez modelinde kullanılan uygulama zaman çizelgesi	32
Şekil 4.1. Deney gruplarına ait karaciğerlerin makroskopik görünüşleri	45
Şekil 4.2. Grupların canlı ağırlıklarının karşılaştırılması	46
Şekil 4.3. Grupların karaciğer ağırlıklarının karşılaştırılması	47
Şekil 4.4. Grupların rölatif karaciğer ağırlıklarının karşılaştırılması	47
Şekil 4.5. Farelerin haftalık ortalama yem tüketimi	48
Şekil 4.6. Farelerin haftalık ortalama su tüketimi	49
Şekil 4.7. Western blot ile analiz edilen NF- κ B P65 ve p- NF- κ B P65 düzeylerinin karşılaştırılması.	52
Şekil 4.8. Western blot ile analiz edilen MMP-2 ve VEGF düzeylerinin karşılaştırılması.	53
Şekil 4.9. Western blot ile analiz edilen TGF- β 1 ve GST-pi düzeylerinin karşılaştırılması.	54
Şekil 4.10. Western blot ile analiz edilen Bax ve Bcl-2 düzeylerinin karşılaştırılması .	55
Şekil 4.11. Western blot ile analiz edilen Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 düzeylerinin karşılaştırılması.	56
Şekil 4.12. Karaciğer dokusunda analizi yapılan SOD, CAT, GSH ve MDA düzeylerinin karşılaştırılması	60
Şekil 4.13. Karaciğer dokusunda analizi yapılan IL-6, Nrf2, GST ve NO düzeylerinin karşılaştırılması	61
Şekil 4.14. Karaciğer dokusunda analizi yapılan hidroksiprolin, protein karbonil, TAS ve TOS düzeylerinin karşılaştırılması	62
Şekil 4.15. Kontrol grubu karaciğerinin histolojik görünümü.....	63
Şekil 4.16. DEN grubu karaciğerinin histolojik görünümü (inflamatuvar alanlar).....	64

Şekil 4.17. DEN grubunun karaciğer histolojik görünümü (Nekroze alanlar)	64
Şekil 4.18. DEN grubu karaciğerinde apoptotik hücre görünümü	65
Şekil 4.19. DEN grubu karaciğerinde mitotik arreste uğramış hücre görünümü	65
Şekil 4.20. DEN grubu karaciğerinde hiperkromatik nükleuslu hücre görünümü	66
Şekil 4.21. DEN grubu karaciğerinde nükleer büyüme ve vakuolizasyon	66
Şekil 4.22. Likopen+DEN grubunun karaciğer histolojik görünümü (İnflamatuvar alanlar)	67
Şekil 4.23. Likopen+DEN grubu karaciğerinde nükleer büyüme ve vakuolizasyon	67
Şekil 4.24. Likopen+NAC+DEN grubunun karaciğer histolojik görünümü (İnflamatuvar alanlar)	68
Şekil 4.25. Likopen+NAC+DEN grubu karaciğerinde nükleer büyüme ve vakuolizasyon	68
Şekil 4.26. NAC+DEN grubunun karaciğer histolojik görünümü (İnflamatuvar alanlar)	69
Şekil 4.27. NAC+DEN grubu karaciğerinde nükleer büyüme ve vakuolizasyon	69
Şekil 4.28. Glipikan-3'ün immünohistokimyasal değerlendirmesi	70

TABLÖLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Tablo 2.1. Hepatoselüler karsinom modelleri	9
Tablo 2.2. Hepatoselüler karsinomada değerlendirilen moleküler belirteçlerin fonksiyonel gruplandırılması	14
Tablo 3.1. Deney grupları, uygulanan tedaviler ve grup başına hayvan sayıları	33
Tablo 3.2. RİPA tamponun içeriği ve konsantrasyonları	36
Tablo 3.3. %10'luk SDS-PAGE ayırma jeli içeriği ve hacimleri	36
Tablo 3.4. %5'lik SDS-PAGE stoklama jeli içeriği ve hacimleri.....	37
Tablo 3.5. SDS PAGE transfer tamponu (1000 ml için).....	38
Tablo 3.6. 10x tris tamponlu tuz çözeltisi içeriği.....	38
Tablo 3.7. Western Blot analizinde kullanılan primer antikorlar.....	39
Tablo 4.1. Fare canlı ağırlıkları, karaciğer ağırlıkları, rölatif karaciğer ağırlıkları.....	46
Tablo 4.2. Western Blot analizi ile elde edilen Bax, Bcl-2, Kaspaz-9, GST-Pİ, NF-κB P65, p- NF-κB P65, TGF Beta, Kaspaz-3, MMP2, VEGF bant yoğunluklarının, aynı örneğe ait β-aktin bant yoğunluklarına oranlanarak protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	50
Tablo 4.3. Karaciğer dokusunda analizi yapılan biyokimyasal parametrelerin sonuçları	58
Tablo 4.4. DEN ile oluşturulan karaciğer hasarında inflamasyon, nekroz, nükleer değişiklikler ve Glipikan-3 immünreaktivite bulguları.....	71

1. GİRİŞ

Küresel kanser istatistiklerine (GLOBOCAN 2022) göre karaciğer kanseri, kanser hastalıkları arasında görülme sıklığı açısından altıncı, ölüm oranı açısından ise üçüncü sırada yer almaktadır (1). Karaciğer kanseri, erkeklerde ölüm nedeni olarak ikinci sırada yer alırken, çoğu bölgede, erkeklerde karaciğer kanseri insidans ve mortalite oranları kadınlara göre daha fazla artmıştır (1). Karaciğer kanserlerinden olan hepatoselüler karsinom (HCC) primer karaciğer kanserlerinin yaklaşık %80-90'ını oluşturmaktadır (2). HCC genellikle kronik karaciğer hastalığı ve onunla ilişkili sirozun devamında gelişir; agresif doğası ve sınırlı tedavi seçenekleriyle ölümcül bir malignitedir (3). Hastalık çeşitli risk faktörleriyle ilişkilendirilmiştir. En önemli risk faktörleri; Hepatit B (HBV), Hepatit C (HCV) ve Hepatit D virüsleriyle kronik enfeksiyon; aşırı alkol alımı, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, diyabet, obezite gibi metabolik bozukluklar, mantar toksini-aflatoksin B1 ile enfekte gıda maddelerinin tüketimi ve tütün kullanımı gibi kimyasal madde maruziyeti; hemokromatozis, Alfa-1 antitripsin eksikliği gibi genetiksel etiyolojiler olarak sıralanabilir (4). Genellikle semptomların geç ortaya çıkması nedeniyle HCC tanısı ileri evrede konmaktadır. Bu nedenle çoğu HCC hastası kötü bir prognoza sahiptir ve küratif tedavi yalnızca sınırlı sayıda hastada kullanılabilmektedir. Bu durum karaciğer kanserinin tedavisini zorlaştırmaktadır (5). HCC'nin başlaması ve gelişimi, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesiyle ortaya çıkan çok aşamalı bir süreçtir. Bu değişikliklere bağlı olarak temel hücresel süreçlerin düzensizliğine yol açan onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu gerçekleşmektedir (6). Bunların yanı sıra hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozis, metastaz ve anjiyogenezde rol oynayan Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt/mTOR, JAK/STAT gibi çeşitli sinyal yolları HCC oluşumuyla beraber anormal çalışmaktadır (7).

HCC'li hastalar için tedavi seçenekleri klinik evreleme ile belirlenir. Uluslararası kabul görmüş Barselona Kliniği Karaciğer Kanseri (BCLC) evreleme sistemine göre HCC'li hastalar klinik evrelere ayrılır (4). HCC de ana tedavi yöntemleri cerrahi rezeksiyon, radyoterapi, kemoterapi ve nakildir. Erken ve orta evre HCC hastaları için cerrahi rezeksiyon ana tedavi yöntemi iken ileri evre hastalar için ilaçlar tek tedavi seçeneği olmaktadır. İleri evrede tanısı konulmuş ve ameliyat olma şansını olan hastalar kötü bir prognoza sahip olmanın yanında çoğu kemoterapötik ajanlara direnç sorunuyla karşı karşıya kalmaktadır (4).

HCC, tümör içinde ve bireyler arasında oldukça heterojendir ve bu durum

hastalığın ilerlemesini, sınıflandırmayı, prognozu ve doğal olarak ilaca karşı hücrel direnci etkiler. Sorafenib, ileri evre HCC için onaylanmış birinci basamak bir kemoterapötik ajandır. Raf (hızla düzenlenen fibrosarkom), EGFR (endotelial büyüme faktörü reseptörü), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), FMS benzeri tirozin kinaz-3 (FLT3) ve c-kit'i hedef alan bir multikinaz inhibitörüdür. Sorafenib ileri evrede hepatik tümör büyümesini ve anjiyogenezi baskılamıştır, ancak uzun süreli maruziyette direnç oluşturduğu ortaya konmuştur (8). Sorafenibin yanı sıra kullanılan ilaçlardan lenvatinib, regorafenib ve cabozantinibin de sağkalımı iyileştirdiği kanıtlanmıştır (4).

Likopen beta karotenoidler arasında en güçlü süperoksit radikal temizleyicisidir. Hepatositlerde dietilnitrozamin (DEN) metabolizması sırasında ortaya çıkan serbest radikallerin etkisini söndürmenin yanında hepatosit membranını stabilize etme, büyüme sinyallerini inhibe etme, hücre döngüsünü durdurma ve apoptozisi indüklemeye gibi birçok hedefte etkili antikanser özelliklere sahiptir (9).

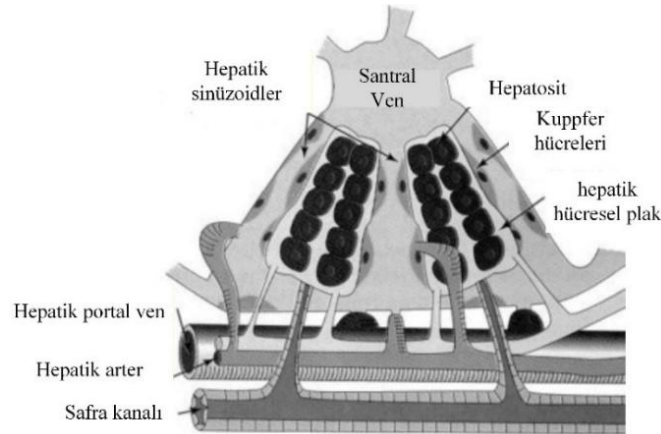
Karaciğer hasarında Redükte Glutasyon (GSH) sentezi bozulmaktadır (10). Doku GSH sentezi için sistin, metiyonin, N-asetilsistein (NAC) ve L-2-oksoyazolidin-4-karboksilat sisteinin etkili öncülleri (11). NAC özellikle hepatik dokuda hücre içi GSH'yi doğrudan artırarak etki eden bir antioksidan olarak bilinmektedir (12). NAC, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından temel bir ilaç olarak tanınan, yaygın olarak parasetamol (asetaminofen) doz aşımının tedavisinde ve solunum yolu hastalıklarında mukolitik bir ajan olarak kullanılan bir ilaçtır (13).

Fare, sıçan gibi kemirgen HCC modelleri insan HCC'sini simüle etmesi bakımından büyük bir öneme sahiptir (14). Karaciğer kanser modeli oluşturmak için bir N-nitrozo bileşiği olan DEN yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsanlar bu kimyasala hem çevresel hem de endojen olarak maruz kalabilmektedir. DEN bileşiğinin metabolize olması sonucu serbest radikaller, alkileyici ajanlar oluşmakta ve bu da hücrede inflamasyon ve DNA hasarına neden olmaktadır (15,16). Oluşan bu hasarı önlemek için çalışmamızda doğal ve çok hedefli bir ajan olan likopen ile bir antiinflamatuvar bileşik olan NAC'i beraber kullanarak tümör oluşumuna etkisini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

Karaciğer vücudumuzdaki hayati organlardan biridir. Karaciğer karın boşluğunun sağ üst kısmında, diyaframın hemen altında yer almaktadır. Fibröz bir kapsülle çevrilidir. Ağırlığı erkeklerde yaklaşık olarak 838-2584 gr ve kadınlarda ise ortalama 775-2395 gr'dır (17,18). Karaciğer sağ ve sol olmak üzere iki ana lob ile bunlardan daha küçük ve merkezi konumdaki iki lobdan oluşmaktadır. Karaciğer lobül adı verilen fonksiyonel birimlerden oluşur. Lobülün merkezinde santral ven vardır, santral ven çevresinde portal yollarla iletişim kurduğu hepatik arter, portal ven ve safra kanalları yer alır (Şekil 2.1) (19). Karaciğer portal ven ve hepatik arterden kanlanmaktadır. Karaciğere gelen kanın %75-80'ini portal venöz sistem, %20-25'ini ise hepatik arteriyel sistem taşımaktadır. Portal ven, barsaklardan emilen, besin açısından zengin kanı getirirken hepatik arter oksijenden zengin kanı karaciğere taşımaktadır. Safra kanalları hepatositlerin salgıladığı safrayı duodenuma taşımaktadır. Hepatositler organın ana metabolik işlevlerinden sorumludur ve hepatik venüllere doğru yayılan plakalar halinde düzenlenmektedir (20).



Karaciğer lobülünde hepatosit, portal üçlü (hepatik arter, hepatik portal ven ve safra kanalı), hepatik sinüzoid ve hepatik plakların temsili görünümü (21)

Şekil 2.1. Karaciğer lobülü

Karaciğer birçok farklı hücre tipinden oluşur ve bunlar parankimal hücreler (hepatositler) ve non-parankimal hücreler (sinüzoidal endotelial hücreler, kupffer hücreleri, hepatik yıldız hücreler (HSC), doğal öldürücü hücreleri (NK hücreleri), hepatik

dentritik hücreler, doğal öldürücü T hücreleri, safra epitelyal hücreler) olmak üzere 2 gruptan oluşur (22). Karaciğer, hepatositlere ve parankimal olmayan hücrelere ek olarak, oval hücreler adı verilen birçok hücre öncülü olabilen intrahepatik "kök" hücreleri de içerir (19). Non-parankimal hücrelerin hepsi sinüzoidlerde bulunur ve "karaciğer sinüzoidal hücreleri" olarak adlandırılır. Hepatosit popülasyonunun karaciğer dokusunun yaklaşık %78'ini oluşturduğu, non-parankimal hücrelerin ise yaklaşık %6,3'ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir; bu hücrelerin yaklaşık %2,8'i endotelyal hücreler, %2,1'i Kupffer hücreleri ve %1,4'ü hepatik yıldız hücrelerdir. Hücreler arası boşluk karaciğer dokusunun yaklaşık %16'sını temsil etmektedir (22).

2.2. Kanser

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), dünya çapında görülen kanser insidansı ve mortalite oranlarını belirlemek, önceden belirlenmiş 20 dünya bölgesi arasında gözlemlenen coğrafi değişkenlikleri ortaya koymak ve küresel demografik göstergelere dayanarak kanser insidansının gelecekteki (2050) büyüklüğünü tahmin etmek amacıyla çeşitli yıllarda kanser istatistiklerine dair raporlar (GLOBOCAN) yayınlamıştır. Bu verilere göre, dünya genelinde kanser vakasının ve kanser nedeniyle ölüm oranının arttığı görülmektedir (1,23–27). Kanser vakalarındaki bu artışın, 2050 yılına kadar 35 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (1). 2022 yılında dünya genelinde yaklaşık 20.0 milyon yeni kanser vakası ve 9.7 milyon kanser nedeniyle ölüm meydana geldiği tahmin edilmiştir (1).

Dünya çapında, bir yaşam sürecinde her 5 erkek veya kadından birinde kanser gelişmektedir, bunun yanı sıra her 9 erkekten biri ile her 12 kadından birinde de kanser nedeniyle ölüm gerçekleşmektedir (1). Dünya genelinde en sık teşhis edilen kanser akciğer kanseri (%12.4 toplam vakaların) olup, bunu meme (%11.6), kolorektum (%9.6), prostat (%7.3) mide (%4.9) ve karaciğer (%4.3) kanserleri izlemektedir. Kanserden ölümlerin başlıca nedeni Akciğer kanseri (%18.7 toplam kanser ölümlerinin) olup, bunu kolorektal (%9.3), karaciğer (%7.8), meme (%6.9) ve mide (%6.8) kanserleri izlemektedir. Kadınlarda, hem en sık teşhis edilen hem de ölüme neden olan kanser meme kanseri olup bunu akciğer ve kolorektal kanser izlemektedir. Erkeklerde hem en sık teşhis edilen hem de ölüme neden olan kanser akciğer kanseri olup, bunu, en sık teşhis bakımından prostat ve kolorektal kanser izlerken, mortalite sayısı bakımından karaciğer ve kolorektal kanser takip etmektedir (1).

Türkiye 2020 kanser istatistiklerine göre erkeklerde en sık görülen ilk beş kanser

sırasıyla akciğer, prostat, kolorektal, mesane ve mide kanseridir. Kadınlarda ise en sık görülen kanserler meme, kolorektal, tiroid, akciğer, mide ve uterus korpus kanseridir (28).

2.3. Karsinogenez

Kanser, hücredeki DNA'nın hasar alması sonucu hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çoğalmasıyla karakterize edilen karmaşık ve çok yönlü bir hastalıktır (29). Normal hücrelerin aksine kanser hücrelerinde proliferatif sinyal sürdürülür, büyüme baskılayıcılardan kaçınılır, hücre ölümüne direnç gösterilir, sınırsız replikasyon ve immün sistemden kaçış yeteneği sergilenir. Bunlara paralel olarak enerji metabolizması ve tümör mikro çevresi yeniden düzenlenir, anjiyogenez uyarılır, invazyon ve metastaz aktive edilir (30).

Kanser oluşumu, başlama, gelişme ve ilerleme safhalarına ayrılabilir. Başlama, normal bir hücrenin kanserli olma olasılığını artıran genetik değişikliklere (mutasyonlara) uğradığı ilk aşamadır. Bu safhada proto-onkogenlerde, tümör baskılayıcı genlerde, DNA onarım genlerinde mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler meydana gelir. Bu mutasyonlara radyasyon, kimyasal ve viral etkenler neden olmaktadır (31). Gelişme evresi, başlama evresinde biriken mutasyonlar nedeniyle premalign hücrelere dönüşümün gerçekleştiği ve hücre popülasyonunun genişlediği bir evredir (30,32). İlerleme evresi, ek genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesi maligniteyi arttırarak invazyon ve metastaza neden olur. Bu evrede kromozomal instabilite, anjiyogenez ve apoptozun engellenmesi söz konusudur (30). Kanser hücreleri istila ettikleri dokudan tek veya küçük kanser hücre kümeleri şeklinde damar içine sızar ve dolaşım sistemi aracılığıyla hedef organın kılcal damarlarında durarak tekrar damar dışına sızar. Kanser hücreleri bu şekilde primer tümör bölgesini terk ederek, uzak organlara yerleşir ve metastatik tümörler oluşturur (33).

2.4. Karaciğer Kanseri

Karaciğer kanseri hepatositlerde gelişen primer karaciğer kanseri (%80'i), safra kanallarında gelişen (2) intrahepatik kolanjiokarsinom (%14,9'u) ve diğer histolojiler (hepatoblastoma, hepatoselüler adenom, pediatrik neoplazm) (% 5.1) olmak üzere alt tiplerden oluşur; bunların etiyoloji ve epidemiyolojileri farklılık göstermektedir (2).

2.5. Hepatoselüler Karsinoma

HCC, kronik karaciğer hastalığına bağlı olarak gelişen en yaygın primer karaciğer

kanseridir. Çoğunlukla kronik karaciğer hastalığı ve onunla ilişkili sirozun devamında gelişir; agresif doğası ve sınırlı tedavi seçenekleriyle ölümcül bir malignitedir (3). HCC'nin başlıca risk faktörleri kronik HBV veya kronik HCV enfeksiyonu olup, dünya çapında HCC'nin %21 ila %55' inden sorumludur (1). Viral risk faktörlerine bağlı gelişen HCC insidansı küresel çapta neonatal HBV aşılamanın yaygınlığı, HBV ve HCV tedavisinde etkili antivirallerin geliştirilmiş olması nedeniyle azalmıştır (4). Dünya Sağlık Örgütü ve/veya Küresel Hastalık Yüğü'nün verilerine göre, metabolik fonksiyon bozukluğuyla ilişkili yağlı karaciğer hastalığı (MAFLD) olarak yeniden adlandırılan alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ve alkole bağlı karaciğer hastalığının yükü giderek artmaktadır (34). Diyabet ve giderek artan obezite gibi metabolik nedenlerle meydana gelen MAFLD önemli bir küresel sağlık tehdidi olup (3), HCC'de HBV veya HCV risk faktörlerinden daha etkin bir duruma geçeceği beklenmektedir (4).

Son yirmi yıldır Türkiye'de HCC gelişiminde en yaygın risk faktörünün kronik viral hepatit olmaya devam ettiği bildirilmektedir. HCC ile en sık ilişkili enfeksiyon HBV olup, bunu HCV enfeksiyonu ve NAFLD izlemektedir (35).

HCC, genotoksik stresler ve farklı etiyolojilere bağlı olarak çeşitli değişikliklerle karakterizedir. Bu değişiklikler, HCC'nin moleküler ve immün alt sınıflara ayrılmasına olanak tanımaktadır. Bu bağlamda, Kanseri Genom Atlası Araştırma Ağı (TCGA), HCC üzerine yapılan ilk büyük ölçekli ve çok platformlu analizde; somatik mutasyonlar, DNA metilasyonu, gen, protein ve mikroRNA (miRNA) ifadeleri gibi çok sayıda moleküler parametreyi değerlendirmiştir (36,37). Bu değerlendirmede 363 HCC vakasında tüm ekzon dizileme ve DNA kopya sayısı analizi, 196 vakada ise DNA metilasyonu, RNA, miRNA'ya ek olarak proteomik ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlere göre;

- DNA sekanslama ve mutasyon analizi LZTR1, EEF1A1, SF3B1 ve SMARCA4 gibi anlamlı şekilde mutasyona uğramış genleri ortaya koymuştur.
- HCC'de metabolik yeniden programlamaya işaret eden genlerde (ALB, APOB ve CPS1) hipermetilasyon kaynaklı aşağı regülasyon veya mutasyon yoluyla değişiklikler gerçekleştiği gözlemlenmiştir.
- TP53 hedef gen ekspresyon imzası, kötü sağkalım ile korele bulunmuştur.
- Tedavi edilebilir potansiyel hedefler arasında WNT sinyali, MDM4, MET, VEGFA, MCL1, IDH1, TERT ve bağışıklık kontrol noktası proteinleri olan CTLA-4,

PD-1 ve PD-L1 proteinlerinin yer aldığı belirtilmiştir (37).

2.5.1. Karaciğer Fibrozu

Kronik karaciğer hasarı inflamasyona, fibrozise, siroza ve HCC gelişimine neden olmaktadır. Karaciğer fibrozisi, hücre dışı matriks proteinlerinin (çoğunlukla çapraz bağlı tip I ve tip III kollajenler) birikmesiyle meydana gelen lifli bir oluşumdur (38). Fibrozise bağlı karsinogenezin potansiyel mekanizmaları arasında fibrotik matriks tarafından artan integrin sinyali, HSC'ler ve hepatositler arasında parakrin sinyali, artan stromal sertlik, hücre dışı matriks tarafından büyüme faktörünün sekestrasyonu (tutulması) ve NK ve NKT hücreleri tarafından tümör gözetiminin azalması yer alır (39). Karaciğer fibrozu, aşırı ekstrasellüler matriks birikimi ve istiflenmiş lif oluşumu ile karakterizedir. Biriken lif oluşumu normal karaciğer mimarisini tahrip ederek hepatosit kaybına sebep olmaktadır. Bu durum karaciğerin fizyolojik fonksiyonlarını engelleyebilmekte ve sonunda karaciğer yetmezliğine neden olabilmektedir (40). Fibrojenezde, ekstrasellüler matriksin ana kaynağı miyofibroblastların aktivasyonu ve proliferasyonu olmaktadır. Ekstrasellüler matriks üreten miyofibroblastlar, hasarlı karaciğerde bulunurlar, ancak normal fizyolojik koşullarda bulunmazlar. Miyofibroblastların ana kaynağı aktive edilmiş hepatik yıldız hücreleri olmakla beraber hem portal fibroblastlar hem de kemik iliğinden kökenli kollajen üreten hücreler miyofibroblastlara transdiferansiye olabilmektedir (41).

Karaciğer hasarı, hastalığın erken dönemlerinde vasküler düzensizliğin başlamasına neden olur. Vasküler düzensizliğin geliştiği bölgelerde hipoksi meydana gelir, bu durum anjiyogenezi başlatır. Hipoksi, hücre hasarı ve inflamasyonu artırır, karaciğer rejenerasyonunu inhibe eder, anjiyogenez ve fibrojenizi uyarır ve karaciğer karsinogenezini destekler. Hipoksinin bu etkilerinin çoğuna, oksijene duyarlı bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi ile indüklenebilir faktör-1a (HIF-1a) aracılık eder. Periportal bölgedeki hücrelerle karşılaştırıldığında, intralobüler HSC'ler hipoksiye daha duyarlıdır(42) ve HSC'ler, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ve vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF) sinyal yoluyla endotelial hücrelerle etkileşimde bulunarak anjiyogenezde önemli bir rol oynar (42). Anjiyogenez karaciğer hasarının başarılı bir şekilde onarımı için gerekli olmasına rağmen sirozda anjiyogenez, VEGF indüklü yeni damarların olgunlaşmaması ve geçirgenliği nedeniyle verimsiz olabilir, dolayısıyla karaciğer hipoksisini düzeltmede başarısız olabilir (42).

2.5.2. Karaciğer Sirozu

Karaciğer sirozundan önce meydana gelen fibrozis, çoğunlukla Tip I ve Tip III kollajenler olmak üzere ekstrasellüler matriks proteinlerinin birikmesinden kaynaklanır. Bu durum fibröz skar oluşumuna neden olarak normal karaciğer fonksiyonlarını tehlikeye atabilir. Etiyolojiden bağımsız olarak karaciğer fibrozu hepatosit ölümüne, sitokin salınımıyla kronik inflamasyona, HSC'lerin aktivasyonuna ve epitelyal veya endotelyal bariyerin bozulmasına neden olur (43). HCC'nin yaklaşık %70-80'i siroz zemininde gelişirken %20-30'u ise siroz olmadan gelişmektedir (44). Altta yatan bir karaciğer hastalığının yokluğunda HCC, hepatik adenomların maligniteye dönüşmesiyle oluşurken, sirozda HCC, rejeneratif nodüllerin displastik lezyonlara ve bunların da erken evre HCC'ye evrilmesiyle oluşur (45). Boyutu 1 mm'den küçük olan displastik odaklar küçük değişiklikler içeren prekanseröz hepatosit grupları iken, boyutu 2 cm'ye kadar olan nodüller malignite gösteren hepatosit gruplarıdır. Displastik odaklar demir içermeyen büyük veya küçük hücresel değişiklikler gösteren bölgelerdir. Displastik nodüller doku mimari anormalliğinin şiddetine bağlı olarak düşük dereceli displastik nodüller (LGDN) veya yüksek dereceli displastik nodüller (HGDN) olarak sınıflandırılabilirler (44). Displastik nodüllerde ve erken HCC'de TERT promotör mutasyonlar ve kromozomal anormallikler gibi moleküler değişikliklerin malign transformasyona geçiş için ilk işaretler olduğu düşünülmektedir (4). Displastik nodüllerde ve yerleşik HCC'de, telomer revers transkriptaz sentezini kodlayan TERT promoterinin mutasyonları LGDN'lerde %6, HGDN'lerde %20 ve HCC'de %60 sıklıkta görülür (44).

2.5.3. Hepatoselüler Karsinoma Tanı ve Tedavi Protokolleri

HCC'de en iyi tedavi sonucunu elde etmek için erken teşhis önemlidir. Kronik karaciğer hastalığı uzun bir süreçten sonra siroza neden olmaktadır. Siroz, hepatosit proliferasyonunun artması sonucu oluşan rejeneratif nodüllerin oluşmasıdır (46). Bu rejeneratif nodüller ile HCC arasındaki ayrım nodül boyutuyla ilişkilendirilmektedir. HCC'nin erken evrede tespit edilmesi, morbidite ve mortalitenin azaltılması için tarama, tanı, evreleme ve tedavi basamaklarının etkili bir şekilde gerçekleştirilmesi gerekmektedir. HCC tanısı için, 6 aylık aralıklarla ultrason, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme gibi radyolojik testler ve α -fetoprotein gibi serolojik belirteçler kullanılmaktadır. Genel olarak, rezeksiyon, ablasyon ve transplantasyon HCC'yi tamamen ortadan kaldırmayı amaçlayan küratif amaçla yapılırken,

transkateterizasyon, radyasyon ve sistemik tedaviler esas olarak evreyi düşürme, kitleyi küçültmek, semptomları hafifletme ve yaşam kalitesini iyileştirme amacıyla uygulanır (4).

2007 yılında FDA tarafından onaylanan ilerlemiş HCC'nin tedavisi için ilk hedefli, sistemik tedavide sorafenib kullanıldı. İlerlemiş HCC hastalarında on yıl boyunca standart tedavi olarak bir anti-anjiyojenik ve tirozin kinaz inhibitörü (TKI) olan sorafenib kullanıldıktan sonra 2018'de yine bir antianjiyojenik ve TKI olan lenvatinib de birinci basamak tedavide kullanılmıştır (44).

2.6. Hepatoselüler Karsinom Kanser Modelleri

HCC gelişiminde önemli risk faktörleri tanımlanmıştır. Ancak hepatoselüler karsinogenez ve metastazının birçok yönü hala bilinmemektedir. HCC hastalarında hassas tedavilerin belirlenmesi hastalar arası yüksek heterojenite nedeniyle zordur (47). Bu bağlamda HCC'nin moleküler, hücresel ve patofizyolojik mekanizmalarının anlaşılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için uygun hayvan modelleri önem taşımaktadır (48). Mevcut hiçbir hayvan modeli insan HCC'sini tamamen simüle etmemekle beraber, HCC için birçok model tasarlanmıştır. Anatomik, fizyolojik ve genetik olarak insanlara benzerlik, küçük boyut, çok sayıda yavru ve daha büyük hayvanlara kıyasla düşük maliyet gibi çeşitli avantajlar sunan kemirgen modelleri HCC araştırmaları için en çok tercih edilen hayvan modelleri olmuşlardır (49). HCC gelişimi için bazı fare suşlarının (C3H, CBA ve DBA/2) kendiliğinden veya kimyasal-indüklü olarak kanser oluşturmaya yatkınken bazı suşların (C57BL/6, BALB/c ve A/J.) oldukça dirençli oldukları tanımlanmıştır (50). Fare modelleri dışında karaciğer kanseri çalışmalarında Moğol gerbili, Gine domuzu, köpek, maymun, tavşan, sıçan, Suriyeli altın hamster, marmoset ve zebra balığı gibi hayvan modelleri kullanılmıştır. Hepatoselüler karsinom modelleri Tablo 2.1.'de sunulmuştur (51).

Tablo 2.1. Hepatoselüler karsinom modelleri

•	Kimyasal indüklü modeller
•	İmplantasyon modelleri
•	Singenik modeller
•	Ksenograft modelleri
•	Kimyasalla immünsupresyon
•	Genetiksel immünsupresyon

•	Viral modeller
•	Genetiği değiştirilmiş fare (GEM) modelleri
•	Hümanize edilmiş modeller

2.6.1. Kimyasal İndüklü Modeller

HCC'nin kimyasal olarak indüklenmiş ilk modeli, 4-dimetil-aminoazobenzenle sıçanlarda oluşturulmuştur (1932-1937). Bu maddenin karaciğer kanserini güçlü bir şekilde indüklediği bir dizi deneyle gösterilmiştir (52). Kimyasalların karsinogenezi indüklemesi için uygulanan maddenin yapısı, konsantrasyonu, uygulandığı hayvan türünün yanı sıra akut veya kronik uygulanma süresi de önemlidir. Kimyasal maruziyetinde hedef organ ksenobiyotik detoksifikasyonundaki rolü nedeniyle karaciğerdir (51). Bu rolüne rağmen detoksifikasyon sonucunda oluşan bazı metabolitler DNA ve hücre proteinleriyle kovalent bağlar oluşturarak kanser gelişimine yol açabilirler (51). Bu modelde normal doku, HCC gelişimi ve immün sistem etkileşimi mevcut olduğundan karsinogenez sürecini etkileyen çevresel, genetik ve immünolojik faktörlerin araştırılması için uygun bir modeldir (52). Kimyasal indüklü modeller seçilirken ve tasarlanırken dikkate alınması gereken "ideal" kriterler bulunmaktadır. Model basit, uygun fiyatlı ve modelin kullanımı kolay olmalıdır. Tümör ve konak arasındaki etkileşimi kapsamlı bir şekilde tasvir etmelidir. HCC modellerinde hepatosit dejenerasyonu, rejenerasyonu, proliferasyonu ve transformasyonunun aşamalarını belirgin olarak oluşturmalıdır. İnsan tümör mikro ortamını simüle etmelidir. HCC'nin gelişim ve ilerlemesiyle ilgili hücresel ve moleküler temel olayların güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde değerlendirilmesine yardımcı olmalıdır. Primer tümör ile metastazları arasındaki ilişkiyi ifade edebilmelidir (51).

Genotoksik Karsinojen İndüklü Model: Genotoksik etkili karsinojenler (DEN veya aflatoksinler gibi), DNA ile kovalent bağlar kurarak DNA adüktleri oluşturan kimyasallardır. DEN tek doz olarak spesifik bir şekilde bir hayvana verildiğinde sentrilobüler hepatositlerde metabolize olur, bu sırada meydana gelen oksidatif stresle ilişkili olarak DNA hasarına neden olan reaksiyonlar oluşur (15). Kronik olarak enjekte edilen DEN, kronik inflamasyona ve ardından fibroza neden olur. Bu nedenle kemirgenlerde karaciğer fibrozunu ve HCC'yi indüklemek için genotoksik karsinojenler, sıklıkla kullanılır. Kemirgen modellerinde DEN tarafından indüklenen bu temel metabolizma yolları, insanların metabolizma yollarına benzerdir (52). DEN ile

indüklenen HCC'lerin gen ekspresyon modellerinin, insan HCC'lerinin daha zayıf hayatta kalma grubundakilerle son derece benzer olduğunu gösterdi (53). Kemirgenlerde DEN ile indüklenen HCC gelişimi insanlarda olduğu gibi insidansı cinsiyete bağlıdır. Yapılan çalışmalar dişi farelerin ve sıçanların DEN kaynaklı hepatokarsinogeneze büyük ölçüde dirençli olduğunu göstermiştir. Bu durum kadınlarda Kupfer hücreleri tarafından IL-6 üretiminin östrojen aracılı inhibisyonuna bağlanmıştır. Bu da kimyasal modellerin immün sistemle ilişkisine işaret etmektedir (52).

Genotoksik Olmayan Karsinojen İndüklü Model: Karbon tetraklorür (CCl₄), tiyoasetamid (TAA) ve fenobarbital ve peroksizom proliferatörleri gibi genotoksik olmayan kanserojenlerin DNA ile doğrudan etkileşimi yoktur. Bu maruziyetler, hücresel yapıları bozarak ve hücre proliferasyonunun veya genetik hata riskini artıran süreçlerin kinetiklerini değiştirerek, inflamasyonla ilişkili olaylara, karaciğer fibrozuna ve artmış HCC insidansına yol açarak hepatik hasara neden olmaktadır (54).

2.6.2. İmplantasyon Modelleri

İmplantasyon modeli 2 çeşittir, tümör hücrelerinin aynı türden hayvana nakledilmesi durumunda Singenik, farklı türden hayvana nakledilmesi durumunda ksenograft model adını alır (51).

Singenik Modeller: Singenik model, allograft tümör modeli olarak da bilinir. Tümör hücrelerinin aynı türden bir hayvana nakledilmesini içerir (47). Singenik modelde HCC gelişimi spontan, viral enfeksiyonlar ve genetiğin değiştirilmesi gibi nedenlerle gerçekleşmiş olabilir. Aynı türden HCC hücreleri bağışıklığı-tam aynı suştan başka bir hayvanın ya deri altına (ektopik) ya da bu HCC hücrelerinin kaynağı olan karaciğere enjekte (ortotopik) edilir. Bu modelin avantajları; bağışıklığı-tam canlılar kullanması, immün sistem ve tümör mikro ortamının oyuncularının araştırılmasına olanak sağlaması ve ortotopik uygulama şeklinin metastaza yol açabilmesi nedeniyle immün yanıtın tümör tarafından baskılanmasının incelenmesine olanak sağlaması olarak sıralanabilir. Dezavantajı ise kullanılan hücre hatlarının insan HCC ile sınırlı genetiksel benzerliğe sahip olmasıdır (51,55).

Ksenograft Modelleri: Bu modelde, tümör hücrelerinin bir hayvana nakledilmesi söz konusudur. Genellikle insan tümör hücre veya dokuları farelere nakledilir ve model hasta kaynaklı ksenograftlar (PDX'ler) olarak adlandırılır (47). İmplant edilen doku reddini önlemek için insan kanserli doku örneklerinin bağışıklığı baskılanmış farelere nakledilmesi gerekmektedir (56). Bu nedenle ksenograft modellerde immün yetmezliği

olan atipik çıplak fareler kullanılmıştır (47). Bu modelde immün yetersiz fareler kullanıldığı için antitümör ajanların bağışıklık tepkileri doğru bir şekilde değerlendirilemez ve bu da onları immünoterapileri içeren çalışmalar için uygunsuz hale getirir (57).

2.6.3. Viral Modeller

HBV ve HCV, hepatositlerin kronik inflamasyon ve rejenerasyonu yoluyla DNA hasarı ve kanser gelişimine neden olduğu için HCC'nin etiyolojisinde yer almaktadır. Bu enfeksiyonlar gelişmekte olan ülkelerdeki toplam karaciğer kanserlerinin yaklaşık %60'ından sorumluyken, insan HCV enfeksiyonunun uygulanabilir küçük hayvan modelinin olmaması etkili tedavilerin geliştirilmesine engel teşkil etmiştir (51).

2.6.4. Genetiği Düzenlenmiş Fare Kanser Modelleri

Hayvanların genetiğiyle oynanarak etiyoloji ve histopatoloji bakımından insanla ilgili tümörler oluşturulabilmektedir (56). Fare germ hattını tasarlamak için çok çeşitli teknolojiler kullanılır. Embriyonik kök hücrelerin veya zigotların genomu düzenlenerek yapılabildiği gibi doğrudan mutasyonlarla tümör baskılayıcı genler inaktive ve onkogenler aktive edilerek veya hedef genlerin ifadesini transkripsiyon sonrası spesifik olarak baskılayan RNA'ların kullanılmasıyla genetiği değiştirilmiş modeller yapılmaktadır (58). Kanser gelişimi doğal stroma ve bağışıklığın tam olduğu bir sistemde gerçekleşmektedir. Genetiği düzenlenmiş fare modelinde tümör kendi doğal ortamında gelişmektedir (otokton kanserler). Genetiği düzenlenmiş fare modelleri immün tedavilerin uygulandığı ve değerlendirildiği tek modeldir (56,59).

2.6.5. İnsanlaştırılmış Fare Modelleri

Bağışıklık sisteminin bileşenlerinden yoksun ksenograftlı farelerin dezavantajlarını aşmak için insanlaştırılmış fare modelleri kullanılmıştır. Bir modelde kordon CD34⁺ hematopoietik kök hücreleri immün yetersiz farelere enjekte edilerek insan bağışıklık sistemi farelere dahil edilebilmiştir. NOG ve NOG-EXL gibi immün yetmezliği olan fare suşlarına insan CD34⁺ hematopoietik kök hücreleri enjekte edilerek 12–16 hafta içinde farede çok çeşitli insan bağışıklık hücreleri geliştirilmiştir. Yine farelere insan periferik kan mononükleer hücreler (T ve B lenfositler, NK ve miyeloid hücreler) enjekte edilmiş ancak sadece T lenfositler tutunmuşlardır (60). Ancak, insan T hücresinin gelişimi farelerde tam olarak tekrarlanamaz çünkü bunların timüslerinde bazı

insanlara özgü faktörler yoktur (47).

2.6.6. İn vitro HCC Modelleri

İn vitro çalışmalar genellikle izole hücrelerin belirli kültür ortamlarında büyümesine dayanır. Kanser hücre hatları, kanser araştırmalarında ve ilaç keşfinde rutin olarak kullanılan değerli klinik öncesi modellerdir. HCC’de yaygın olarak kullanılan hücre hatları, ölümsüzleştirilmiş insan birincil tümörlerinden oluşturulmuştur. Bu HCC hücre hatlarında birincil HCC tümörlerinin genomik ve transkriptomik özellikleri hemen hemen tam olarak korunmuştur. Bu hücre hatları hücresel sinyal yolları, metabolizma, invazyon, çoğalma ve kemoterapi veya radyoterapiye yanıt, ilaç direnci ve tümör büyümesinin ve metastazının moleküler mekanizmaları hakkında bilgi sağlarlar (61–63).

