

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÖKSE OTU (*VISCUM ALBUM L.*) EKSTRAKTININ
KARACİĞER DOKUSUNDA İYONİZE RADYASYON
MARUZİYETİNDE RADYOPROTEKTİF ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Hakan VATANSEV

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Bahadır ÖZTÜRK**

KONYA-2022

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÖKSE OTU (*VISCUM ALBUM L.*) EKSTRAKTININ
KARACİĞER DOKUSUNDA İYONİZE RADYASYON
MARUZİYETİNDE RADYOPROTEKTİF ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Hakan VATANSEV

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19202005 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2022

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Bahadır ÖZTÜRK yönetiminde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne doktora tezi olarak sunulmuştur.

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve birikimi ile yetişmemde ve bugünlere gelmemde üzerimde çok büyük emeği olan danışmanım Prof. Dr. Bahadır ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ali ÜNLÜ'ye, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ender ERDOĞAN'a çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sürecinde bana destek ve emek veren Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyesi hocalarına, hayatım boyunca desteğini hep yanımda hissettiğim büyüğüm ve kıymetli hocam Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV'e, çalışma sonuçlarının analizine katkıda bulunan Dr. Öğr. Üyesi Muslu Kazım KÖREZ'e, çalışmalarımdaya bana destek olan tüm biyokimya laboratuvarı çalışanlarına, teknik altyapı ve akademik destekleriyle proje çalışmalarına katkı veren Radyasyon Onkolojisi ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi ve elemanlarına, Üniversitemiz Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi ve İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlükleri ve çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Son olarak, her zaman olduğu gibi bu süreçte de moral ve motivasyon sağlayan başta eşim olmak üzere çocuklarıma, bugünlere gelmemde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli babama ve rahmetli anneme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Radyasyon	4
1.1.1. İyonize olmayan radyasyon.....	4
1.1.2. İyonize radyasyon.....	5
1.2. İyonize Radyasyonun Etki Evreleri.....	5
1.3. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri	6
1.4. Serbest Radikallerin Hücre Bileşenlerine Etkileri.....	7
1.4.1. DNA'ya etkisi.....	7
1.4.2. Membran lipitlerine etkisi	9
1.4.3. Proteinler üzerine etkisi	10
1.4.4. Karbonhidratlar üzerine etkisi	10
1.5. Antioksidan Savunma Sistemleri	10
1.6. Glutasyon Sistemi	12
1.6.1. Glutasyon peroksidaz.....	13
1.6.2. Glutasyon redüktaz	13
1.6.3. Glutasyon transferaz	14
1.7. Radyasyon Hasarını Etkileyen Faktörler.....	14
1.7.1. İyonize radyasyon ile ilgili faktörler	14
1.7.2. Hedef doku ile ilgili faktörler	15
1.8. İyonize Radyasyonun Neden Olduğu Hücre Hasarı.....	16
1.9. Apoptoz	17
1.9.1. Apoptoz aşamaları.....	18
1.9.2. Apoptozun düzenlenmesi	18
1.9.3. Apoptoz mekanizması	20
1.9.4. Apoptozu belirlemede kullanılan yöntemler	21
1.10. Karaciğer	22
1.10.1. Karaciğer histolojisi	23
1.10.2. Karaciğer fizyolojisi	25

1.10.3. Karaciğer'in fonksiyonları	25
1.10.4. Karaciğer hasarı ve hasar oluşum mekanizmaları	27
1.11. Radyoterapi	30
1.11.1. Radyoterapinin yan etkileri	30
1.12. Radyokoruyucu Ajanlar	33
1.13. N-Asetilsistein	35
1.13.1. NAS'in emilimi, atılımı ve biyoyararlanımı	37
1.13.2. NAS'in farmakokinetiği	37
1.13.3. NAS'in biyolojik etkileri.....	37
1.13.4. NAS'in radyokoruyucu etkileri	38
1.14. Ökse Otu.....	41
1.14.1. Botanik özellikleri ve coğrafi dağılımı.....	42
1.14.2. Kimyasal bileşimi.....	43
1.14.3. VA'nun biyolojik etkileri	45
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	55
2.1. Gereçler	55
2.1.1. Kullanılan kimyasallar	55
2.1.2. Cihazlar ve laboratuvar gereçleri	57
2.2. Yöntem	59
2.2.1. Bitki örneklerinin toplanması.....	59
2.2.2. VA ekstraktlarının hazırlanması.....	59
2.2.3. TFM, TAK ve TAA analizleri.....	60
2.2.4. Deneysel çalışma.....	61
2.2.5. Doku homojenatlarının hazırlanması	63
2.2.6. Kan örneklerinin toplanması	63
2.2.7. Serum ALT ve AST düzeylerinin belirlenmesi.....	64
2.2.8. Serum ve doku örneklerinde TAK ve TOK düzeyleri ve OSİ'lerinin belirlenmesi	64
2.2.9. Karaciğer doku örneklerinde 8-OHdG düzeylerinin belirlenmesi	64
2.2.10. Serum M-30 Düzeylerinin Belirlenmesi	65
2.2.11. Karaciğer doku örneklerinden protein izolasyonu	66
2.2.12. Karaciğer doku örneklerinde total protein analizi	66
2.2.13. Karaciğer doku örneklerinde Western Blot yöntemi ile apoptotik protein (Bcl-2, Bax) ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi.....	66

2.2.14. Karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesi ve immünohistokimyasal boyama yöntemleriyle kaspaz 3 ve kaspaz 9 antijen düzeylerinin belirlenmesi	70
2.3. İstatistiksel Analizler	74
3. BULGULAR	75
3.1. TFM, TAK ve TAA Sonuçları	75
3.2. Serum Örneklerinde Biyokimyasal Sonuçlar	77
3.3. Karaciğer Doku Örneklerinde Biyokimyasal Sonuçlar	78
3.4. İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları	80
3.5. Histopatolojik Değerlendirmeler	83
4.TARTIŞMA	87
5.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	98
6.KAYNAKLAR	99
7.EKLER.....	108
Ek-A: Etik Kurul Kararı	108
Ek-B: Turnitin Raporu	109
8. ÖZGEÇMİŞ	111

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT	Alanin aminotransferaz
ALP	Alkalen fosfataz
WR-2721	Amifostin
AMH	Antimüllerian hormon
AST	Aspartat aninotransferaz
API	Apopitotik hücre indeksi
AIF	Apopitoz indükleyici faktör
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
VAE	Avrupa ökse otu
BVA	Badem ökse otu
BER	Baz eksizyon onarım
5mC	5-metilsitozin
dC	Deoksisitozin
NK	Doğal öldürücü
NK-T	Doğal öldürücü T hücre
LET	Doğrusal enerji transferi
TGF- β 1	Dönüştürücü büyüme faktörü- β 1
eV	Elektron-volt
FL	Fosfolipit
GİS	Gastrointestinal sistem
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon-S-transferaz
Gy	Gray

H&E	Hematoksilen&Eozin
HO-1	Hemoksijenaz-1
Hz	Hertz
8-OHdG	8-hidroksi-2-deoksiguanozin
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
ROOH	Hidroperoksit
ICAD	İnaktif kaspaz aktive edici DNaz
GSH	İndirgenmiş glutatyon
IAF	İnhibitör apoptotik faktör
IL	İnterlokin
i.g.	İntragastrik
i.p.	İntraperitoneal
i.v.	İntravenöz
İR	İyonize radyasyon
J	Joule
Ca	Kalsiyum
KC	Karaciğer
C	Karbon
CCl ₄	Karbon tetraklorür
CAD	Kaspaz aktive edici DNaz
KT	Kemoterapi
Kg	Kilogram
ConA	Konkanavalin A
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LPS	Lipopolisakkarit
MDA	Malondialdehit
TIMP-1	Metalloproteinaz doku inhibitörü-1