2.7. Hepatoselüler Karsinomada Önemli Sinyal Yolakları ve İlgili Proteinler

Sistemik tedavinin sınırlı etkinliği, HCC'deki heterojenliğe ve HCC gelişimini ve ilerlemesini yönlendiren karmaşık moleküler mekanizmalara atfedilir. Bu nedenle, HCC gelişiminin ardındaki mekanizmaların kapsamlı bir şekilde araştırılması ve etkili tedavi stratejilerinin izlenmesi büyük önem taşımaktadır. HCC'nin moleküler patogenezi üzerine yapılan kapsamlı araştırmalar, tümörü başlatma, ilerletme ve tümörün metastazında yer alan birkaç kritik sinyal yolunu tanımlamıştır. Bu yollar arasında mitojenle aktive olan protein kinaz/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (MAPK/ERK), Wnt/ β -katenin, Hedgehog (HH), Janus kinaz/transkripsiyon faktörünün sinyal dönüştürücü aktivatörü (JAK/STAT) ve fosfatidilinositol 3-kinaz/AKT/rapamisin memeli hedefi (PI3K/AKT/mTOR) gibi sinyal yolları bulunmaktadır (64).

Tablo 2.2. Hepatoselüler karsinomada değerlendirilen moleküler belirteçlerin fonksiyonel gruplandırılması

Fonksiyonel Süreç	Parametreler	Kanserle İlişkili Etki
Apoptozis	Bax, Bcl-2, Bax/Bcl-2, Kaspaz-9, Kaspaz-3	Hücre ölümünün düzenlenmesi; apoptotik ve antiapoptotik sinyaller
İnflamasyon ve Sinyalizasyon	NF- κ B, P-NF- κ B, IL-6, NO, TGF- β 1	Kronik inflamasyon ve inflamatuvar yanıt, sitokin üretimi, hücre sağ kalımı ve fibrojeniz
Oksidatif Stres (Pro-oksidan)	MDA, PC, TOS	Lipid/protein oksidasyonu ve DNA hasarı
Oksidatif Stres (Antioksidan)	GSH, SOD, CAT, GSH-Px, GST, TAS, Nrf2	Redoks dengesi; Nrf2 aracılı antioksidan yanıt
Anjiyogenez ve İnvazyon	NF- κ B, TGF- β 1, GST-Pi, VEGF, MMP-2,	Neoplastik dönüşüm, ekstraselüler matriks yıkımı, damar oluşumu, invazyon ve metastaz
Fibrozis ve Matriks Yeniden Yapılanması	TGF- β , Hidroksiprolin, MMP-2	Kollajen birikimi ve tümör mikroçevresi değişimi

2.8. Matriks Metalloproteinaz-2

Karaciğerin parankimal olmayan hücre popülasyonu kolanjiyositler (epitelyal hücreler), sinüzoidal endotelyal hücreler, hepatik yıldız hücreler, Kupffer hücreleri ve lenfositler başta olmak üzere çeşitli immün hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücreler, parakrin faktörler aracılığıyla hem birbirleriyle hem de hepatositlerle etkileşime girerek karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar (22). Karaciğer mikroçevresinin hücresel olmayan bileşeni ise kollajen, fibronektin, laminin, proteoglikanlar ve diğer matriksel proteinlerden oluşan ekstraselüler matrikstir (65).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), ekstraselüler matriks bileşenlerini parçalar, bütünlüğünü ve kompozisyonunu düzenlerler. Bunlar matriks aracılı sinyallemde önemli rol oynayan, kalsiyum bağımlı çinko içeren endoproteinazlardır (66). İnsan MMP'leri, substrat özgüllükleri ve yapısal benzerliklerine göre kollajenazlar, stromelisinler, jelatinazlar, matrilisinler, membran tipi MMP'ler ve diğerleri olmak üzere altı alt gruba ayrılır (66). MMP'ler; proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, adezyon, hücre göçü, yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu gibi birçok biyolojik süreçte rol oynar. Karaciğer hastalıklarının ilerlemesi sırasında MMP'ler ekstraselüler matriks yıkımını gerçekleştirir,

sitokin salınımını indükler ve fibrotik sürecin ilerlemesini sağlar; bu durum HCC gelişimine doğru ilerler. Ayrıca MMP'ler, tümör invazyonu ve metastazı destekleyici etkiler gösterir (67).

Jelatinaz A olarak da bilinen MMP-2, özellikle vasküler bölgelerde yer almaktadır ve karaciğer vasküler homeostazının sürdürülmesinde görev alır. MMP-2, çeşitli karaciğer hücreleri tarafından eksprese edilmekle birlikte en yüksek düzeyde hepatik yıldız hücreler ve Kupffer hücreleri tarafından üretilir ve karaciğer fibrozisinde en sık incelenen enzimlerden biridir (68,69). MMP-2 ekspresyonunun artışı; kronik hepatit, karaciğer fibrozisi, alkolik karaciğer sirozu, iskemi-reperfüzyon hasarı ve HCC metastazı ile ilişkilendirilir (69). Radbill ve ark., MMP-2 ^{-/-} ve MMP-2 ^{+/+} fare modellerini kullanarak MMP-2'nin fibrotik süreçteki rolünü incelemiş ve MMP-2 ^{-/-} farelerinde fibrozisin arttığını gözlemlemiştir (70). Ayrıca MMP inhibitörlerinin, deneysel çalışmalarda HCC'de tümör büyümesini baskılayabildiği gösterilmiştir (71). Bu nedenle MMP inhibitörleri, kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmiştir. Ancak insanlarda yürütülen çok sayıda klinik çalışmanın başarısızlıkla sonuçlanması MMP inhibisyonuna yönelik tedavi stratejilerine olan ilgiyi azaltmıştır. Klinik çalışmalarda anti-MMP ajanlarının başarısızlığı, MMP'lerin normal dokuda fizyolojik ve yararlı işlevlere sahip olduğunu göstermekle beraber hayvan modellerinde tolere edilebilen inhibisyonun insanlarda öngörülmeleyen olumsuzluklara yol açabileceğini göstermektedir (67).

2.9. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

Karaciğer, zengin vaskülarizasyona sahip bir organdır ve hücrel rejenerasyonun sürdürülebilmesi için anjiyogeneze gereksinim duyar. Benzer şekilde HCC de yüksek derecede vaskülarize bir tümör olup invazyon ve metastaz süreçlerinin devamı açısından anjiyogeneze bağımlıdır. Anjiyogeneze olmaksızın HCC'nin 1–2 mm'den daha fazla büyüemeyeceği bildirilmektedir. Tümör gelişimi sırasında ortaya çıkan hipoksik mikroçevre, hipoksiye duyarlı faktör-1 α (HIF-1 α) ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Bu faktörlerin aktivasyonu, VEGF salınımını artırarak anjiyogeneze sürecini başlatır (72,73).

Vasküler endotel hücreleri için bir anjiyojenik faktör olan VEGF, tümör hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tipi tarafından üretilir. VEGF/VEGFR sistemi endotel hücrelerinin hayatta kalması, çoğalması ve göçünde rol oynar (74). VEGF temel anjiyojenik faktör olmakla birlikte, tümör anjiyogenezinde anjiyopoietinler, fibroblast

büyüme faktörleri (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri de görev almaktadır. Bu çoklu düzenleyici mekanizmalar, tümör anjiyogenez sürecini karmaşık bir hale getirmektedir (72). Ayrıca bir tümör içerisindeki farklı bölgeler; inflamasyon, immünsüpresyon, proliferasyon kapasitesi, farklılaşma düzeyi, vaskülarite, ve invazivlik açısından heterojen özellikler göstermektedir (75). VEGF, PI3K/Akt yolunu aktive ederek ve B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırarak endotel hücre sağkalımını destekler. Endotel hücreleri, bağlantısal adezyon molekülü-1 (JAM-1) ve vasküler endotelyal kadherin (VE-kadherin) aracılığıyla sırasıyla sıkı ve adezyon tipi bağlantılarla birbirine tutunur. VEGF'in VE-kadherin kaybına aracılık ederek endotelyal hücre-hücre temaslarını gevşetebilmesi nedeniyle "vasküler geçirgenlik faktörü" olarak da adlandırıldığı bildirilmektedir (76). Son yıllarda HCC'de anti-anjiyojenik tedavilere yönelik klinik uygulamalarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Sorafenib gibi anjiyogenezi hedefleyen ajanlar klinikte kullanılmakta ve etki mekanizmaları kapsamlı biçimde araştırılmaktadır; ancak bu tedavilerin yan etkileri ve gelişen ilaç direnci, klinik etkinliği sınırlayabilmektedir (73).

2.10. Nükleer Faktör Kappa B

1986 yılında Ranjan Sen ve David Baltimore, B lenfositlerinde immünoglobulin κ hafif zincir geninin κ güçlendirici (enhancer) bölgesine bağlanan bir nükleer faktörü ilk kez tanımlamışlardır. Uçları işaretlenmiş DNA fragmanları kullanılarak gerçekleştirilen elektroforetik mobilite kayma analizleri ile bu faktör karakterize edilmiş ve κ hafif zincir genine yakın bağlanması nedeniyle "NF- κ B" olarak adlandırılmıştır (77).

NF- κ B, inflamatuvar ve immün yanıtların düzenlenmesinde merkezi rol oynayan, hemen hemen tüm memeli hücrelerinin sitoplazmasında bulunan indüklenebilir bir transkripsiyon faktörüdür (78). Memeli NF- κ B ailesi; NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB ve c-Rel olmak üzere beş üyeden oluşur. Bu proteinlerin tümü, dimerizasyonu, DNA'ya bağlanmayı ve NF- κ B dimerlerini sitoplazmada tutan inhibitör proteinler (I κ B) ile etkileşimi sağlayan Rel homoloji alanı içerir (79). RelA, RelB ve c-Rel transkripsiyon aktivasyon alanına sahipken; p105 ve p100 bu alanı içermez ve prekürsör proteinlerdir. Bu prekürsörlerin proteolitik işlenmesi sonucunda sırasıyla p50 ve p52 alt birimleri oluşur (80).

Normal şartlarda NF- κ B dimerleri I κ B α , I κ B β ve I κ B ϵ gibi inhibitör proteinlere bağlı halde sitoplazmada inaktif olarak bulunur (81). Hücrel bir uyarı sonrasında I κ B

kinaz (IKK) kompleksi aktive olur ve NF- κ B sinyal kaskadı başlatılır. IKK kompleksi; iki katalitik alt birim olan IKK α (IKK1) ve IKK β (IKK2) ile düzenleyici alt birim IKK γ /NEMO'dan (NF- κ B essential modulator) oluşur (82).

NF- κ B aktivasyonu iki temel yol üzerinden gerçekleşir. Kanonik (klasik) yol, mikrobiyal enfeksiyonlar, Toll-benzeri reseptörler (örneğin TLR4), tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ve interlökin-1 reseptörü (IL-1R) gibi sitokin reseptörlerinin uyarılmasıyla aktive edilir (83). Aktive olan IKK, I κ B proteinlerini fosforile eder; fosforile I κ B'ler E3 ubiquitin ligaz kompleksi tarafından tanınarak ubiquitinlenir ve proteazomal yıkıma uğrar (81, 82). Böylece serbest kalan NF- κ B (çoğunlukla p50/p65 heterodimeri) çekirdeğe transloke olur ve IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) gibi sitokinleri; büyüme faktörlerini; hücre adezyon moleküllerini (ICAM, VCAM, E-selektin); akut faz proteinlerini (örneğin SAA); indüklenebilir enzimler (iNOS, COX-2) ile pro- ve antiapoptotik proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu düzenler (79).

Kanonik olmayan (alternatif) yol ise NF- κ B2 (p100)/RelB kompleksine özgüdür. Bu yol; TNF ailesine ait B hücresi aktive edici faktör (BAFF) ve reseptörü (BAFFR), CD40 ve RANK gibi reseptörlerin uyarılmasıyla aktive edilir (84). NF- κ B indükleyen kinaz (NIK, NF- κ B-indükleyen kinaz), bu yolun temel bileşenidir. NIK aracılığıyla aktive edilen IKK α , p100'ü fosforile eder (85). Ardından p100 proteolitik olarak işlenerek p52 aktif formuna dönüştürülür. Oluşan p52, RelB ile heterodimer oluşturarak çekirdeğe taşınır ve hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler. Sonuç olarak NF- κ B sinyal yolunun aktivasyonu; sitokinler, kemokinler ve çeşitli düzenleyici genlerin ekspresyonunu kontrol ederek inflamasyon, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz gibi çok sayıda hücresel sürecin düzenlenmesinde kritik rol oynar (77).

2.11. Glutasyon S-Transferaz Pi

Glutasyon S-transferazlar (GST'ler), reaktif oksijen türleri (ROS), kanserojenler ve kemoterapötik ajanlar gibi reaktif elektrofilik bileşiklerin makromoleküllere zarar vermesini önleyerek hücrel detoksifikasyonda merkezi rol oynayan, tüm dokularda yaygın olarak bulunan çok işlevli Faz II enzimleridir. (86). GST'ler sitozolik (çözünabilir), mitokondriyal ve mikrozomal olmak üzere üç farklı süper aileden oluşur. En geniş grubu oluşturan sitozolik GST'ler, memelilerde alfa, mu, pi, sigma, teta, kappa, omega ve zeta şeklinde en az sekiz farklı sınıfa ayrılır (87).

GST enzimlerinin substratları genellikle hidrofobik özellik gösterir. GST'ler,

elektrofilik fonksiyonel gruplar içeren çeşitli ekzojen ve endojen bileşiklerin elektrofilik merkezlerine GSH'nın sülfidril (-SH) grubu aracılığıyla konjugasyonunu katalize ederek bu bileşikleri daha suda çözünür hale getirir (88). Ayrıca GST'ler, çeşitli elektrofilik ilaçların biyotransformasyonunu sağlayarak bu moleküllerin polaritesini artırmakta ve hücre dışına taşınmalarını kolaylaştırmaktadır. Bu durum ilaç toksisitesinin azalmasına yol açarken, aynı zamanda kemoterapötik ajanlara karşı direnç gelişimine de katkıda bulunabilmektedir (89). Nitekim artan kanıtlar, GST'nin aşırı ekspresyonunun ilaç inaktivasyonuna yol açtığını ve kemoterapi direncinin gelişiminde önemli bir mekanizma olduğunu göstermektedir. (90–92).

HCC'de, tümör baskılayıcı genler promotör hipermetilasyonu gibi epigenetik değişiklikler sonucunda susturulabilmektedir. HCC'de en sık metillenen tümör baskılayıcı genlerden birinin GST-pi (GST3) olduğu ve bu oranın yaklaşık %54'e ulaştığı bildirilmiştir (93). Bununla birlikte bazı çalışmalar, GST-pi proteini veya GST-pi mRNA'sının normal karaciğer dokusunda neredeyse saptanamaz düzeyde olduğunu; buna karşılık HCC'de ve preneoplastik hepatik lezyonlarda immünohistokimyasal boyama yöntemiyle belirgin şekilde arttığını göstermiştir (94–96).

Kimyasal karsinojenlerle indüklenen sıçan karaciğer karsinogenez modellerinde, GST-pi pozitif tek hücrelerin preneoplastik odakların öncü/başlatıcı hücreleri olduğu immünohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Bu hücrelerdeki GST-pi düzeylerinin, preneoplastik odaklara kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca GST-pi'nin, γ -glutamil transferaz veya alfa-fetoproteine göre HCC'nin saptanmasında daha duyarlı bir belirteç olabileceği ifade edilmektedir (97,98).

DEN'in tek doz enjeksiyonundan sonraki 48 saat içinde GST-pi ekspresyonunun saptanabilmesi, bu enzimin erken dönem hepatokarsinogenezdeki önemini göstermektedir (97). Bu nedenle GST-pi'nin, kimyasal indüklü hepatokarsinogenez modelinde çok erken "başlangıç hücrelerin" saptanması için en doğru belirteç enzimlerden biri olduğu düşünülmektedir (98).

2.12. Glipikan-3

Glipikan-3 (GPC-3), GPC-3 geni tarafından kodlanan 70 kD'luk bir proteindir (99). GPC-3, bir çekirdek protein ve bir heparan sülfat zincirinden oluşan temel bir yapıya sahiptir ve hücre zarına bir glikozilfosfatidilinositol (GPI) yapısı ile bağlanan glipikan ailesinin bir üyesidir (100). Heparan sülfat proteoglikanları, büyüme faktörleri, kemokinler ve hücre dışı matriks proteinleri dâhil olmak üzere çeşitli hücre dışı

moleküllerle etkileşime girerek hücre yüzeyinde ko-reseptör olarak görev yapar ve bu etkileşimler aracılığıyla hücre büyümesi, farklılaşma ve tümör gelişimi gibi süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. (101). Membrana bağlı glipikanların ana işlevi Wnt'lerin, Hedgehog'ların, fibroblast büyüme faktörlerinin sinyallemesini düzenlemektir (102). Wnt sinyal yolunda GPC-3, Wnt ligandları ile etkileşime girerek Wnt/Frizzled bağlanmasını kolaylaştırır ve Wnt ile kompleks oluşturarak HCC büyümesine katkı sağlayan Wnt sinyalizasyonunun aktivasyonunu destekler (103). GPC-3'ler, HCC'lerin %70'inden fazlasında yüksek oranda ifade edilir ve kötü prognozla ilişkilidir (101,102). Bu nedenle GPC-3'ün, preneoplastik lezyonları iyi diferansiye neoplastik hepatoselüler lezyonlardan ve iyi huylu sirotik nodüllerden ayırt etmede potansiyel bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (100). Ayrıca HCC'de GPC-3'ün, alfa-fetoproteine kıyasla daha güçlü düzeyde eksprese edildiği belirtilmektedir (104).

GPC-3, hücre tipine bağlı olarak hücre büyümesini hem negatif hem de pozitif olarak düzenleyebilmektedir. Mezodermal embriyonik dokularda yüksek düzeyde eksprese edilen GPC-3'ün, meme, over ve akciğer kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı olarak işlev görebildiği bildirilmiştir (105). Ayrıca çalışmalar, GPC-3'ün tümör mikroçevresinin düzenlenmesi ve kanser metastazında rol oynadığını ortaya koymuştur (99). Gao ve ark., GPC-3'ün heparan sülfat zinciri aracılı etkileşimler yoluyla HGF/Met sinyal yolunu modüle ederek HCC hücre göç ve invazyonuna katkıda bulunduğunu; GPC-3'e özgü shRNA ile gen ekspresyonunun baskılanmasının ise hücre göç ve invazyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (101). Bu bulgularla uyumlu olarak, Montalbano ve ark. da GPC-3'ün siRNA ile inhibisyonunun hücre göç ve invazyonunu azalttığını bildirmiştir (106). Klinik çalışmalar, geliştirilen antikörler aracılığıyla GPC-3'ün hedeflenmesinin, özellikle GPC-3'ü aşırı eksprese eden hastalarda, düşük GPC-3 düzeyine sahip hastalara kıyasla progresyonsuz sağkalımı artırdığını göstermektedir. Bu bulgular, GPC-3'ün önemli bir terapötik hedef potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır (107).

2.13. Apoptotik ve Antiapoptotik Proteinler (Bcl-2, Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9)

Bcl-2 ailesi; Bcl-2 ve Bcl-xL gibi antiapoptotik proteinler ile Bax, Bak, Bid ve Bim gibi proapoptotik üyeleri içermektedir. Bcl-2, Bcl-xL ve Bak ağırlıklı olarak mitokondriyal membranda lokalize olurken; Bax, Bid ve Bim çoğunlukla sitoplazmada bulunmaktadır (108). Bcl-2, hücre sağkalımının düzenleyicilerinden biridir.

Mitokondriyal membran bütünlüğünü stabilize ederek ve kaspaz aktivasyonunu başlatan sitokrom c salınımını inhibe ederek apoptozu baskılar (109). Ayrıca Bcl-2; Bcl-2 ilişkili X (Bax) gibi proapoptotik aile üyeleri ile heterodimer oluşturarak onların aktivitesini inhibe etme, inositol 1,4,5-trisfosfat reseptörü ile etkileşerek endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımını düzenleme ve mitokondri düzeyinde antioksidan benzeri etkiler gösterme gibi rollere sahiptir. Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun, önemli bir hücresel antioksidan olan GSH düzeylerini artırdığı ve mitokondriyal işlev bozukluğu ile hücre ölümünü engellediği bildirilmiştir (110).

HCC'nin gelişimi, programlanmış (apoptozis, nekroptosis ve otofajiye bağlı hücre ölümü gibi) veya programlanamayan (piroptosis ve nekroz gibi) bir tür hücre ölümüyle ilişkilidir (111). Apoptoz, organizmanın homeostazisini korumak amacıyla hasarlı veya işlevini yitirmiş hücrelerin kontrollü ve enerji gerektiren bir süreçle ortadan kaldırılmasıdır (112). Apoptotik hücrelerin oluşturduğu apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından fagosite edildiği için bu süreç genellikle inflamasyonla sonuçlanmaz (111). Buna karşılık nekroz, çoğunlukla kontrolsüz bir hücre ölümü biçimidir ve hücresel şişme ve hücre membran bütünlüğünün bozulması ile karakterize bir süreçtir (112).

Hepatosit apoptozu, ölüm reseptörü aracılığıyla ölüm sinyallerini ileten dışsal yol ve hücre içi uyarılarla başlatılan içsel yol olmak üzere iki temel yolağı içerir. Apoptoz, bir dizi kaspazın ardışık aktivasyonu ile gerçekleşir. Başlatıcı 8 ve 9 kaspazlar, hücre içi sensörler aracılığıyla başlangıç sinyalini algıladıktan sonra pro-kaspazlar tarafından aktive edilir ve infazcı 3, 6 ve 7 kaspazları aktive eder (111).

İçsel apoptoz yolu, sitokrom c ve diğer kaspaz aktive edici faktörlerin mitokondrinin iç membran boşluğundan sitoplazmaya salınması ile başlatılır. Bu süreçte mitokondriyal dış membran geçirgenliği artar. Sitoplazmaya salınan sitokrom c, "apoptozom" olarak adlandırılan kompleksin oluşmasına neden olur. Bu kompleks proKaspaz-9'un Kaspaz-9'a aktivasyonuna yol açar; ardından efektör kaspazların aktive edilmesiyle apoptotik süreç ilerler. Mitokondri aracılı içsel apoptoz yolu, Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenmektedir. Bcl-2, Bcl-xL ve diğer antiapoptotik proteinler mitokondrinin dış zarına bağlanarak membran geçirgenliğini azaltır, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasını engeller ve Bax ile Bak'ın oligomerizasyonunu inhibe eder. TNF- α 'nın reseptörüne bağlanması, dışsal yol ile içsel yol arasında bir kesişime yol açabilir. Bu süreçte Bid, kaspaz 8 aracılığıyla daha kısaltılmış bir forma dönüştürülür. Kısaltılmış Bid, Bax'ın oligomerizasyonunu ve mitokondriyal membrana yerleşimini

teşvik ederek mitokondriyal permeabilite artışını ve dolayısıyla apoptozun başlatılmasını sağlar (111,112).

Hücre dışı apoptoz yolu, ölüm ligandlarının plazma membranında bulunan ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla aktive edilir. Başlıca ölüm ligandları Fas ligandı (FasL), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL)'dır. Bu ligandların bağlandığı ölüm reseptörleri arasında Fas, TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörü (TRAIL-R) yer almaktadır. Ölüm ligandının reseptörüne bağlanması, reseptörde konformasyonel değişikliğe yol açar. Bu değişiklik, sitoplazmik adaptör proteinlerin, özellikle ölüm domeini içeren Fas ile ilişkili protein (FADD)'in, reseptör kompleksine katılımını sağlar. FADD aracılığıyla başlatıcı kaspazlar (örneğin kaspaz-8) komplekse bağlanır. Ölüm reseptörü, adaptör protein ve ilişkili kaspazlardan oluşan bu yapı "ölüm indükleyici sinyal kompleksi" (DISC) olarak adlandırılır. DISC oluşumu sonucunda kaspaz-8 aktive olur ve bunu takiben efektör kaspazlar (Kaspaz-3, -6 ve -7) aktive edilerek apoptotik hücre ölümü süreci başlatılır (112).

Hepatosit apoptozunun alkolik hepatit ve alkolsüz steatohepatitli hastalarda belirgin şekilde arttığı ve bu artışın hastalık şiddeti ile hepatik fibroz derecesiyle korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (113). Akut karaciğer yetmezliğinde apoptozun spontan iyileşme sürecinde rol oynayabileceği bildirilmektedir (114). Spontan iyileşen hastalarda, transplantasyon gerektiren veya mortalite ile sonuçlanan olgulara kıyasla daha yüksek kaspaz aktivasyonu saptanırken; ağır seyirli olgulara yaygın DNA parçalanması ve kaspazdan bağımsız hücre ölümü bulguları gözlenmiştir. Dolayısıyla akut karaciğer yetmezliğinde kendiliğinden iyileşme sürecinde kaspaz aktivasyonu ve apoptozun önemli rol oynayabileceği; buna karşın geri dönüşümsüz karaciğer yetmezliği formlarında kaspazdan bağımsız hücre ölümü mekanizmalarının daha baskın olabileceği belirtilmiştir (114).

2.14. Nrf2 Sinyal Yolu ve Antioksidan Savunma Mekanizması

Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) / antioksidan yanıt elementleri (ARE) sinyal yolu, hücresel antioksidan savunma mekanizmasının esasını teşkil etmektedir ve karaciğer patofizyolojisinde kritik işlevlere sahiptir. Birincil işlevi, promotörlerinde ARE içeren çeşitli antioksidan ve detoksifikasyon genlerinin ifadesini düzenlemektir. Nrf2, hücre homeostatik durumda iken, Nrf2, Kelch-benzeri ECH ilişkili protein 1 (Keap1) ile etkileşime girerek ubikuitinasyona uğrar. Keap1, Cul3-Rbx1 E3

ligaz holoenzimi için bir substrat adaptörü görevi görür. Daha sonra gerçekleşen 26S proteazom aracılı bozunma, Nrf2 proteininin stresli olmayan hücrelerde uygun bir düşük seviyede tutulmasını sağlar (115). Normal fizyolojik koşullar altında yarı ömrü 15 dakikadan azdır ve proteazomlar tarafından hızla bozunur (116). Ancak oksidatif stresin yüksek olduğu hücrelerde, Keap1-Cul3-Rbx1 kompleksinin Nrf2'yi ubiquitinasyon etme yeteneği, Keap1'deki belirli kritik sistein kalıntılarının modifikasyonu nedeniyle tehlikeye girer. Bu durum Nrf2 protein seviyelerinin hızla yenilenmesine ve promotörlerinde ARE içeren genlerin transaktivasyonunun artmasına neden olur (117). NRF2'nin ARE'lere bağlanması, antioksidan enzimler, faz II detoksifiye edici enzimler (örneğin glutatyon S-transferazlar, NAD(P)H kinon oksidoredüktaz 1) ve diğer stres tepkisi proteinleri dahil olmak üzere bir dizi sitoprotektif genin transkripsiyonunu başlatır. Bu gen ürünleri, hücre içi antioksidan kapasitesini artırarak ve detoksifikasyon süreçlerini teşvik ederek oksidatif strese karşı hücrel savunmaya katkıda bulunur (118). Farklı dokularda ifade edilir ve en yüksek seviyeleri kas, böbrek, karaciğer ve akciğerdedir (116).

Bütün karaciğer hastalıklarının etiyolojisinde ROS üretimi artar. ROS; başlıca mitokondriler, sitokrom P450 (CYP450) enzim sistemi, Kupffer hücreleri ve nötrofillerden kaynaklanmaktadır. ROS'ler kısa yarı ömürlü olmaları nedeniyle çoğunlukla oluştukları bölgede lokal toksik etki gösterir. Buna karşılık lipid peroksidasyon ürünleri olan malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) daha uzun yarı ömre sahip olup doku içerisinde diffüze olarak daha geniş alanlarda biyolojik etki oluşturabilmektedir (119).

Karaciğer hücreleri, ROS'u fizyolojik seviyelerde tutmayı sağlayan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptir. Başlıca antioksidan enzimler arasında süperoksit dismutazlar (SOD), sitozolik glutatyon peroksidazlar (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), peroksiredoksinler (PRX), tiyoredoksinler (TRX) ve katalaz (CAT) yer almaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise indirgenmiş glutatyon (GSH), bilirubin, ubikinon (koenzim Q10), ürik asit ile E, A ve C vitaminlerini içermektedir (118). Başlıca reaktif oksijen türleri arasında süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\bullet OH$) bulunmakta olup, bu moleküller birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. SOD enzimleri, süperoksit radikal anyonunun ($O_2^{\bullet-}$) dismutasyonunu katalize ederek H_2O_2 oluşumunu sağlar (120). Oluşan H_2O_2 ise katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aracılığıyla suya indirgenerek detoksifiye edilir. Serbest oksijen radikallerinin başlıca hedefi, membranda yer alan

fosfolipidlerdeki çoklu doymamış yağ asitleridir. Bu yapıların oksidasyona uğraması lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre bütünlüğü ve işlevinin bozulmasına neden olur. Meydana gelen bu lipid peroksidasyonunun ürünlerinden biri büyük oranda malondialdehit (MDA)'dır (121).

Karaciğer, GSH sentezleme kapasitesi en yüksek organlardan biri olup, diğer dokulara kıyasla en yüksek GSH düzeylerine sahiptir (122). Oksidan–antioksidan dengenin bozulması ise hücre hasara yol açarak fibrozis, siroz ve HCC gelişimine zemin hazırlayabilmektedir (123). Karaciğerde oksidatif stresin başlıca kaynaklarından biri aktive Kupffer hücreleridir. Bu hücreler, NF- κ B sinyal yolları üzerinden TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 ve IL-18 gibi proinflatuar sitokinleri üretir. Söz konusu sitokinlerin bir kısmı kaspaz kaskadını aktive ederek proapoptotik sinyalleri başlatır ve hepatosit ölümünü hızlandırır. Bazı karaciğer hastalıklarında yaygın apoptoz, önemli sayıda hepatosit kaybına neden olarak karaciğer fonksiyonunun bozulmasına yol açmaktadır (124).

İnflamasyon sırasında mast hücreleri, nötrofiller ve diğer immün hücrelerin hasarlı bölgeye göçü ve artan oksijen tüketimi, ROS birikimini daha da artırır. Kupffer hücre aktivasyonu bu hücrelerin adezyonunu ve trombosit agregasyonunu tetikleyerek mikrosirkülasyon bozukluğuna ve iskemi-reperfüzyon hasarına katkıda bulunur (123). Aynı zamanda aktive olmuş bu hücreler hepatositleri yok eder ve hepatik yıldız hücrelerinin aktivasyonunu uyarır. Tekrarlayan apoptoz ve hepatosit rejenerasyon döngüleri sirozun patogenezeine katkıda bulunur. Kupffer hücrelerinden salınan TGF- β 1, PDGF, TNF- α , IL-1 gibi sitokinler, hepatik yıldız hücrelerin aktivasyonunu indükler. Aktive hepatik yıldız hücreleri miyofibroblastlara dönüşerek α -düz kas aktin (α -SMA) ve kollajen tip I, III ve IV gibi ekstrasellüler matriks bileşenlerini sentezler. Hepatosit hasarı sonucu açığa çıkan MDA'nın profibrotik özellikleri, bu süreçleri güçlendirerek kronik inflamasyonun fibrozise dönüşümünü hızlandırır (124,125).

Oksidatif stres, pro-oksidanların antioksidan savunma kapasitesini aştığı bir durum olup; bu koşullarda proteinler dâhil olmak üzere hücre makromolekülleri hasara uğramaktadır. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu, sülfasyon ve karbonilasyon gibi çeşitli mekanizmalarla gerçekleşebilir. Protein karbonilasyonu, proteinlerin pro-oksidanlarla reaksiyona girmesi veya lipid peroksidasyon ürünleri aracılığıyla karbonil gruplarının protein yapısına eklenmesi sonucu oluşur. Karbonillenmiş proteinler genellikle agregasyon eğilimi gösterir; meydana gelen konformasyonel değişiklikler enzimatik aktivitenin değişimine de yol açabilmektedir (126).

Sonuç olarak, oksidatif stres ile inflamatuvar medyatörler ve hücrel yanıt mekanizmaları arasındaki karşılıklı etkileşim; hepatosit hasarını, fibrojeniz sürecini ve doku yeniden yapılanmasını tetikleyerek fibrozis, siroz ve hepatoselüler karsinom gelişimine zemin hazırlamaktadır (125).

2.15. Tümör Büyüme Faktörü β 1

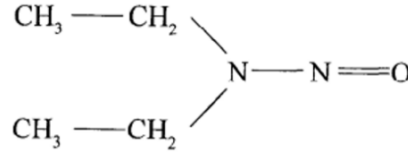
Tümör büyüme faktörü β (TGF- β), hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak hücre proliferasyonunu baskılar ve apoptozu tetikler. TGF- β 1, TGF- β 'nın izoformlarından biridir ve hepatik yıldız hücrelerin miyofibroblastlara dönüşümünü teşvik eder, hücre dışı matriks sentezine katkıda bulunur, aktive edilmiş hepatik yıldız hücreleri üzerinde PDGF reseptör ekspresyonunu artırır, otokrin PDGF ve TGF- β 1 üretimini hızlandırır ve aktifleştirilmiş hepatik yıldız hücrelerinin apoptozunu inhibe eder (127). Hepatik yıldız hücrelerinden salgılanan TGF- β 1, HepG2 hücrelerinde proliferasyonu uyarır, tümör anjiyogenezini teşvik eder ve tümör invazyonunu artırır (128). Bir büyüme inhibitörü olmasına rağmen, karaciğerde TGF- β 1'in aşırı ekspresyonunun HCC dokularında görüldüğü ve bunun karsinogenez, hastalık progresyonu ve prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (92). HCC'li hastaların plazma TGF- β 1 konsantrasyonları sirozlu ancak HCC'si olmayan hastalara kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olmakla birlikte (129), rezeke edilemeyen HCC'li hastaların plazma TGF- β 1 konsantrasyonu ile tümör evresi (III-IV) arasında da korelasyon tespit edilmiştir (130).

2.16. Dietilnitrozamin (DEN)

Alkilleyici ajanlar mutajen olup karsinogenezi indükleyebilmenin yanı sıra anti kanser ilaçlar olarak da kullanılmaktadır. Alkilleyici maddelerin bir kısmı "alkilleme" özelliklerini direkt olarak gösterirken dialkil nitrozaminler bu özelliği metabolize olduktan sonra gösterirler (131). Bu bileşikler güçlü elektrofilik özelliğe sahip olup, hücrede nükleofilik gruplar olan -OH, -SH ve -NH grupları üzerinden protein, RNA ve DNA gibi makromoleküllere kovalent olarak bağlanabilirler (132).

N-nitrozo bileşikleri (Dimetil nitrozamin, Dietil nitrozamin) doğrudan bir mutajen olarak hareket etmeyip, CYP450 enzimlerinden özellikle CYP450 2E1 ve 2A6 izoformları tarafından metabolize olduktan sonra aktive olup toksisitesini göstermektedir (133). Alkilleyici maddeler, çevresel maruziyetin yanı sıra organizmada endojen olarak da sentezlenebilirler. Endojen oluşan alkilleyiciler, organizmada NO'ten türetilen nitroz anhidrit ve nitrat gibi nitrozolayıcı bileşikler tarafından primer aminlerin nitrozolanması

sonucu oluşurlar. Özellikle kronik enfeksiyon ve inflamatuvar şartlarda artmış nitrat ve nitrozamin düzeyi karsinogenez için bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir (132).



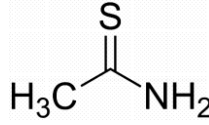
şekil 2.2. DEN'in kimyasal yapısı (15)

N-nitrozo bileşiklerinden olan DEN, N-nitrosodietilamin (NDEA) olarak da bilinmektedir. Bu bileşik kimyasal olarak oluşturulan HCC modellerinde yaygın olarak kullanılan ksenobiyotiktir. Her ne kadar insan günlük N-nitrozamin alımı genellikle düşük mikrogram (0,5-1,0 $\mu\text{g/gün}$) aralıklarında gerçekleşse de DEN, Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı'na göre "Grup 2A: insanlar için muhtemelen kanserojen" sınıflandırmasına sahiptir (134). P450 izoenzimleri DEN detoksifikasyonunu herhangi bir dokuda gerçekleştirerek elektrofilik bir metabolit olan etildiazonyum iyonunu oluştururlar. Her organdaki nitrozamin alkilasyonu diazonyum iyonunun diğer organlara taşınamayacak kadar reaktif olması nedeniyle, yerel biyoaktivasyon kapasitesi seviyesini yansıtır (133). Biyotransformasyonun ilk adımı, bir alfa-hidroksilnitrozamin üreten P450 aracılı alfa-hidroksilasyondur. Bu reaksiyon sonucunda kararsız etil diazonyum hidroksit molekülü üretilir. Bunu dealkilasyon reaksiyonu takip eder ve sonunda DEN bir elektrofilik etildiazonyum iyonuna biyoaktif olur. Bu elektrofilik metabolit oldukça reaktif olan karbonyum iyonları, ROS ve nitrojen (RNS) türlerinin oluşmasına da neden olur (133). Bu oldukça reaktif metabolitler DNA ve proteinler dahil olmak üzere farklı biyomoleküllere bağlanabilir. DEN tarafından indüklenen DNA alkilasyonu veya oksidasyonu genomik instabiliteye, DNA hasarına, mutasyona ve tümör başlangıcına katkıda bulunabilir (135). Reaktif diazonyum iyonu DNA bazları da dahil olmak üzere nükleofillerle reaksiyona girerek ad ktler oluşturur. Ad kt oluşumuna karşı duyarlılık, DNA bazındaki her bir atomun ayrı ayrı negatif yüküne bağlıdır. Elektron yoğunluğu hesaplamalarına göre, en büyük negatif yük sitozin N3'te bulunur, ancak diğer olası hedefler sitozin O², guanin N³, N⁷ ve O⁶, adenin N³ ve N⁷ ve timin O² ve O⁴ pozisyonlarıdır (136). Bu hedeflerin alkilenmesi DNA zincirlerinin çapraz bağlanmasına, anormal baz eşleşmelerine veya DNA zincir kırıklarına yol açabilmektedir (137). Guaninin O⁶ pozisyonundaki metilasyonu en toksik ve en mutajenik alkilasyon olarak belirtilmektedir (132). DEN, N-nitrozo bileşikleri (NOC) ailesinin bir üyesidir,

oldukça kanserojen kabul edilir ve içecek, yiyecek, tütün, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinin bir kirleticisi olduğu ortaya çıkarılmıştır. DEN suyun ozonlama, klorlama gibi dezenfeksiyon işlemlerinden sonra dezenfeksiyon yan ürünleri olarak da ortaya çıkmaktadır (138). DEN dışarıdan alındığı gibi endojen olarak da üretilmektedir. Çocuklardan alınan kan örneklerinde yüksek nitrat içerikli içme suyu ve sağlık standartlarına uygun içme suyu tüketen çocuklardan alınan kan örnekleri gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi ile yapılan analizde N-nitrosaminlerin (N-nitrosodimetilamin ve N-nitrosodietilamin) konsantrasyonu ölçülmüştür. Nitratlı su içenlerin serum N-nitrosodimetilamin düzeyi normal su ienlerinkinden 2,6 kat farklı bulunmuştur. Bunlara ek olarak özgül bağışıklık yanıtı, özgül serum IgG düzeyi ve araşidonik asit metabolit düzeyi yaklaşık olarak 2 kat artarken onkosüpresyondan sorumlu p53 transkripsiyon faktörü ekspresyonu yaklaşık olarak 2 kat azalmıştır (139). Tükürük salgısının yüksek miktarda nitrat içermesinin yanında sindirim sisteminde nitrit ve aminlerin birleşerek nitrosaminleri oluşturabildiğı de belirtilmektedir (16). Genç veya yetişkin farelere tek bir intraperitoneal (ip) DEN enjeksiyonu uygulandığında, yüksek bir neoplastik lezyon yükü elde etmek için uzun süre gereklidir. Buna karşın genç/yetişkin kemirgenler yerine neonatal farelerin kullanılması bu neoplastik lezyon yükünü daha hızlı bir şekilde biriktirmiştir ve bu durum hepatik doğum sonrası gelişimin hızıyla ilişkilendirilmiştir (140). CYP450 7. ile 15. günler arasında en yüksek aktivitesine ulaşır ve daha sonra azalır (141). Fareler 2 haftadan büyükse, DEN uygulamasından sonra hepatokarsinogenezi artıran bir tümör promotörü gerekir. Bu promotörler karbon tetraklorür (142), fenobarbital, tiyoasetamid (143) gibi fibrozis oluşturan tümör destekleyici ajanlar olabilmektedir.

Yapılan fare ve insan HCC'lerinin moleküler özelliklerinin karşılaştırmalı analizi Myc , E2f1 ve Myc E2f1 transgenik farelerden elde edilen HCC'lerdeki gen ekspresyon örüntüleri, insan HCC'lerinin daha iyi hayatta kalma grubuyla çok benzediğini, buna karşın Myc Tgfa transgenik farelerden elde edilen HCC'ler ile DEN-indüklü fare HCC'lerindeki ekspresyon örüntüleri karşılaştırıldığında DEN kaynaklı HCC'nin transkriptomik profilinin, insan HCC'lerinin daha zayıf hayatta kalma grubuyla benzer olduğunu ortaya koymuştur (144).

2.17. Tiyoasetamid (TAA)



Şekil 2.3. TAA'nın kimyasal yapısı

Tiyoasetamid (C_2H_5NS ; TAA), bir organosülfür bileşiğidir. Kristal, katı formdaki bu kimyasal suda çözünür, organik ve inorganik bileşiklerin sentezinde sülfür iyonlarının kaynağı olarak görev yapar (145). Tiyoasetamid'in deneysel hayvan modelinde akut veya kronik insan karaciğer hastalığının (fibrozis ve siroz) başlangıcını ve ilerlemesini taklit edebileceği bildirilmiştir (146). TAA, flavin içeren monooksijenaz (FMO'lar) sistemleri tarafından biyotransformasyona uğrar. Karaciğer mikrozomlarında bulunan CYP450 enzimleri tarafından TAA toksik yapıya sahip reaktif bir ara madde olan tiyoasetamid S-oksit'e (TAASO), o da aynı enzimle tiyoasetamid S-dioksit'e (TAASO₂) dönüştürülür, bu oksidasyon süreci hepatik hücrelerde oksidatif strese, sentrilobüler nekroza, nükleer hacimin artmasına, hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunun artmasına, hücre geçirgenliğinin değişimine, mitokondriyal aktivitenin engellenmesine, lipoprotein metabolizmasının değişmesine, üre döngüsünün bozulmasına ve karaciğer hasarına yol açar (145,147). TAA gibi tümör destekleyici bir ajanın çeşitli fare türlerinde, karaciğer fibroz gelişimini indüklediği gösterilmiştir. Karsinogenezin DEN ile indüklenip daha sonra TAA ile desteklenmesi, hepatosellüler odakların sayısını ve alanını arttırmanın yanı sıra proliferatif ve apoptotik hücrelerin sayısını artırdığı bildirilmiştir (148).

2.18. Sorafenib

Sorafenib, tümör hücrelerinde proliferasyonu ve anjiyogenezi inhibe eden ve apoptozu arttıran küçük bir moleküldür (Şekil 2.4) (149). Karaciğer fonksiyonu iyi korunmuş, rezeke edilemeyen HCC'si olan veya lokorajyonel tedaviden sonra ilerleyen tümörleri olan HCC hastalarında standart sistemik tedavi olarak sorafenib önerilmektedir (150). Sorafenib, RAF/MAPK/ERK, PI3K/Akt/mTOR, JAK/STAT, Wnt/ β -katenin, cMET ve IGF sinyal yolunu etkilemenin yanı sıra VEGFR1, 2 ve 3, PDGFR β , c-KIT dahil olmak üzere 40'a yakın tirozin kinazın fosforilasyonunu inhibe etmektedir (44,151).



Şekil 2.4. Sorafenibin kimyasal yapısı (152)

Sorafenib, tümör hücrelerinde proliferasyonu ve anjiyogenezi baskılar, apoptozu destekler (153). Sorafenib'in etkinliği hem tümör hücreleri hem de tümör mikroçevresini hedefleme kapasitesinden kaynaklanmaktadır (46). Tümör mikro ortamında bulunan HSC ve karaciğer endotel hücreleri gibi parankimal olmayan hücreler üzerinde de sorafenibin önemli etkileri olduğu bildirilmektedir (154).

HCC hücrelerinin sorafenib ile tedavisi oksidatif fosforilasyon aktivitesinin azalması, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması ve ATP sentezinin azalması yönünde mitokondride tahribat oluşturmuştur. Bunun sonucunda ferroptoz nedeniyle hücre ölümü meydana gelmiştir. GSH farmakolojik kullanımı, sorafenib kaynaklı ferroptozu önlemiş, hücrel mitokondriyal ROS ve lipid peroksit birikimini ortadan kaldırmıştır. Sistein yoksunluğu veya sisteinaz inhibisyonu yoluyla GSH tükenmesi, sorafenib kaynaklı ferroptotik hücre ölümü ve lipid peroksit oluşumu şiddetlenmiştir (155). Liu ve ark. sorafenibin , ATP-AMPK-mTOR-SREBP1 yolu aracılığıyla karaciğer kanseri hücrelerindeki antikanser aktivitesinin ATP üretimi, SCD1(stearoil koenzim A desatürase 1) ekspresyonu ve tekli doymamış serbest yağ asit sentezinin inhibisyonuna dayandığını, SCD1'i hedefleyerek lipogenezi bozabildiğini ve kanser hücresi ölümünü indükleyebildiğini göstermiştir (156). Garten ve ark. sorafenib'in, NAD-SIRT1-AMPK eksenini yoluyla HCC hücre apoptozunu indüklediğini bildirmiştir (156). Ayrıca sorafenib HCC hücrelerinde Bcl-2 ailesinin bir anti-apoptotik üyesi olan miyeloid hücre lösemi sekansı 1 (MCL-1) ekspresyonunu aşağı regüle ederek apoptozun aktivasyonunda rol oynamıştır (8). Wnt/ β -katenin sinyal yolunun inhibisyonu, sorafenibin HCC'ye karşı in vitro ve in vivo antitümör etkilerini iyileştirmiştir (157). Her ne kadar kansere bağlı çeşitli protein kinaz hedefleri aracılığıyla etki mekanizması iyi tanımlanmış olsa da, sorafenib insan tümörleri arasında değişken yanıtlara neden olmaktadır (156).

2.19. Likopen

Bugüne kadar doğal olarak oluşan 700 karotenoid tanımlanmıştır, bunlardan yalnızca ellisi insan vücudu tarafından metabolize edilebilmektedir (158). Likopen de,

bitki ve bazı mikroorganizmalarda biyolojik olarak oluşan bir karotenoiddir (159). Likopen ilk kez 1876 yılında Millardet tarafından domates meyvesinden (*lycopersicum esculentum*) izole edilmiştir, ona 'solanorubin' adı verilmiştir. 1903 yılında Schunck tarafından lycopene olarak adlandırılmıştır. Likopenin moleküler formülü $C_{40}H_{56}$ 'dır (160). Molekül ağırlığı 536.85 dalton, erime noktası 172–175°C olup, kloroform, heksan, benzen, karbon disülfid, aseton, petrol eteri içinde çözünürken su, etanol, metanolde çözünmemektedir (161). Likopen 11'i konjuge olmak üzere 13 çift bağ taşıyan simetrik, alifatik bir hidrokarbondur (160). Khun doğal karotenoid bileşiklerin rengini dörtten fazla konjuge çift bağ zincirine bağlamıştır. Kırmızı renkli bir karotenoid olan likopen başta domates olmak üzere karpuz, guava, kuşburnu, papaya ve pembe greyfurt gibi kırmızı renkli meyve ve sebzelerde bulunmaktadır (161).

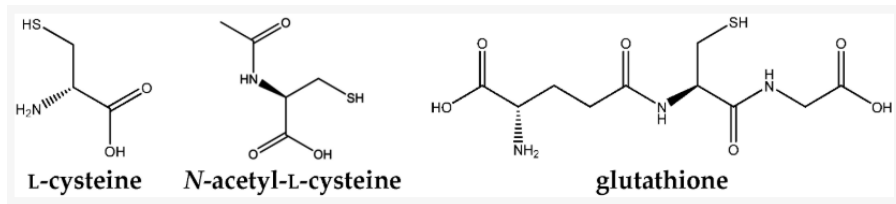
Likopenin all-trans, mono-cis ve poli-cis gibi çeşitli geometrik izomerleri bulunmaktadır. Diyetle baskın izomer likopenin all-trans izomeridir, ancak cis izomerleri termodinamik olarak daha kararlıdır (162). Likopen, domatesin işlenmesi ve depolanması sırasında trans-cis izomerizasyonuna uğrayabilmektedir (158). İnsan serum ve dokusunda baskın izomer likopenin cis-izomerleri (9-, 13-, 15-cis) olup toplam likopenin yaklaşık %50' sini oluşturmaktadır (163,164). Cis izomerleri yağ ve hidrokarbon çözücülerde all-trans izomerlere göre daha fazla çözünür (161). Likopen oluşumu yalnızca 10 °C'nin üzerindeki ve 37 °C'nin altındaki sıcaklıklarda meydana gelmektedir. Domateste likopen oluşumu için optimum sıcaklık 24 °C' dir (160). Yiyeceklerin sindiriminden sonra karotenoidler ince barsaktan emilir ve şilomikronlara dahil olarak lenfatik sisteme salınır. Başlangıçta karotenoidler, şilomikron ve VLDL fraksiyonunda görülürken LDL ve HDL fraksiyonunda ise ilerleyen zaman diliminde yükselişe geçmektedir (165,166) ve 24-48 saatte en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. İnsan serumundaki likopenin yarı ömrü 2 ile 3 gün arasında olmaktadır (163). Beta karoten ve likopen gibi hidrokarbon karotenoidlerin ana taşıyıcısı LDL'dir (165). Likopen, şilomikron yapısındayken adrenaller, böbrek, yağ, dalak, akciğer ve üreme organları gibi çeşitli dokular tarafından pasif olarak alınma potansiyeline sahiptir. VLDL ve LDL yapısına katıldıktan sonra dokulara alımının LDL reseptörü yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (164). Dolayısıyla karotenoidlerin en yüksek konsantrasyonlarına sahip dokular (karaciğer, adrenal, testisler) yüksek LDL reseptör aktivitesine sahip olma eğilimindedirler. Likopen insan karaciğerinde, adrenallerde, yağ dokusunda, testislerde ve prostatta baskın olarak biriken bir karotenoiddir (164).

Karotenoid emilimi ve metabolizmasının incelenmesi için en iyi modellerin gerbil,

ferret ve ön-rumenli buzağılar olduğu belirtilmektedir. Fareler veya sıçanlar kanser, bağışıklık ve vitamin A eksikliğinin incelenmesi için daha uygunken ancak bu türler karotenoidlerin fizyolojik dozlarını bozulmadan absorbe edememektedirler, karotenoidleri insanlardan farklı bir şekilde emerler; ancak, suprafizyolojik düzeylerde (diyetin %0,02'si) karotenoid içeren diyetlerle beslenmeleri durumunda karotenoidleri bozulmadan emmektedirler (167). Likopen izomerlerinin biyolojik etkilerini incelemek için, insanlara benzer şekilde likopen serum ve doku dağılımı göstermeleri nedeniyle ratlar model olarak kullanılmıştır (168). Bu çalışmalarda, karaciğerin, likopen birikiminin ana bölgesi olduğu, bunun yanı sıra akciğer, prostat, meme bezleri ve serumun da önemli miktarda likopen biriktirdiği tespit edilmiştir (164). Likopen, halkasal olmayan uzun lineer yapısındaki konjuge çift bağları ve aşırı hidrofobikliği sayesinde bir anti oksidan olmanın yanında birçok farklı biyolojik özellik sergilemektedir (171, 179). Konneksin 43 mRNA ekspresyonunu indükleyerek hücrelerarası boşluk-bağlantı iletişimini yukarı doğru düzenlemektedir (169). Likopen alımı ile çeşitli kanser türlerinin görülme sıklığının azaldığı bildirilmektedir. Bu kapsamda likopenin antikanser mekanizmalarını açığa kavuşturmaya çalışan in vivo ve in vitro araştırmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda likopenin antikanser rolünü; güçlü singlet-oksijen söndürücü olması, detoksifiye eden antioksidan enzim üretiminin uyarılması, apoptozu başlatması, hücre döngüsünün ilerlemesini durdurarak hücre proliferasyonunu engellemesi, hücrelerarası boşluk ve iletişimi modüle etmesi, büyüme faktörlerine ve sinyal iletim yollarına etki etmesi ile gösterdiği belirtilmektedir (180).

2.20. N-Asetilsistein

Karaciğer, sindirim yoluyla elde edilen ve kandan üretilen maddelerin metabolizmasında ve detoksifikasyonunda ana organdır. Karaciğer glutatyon aracılı biyotransformasyonla ksenobiyotikleri detoksifiye ederek ortadan kaldırmaktadır (170). GSH, çekirdek de dahil olmak üzere hücrenin neredeyse her bölgesinde bulunmaktadır (10).



Şekil 2.5. L -sistein, N -asetil- L -sistein ve glutatyonun kimyasal yapıları (14)

GSH sisteminin fizyolojik bir rezervuarıdır (10). Sistein kalıntısı nedeniyle GSH, elektrofilik maddeler (örn. serbest radikaller ve reaktif oksijen/azot türleri) tarafından enzimatik olmayan bir şekilde glutatyon disülfüre (GSSG) kolaylıkla oksitlenir (11). GSH indirgeyici bir ajan ve antioksidan görevi görür, ksenobiyotiklerin ve farklı hücre moleküllerinin metabolizmasında rol oynar, serbest radikal temizleyicidir, hücre döngüsü düzenlemesinde ve çoklu ilaç ve radyasyon direncinin düzenlenmesinde rol oynar, Ca^{2+} homeostazını düzenler, tiyol-disülfür değişim reaksiyonları yoluyla protein işlevini ve gen ifadesini düzenler, lenfosit işlevlerini ve bağışıklık tepkilerini modüle eder ve geçirgenlik geçiş gözenek kompleksinin açılmasını ve hücre ölümünün aktivasyonunu birbirine bağlayan mitokondriyal mekanizmalarda rol oynar (10). Glutatyon, çekirdekteki hücre döngüsünü ve hücre çoğalmasının başlangıcını düzenler. Ayrıca Bcl-2'yi düzenleyerek apoptozu kontrol eder. Yüksek oksidatif bir ortamda, yüksek GSH seviyelerinin Bcl-2'ye bağlanarak apoptozu ve hücre ölümünü önleyebileceği bildirilmektedir (171). NAC'ın başlıca rolü, antioksidan ve anti-inflamatuar aktivitesiyle ilişkili olup GSH hücre içi konsantrasyonunu artırma yeteneğindedir. Bir anti-inflamatuar bileşik olarak NAC, NF- κ B aktivitesini baskılayarak TNF- α ve interlökin (IL-6 ve IL-1 β) düzeylerini düşürebilmektedir (172). NAC'ın terapötik potansiyele sahip olduğunu gösteren çalışmaların yanı sıra farklı patolojik durumları ele alan klinik çalışmalardaki etkinliği çelişkili sonuçlara sahiptir (12,170). Hayvan çalışmaları, enfeksiyon durumunda ağrı ve inflammatuar hücrelerin infiltrasyonunu azaltarak inflamasyona ve oluşan oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği belirtilmektedir (172,173). Buna karşın kötü huylu tümörlerde, normal dokulara kıyasla tedaviye gösterilen direnç çoğu durumda kanser hücrelerindeki daha yüksek GSH seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir (10).

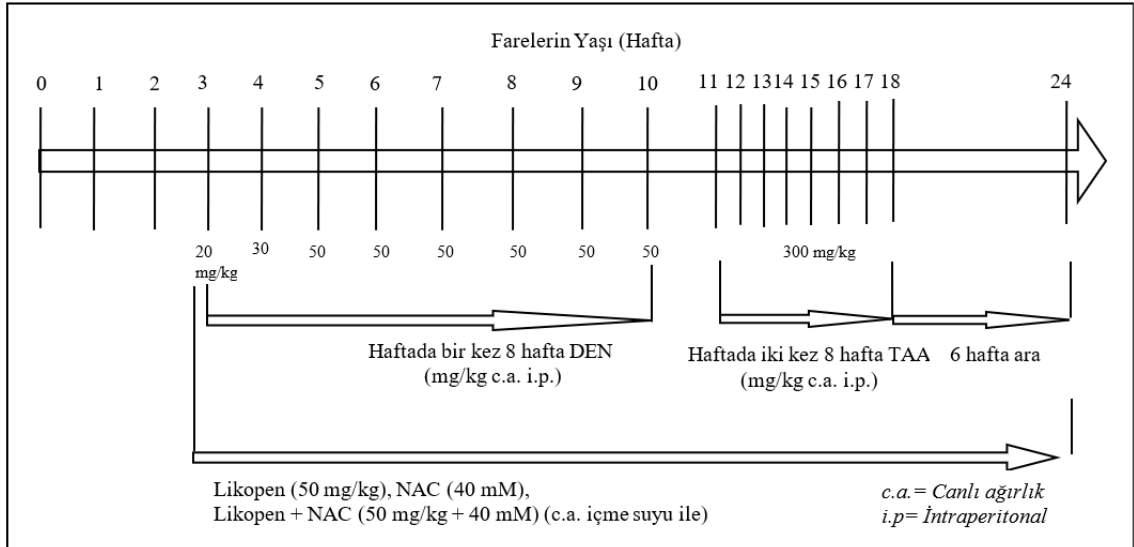
3.MATERYAL ve METOT

3.1. Balb/c Farelerinin Temini

Çalışmamızda sütten kesildikten sonra yaklaşık olarak 19 günlük yavru Balb/c fareleri kullanıldı. Power analizi yapılarak ortalama ağırlıkları 5gr olan 56 yavru fare çalışmaya dahil edildi. Fareler İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurul (HADYEK) Başkanlığının 2021/12-1 karar sayılı izni ile İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi.

3.2. Deneysel HCC Modelinin Oluşturulması, Deney Grupları ve Uygulamalar

Hayvan grupları rastgele olacak şekilde Kontrol, DEN, Likopen+DEN, Likopen+NAC+DEN, NAC+DEN şeklinde gruplara ayrıldı. DEN'in toksik özelliğinden dolayı DEN uygulanan gruplarda kayıp yaşanması ihtimaline karşı örneklem büyüklüğü 12 olarak tutuldu. Çalışmanın dizaynı Şekil 3. 1'de verilmiştir.



Farelerin yaşına göre dietilnitrozamin (DEN) haftada bir kez 8 hafta süreyle ve tiyoasetamid (TAA) haftada iki kez 8 hafta süreyle intraperitoneal olarak uygulandı. Likopen (50 mg/kg), N-asetilsistein (NAC, 40 mM) ve likopen + NAC kombinasyonu içme suyu aracılığıyla verildi. c.a.: canlı ağırlık; i.p.: intraperitoneal.

Şekil 3.1. Deneysel hepatokarsinogenez modelinde kullanılan uygulama zaman çizelgesi

Deneysel hepatokarsinogenez modelimizde oluşturulan gruplar, her bir gruba uygulanan tedaviler (143,174,175) ve grup başına düşen hayvan sayıları Tablo 3.1’de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Deney grupları, uygulanan tedaviler ve grup başına hayvan sayıları

Grup	Uygulama	n
Kontrol Grubu	Yem + Su	8
DEN Grubu	Yem+Su+i.p.DEN+TAA	12
Likopen+DEN Grubu	Yem+Suda Likopen+i.p.DEN+TAA	12
Likopen+NAC+DEN Grubu	Yem+Suda Likopen+NAC+i.p.DEN+TAA	12
NAC+DEN Grubu	Yem+Suda NAC+i.p.DEN+TAA	12

Kontrol grubuna yalnızca standart yem ve su verildi. DEN gruplarında hepatokarsinogenez oluşturmak amacıyla diyetilnitrozamin (DEN) uygulandı. Tedavi gruplarında DEN uygulamasına ek olarak likopen, N-asetilsistein (NAC) veya likopen + NAC kombinasyonu içme suyu aracılığıyla verildi. Her bir gruptaki hayvan sayısı (n) tabloda belirtilmiştir.

Grup 1 (Kontrol Grubu): 8 adet erkek fare bu grubu oluşturmuş olup, ad-libitum beslenmeleri sağlandı.

Grup 2 (DEN): 12 adet erkek fare bu grubu oluşturdu. Yavru fareler sütten kesildikten 1 hafta sonra başlamak üzere ilk iki hafta 20 mg/kg, 30 mg/kg ve sonraki haftalarda 50 mg/kg vücut ağırlığı dozunda DEN, 8 hafta boyunca haftada bir defa intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmıştır. Bir hafta ara verildikten sonra 8 hafta süre ile haftada 2 defa 300 mg/kg vücut ağırlığı dozunda TAA enjeksiyonu intraperitoneal olarak uygulanmıştır. TAA uygulamasının 8. haftasından sonra 6 hafta ara verilerek 6. haftanın sonunda fareler tartılıp kurban edildiler, karaciğer dokuları analiz edilmek üzere -80 °C de muhafaza edildi.

Grup 3 (Likopen+DEN): 12 adet erkek fare bu grubu oluşturmuştur. 19. günden başlayarak farelerin normal yem ve suda çözünmüş 50 ppm dozda likopen ile beslenmeleri sağlanmış olup çalışmanın sonuna kadar devam etmiştir. Sütten kesildikten 1 hafta sonra başlamak üzere ilk hafta 20 mg/kg, ikinci hafta 30 mg/kg ve sonraki haftalarda 50 mg/kg vücut ağırlığı dozunda DEN haftada bir defa 8 hafta boyunca intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmıştır. Bir hafta ara verildikten sonra 300 mg/kg vücut

ağırlığı dozunda TAA haftada iki kez olmak üzere 8 hafta boyunca enjeksiyonla uygulanmıştır. TAA uygulamasının 8. haftasından sonra 6 hafta ara verilerek 6. haftanın sonunda fareler tartılıp sakrifiye edildi, karaciğer dokuları analiz edilmek üzere -80 °C de muhafaza edildi.

Grup 4 (Likopen+NAC+DEN): 12 adet erkek fare bu grubu oluşturmuştur. Fareler yaklaşık olarak 19 günlük iken farelerin normal yem ve suda çözünmüş 50 ppm dozda likopen ve 40 mM dozda NAC ile beslenmeleri sağlanmış olup çalışmanın sonuna kadar devam etmiştir. Sütten kesildikten 1 hafta sonra başlamak üzere ilk hafta 20 mg/kg, ikinci hafta 30 mg/kg ve sonraki haftalarda 50 mg/kg vücut ağırlığı dozunda DEN haftada bir defa 8 hafta boyunca intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmıştır. Bir hafta ara verildikten sonra 300 mg/kg vücut ağırlığı dozunda TAA, haftada iki kez olmak üzere 8 hafta boyunca intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmıştır. TAA uygulamasının 8. haftasından sonra 6 hafta ara verilerek 6. haftanın sonunda fareler tartılıp sakrifiye edildi, karaciğer dokuları analiz edilmek üzere -80 °C de muhafaza edildi

Grup 5 (NAC+DEN): 12 adet erkek fare bu grubu oluşturmuştur. Fareler yaklaşık olarak 19 günlük iken farelerin normal yem ve suda çözünmüş 40 mM NAC ile beslenmeleri sağlanmış olup çalışmanın sonuna kadar devam etmiştir. Sütten kesildikten 1 hafta sonra başlamak üzere ilk hafta 20 mg/kg, ikinci hafta 30 mg/kg ve sonraki haftalarda 50 mg/kg vücut ağırlığı dozunda DEN haftada bir defa 8 hafta boyunca intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmıştır. Bir hafta ara verildikten sonra 300 mg/kg vücut ağırlığı dozunda TAA haftada iki kez olmak üzere 8 hafta boyunca intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmıştır. TAA uygulamasının 8. haftasından sonra 6 hafta ara verilerek 6. haftanın sonunda fareler tartılıp sakrifiye edildi, karaciğer dokuları analiz edilmek üzere -80 °C de muhafaza edildi.

3.3. Fare Canlı Ağırlıkları, Yem ve Su Tüketimleri

Çalışmanın deney hayvanları ile ilgili sürecinde DEN, TAA, likopen ve NAC belirli dozlarda titizlikle uygulandı. Her uygulanan doz vücut ağırlığıyla orantılı olacak şekilde gerçekleştirildi. Farelerin ağırlık takibi yanı sıra yem ve su tüketimleri haftada 2 kez (pazartesi ve perşembe) yapıldı.

3.4. Numunelerin Alınması ve Muhafaza Edilmesi

Deney hayvanlarına 3.ve 10. hafta arasında 8 hafta boyunca DEN uygulaması yapıldı. Bir hafta ara verildikten sonra 8 hafta TAA uygulaması gerçekleştirildi. Son TAA

uygulamasından sonra 6 hafta (18-24. hafta) herhangi bir kanserojen verilmeyerek likopen ve NAC uygulamasına devam edildi. 24. hafta farelere ksilazin/ketamin verilerek dekapitasyon işlemi gerçekleştirildi. Karaciğer dokusu alındı. Histopatolojik değerlendirme için karaciğer dokusunun bir kısmı %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Biyokimyasal analizlerde kullanılmak elde edilen karaciğer dokusu analiz gününe kadar -80 °C de muhafaza edildi.

Antioksidan biyokimyasal analizler için, çalışma günü karaciğer dokusunun bir kısmı tartılarak işleme alındı. Doku, tartılan ağırlığının 9 katı kadar pH 7.0 ve 50 mM sodyum-potasyum fosfat tamponu ilave edilerek homojenize edildi. Doku homojenatı yaklaşık olarak 10000 g'de 10 dakika ve +4 °C de santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası elde edilen süpernatant biyokimyasal analizlerde kullanıldı.

3.5. Western Blot Analizi

Western Blot analizleri, İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Balb/c farelerinde oluşturulan HCC modelinde; neoplastik değişiklikler (GST-pi), inflamatuvar ve apoptotik durum (NF-κB p65, p-NF-κB p65, TGF-β1, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9), anjiyogenez (VEGF) ve invazyon/anjiyogenez/metastaz (MMP-2) ile ilişkili protein düzeyleri Western blot yöntemiyle analiz edildi.

3.5.1. Numunelerden Protein Ekstraksiyonu ve Protein Miktar Tayini

Karaciğer dokusu tartılarak, ağırlığının 5 katı kadar 1mM proteaz inhibitör kokteyli (Bioshop Canada Inc.) ve PMSF içeren RIPA tamponu ilave edilerek homojenizatör cihazı ile yaklaşık 1 dakika kadar homojenize edildi (Tablo 3.2). Homojenat +4 °C de 13000 rpm'de de 10 dakika santrifügasyon işlemine tabi tutuldu. Protein ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen süpernatant western blot analizi yapılmak üzere porsiyonlanarak -80 °C de muhafaza edildi. Elde edilen numunelerin protein konsantrasyonları BCA (bikinchoninic asit) kiti (Pierce TM BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford-U.S.A.) kullanılarak üretici firmanın sağladığı protokole göre ölçüldü.

Tablo 3.2. RİPA tamponun içeriği ve konsantrasyonları

Adı	Konsantrasyonu
Tris HCl	50 mM
NaCl	150 mM
NP 40	%1
Sodyum Deoksikolat	%0.5
EDTA	1 mM
SDS	%0.1

Çözelti hazırlandıktan sonra pH'sı 7.4'e ayarlandı.

3.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Stoklama ve Ayırma Jeli

Çalışmada jellerin SDS-PAGE analizinde kullanılacak ayırma jeli, standart jel hazırlama protokolüne uygun olarak hazırlandı. Akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi uygun tampon sistemi içerisinde seyreltildi, jel pH'sının korunması amacıyla Tris tamponu kullanıldı. Jel matriksinde proteinlerin düzgün migrasyonunu sağlamak için anyonik deterjan olarak SDS eklendi. Polimerizasyon reaksiyonu, serbest radikal oluşumunu başlatmak amacıyla amonyum persülfat (APS) ve katalizör olarak TEMED (Tetrametiletilendiamin) ilavesiyle gerçekleştirildi. Hazırlanan jel, tamamen polimerize oluncaya kadar oda sıcaklığında bekletildi ve ardından elektrofrez sisteminde yürütme yapıldı. Yürütme işleminde Bio-Rad marka (Mini-PROTEAN Tetra System) jel dökme sistemi kullanıldı. Stoklama ve ayırma jel içerikleri Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te verildi.

Tablo 3.3. %10'luk SDS-PAGE ayırma jeli içeriği ve hacimleri

Adı	Eklenen hacim
Distile Su	4.02 mL
%30 Akrilamid/Bis Akrilamid Stoğu	3.33 mL
1.5 M Tris Tamponu (pH 8.8)	2.5 mL
%10 SDS	100 µL
TEMED	5 µL
%10 APS	50 µL

Tablo 3.4. %5’lik SDS-PAGE stoklama jeli içeriği ve hacimleri

Adı	Eklenen Hacim
Distile Su	4.02 mL
%30 Akrilamid/Bis Akrilamid Stoğu	3.33 mL
1 M Tris Tamponu (pH 6.8)	2.5 mL
%10 SDS	100 µL
TEMED	5 µL
%10 APS	50 µL

Ayırma jeli karışımı (4 ml) hazırlanarak jel döküm sistemine yerleştirilmiş ince ve kalın camlar arasına bir pipet yardımıyla boşaltılır. Jel üst hattının düzgün olması ve hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için jelin üzerine yaklaşık olarak 150 mikrolitre izopropanol eklenir. Ayırma jelinin polimerize olması için 20-30 dakika beklendikten sonra izopropanol uzaklaştırılarak birkaç kere distile sudan geçirilir ve distile su iyice uzaklaştırılır. Stoklama jeli karışımı hazırlanır, yaklaşık 2 ml’si ayırma jelinin üzerine boşaltılır. Bu işlemin hemen ardından 10 kuyucuklu tarak kabarcık bırakmadan camların arasına yerleştirilir. Stoklama jelinin polimerize olması için 20-30 dakika beklenir.

3.5.3. Numunelerin Hazırlanması ve Yürütme

Numunelerin, her kuyucuğa aynı miktarda protein (40 µg) yüklemesi yapılacak şekilde gerekli dilisyonları yapıldı. Numunelere 2X Laemli numune yükleme tamponu ve bu tamponun %10’u kadar β-merkaptetanol eklendi. Hazırlanan karışım 95 °C de 5 dk inkübe edilerek proteinlerin denatüre olması ve negatif yüklenmesi sağlandı. Numuneler her kuyucukta 40 µg protein olacak şekilde yüklendi. Dikey Elektroforez tank sistemine (Mini PROTEAN Tetra Cell, Bio Rad) yürütme tamponu doldurularak tank güç kaynağına (Power Pac 3000, Bio-Rad) bağlandı. 100 V’luk gerilim verilerek numunelerin jelin en alt seviyesine kadar yürümesi sağlandı (yaklaşık olarak 1 saat 45 dakika).

3.5.4. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

Proteinler polivinilidin diflorür (PVDF) membrana yarı-kuru transfer yöntemi kullanılarak Bio-Rad marka Semi-Dry cihazı ile transfer edildi. Cihaz kasetine önce iki filtre kağıdı, üzerine metanol ve distile suda hidrate edildi PVDF (GVS, USA) membran, sonra jel ve son olarak bunların üzerine iki filtre kağıdı yerleştirilerek kaset kapatıldı ve cihaza yerleştirildi. 25V 2.5 A (sabit akım) ile 10-15 dk süre ile proteinlerin jelden PVDF membrana transferi sağlandı. Transfer işleminin ardından jel, protein transferini

doğrulamak amacıyla uygun boyama çözeltisi (örneğin Comassie Brilliant Blue R-250) içerisinde oda sıcaklığında en az 2 saat hafif çalkalama ile inkübe edildi. Boyama sonrasında jel, destain (boya giderme) çözeltisi ile yıkanarak arka plan boyası uzaklaştırıldı. Protein bantlarının jel üzerinde bulunup bulunmadığı görsel olarak değerlendirilerek transfer etkinliği kontrol edildi.

Tablo 3.5. SDS PAGE transfer tamponu (1000 ml için)

İçerik	Hacmi
10X Yürütme Tamponu	100 mL
Saf Metanol	100 mL
Distile Su	800 mL

3.5.5. Bloklama

Protein transfer edildi PVDF membran %5 yağsız süt tozu (Serva) içeren 15 ml 1X TBST çözeltisi içinde oda ısısında 1,5-2 saat çalkalanarak bloklandı. Membran bloklama işleminden sonra 4'er defa 6'şar dakika 1X TBST (TBS+Tween-20) çözeltisinde çalkalanarak yıkandı.

Tablo 3.6. 10x tris tamponlu tuz çözeltisi içeriği

İçerik	Miktar	pH
Tris	31,4 gr	7.6
NaCl	80 gr	

3.5.6. Primer Antikor ile İnkübasyon

Bloklama işleminden sonra membran ve hedef proteinlere spesifik primer antikorlar, %5 süt tozu içeren 4 ml 1X TBST çözeltisinde 1/1000 oranında seyreltilerek 50 ml'lik falkon tüpe özenle bırakıldı. Membran ve primer antikor, falkon tüpte silindir karıştırıcıda +4 °C de gece boyunca inkübe edildi. Membran, primer antikorla inkübasyon işleminden sonra 3'er defa 10'ar dakika 1X TBST (TBS, Tween-20) çözeltisinde çalkalanarak yıkandı.

Tablo 3.7. Western Blot analizinde kullanılan primer antikorlar

Protein	Primer Antikor	Dilisyon	Molekül Ağırlığı (kD)	Marka
Beta Aktin	Fare IgG/Monoklonal	1:1000	43	Santa Cruz sc-47778
NF-κB P65	Tavşan IgG/Monoklonal	1:1000	65	Cell signaling 8242
p- NF-κB P65	Fare IgG/Monoklonal	1:1000	66	Santa Cruz sc-136548
TGF-β1	Fare IgG/Monoklonal	1:1000	13	Santa Cruz sc-130348
Kaspaz-3	Fare IgG/Monoklonal	1:1000	11/17/20	Santa Cruz sc-65497
Kaspaz-9	Fare IgG/Monoklonal	1:1000	46	Santa Cruz sc-56076
Bcl-2	Fare IgG/Monoklonal	1:1000	30	Santa Cruz sc-7382
Bax	Fare IgG/Monoklonal	1:1000	23	Santa Cruz sc-7480
GST-Pİ	Tavşan IgG/Monoklonal	1:1000	23	Abcam Ab138491
VEGF	Fare IgG/Monoklonal	1:1000	42	Santa Cruz sc-7269
MMP2	Fare IgG/Monoklonal	1:1000	72	Santa Cruz sc-13594

3.5.7. Sekonder Antikor ile İnkübasyon

Primer antikor ile inkübasyon işlemi ile birincil antikorlar hedef proteine bağlanır. Bu işlemden sonra membran yaban turpu peroksidazına (horseradish peroxidase, HRP) konjuge edilmiş sekonder antikor ile inkübe edildi. Sekonder antikor Primer antikorun elde edildiği canlı türüne göre Anti-mouse (Cell Signaling Technology, 7076S) veya Anti-rabbit (Cell Signaling Technology, 7074S) olarak belirlenir. Membran ve % 5 süt tozu içeren 4 ml 1X TBST çözeltisinde 1/2000 oranında seyreltilen HRP ile konjuge ikincil antikor, 50 ml'lik falkon tüpe özenle bırakıldı. Membran ve ikincil antikor, falkon tüpte oda ısısında silindir karıştırıcıda hafifçe karıştırılarak 1,5-2 saat inkübe edildi. Membran, HRP ile konjuge ikincil antikorla inkübasyon işleminden sonra 4'er defa 6'şar dakika 1X TBST (TBS, Tween-20) çözeltisinde çalkalanarak yıkandı.

3.5.8. Görüntüleme ve Analiz

PVDF membrandaki hedef proteine sırasıyla birincil antikor ve HRP ile konjuge ikincil antikorun bağlanması sağlandı. Membranda antikorlar ile işaretlenmiş proteini görüntülemek için ikincil antikorla konjuge HRP enziminden faydalanılır. HRP enzimine özgü substratı içeren ECL kiti (Enhanced Chemiluminescence) (Pierce ECL Plus Western

Blotting Substratı, Thermo Scientific) ilave edildikten sonra HRP katalizörlüğünde kimyasal reaksiyon meydana gelir. Bu kimyasal reaksiyon sonucu bir kemilüminesans bileşiği olan Luminol reaktifi oksitlenerek ışık yayar. Bu ışıma DNR Biochemi (DNR Bio-imaging system, İsrail) görüntüleme cihazı ile kaydedildi. Kaydedilen bantlar, ImageJ studio Lite Ver 5.2 programı ile analiz edilerek protein yoğunlukları değerlendirildi. Rölatif değerlendirme β -aktin'e (housekeeping protein) göre yapıldı.

3.5.9. Hafif Sıyırma (stripping) ve Tekrar Proplama

Membranın üzeri kaplayacak hacimde sıyırma tamponu kullanılarak karıştırmadan oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edildi. Mevcut tampon dökülerek yeni tampon ile işlem tekrar edildi. Tekrar tampon dökülerek PBS içinde 2 defa 5'er dakika olmak üzere shake yapılarak yıkama yapıldı. Daha sonra TBST ile de 2 defa 5'er dakika olmak üzere shake yapılarak yıkama yapıldı. Membran Bloklamaya hazırdır.

3.6. GSH Miktar Tayini

GSH düzeyi Ellman'ın (176) metodu ile ölçülmüştür. Karaciğer doku süpernatantı eş hacimdeki %10'luk trikloroasetik asit ile deproteinize edildi. Daha sonra 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek proteinden arındırıldı. Numune ortamına 0,3 M disodyumhidrojenfosfat ve kromojenik 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ilave edilerek 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra meydana gelen rengin şiddeti 410 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart eğriye göre örnekteki GSH konsantrasyonu nmol/g yaş doku olarak hesaplandı.

3.7. Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivite Tayini

Çalışma prensibi ksantin+ksantin oksidaz reaksiyonu ile ortaya çıkan süperoksit radikallerinin NBT'yi (nitroblue tetrazolium) indirgemesiyle mavi-mor renginde formazonun oluşmasına dayanmaktadır. Bu rengin 560 nm dalga boyunda verdiği absorbans spektrofotometrik ölçülür ve SOD aktivitesi belirlenir. Ortamda SOD enzimi olmadığı zaman NBT'nin indirgenmesi maksimum düzeyde gerçekleşerek koyu mavi bir renk gözlenir. Ortamda SOD enzimi varlığında ise süperoksit anyonu hidrojen peroksit çevrileceğinden NBT indirgenmesi azalır ve oluşan mavi renkli formazon enzim miktarıyla ters orantılı olarak azalacaktır. Dolayısıyla SOD miktarı arttıkça rengin şiddeti az olacaktır (177). Enzim spesifik aktivitesinin belirlenmesi için doku protein düzeyi Lowry yöntemiyle ölçüldü. SOD aktivitesi Ünite/mg protein olarak ifade edildi.

3.8. Malondialdehit (MDA) Miktar Tayini

Karaciğer doku MDA düzeyi, Ohkawa ve ark. (178) tarafından geliştirilen metod ile ölçülmüştür. Vida kapaklı cam tüpe 0,25 ml karaciğer doku homojenatı, 1,5 ml %1'lik fosforik asit ve 0,5 ml %0,6'lık tiobarbitürik asit (TBA) konur, iyice karıştırıldıktan sonra 95 °C su banyosunda 45 dakika bekletilir. Daha sonra numuneler soğutuldu ve her numuneye 2 ml n-butanol eklenir. Her tüp 5'er dakika kuvvetlice vortekslenir. Daha sonra numuneler 5000 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatanttan (n-butanol fazı) 250 mikrolitre mikro plakaya alındı ve oluşan rengin şiddeti 535 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart eğriye göre örnekteki MDA konsantrasyonu nmol/g yaş doku olarak hesaplandı.

3.9. Katalaz Aktivite Tayini

Hidrojen peroksit (H_2O_2) ultraviyole dalga boyunda absorbans veren bir maddedir. Hidrojen peroksit 240 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Ortamda bulunan hidrojen peroksit katalaz tarafından su ve oksijene parçalanır. 240 nm'de zamana bağlı kinetik okuma yapılarak 15 saniye aralıklarla meydana gelen absorbans azalması 1 dk boyunca kaydedildi. Absorbanstaki azalma enzimin aktivitesi ile orantılı bir eğilim göstermektedir. Enzim aktivitesi dokular için K/mg protein halinde spesifik aktivite olarak değerlendirilir (179).

3.10. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini

Redükte glutasyon varlığında hidrojen peroksitin suya dönüştürülmesini katalize eden bir enzimdir. Bu reaksiyon sonucunda redükte glutasyon oksitlenmiş forma dönüştürülür. Bu reaksiyonun tekrarlanması için okside glutasyonun redükte forma dönüştürülmesi gerekir. Deney ortamında indirgenmiş NADP varlığında okside glutasyon redükte forma glutasyon redüktaz enzimi tarafından dönüştürülür. İndirgenmiş NADP 340 nm'de maksimum absorbans verir ve glutasyon redüktaz okside glutasyonu redükte forma dönüştürdükçe absorbans giderek azalır. GSH-Px aktivitesi, 3 dakikalık absorbansdaki değişimin 1 dakikalık mutlak değerine göre hesaplanır. GSH-Px aktivitesi Ü/mg protein olarak ifade edildi (180).

3.11. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivite Tayini

Glutasyon S-transferaz, GSH ile elektrofilik bileşiklerin tepkimesini katalizleyerek bu bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlar. GST aktive düzeyleri, 340 nm dalga boyunda

1-kloro 2,4 dinitrobenzen (2,4-dinitrochlorobenzene; CDNB)'nin GSH ile konjugasyonu sırasında meydana gelen absorbans artışlarının takip edilmesi ile ölçülür (181). GST aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

3.12. Protein Karbonil (PC) Tayini

Doku PC düzeyleri, Reznick ve Packer (182) tarafından geliştirilen yöntemle tayin edildi. Metodun prensibi, protein yapısında bulunan karbonil (aldehit ve keton) gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları sarı/turuncu/kırmızımsı renkli hidrazonların renk şiddetinin 360 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Protein karbonil düzeyi nmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.13. Hidroksiprolin Miktar Tayini

Karaciğer hidroksiprolin düzeyleri Berkman ve Loxley (183) Ellis ve ark. (184) tarif ettiği analiz metotları modifiye edilerek ölçülmüştür. Hidroksiprolinin pirol türevleri Chloramin-T ile okside edilir ve Erlich reaktifi ile renkli bileşik oluşturulur. Oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür. Hidroksiprolin düzeyleri mg/mL olarak ifade edildi.