MTX	Metotreksat
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MPO	Miyeloperoksidaz
NAS	N-asetilsistein
NO	Nitrik oksit
NER	Nükleotid eksizyon onarımı
OSİ	Oksidatif stres indeksi
O ₂	Oksijen
8-oksodG	8-okso-2-deoksiguanozin
VA	Ökse otu
ML-I	Ökse otu lektini-I
ML-II	Ökse otu lektini-II
ML-III	Ökse otu lektini-III
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
PGE2	Prostaglandin E2
RT	Radyoterapi
RILD	Radyasyona bağlı karaciğer hasarı
ROT	Reaktif oksijen türleri
SÜ	Selçuk üniversitesi
Se	Selenyum
Sv	Sievert
COX-2	Siklooksijenaz-2
CK-18/M-30	Sitokeratin-18
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid
STZ	Streptozotosin
s.c.	Subkutan
SH	Sülfidril

S ⁻²	Sülfür
SOD	Süperoksit dismutaz
TBARS	Tiyobarbitürik asit
TAA	Toplam antioksidan aktivite
TAK	Total antioksidan kapasite
TFM	Toplam fenolik madde
TOK	Total oksidan kapasite
TNF- α	Tümör nekroz faktör-alfa
TP53	Tümör protein 53
VCA	<i>V. album var. coloratum</i> agglutinin
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ökse Otu (*Viscum album L.*) Ekstraktının Karaciğer Dokusunda İyonize Radyasyon Maruziyetinde Radyoprotektif Etkilerinin İncelenmesi

Hakan VATANSEV

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2022

İyonize radyasyon (İR)'un iyonizasyon ile doğrudan, serbest radikaller aracılığıyla ise dolaylı olarak hem kanserli hücrelerde hem de komşu normal hücrelerde hasara sebep olduğu bilinmektedir. Bu hasarı önlemeye veya azaltmaya yönelik olarak, çalışmamızda badem ağaçları üzerinden toplanan ökse otlarından elde edilen ekstraktın tek başına veya N-asetilsistein (NAS) ile kombine edilerek kullanıldığında radyoterapi (RT) alan kanser hastalarında oluşabilecek oksidatif hasarın azaltılması başta olmak üzere, yan etkilerin önlenmesinde veya azaltılmasında takviye edici bir bitkisel ürün olarak kullanılıp kullanılmayacağını deneysel hayvan modeli ile ortaya koymayı amaçladık.

Bu kapsamda Nisan-Haziran 2019 döneminde şehir merkezi dışındaki Konya ili ve çevre ilçelerinde yayılış gösteren doğal ağaç toplulukları arasındaki ahlat, söğüt, badem ağaçları üzerinden toplanan ökse otları kullanılarak elde edilen etanolik ekstraktların ilk aşamada toplam fenolik madde (TFM), toplam antioksidan kapasite (TAK) ve antioksidan aktivite (AA) analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre öne çıkan ökse otu (VA) türü olarak belirlenen badem ökse otu (500 mg/kg, i.g.), RT uygulanan deney gruplarında tek başına veya NAS (275 mg/kg/48 saat, i.p.) ile kombine edilerek 14 gün süreyle uygulanmıştır. Uygulama sonunda kan ve karaciğer doku örnekleri toplanmıştır. Serum ve doku örneklerinde biyokimyasal analizler, histopatolojik değerlendirmeler ve immünohistokimyasal çalışmalar yapılmıştır.

Çalışma grupları arasında serum örneklerinde, total oksidan kapasite (TOK) düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık ($p=0,046$) tespit edilmiştir. Diğer parametreler; alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), total antioksidan kapasite (TAK), oksidatif stres indeks (OSİ)'leri ve sitokeratin-18 (M-30) bakımından ise çalışma grupları arasında anlamlı bir fark (sırasıyla $p=0,705$; $p=0,235$; $p=0,066$; $p=0,087$; $p=0,165$) bulunamamıştır. Kontrol grubuna kıyasla RT uygulanan gruplarda, 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir ($p=0,001$). Diğer parametreler (TAK, TOK, OSİ, Bax ve Bcl-2) açısından ise çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık (sırasıyla $p=0,105$; $p=0,298$; $p=0,111$; $p=0,069$; $p=0,469$; $p=0,186$) bulunamamıştır. Çalışma grupları arasında karaciğer doku örneklerinde kaspaz-3 ile boyanan apoptotik hücre sayıları, Dapi ile işaretlenen canlı hücre sayıları ve apoptotik hücre indeks (API)'leri bakımından anlamlı bir farklılık (sırasıyla $p=0,353$; $p=0,075$; $p=0,144$) bulunamamıştır. RT ile indüklenen karaciğer hasarına karşı badem ökse otu (BVA) ekstraktı uygulanan çalışma grubunda, karaciğer doku kesitlerinde portal alanda inflamasyon, santral ven ve sinüzoidal kapillerde genişlemeler varlığında hepatosit bütünlüğünün ve radyal mimarinin RT grubuna kıyasla daha iyi korunduğu, sınırlarının daha net olduğu izlenmiştir. Ayrıca bu grupta, RT+NAS grubundaki kadar yoğun olmasa da, proliferatif alanlar dikkati çekmiştir. RT+NAS grubunda ise, kesit alanına giren portal vende ve devamındaki dağıtıcı dalında konjesyon alanları ve periportal lokalizasyonlu hafif inflamasyon gözlenirken, belirgin reaktif hücre proliferasyonu dikkati gözlenmiştir.

Elde edilen çalışma sonuçlarımıza göre, BVA'nun radyoprotektif etkinliği doğrulanamamıştır. Daha uzun deneysel çalışma süreleriyle planlanacak kapsamlı çalışmalarla BVA'nun radyoprotektif etkinliğinin daha net bir şekilde ortaya konabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz; iyonize radyasyon; karaciğer hasarı; oksidatif stres; ökse otu.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of Radioprotective Effects of Mistletoe (*Viscum album L.*) Extract on Ionizing Radiation Exposure in Liver Tissue

Hakan VATANSEV

Department of Biochemistry

PhD THESIS / KONYA-2022

It is known that ionizing radiation (IR) directly causes damage to both cancerous cells and neighboring normal cells through ionization and indirectly via free radicals. In order to prevent or reduce this damage, in our study, when the extract obtained from mistletoe collected from almond trees was used alone or in combination with N-acetylcysteine (NAS), it was aimed to reduce the oxidative damage that may occur in cancer patients receiving radiotherapy (RT), to prevent or prevent side effects. We aimed to demonstrate with an experimental animal model whether it can be used as a supplemental herbal product in reducing.

In this context, in the first stage, the total phenolic substance (TFM), total antioxidant capacity (TAS) and antioxidant activity (AA) analyzes of the ethanolic extracts obtained by using mistletoe collected from the pewpea, willow and almond trees among the natural tree communities spreading in the province of Konya and its surrounding districts outside the city center during the April-June 2019 period were performed. Almond mistletoe (500 mg/kg, i.g.), which was determined as the prominent mistletoe (VA) species according to the results of this analysis, alone or in combination with NAS (275 mg/kg/48 hours, i.p.) in the RT-treated experimental groups, continued for 14 days. applied for a period of time. At the end of the application, blood and liver tissue samples were collected. Biochemical analyzes, histopathological evaluations and immunohistochemical studies were performed on serum and tissue samples.

There was a significant difference ($p=0.046$) between study groups in terms of total oxidant capacity (TOS) levels in serum samples. There was no significant difference between study groups in terms of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total antioxidant capacity (TAS), oxidative stress indices (OSI) and cytotokerain-18 (M-30) ($p=0.705$, respectively; $p=0.235$; $p=0.066$; $p=0.087$; $p=0.165$) could not be found between other parameters. It was determined that 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) levels were decreased in RT groups compared to the control group ($p=0.001$). No significant difference was found between the study groups in terms of other parameters (TAS, TOS, OSI, Bax, and Bcl-2) (respectively $p=0.105$; $p=0.298$; $p=0.111$; $p=0.069$; $p=0.469$; $p=0.186$). There was no significant difference between study groups in terms of apoptotic cell counts stained with caspase-3, viable cell counts marked with Dapi, and apoptotic cell indices (API) in liver tissue samples ($p=0.353$; $p=0.075$; $p=0.144$, respectively). In the study group, in which almond mistletoe (AVA) extract was applied against RT-induced liver damage, hepatocyte integrity and radial architecture were better preserved and the borders were clearer in the presence of inflammation in the portal area in the liver tissue sections, enlargement of the central vein and sinusoidal capillaries, compared to the RT group. In addition, proliferative areas were noted in this group, although not as intense as in the RT+NAS group. In the RT+NAS group, congestion areas and mild inflammation with periportal localization were observed in the portal vein entering the cross-sectional area and its distribution branch, while significant reactive cell proliferation was observed.

According to our study results, the radioprotective efficacy of AVA could not be confirmed. It is thought that the radioprotective activity of AVA can be revealed more clearly with comprehensive studies to be planned with longer experimental study times.

Key Words: Apoptosis; ionizing radiation; liver damage; mistletoe; oxidative stress.

1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde tüm ölüm nedenlerinin dörtte birini oluşturan, özellikle 85 yaşın altındaki bireyler için başlıca ölüm nedeni olarak, kalp hastalıklarını geride bırakan önemli bir halk sağlığı sorunudur (Siegel ve ark 2012). Kanser, yaşlanan bir popülasyonda artan bir endişe kaynağı olmasının yanında, tedavisine yönelik uygulanması gereken tıbbi yöntemler itibariyle, özellikle gelişmekte olan ülkelerde giderek daha fazla önem kazanmıştır (Thariat ve ark 2013). Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan ana terapötik yaklaşımlar, tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanan cerrahi müdahale, kemoterapi (KT) ve radyoterapi (RT)'dir. Cerrahi müdahale ve RT, birincil metastazsız solid tümörlerin tedavisinde başlıca yöntemlerdir. Ancak cerrahi müdahaleye uygun olmayan komorbiditesi olan hastalarda, derin yerleşimli ve vasküler tutulumu olan tümörlerde RT'ye kombine KT de uygulanmaktadır (Haume ve ark 2016). RT, kanser tedavisinde önemli bir yere sahip olup, kanser hastalarının yaklaşık %50'sinin tedavisinde faydalı sonuçlar vermiştir. RT, tipik olarak yüksek enerjili gama (Y) ışınlarının, X-ışınlarının (fotonlar) veya iyonların ışınlanması ile uygulanan ve doza bağlı olarak kanser hücrelerinde enerji birikimine dayanan bir tedavi yöntemidir. Bu enerji birikimi kanser hücrelerinin beslenmelerinin bozulmasına, DNA hasarına oluşmasına, bölünme ve proliferasyonlarının engellenmesi ve sonucunda ölmelerine neden olmaktadır (Hainfeld ve ark 2008, Delaney ve Barton 2015).

İyonize radyasyon (İR)'un iyonizasyon ile doğrudan, serbest radikaller aracılığıyla ise dolaylı olarak hem kanserli hücrelerde hem de komşu normal hücrelerde hasara sebep olduğu bilinmektedir. Bu hasarı önlemeye veya azaltmaya yarayan maddelerle uygulanan bir desteğin, radyasyonun hem kanserli hücrelere yanıtını artırıp, hem de normal hücreler üzerine toksik etkisini azaltarak, tedavi düzeyini artırabileceği düşünülmektedir. Günümüze kadar İR uygulamalarına yönelik çeşitli modern teknikler geliştirilmiştir. Gelişen tekniklere rağmen, tedavi sırasında ve sonrasında sağlıklı dokuların da hasar görmesi sonucunda meydana gelen bazı yan etkiler ve komplikasyonlar tedaviyi sınırlamıştır (Smith ve DeCosse 1986). Bu nedenle genetik materyalle etkileşim sonucu meydana gelen mutasyonlar aracılığı ile hasarlar daha sonraki kuşaklarda ciddi tehlikeler oluşturabileceğinden, antitümoral etkinliği değiştirmeksizin sağlıklı dokuları radyasyon hasarından koruyacak yeni biyolojik ve kimyasal yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Prasad

ve ark 2002). RT'nin sağlıklı dokulardaki hasar verici etkisini azaltmak için radyoprotektör (radyokoruyucu) adı verilen kimyasal ajanlar kullanılmaktadır. Radyokoruyucuların ortak özelliği, İR nedeniyle oluşan serbest radikallerin sağlıklı hücrelere olan toksik etkilerini azaltmalarıdır. Bunun yanında radyasyonun kanser hücreleri üzerindeki tahrip edici etkisinin azalmaması istenir. Yapılan bilimsel araştırmalar kanser tedavisinde RT'nin hastalar üzerinde ciddi yan etkiler oluşturduğunu, özellikle uygulama sonrası serbest radikaller aracılığı ile ortaya çıkan oksidatif hasarın hedeflenen tedavi başarısını düşürdüğünü göstermiştir (Sert ve MS 1996).

Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasarı giderebilmek için birçok çalışmada kullanılan bitkilerden biri olan ökse otu (VA-*Viscum album L.*), saçak köklerinin yardımıyla iğne yapraklı (çam, köknar ve ladin vb.), meyve (kiraz, elma, kayısı, erik, ahlat, badem vb.), kış mevsiminde yapraklarını döken (söğüt, kestane, meşe, kavak, kızılağaç vb) ağaçların veya çalılıarın üzerinde yetişen yarı parazit bir bitkidir (Baytop 1984, Yesilada ve ark 1998). VA'ndan elde edilen ekstraktlar, tamamlayıcı kanser terapisinin en sık kullanılan formu olup, uzun zamandır kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ekstraktlar başlıca Almanya, Avusturya ve İsviçre'deki çeşitli firmalar tarafından tüm dünyaya pazarlanmakta ve özellikle Avrupa'da standart KT veya RT ile birlikte adjuvan tedavi protokollerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu ticari ürünler pek çok araştırmaya konu olmuş ve sahip oldukları polifenolik bileşenleri sayesinde antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antikanser etkiye sahip oldukları yapılan bilimsel çalışmalar ile ortaya konmuştur. Ürünün hazırlanma şekli, bitki materyalinin toplanma zamanı ve bitkinin üzerinde yaşadığı konakçı ağaç türüne göre bu ürünlerin kimyasal içeriğinin farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca bu ekstraktların kanser hastalarının tedavi sürecinde KT ve RT'den kaynaklı ortaya çıkan yan etkileri azalttığı ve immün sistem üzerinde düzenleyici role sahip olduğu yapılan *in vitro* ve *in vivo* birçok çalışmayla gösterilmiştir (Narimanov ve ark 1992, Kuttan ve Kuttan 1993, Möckel ve ark 1997, Sakallı Çetin ve Özcelik 2007, Murthuza ve ark 2016).

Karaciğer (KC) enerji metabolizması, detoksifikasyon, safra üretimi ve protein sentezi gibi pek çok biyokimyasal süreçte önemli işlevleri olan bir organdır. KC alt torasik ve abdominal tümörlere karşı sıklıkla uygulanan RT sırasında tesadüfen ışınlanır (Pan ve ark 2010). KC diğer organlarla karşılaştırıldığında, rölatif

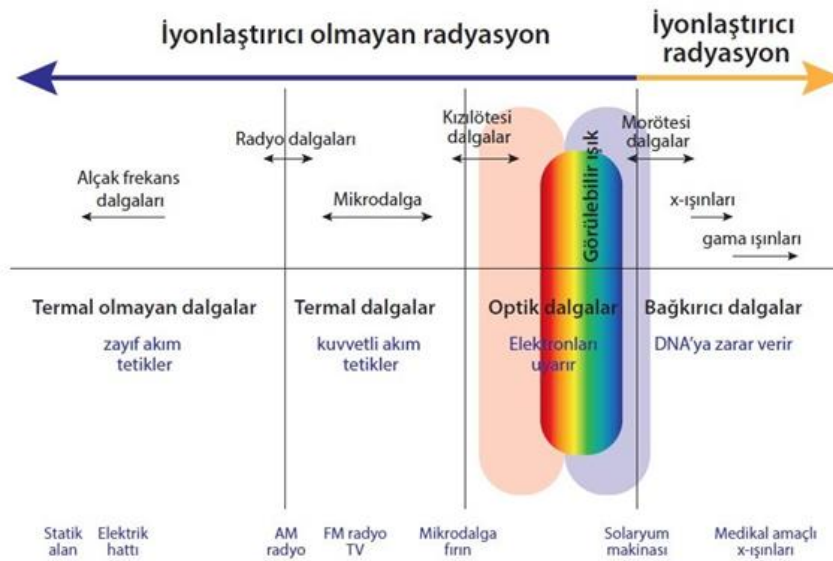
olarak radyasyona karşı daha duyarlı bir organdır ve radyasyon maruziyetinden sonra bu organın metabolik fonksiyonlarında önemli derecede değişiklikler oluşmaktadır (Barshishat-Kupper ve ark 2014).