3.14. İnterlökin-6 (IL-6) ve Nrf2 Miktar Tayini

Karaciğer dokusu İnterlökin-6 (IL-6), Katalog No:E-EL-R0015, Elabscience, USA) ve Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2 (Nrf2) (Katalog No:E-EL-R1052, Elabscience, USA) düzeyleri marka ELISA kitleri kullanılarak belirlendi. Üretici talimatlarına göre çalışma yapıldı. IL-6 ve Nrf2 kitleri çift antikorlu sandviç prensibi kullanarak Enzim-Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA) yöntemi ile kantitatif ölçüm yapıldı.

3.14. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler

Histopatolojik değerlendirme için farelerin karaciğer dokuları 34 mm'lik küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra plastik doku takip kasetlerine konularak %10'luk formaldehit içerisinde 24 saat süre ile fiksede edildi. Fiksasyon işleminin ardından dokular 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandılar. Dereceli alkollerde dehidrate edilerek, ksilende şeffaflaştırılıp parafine gömüldüler. Parafin bloklardan Leica RM2145 marka mikrotom yardımıyla 5'er mikron'luk kesitler alındı. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla Hematoksilen ve eozin boyama yöntemi uygulandı. Karaciğer hasarı; parankimasında bulunan sınırları düzensiz inflamatuvar ve nekroze alanların sayısı

ile hepatositlerdeki nükleer değişikliklere göre belirlendi. Histolojik değerlendirme için her kesitten X20'lik büyütmede 10 alan incelendi. Her dokunun mikroskopik skoru, her kritere verilen skorların toplamı olarak hesaplandı. Puanlar her kriter için 0, yok; 1, hafif; 2, orta ve 3, şiddetli olarak verildi. Preparatlar Leica DFC280 ışık mikroskobu ve Leica Q (Leica Micros Imaging solution Ltd, Cambrige, UK) görüntü analiz sistemi ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

İmmünohistokimyasal analizler için deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilen kesitler 2100 Antijen Retriever inkübatöre alınarak 0.01 M sitrat (pH 6.0) içinde 15-20 dk kaynatıldı. Endojen peroksidaz enzim aktivitesini bloke etmek için kesitlere 12 dk boyunca %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. PBS ile yıkanan kesitlere 5 dk süresince protein blok (ultra V blok) uygulaması yapıldı. Daha sonra kesitler 37 °C'de 60 dk primer antikor (GPC-3, 1/100 dilisyon, 67 kD, sc-390587) ile inkübe edildi. PBS ile yıkanan dokulara 37 °C'de 10 dk boyunca biotinli sekonder antikor uygulandı. Bu işlem sonrasında kesitler 37 °C'de 10 dk streptavadin peroksidaz ile inkübe edildi. Ardından kromojen uygulaması yapılan kesitler hematoksilin ile boyanarak su bazlı kapatıcı ile kapatıldı. Boyanma immünreaktivitenin yaygınlığı (0: 0-%25, 1:%26-50, 2:%51-75, 3:%76-100) esas alınarak semikantitatif olarak skorlandı.

3.15. İstatistiksel Analizler

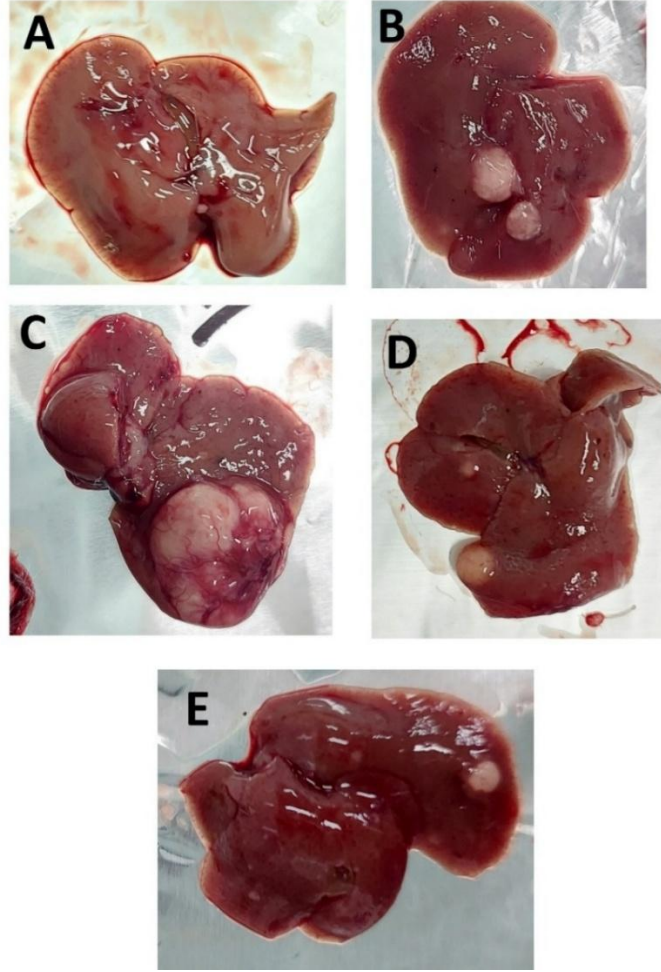
Gruplar arası karşılaştırma Kruskal-Wallis H teti ile yapıldı, eğer Kruskal-Wallis testi pozitif ise ($p < 0.05$) Conover (1999)'e göre alt grupların karşılaştırılması MedCalc istatistik programı ile yapıldı, veriler medyan (25-75 yüzdelerlik dilim) veya (çeyreklikler arası genişlik) olarak verildi. Her bir satırda gruplarda farklı olan harfler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ($p < 0.05$).

Histolojik verilerin istatistiksel analizleri, SPSS istatistiksel yazılım programı (SPSS for Windows version 17) ile yapıldı. Çalışmada yer alan tüm gruplardaki ölçülebilir değişkenlerin normallik testlerine göre normal dağılım göstermediği saptandı ($p > 0.05$). Bu nedenle, istatistiksel değerlendirmede parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis varyans analizi, tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar, Bonferroni düzeltmesi yapılarak Mann-Whitney-U testi ile yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler, dağılıma bağlı olarak medyan (minimum-maksimum; Med (Min-Maks)) olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Farelerin Canlı Ağırlık, Karaciğer Ağırlıkları ve Rölatif Karaciğer Ağırlıkları

Fare karaciğerlerine ait makroskopik görüntüler incelendiğinde kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda yüzeyin düzgün, rengin homojen olduğu ve nodüler oluşumların bulunmadığı gözlemlendi. DEN grubunda, karaciğer yüzeyinde belirgin ve büyük şekilde nodüler lezyon gözlemlendi, ancak büyük kitlelerin görülme sıklığı diğer DEN alan gruplara göre düşüktü. Likopen+DEN grubuna ait karaciğerlerde karaciğer doku yüzeyinin pürüzlü, renginin mat ve nodüler oluşumların DEN ve NAC+DEN grubuna kıyasla arttığı gözlemlendi. NAC+DEN grubunun karaciğer doku yüzeyinin Likopen+DEN ve Likopen+NAC+DEN gruplarına göre daha düzgün, renginin daha canlı, homojen olmasının yanı sıra nodül büyüklük ve görülme sıklığının bu gruplarla benzer olduğu gözlemlendi. Likopen+NAC+DEN grubunun Likopen+DEN grubuna göre karaciğer yüzeyinin benzer şekilde pürüzlü ve renginin mat olmasının yanı sıra nodüler yapıların görülme sıklığının hemen hemen aynı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1).



A: Kontrol B: DEN, C: Likopen+DEN D: Likopen+NAC+DEN E: NAC+DEN

Şekil 4.1. Deney gruplarına ait karaciğerlerin makroskopik görünüşleri

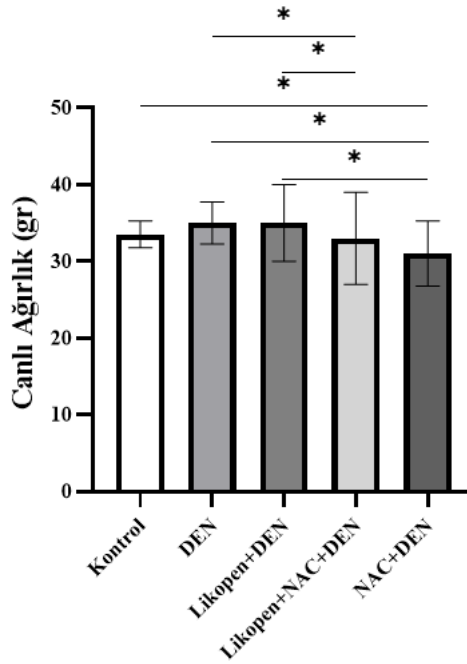
Çalışma gruplarının canlı ağırlıkları, karaciğer ağırlıkları ve rölatif (karaciğer ağırlığının canlı hayvan ağırlığına oranının 100 ile çarpımı) karaciğer ağırlıkları karşılaştırıldı. Fare canlı ağırlık bakımından NAC+DEN grubunun canlı ağırlığının kontrol, DEN, Likopen+DEN gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu; Likopen+NAC+DEN grubunun canlı ağırlığının DEN, Likopen+DEN gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi (Tablo 4.1, Şekil 4.2) ($p<0.05$). Karaciğer ağırlığı bakımından Likopen+DEN grubunun Kontrol, DEN, NAC+DEN gruplarına göre anlamlı derecede daha ağır karaciğerlere sahip olduğu tespit edildi (Tablo 4.1, Şekil 4.3) ($p<0.05$). Rölatif karaciğer ağırlığı bakımından Kontrol ve DEN grubuna göre Likopen ve/veya NAC uygulanan diğer grupların anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 4.1, Şekil 4.4) ($p<0.05$).

Tablo 4.1. Fare canlı ağırlıkları, karaciğer ağırlıkları, rölatif karaciğer ağırlıkları

	Gruplar					p
	Kontrol (n=8)	DEN (n=12)	L+DEN (n=11)	L+NAC+DEN (n=12)	NAC+DEN (n=12)	
	Medyan- (IQR)	Medyan- (IQR)	Medyan- (IQR)	Medyan- (IQR)	Medyan- (IQR)	
C.Ağırlık (gr)	33.5 (1.75) ^{ab}	35 (2.75) ^a	35 (5) ^a	33 (6) ^{bc}	31 (4.25) ^c	0.004
KC (gr)	1.55 (0.32) ^a	1.78 (0.34) ^a	2.1 (0.53) ^b	1.85 (0.66) ^{ab}	1.72 (0.4) ^a	0.015
Rölatif KC Ağırlığı	4.75 (0.98) ^a	5.08 (0.7) ^a	6 (1.27) ^b	5.89 (1.04) ^b	5.81 (0.88) ^b	0.001

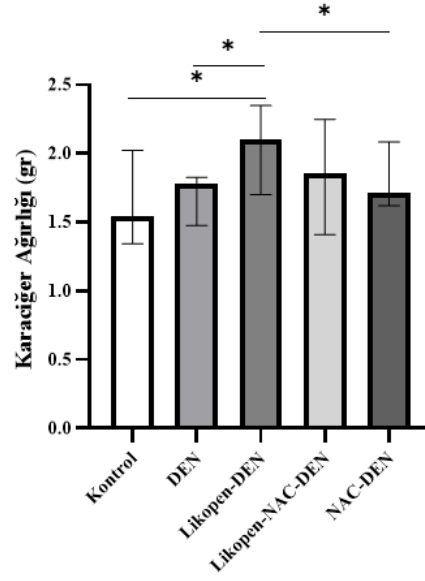
C.Ağırlık: canlı ağırlık; KC: karaciğer ağırlığı DEN: Dietilnitrozamin, L: likopen, NAC: N-asetilsistein
Değişkenler medyan, (çeyreklikler arası genişlik, IQR) şeklinde özetlendi.

^{a, b, c} Aynı harfi içermeyen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır.



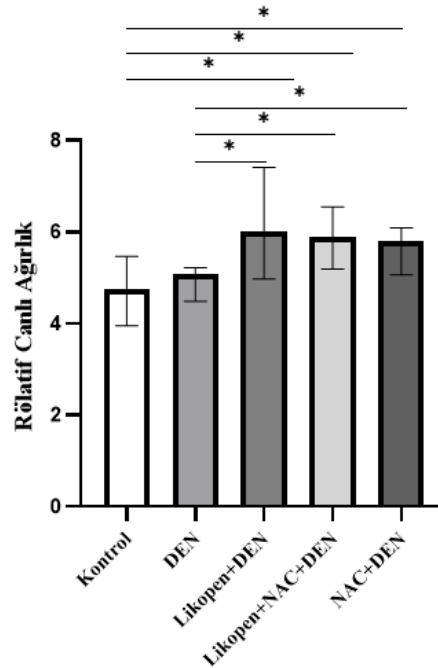
Fare canlı ağırlığı bakımından NAC+DEN grubu diğer gruplara göre anlamlı derecede düşüktür. DEN: Dietilnitrozamin, NAC: N-asetilsistein

Şekil 4.2. Grupların canlı ağırlıklarının karşılaştırılması



Karaciğer ağırlığı bakımından Likopen+DEN grubunun Kontrol, DEN, NAC+DEN gruplarına göre anlamlı derecede daha ağır karaciğerlere sahip olduğu tespit edildi. DEN: Dietilnitrozamin, NAC: N-asetilsistein

Şekil 4.3. Grupların karaciğer ağırlıklarının karşılaştırılması

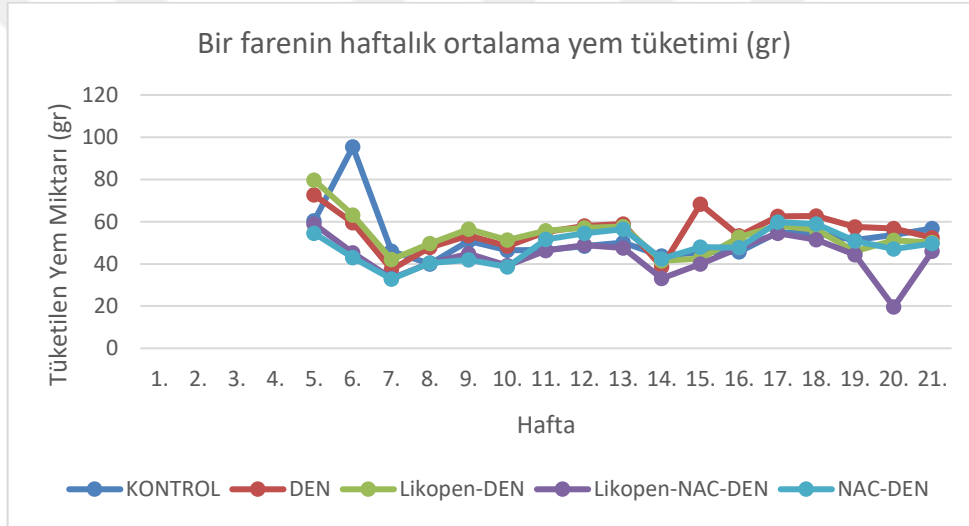


Rölatif karaciğer ağırlığı bakımından Kontrol ve DEN grubuna göre Likopen ve/veya NAC uygulanan diğer grupların anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi. DEN: Dietilnitrozamin, NAC: N-asetilsistein

Şekil 4.4. Grupların rölatif karaciğer ağırlıklarının karşılaştırılması

4.2. Farelerin Haftalık Ortalama Su ve Yem Tüketimleri

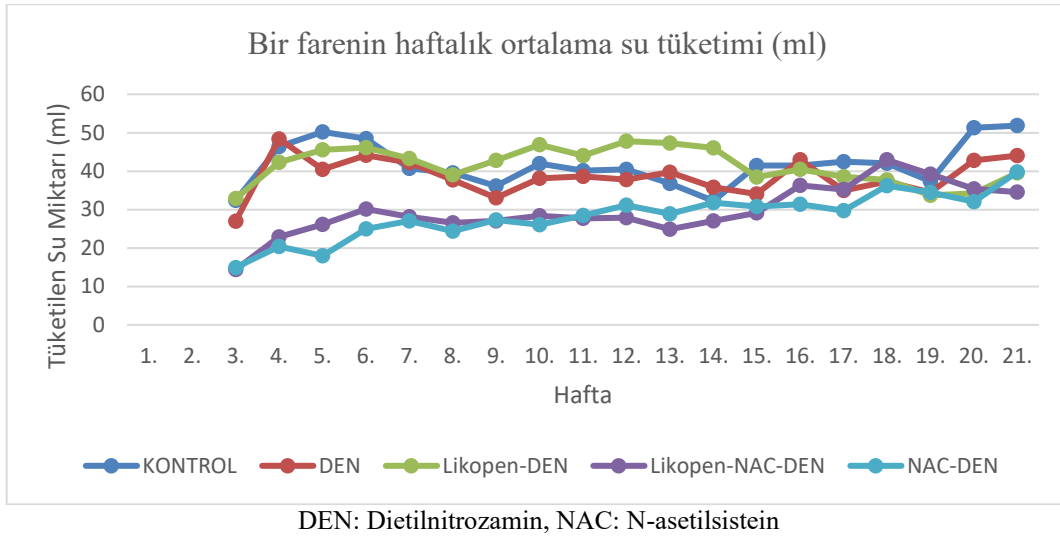
Çalışma gruplarında yer alan farelerin haftalık ortalama yem ve su tüketimleri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’te verilmiştir. Bu grafikte deney süresi boyunca kontrol ve tedavi gruplarındaki farelerin haftalık ortalama yem tüketimleri (gr) gösterilmektedir. Tüm gruplarda deneyin erken döneminde yem tüketiminde belirgin bir düşüş gözlenmiş, ilerleyen haftalarda ise tüketimin kademeli olarak arttığı ve benzer düzeylerde seyrettiği izlenmiştir. DEN uygulanan gruplarda bazı haftalarda yem tüketiminde dalgalanmalar görülmekle birlikte, likopen ve/veya NAC verilen grupların genel yem tüketim profillerinin kontrol grubuna yakın olduğu gözlenmiştir. Bulgular, uygulanan tedavilerin uzun dönemde yem tüketimi üzerinde belirgin bir olumsuz etki oluşturmadığını göstermektedir (Şekil 4.5).



DEN: Dietilnitrozamin, NAC: N-asetilsistein

Şekil 4.5. Farelerin haftalık ortalama yem tüketimi

Deneyin başlangıç haftalarında tüm gruplarda su tüketiminin arttığı, ilerleyen haftalarda ise gruplar arasında dalgalı bir seyir izlediği görüldü. Kontrol grubunda su tüketimi genel olarak bir artış gösterdi. DEN uygulanan grupta, bazı haftalarda kontrol grubuna kıyasla su tüketiminde azalma gözlemlendi. Likopen-DEN grubunda, su tüketiminin çoğu haftada DEN grubuna benzer veya kısmen daha yüksek olduğu, ancak belirgin dalgalanmalar gösterdiği dikkat çekti. Likopen+NAC+DEN grubu ile NAC-DEN grubunda özellikle erken ve orta dönemlerde daha düşük su tüketimi izlendi, ancak zamanla bu değerlerin arttığı ve deneyin sonuna doğru diğer gruplara yaklaştığı gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Farelerin haftalık ortalama su tüketimi

4.3. Western Blot ile Protein Analiz Sonuçları

Çalışma gruplarından alınan karaciğer dokusu RIPA ile ekstrakte edildi. Ekstrakte edilen proteinlerin konsantrasyonları BCA protein analiz kiti (Pierce™ BCA Protein Assay Kits, Thermo Scientific™) kullanılarak belirlenmiştir. Tüm gruplardan (Kontrol, DEN, Likopen+DEN, Likopen+NAC+DEN ve NAC+DEN) eşit miktarda protein yüklenerek SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarına göre ayrılan MMP2, VEGF, NF- κ B P65 (65 kD), p- NF- κ B P65, GST-Pİ, Kaspaz-9, Kaspaz-3, Bax, Bcl-2, TGF Beta ve β -aktin proteinlerinin düzeyleri western-blot metodu ile analiz edildi. Elde edilen band değerleri, houskeeping protein olan beta aktine oranlanarak Tablo 4.2 ve Şekil 4.7’de verildi.

Tablo 4.2. Western Blot analizi ile elde edilen Bax, Bcl-2, Kaspaz-9, GST-Pİ, NF-κB P65, p- NF-κB P65, TGF Beta, Kaspaz-3, MMP2, VEGF bant yoğunluklarının, aynı örneğe ait β-aktin bant yoğunluklarına oranlanarak protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

	Gruplar									
	Kontrol		DEN		Likopen+DEN		Likopen+NAC+DEN		NAC+DEN	
	(n=8)		(n=12)		(n=11)		(n=12)		(n=12)	
	Medyan	25 - 75 P	Medyan	25 - 75 P	Medyan	25 - 75 P	Medyan	25 - 75 P	Medyan	25 - 75 P
Bax	0.0697 ^A	0.0660 - 0.0716	0.115 ^{AB}	0.0917 - 0.130	0.154 ^B	0.151 - 0.228	0.168 ^B	0.102 - 0.183	0.113 ^B	0.101 - 0.137
Bcl-2	0.914 ^A	0.895 - 0.974	0.898 ^A	0.891 - 0.972	1.376 ^B	1.129 - 1.522	1.705 ^B	1.315 - 1.932	1.389 ^B	1.173 - 1.902
Bax/Bcl-2	0.0708	0.0702 - 0.0786	0.129	0.0952 - 0.146	0.143	0.120 - 0.156	0.0938	0.0739 - 0.0972	0.103	0.0606 - 0.104
Kaspaz-9	0.0971	0.0877 - 0.101	0.117	0.111 - 0.125	0.152	0.142 - 0.153	0.159	0.116 - 0.199	0.186	0.110 - 0.195
GST-pi	1.331 ^A	1.178 - 1.751	0.582 ^C	0.491 - 0.821	0.733 ^C	0.569 - 0.859	0.290 ^B	0.195 - 0.357	0.357 ^B	0.108 - 0.483
NF-κB P65	0.318 ^{AB}	0.305 - 0.321	0.179 ^{BC}	0.174 - 0.268	0.156 ^C	0.155 - 0.183	0.185 ^{BC}	0.109 - 0.311	0.764 ^A	0.627 - 0.847
p- NF-κB P65	0.343	0.327 - 0.345	0.376	0.363 - 0.380	0.572	0.479 - 0.646	0.649	0.340 - 1.062	0.485	0.373 - 0.709
Tgf-β	0.368 ^A	0.294 - 0.410	0.480 ^A	0.376 - 0.510	0.641 ^B	0.563 - 0.739	0.686 ^B	0.634 - 0.711	0.592 ^B	0.565 - 0.645
Kaspaz-3	0.332	0.321 - 0.481	0.448	0.372 - 0.459	0.325	0.323 - 0.362	0.379	0.368 - 0.509	0.398	0.338 - 0.519
MMP-2	0.707 ^A	0.670 - 0.826	0.862 ^{AC}	0.740 - 0.986	1.159 ^{BC}	1.099 - 1.279	1.425 ^B	1.021 - 1.558	0.723 ^A	0.669 - 0.765
VEGF	0.786 ^{BE}	0.599 - 1.076	1.099 ^{AE}	0.906 - 1.196	1.579 ^{CD}	1.338 - 2.002	1.563 ^{AD}	1.132 - 1.784	1.136 ^{AB}	1.039 - 1.187

DEN: Dietilnitrozamin, NAC: N-asetilsistein. Değişkenler medyan ve 25-75 yüzdeler şeklinde özetlendi.

Satırlarda aynı harfi içermeyen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır.

Analiz sonuçlarına göre:

Bax protein düzeyi; Kontrol grubuna kıyasla DEN grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan fakat belirgin bir artış gözlemlendi. Likopen+DEN, Likopen+NAC+DEN ve NAC+DEN grupları DEN'e göre farksız olup, bu gruplar kontrole kıyasla anlamlı bir yükselme gösterdi (Şekil 4.10) ($p<0.05$).

Bcl-2 protein düzeyi; Likopen+DEN, Likopen+NAC+DEN ve NAC+DEN grupları arasında anlamlı bir fark göstermezken bu gruplar, aralarında istatistiki fark olmayan DEN ve Kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdi (Şekil 4.10) ($p<0.05$).

GST-pi (GST P1) protein düzeyi; DEN ve Likopen+DEN grupları arasında anlamlı bir fark göstermezken bu gruplar Kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak anlamlı bir düşüş ($p<0.05$) ve Likopen+NAC ve NAC+DEN gruplarına göre ise istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdi (Şekil 4.9) ($p<0.05$).

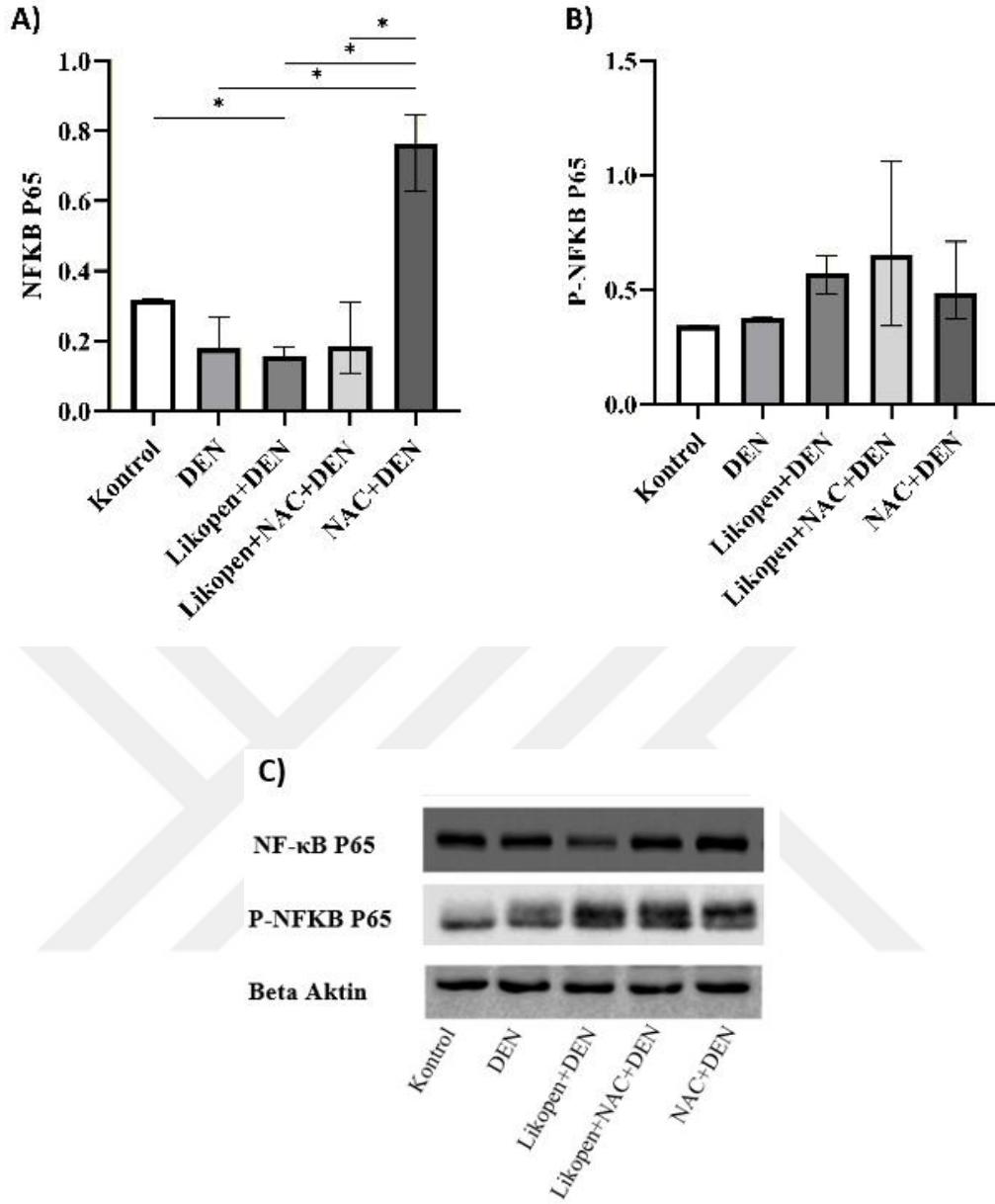
NF- κ B protein düzeyi; Kontrol ve NAC+DEN grupları arasında anlamlı bir fark göstermezken; bu gruplar DEN, Likopen+DEN ve Likopen+NAC+DEN gruplarına kıyasla istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.05$); Likopen+DEN, Likopen+NAC+DEN grupları kendi aralarında anlamlı bir fark göstermedi (Şekil 4.7).

TGF β protein düzeyi; Likopen+DEN, Likopen+NAC+DEN ve NAC+DEN grupları arasında anlamlı bir fark göstermezken bu gruplar, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmayan DEN ve Kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme gösterdi (Şekil 4.9) ($p<0.05$).

MMP 2 protein düzeyi; Kontrol, DEN ve NAC+DEN grupları arasında istatistiksel bir anlam ifade etmezken; bu gruplar DEN+NAC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdi ($p<0.05$). Likopen+DEN ve Likopen+NAC+DEN grupları arasında da anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.8).

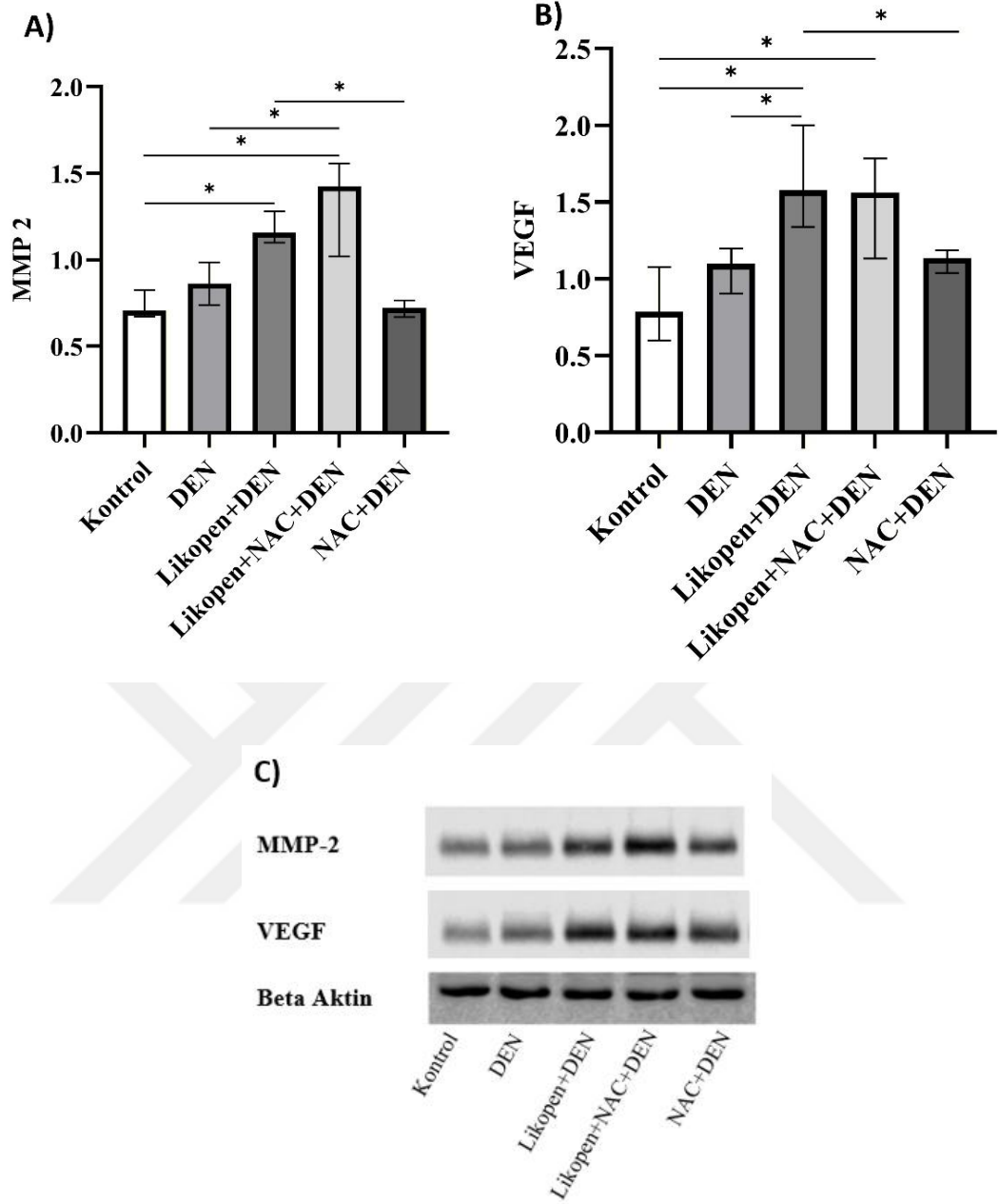
VEGF protein düzeyi; Kontrol grubuna kıyasla DEN grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan fakat belirgin bir artış gözlemlendi. Likopen+DEN ve Likopen+NAC+DEN grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. NAC+DEN grubuna kıyasla Likopen+DEN grubu istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.05$). Kontrol ve DEN grubuna kıyasla Likopen+DEN grubu istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi (Şekil 4.8) ($p<0.05$).

Kaspaz-9 (Şekil 4.11), Kaspaz-3 (Şekil 4.11) ve p- NF- κ B P65 (Şekil 4.7) protein düzeyleri bakımından gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunmadı ($p>0.05$).



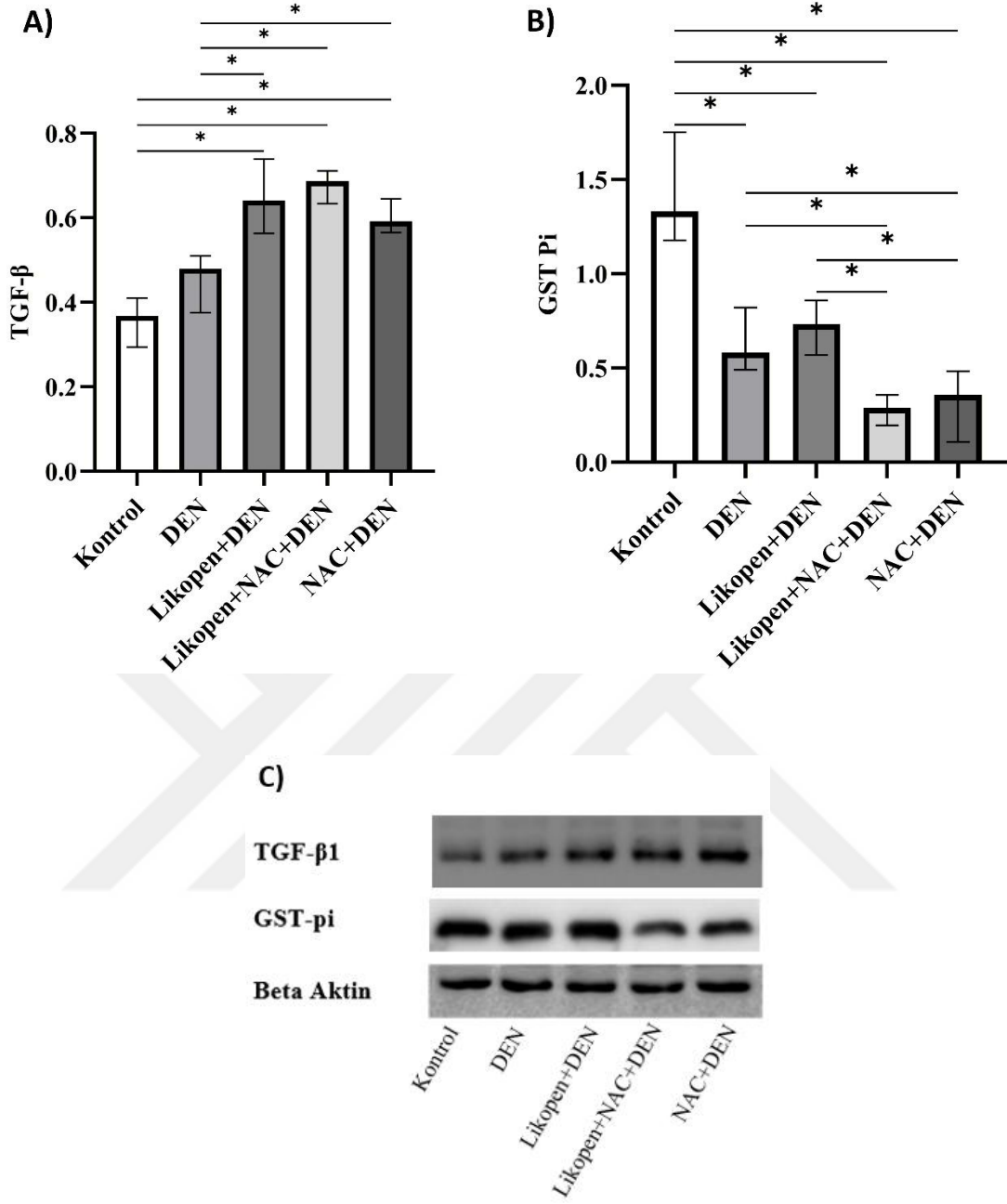
A: NF-κB P65, B: p- NF-κB P65 bant yoğunluklarının, aynı örneğe ait β-aktin bant yoğunluklarına oranlanarak protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması C: NF-κB P65 ve p- NF-κB P65 western blot bantları.

Şekil 4.7. Western blot ile analiz edilen NF-κB P65 ve p- NF-κB P65 düzeylerinin karşılaştırılması.



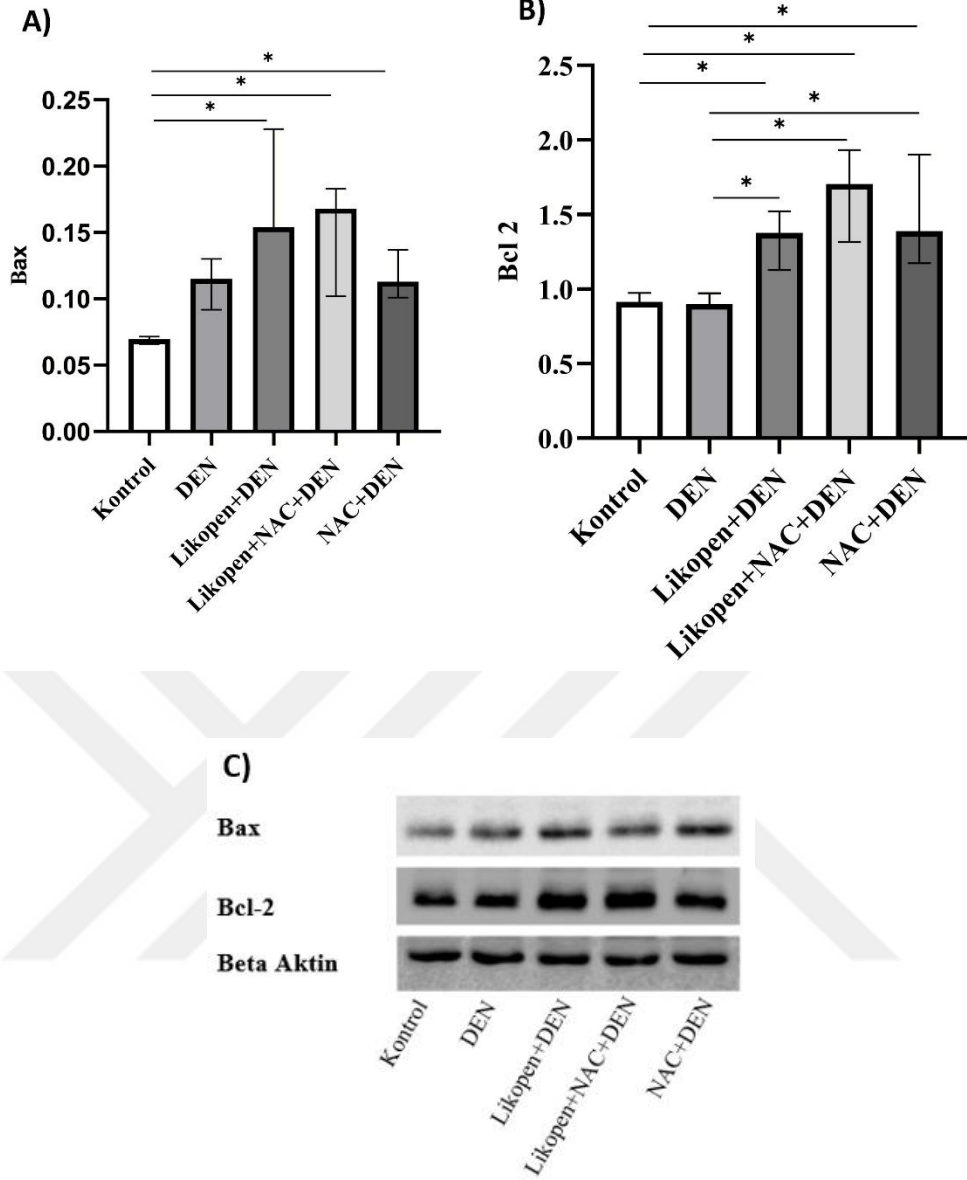
A: MMP-2, B: VEGF bant yoğunluklarının, aynı örneğe ait β -aktin bant yoğunluklarına oranlanarak protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ve C: MMP-2 ve VEGF'in western blot bantları.