Tez çalışmamızın hipotezi; farklı VA türlerine ait ekstraktların toplam fenolik madde, toplam antioksidan kapasite ve antioksidan aktivite analizleri yapılarak, öne çıkan VA türüne ait ekstraktın tek başına veya N-asetilsistein (NAS) ile kombine edilerek kullanıldığında RT alan kanser hastalarında oluşabilecek oksidatif hasarın azaltılması başta olmak üzere, yan etkilerin önlenmesinde veya azaltılmasında, hastaların yaşam kalitesinin iyileştirilmesinde takviye edici bir bitkisel ürün olarak kullanılıp kullanılmayacağını deneysel hayvan modeli ile ortaya koymaktır.

Bu kapsamda Nisan-Haziran 2019 döneminde şehir merkezi dışındaki Konya ili ve çevre ilçelerinde yayılış gösteren doğal ağaç toplulukları arasındaki ahlat, söğüt, badem ağaçları üzerinden toplanan VA bitkilerinden elde edilen ekstraktların ilk aşamada ayrı ayrı toplam fenolik madde (TFM), toplam antioksidan kapasite (TAK) ve antioksidan aktivite (AA) analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre öne çıkan VA türü olarak badem (*Amygdalus communis L.*) ökse otu belirlenmiş, badem ökse otu (BVA)'na ait ekstrakt sabit dozda (500 mg/kg) farklı deney gruplarında RT ve NAS ile kombine edilerek uygulanmıştır. Uygulama sonunda KC dokularının histopatolojik değerlendirmeleri yapılmış, immünohistokimyasal boyama yöntemleriyle kaspaz-3 antijen düzeyleri belirlenerek apoptotik indeksler hesaplanmıştır. KC dokularında total protein analizi yapılarak, apoptotik protein ekspresyon düzeyleri (Bcl-2, Bax) Western Blot yöntemi ile belirlenmiştir. KC doku örneklerinde DNA hasarını göstermek için, DNA izolasyonu sonucu elde edilen nükleer ekstraktlarda 8-OHdG ölçümleri elisa yöntemiyle yapılmıştır. KC doku örneklerinde; total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan kapasite (TOK) düzeyleri spektrofotometrik yöntem ile analiz edilerek, oksidatif stres indeks (OSİ)'leri hesaplanmıştır. Serum örneklerinde alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), TAK, TOK, sitokeratin-18 (M30) düzeyleri spektrofotometrik ve immünolojik yöntemler ile analiz edilerek, OSİ'leri hesaplanmıştır.

1.1. Radyasyon

Radyasyon, dalgalar veya parçacıklar şeklinde hareket eden ve günlük çevremizin bir parçası olan enerji türüdür. İnsanlar kozmik ışınların yanı sıra toprakta, suda, havada, gıdalarda bulunan ve tıbbi amaçlı kullanılan radyoaktif maddelerden radyasyona maruz kalmaktadır. Radyasyon kaynakları tıpta ve endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Canlı organizmalar, radyasyonun neden olduğu hücresel hasardan önemli derecede etkilenir. Tıbbi amaçlı uygulanan radyasyon hem hastalıklı dokuları, hem de sağlıklı dokuları etkilemektedir. İnsanlarda radyasyon kaynağı, uygulanan radyasyon dozu, uygulama süresi ve radyasyon uygulanan bireyin genetik ve epigenetik yapısı gibi faktörlere bağlı olarak, radyasyona karşı geniş bir yanıt aralığı vardır (Reisz ve ark 2014). Radyasyon dozu için uluslararası ölçü birimi olarak, J/kg kütle şeklinde tanımlanan Gray (Gy) kullanılır. Yani radyasyon uygulanan 1 kg maddenin soğurduğu 1 J'lük radyasyon enerjisine 1 Gy denir. Radyasyonun, iyonize olmayan ve iyonize olan radyasyon olmak üzere 2 türü vardır (Khong ve ark 2013).



Şekil 1.1. Radyasyon türleri (<https://www.afad.gov.tr/kbrn/radyasyon-nedir>).

1.1.1. İyonize olmayan radyasyon

İyonize olmayan radyasyon bir güç kaynağı tarafından üretilen, belirli bir dalga boyuna sahip ve uzayda elektromanyetik dalgalar şeklinde hareket edebilen bir enerji şeklidir. İyonize olmayan radyasyonun bir molekülü veya bir atomu uyararak için çok az enerjisi vardır. İyonize olmayan radyasyon kaynakları arasında radyo frekansları, kızılötesi, mikrodalgalar ve düşük enerjili elektromanyetik dalgalar yer

alır. Bu radyasyon türüne kısaca ultraviyole radyasyon da denir. Uzun bir dalga boyuna (>100 nm) ve düşük bir foton enerjisine ($<12,4$ eV) sahiptirler. Elektromanyetik spektrumun 1 Hz'den 3×10^{15} Hz'e kadar olan kısmını kapsarlar (Bisht ve ark 2021).

1.1.2. İyonize radyasyon

İR çok kısa dalga boylarına, yüksek yoğunluğa ve etkileştiği maddedeki atom veya moleküllerden elektron koparabilecek kadar yüksek enerjiye sahip bir radyasyon türüdür. Alfa parçacıkları, beta parçacıkları, X ışınları, gama ışınları ve elektron ışınları iyonlaştırıcı radyasyonların en yaygın örnekleridir. Eşit İR dozları, biyolojik hedefin kaynağına ve özelliklerine bağlı olarak farklı etkiler ortaya çıkardığından, eşdeğer dozu ifade etmek için Sievert (Sv) birimi kullanılır. Bireyler doğal kaynaklardan yılda ortalama 2.4 mSv radyasyon alırlar, ancak bu rakam gelişmiş ülkelerde daha da artmaktadır. Gama ışınlarının (K-40) doğal kaynakları mevcut olmakla birlikte, araştırma ve tedavilerde en yaygın kullanılan gama ışınları, Co-60 ve Cs-137 gibi yapay kaynaklardan elde edilmektedir. Bilgisayarlı tomografi (BT) taramaları da dahil olmak üzere X-ışınlarından elde edilen radyasyon ise gama ışınlarına benzemekle birlikte, daha düşük enerjili bir IR şeklidir. X-ışınları ile insan vücudunda fotoelektrik etki nedeniyle, yumuşak doku kadar verimli bir şekilde nüfuz edilemeyen kemikler gibi kısımlar görüntülenebilir. BT taraması, X-ray'den daha kapsamlı tarama imkanı sağlar, ancak hasta X-ray görüntülemesi (0,01-0,15 mGy) ile karşılaştırıldığında daha yüksek radyasyon dozuna (15-30 mGy) maruz kalır (Brenner ve Hall 2007, Reisz ve ark 2014).

İR'un doğrudan ve dolaylı olmak üzere farklı hücresel etkileri vardır. DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi hücresel bileşenler İR tarafından doğrudan hasar görürken, insan vücudunda büyük oranda su bulunduğu göz önünde bulundurularak, suyun radyolizi sonucu açığa çıkan serbest radikaller aracılığıyla da hücreler dolaylı hasara uğrar (Reisz ve ark 2014).

1.2. İyonize Radyasyonun Etki Evreleri

İR'un canlı sistemlerdeki başlıca etkileri 3 evrede incelenir. Bunlar;

Fiziksel evre: İR'un dokuları oluşturan atom ve moleküllerle ilk etkileşim evresidir. Radyasyon enerjisi hedef dokuya aktarılır ve bunun sonucunda dokuyu oluşturan

atom ve moleküllerde iyonizasyon (uyarılma) meydana gelir. İyonizasyon sonucu meydana gelen serbest elektronlar vasıtasıyla diğer komşu atom ve moleküllerde de iyonizasyon gerçekleşir ve bu süreç bir reaksiyon zinciri ile devam eder. Zincir reaksiyonlar ile ortaya çıkan ürünler kararsız olup, kısa sürede ikincil reaksiyonlara katılırlar.

Kimyasal evre: İkincil reaksiyonların meydana geldiği evredir. Bu evrede son derece reaktif olan serbest radikaller, hem kendi içlerinde hem de ortamdaki diğer atom ve moleküllerle reaksiyona girerler. Serbest radikal reaksiyonları, radyasyonun dokularca emiliminden hemen sonra çok kısa bir süre içerisinde gerçekleşir.

Biyolojik evre: Radyasyonun son biyolojik etkilerinin ortaya çıktığı evredir. Bu evre bazı hasarlara neden olan enzimatik reaksiyonlarla başlar. Enzimatik reaksiyonlar sonucunda hücre çekirdeği ve sitoplazmada morfolojik değişimler, kromatinlerde hasar, mitoz hızında farklılaşma ve hücreler arası sinyalizasyonda bozulmalar görülür. DNA'da onarılabılır veya onarılamaz hasarlar oluşurken, onarılamayan hasarlar nihayetinde hücrenin ölümüne neden olur. Bunun yanında İR genetik bozukluklara ve kansere de neden olabilir (Hall ve Giaccia 2006).

1.3. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri

İR'un biyolojik etkileri yapısal; kalıtsal veya somatik etkiler ve maruziyet sonrası zamana göre; erken (deterministik) veya geç (sitokastik) etkiler olmak üzere farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Deterministik etkiler, uygulanan radyasyona bağlı ortaya çıkması muhtemel yani öngörülebilir etkilerdir. Yanıtın doza bağlı olduğu ve bir radyasyon dozu eşiğinin bulunduğu uygulamalarda ortaya çıkarlar. Bilinen deterministik etkilere, radyasyona bağlı gelişen akciğer fibrozisi ve katarakt örnek olarak verilebilir. Sitokastik etkiler ise öngörülemeyen etkiler olup, bir radyasyon dozu eşiğinin bulunmadığı uygulamalarda ve genellikle düşük doz radyasyon uygulamasına bağlı kronik maruziyet sonucu ortaya çıkar (Elgazzar ve Kazem 2015). İR'un biyolojik etkileri, doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki ana mekanizma aracılığıyla ortaya çıkar.

1- Doğrudan Etkisi: DNA'nın tek veya çift sarmal yapısında kromozomal kırılmalar sonucu gerçekleşen DNA hasarı başta olmak üzere, enzimler, yapısal proteinler ve

RNA gibi hücrelerde ve diğer tüm atomlar veya moleküllerde ortaya çıkan hasarlardır.

2- Dolaylı Etkisi: Hücresel suyun radyoliziyle oluşan serbest radikallerle ortaya çıkar. Bu serbest radikaller, kimyasal modifikasyonlar aracılığıyla hücresel bileşenlerle, özellikle DNA'daki atomlar ve moleküllerle etkileşime girerek hücre toksisitesini artırır. Hücresel suyun radyolizi ile serbest radikallerin (H^{\bullet} , OH^{\bullet}) oluşumu aşağıda verilmiştir;

- $H_2O + \dot{I}R \rightarrow e^{-} + H_2O^{+}$
- $e^{-} + H_2O \rightarrow H_2O^{-}$
- $H_2O^{-} \rightarrow OH^{-} + H^{\bullet}$
- $H_2O^{-} \rightarrow H^{+} + OH^{\bullet}$

Hücredeki çözünmüş oksijen konsantrasyonu fazla ise, ikincil serbest radikal oluşumları meydana gelir. Artmış oksijen konsantrasyonu, oluşan ikincil serbest radikallerin stabilitesini de artırır (Cotran ve ark 1999, Prasad ve ark 2002, Prasad 2020).

- $H^{\bullet} + O_2 \rightarrow HO_2^{\bullet}$ (hidroperoksil serbest radikalleri)
- $HO_2^{\bullet} + HO_2^{\bullet} \rightarrow H_2O_2^{\bullet}$ (hidrojen peroksit) + O_2

1.4. Serbest Radikallerin Hücre Bileşenlerine Etkileri

Serbest radikaller son orbitallerinde bir veya birden çok eşleşmemiş elektronu bulunan, kararsız, elektriksel açıdan genellikle yüksüz olmakla birlikte yüklü de olabilen, son derece reaktif atom veya moleküllerdir Serbest radikaller canlı organizmalarda normal metabolik süreçler sırasında oluşacağı gibi, çeşitli dış etkenlerin aracılığıyla da oluşabilmektedir. Bu dış etkenlerden biri de $\dot{I}R$ 'dur. $\dot{I}R$ 'un dolaylı etkisiyle aktive olan serbest radikaller hücre bileşenleri ile etkileşerek birçok oksidatif hasara sebep olur. Bu hasarlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir (Valko ve ark 2007).

1.4.1. DNA'ya etkisi

Serbest radikaller DNA ile etkileşerek hidrojen bağlarının kopmasına, çapraz bağlanmalara, tek veya çift sarmalda zincir kırılmalarına, baz değişiklerine, baz hasarlarına ve şeker ile fosfat konfigürasyonunun bozulmasına neden olmaktadır.

Oluşan küçük zincir kırıkları hücre ölümüne neden olmazken, büyük zincir kırıkları ise genellikle onarılsa bile sonraki jenerasyonlarda ölümcül olabilmektedir (Arslan 2017).

İR'a bağlı oluşan oksidatif hasarın düzeyini belirlemeye yönelik, son dönemde kullanılan analitik yöntemlerin duyarlılığındaki gelişmeler, İR'a veya diğer mutajenik etkilere maruz kalmayan normal hücrelerin de DNA'sında baz ve nükleotid değişikliklerinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Elde edilen analiz sonuçları, bazı endojen biyokimyasal süreçlerin genetik mutasyonların ortaya çıkmasına büyük ölçüde katkıda bulunduğunu göstermiştir. Normal hücresel metabolik süreçlerde bile genel olarak O₂ ve H₂O₂ aracılığı ile oluşan reaktif oksijen türleri (ROT)'nin, önemli derecede depurinasyonlara ve depirimidinasyonlara neden olduğu, DNA'daki bazlarda, örneğin deoksiguanozin (dG)'in 8-okso-2-deoksiguanozin (8-oksodG)'e oksidasyonu gibi günde yaklaşık 100-500 hasar oluştuğu görülmüştür. Bu hasarların oluşum hızının, canlılarda oksidatif metabolizma hızı ile yakından ilgili olduğu, dolaşımda oksijen konsantrasyonu arttığında, DNA'da baz oksidasyon hızının da arttığı bildirilmiştir (Ames 1989, Lindahl 1993).

Okside olmuş bazların onarılamaması sonucu, DNA replikasyonu sırasında mutasyon riski artmaktadır. Örneğin, 8-oksodG, deoksisitozin (dC) yerine deoksiadenozin (dA) ile yanlış eşleşerek bir sitozin-adenin nokta mutasyonuna neden olabilmektedir. Baz oksidasyonu, depurinasyon ve depirimidinasyona ek olarak, DNA'da başka spontan hasarlar da meydana gelebilir. Esas olarak memeli genomundaki sitozin-guanin çiftlerinde, sitozinin 5-metilsitozine (5mC) modifikasyonu ile sonuçlanan S-adenosilmetiyonin reaksiyonunun neden olduğu, timin üreten mutajenik bir bölge oluşturur. Timin normal DNA'nın bir bileşeni olduğundan timin-guanin baz çifti tespit edilemeyebilir ve sonraki replikasyon döngüsünde kalıp görevi görerek sitozin-timin nokta mutasyonuna yol açar. Bu durumda bazı savunma mekanizmaları, DNA bütünlüğünü yeniden sağlamak için harekete geçer. DNA hasarına yanıt olarak savunma hücreleri, DNA hasarlarının onarımı için zaman oluşturmak adına hücre döngüsü kontrol noktalarını etkinleştirir. Bu aşamada, baz eksizyon onarım (BER) mekanizması, spontan baz modifikasyonlarını, bazik olmayan bölgeleri ve tek zincir kırıklarını tanır ve onarır. Nükleotid eksizyon onarımı (NER), uyumsuzluk onarımı ve çift zincir kırıkları

onarımı dahil olmak üzere diğer DNA onarım mekanizmaları da, diğer DNA hasarları onarılmaya çalışılır (Holliday ve Grigg 1993, Azzam ve ark 2012).