Şekil 4.8. Western blot ile analiz edilen MMP-2 ve VEGF düzeylerinin karşılaştırılması.



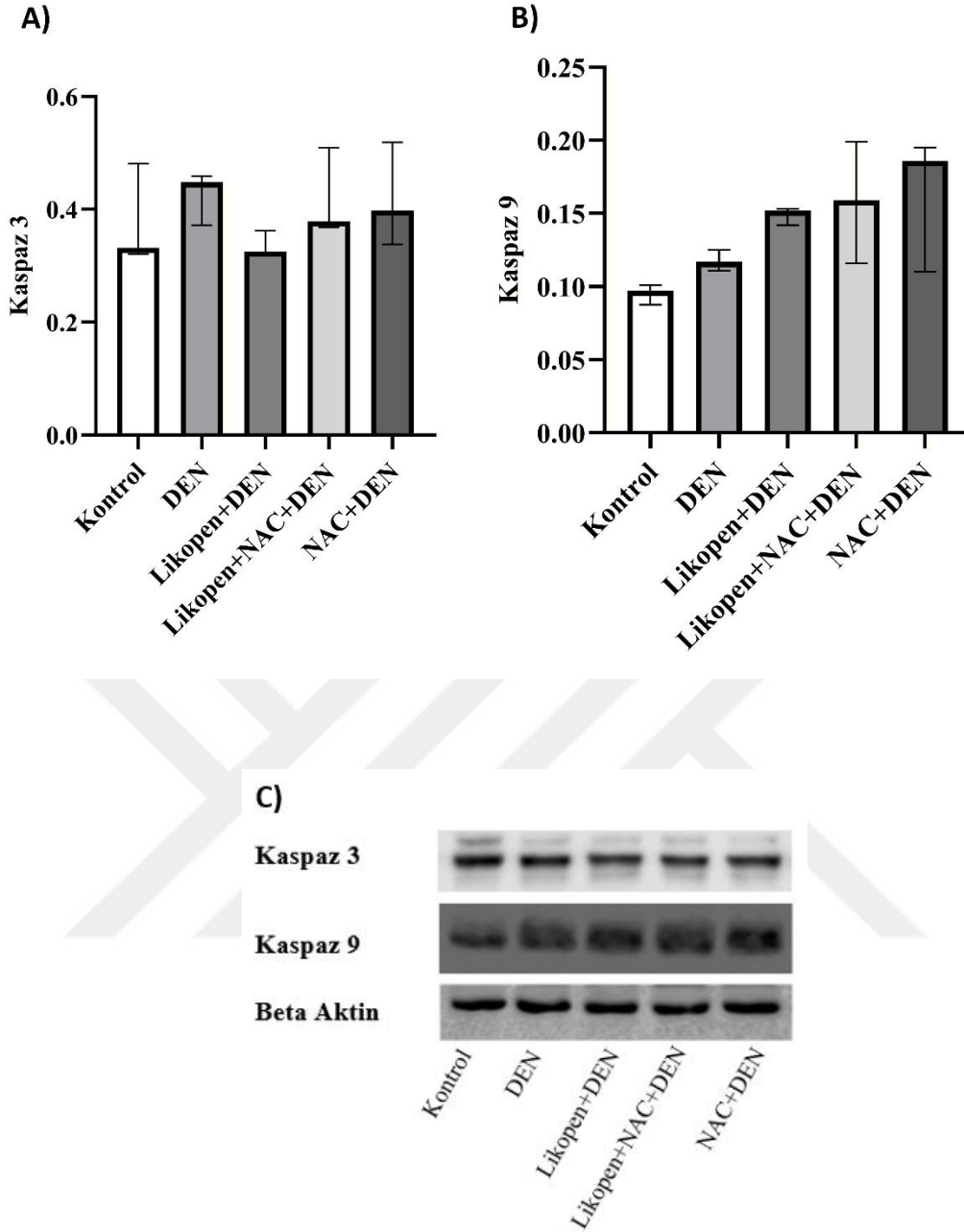
A: TGF-β1, B: GST-pi bant yoğunluklarının, aynı örneğe ait β-aktin bant yoğunluklarına oranlanarak protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ve C: TGF-β1 ve GST-pi'nin western blot bantları.

Şekil 4.9. Western blot ile analiz edilen TGF-β1 ve GST-pi düzeylerinin karşılaştırılması.



A: Bax, B: Bcl-2 bant yoğunluklarının, aynı örneğe ait β -aktin bant yoğunluklarına oranlanarak protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ve C: Bax ve Bcl-2'nin western blot bantları.

Şekil 4.10. Western blot ile analiz edilen Bax ve Bcl-2 düzeylerinin karşılaştırılması



A: Kaspaz-3, B: Kaspaz-9 bant yoğunluklarının, aynı örneğe ait β -aktin bant yoğunluklarına oranlanarak protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ve C: Kaspaz-3 ve Kaspaz-9'un western blot bantları.

Şekil 4.11. Western blot ile analiz edilen Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 düzeylerinin karşılaştırılması.

Gruplar arası karşılaştırma Kruskal-Wallis H teti ile yapıldı, eğer Kruskal-Wallis testi pozitif ise ($p < 0.05$) Conover (1999)'e göre alt grupların karşılaştırılması MedCalc istatistik programı ile yapıldı, veriler median (25-75 percentile) olarak verildi. Her bir satırda gruplarda farklı olan harfler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi ($p < 0.05$).

4.4. Analizi Yapılan Biyokimyasal Parametrelerin Sonuçları

Çalışma gruplarının karaciğer dokusunda analizi yapılan MDA, GSH, SOD, CAT, GSH-Px, IL-6, Nrf2, GST, NO, Hidroksiprolin, Protein karbonil, TAS ve TOS parametrelerinin sonuçları ve grup karşılaştırmaları Tablo 4.3 ve Şekil 4.12; 4.13; 4.14’te verildi.



Tablo 4.3. Karaciğer dokusunda analizi yapılan biyokimyasal parametrelerin sonuçları

	Kontrol (n=8)	DEN (n=12)	Likopen+DEN (n=11)	Likopen+NAC+DEN (n=12)	NAC+DEN (n=12)	p
	Medyan- (IQR)	Medyan- (IQR)	Medyan-(IQR)	Medyan- (IQR)	Medyan- (IQR)	
MDA (nmol/g yaş doku)	98.22 (10.71)	95.88 (4.14)	96.56 (14.28)	93.93 (5.44)	96.12 (7.48)	0.578
GSH (nmol/g yaş doku)	172.97 (64.1) ^{AB}	164.83 (18.32) ^A	187.22 (61.05) ^B	183.15 (69.19) ^B	185.19 (38.66) ^B	0.010
SOD (U/mg protein)	0.93 (0.25) ^A	1.06 (0.64) ^B	1.21 (0.28) ^B	1.27 (0.25) ^B	1.26 (0.14) ^B	0.022
CAT (K/mg protein)	6 (0.75) ^A	7.47 (1.6) ^B	7.39 (1.43) ^B	4.36 (0.93) ^A	8.18 (2.02) ^B	<0.001
GSH-Px (U/mg protein)	10.88 (36.04)	10.64 (29.08)	36.2 (34.89)	24.2 (43.63)	29.52 (54.34)	0.352
IL-6 (pg/mL)	935.18 (46.71) ^A	956.77 (99.53) ^A	903.31 (80.87) ^B	883.88 (36.93) ^B	874.89 (55.67) ^B	0.003
Nrf2 (pg/mL)	727.04 (158.49) ^A	754.52 (35.05) ^A	771.41 (106.57) ^A	723.4 (91.94) ^A	640.05 (46.29) ^B	<0.001
GST (U/mg protein)	1.27 (0.32) ^A	1.38 (0.18) ^B	1.62 (0.24) ^C	1.27 (0.16) ^A	1.46 (0.37) ^B	<0.001
NO (mikromol/L)	1077.35 (51.45)	1061.19 (29.88)	1077.81 (15.87)	1072.96 (14.33)	1063.99 (28.20)	0.726
Hidroksiprolin (mg/ml)	237.31 (54.67) ^A	223.13 (75.74) ^{AB}	257.31 (77.27) ^{AB}	277.3 (30.98) ^{BC}	301.18 (68.81) ^C	0.008
PC (nmol/mg protein)	6.68 (1.13) ^{AC}	9.49 (2.5) ^B	7.98 (5.02) ^{AB}	6 (1.71) ^C	5.7 (1.6) ^C	0.001
TAS (1mmol/L)	9.99 (0.80)	9.68 (1.45)	10.51 (1.61)	10.22 (1.57)	10.63 (2.39)	0.411
TOS (umol/L)	81.87 (23.39)	87.72 (13.59)	80.7 (18.71)	72.51 (32.16)	82.75 (20.32)	0.464

Değişkenler medyan (çeyreklikler arası genişlik, IQR)' şeklinde özetlendi.

^{A, B, C,} Aynı harfi içermeyen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır.

Analiz sonuçlarına göre:

GSH düzeyi; Kontrol, DEN, Likopen+DEN, Likopen+NAC+DEN ve NAC+DEN grupları arasında anlamlı bir fark göstermezken, sadece DEN uygulanan gruba kıyasla Likopen+NAC+DEN ve NAC+DEN gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. DEN grubuna kıyasla Likopen+DEN, Likopen+NAC+DEN ve NAC+DEN grupları istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi (Şekil 4.12) ($p<0.05$).

SOD aktivite düzeyi; Kontrol grubuna kıyasla DEN uygulanan tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi (Şekil 4.12) ($p<0.05$).

CAT aktivite düzeyi; Kontrol ve Likopen+NAC+DEN gruplarına kıyasla DEN, Likopen+DEN ve NAC+DEN gruplarında anlamlı derecede yüksek çıktı (Şekil 4.12) ($p<0.05$).

IL-6 düzeyi; Kontrol ve DEN grupları arasında anlamlı bir fark göstermezken, Likopen ve/veya NAC uygulaması IL-6 düzeyini anlamlı derecede düşürdü (Şekil 4.13) ($p<0.05$).

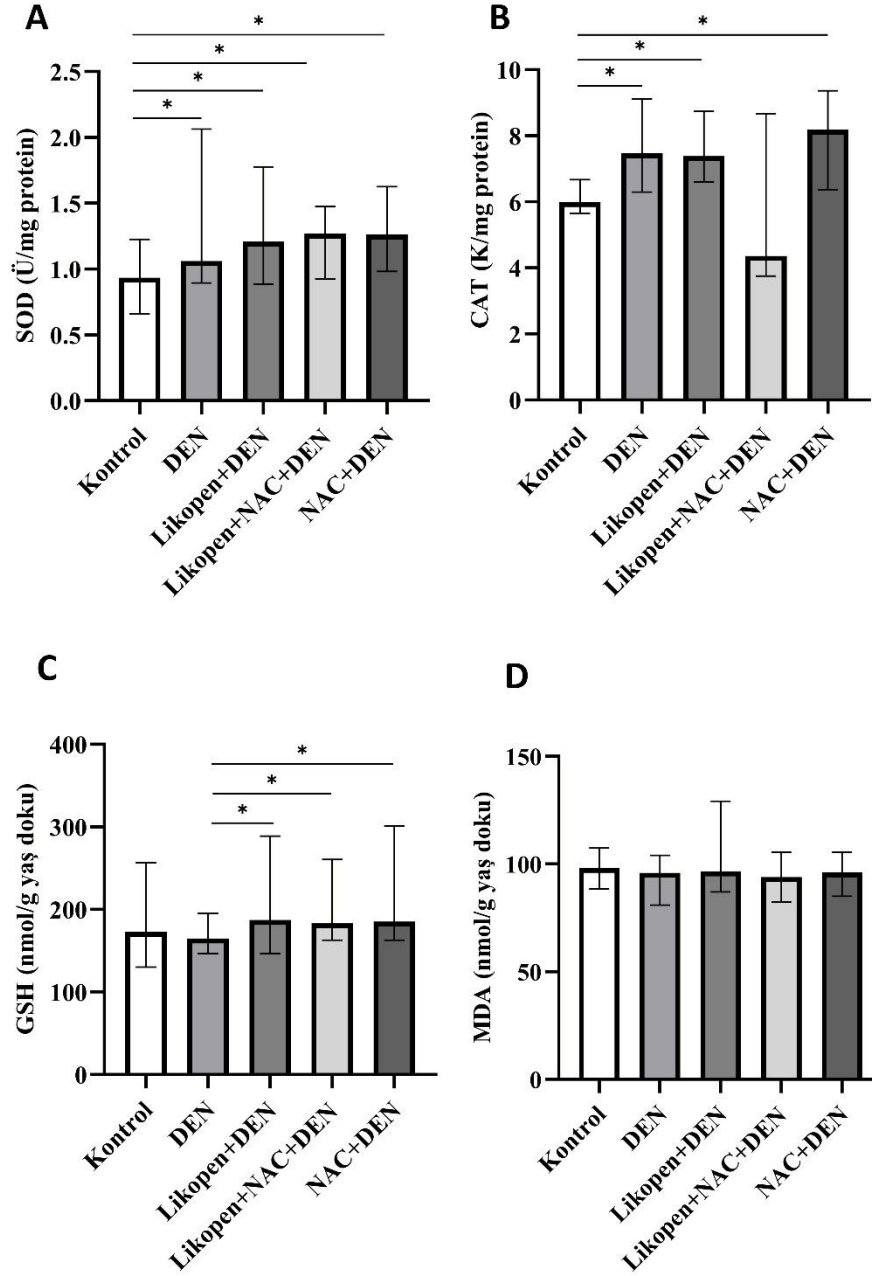
Nrf2 düzeyi; tüm gruplara kıyasla NAC+DEN grubunda anlamlı derecede düşük bulundu (Şekil 4.13) ($p<0.05$).

GST düzeyi; Kontrol ve NAC+DEN grupları DEN, Likopen+DEN ve NAC+DEN gruplarına göre istatistiki olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.05$). Likopen+DEN grubu DEN ve NAC+DEN grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 4.13) ($p<0.05$).

Hidroksiprolin düzeyi; Kontrol, DEN ve Likopen+DEN gruplarında anlamlı bir fark göstermezken, NAC uygulaması Hidroksiprolin düzeyini bu gruplara göre anlamlı derecede yükseltti ($p<0.05$). Likopen+NAC uygulaması ise hidroksiprolin düzeyini kontrole göre anlamlı derecede yükseltti (Şekil 4.14).

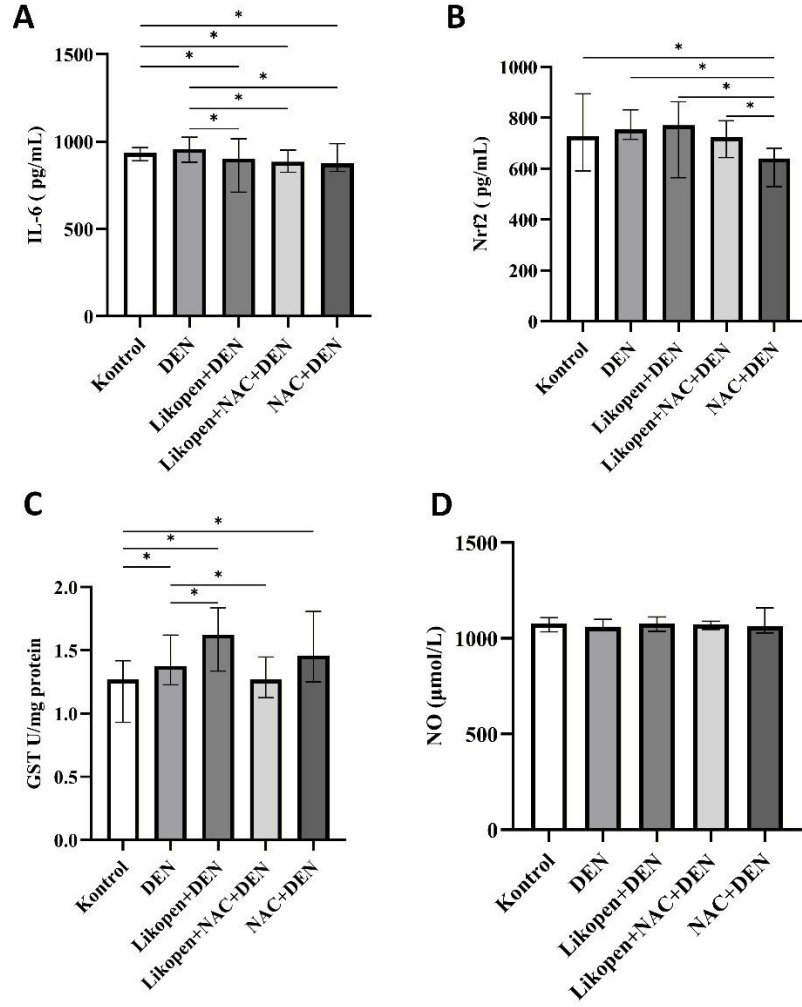
PC düzeyi; Kontrol ile Likopen+DEN grupları arasında farklılık göstermezken, DEN grubunda Kontrol, Likopen+NAC+DEN ve NAC+DEN gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). NAC uygulama gruplarına kıyasla Likopen+DEN grubu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 4.14) ($p<0.05$).

Tüm gruplarda MDA (Şekil 4.12), GSH-Px, NO (Şekil 4.13), TAS (Şekil 4.14) ve TOS (Şekil 4.14) bulguları arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).



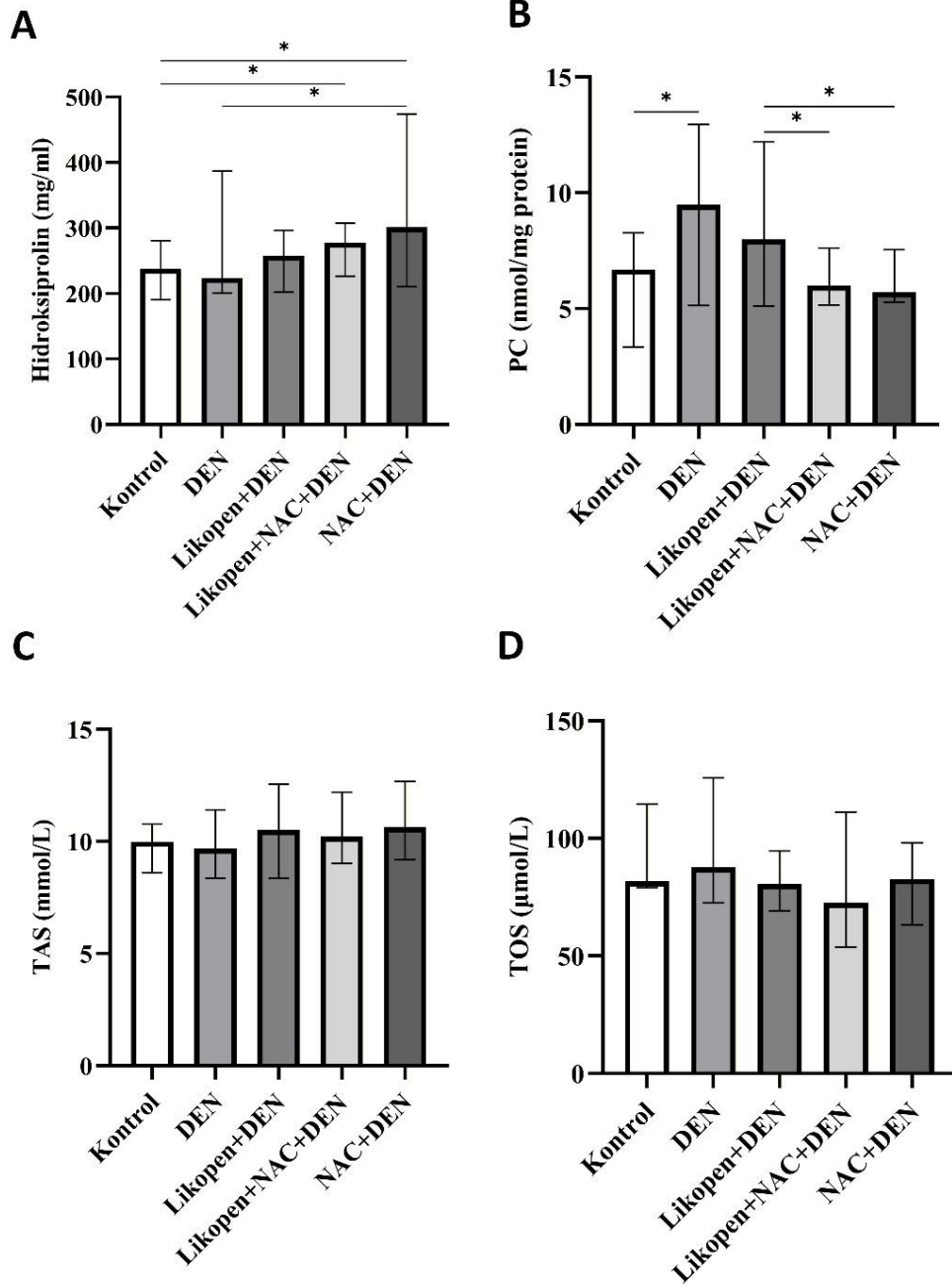
A: SOD, B: Katalaz, C: GSH, D: MDA

Şekil 4.12. Karaciğer dokusunda analizi yapılan SOD, CAT, GSH ve MDA düzeylerinin karşılaştırılması



A: İnterlökin-6, B: Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2, C: Glutasyon S-transferaz, D: Nitrik Oksit

Şekil 4.13. Karaciğer dokusunda analizi yapılan IL-6, Nrf2, GST ve NO düzeylerinin karşılaştırılması



A: Hidroksiprolin, B: Protein karbonil, C: Total antioksidan kapasitesi, D: Total oksidan kapasite

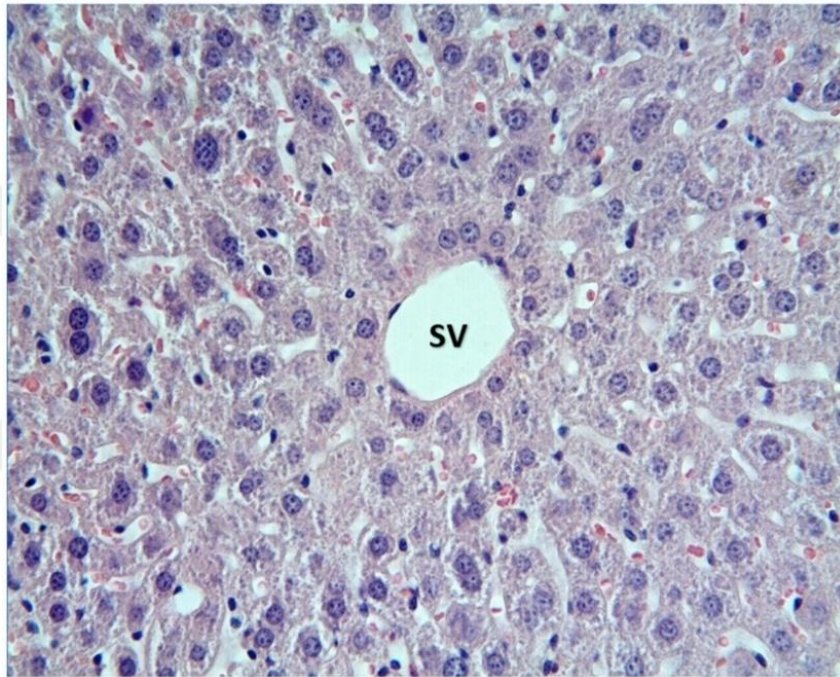
Şekil 4.14. Karaciğer dokusunda analizi yapılan hidroksiprolin, protein karbonil, TAS ve TOS düzeylerinin karşılaştırılması

Sayısal verilerin dağılımı ortanca (çeyreklikler arası genişlik) ile sunuldu. İki denetimden çok bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi ve sonrasında Conover ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. Tablolarda ikili karşılaştırma sonuçları APA (American Psychological Association) stiline göre harflendirilmiş üst indisler ile gösterildi. Aynı üst indise sahip olmayan gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tüm testlerde iki-yönlü anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

4.5. Histolojik Bulgular

4.5.1. Histopatolojik Değerlendirme ile İlgili Bulgular

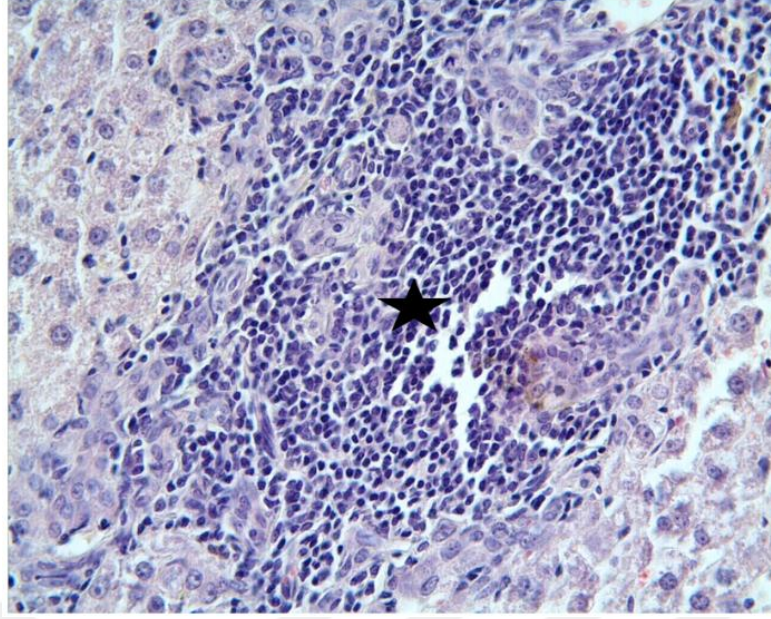
Kontrol grubu: Hematoksilin-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde karaciğerin; klasik altıgen yapıda, merkezinde santral ven ve köşelerinde portal alanların yer aldığı lobüllerden oluştuğu gözlemlendi. Santral venden lobülün periferine doğru ışınal olarak uzanan hepatosit kordonları ve bu kordonlar arasında sinüzoidal tipde kapillerlerin olduğu izlendi (Şekil 4.15). Kontrol grubu karaciğerinin histopatolojik görüntüsü normaldi.



SV: santral ven, H-EX400

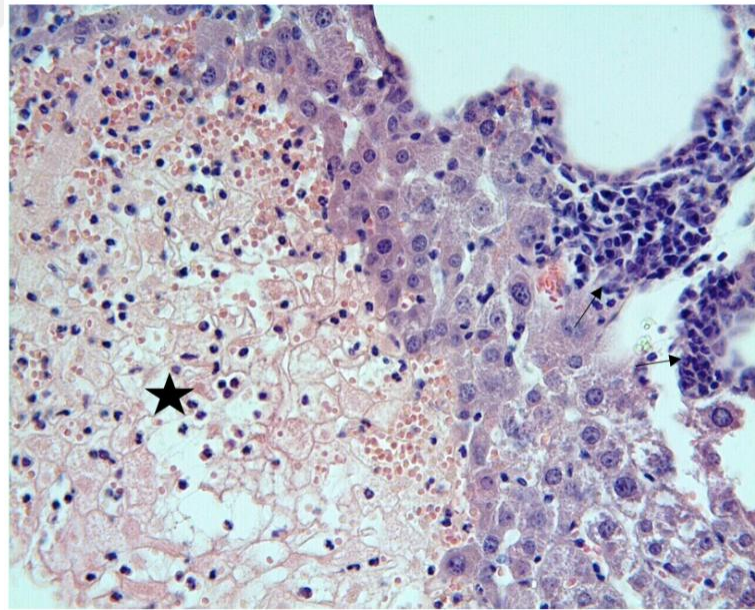
Şekil 4.15. Kontrol grubu karaciğerinin histolojik görünümü

DEN grubu: Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde, parankim içerisinde normal histolojik yapıdan farklı olarak izlenen, sınırları düzensiz geniş inflamatuvar alanlar görüldü (Şekil 4.16). Ayrıca parankima içerisinde geniş nekroze alanlar tespit edildi (Şekil 4.17).



Sınırları düzensiz geniş inflamatuvar hücre alanlarının görünümü (oklar). H-EX400.

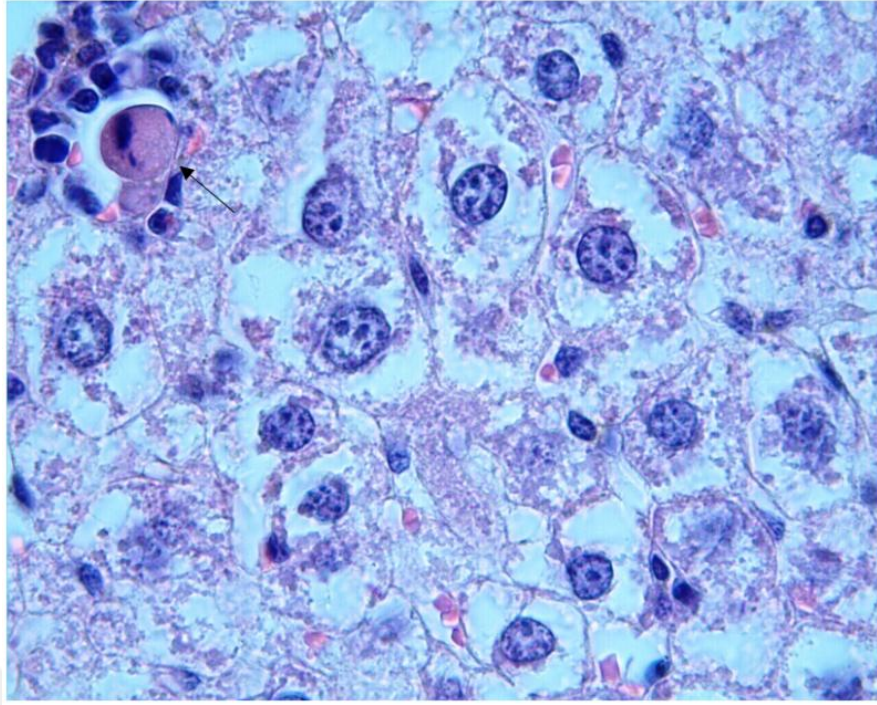
Şekil 4.16. DEN grubu karaciğerinin histolojik görünümü (inflamatuvar alanlar)



Nekroze (yıldız) ve inflamatuvar (oklar) alanların görünümü. H-EX400.

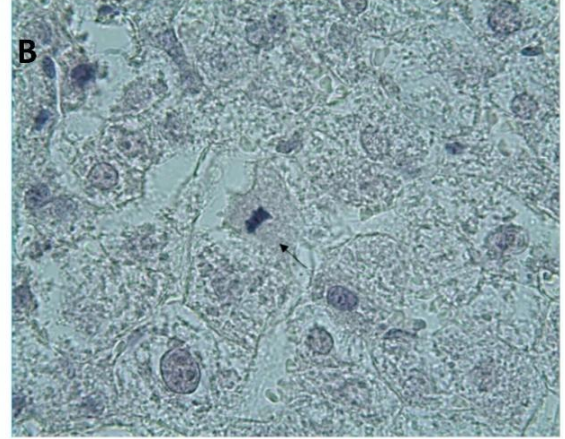
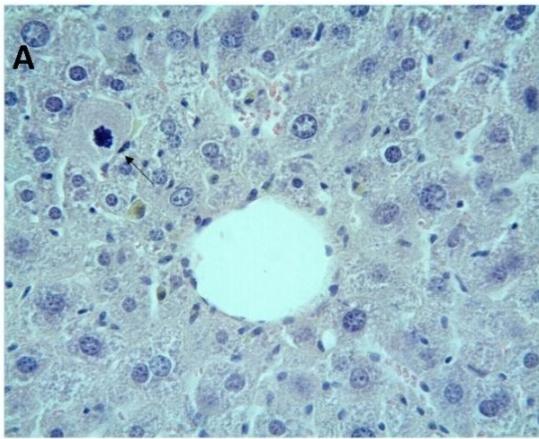
Şekil 4.17. DEN grubunun karaciğer histolojik görünümü (Nekroze alanlar)

Dikkat çekici diğer bir özellik hepatositlerdeki nükleer değişikliklerdi. Bazı alanlarda apoptotik (Şekil 4.18) ve mitotik arreste uğramış hücrelere rastlandı (Şekil 4.19).



Apoptotik hücre görünümü (ok). H-EX1000

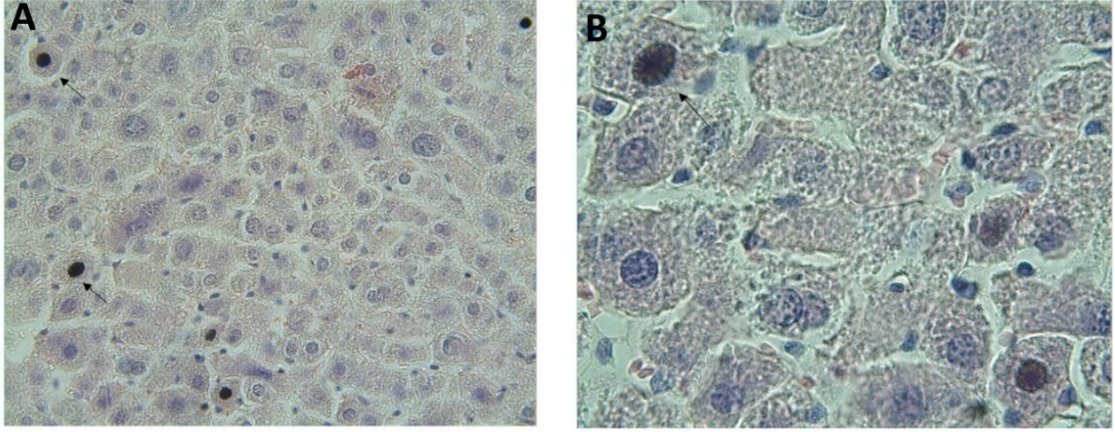
Şekil 4.18. DEN grubu karaciğerinde apoptotik hücre görünümü



Mitotik arreste uğramış hücre görünümü (oklar). A: H-EX400, B: H-EX1000

Şekil 4.19. DEN grubu karaciğerinde mitotik arreste uğramış hücre görünümü

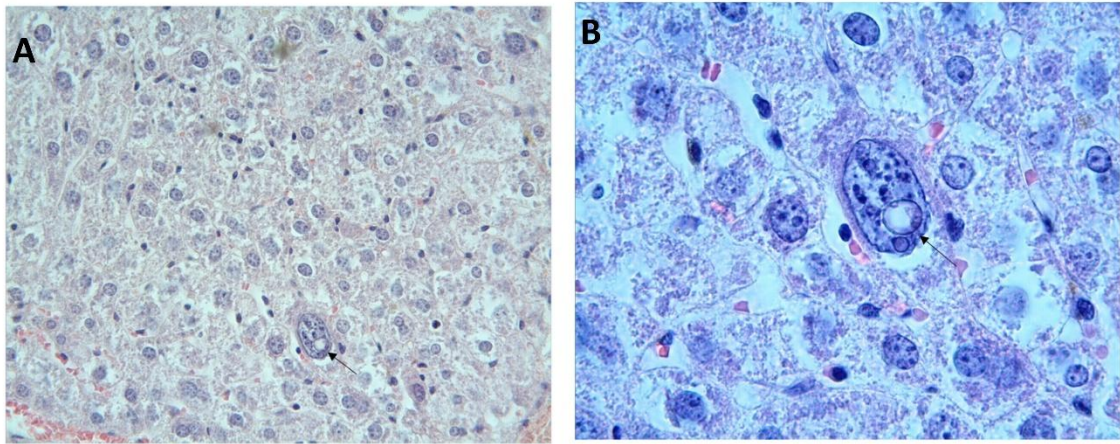
Apoptotik hücreler, etraflarındaki hücrelerden belirgin bir halo ile ayrılan eozinofilik sitoplazması ve piknotik nükleusu ile ayırt edildi. Yine bazı hücrelerin nükleusları hiperkromatik olarak izlendi (Şekil 4.20)



Hiperkromatik nükleuslu hücrelerin görünümü (oklar). A: H-EX400, B: H-EX1000

Şekil 4.20. DEN grubu karaciğerinde hiperkromatik nükleuslu hücre görünümü

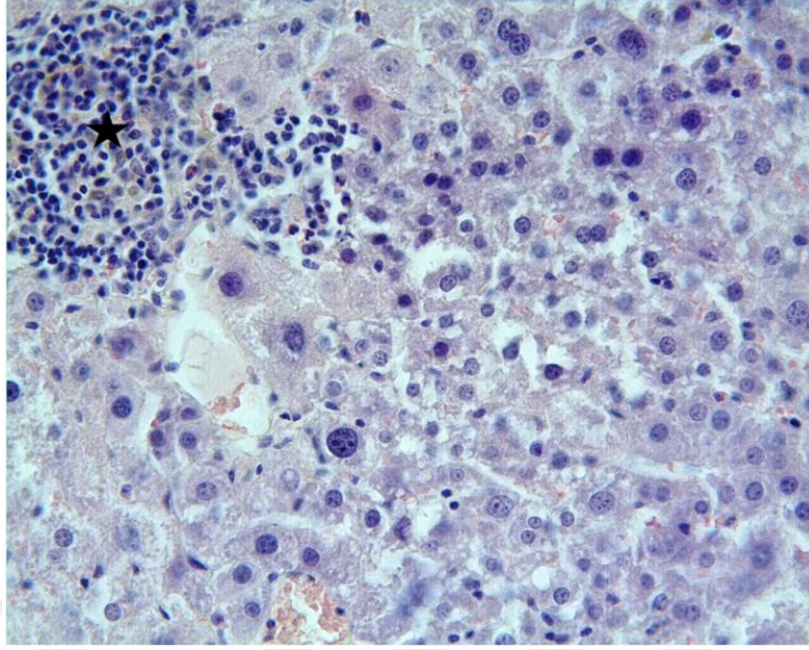
Ayrıca bazı hepatositlerin nükleuslarında büyüme ve vakuolizasyonlar tespit edildi (Şekil 4.21).



Nükleer büyüme ve vakuolizasyon (ok). A: H-EX400, B: H-EX1000

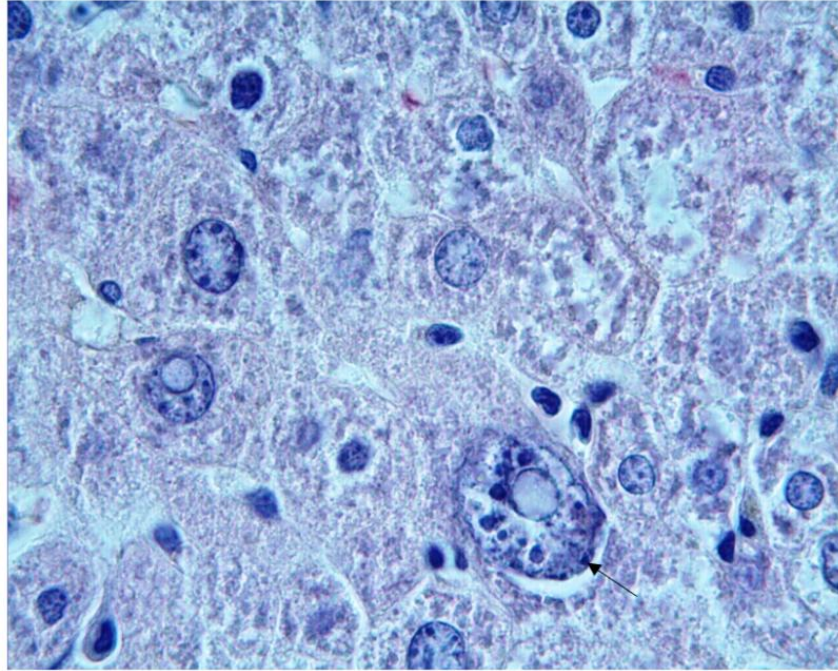
Şekil 4.21. DEN grubu karaciğerinde nükleer büyüme ve vakuolizasyon

Likopen+DEN grubu: Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde, parankim içerisinde sınırları küçülmüş düzensiz inflamatuvar alanlar görülmeye devam ediyordu (Şekil 4.22). Yine bazı hepatositlerde nükleer değişikliklere rastlandı (Şekil 4.23).



Sınırları düzensiz inflamatuvar hücre alanlarının görünümü (yıldız). H-EX400.