Işınlama sırasında ve hemen sonrasında ortaya çıkan ROT'ı, normal metabolik süreçlerde ortaya çıkan ROT'lara benzer, fakat mikro dağılım açısından bakıldığında ışınlama sonrası O₂ ve H₂O₂ konsantrasyonlarına bağlı olarak, hücre OH radikal konsantrasyonlarının aşırı yükseldiği görülür. Ayrıca İR uygulamalarında katedilen birim mesafe başına enerji kaybını ifade eden doğrusal enerji transferi (LET) açısından, düşük doğrusal enerji transferli (LET) İR'un neden olduğu biyolojik hasarın yaklaşık 2/3'ünün, İR'un dolaylı etkisinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Yüksek LET'li İR'un biyolojik hasarı ise, İR'un doğrudan etkisinden kaynaklanmaktadır. Endojen kaynaklı DNA hasarı da öncelikle İR'un dolaylı etkisinden ileri gelmektedir. Gaz kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, immünoassay ve Comet Assay gibi teknikler ile İR'un DNA üzerinde neden olduğu doğrudan ve dolaylı etkisi kantitatif olarak analiz edilebilmektedir (Feinendegen 2002, Azzam ve ark 2012).

1.4.1.1. 8-hidroksi-2- deoksiguanozin

Guaninin, DNA'da yer alan bazlar arasında iyonizasyon potansiyeli en yüksek baz olması ve Cu⁺² iyonlarının guanin-sitozin baz çiftlerince zengin DNA bölgelerinde bulunması nedeniyle oksidasyona en fazla maruz kalan bazdır. Bu yönüyle 8-OHdG, ROT'inin neden olduğu oksidatif hasarın düzeyini belirlemede en sık kullanılan ve DNA baz hasarlarında mutajenitesi en iyi bilinen parametrelerden biridir. Canlılarda 8-OHdG düzeyi, endojen veya eksojen kaynaklara bağlı olarak ortaya çıkan ROT'ların DNA'daki hasar derecesini yansıtır. DNA, OH radikalleri ile oksidasyona uğradığında, guanin molekülünün dördüncü, beşinci ve sekizinci karbon (C) atomları OH radikalleriyle etkileşerek DNA radikalleri oluşturur. Bu etkileşim 8. C atomundaki çift bağ ile gerçekleştiği zaman 8-OHdG oluşur. Artmış 8-OHdG düzeyleri ile paralellik gösteren bu hasar da, replikasyon aşamasında kalıptan yanlış okumayla bir önceki konu başlığında bahsettiğimiz mutasyonlara neden olur (McDorman ve ark 2005).

1.4.2. Membran lipitlerine etkisi

Serbest radikaller hücre membranının yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımına neden olarak lipit peroksidasyonuna yol açar. Lipit

peroksidasyonu, hidroperoksitlerin başlıca aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşümü ile son bulur (Girotti 1998).

1.4.3. Proteinler üzerine etkisi

Serbest radikallerin hücresel aşırı birikimi ile proteinler ve protein yapılı bileşiklerin (enzimler) üç boyutlu konformasyonları bozular. Serbest radikaller polipeptit zincirinde spesifik bölgelerde yoğunlaşarak fonksiyon kayıplarına neden olur. Sonuçta karbon ve sülfür merkezli serbest radikaller meydana gelir (Dröge 2002).

1.4.4. Karbonhidratlar üzerine etkisi

Serbest radikaller monosakkaritlerle reaksiyona girerek okzoaldehitleri ve peroksitleri meydana getirir. Okzoaldehitler, DNA ve proteinlere bağlanarak çapraz bağlanmalar oluşturur ve hücre mitozunu inhibe eder. Okzoaldehitler'in yaşlanma ve karsinogenepte önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Kalapos 2008).

1.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlılarda DNA, lipit, protein ve karbonhidratlar gibi hücresel bileşenlerin oksidatif hasarını önleyen veya inhibe eden maddeler antioksidanlar olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar, insanlarda vücut tarafından karşılanıp karşılanamama durumuna göre; endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere 2'ye ayrılırken, endojen antioksidanlar kendi içinde enzim ve enzim olmayanlar, eksojen antioksidanlar da yine kendi içinde vitamin ve ilaç olarak kullanılan antioksidanlar şeklinde 2'ye ayrılır. Antioksidanların sınıflandırılması Çizelge 1.1.'de verilmiştir (Mercan 2004).

Çizelge 1.1. Antioksidanların sınıflandırılması.

Endojen Antioksidanlar		Eksojen Antioksidanlar	
Enzim olan endojen antioksidanlar	Enzim olmayan endojen antioksidanlar	Vitaminler	İlaçlar
Süperoksit dismutaz (SOD)	Sistein	E vitamini	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
Glutasyon peroksidaz (GSHPx)	Metiyonin	A vitamini	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar)
Glutasyon S-Transferaz (GST)	Glutasyon	Askorbik asit	Rekombinant süperoksit dismutaz
Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD)	Hemoglobin	Folik asit	Trolox-C
6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD)	Miyoglobin		Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
Glutasyon redüktaz (GR)	Ferritin		Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
Katalaz	Transferin		Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi	Seruloplazmin		Nötrofil adezyon inhibitörleri
Hidroperoksidaz	Melatonin		Sitokinler (TNF ve IL-1)
	Bilirubin		Barbitüratlar
	Laktoferrin		Demir şelatörleri
	Albumin		

Canlılarda oksijen varlığında serbest radikaller sürekli oluşmakta, fakat oluşan bu serbest radikallerin zararlı etkileri antioksidan savunma sistemleri ile önlenmektedir. Canlılarda serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı arasında bir denge mevcuttur. Hücresel düzeydeki bu denge haline oksidatif denge denir. Oksidatif denge korunduğu müddetçe, organizma serbest radikallerden olumsuz etkilenmemektedir. Hücresel serbest radikal konsantrasyonu arttığında veya bu serbest radikallerin ortadan kaldırılma hızında bir azalma olduğunda, oksidatif denge serbest radikaller tarafına kayar ve oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres sonucu doku hasarları ve hücre ölümüne varan pek çok patolojik durum ortaya çıkar (Maxwell 1995, Durak ve ark 2001). Antioksidanlar etkilerini 2 farklı yolla gösterirler:

1- Serbest radikal oluşumunun engellenmesi: 3 temel mekanizma ile sağlanır. Bunlar;

a) Başlatıcı reaktif türlerin uzaklaştırılması,

b) Oksijenin uzaklaştırılması veya konsantrasyonunun azaltılması,

c) Metal iyonlarının uzaklaştırılması.

2- Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi: 4 farklı etki mekanizması vardır. Bunlar;

a) **Zincir kırıcı etki:** Antioksidanlar tarafından serbest radikallerin bağlanması ve zincir reaksiyonlarına katılımlarının engellenmesi.

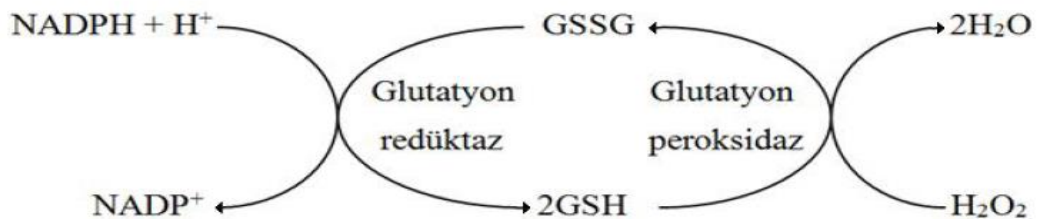
b) **Süpürücü etki:** Serbest radikallerin antioksidanlarca bağlanarak düşük reaktif etkili diğer moleküllere dönüştürülmesi.

c) **Bastırıcı etki:** Antioksidanlarca eklenen protonlarla serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi.

d) **Onarıcı etki:** Oksidatif hasara uğrayan moleküllerin onarılması (Maxwell 1995).