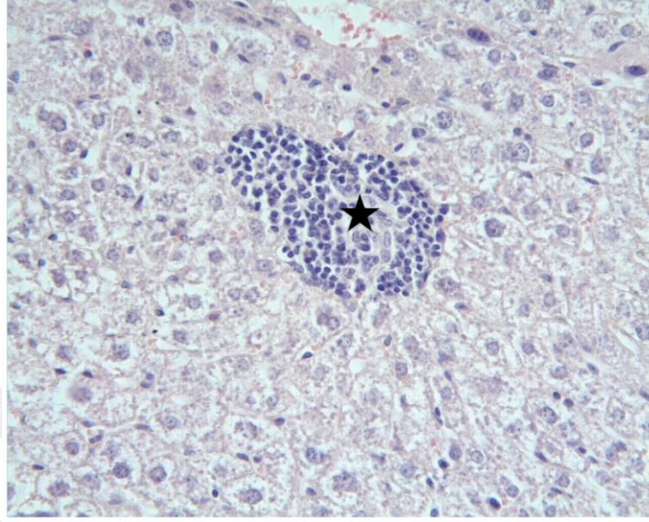
Şekil 4.22. Likopen+DEN grubunun karaciğer histolojik görünümü (İnflamatuvar alanlar)



Nükleer büyüme ve vakuolizasyon (ok). H-EX1000

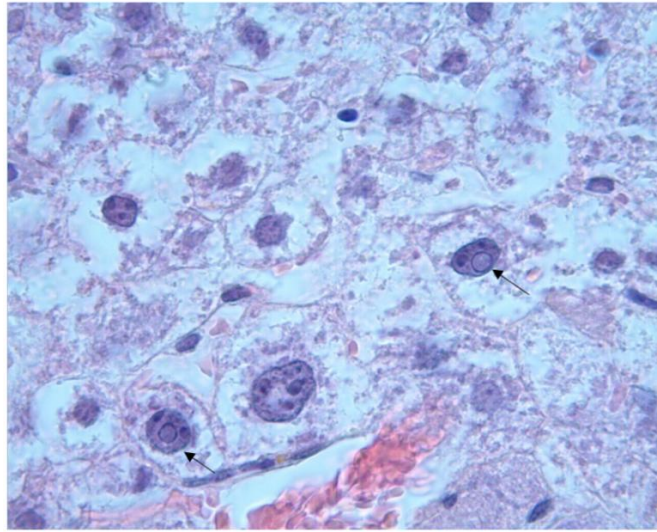
Şekil 4.23. Likopen+DEN grubu karaciğerinde nükleer büyüme ve vakuolizasyon

Likopen+NAC+DEN grubu: Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde, Likopen ve NAC gruplarına benzer şekilde parankim içerisinde sınırları küçülmüş düzensiz inflamatuvar alanlar (Şekil 4.24) ve bazı hepatositlerdeki nükleer değişiklikler (Şekil 4.25) görülmeye devam ediyordu.



Sınırları düzensiz inflamatuvar hücre alanlarının görünümü (oklar). H-EX400.

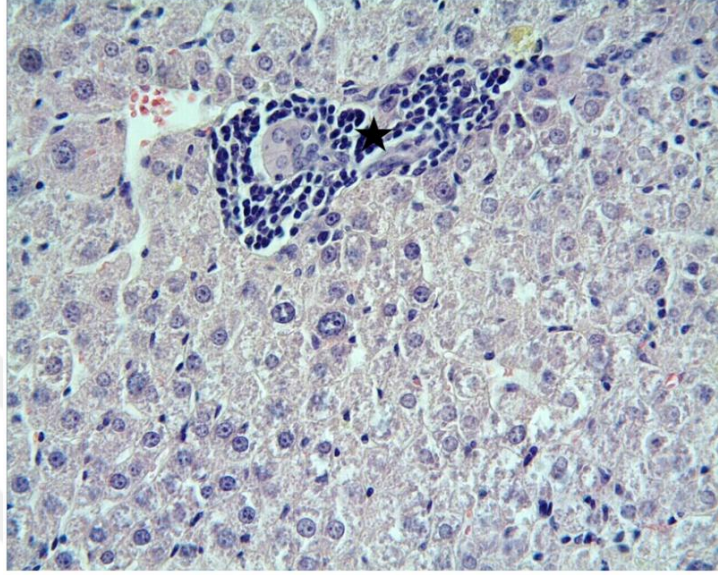
Şekil 4.24. Likopen+NAC+DEN grubunun karaciğer histolojik görünümü (İnflamatuvar alanlar)



Nükleer büyüme ve vakuolizasyon (ok). H-EX1000.

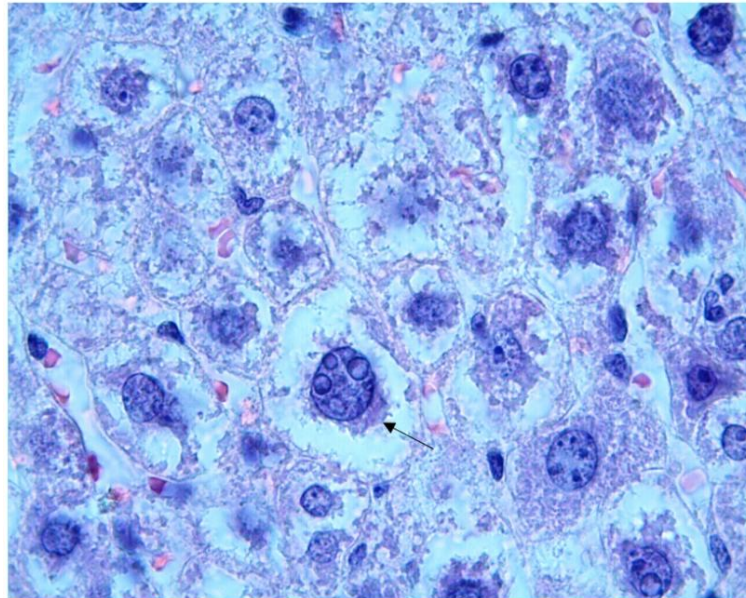
Şekil 4.245. Likopen+NAC+DEN grubu karaciğerinde nükleer büyüme ve vakuolizasyon

NAC+DEN grubu: Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde, Likopen+DEN grubuna benzer şekilde parankim içerisinde sınırları küçülmüş düzensiz inflamatuvar alanlar (Şekil 4.26) ve bazı hepatositlerdeki nükleer değişiklikler (Şekil 4.27) görülmeye devam ediyordu.



Sınırları düzensiz inflamatuvar hücre alanlarının görünümü (oklar). H-EX400.

Şekil 4.256. NAC+DEN grubunun karaciğer histolojik görünümü (İnflamatuvar alanlar)

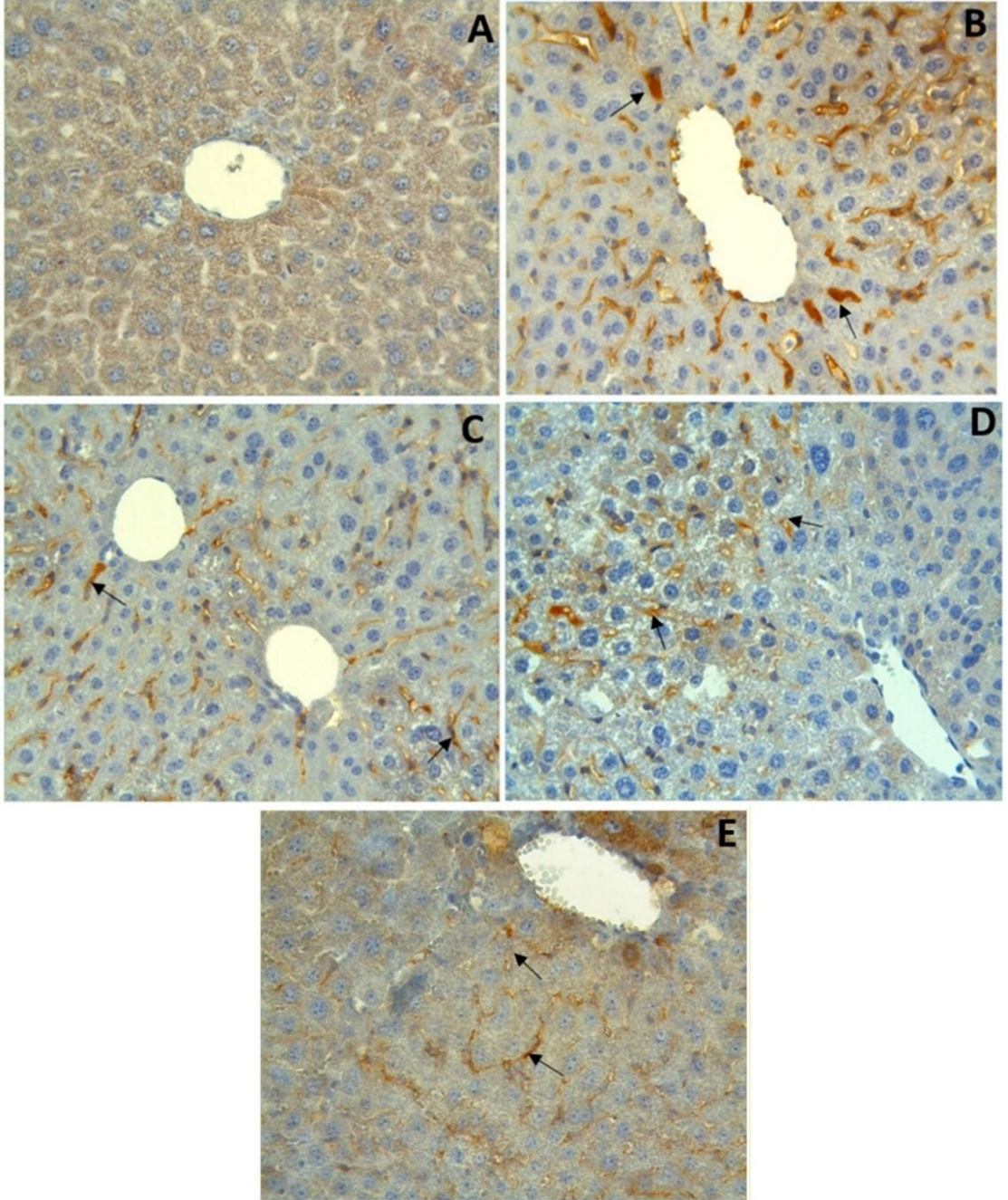


Nükleer büyüme ve vakuolizasyon (ok). H-EX1000

Şekil 4.267. NAC+DEN grubu karaciğerinde nükleer büyüme ve vakuolizasyon

4.5.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme ile İlgili Bulgular

GPC-3 boyama metodu uygulanmış kesitlerde kontrol grubunda pozitif hücrelere rastlanmadı. DEN grubunda GPC-3 pozitifliğinin kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Diğer yandan tedavi gruplarında GPC-3 pozitifliğinin DEN grubuna göre anlamlı derecede azaldığı fakat gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edildi (Şekil 4.28).



A: Kontrol, B: DEN, C: Likopen+DEN, D: NAC+DEN, E: Likopen+NAC+DEN, Glipikan-3 (+) alanların görünümü (oklar). Glipikan-3X400

Şekil 4.27. Glipikan-3'ün immünohistokimyasal değerlendirmesi

Tablo 4.4. DEN ile oluşturulan karaciğer hasarında inflamasyon, nekroz, nükleer değişiklikler ve Glipikan-3 immünreaktivite bulguları

Gruplar	İnflamatuvar alan	Nekrotik alan	Nükleer değişiklikler	Glipikan-3 (+)
Kontrol	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
DEN	0 (0-3) ^a	0 (0-2) ^a	0 (0-2) ^a	0 (0-3) ^a
Likopen+DEN	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b
Likopen+NAC+DEN	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b
NAC+DEN	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b

DEN: Dietilnitrozamin, NAC: N-asetilsistein

^aKontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.0001)

^b DEN grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.0001)

Veriler medyan (Minimum-Maksimum) olarak ifade edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Karaciğer doku mimarisi; alkol tüketimi, kronik viral hepatitler, otoimmün hastalıklar, paraziter enfeksiyonlar, metabolik bozukluklar, lipopolisakkarit maruziyeti ve çeşitli ilaçlar gibi çok sayıda etiyolojik faktöre bağlı gelişen hepatosit kaybı ve bunu izleyen ekstraselüler matriks birikimi sonucunda bozulmaktadır. Bu süreçte ortaya çıkan karaciğer fibrozu, kronik karaciğer hasarına karşı gelişen ve başlangıçta geri dönüşümlü olan bir yara iyileşme yanıtı olarak tanımlanmaktadır. Ancak fibrotik yanıtın kontrol altına alınamaması durumunda süreç ilerleyerek siroz gelişimine ve nihayetinde HCC oluşumuna zemin hazırlamaktadır (14). HCC, küresel ölçekte kanserler arasında görülme sıklığı açısından altıncı, kanserle ilişkili ölümler açısından ise üçüncü sırada yer almakta olup önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır (1).

Epidemiyolojik kanıtlar bazı bölgelerde tümöre karşı koruyucu bir rolün varlığını göstermiştir (185). Örneğin Fang ve ark.'nın yaptığı çalışmada prostat kanseri hücre hatlarının soya izoflavonlarına maruz kaldıktan sonra prostat kanseri hücrelerinde O⁶-metilguanin-DNA metiltransferazın (MGMT) hipermetilasyonunun tersine döndüğünü tespit etmiştir (185). Bazı çalışmalar da meyve, sebze ve karotenoidler açısından zengin bir diyet ile farklı kanser türlerinin görülme sıklığı arasında ters bir korelasyon olduğunu göstermiştir (169). Benzer şekilde literatürde, gıdalarda bulunan bazı aktif bileşenlerin inflamasyon, apoptoz, hücre döngüsü kontrolü, hormonal denge, transkripsiyonel aktivite, anjiyogenez, kanser metabolizması ve metastaz dahil olmak üzere birden fazla kanserojen süreci etkileyebildiği bildirilmektedir (169). Proflakside amaç doğal veya sentetik bileşikler kullanarak karsinogenezin erken aşamasına müdahale etmektir (186). Bu bağlamda domates gibi kırmızı meyve ve sebzelerde yüksek yoğunlukta bulunan ve bir karotenoid olan likopenin yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu, apoptozu indükleyebildiği ve tümör büyümesini engellediği klinik, hücre kültürü ve hayvan modelleri üzerindeki çalışmalarla gösterilmiştir (169). Çalışmalar, likopenin çeşitli tümör oluşumu modellerinde hücre çoğalması, hücre farklılaşması, hücre sinyali, apoptoz vb. gibi hücresel süreçleri modüle edebileceğini göstermektedir (187). Kanser önlemedeki temel zorluklardan biri, yeni moleküler bulguların klinik uygulamaya entegre edilmesidir. Bu nedenle, likopenin antineoplastik aktivitesinin altında yatan mekanizmaların anlaşılması önemlidir (169).

Karaciğer kanseri, 2018 verilerine göre dünya genelinde en sık görülen kanserler arasında 6., kansere bağlı ölümler arasında ise 4. sırada yer alırken; GLOBOCAN 2022

verilerine göre insidans açısından yerini korumakla birlikte mortalite açısından 3. sıraya yükselmiştir. Bu durum, karaciğer kanserinin küresel ölçekte önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam ettiğini göstermektedir (1,26). HCC genellikle semptomların geç ortaya çıkması nedeniyle ileri evrede tanı almakta; tedavideki gelişmelere rağmen kesin küratif bir yaklaşımın bulunmaması ve kemoterapötik ajanlara karşı gelişen ilaç direnci yeni ve çok yönlü tedavi stratejilerine olan ihtiyacı artırmaktadır (4). Farklı etiyolojilere bağlı olarak gelişen karaciğer fibrozisi ve sirozda ortak moleküler mekanizmaların bulunduğu ve bu süreçlerin deneysel DEN/TAA ile indüklenen HCC modellerinde insan hastalığını büyük ölçüde yansıttığı gösterilmiştir (53). DEN bir N-nitrozo bileşiği olup, bu bileşikler güçlü mutajenik ve karsinojenik özellik göstermektedir. N-nitrozo bileşikler HCC modelleme etkeni olarak kalmayıp bu bileşiklere insanlar ekzojen maruz kalmanın yanı sıra toplam maruziyetin %45–75'inin in vivo oluşumdan kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir. Ancak değişen diyet alışkanlıklarının bu maruziyet düzeyleri ve klinik sonuçları üzerindeki etkileri henüz net değildir (188). N-nitrozo bileşiklerinin kararsız ve elektrofilik metabolitlerinin DNA ile reaksiyona girerek mutasyon birikimine yol açtığı; DNA onarım mekanizmalarının ise alkil gruplarının proteinlerdeki sistein alıcı bölgelerine aktarılması yoluyla gerçekleştiği bildirilmektedir (137). Bu bağlamda, halihazırda kullanılan ve kanserde çok hedefli etkiler gösterdiği bildirilen likopen ile glutatyon düzeylerini artırması ve DNA tamirinde görev alan aktif tiyol gruplu proteinlerin devamlılığına katkı sağlaması beklenen NAC'ın birlikte kullanımının HCC üzerindeki profilaktik potansiyeli değerlendirilecektir. Profilaktik yaklaşımlarda amaç, doğal veya sentetik bileşiklerle karsinogenezin erken evrelerine müdahale ederek tümör gelişimini baskılamaktır; ancak bu bileşiklerin HCC bağlamında hangi moleküler yollar üzerinden etkili olduğu ve uzun dönem klinik yansımalarına ilişkin veriler sınırlıdır (186). Bu nedenle çalışmamızda, DEN/TAA ile indüklenen HCC modelinde likopen ve NAC'ın birlikte uygulanmasının hepatokarsinogenez sürecinde oksidatif stres, inflamatuvar sinyal yolları ve tümör progresyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Literatürde, DEN ile birlikte farklı kimyasalların kullanıldığı çoklu organ karsinogenez modelinde, karsinojenle eş zamanlı likopen uygulanan grupta rölatif karaciğer ağırlıklarının yalnızca karsinojen verilen kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (189). Başka bir çalışmada fare vücut ağırlığının DEN uygulama gruplarında başlangıçta kademeli olarak arttığı, son enjeksiyonun ardından ise zamanla azaldığı bildirilmiştir (143). Çalışmamız, canlı ağırlık açısından değerlendirildiğinde, NAC+DEN grubunda farelerin vücut ağırlığının, Kontrol, DEN ve Likopen+DEN gruplarına kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Bu durum, NAC

uygulamasının sistemik metabolizma, iştah, enerji dengesi veya karsinojen maruziyetine verilen fizyolojik yanıt üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Kimyasal HCC modelinde karaciğer ağırlığındaki artış HCC'nin karakteristik özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda da DEN ve DEN+TAA uygulanan gruplarda karaciğer ağırlıklarının belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir (143). Nitekim çalışmamızda da karaciğer ağırlığı değerlendirildiğinde Likopen+DEN grubunun Kontrol, DEN ve NAC+DEN gruplarına göre anlamlı derecede daha ağır karaciğerlere sahip olduğu saptanmıştır. Bu bulgu, deneysel HCC modelinde tümöral doku artışının gerçekleştiğini ve modelin başarıyla oluşturulduğunu göstermekle beraber özellikle Likopen+DEN grubunda artmış karaciğer ağırlığı inflamasyon, rejeneratif yanıt veya tümörle ilişkili doku yeniden yapılanmasının baskın hale gelmiş olabileceğine işaret etmektedir. Rölatif karaciğer ağırlığı değerlendirildiğinde ise, likopen ve/veya NAC uygulanan tüm gruplarda, Kontrol ve yalnızca DEN uygulanan gruplara kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu bulgu, antioksidan uygulamalarının karaciğer ağırlığı üzerindeki etkilerinin, kullanılan karsinogenez modeli, uygulama süresi ve dozu, eşlik eden doku yanıtlarına bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini düşündürmektedir. Nitekim Kim ve arkadaşlarının çoklu organ karsinogenez modelinde, karsinojen ile birlikte 50 ppm likopen verilen erkek farelerde akciğer karsinomu insidansının, yalnızca karsinojen verilen ya da 25 ppm likopen uygulanan gruplara kıyasla anlamlı derecede azaldığı bildirilmiştir (189). . Bu durum, likopenin doza ve kullanılan deneysel modele bağlı olarak farklı biyolojik etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir. Antioksidanlar, kanserden korunma veya kanserin olumsuz etkilerinin azaltılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (190). Ancak, antioksidan takviyelerinin kanser tedavisindeki faydaları tartışmalı bir konu olmuştur. Birçok çalışma ekzojen antioksidanların HCC oluşumunu ve tümör büyümesini desteklediğini ortaya koymuştur (191).

Karaciğer kanseri uzun süreli devam eden inflamasyon-hepatosit rejenerasyon süreci sırasında meydana gelen patofizyolojik değişiklikler sonucu gelişir (39). IL-6, tümör mikroçevresinde yüksek seviyelerde bulunan bir proinflamatuvar sitokindir. Apoptozu, sağkalımı, çoğalmayı, VEGF aracılı anjiyogenezi, invazivliği ve metastazı düzenleyebileceği belirtilmektedir. IL-6 onarıcı yolları indükleyerek kanserli hücrelerde DNA hasar ve oksidatif stres koruması sağlamanın (192,193) yanında, bilimsel kanıtlar, proinflamatuvar sitokinlerin tümör hücrelerinin karşılaştığı hipoksi tarafından da indüklenebildiklerini ve kanser ilerlemesinde rol oynayabileceklerini belirtmektedir (194). IL-6, baskın olarak Kupffer hücreleri tarafından üretilir ve DEN kaynaklı

hepatokarsinogenezde önemli olabilecek telafi edici rejenerasyonu uyarır. IL-6'nın hepatoprotektif bir sitokin olduğu düşünülürken (195), bunun aksi olarak yüksek IL-6 seviyelerinin karaciğer hasarına neden olduğu da gösterilmiştir (196). Naugler ve ark. tarafından kullanılan deneysel modelde, DEN ile tedavi edilen IL-6 nakavt farelerin daha az hepatoselüler hasara uğradığı ve erkeklerde cinsiyet eşitsizliğinin ortadan kalkmasıyla HCC insidansının azaldığı görülmüştür. Dolayısıyla IL-6'nın karaciğer hasarını artırdığı tespit edilmiştir. Erkek farelere östrojen verilmesi IL-6 üretimini azaltıp ve karaciğer hasarını hafifletirken yumurtalıkların alınması dişilerde DEN kaynaklı karaciğer hasarını artırmıştır (196). Birçok çalışma, likopenin IL-12, TNF- α , IL-1, IL-1 β , IL-6 gibi proinflatuar sitokinleri baskılayabildiğini (197) ve uyguladığı antiinflatuar özelliğin arkasındaki ana mekanizmanın proinflatuar sitokinlerin aşağı düzenlenerek inflamasyonun ilerlemesinin önlenmesi olduğunu öne sürmüştür (198). Çalışmamızda DEN grubunda IL-6 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek olması ancak anlamlı farklılık göstermemesi, buna karşılık likopen, likopen+NAC ve NAC uygulanan gruplarda IL-6 düzeylerinin anlamlı şekilde azalması, IL-6'nın hepatik hasar ve tümör mikroçevresindeki çift yönlü rolü ile uyumludur. Çalışmamızda DEN grubunda IL-6 düzeylerinin kontrol grubuyla benzer bulunması, DEN-indüklü HCC modelinde inflammatuar yanıtın kronik evreye ilerlemesiyle IL-6'nın akut faz yanıtı olmaktan çıkması ile ilişkilendirilebilir. IL-6, akut karaciğer hasarında hepatosit proliferasyonu ve rejenerasyonu destekleyen hepatoprotektif bir sitokin olarak tanımlanmakla birlikte, kronik ve süreklilik gösteren IL-6/STAT3 aktivasyonunun oksidatif stres artışı, anti-apoptotik sinyalizasyon ve hücrel proliferasyon yoluyla karaciğer hasarı ve hepatokarsinogenezi desteklediği gösterilmiştir (199). Ayrıca klinik ve deneysel çalışmalarda yüksek IL-6 düzeylerinin HCC progresyonu, kötü prognoz ve fibrotik yanıt ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (4). Çalışmamızda likopen ve/veya NAC uygulamasıyla IL-6 düzeylerinin azalması, bu antioksidanların oksidatif stres ve inflammatuar sinyal yollarını (NF- κ B/STAT3) baskılayıcı etkileriyle (199) açıklanabilir. Çalışmamızda NF- κ B P65 ve p- NF- κ B P65 düzeylerine bakılmış olup p-NF- κ B P65 düzeylerinin gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği; NF- κ B P65 düzeylerinin ise Likopen+DEN grubunda kontrol ve NAC+DEN gruplarına göre anlamlı düşüş gösterdiği gözlenmiştir. Bütün bu bilgiler ışığında bu durum iki farklı şekilde açıklanabilir.

Birinci durumda, likopen ve/veya NAC uygulanan gruplarda IL-6 düzeylerinin anlamlı olarak azalması, antioksidan tedavilerin kronik inflammatuar mikroçevreyi baskılayarak IL-6'nın zararlı etkilerini sınırladığına işaret etmektedir. Hematoksilen-

eozen boyama metodu uygulanmış kesitlerde, DEN grubunda parankim içerisinde normal histolojik yapıdan farklı olarak sınırları düzensiz geniş inflamatuvar alanlar görülürken Likopen ve/veya NAC uygulanan gruplarda sınırları küçülmüş düzensiz inflamatuvar alanlar izlenmiştir. Histolojik bu bulgu Likopen ve/veya NAC uygulamasının IL-6 düzeyini baskılayarak zararlı etkilerini bastırdığını desteklemektedir.

İkinci durumda, Likopen gruplarında IL-6 düzeyiyle beraber NF- κ B inhibisyonu da gerçekleşmiştir. Bu da inflamatuvar sinyalizasyonun baskılandığını göstermektedir. Bu bağlamda literatürde, hem kimyasal karsinogenez modellerinde hem de HBV yüzey antijeni eksprese eden transgenik farelerde, NF- κ B'nin hepatositlerde inhibe edilmesinin hasarlı hepatositlerin proliferasyonunun artmasına, buna ek olarak artmış hepatosit ölümüne karşılık telafi edici proliferasyonun artmasına ve sonuçta HCC gelişiminin hızlanmasına yol açabildiği bildirilmektedir (199,200). Dolayısıyla Likopen gruplarında gözlenen NF- κ B inhibisyonu, inflamasyonun baskılanması açısından yararlı olmakla birlikte, kronik hasar zemininde hasarlı hepatositlerin eliminasyonunu sınırlayarak tümör odaklarının artmasına (199) katkıda bulunmuş olabilir. Bu bulgu likopen alan grupların karaciğer makroskobik görüntülerinde gözlenen artmış HCC nodül sayısı ile desteklendiği düşünülebilir.

8 haftalık DEN uygulamasından sonra kontrol grubuna göre DEN grubunda IL-6 düzeyi artmıştır (201). Yine benzer şekilde DEN ile indüklenen HCC'nin klasik bir sıçan modelinde de 14-20 haftalık maruziyetten sonra fibröz gelişimi ve ardından siroz oluşumu meydana gelmiştir. Bu da insan HCC oluşumunu simüle senaryosunu doğru bir şekilde özetlemektedir (52). DEN kaynaklı karaciğer sirozu ve preneoplastik lezyonların gelişimi ile ilgili yapılan bir çalışmada sıçanlara 4., 6. ve 8. haftalarda 15 gün arayla üç kez DEN (200 mg/kg; i.p.) enjekte edilerek son DEN enjeksiyonundan 8 hafta sonra çalışma sonlandırılmıştır. DEN uygulaması preneoplastik lezyonların belirteci olan GST-pi düzeylerini artırmıştır. Bunun yanı sıra hepatik SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri ve bunların mRNA ifadeleri ile hepatik MDA, PC ve hidroksiprolin düzeyleri artmıştır (202). Bulgularımızın literatürdeki benzer hayvan modelleriyle yapılan çalışmalardan farklı olması söz konusu çalışmaların DEN maruziyetinin hepatosit proliferasyonunun kritik dönemini aşmış olması, DEN maruziyet süresinin veya çalışmanın daha kısa süreli olması, kullanılan kemirgen cinsinin farklı olması gibi sebepler nedeniyle bu çalışmaların HCC modelinin siroz-erken HCC evresinde kalmış olması olabilir.

NF- κ B, birçok hepatik hücre popülasyonunda inflamasyonun önemli bir düzenleyicisidir ve hepatositlerin, hepatik yıldız hücrelerinin ve hepatik

miyofibroblastların hayatta kalması ve karaciğer homeostazisi için gereklidir. NF- κ B'nin hepatik hasar, fibrozis gelişimi ve HCC progresyonu arasında merkezi bir moleküler bağlantı noktası oluşturduğu bildirilmektedir. (203). NF- κ B'nin aktivasyonu, tümör gelişiminin altında yatan temel mekanizmalardan biri olup; proliferasyon, hücreyel sağkalım, anjiyogenez, metastaz ve ilaç direncinde rol alan çok sayıda genin ekspresyonunu düzenlemektedir (78). Fizyolojik koşullarda NF- κ B sinyalleme hücre sağkalımını destekler, inflamatuvar ve immün yanıtları düzenler ve doku homeostazına katkı sağlar. Buna karşılık NF- κ B'nin aşırı aktivasyonu; anjiyogenez, invazyon, metastaz ve tedavi direnci gibi tümör malignitesini artıran süreçlerle ilişkilendirilmiştir (77). NF- κ B transkripsiyon faktörü HIF1 α 'nın ekspresyonunda ve aktivasyonunda düzenleyici olup, HIF1 α / VEGF/NF- κ B sinyal yolunun anjiyogenezi aktive ederek ve HCC'nin ilerlemesini teşvik ettiği bildirilmektedir (73). Tümör oluşumu, hipoksik bir mikroçevre oluşturmaktadır, bu hipoksi ortamı HIF-1 α ve NF- κ B sinyal yollarının aktive olmasına neden olmaktadır. Bu aktivasyon, VEGF-A ekspresyonunun artmasına ve sonuçta anjiyogenezin tetiklenmesine yol açmaktadır (73). NF- κ B'nin inflamatuvar yanıt ve apoptozun kontrolü ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. NF- κ B aktivasyonu, programlanmış hücre ölümünü baskılayan anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu artırırken, bu yolun önemli bir uyarıcısı olan TNF- α 'nın tek başına apoptozu zayıf bir şekilde indüklemesi, NF- κ B'nin hücrelerin hayatta kalması üzerindeki rolünü ortaya koymaktadır (204). Literatürde NF- κ B aktivasyonunun, HCC tedavisinde kullanılan sorafenibe karşı gelişen direncin oluşumunda kilit bir rol oynadığı gösterilmiştir (205). Buna paralel olarak NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonunun, HCC dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kemoterapi direncinin aşılmasına katkı sağladığı bildirilmiştir (78,206). Bununla birlikte NF- κ B iki ucu keskin bir kılıç gibi davranmaktadır. NF- κ B 'nin inhibisyonu yararlı etkiler göstermenin yanı sıra özellikle belirgin düzeyde inhibisyonu hepatosit canlılığını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Hatta hepatositlerde tam NF- κ B blokajı, karaciğer hasarında artış ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle, NF- κ B aktivitesini tamamen baskılamaktan ziyade, orta düzeyde modüle eden ya da parankimal olmayan hücreleri hedefleyen yaklaşımların geliştirilmesinin önemi vurgulanmıştır (203). Öte yandan NF- κ B p65 fosforilasyonunun, inflamasyonla ilişkili HCC hastalarında anlamlı derecede arttığı; CCl₄, TNF- α ve DEN ile indüklenen fare hepatik inflamasyon ve HCC modellerinde de benzer şekilde yükseldiği gösterilmiştir (207). Erkek Wistar albino sıçanlarda oluşturulan DEN/fenobarbital indüklü HCC modelinde yapılan bir çalışmada, DEN grubunda inflamasyonu yansıtan NF- κ B p65 ekspresyonunun anlamlı

şekilde arttığı, Likopen+DEN grubunda ise bu artışın DEN grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı bildirilmiştir (9). Çalışmamızda Likopen+DEN grubunun NF- κ B düzeyi diğer gruplardan düşük bulunmuş ve bu grubun kontrol ile NAC+DEN grubundan anlamlı olarak ayrılan tek grup olduğu görülmüştür. Likopen ile oluşan NF- κ B baskılanmasının, NAC eklenmesiyle (Likopen+NAC+DEN) kısmen kırıldığı; NAC+DEN grubunda ise NF- κ B düzeyinin daha belirgin biçimde toparlanarak kontrol grubuna yakınlaştığı, hatta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gösterdiği saptanmıştır. Bulgularımız HIF1 α / VEGF/NF- κ B sinyal yolu bağlamında değerlendirildiğinde NF- κ B'nin, hipoksik koşullarda HIF-1 α 'nın transkripsiyonel aktivitesini destekleyerek VEGF ekspresyonunu ve anjiyogenezi artırması beklenmektedir. NF- κ B bulgularımız, VEGF düzeyleriyle karşılaştırıldığında Likopen+DEN grubunda VEGF düzeyinin, kontrol, DEN ve NAC+DEN gruplarına kıyasla anlamlı derecede artmış olması; likopen ile birlikte NAC uygulanmasının, Likopen+NAC+DEN grubunda anjiyogenezin şiddetini baskılayarak VEGF düzeylerinde azalmaya yol açması; sadece NAC uygulamasının ise anjiyogenezi daha güçlü biçimde baskılayarak NAC+DEN grubunda VEGF düzeylerini kontrol grubuna benzer seviyelere geriletmesi NAC'ın NF- κ B'de oluşturduğu etkiye ters yönde paralellik göstermektedir. Likopen+DEN grubunda VEGF düzeylerinin artmış olması, HIF-1 α /VEGF ekseninin baskın hale geldiğini ve anjiyogenezin uyarıldığını buna eşlik eden düşük NF- κ B düzeyleri ise, NF- κ B'nin hepatosit sağkalımı ve doku homeostazındaki koruyucu rolünün zayıflamış olabileceğini düşündürmektedir. NAC uygulanan gruplarda NF- κ B aktivitesinin fizyolojik sınırlar içinde korunduğu, VEGF düzeylerinin azalması ve kontrol grubuna benzer olması, anjiyogenezin şiddetinin baskılandığını ve tümör mikroçevresinde hipoksiye bağlı pro-anjiyojenik sinyallerin sınırlandırıldığını düşündürmektedir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, NF- κ B sinyal yolunun HCC gelişiminde çift yönlü bir role sahip olduğu; hem tümör progresyonunu destekleyebildiği hem de hepatosit sağkalımı ve doku homeostazı açısından belirli bir düzeyde aktivitesinin gerekli olduğu anlaşılmaktadır.

Bcl-2, ROS oluşumunun azaltılması, oksijen radikali aracılı LPO'nun önlenmesi, mitokondriyal ve nükleer GSH'nin düzenlenmesi gibi rollerle hücreyi ölümden koruyan bir proteindir (187,208). Kanseri hücreleri apoptoza karşı daha dirençli olma eğilimindedir. Apoptoz sırasında glutatyon azalması meydana gelmektedir (209). Bcl-2 ve GSH'nin birlikte tükenmesi tümörleşmeyi azaltmayla ilişkilendirilmiştir (187). Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, GSH'nin rejenerasyonundan sorumlu olan hücre içi ve

mitokondriyal NADPH'de bir artışa neden olur. GSH seviyeleri arttıkça, Bcl-2'ye bağlanabilir ve apoptozu önleyebilir. Böylece yüksek GSH seviyeleri, hücrel apoptozu karşı direnci artırır (209). Mitokondriyal sitokrom c'nin salınımını önleyerek apoptozu inhibe eden bcl-2 ekspresyonunun artması ; hücrenin apoptozise uğramasından sorumlu olan Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 ekspresyonunun azalması apoptozdan kaçınmayı ve karsinom gelişimini kolaylaştırmayı sağlayabilmektedir (187). Çalışmalar, DEN uygulamasıyla apoptoz oranının azaldığını bildirmektedir (187). Kaspaz-3 eksikliği olan nakavt farelerde DEN kaynaklı HCC'nin önemli ölçüde artmasının yanında telafi edici hücrelerin proliferasyonunun arttığı da bildirilmektedir (210). Young-Min Han ve ark. yaptığı DEN/TAA indüklü fare HCC modelinde mitokondriyal aracılı apoptozda rol oynayan proapoptotik bir protein olan Bax ekspresyonu, çalışmamızda olduğu gibi DEN grubunda kontrolle anlamlı bir farklılık göstermemiştir (211). Gupta ve ark. yaptığı çalışmada, DEN uygulamasının intrinsik apoptotik yolları baskılayarak Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 ekspresyonunu azalttığı ve Bcl-2 artışıyla hücreleri apoptozu dirençli hâle getirdiği bildirilmektedir. Likopenin ise oksidatif stres ve inflamasyonu azaltarak bu dengeyi apoptotik yönde düzenlediği belirtilmektedir (212). Çalışmamızda Likopen, Likopen+NAC ve NAC gruplarında Bcl-2 ve GSH düzeylerinin artmış olması, güçlü antioksidan kapasiteye bağlı olarak mitokondriyal stresin ve apoptozun baskılanması ile uyumludur. Buna karşın Bax artışı, hücrelerin proapoptotik sinyale duyarlı hale geldiğini, ancak eşzamanlı olarak artan Bcl-2 ve redoks tamponlaması (GSH) nedeniyle bu sinyalin Kaspaz-3 ve -9 aktivasyonuna tam olarak yansımadığını ve hücrelerin parsiyel veya bloke edilmiş apoptoz durumunda kaldığını düşündürmektedir.

Çalışmamız histolojik olarak değerlendirildiğinde DEN grubunda bazı alanlarda apoptotik (Şekil 4.18) ve mitotik arreste uğramış hücrelere rastlamanın yanında (Şekil 4.19) DEN ve Likopen ve/veya NAC uygulanan gruplarda nükleer büyüme ve vakuolizasyon gözlenmiştir. Lin H. ve ark. yaptığı çalışmada DEN'in, oksidatif stres ve ksenobiyotiklerin hepatik hiperpoliploidizasyona neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca DEN'in hepatositlerde daha yüksek DNA içeriğine sahip büyümüş çekirdeklere neden olduğu da tespit edilmiştir. DEN kaynaklı hepatosit hiperpoliploidizasyonunun nedeni anormal hücre çoğalması ve hücre bölünmesinin başarısızlığına bağlanmıştır. DEN enjeksiyonundan sonra hiperpoliploidi ile korele olarak nükleer vakuolasyonun da arttığı ve bu sürecin hepatositlerin HCC hücrelerine dönüşümü ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (213). Dolayısıyla DEN'in genotoksik etkisine bağlı olarak DNA hasarı, poliploidi ve tamamlanamamış hücre döngüsü meydana gelmektedir ve buna bağlı olarak nükleer

büyüme ve vakuolizasyon ortaya çıkmaktadır. Normal gelişim ve doku homeostazını korumak ve normal hücre döngüsünü sürdürmek için programlanmış hücre ölümünün gerekli olduğu (214) ancak çalışmamızda DEN grubunun histolojik değerlendirmesinde apoptotik ve mitotik arreste uğramış hücrelere de rastlanması nedeniyle hücre apoptozis ve bölünmesinin sekteye uğradığı görülmektedir. Literatürde likopenin DEN'e bağlı azalmış apoptotik sinyallemeyle tersine çevirebildiği (Kaspaz -3/-9 artışı, Bcl-2 azalması) yönünde etkilerinin olduğu belirtilmektedir (203). Çalışmamızda Likopen, Likopen+NAC ve NAC gruplarında Bcl-2 ve her ne kadar anlamlı olmasa da GSH düzeylerinin artması, Kaspaz-3 ve -9'un tüm gruplarda farklılık göstermemesi güçlü antioksidan kapasiteye bağlı olarak mitokondriyal stresin ve kaspaz-bağımlı apoptozun baskılanabileceğine işaret etmektedir. Buna karşın Bax artışı, hücrelerin proapoptotik sinyale duyarlı hale geldiğini, ancak eşzamanlı olarak artan Bcl-2 ve redoks tamponlaması (GSH) nedeniyle bu sinyalin Kaspaz-3 ve -9 yoluyla kaspaz kaskadının aktivasyonuna tam olarak yansımadığını, hasarlı hepatositlerin apoptozdan kaçtığını düşündürmektedir. Dolayısıyla sonuçlarımız, likopen ve/veya NAC uygulamasının DEN modelinde apoptozu başlatan sinyalleri (Bax) artırmasına rağmen, antiapoptotik ve sitoprotektif mekanizmaların (Bcl-2, GSH) baskın gelmesiyle net kaspaz aktivasyonunun sınırlı kaldığı bir duruma işaret etmektedir. Bu durum, antioksidan tedavilerin HCC'de çift yönlü (apoptoz düzenleyici vs. hücre koruyucu) etkiler gösterebileceğini desteklemektedir.

Kanser hücrelerinde GST ekspresyonunun artması, antikanser ilaçların detoksifikasyonunu hızlandırarak sitotoksik etkinliklerinin azalmasına ve tedavi direncinin gelişmesine yol açmaktadır. Bu nedenle glutatyon transferazların inhibisyonunun, kemoterapötik ajanların etkinliğini artırdığı bildirilmektedir. Glutatyon (GSH) ve ilişkili antioksidan enzimler tümör hücrelerinde sıklıkla aşırı eksprese edilmekte ve ilaç direncine katkıda bulunmaktadır (215). Özellikle HCC gibi kanserlerde yüksek GST düzeyleri, GSH'nin elektrofilik ilaçlar ve metabolitlerle konjugasyonunu artırarak kemoterapiye duyarlılığı azaltmaktadır (89). Fenolik ve flavonoid bileşikler GST'lerin aktivitesini ve/veya ekspresyonunu modüle etme potansiyeline sahiptir (216). Hücresel makromolekülleri elektrofilik bileşiklerden koruma işlevi gören bir grup detoksifiye edici enzim olan GST'ler doğrudan detoksifikasyon yoluyla ve mitogenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolunu inhibe ederek ilaç direncinin gelişmesine yardımcı olur (217). GST'lerin π ve μ sınıfları c-Jun N-terminal kinaz 1 (JNK1) ve ASK1(apoptoz sinyali düzenleyici kinaz) ile protein-protein etkileşimleri yoluyla

hücrel hayatta kalma ve ölüm sinyallerine katılan mitojenle aktifleşen protein (MAP) kinaz yolunda düzenleyici bir rol oynamaktadır. JNK ve ASK1 hücrel strese yanıt olarak aktive edilir. Stres altında olmayan hücrelerde, GST Pi-JNK kompleks proteinin sekestrasyonuna bağılı olarak düşük JNK aktivitesi gözlenir (218). Ancak, oksidatif stres koşulları durumunda JNK aktivitesinin üzerindeki baskı kalkar ve daha sonra GST-pi - JNK kompleksinin ayrışması, GST-pi'nin oligomerizasyonu ve apoptozisin indüksiyonuyla sonuçlanır (218). JNK'lar pro-apoptotik kinazlar olarak kabul edilir (219). Birçok antikanser ajanı, özellikle JNK ve p38 aracılığıyla MAP kinaz yolağının aktivasyonu yoluyla apoptozu indükler (220). JNK p 53'ü aktive eder, p 53 Bax'ı aktive eder ve apoptozisi başlatır (221). Çalışmamızda kontrol grubu dışındaki bütün gruplarda GST-pi düzeyleri düşük bulunmuştur. JNK Bax ve Bak aracılığıyla apoptozu aktive ettiğinden (108) GST-pi düzeyinin düşüklüğü JNK ve dolayısıyla Bax aktivitesinin artışına neden olduğuna işaret etmektedir. Çünkü yükselmiş GST düzeyleri, çeşitli uyarılarla başlatılan apoptoza karşı artan dirençle ilişkilidir (217). Bununla birlikte GST-pi, tümör oluşumunda iki ucu keskin bir kılıç olarak kabul edilir; yani GST-pi, normal hücreler, malign fenotipli hücreler ve tümör hücreleri de dahil olmak üzere onu eksprese eden tüm hücreleri korur, apoptozise gitmelerini önler (98). Literatürdeki birçok çalışma kanserleşmeye paralel olarak GST-pi düzeyinin arttığını göstermiştir. Bu bağlamda Bocedi ve ark. DEN kaynaklı rat hepatokarsinogenez modelinde hepatosit proliferasyonu ile ilişkili neoplastik odakların varlığını GST-pi artışı ile korele göstermiştir (222). Yine bu yönde Young-Min Han ve ark. DEN/TAA indüklü fare HCC modelinde tümör proliferasyonu ile ilişkili bir faktör olan GST-pi düzeyinin kontrole göre anlamlı bir şekilde yükseldiğini tespit etmiştir (211). Bhatia ve ark. DEN indüklü dişi Balb/c farelerle yaptığı HCC modelinde bizim çalışmamızdakine benzer şekilde haftada bir kez olmak üzere 8 hafta intraperitoneal DEN (200mg/kg vücut ağırlığı) enjeksiyonu ve 10 hafta boyunca haftada 3 kez olmak üzere zeytinyağında çözölmüş (5 mg/kg vücut ağırlığı) likopen (domatesten ekstraksiyonla elde edilmiş) tedavisi uygulamıştır. DEN uygulaması, kontrol hayvanlarıyla karşılaştırıldığında plazma GST aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Likopen uygulaması da bu artışı hafifletmiştir (223). Literatürde GST-pi'nin artışını gösteren çalışmaların yanında her ne kadar az da olsa düşüğünü gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu bağlamda HCC hastalarında, kronik hepatit B hastalarına kıyasla periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC'ler) GST-pi'nin ekspresyonunun azalmış olduğu ve bunun oksidatif stres belirteçlerinde artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (118). Literatürde likopen takviyesinin tümör gelişiminin bir

göstergesi olan HCC lezyonlarında GST-pi pozitif alanlarını önemli ölçüde azaltmasının (224,225) yanı sıra spontan hepatokarsinogenezin iyi karakterize edilmiş bir modeli olan LEC (The Long-Evans Cinnamon) sıçanlarına likopen diyeti 6 haftalıkken başlanır ve 76 haftaya kadar devam edilir. Likopenin bu uzun süreli kullanımının sıçanlarda HCC lezyonları içindeki GST-pi pozitif alanların sayısını azaltmayarak hepatokarsinogenez riskini düşürmediği tespit edilmiştir (226). Bütün bunlar göz önüne alındığında çalışmamızda DEN grubunda GST-pi düzeyinin düşmemesi gerekirdi. Ancak HCC'de GST-pi'nin fokal olarak ekspresyon göstermesi (222) ve en sık metillenen tümör baskılayıcı genlerden birinin GST-pi olması (93) nedeniyle bulgularımız literatürle uyumlu çıkmamış olabilir. Likopen ve/veya NAC alan gruplarda GST-pi düzeyinin azalması bu tedavi edicilerin iyileştirici yöndeki etkilerine bağlanabilir ve bu literatürle uyumludur. Ancak GST-pi'nin tüm hücreleri koruyucu bir özelliğe sahip olması göz önüne alındığında DEN alan tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük olması NF- κ B ve IL-6 düzeylerinin düşüklüğüne karşılık proliferasyon, hücre farklılaşması, inflamasyon durumlarını düzenleyen JNK sinyal yolunun aktivasyonunu sağlamış olabilir. Ancak JNK yolunun oksidatif stres koşulları altında aktive olacağı (218) göz önünde bulundurulduğunda ve çalışmamızda yükselmiş antioksidan (SOD, CAT, GST, GSH) düzeylerinin söz konusu oksidatif stres koşullarını yumuşatması durumunda JNK aracılı aktive olan Bax'ın apoptizi indüklediğini ancak kaspaz kaskadını etkinleştiremediğini ve bunun da tümör progresyonunu destekleyebileceğini düşündürmektedir. Likopen+NAC+DEN ve NAC+DEN grupları GST-pi ve NF- κ B düzeyi bakımından birbirinden istatistiki olarak farksızken Likopen+NAC+DEN grubunda bazı antioksidanların (katalaz ve GST) kontrolden farksız olması bu gruba JNK sinyal yolunun inaktivasyonu aracılığıyla antiapoptotik karakter kazandırılmış ve karsinogenez desteklenmiş olabilir. NAC+DEN grubunda ise antioksidan parametrelerin ve NF- κ B düzeyinin yükselmiş olması bir apoptotik denge durumunu düşündürmektedir.

Fare modellerinde oksidatif stres, antioksidan savunma sistemleri ve hepatoselüler karsinogenez (HCC) arasında güçlü moleküler bağlantılar kurulmuştur. Süperoksit dismutaz 1 (SOD1) veya NRF1 (NRF2 homologu) hedefli genetik bozulmaya sahip farelerin hepatokarsinogeneze karşı artmış duyarlılık göstermesi, antioksidan savunma mekanizmalarının karaciğer tümör gelişimindeki kritik rolünü ortaya koymaktadır. Klinik kohort çalışmalarında da düşük SOD2 ekspresyonunun HCC hastalarında daha kötü sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (115). Literatürde erkek Wistar albino sıçanlarda tek doz DEN/fenobarbital ile indüklenen HCC modelinde, likopenin DEN

uygulamasından önce başladığında inflamasyon ve oksidatif stres parametrelerini baskıladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada DEN grubunda NF- κ B p65 ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı, likopen+DEN grubunda ise bu artışın baskılandığı bildirilmiştir (9). Ayrıca likopenin Nrf2 sinyal yolunu aktive ederek oksidatif stresi azalttığı ve likopen+DEN grubunda Nrf2 düzeylerinin DEN grubuna göre anlamlı biçimde yükseldiği gösterilmiştir (9). Aynı çalışmada likopen uygulamasının, DEN-indüklü HCC’de SOD, CAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı bildirilmiştir (9). Buna karşılık, bizim çalışmamızda GSH-Px aktivitesinde gruplar arasında anlamlılık gözlenmezken, Likopen+NAC+DEN grubunun katalaz aktivitesi dışında DEN alan tüm gruplarda SOD ve katalaz düzeyleri yükselmiştir. Bu durum, antioksidan yanıtın model ve uygulama protokolüne bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini düşündürmektedir. Kimyasal karsinogenez sırasında preneoplastik hepatosit nodüllerinde GSH düzeylerinin arttığı ve GST-P1-1 gibi detoksifikasyon enzimlerinin aşırı eksprese edildiği ve bu enzimlerin büyük ölçüde Nrf2 tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (209). Çalışmamızda, Nrf2 tarafından düzenlenen faz II detoksifikasyon enzimi GST-Pi düzeylerindeki azalmanın, Nrf2 aktivasyonunun baskılanmasıyla ilişkili olabileceği düşünülebilir. Ancak DEN uygulanan tüm gruplarda GST-Pi düzeylerinin azalmış olması, GST-Pi’deki azalmanın her zaman antitümöral bir etkiyi yansıtmadığını göstermektedir. Normal hücrelerde, Nrf2/Keap1 yolağının akut aktivasyonu oksidatif strese ve hücre ölümüne karşı koruma sağlarken kanser hücrelerinde Nrf2/Keap1 sisteminin düzensizliği ROS’un toksik etkilerine karşı duyarlılığı değiştirir ve böylece tümör hücrelerinin hayatta kalmasını kolaylaştırabilir (209). Öte yandan, düşük Nrf2 aktivitesinin hücreleri kimyasal karsinogeneze daha yatkın hâle getirdiği de bildirilmiştir (227). Nrf2, antioksidan savunma sistemlerini aktive eden temel bir transkripsiyon faktörüdür. Ancak hücre içi ortamda yüksek GSH varlığı, ROS’u doğrudan nötralize ederek Nrf2 aktivasyon ihtiyacını azaltabilmekte, bu nedenle Nrf2 düzeyleri artmaksızın düşük seviyelerde kalabilmektedir. Bu durum, oksidatif stresin baskılanmasına rağmen, redoks dengesinin tümör hücreleri lehine kaymasına ve tümör büyümesi ile progresyonunun desteklenmesine katkıda bulunabilir. Nitekim NAC uygulamasının akciğer kanseri ve melanom modellerinde tümör büyümesini şiddetlendirdiği rapor edilmiştir (228). NAC ve GSH, tiyol (-SH) grubu içeren ve ROS’u doğrudan nötralize eden güçlü antioksidanlardır. Dışarıdan NAC veya GSH takviyesinin, NRF2 ve hücrel GSH biyosentezinin hız sınırlayıcı enzimi olan GCLC ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Birden fazla fare HCC modeli (DEN, Trp53KO/C-MycOE),

hepatoma hücre hatları ve insan HCC ksenograft modellerinde yapılan kapsamlı çalışmalarda, NAC ve GSH takviyesinin HCC tümör oluşumunu ve büyümesini artırdığı, ayrıca Sorafenib'in terapötik etkisini zayıflattığı ve hücre içi ROS seviyelerinde önemli bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Öte yandan, sırasıyla NAC ve GSH metabolizmasını hedef alan inhibitörler olan BSO (butiyonin sülfoksimin) ve SSA (sülfasalazin) NAC ve GSH'nin in vitro ve in vivo neden olduğu pro-onkogenik etkileri kısmen ortadan kaldırmıştır (228). Bu çalışmada NAC veya GSH'nin dışarıdan takviyesi, NRF2 ve GCLC ekspresyonunu da azaltmıştır ve bu durum NRF2/GCLC ile ilişkili antioksidan üretim yolunun desensitize olabileceğine bağlanmıştır (228). GCLC'nin çeşitli kanser türlerinde aşırı ekspresyon gösterdiği ve bunun tümör ilerlemesi ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (229). Likopenin ise daha önce Nrf2 sinyal yolunu aktive ettiği ve bu yolak üzerinden oksidatif stresi azaltabildiği gösterilmiştir (9). Bunun yanı sıra NRF2-KEAP1 yolağının bir dizi antioksidan mekanizmayı destekleyerek kansere karşı koruyucu olduğu savunulurken, günümüzde kanseri desteklediği de tespit edilmiştir (230). Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, likopen ve özellikle NAC uygulamasının oksidatif stresi ve inflamasyonu baskılamakla birlikte Nrf2/Keap1 yolunun hepatokarsinogenezde yalnızca koruyucu bir mekanizma olmadığı; hastalığın evresine ve antioksidan yüküne bağlı olarak hem koruyucu hem de tümörü destekleyici roller üstlenebileceğini göstermektedir.

Antioksidanlar çeşitli gıdalarda ve besin takviyelerinde bulunur ve sıklıkla kanseri önleme amacıyla kullanılır, ancak artan kanıtlar bunların düşünüldüğü kadar faydalı olmayabileceğini göstermektedir. Bazı çalışmalar antioksidanların bazı kanser türlerinin riskini, ilerleme hızını, invazyon ve metastazını artırabileceğini göstermiştir (231–233). Antioksidanlar beklendiği gibi oksidatif stresi ve DNA hasarını azaltmıştır, ancak aynı zamanda önemli bir tümör baskılayıcı protein olan p53'ün ekspresyonunu da azaltmıştır (233). Hayvan çalışmaları, NAC tedavisinin enfeksiyon modellerinde inflamasyon ve oksidatif stresi baskıladığını göstermektedir. *Leishmania amazonensis* ile enfekte Balb/c farelerinde oral NAC (200 mg/kg) uygulaması, artmış proinflamatuvar sitokin düzeylerini (TNF- α , IL-6, IL-1 β), lipid peroksidasyonunu (MDA) ve MPO aktivitesini azaltırken; enfeksiyonla azalan GSH düzeyi ve SOD aktivitesini kontrol seviyelerine yaklaştırmıştır. Histolojik hasar düzeyi, MPO aktivitesindeki artışla ortaya çıkan nötrofil infiltrasyonu ile ilişkilendirilmiş olup, bu etkiler, NAC'ın inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve doku hasarını sınırlayan koruyucu rolünü desteklemektedir (229,230).

Gupta ve ark. tarafından yapılan çalışmada, DEN ile indüklenen HCC modelinde

likopen tedavisinin oksidatif stres üzerindeki etkileri lipid peroksidasyonu (MDA) ve glutatyon redoks oranı (GSSG/GSH) üzerinden değerlendirilmiştir. On haftalık tedaviden sonra DEN grubunda hepatik MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, Likopen+DEN grubunda bu artışın baskılandığı ve MDA düzeylerinin kontrol seviyelerine yakın olduğu bildirilmiştir. Yirmi dört haftalık dönemde ise DEN grubunda MDA düzeyleri yüksek seyrini korumuş; Likopen+DEN grubunda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olmakla birlikte DEN grubundan anlamlı şekilde farklı bulunmamıştır. Benzer şekilde, glutatyon redoks oranı DEN grubunda her iki zaman noktasında da kontrol grubuna göre artmış; Likopen+DEN grubunda ise erken dönemde azalma, geç dönemde ise redoks oranının kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (202). Bu bulgular, DEN'in GSH tükenmesi yoluyla ROS artışına ve lipid peroksidasyonuna neden olduğunu, likopenin ise erken dönemde oksidatif hasarı sınırlayabildiğini düşündürmektedir. Çalışmamızda gruplar arasında MDA düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmamış olması, DEN grubunda ve likopen ve/veya NAC uygulanan gruplarda GSH düzeylerinin kontrol grubuna benzer bulunması ile açıklanabilir. Bu durum, yeterli GSH varlığının lipid peroksidasyonunu sınırlayarak MDA düzeylerindeki belirgin değişimleri maskeleyebileceğini düşündürmektedir.

Protein karbonilasyonu, oksidatif strese bağlı gelişen geri dönüşümsüz bir post-translasyonel modifikasyondur (234). Alkolik karaciğer hastalığı fenotipi lipid birikimi ve artmış oksidatif stres ile karakterize hepatoselüler bir ortam olarak belirtilmiştir. Bu oksidan ortamda artan lipid peroksidasyonu reaktif aldehytlerin birikmesine neden olur. Bu reaktif aldehytler, DNA ile reaksiyona girmenin yanı sıra, translasyon sonrası proteinler içindeki Cys, Lys ve His kalıntılarıyla reaksiyona girerek protein karbonilasyonuna sebep olurlar. Alkolik karaciğer hastalığı erken evresine kıyasla son evresinde hepatositlerde protein karbonilasyonun arttığı tespit edilmiştir (235). Meme tümör dokusu bitişik sağlıklı doku ile karşılaştırıldığında protein karbonilasyonunun artması ile birlikte SOD1/SOD2 düzeyleri ve toplam SOD aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir (234). HCV ve metabolik sendromdan kaynaklanan insan HCC'si arasında protein karbonilasyonunun glukoz fosfat izomeras, izositrat dehidrogenaz ve 3-ketoasil-CoA tiyolaz gibi proteinlerde farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Metabolik sendromdan kaynaklanan insan HCC örneklerinde özellikle redoks yanıtında ve lipid metabolizmasında rol alan proteinlerde daha yüksek protein karbonilasyonu gözlemlenmiştir (236). Sonuç olarak, farklı etiyolojik faktörlere bağlı gelişen karsinomlar

arasında gözlenen protein oksidatif hasarındaki farklılıkların, hepatokarsinogenezin farklı moleküler gelişim yollarını yansıtabileceği bildirilmektedir (236). Bunun yanı sıra birçok patolojide oksidatif stres ve protein karbonilasyonu saptanmış olup, kanser dokusunda bu karbonillenmiş proteinlerin kötü prognoza katkıda bulunabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca tümör dokusunda karbonillenmiş proteinlerin ve hedef amino asit kalıntılarının tanımlanmasının, kanserin başlangıcı ve ilerleyişine yönelik yeni tanısal ve terapötik yaklaşımlara ışık tutabileceği bildirilmektedir (234). Çalışmamızda, protein karbonilasyonu düzeyinin DEN grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı, bu artışın antioksidan olan likopen uygulaması ile azaldığı gözlenmiştir. Buna karşılık, NAC uygulanan gruplarda protein karbonilasyon düzeyinin diğer gruplara göre anlamlı biçimde daha düşük bulunması, NAC'nin güçlü antioksidan etkisiyle protein oksidatif hasarını baskılayabildiğini düşündürmektedir.

Deneysel siroz modellerinde kollajenaz-3 olarak da bilinen MMP-13'ün aşırı ekspresyonunun, kollajen yıkımını artırarak hepatik onarım sürecini desteklediği; bu etkinin HGF, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun indüklenmesi yoluyla gerçekleştiği bildirilmiştir (237). MMP-2, bazal membranın yıkımında rol alan başlıca proteolitik enzimlerden biri olup, tümör hücrelerinin lokal invazyonu ve uzak metastazını kolaylaştıran önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir (238). HCC dokusundaki hipoksik mikroçevrenin, nükleer transkripsiyon faktörü HIF-1 α 'nın aşırı ekspresyonunu uyardığı; HIF-1 α artışına paralel olarak MMP-2 ekspresyonunun yükseldiği gösterilmiştir. Nitekim hepatoma hücre hatlarında HIF-1 α 'nın baskılanmasının, MMP-2 ekspresyonunu sınırladığı ve buna bağlı olarak tümör hücrelerinin invazyon ve proliferasyon kapasitesini belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir. Bu bulgular, MMP-2'nin HIF-1 α aracılığıyla düzenlendiğini araştırmacılara düşündürmüştür (238). Fibröz kapsül bütünlüğü ile MMP ekspresyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda, yırtılmış fibröz kapsül bölgelerinde makrofaj kaynaklı MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun, sağlam kapsül bölgelerine kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu ve tümör hücrelerinin bu bölgelerden göç ve invazyona geçtiği gösterilmiştir (239). Benzer şekilde, Huang ve arkadaşları insan HCC hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyon ve aktivitesinin tümöre metastatik özellik kazandırdığını ortaya koymuşlardır (240). Chen ve arkadaşları da bu iki MMP'nin HCC'de invazyon ve metastazla güçlü şekilde ilişkili olduğunu vurgulamışlardır (241). Han ve ark. erkek C57BL/6 fareleri (5 haftalık) ile yaptığı çalışmada, karaciğer kanserini tetiklemek için, DEN 8 hafta boyunca haftada bir kez intraperitoneal (ip) olarak uygulanmıştır, ardından 8 hafta boyunca (9-16. haftalar)

içme suyuna karıştırılmış TAA uygulanmıştır. Han ve ark.'larının DEN/TAA ile indüklediği bu HCC modelinde IL-6, VEGF ve MMP-2 mRNA düzeylerinin DEN grubunda anlamlı şekilde arttığı ve bu belirteçlerin tümör büyümesi ile vasküler beslenmenin sürdürülmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (193). Çalışmamızda ise DEN grubunda bu belirteçlerin protein düzeylerinde artış gözlenmekle birlikte istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır. Literatürde, iyi diferansiye HCC'lerde VEGF ekspresyonunun daha yüksek, düşük diferansiyasyon derecesine sahip karsinomlarda ise dolaşımdaki VEGF düzeylerinin daha düşük olabileceği bildirilmektedir (242). Çalışmamızda kullanılan Balb/c fareleri 21 günlükken DEN enjeksiyonuna tabi tutuldu. Karaciğer CYP450 enzimlerinin 7.-15. günde en aktif dönemde olması (141) göz önüne alındığında DEN'in alkilleyici etkisinin Balb/c farelerinde daha belirgin olmasına ve daha agresif bir HCC fenotipinin gelişmesine yol açmış olabilir. Buna karşılık, C57BL/6 farelerinin karsinogeneze daha dirençli olması (243) ve DEN'e CYP450 aktivitesinin daha düşük olduğu bir dönemde (5. hafta) maruz kalmaları, bu türde siroz-erken HCC tablosunun baskın olmasına ve VEGF ile MMP-2 düzeylerinin hepatik onarım yanıtı kapsamında artmasına neden olmuş olabilir. Ayrıca in vitro bir çalışmada, likopenin düşük konsantrasyonlarda CYP2E1'i inhibe ettiği, yüksek konsantrasyonlarda ise bu etkinin belirgin olmadığı bildirilmiştir (244). Buna karşın, in vivo modelde tek başına likopen uygulaması CYP2E1 ekspresyonunu etkilemezken, alkol maruziyeti altında artan dozlarla birlikte CYP2E1 protein düzeylerinde artış eğilimi gözlenmiştir (245). Bu bulgular, uygulanan likopen dozunun yüksek olabileceğini ve CYP2E1 aktivitesini artırarak DEN'nin metabolik aktivasyonu ve mutajenik potansiyelini güçlendirmiş olabileceğini; dolayısıyla tümörleşme sürecine katkıda bulunmuş olabileceğini düşündürmektedir. Alternatif olarak, DEN enjeksiyonunun farelere 21 günlükken yapılması ileri evre HCC tablosu oluşturmuş olup, DEN grubunun herhangi bir yeni tetikleyici ajan almayarak tümörleşmenin stabil olması organizmada VEGF ve MMP 2 düzeylerini kontrolden farksız yaparken likopen uygulanan gruplarda ise tümör progresyonunun devam etmesiyle birlikte HIF-1 α 'nın aşırı ekspresyonuna paralel olarak anjiyogenezin uyarılması, VEGF ve MMP-2 düzeylerinde artışa neden olmuş olabilir. Bu durum, MMP ve VEGF ekspresyonunun yalnızca tümör varlığıyla değil; tümör evresi, hipoksi derecesi, onarım yanıtı ve kullanılan hayvan modeline özgü metabolik özelliklerle yakından ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Tümör dokularında VEGF'in aşırı ekspresyonunun, artmış anjiyogenez ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (246). Bununla birlikte deneysel siroz

modellerinde, HGF, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun indüklenmesi yoluyla kollajen yıkımının artırılarak hepatik onarımın gerçekleştiği de bildirilmiştir (237). Bu durum, VEGF ve MMP'lerin yalnızca tümör progresyonu değil, aynı zamanda doku onarımı ve fibrozun çözülmesi süreçlerinde de rol alabileceğine işaret etmektedir. Nitekim Young-Min ve arkadaşlarının silimarin+DEN/TAA uygulanan deneysel modelinde, hepatoprotektif pozitif kontrol grubunda VEGF mRNA düzeylerinin anlamlı şekilde artmış olması, bu modelin sirozdan HCC'ye geçişin erken evrelerini temsil edebileceği ve VEGF artışının hepatik onarım yanıtının bir parçası olabileceği (247) düşünülebilir. Bu bağlamda, çalışmamızda kullanılan fare modelinin daha ileri evre HCC'ye, Young-Min ve arkadaşlarının modelinin ise erken HCC evresine karşılık geldiği söz konusu olabilir. Chugh ve arkadaşlarının dişi Balb/c farelerde oluşturdukları DEN indüklü HCC modelinde, çalışmamızdakine benzer şekilde haftada bir kez olmak üzere 8 hafta intraperitoneal DEN (200mg/kg vücut ağırlığı) enjeksiyonu ve 24 hafta boyunca haftada 3 kez olmak üzere zeytinyağında çözülmüş (5 mg/kg vücut ağırlığı) likopen (domatesten ekstraksiyonla elde edilmiş) tedavisi uygulanmıştır. DEN grubunda VEGF ve MMP-2 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı, likopen+DEN grubuna kıyasla ise bu artışın anlamlı olmadığı bildirilmiştir (248). Bu çalışmanın bulguları ile çalışmamız arasındaki farklılıklar; farelerin dişi olması, karsinogenezi güçlendirecek ikinci bir kimyasal ajanın kullanılmaması ve daha düşük dozda (5 mg/kg) domatesten ekstrakte edilmiş likopen uygulanması ile açıklanabilir. Çalışmamızda ise daha yüksek dozda likopen (50 mg/kg) ve farklı deneysel koşullar söz konusudur. Benzer şekilde Abdallah ve Khattab'ın yaptığı çalışma, DEN/fenobarbital (iki günde bir olmak üzere 200 mg/kg vücut ağırlığı dozlarında DEN ile 5 kez i.p. enjeksiyonu/ içme suyunda 500 ppm fenobarbital) indüklü 5 haftalık erkek Sprague Dawley sıçanlara DEN verilmeden 7 gün önce 0,12 mg/gün oral yolla likopen (domatesten ekstraksiyonla elde edilmiş) başlanmış olup 12 hafta sürmüştür. DEN grubunda MMP düzeylerinin Likopen+DEN grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir (249). Chugh ve arkadaşlarının ve Abdallah ve Khattab'ın yaptığı bu çalışmalarda sırasıyla dişi farelerde HCC görülme insidansının erkek farelerden düşük olması ve sıçanların 5 haftalık olup CYP450 enzim aktivite hızının pik yaptığı dönemden çıkmış olmaları nedeniyle bu modellerin siroz-erken HCC evresinde olabilecekleri varsayımıyla bulgularımız farklılık göstermiş olabilir. Çalışmamızda kullanılan Balb/c farelerde DEN'in 21 günlükken uygulanması CYP450 enzim aktivitesinin yüksek olduğu bir döneme denk gelmiş ve daha agresif, ileri evre bir HCC tablosu gelişmesine neden olmuş olabilir. Bu durumda, tümörleşmenin

stabil hale gelmesi ve organizmanın savunma mekanizmalarının zayıflaması sonucu DEN grubunda VEGF ve MMP-2 düzeylerinin kontrol grubuna benzer kalmış olması olasıdır. Buna karşın, likopen uygulanan gruplarda likopenin çalışmanın sonuna kadar verilmesi; anti-inflamatuar (NF- κ B ve IL-6 baskılanması), antiapoptotik ve anjiyojenik etkiler yoluyla tümör mikroçevresini etkileyerek VEGF ve MMP-2 düzeylerinin artmasına ve HCC şiddetinin ilerlemesine katkıda bulunmuş olabilir. Gupta ve ark. Tarafından dişi Balb/c fareleri kullanılarak (DEN 8 hafta boyunca 200 mg DEN/kg vücut ağırlığı kümülatif dozda intraperitoneal) yapılan çalışmada profilaktik olarak ilk DEN dozundan 2 hafta önce başlamak üzere likopen (zeytinyağında haftada üç kez ağızdan 5 mg/kg vücut ağırlığı, domatesten ekstraksiyonla elde edilmiş) 24 hafta boyunca verilmiştir. DEN ve Likopen+DEN gruplarında kontrol grubuna kıyasla kuyruklu yıldız oluşumunda anlamlı bir artış gözlenmiş olmanın yanı sıra Likopen+DEN grubunda DEN grubuna kıyasla istatistiksel olarak da anlamlı olmayan bir artış görülmüştür (187). Bu bulgu, çalışmamızla uyumlu şekilde, likopenin DNA hasarını ve tümör progresyonunu şiddetlendirebileceğini düşündürmektedir. İnvaziv karsinomlarda artan tümör kütlesi, hipoksi ve besin yetersizliğine yol açmakta; bu durum HIF-1 α 'nın aşırı ekspresyonunu ve buna bağlı olarak VEGF aracılı anjiyogenezin uyarılmasını tetiklemektedir (246). HCC hücrelerinin VEGF, PDGF, FGF ve HGF gibi çeşitli büyüme faktörleri salgılaması, uygun oksijen ve besin temini için anjiyogenezi desteklemektedir. Bununla birlikte VEGF'in fibrogenezi desteklemesinin yanı sıra hepatik doku onarımı ve fibrozun çözülmesi süreçlerinde de rol alabildiği ve bu çift yönlü etkisinin dikkatle değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir (247). Hepatoselüler karsinom oldukça vaskülarize bir tümördür ve bu da HCC tedavisinde vasküler hedefleme yaklaşımlarını cazip hale getirmektedir (43). Klinik veriler, rezeksiyon sonrası yüksek mikrodamar yoğunluğu ve artmış VEGF düzeylerinin, hastalısız sağkalım açısından kötü prognoz göstergeleri olduğunu ortaya koymuştur (250). Öte yandan antianjiyojenik ajanların, tümör damar yapısını geçici olarak normalize ederek kan perfüzyonunu artırabildiği, hipoksiyi azaltabildiği ve kemoterapötik ajanlar ile antitümör bağışıklık hücrelerinin tümör dokusuna iletimini kolaylaştırarak antikansere yönelik tedavilerin etkinliğini artırabildiği bildirilmektedir (251). Bu bağlamda, anjiyogenezin tamamen baskılanmasından ziyade kontrollü bir şekilde modüle edilmesinin önemi vurgulanmaktadır. Çalışmamızda Likopen+DEN grubunda VEGF düzeyinin, kontrol, DEN ve NAC+DEN gruplarına kıyasla anlamlı derecede artmış olması, bu durumun artmış anjiyogenez ve kötü prognoz ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Buna

karşılık likopen ile birlikte NAC uygulanması, Likopen+NAC+DEN grubunda anjiyogenezin şiddetini baskılayarak VEGF düzeylerinde azalmaya yol açmıştır. Sadece NAC uygulaması ise anjiyogenezi daha güçlü biçimde baskılamış; NAC+DEN grubunda VEGF düzeylerinin kontrol grubuna benzer seviyelere gerilemesini sağlamıştır. Bu bulgular, NAC'ın anjiyogenezin şiddetini baskılayıcı bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen sonuçlar, VEGF ve MMP-2 ekspresyonunun HCC'de yalnızca tümör varlığı ile açıklanamayacağını; bu parametrelerin tümör evresi, hipoksi derecesi, doku onarım yanıtı ve kullanılan hayvan modeline özgü metabolik özelliklere bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini göstermektedir.

Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF-beta) sinyal yolu, HCC'de epitelden mezenşimal dokuya geçişi, anjiyogenezi, makrofaj olgunlaşmasını, kanser kök hücre popülasyonunu ve hücre çoğalmasını destekler (8). TGF beta, PDGF, bağ dokusu büyüme faktörü ve Hedgehog yolu gibi çeşitli fibrojenik mediatörlerin ve bunların aktive ettiği sinyal yollarını ve hepatik yıldız hücrelerinin aktivasyonunu tetiklediği tespit edilmiştir (247). TGF- β sinyal yolu proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve hücre dışı matris üretimi dahil olmak üzere çok sayıda hücresel sürecin önemli bir düzenleyicisidir (252). Tümör hücreleri ile tümörle ilişkili fibroblastlar arasında yoğun hücreler arası sinyal ağları bulunmaktadır. Tümör tarafından salgılanan PDGF ve TGF- β fibroblastların miyofibroblast fenotipine farklılaşmasını uyararak ekstrasellüler matriksin kompozisyonu ve organizasyonunda belirgin değişikliklere yol açmaktadır. Aktive olmuş fibroblastların, yalnızca primer tümör gelişiminde değil, aynı zamanda metastazın erken evrelerinde de tümör büyümesini, invazyonu ve stromal yeniden yapılanmayı desteklediği bildirilmiştir (39). Kronik inflamasyon, TGF- β gibi inhibitör sitokinlerin üretimini artırarak bağışıklık yanıtını baskılar ve böylece tümör progresyonunu destekler (112). TGF- β sinyalleme çift yönlü bir etkiye sahiptir: normal fizyolojik koşullarda hücre döngüsü duraklaması ve apoptozu uyararak tümör baskılayıcı rol oynarken, inflamasyon ve kanser gibi patolojik durumlarda doku yeniden yapılanması, tümör progresyonu ve fibrozisi destekleyen süreçleri aktive eder (252). Çalışmamızda likopen ve/veya NAC uygulanan gruplarda TGF- β düzeylerinin anlamlı şekilde artmış olması, tümör mikroçevresinde stromal yanıtın ve doku yeniden şekillenmesinin aktive edildiğini düşündürmektedir. TGF- β 'nın bu artışı, MMP-2 ekspresyonunun uyarılması yoluyla ekstrasellüler matriks yıkımını kolaylaştırarak tümör invazyonu ve hücre göçü için elverişli bir mikroçevre oluşturabilir. Öte yandan TGF- β , NF- κ B sinyal yolu ile çift yönlü bir etkileşim içerisindedir. Erken evrelerde NF- κ B aracılığıyla inflamasyon ve hücre

sağkalımı destekleyebilen TGF- β , ilerleyen evrelerde pro-invaziv ve pro-anjiyojenik bir profile kayabilmektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda özellikle likopen uygulanan gruplarda VEGF düzeylerindeki artış, TGF- β 'nın NF- κ B ve hipoksiye duyarlı sinyal yolları ile etkileşimi sonucunda anjiyogenezin uyarıldığına işaret etmektedir. TGF- β aynı zamanda apoptoz ve hücre sağkalımını düzenleyen Bcl-2 ailesi proteinleri üzerinde de etkilidir (252). NF- κ B aracılığıyla anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunun artması, buna karşın Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin baskılanması, tümör hücrelerinin apoptotik sinyallerden kaçmasına olanak tanıyabilir. NAC uygulanan gruplarda oksidatif stresin baskılanmasına bağlı olarak NF- κ B aktivitesinin fizyolojik sınırlar içinde tutulması, TGF- β artışına rağmen VEGF ve MMP-2 aracılı yanıtın daha kontrollü seyretmesini sağlamış olabilir. Bu durum, NAC'ın redoks dengesini düzenleyerek TGF- β 'nın tümör destekleyici etkilerinin bir kısmını sınırlayabileceğini düşündürmektedir.

Heparin sülfat proteoglikanı olan GPC-3, normal yetişkin dokularında ifade edilmezken, HCC hastalarının %80'inden fazlasında önemli ölçüde aşırı ifade edilmiş ve hastalarda kötü prognoz ile pozitif ilişkili bulunmuştur (8). GPC-3'ün kanonik Wnt/ β -katenin sinyal yolunu aktive ederek tümör hücre proliferasyonunu desteklediği, buna karşılık GPC-3'ün hedeflenmesiyle Wnt sinyallemesinin baskılanabildiği ve tümör büyümesinin inhibe edildiği gösterilmiştir (253). Ayrıca serum GPC-3 düzeylerinin, özellikle sirotik hastalarda erken evre HCC'nin saptanmasında potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (254). Ayrıca serum GPC-3 düzeylerinin, özellikle sirotik hastalarda erken evre HCC'nin saptanmasında potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (255). Bununla birlikte GPC-3'ün hücre tipine ve doku bağlamına bağlı olarak çift yönlü bir biyolojik etkiye sahip olabileceği bildirilmektedir. GPC-3, fetal karaciğerde ve mezodermal embriyonik dokularda yüksek düzeyde ifade edilirken, meme, over ve akciğer kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı özellik gösterebildiği ve hücre büyümesini inhibe edebildiği bildirilmiştir (105).

Çalışmamızda DEN grubunda GPC-3 pozitifliğinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmış olması, DEN-indüklü HCC modelinde GPC-3'ün tümörleşme sürecine eşlik eden bir belirteç olduğunu desteklemektedir. Buna karşılık likopen ve/veya NAC uygulanan gruplarda GPC-3 pozitifliğinin DEN grubuna göre anlamlı şekilde azalması, bu ajanların tümör progresyonunu baskılayıcı etkiler gösterebileceğine işaret etmektedir. Ancak tedavi gruplarının kendi aralarında anlamlı farklılık göstermemesi, bu etkinin dozdan veya uygulama süresinden ziyade genel olarak oksidatif stres ve tümör mikroçevresinin modülasyonuna bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Gruplar kendi

içinde karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, GPC-3'ün fonksiyonunun mikroevresel sinyaller ve eşlik eden moleküler yolaklara bağlı olarak değişebildiğini düşündürmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

HCC ileri evrede tanı konulan kötü prognoza sahip bir hastalıktır. Çok sayıda sinyal yolu hastalığın patogenezeine katkıda bulunmaktadır. HCC'nin moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamadığından yeni tedavi ve önleme stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. İnsan HCC'sini simüle eden deneysel HCC modelleri hepatokarsinogenez sürecinde ortaya çıkan patofizyolojik ve moleküler olayları doğru bir şekilde yansıtması bakımından önem taşımaktadır. Bu kapsamda çalışmamızda Balb/c farelerinde DEN/TAA indüklü HCC modeli oluşturulmuştur. Literatürde, birçok büyüme faktörü sinyal yolunu, anjiyogenezi ve invazyonu inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediği bildirilen antiinflamatuvar likopen ile antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip NAC'ın, DEN indüksiyonu öncesinde Balb/c farelerine uygulanarak karaciğer karsinogenezi üzerindeki etkileri inflamatuvar, apoptotik, anjiyojenik, invazyonel ve oksidatif belirteçler açısından incelenmiştir.

DEN alan gruplar tümör nodülü sayısı bakımından karşılaştırıldığında Likopen+DEN, Likopen+NAC+DEN ve NAC+DEN gruplarında nodül sayısının DEN grubuna göre daha fazla sayıda olduğu gözlenmiştir. DEN grubunda ise tümör nodülü görülme sıklığı daha az olup genelde büyük tek bir nodül gözlenmiştir.

TGF- β , VEGF ve MMP-2 gibi fibrotik, anjiyojenik ve metastatik belirteçlerin sinyalleme likopen uygulaması ile yukarı yönlü düzenlenmiş olup, tümör oluşumu ve tümör öbek sayısını artırıcı etki göstermiş olabileceği düşünülmüştür.

MMP-2 ve VEGF protein düzeyleri, kontrol ve DEN grupları ile karşılaştırıldığında NAC+DEN grubunda anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Karaciğerin bütünsel makroskopik görünümü değerlendirildiğinde ise yalnızca NAC uygulanan grubun kontrole daha yakın bir görünüm sergilemekle beraber karaciğer yüzeyindeki kılcal damar ağlarının daha belirgin olduğu gözlenmiştir.

Likopen ve/veya NAC uygulamasının Bax/Bcl-2 oranını azaltması antiapoptotik bir etkiye işaret etmekte olup, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 aktivasyonunun saptanmaması bu bulguyu desteklemektedir.

HCC'de genellikle kötü prognoz ile ilişkili olarak düzeyinin arttığı bildirilen GST-pi düzeyi, DEN uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla düşük bulunmuştur.

HCC her ne kadar kronik inflamasyon zemininde geliyorsa da NF- κ B anti apoptotik bir karaktere sahip bir transkripsiyon faktörü olup hücrel hayatta kalma için aktive olma ve aktif kalma süresinin belli bir dengede olması gerekmektedir. Likopenin

NF- κ B düzeyini çok düşürmüş olması hücrel savunma mekanizmasını olumsuz yönde etkileyerek tümör öbek sayısını artmasına katkı sağlamış olabilir. Bu nedenle inflamasyonun her koşulda zararlı olmadığını ve antiinflamatuvar yaklaşımların hastalığın biyolojik mekanizmasına ve evresine bağlı olarak farklı sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, fare kanser modelinde karsinogenez öncesinde likopen ve NAC ile profilaktik önkoşullama uygulanarak karsinogenezin seyri değerlendirildiğinde, tümörögenез sürecinin daha agresif bir fenotipe yönelmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın ve bu yönde yapılacak çalışmaların güçlendirilmesi amacıyla öne çıkan öneriler aşağıda sunulmuştur:

Kullanılan deneysel HCC modelinde gözlenen tümör nodülleri, modelin başarıyla oluşturulduğunu göstermiş olmakla birlikte, preneoplastik ve neoplastik evrelerin hangi zamansal döneme karşılık geldiğinin net olarak belirlenmesi gerekmektedir. Bu ayrımın yapılması, inflamatuvar, anjiyojenik ve invazyonel belirteçlerin onarıcı yanıt mı yoksa tümör progresyonunu destekleyici mekanizmalar mı doğrultusunda etkili olduklarının daha doğru biçimde ortaya konulmasına olanak sağlayacaktır.