1.6. Glutasyon Sistemi

Glutasyon başlıca KC olmak üzere birçok dokuda yüksek konsantrasyonlarda bulunan, glutamat, sistein ve glisin bir araya gelerek oluşturduğu bir tripeptittir. Antioksidan ve redükte edici bir maddedir. Glutasyonun antioksidan kabiliyeti yapısındaki tiyol grubundan ileri gelir. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon transferaz (GST) gibi enzimlerin kofaktörüdür. Oksidan maddelere karşı, hücre içinde yer alan bazı fonksiyonel proteinlerin oksidasyonu glutasyon ile engellenir. Glutasyon, serbest radikalleri temizleyerek ve peroksitlerle etkileşerek hücreleri oksidatif hasara karşı korurken, aynı zamanda aminoasitlerin taşınmasında da rol oynar. E vitamini ve askorbik asit gibi antioksidanlar ve diğer serbest radikal süpürücülerin aktivitesine de önemli derecede katkı sağlar. Ayrıca, proteinlerdeki tiyol gruplarını indirgenmiş halde tutarak çoğu protein ve enzimin aktivitesinin devamlılığını sağlar (Scott ve ark 1991).

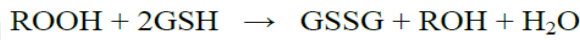
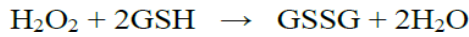


Şekil 1.2. Glutasyon sistemi

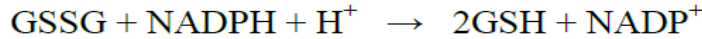
İndirgenmiş glutatyon (GSH) oksidasyona uğradığında, yükseltgenerek (GSSG) dönüşür (Şekil 1.1.). GSSG'nin yeniden indirgenmesi NADPH ile sağlanır. Bu sayede dokularda GSH/GSSG oranı yüksek tutulur. Glutatyon hücre içinde etkili güçlü bir antioksidan olup, enzimatik olmayan antioksidanların hücre dışında daha etkili olduğu göz önüne alındığında, glutatyonun bu konuda bir istisna olduğu açıktır (Maxwell 1995).

1.6.1. Glutatyon peroksidaz

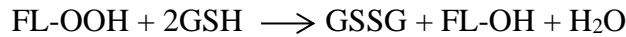
H₂O₂'in ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini sağlar. Yapısında 4 selenyum (Se) atomu bulunan tetramerik bir enzimdir. GSH-Px enziminin Se'a bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki izomeri vardır. Se bağımlı GSH-Px, H₂O₂'in ve lipit hidroperoksitlerin, Se bağımsız GSH-Px ise yalnız lipit hidroperoksitlerin detoksifikasyonundan sorumludur. Peroksitler tarafından membran lipitlerinin ve hemoglobinin oksidasyonunun önlenmesi başlıca görevidir.



Koenzim görevindeki okside glutatyon, glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar indirgenir.

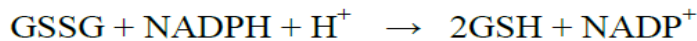


Bir diğer GSH-Px, "fosfolipit (FL) hidroperoksit glutatyon peroksidaz" enzimidir. Bu enzimin kofaktörü de Se olup, monomerik yapıdadır. Hücre membranı yapısındaki fosfolipit hidroperoksitlerini alkollere redükte ederek E vitamininin yetersiz kaldığı durumlarda peroksidasyona karşı koruma sağlar (Wendel 1981).



1.6.2. Glutatyon redüktaz

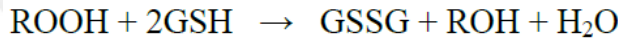
Glutatyon redüktaz (GSH-R) dimerik yapılu bir flavoprotein olup, hücrede okside glutatyonu (GSSG) indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşüren NADPH'a bağımlı bir enzimdir.



GSH, çevresindeki oksidan molekülleri bağlayarak, hücrenin fonksiyonel proteinlerinin degradasyonunu önlemektedir. Bunun yanında ikincil serbest radikallerden biri olan peroksitleri temizlemek için bazı peroksidaz enzimlerince de kofaktör görevi görür. Bu sayede oluşan okside glutatyon GSH-R enzimi tarafından indirgenmiş glutatyona dönüştürülür. Hücre içi okside glutatyon ve NADPH düzeylerine göre aktive olur (Carlberg ve Mannervik 1985).

1.6.3. Glutatyon transferaz

GST, glutatyonun sülfidril (-SH) grubu ile reaktif bir aktif merkeze sahip, organik moleküllerin bir araya gelmesini sağlayan bir enzim grubudur. GST'ler başlıca 3 sitozolik ve 1 de mikrozomal olmak üzere 4 gruba ayrılır. Vücuda alınan ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli işlevleri vardır. Se bağımsız aktiviteleriyle lipit hidroperoksitlere (ROOH) karşı etkilidirler (Hayes ve ark 2005).



1.7. Radyasyon Hasarını Etkileyen Faktörler

İnsanlarda radyasyon hasarı, İR ve hedef doku ile ilgili faktörler varlığında değişkenlik gösterir (Elgazzar ve Kazem 2015).

1.7.1. İyonize radyasyon ile ilgili faktörler

İR ilgili bazı faktörler, aynı radyasyon dozunun farklı organlara etkilerini belirler. Bu faktörler;

1- Radyasyon Türü: LET'ne dayalı olarak nüfuz edilebilirlik açısından, radyasyon türleri farklılık gösterir. LET değeri alfa parçacıkları için yüksek, beta parçacıkları için daha düşüktür, gama ve X-ışınları için ise çok daha düşüktür. Böylece alfa parçacıkları kısa bir mesafeye nüfuz eder, ancak ağır hasara neden olur. Buna karşın beta parçacıkları daha uzun bir mesafe katederek daha az hasar verir. Gama ışınlarının verdiği hasar ise beta parçacıklarına nazaran daha düşüktür.

2- Uygulama Şekli: İR dozu uygulamada önemli bir faktördür. Ancak planlanan İR dozunun tek seferde uygulanması, aynı dozun fraksiyonlara ayrılmış haline nazaran daha fazla hasara neden olur. Bu yüzden hasarı azaltmak için uygulamada fraksiyonel doz tercih edilir.

3- Doz oranı: Doz oranı, dozun verildiği süreyi ifade eder. Dozun uygulama süresi ne kadar uzun olursa, hücrel onarım şansı o kadar yüksek ve hasar da o kadar küçük olur (Elgazzar ve Kazem 2015).

1.7.2. Hedef doku ile ilgili faktörler

Dokuların ve hücrelerin belirli özellikleri de, İR'un biyolojik etkilerini önemli ölçüde etkiler. Bu özellikleri şöyle sıralayabiliriz;

1-Radyoduyarlılık: Tüm hücreler İR'dan etkilense de, normal hücreler ile kanser hücrelerinin İR'a duyarlılıkları farklılık gösterir. Yavaş ve hızlı bölünen hücreler, hücre döngüsü boyunca farklı radyoduyarlılığa sahip olup, bu farklılık mitoz hızına ve hücrel olgunluğa göre değişir. Mitotik aktivitesi yüksek kanser hücreleri, normal hücrelere kıyasla İR'dan daha fazla etkilenir. Radyoduyarlılıkta hücre türü de önemli bir faktördür. Örneğin kan hücreleri radyasyona karşı çok duyarlıyken, nöronlar, kas ve paratiroid hücreleri yüksek oranda radyodirençlidir. Ayrıca belirli bir hücre içinde, çekirdek genel olarak sitoplazmaya kıyasla nispeten daha radyo duyarlıdır. Hücre döngüsünün G_0/G_1 fazındaki hücreler radyasyona maruz kaldıklarında G_2/M fazına ilerlemelerini durdurma eğilimindedirler. G_2 senkronizasyonu, bir radyoduyarlı hücre kümesi üretir. 5-12 saatlik bir zaman aralığında ikinci bir İR uygulaması, daha yüksek oranda zararlı etkilere yol açar (Kendall 2000).

2-Hücrelerin Onarım Kapasitesi: Bazı hücrelerin İR'un neden olduğu hasarı onarmak için diğerlerinden daha yüksek onarım kapasitesine sahip olduğu ve bu hücrelerde İR uygulaması sonrası 3 saat içinde hızlı bir şekilde onarım gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu durum aynı radyasyon dozunun hücre türüne göre biyolojik etkilerinin farklı olduğunu göstermiştir (Elgazzar ve Kazem 2015).