Kullanılan profilaktik likopen ve NAC bileşiklerinin etkinlik ve güvenilirliklerinin daha net ortaya konulabilmesi için ayrıntılı doz-yanıt çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Çalışmada kullanılan bileşiklerin etki mekanizmalarının, ilgili sinyal yolları ve bunlarla etkileşim halinde olabilecek olası yan yollar dikkate alınarak bütüncül bir yaklaşımla değerlendirilmesi gerekmektedir. NF- κ B sinyal yolağının ROS düzeyleri, inflamatuvar, apoptotik, anjiyojenik süreçler ve GST-pi ekspresyonu ile arasındaki ilişki değerlendirilirken, ayrıca TNF- α , HIF-1 α , JNK, p53 ve Bak gibi belirteçlerin sonuçlarının da ortaya konulmasının gerekli olduğu anlaşılmıştır.

Çalışmada değerlendirilen proteinlerle ilgili genlerin metilasyon düzeylerinin analiz edilmesi, gözlenen ekspresyon değişiklikleriyle ilişkili olup olmadığının açığa kavuşturulması bulguların daha kapsamlı biçimde yorumlanmasına olanak sağlayacaktır.

Masum görünen doğal veya sentetik bileşiklerin, kullanılan doza ve HCC'nin evresine bağlı olarak zıt yönlü etkiler gösterebileceğinin göz önünde bulundurulmasının son derece önemli olduğunu vurgulamaktayız.

KAYNAKLAR

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74:229-263.
2. Rungay H, Ferlay J, de Martel C, Georges D, Ibrahim AS, Zheng R, et al. Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype. *Eur J Cancer.* 2022;161:108-118.
3. Shah M, Sarkar D. HCC-related lncRNAs: roles and mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2024;25(1):597.
4. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7(1):6.
5. Yang C, Zhang H, Zhang L, Zhu AX, Bernards R, Qin W, et al. Evolving therapeutic landscape of advanced hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2023;20(4):203-222.
6. Zhao M, He HW, Sun HX, Ren KH, Shao RG. Dual knockdown of N-ras and epiregulin synergistically suppressed the growth of human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;387(2):239-244.
7. Chow AKM, Yau SWL, Ng L. Novel molecular targets in hepatocellular carcinoma. *World J Clin Oncol.* 2020;11(8):589-605.
8. Singh AK, Singh SV, Kumar R, Kumar S, Senapati S, Pandey AK. Current therapeutic modalities and chemopreventive role of natural products in liver cancer: Progress and promise. *World J Hepatol.* 2023;15(1):1-18.
9. Şahin K, Orhan C, Tuzcu M, Şahin N, Ali S, Bağçecioglu IH, et al. Orally administered lycopene attenuates diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats by modulating Nrf2/HO-1 and Akt/mTOR pathways. *Br J Nutr.* 2014;111(4):590-598.
10. Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2006;43(2):143-181.
11. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004;134(3):489-492.
12. Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: Pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther.* 2008;8(12):1955-1962.

13. Tardiolo G, Bramanti P, Mazzon E. Overview on the effects of N-acetylcysteine in neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2018;23(12):3305.
14. de Andrade KQ, Moura FA, dos Santos JM, de Araújo ORP, Santos JCF, Goulart MOF. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Therapeutic possibilities of N-acetylcysteine. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):30269-30308.
15. Verna L, Whysner J, Williams GM. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther*. 1996;71(2):57-81.
16. Kaya E, Yilmaz S, Ceribasi AO, Telo S. Protective effect of lycopene on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and catalase expression in rats. *Ankara Univ Vet Fak Derg*. 2019;66:43-52.
17. Molina DK, DiMaio VJM. Normal organ weights in men: Part II—the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys. *Am J Forensic Med Pathol*. 2012;33(4):368-372.
18. Molina DK, DiMaio VJM. Normal organ weights in women: Part II—the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys. *Am J Forensic Med Pathol*. 2015;36(3):182-187.
19. Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev*. 2003;120:117-130.
20. Cotoi CG, Quaglia A. Normal liver anatomy and introduction to liver histology. In: Guandalini S, Dhawan A, Branski D, editors. *Textbook of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*. Cham: Springer; 2016. p. 609-612.
21. Krebs NJ, Neville C, Vacanti JP. Cellular transplants for liver diseases. In: Atala A, Lanza R, editors. *Cellular Transplantation: From Laboratory to Clinic*. Burlington: Elsevier Academic Press; 2007.
22. Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda S. Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol*. 2009;31:399-409.
23. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108.
24. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
25. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
26. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-1953.

27. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
28. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı. Türkiye Kanser İstatistikleri 2020. Son Erişim Tarihi 24 Şubat 2026.
29. Chehelgerdi M, Behdarvand Dehkordi F, Chehelgerdi M, Kabiri H, Salehian-Dehkordi H, Abdolvand M, et al. Exploring the promising potential of induced pluripotent stem cells in cancer research and therapy. *Mol Cancer.* 2023;22(1):1-19.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
31. Alipour M. Molecular mechanism of Helicobacter pylori-induced gastric cancer. *J Gastrointest Cancer.* 2021;52:23-30.
32. Bi Q, Wu JY, Qiu XM, Zhang JD, Sun ZJ, Wang W. Tumor-associated inflammation: The tumor-promoting immunity in the early stages of tumorigenesis. *J Immunol Res.* 2022;2022:3128933.
33. Seferbekova Z, Lomakin A, Yates LR, Gerstung M. Spatial biology of cancer evolution. *Nat Rev Genet.* 2023;24(5):295-313.
34. Younossi ZM, Wong G, Anstee QM, Henry L. The global burden of liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2023;21:1978-1991.
35. Guzelbulut F, Karaogullarından U, Akkiz H, Altintas E, Demirtas CO, Bahadır O, et al. Characteristics of patients with hepatocellular carcinoma: A multicenter study. *Hepatol Forum.* 2022;3(3):71-76.
36. Romualdo GR, Leroy K, Costa CJS, Prata GB, Vanderborght B, da Silva TC, et al. In vivo and in vitro models of hepatocellular carcinoma: Current strategies for translational modeling. *Cancers (Basel).* 2021;13(21):5583.
37. Ally A, Balasundaram M, Carlsen R, Chuah E, Clarke A, Dhalla N, et al. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma. *Cell.* 2017;169(7):1327-1341.e23.
38. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18:151-166.
39. Zhang DY, Friedman SL. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2012;56(2):769-775.
40. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005;115(2):209-218.

41. Sun M, Kisseleva T. Reversibility of liver fibrosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39:60-63.
42. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: A link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis*. 2010;30:258-270.
43. Greten TF, Korangy F, Manns MP, Malek NP. Molecular therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2009;100(1):19-23.
44. Cucarull B, Tutusaus A, Rider P, Hernáez-Alsina T, Cuño C, de Frutos PG, et al. Hepatocellular carcinoma: Molecular pathogenesis and therapeutic advances. *Cancers (Basel)*. 2022;14(3):621.
45. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1226-1239.e4.
46. Balogh J, Victor D, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, et al. Hepatocellular carcinoma: A review. *J Hepatocell Carcinoma*. 2016;3:41-53.
47. Barcena-Varela M, Monga SP, Lujambio A. Precision models in hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2025;22(3):191-205.
48. Li Y, Tang ZY, Hou JX. Hepatocellular carcinoma: Insight from animal models. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(1):32-43.
49. Blidisel A, Marcovici I, Coricovac D, Hut F, Dehelean CA, Cretu OM. Experimental models of hepatocellular carcinoma—a preclinical perspective. *Cancers (Basel)*. 2021;13(15):3651.
50. Rogers AB. Stress of strains: Inbred mice in liver research. *Gene Expr*. 2018;19(1):61-67.
51. Santos NP, Colaço AA, Oliveira PA. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A review. *Tumour Biol*. 2017;39(3):1010428317695923.
52. Jilkova ZM, Kurma K, Decaens T. Animal models of hepatocellular carcinoma: The role of immune system and tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10):1487.
53. Jilkova ZM, Kuyucu AZ, Kurma K, Tayébéh S, Pour A, Roth GS, et al. Combination of AKT inhibitor ARQ 092 and sorafenib potentiates inhibition of tumor progression in cirrhotic rat model of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(13):11145-11158.
54. Varga J, Brenner DA, Phan SH, Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med*. 2005;117:69-87.

55. Li E, Lin L, Chen CW, Ou DL. Mouse models for immunotherapy in hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11):1800.
56. Day CP, Merlino G, Van Dyke T. Preclinical mouse cancer models: A maze of opportunities and challenges. *Cell*. 2015;163(1):39-53.
57. Liu Y, Wu W, Cai C, Zhang H, Shen H, Han Y. Patient-derived xenograft models in cancer therapy: Technologies and applications. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):123.
58. Walrath JC, Hawes JJ, Van Dyke T, Reilly KM. Genetically engineered mouse models in cancer research. *Adv Cancer Res*. 2010;106:113-164.
59. Barcena-Varela M, Monga SP, Lujambio A. Precision models in hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2025;22:191-205.
60. Verma B, Wesa A. Establishment of humanized mice from peripheral blood mononuclear cells or cord blood CD34⁺ hematopoietic stem cells for immune-oncology studies evaluating new therapeutic agents. *Curr Protoc Pharmacol*. 2020;89(1):e77.
61. Saydé T, Hamoui O El, Alies B, Gaudin K, Lespes G, Battu S. Biomaterials for three-dimensional cell culture: From applications in oncology to nanotechnology. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(2):481.
62. Costa E, Ferreira-Gonçalves T, Chasqueira G, Cabrita AS, Figueiredo IV, Reis CP. Experimental models as refined translational tools for breast cancer research. *Sci Pharm*. 2020;88(3):32.
63. Fan H, Demirci U, Chen P. Emerging organoid models: Leaping forward in cancer research. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):142.
64. Moon H, Ro SW. MAPK/ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(12):3026.
65. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol*. 2003;200(4):504-515.
66. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol*. 2015;44-46:147-156.
67. Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: Animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res*. 2014;6(2):114-118.
68. Powell B, Malaspina DC, Szleifer I, Dhaher Y. Effect of collagenase–gelatinase ratio on the mechanical properties of a collagen fibril. *Biomech Model Mechanobiol*. 2019;18(6):1809-1819.

69. Geervliet E, Bansal R. Matrix metalloproteinases as potential biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Cells*. 2020;9(5):1212.
70. Radbill BD, Gupta R, Ramirez MCM, Difeo A, Martignetti JA, Alvarez CE, et al. Loss of matrix metalloproteinase-2 amplifies murine toxin-induced liver fibrosis. *Dig Dis Sci*. 2011;56(2):406-416.
71. Scheau C, Badarau IA, Costache R, Caruntu C, Mihai GL, Didilescu AC, et al. The role of matrix metalloproteinases in the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019;2019:9423907.
72. Martin JD, Seano G, Jain RK. Normalizing function of tumor vessels: Progress, opportunities, and challenges. *Annu Rev Physiol*. 2019;81:505-534.
73. Zhu T, Peng X, Cheng Z, Gong X, Xing D, Cheng W, et al. COMMD3 expression affects angiogenesis through the HIF1 α /VEGF/NF- κ B signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1655502.
74. Debes JD, Romagnoli PA, Prieto J, Arrese M, Mattos AZ, Boonstra A. Serum biomarkers for the prediction of hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1681.
75. Martin JD, Fukumura D, Duda DG, Boucher Y, Jain RK. Reengineering the tumor microenvironment to alleviate hypoxia and overcome cancer heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(12):a027094.
76. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated angiogenesis. *Cell*. 1999;98:147-157.
77. Guo Q, Jin Y, Chen X, Ye X, Shen X, Lin M, et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: New insights and translational implications. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):57.
78. Neelgundmath M, Dinesh KR, Mohan CD, Li F, Dai X, Siveen KS, et al. Novel synthetic coumarins that target NF- κ B in hepatocellular carcinoma. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(4):893-897.
79. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*. 2002;109(Suppl):S81-S96.
80. Zinatizadeh MR, Schock B, Chalbatani GM, Zarandi PK, Jalali SA, Miri SR. The nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes Dis*. 2021;8(3):287-297.

81. Peng C, Ouyang Y, Lu N, Li N. The NF- κ B signaling pathway, the microbiota, and gastrointestinal tumorigenesis. *Front Immunol*. 2020;11:1387.
82. Karin M, Delhase M. The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: Key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol*. 2000;12:85-98.
83. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol*. 2011;12(8):695-708.
84. Cildir G, Low KC, Tergaonkar V. Noncanonical NF- κ B signaling in health and disease. *Trends Mol Med*. 2016;22(5):414-429.
85. Peng C, Ouyang Y, Lu N, Li N. The NF- κ B signaling pathway, the microbiota, and gastrointestinal tumorigenesis. *Front Immunol*. 2020;11:1387.
86. Di Pietro G, Magno LA, Rios-Santos F. Glutathione S-transferases: An overview in cancer research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010;6(2):153-170.
87. Hitchens TK, Mannervik B, Rule GS. Disorder-to-order transition of the active site of human class Pi glutathione transferase, GSTP1-1. *Biochemistry*. 2001;40:11660-11669.
88. Oakley A. Glutathione transferases: A structural perspective. *Drug Metab Rev*. 2011;43(2):138-151.
89. Mao L, Qin Y, Fan J, Yang W, Li B, Cao L, et al. Rapid discovery of a novel natural GST inhibitor for sensitizing hepatocellular carcinoma to cisplatin. *J Pharm Anal*. 2024;14(5):512-523.
90. Niu B, Zhou Y, Liao K, Wen T, Lao S, Quan G, et al. Reversing cisplatin resistance based on simultaneous glutathione depletion and GST inhibition. *Acta Pharm Sin B*. 2022;12(4):2074-2088.
91. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1769-1792.
92. Yim SH, Chung YJ. An overview of biomarkers and molecular signatures in HCC. *Cancers (Basel)*. 2010;2(2):809-823.
93. Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*. 2003;163(3):1101-1107.
94. Nishikawa T, Wanibuchi H, Ogawa M, Kinoshita A, Morimura K, Hiroi T, et al. Promoting effects of arsenic compounds on rat liver preneoplastic GST-P positive foci. *Int J Cancer*. 2002;100(2):136-139.

95. Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, Duda DG, Jain RK. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(5):325-340.
96. Imai T, Masui T, Ichinose M. Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver. *Carcinogenesis*. 1997;18(3):545-551.
97. Satoh K, Itoh K, Yamamoto M, Tanaka M, Hayakari M, Ookawa K, et al. Nrf2 transactivator-independent GSTP1-1 expression inducible in female mouse liver by DEN. *Carcinogenesis*. 2002;23(3):457-462.
98. Niu ZS, Wang M. Expression of c-erbB-2 and glutathione S-transferase-pi in hepatocellular carcinoma and adjacent tissue. *World J Gastroenterol*. 2005;11(28):4404-4408.
99. Shih TC, Wang L, Wang HC, Wan YJY. Glypican-3: A molecular marker for the detection and treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Res*. 2020;4(4):168-172.
100. Li B, Liu H, Shang HW, Li P, Li N, Ding HG. Diagnostic value of glypican-3 in alpha-fetoprotein negative hepatocellular carcinoma patients. *Afr Health Sci*. 2013;13(3):703-709.
101. Gao W, Kim H, Ho M. Human monoclonal antibody targeting the heparan sulfate chains of glypican-3 inhibits HGF-mediated migration and motility of hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137664.
102. Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans. *Genome Biol*. 2008;9(5):224.
103. Bengochea A, De Souza MM, Lefrançois L, Le Roux E, Galy O, Chemin I, et al. Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2008;99(1):143-150.
104. Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: Biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res*. 1997;57:5179-5184.
105. Zheng X, Liu X, Lei Y, Wang G, Liu M. Glypican-3: A novel and promising target for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Front Oncol*. 2022;12:824208.
106. Montalbano M, Rastellini C, McGuire JT, Prajapati J, Shirafkan A, Vento R, et al. Role of glypican-3 in the growth, migration and invasion of primary hepatocytes isolated from patients with hepatocellular carcinoma. *Cell Oncol (Dordr)*. 2018;41(2):169-184.
107. Singh AK, Singh SV, Kumar R, Kumar S, Senapati S, Pandey AK. Current therapeutic modalities and chemopreventive role of natural products in liver cancer: Progress and promise. *World J Hepatol*. 2023;15(1):1-18.

108. Papadakis ES, Finegan KG, Wang X, Robinson AC, Guo C, Kayahara M, et al. The regulation of Bax by c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) is a prerequisite to the mitochondrial-induced apoptotic pathway. *FEBS Lett.* 2006;580(5):1320-1326.
109. Darwesh R, Alharthi S, Alharthi S, Kodous AS, Mahmoud Hassanin SO, Mahmoud MO, et al. Propolis-loaded acrylic acid/chitosan nanogel as a targeted therapeutic platform against hepatocellular carcinoma disrupting metastatic pathways with enhanced bioavailability. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2025;111:107152.
110. Zimmermann AK, Loucks FA, Schroeder EK, Bouchard RJ, Tyler KL, Linseman DA. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: A molecular basis for BCL-2 antioxidant function at mitochondria. *J Biol Chem.* 2007;282(40):29296-29304.
111. Kouroumalis E, Tsomidis I, Voumvouraki A. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: The interplay of apoptosis and autophagy. *Biomedicines.* 2023;11(4):1166.
112. Cao L, Quan XB, Zeng WJ, Yang XO, Wang MJ. Mechanism of hepatocyte apoptosis. *J Cell Death.* 2016;9:19-29.
113. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: The nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 2004;39(2):273-278.
114. Volkmann X, Anstaett M, Hadem J, Stiefel P, Bahr MJ, Lehner F, et al. Caspase activation is associated with spontaneous recovery from acute liver failure. *Hepatology.* 2008;47(5):1624-1633.
115. Allameh A, Niayesh-Mehr R, Aliarab A, Sebastiani G, Pantopoulos K. Oxidative stress in liver pathophysiology and disease. *Antioxidants (Basel).* 2023;12(9):1653.
116. Hansen M, Porosk R, Mahlapuu R, Kairane C, Kilk K, Soomets U. GSH synthetic analogue O-methyl-L-tyrosinylglutathione regulates Nrf2-mediated expression of GCLc and GCLm. *J Chem.* 2019;2019:3841219.
117. Hayes JD, McMahon M. The double-edged sword of Nrf2: Subversion of redox homeostasis during the evolution of cancer. *Mol Cell.* 2006;21(6):732-734.
118. Allameh A, Niayesh-Mehr R, Aliarab A, Sebastiani G, Pantopoulos K. Oxidative stress in liver pathophysiology and disease. *Antioxidants (Basel).* 2023;12(9):1653.
119. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(1):59-69.
120. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34(3):497-500.

121. Todorova I, Simeonova G, Kyuchukova D, Dinev D, Gadjeva V. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comp Clin Path.* 2005;13(4):190-194.
122. Lu SC. Dysregulation of glutathione synthesis in liver disease. *Liver Res.* 2020;4(2):64-73.
123. Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact.* 2011;193(3):225-231.
124. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(23):7312-7324.
125. de Andrade KQ, Moura FA, dos Santos JM, de Araújo ORP, Santos JC, Goulart MOF. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Therapeutic possibilities of N-acetylcysteine. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):30269-30308.
126. Chienwichai P, Reamtong O, Boonyuen U, Pisitkun T, Somparn P, Tharnpoophasiam P, et al. Hepatic protein carbonylation profiles induced by lipid accumulation and oxidative stress for investigating cellular response to non-alcoholic fatty liver disease in vitro. *Proteome Sci.* 2019;17(1):2.
127. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 2002;7:d793-807.
128. Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res.* 2010;316(17):2713-2722.
129. Shirai Y, Kawata S, Tamura S, Ito N, Tsushima H, Takaishi K, et al. Plasma transforming growth factor- β 1 in patients with hepatocellular carcinoma: Comparison with chronic liver diseases. *Cancer.* 1994;73(9):2275-2279.
130. Okumoto K, Hattori E, Tamura K, Kiso S, Watanabe H, Saito K, et al. Possible contribution of circulating transforming growth factor- β 1 to immunity and prognosis in unresectable hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2004;24(1):21-28.
131. Mirvish SS. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer. *Cancer Lett.* 1995;93:17-48.
132. Saygili E, Aksoy, Akcay T. Alkilleyici maddelerin tümör ve savunma mekanizması. *Anadolu Dergisi.* 2009 Jan;10(1):40-7.
133. Verna L, Whysner J, Williams GM. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther.* 1996;71(2):57-81.

134. Romualdo GR, Leroy K, Costa CJS, Prata GB, Vanderborght B, da Silva TC, et al. In vivo and in vitro models of hepatocellular carcinoma: Current strategies for translational modeling. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5583.
135. Aleksic K, Lackner C, Geigl JB, Schwarz M, Auer M, Ulz P, et al. Evolution of genomic instability in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*. 2011;53(3):895-904.
136. Saenger W. Physical properties of nucleotides: Charge densities, pK values, spectra, and tautomerism. In: *Physical Properties of Nucleotides*. Berlin: Springer; 1984. p. 105-106.
137. Chiorcea-Paquim AM, Oliveira-Brett AM. Electrochemistry of chemotherapeutic alkylating agents and their interaction with DNA. *J Pharm Biomed Anal*. 2023;222:115036.
138. Zheng J, Lin T, Chen W. Removal of the precursors of N-nitrosodiethylamine (NDEA) in drinking water treatment process and its toxicity to adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 2018;191:1028-1037.
139. Zaitseva NV, Ulanova TS, Dolgikh OV, Nurislamova TV, Mal'tseva OA. Diagnostics of early changes in the immune system due to low concentration of N-nitrosamines in the blood. *Bull Exp Biol Med*. 2018;164(3):334-338.
140. Romualdo GR, Leroy K, Costa CJS, Prata GB, Vanderborght B, da Silva TC, et al. In vivo and in vitro models of hepatocellular carcinoma: Current strategies for translational modeling. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5583.
141. Rao KVN, Vesselinovitch SD. Age- and sex-associated diethylnitrosamine dealkylation activity of the mouse liver and hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. 1973;33:1625-1627.
142. Xin B, Cui Y, Wang Y, Wang L, Yin J, Zhang L, et al. Combined use of alcohol in conventional chemical-induced mouse liver cancer model improves the simulation of clinical characteristics of human hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2017;14(4):4722-4728.
143. Memon A, Pyao Y, Jung Y, Lee JI, Lee WK. A modified protocol of diethylnitrosamine administration in mice to model hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5461.
144. Lee JS, Chu IS, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, et al. Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nat Genet*. 2004;36(12):1306-1311.

145. Akhtar T, Sheikh N. An overview of thioacetamide-induced hepatotoxicity. *Toxin Rev.* 2013;32(3):43-46.
146. Dwivedi DK, Jena GB. Glibenclamide protects against thioacetamide-induced hepatic damage in Wistar rat: Investigation on NLRP3, MMP-2, and stellate cell activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018;391(11):1257-1274.
147. Hajovsky H, Hu G, Koen Y, Sarma D, Cui W, Moore DS, et al. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol.* 2012;25(9):1955-1963.
148. Kimura M, Fujii Y, Yamamoto R, Yafune A, Hayashi SM, Suzuki K, et al. Involvement of multiple cell cycle aberrations in early preneoplastic liver cell lesions by tumor promotion with thioacetamide in a two-stage rat hepatocarcinogenesis model. *Exp Toxicol Pathol.* 2013;65(7-8):979-988.
149. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008;359:378-390.
150. Tümen D, Heumann P, Gülow K, Demirci CN, Cosma LS, Müller M, et al. Pathogenesis and current treatment strategies of hepatocellular carcinoma. *Biomedicines.* 2022;10(12):3202.
151. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 2006;66(24):11851-11858.
152. Wang Z, Shen S, Peng J, Wu D, Liu X, Xu M, et al. Study on several novel crystalline complexes of sorafenib with dicarboxylic acid: Nature identification and solubilization mechanism. *J Mol Struct.* 2025;1323:140451.
153. Zhu YJ, Zheng B, Wang HY, Chen L. New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(5):614-622.
154. Thabut D, Routray C, Lomberk G, Shergill U, Glaser K, Huebert R, et al. Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis. *Hepatology.* 2011;54(2):573-585.
155. Li Y, Xia J, Shao F, Zhou Y, Yu J, Wu H, et al. Sorafenib induces mitochondrial dysfunction and exhibits synergistic effect with cysteine depletion by promoting HCC cells ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;534:877-884.

156. Liu G, Kuang S, Cao R, Wang J, Peng Q, Sun C. Sorafenib kills liver cancer cells by disrupting SCD1-mediated synthesis of monounsaturated fatty acids via the ATP-AMPK-mTOR-SREBP1 signaling pathway. *FASEB J.* 2019;33(9):10089-10103.
157. Lin HH, Feng WC, Lu LC, Shao YY, Hsu CH, Cheng AL. Inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway improves the anti-tumor effects of sorafenib against hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2016;381(1):58-66.
158. Srivastava S, Srivastava AK. Lycopene: Chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. *J Food Sci Technol.* 2015;52(1):41-53.
159. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys.* 1989;274(2):532-538.
160. Vogele AC. Effect of environmental factors upon the color of the tomato and the watermelon. In: *Plant Physiology*. Minnesota Agricultural Experiment Station; 1937. p. 929-955.
161. Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2000;40(1):1-42.
162. Schierle J, Bretzel W, Bühler I, Faccin N, Hess D, Steiner K, et al. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem.* 1997;59(3):459-465.
163. Stahl W, Sies H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J Nutr.* 1992;122(11):2161-2166.
164. Boileau TW, Boileau AC, Erdman JW Jr. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002;227:914-919.
165. Erdman JW Jr, Bierer TL, Gugger ET. Absorption and transport of carotenoids. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;691:76-85.
166. Sies H, Stahl W. Bioavailability of lycopene. *Acta Hort.* 1998;487:389-393.
167. Lee CM, Boileau AC, Boileau TW, Williams AW, Swanson KS, Heintz KA, et al. Review of animal models in carotenoid research. *J Nutr.* 1999;129(12):2271-2277.
168. Boileau TW, Clinton SK, Erdman JW Jr. Tissue lycopene concentrations and isomer patterns are affected by androgen status and dietary lycopene concentration in male F344 rats. *J Nutr.* 2000;130:1613-1618.
169. Trejo-Solís C, Pedraza-Chaverri J, Torres-Ramos M, Jiménez-Farfán D, Cruz-Salgado A, Serrano-García N, et al. Multiple molecular and cellular mechanisms of

- action of lycopene in cancer inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:705121.
170. de Andrade KQ, Moura FA, dos Santos JM, de Araújo ORP, Santos JC, Goulart MOF. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Therapeutic possibilities of N-acetylcysteine. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):30269-30308.
 171. Corso CR, Acco A. Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;128:43-57.
 172. Tenório MCDS, Graciliano NG, Moura FA, de Oliveira ACM, Goulart MOF. N-acetylcysteine (NAC): Impacts on human health. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(6):967.
 173. Crupi R, Gugliandolo E, Siracusa R, Impellizzeri D, Cordaro M, Di Paola R, et al. N-acetyl-L-cysteine reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in BALB/c mice. *BMC Vet Res*. 2020;16(1):13.
 174. Aggarwal A, Yuan Z, Barletta JA, Lorch JH, Nehs MA. Ketogenic diet combined with antioxidant N-acetylcysteine inhibits tumor growth in a mouse model of anaplastic thyroid cancer. *Surgery*. 2020;167(1):87-93.
 175. Kim DJ, Takasuka N, Kim JM, Sekine K, Ota T, Asamoto M, et al. Chemoprevention by lycopene of mouse lung neoplasia after combined initiation treatment with DEN, MNU and DMH. *Carcinogenesis*. 1997;18:561-567.
 176. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82:70-77.
 177. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988;34(3):497-500.
 178. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351-358.
 179. Lück H. Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. 1965. p. 885-894.
 180. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):158-169.
 181. Moron MS, Depierre JW, Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochim Biophys Acta*. 1979;582:67-78.
 182. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1994;233:346-357.

183. Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem.* 1963;35(12):1961-1965.
184. Ellis AJ, Curry VA, Powell EK, Cawston TE. The prevention of collagen breakdown in bovine nasal cartilage by TIMP, TIMP-2 and a low molecular weight synthetic inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;201:94-101.
185. Adjakly M, Ngollo M, Boiteux JP, Bignon YJ, Guy L, Bernard-Gallon D. Genistein and daidzein: Different molecular effects on prostate cancer. *Anticancer Res.* 2013;33:39-44.
186. George BP, Chandran R, Abrahamse H. Role of phytochemicals in cancer chemoprevention: Insights. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(9):1455.
187. Gupta P, Bansal MP, Koul A. Evaluating the effect of lycopene from *Lycopersicum esculentum* on apoptosis during NDEA-induced hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;434(3):479-485.
188. Zheng J, Stuff J, Tang H, Hassan MM, Daniel CR, Li D. Dietary N-nitroso compounds and risk of pancreatic cancer: Results from a large case-control study. *Carcinogenesis.* 2019;40(2):254-262.
189. Kim DJ, Takasuka N, Nishino H, Tsuda H. Chemoprevention of lung cancer by lycopene. *Biofactors.* 2000;13(1-4):95-102.
190. Çiftçi N. The role of oxidative stress in cancer: Could antioxidants fuel the progression of cancer? *J Cancer Res Ther.* 2017;13:8-13.
191. Zhang VX, Sze KMF, Chan LK, Ho DWH, Tsui YM, Chiu YT, et al. Antioxidant supplements promote tumor formation and growth and confer drug resistance in hepatocellular carcinoma by reducing intracellular ROS and induction of TMBIM1. *Cell Biosci.* 2021;11(1):191.
192. Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol.* 2016;37(9):11553-11572.
193. Han YM, Ahn HR, Lee DY, Song MY, Lee SW, Jang YK, et al. Therapeutic potential of hongjam in a diethylnitrosamine and thioacetamide-induced hepatocellular carcinoma mouse model. *J Cancer Prev.* 2024;29(4):165-174.
194. Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev.* 2004;202:275-293.
195. Taub R. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J Clin Invest.* 2003;112(7):978-980.

196. Prieto J. Inflammation, HCC and sex: IL-6 in the centre of the triangle. *J Hepatol.* 2008;48(2):380-381.
197. Jiang LN, Liu YB, Li BH. Lycopene exerts anti-inflammatory effect to inhibit prostate cancer progression. *Asian J Androl.* 2019;21(1):80-85.
198. Puah BP, Jalil J, Attiq A, Kamisah Y. New insights into molecular mechanism behind anti-cancer activities of lycopene. *Molecules.* 2021;26(13):3888.
199. Ringelhan M, Pfister D, O'Connor T, Pikarsky E, Heikenwalder M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol.* 2018;19(3):222-232.
200. Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell.* 2005;121(7):977-990.
201. Wang S, Kou B, Chai M, Gao Y, Lin X, Yin L, et al. Knockout of ASPP2 promotes DEN-induced hepatocarcinogenesis via the NF- κ B pathway in mice. *Cancer Gene Ther.* 2022;29(2):202-214.
202. Bingül I, Başaran-Küçükgergin C, Aydın AF, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, et al. Blueberry treatment attenuated cirrhotic and preneoplastic lesions and oxidative stress in the liver of diethylnitrosamine-treated rats. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2016;29(3):426-437.
203. Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in the liver: Linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(2):108-118.
204. Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2007;19(2):154-161.
205. Lo J, Yuen E, Lau T, Hiu R, Ching H, Yik B, et al. Nuclear factor kappa B-mediated CD47 up-regulation promotes sorafenib resistance and its blockade synergizes the effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology.* 2015;62:534-545.
206. Liang L, Wu J, Luo J, Wang L, Chen ZX, Han CL, et al. Oxymatrine reverses 5-fluorouracil resistance by inhibition of colon cancer cell epithelial-mesenchymal transition and NF- κ B signaling in vitro. *Oncol Lett.* 2020;19(1):519-526.
207. Xu X, Lei Y, Chen L, Zhou H, Liu H, Jiang J, et al. Phosphorylation of NF- κ B p65 drives inflammation-mediated hepatocellular carcinogenesis and is a novel therapeutic target. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):1-17.

208. Zimmermann AK, Loucks FA, Schroeder EK, Bouchard RJ, Tyler KL, Linseman DA. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: A molecular basis for BCL-2 antioxidant function at mitochondria. *J Biol Chem.* 2007;282(40):29296-29304.
209. Gupta P, Bansal MP, Koul A. Evaluating the effect of lycopene from *Lycopersicum esculentum* on apoptosis during NDEA-induced hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;434(3):479-485.
210. Corso CR, Acco A. Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;128:43-57.
211. Shang N, Bank T, Ding X, Breslin P, Li J, Shi B, et al. Caspase-3 suppresses diethylnitrosamine-induced hepatocyte death, compensatory proliferation and hepatocarcinogenesis through inhibiting p38 activation. *Cell Death Dis.* 2018;9(5):1-12.
212. Han YM, Ahn HR, Lee DY, Song MY, Lee SW, Jang YK, et al. Therapeutic potential of hongjam in a diethylnitrosamine and thioacetamide-induced hepatocellular carcinoma mouse model. *J Cancer Prev.* 2024;29(4):165-174.
213. Lin H, Huang YS, Fustin JM, Doi M, Chen H, Lai HH, et al. Hyperpolyploidization of hepatocyte initiates preneoplastic lesion formation in the liver. *Nat Commun.* 2021;12(1):1-15.
214. Hanson S, Dharan A, Jinsha PV, Pal S, Nair BG, Kar R, et al. Paraptosis: A unique cell death mode for targeting cancer. *Front Pharmacol.* 2023;14:1-15.
215. Ozcan M, Esendagli G, Musdal Y, Canpinar H, Bacanlı M, Anlar HG, et al. Dual actions of the antioxidant chlorophyllin, a glutathione transferase P1-1 inhibitor, in tumorigenesis and tumor progression. *J Cell Biochem.* 2019;120(5):7045-7055.
216. Boušová I, Skálová L. Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: Possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metab Rev.* 2012;44(4):267-286.
217. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7369-7375.
218. Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, et al. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 1999;18(5):1321-1334.
219. Abdelrahman KS, Hassan HA, Abdel-Aziz SA, Marzouk AA, Narumi A, Konno H, et al. JNK signaling as a target for anticancer therapy. *Pharmacol Rep.* 2021;73(2):405-434.

220. Wu Q, Wu W, Fu B, Shi L, Wang X, Kuca K. JNK signaling in cancer cell survival. *Med Res Rev.* 2019;39(6):2082-2104.
221. Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, et al. p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol.* 1998;143(6):1691-1703.
222. Bocedi A, Noce A, Marrone G, Noce G, Cattani G, Gambardella G, et al. Glutathione transferase P1-1: An enzyme useful in biomedicine and as biomarker in clinical practice and environmental pollution. *Nutrients.* 2019;11(8):1741.
223. Bhatia N, Singh B, Koul A. Lycopene treatment stalls the onset of experimentally induced hepatocellular carcinoma: A radioisotopic, physiological and biochemical analysis. *Hepatoma Res.* 2018;4:3-16.
224. Ip BC, Wang XD. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: Implications for lycopene intervention. *Nutrients.* 2014;6(1):124-162.
225. Punvittayagul C, Taya S, Luangsuphabool T, Wongpoomchai R. Protocatechuic acid suppresses diethylnitrosamine-induced hepatic preneoplastic lesions by inhibiting phase I enzymes, reducing cell proliferation, and promoting apoptosis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(2):1-8.
226. Watanabe S, Kitade Y, Masaki T, Nishioka M, Satoh K, Nishino H. Effects of lycopene and Sho-saiko-to on hepatocarcinogenesis in a rat model of spontaneous liver cancer. *Nutr Cancer.* 2001;39(1):96-101.
227. Hayes JD, McMahon M. The double-edged sword of Nrf2: Subversion of redox homeostasis during the evolution of cancer. *Mol Cell.* 2006;21(6):732-734.
228. Zhang VX, Sze KMF, Chan LK, Ho DWH, Tsui YM, Chiu YT, et al. Antioxidant supplements promote tumor formation and growth and confer drug resistance in hepatocellular carcinoma by reducing intracellular ROS and induction of TMBIM1. *Cell Biosci.* 2021;11(1):1-20.
229. Sun J, Zhou C, Ma Q, Chen W, Atyah M, Yin Y, et al. High GCLC level in tumor tissues is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *J Cancer.* 2019;10(15):3333-3343.
230. Kaleler İ, Yaylım İ. NRF2'nin ikili doğası: Kanser gelişiminde koruyucu ve teşvik edici rolü. *Haliç Univ Fen Bilim Derg.* 2024;7(1):1-16.
231. Hercberg S, Ezzedine K, Guinot C, Preziosi P, Galan P, Bertrais S, et al. Antioxidant supplementation increases the risk of skin cancers in women but not in men. *J Nutr.* 2007;137:2098-2105.

232. Le Gal K, Ibrahim MX, Wiel C, Sayin VI, Akula MK, Karlsson C, et al. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Sci Transl Med*. 2015;7(308):1-7.
233. Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med*. 2014;6:1-7.
234. Aryal B, Rao VA. Specific protein carbonylation in human breast cancer tissue compared to adjacent healthy epithelial tissue. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194164.
235. Shearn CT, Orlicky DJ, Saba LM, Shearn AH, Petersen DR. Increased hepatocellular protein carbonylation in human end-stage alcoholic cirrhosis. *Free Radic Biol Med*. 2015;89:1144-1153.
236. Ariel MF, Mouniya M, Valérie P, Bertrand F, Radman M. Hepatocellular carcinoma protein carbonylation in hepatitis C and metabolic syndrome patients. *Free Radic Biol Med*. 2014;75:S40.
237. Endo H, Niioka M, Sugioka Y, Itoh J, Kameyama K, Okazaki I, et al. Matrix metalloproteinase-13 promotes recovery from experimental liver cirrhosis in rats. *Pathobiology*. 2011;78(5):239-252.
238. Wang B, Ding YM, Fan P, Wang B, Xu JH, Wang WX. Expression and significance of MMP2 and HIF-1 α in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2014;8(2):539-546.
239. Cui Q, Wang X, Zhang Y, Shen Y, Qian Y. Macrophage-derived MMP-9 and MMP-2 are closely related to the rupture of the fibrous capsule of hepatocellular carcinoma leading to tumor invasion. *Biol Proced Online*. 2023;25(1):1-13.
240. Huang CF, Teng YH, Lu FJ, Hsu WH, Lin CL, Hung CC, et al. β -mangostin suppresses human hepatocellular carcinoma cell invasion through inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression and activation of ERK and JNK pathways. *Environ Toxicol*. 2017;32(11):2360-2370.
241. Chen JS, Huang XH, Wang Q, Huang JQ, Zhang LJ, Chen XL, et al. Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of MMP-2 and MMP-9 in liver cancer. *Carcinogenesis*. 2013;34(1):10-19.
242. Torimura T, Sata M, Ueno T, Kin M, Tsuji R, Suzaku K, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor is associated with tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*. 1998;29:986-991.
243. Rogers AB. Stress of strains: Inbred mice in liver research. *Gene Expr*. 2018;19(1):61-67.

244. Kong L, Song C, Ye L, Xu J, Guo D, Shi Q. The effect of lycopene on cytochrome P450 isoenzymes and P-glycoprotein using human liver microsomes and Caco-2 cell monolayer model. *Int J Food Sci Nutr*. 2018;69(7):835-841.
245. Veeramachaneni S, Ausman LM, Choi SW, Russell RM, Wang XD, Mayer J. High-dose lycopene supplementation increases hepatic cytochrome P450E1 protein and inflammation in alcohol-fed rats. *J Nutr*. 2008;138:1329-1335.
246. Wang B, Ding YM, Fan P, Wang B, Xu JH, Wang WX. Expression and significance of MMP2 and HIF-1 α in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2014;8(2):539-546.
247. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14:397-411.
248. Chugh NA, Bhatia N, Gupta P, Koul A. Lycopene enriched tomato extract exerts modulatory effects on hypoxia, angiogenesis and metastasis during NDEA-induced hepatocellular carcinoma in mice. *Indian J Biochem Biophys*. 2024;61(5):290-304.
249. Abdallah IZA, Khattab HAH. Protective role of lycopene against diethylnitrosamine-induced experimental hepatocarcinogenesis. *Egypt J Hosp Med*. 2004;16:1684-1697.
250. Poon RTP, Lau C, Pang R, Ng KK, Yuen J, Fan ST. High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(6):1835-1845.
251. Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: Bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol*. 2013;31(17):2205-2218.
252. Giarratana AO, Prendergast CM, Salvatore MM, Capaccione KM. TGF- β signaling: Critical nexus of fibrogenesis and cancer. *J Transl Med*. 2024;22(1):1-15.
253. Gao W, Kim H, Feng M, Phung Y, Xavier CP, Rubin JS, et al. Inactivation of Wnt signaling by a human antibody that recognizes the heparan sulfate chains of glypican-3 for liver cancer therapy. *Hepatology*. 2014;60(2):576-587.
254. Mohamed M. Role of serum glypican-3 as a predictive tool for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Al-Azhar Int Med J*. 2020;1(1):21-30.
255. Yang SL, Fang X, Huang ZZ, Liu XJ, Xiong ZF, Liu P, et al. Can serum glypican-3 be a biomarker for effective diagnosis of hepatocellular carcinoma? A meta-analysis of the literature. *Dis Markers*. 2014;2014:1-12.

EKLER

EK 1. Özgeçmiş



EK 2. Etik Kurul Kararı