3-Hücre Döngüsü Fazı: Hücre döngüsünün tüm aşamaları İR'dan etkilenebilir. Belirli bir hücrenin radyoduyarlılığı, bir hücre siklusu fazından diğerine geçişte değişir. Genel olarak, radyoduyarlılığın G_2 aşamasında en yüksek olduğu görülmektedir. Bu aşamada İR hücre bölünmesini geciktirir. Mitoz sırasında İR kromozomal anormalliklere, yani kırılmalara, delesyonlara ve translokasyonlara neden olur. Belirli bir hücre döngüsü fazının duyarlılığı, hücre türüne göre de farklılık gösterir. Örneğin, üreme hücreleri M fazında en hassas iken, DNA ve

kromozomlarda hasar en çok hücre G₂ fazındayken meydana gelir. Ölümcül olmayan hasardan kurtarma, hücre döngüsünün tüm aşamalarında gerçekleşir. Bununla birlikte, hücre siklusunun S fazında radyodirençlilik daha belirgindir (Ward 1988).

4-Doku Oksijenasyon Derecesi: Moleküler oksijenin radyasyona yanıtı artırdığı bilinmektedir. Hücrelerin radyasyona duyarlılığını arttırmada hücrelerin oksijen kullanım oranından ziyade moleküler oksijen miktarı en önemli faktördür. Burada muhtemel mekanizma, hücre hasarını artıran serbest radikal oluşumunun daha fazla aktive olmasıdır (Prasad 2020).

1.8. İyonize Radyasyonun Neden Olduğu Hücre Hasarı

İR'un oluşturduğu hücresel hasar, genel olarak subletal, letal ve potansiyel letal hasar olmak üzere 3'e ayrılır;

Subletal hasar: Düşük LET'li İR'ların dolaylı etkisiyle oluşan hasar tipidir. Uygulanan İR hücrelerde hasar oluşturur, fakat bu hasar uygun koşullarda hücre onarım mekanizmalarıyla onarılabildiğinden direk hücre ölümü gerçekleşmez. Eğer İR uygulanmaya devam ederse hasar kümülatif olarak birikir ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşebilir.

Letal hasar: Yüksek LET'li İR'ların doğrudan etkisiyle oluşan hasar tipidir. İR dozunun yüksek olduğu ve hücresel onarım mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan, geri dönüşümsüz ve hücre ölümüyle sonuçlanan hasarlardır.

Potansiyel letal hasar: Uygulanan İR hücrede hasar oluşturmakla birlikte hücre ölümü, çevresel etkenlere bağlı olarak hücresel ortamda meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkar. Hücre bölünmesinin kısa sürede gerçekleştiği durumlarda hasar ölümcüldür, fakat bölünmenin geciktiği durumlarda hücre hasarı onarılabilmektedir (Dubois ve ark 1987).

İR'un neden olduğu hücre hasarı hücre organelleri açısından değerlendirildiğinde hücre çekirdeği İR maruziyetinde sitoplazmik yapılara nazaran daha radyoduyarlıdır. İR sonrası nükleer değişiklikler, nükleer membranın şişmesi ve kromatin materyallerinin bozulması ile karakterizedir. Sitoplazmik değişiklik olarak şişme, vakuolizasyon, mitokondri ve endoplazmik retikulumun parçalanması

ve polizom sayısında azalmalar görülür (Ward 1988, Cotran ve ark 1999). İR dozuna ve hücre içi değişikliklere bağlı olarak, daha önce açıklanan faktörlerle birlikte, hücre üzerindeki potansiyel etkiler farklılık gösterir. İR'a maruz kaldıktan sonra, hücrel hasar aşağıdaki şekillerden biriyle meydana gelir (Bolus 2001);

1- Hücre Bölünmesinin Gecikmesi: 0,5-3,0 Gy aralığında İR'a maruz kaldıktan sonra mitoz gecikmesi gözlenir. Birkaç jenerasyon sonrası mitotik aktivitenin normale döndüğü görülür.

2- Üreme Yetmezliği: Bozulmuş mitotik aktivite kalıcı olup, hücre ölümü ile sonuçlanır. Bu durum 1,5 Gy'den fazla İR maruziyetinden sonra doğrusal bir şekilde artar. 1,5 Gy'in altında üreme yetmezliği rastgele oluşur ve doğrusal değildir.

3- Fazlararası Ölüm: Hücre türüne bağlı olarak oranı değişmekle birlikte, apopitoz radyasyonla indüklenir. Örneğin lenfositler, apopitoz açısından radyasyona karşı oldukça duyarlı hücrelerdir.

1.9. Apopitoz

Prokaryotik ve ökaryotik tüm organizmalarda, organizmayı oluşturan her bir hücrenin belli bir yaşam süresi vardır. Bu sürenin sonunda hücre ölümleri gözlenir. Hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasında kontrollü bir denge vardır. Bu denge programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apopitoz ile sağlanır. Apopitoz genel olarak yaşam süresinin sonuna gelen hücrelerin ölümüyle sonuçlanan, programlı, sürecin birtakım genlerle düzenlendiği, RNA, protein sentezi ve enerji gereksinimi olan organizmada hücre homeostazını sağlayan fizyolojik bir olay olarak tanımlayabiliriz (Renehan ve ark 2001). Apopitoz görülen biyolojik süreçler üç aşamada incelenir;

1-Embriyonik dönemde görülen apopitoz: Memeli canlıların el ve ayak parmak oluşumlarında ara dokuların ortadan kaldırılması, santral sinir sisteminin ve vasküler yapıların şekillendirilmesi gibi süreçler örnek olarak verilebilir.

2-Postnatal dönemde görülen apopitoz: Kemik iliğinde üretilen kan hücrelerinin homeostazı için bir miktar kan hücresinin ortadan kaldırılması, menstruasyon döneminde endometriyumun fonksiyonel tabakasının yenilenmesi ve korpus luteumun parçalanması, ince bağırsaklarda emilimi sağlayan kripta hücrelerinin

tabanında ilk oluşan hücrelerin ilerleyen aşamada ortadan kaldırılması, epiderminin en alt tabakası olan bazal tabakanın oluşumunu sağlayan deri hücrelerinin epiderminin en üst tabakasına doğru göç ederek yok olması ve immün sistemin en önemli hücrelerinden olan T lenfositlerden etkisiz veya organizmaya ters etkiler gösterilebilecek olanların ortadan kaldırılması postnatal dönemde görülen apopitozun örneklerindedir.

3-Patolojik durumlarda görülen apopitoz: DM gibi endokrin hastalıklar, nörolojik ve nöropsikiyatrik hastalıklar (Parkinson, Alzheimer vb.), immün sistem hastalıkları, viral enfeksiyonlar, kardiyovasküler hastalıklar, malign tümör oluşumları, AIDS, organ transplantasyonları, alkolizm ve radyasyon gibi faktörler apopitoza neden olmaktadır (Coşkun ve Özgür 2011).

1.9.1. Apopitoz aşamaları

Apopitoz, bazı metabolik ve fizyolojik süreçlerin rol oynadığı bir olaydır. Apopitoz ile uyarılan hücre bulunduğu bölgeden uzaklaşarak çevresinde bulunan diğer hücrelerle bağlantısını koparır. Kromatini yoğunlaşarak küçülür ve hücre çekirdeği büzülür. Apopitoza uğramış hücre jel elektroforezinde incelendiğinde, histon proteinlerinden oluşan nükleozomların DNA sarmalından ayrılması sonucu bantlar tipik merdiven görünümü oluşturur. Buna karşın hücre organellerinin yapısal bütünlükleri bozulmaz. Hücre membranı yapısında yer alan fosfolipidlerin translokasyonu hücre membranının iç yüzünden dış yüzüne yer değiştirir. Sonrasında küçülen hücre çekirdeği parçalanır. Hücre, membranla sarılı tomurcuklar şeklinde koparak apoptotik cisimciklere dönüşür. Bunlar inflamasyon oluşturmaksızın makrofajlarca tanınır ve fagosite edilerek ortadan kaldırılır (Ellis ve ark 1991).

1.9.2. Apopitozun düzenlenmesi

Apopitozun düzenlenmesinde Ca, Bcl-2 ailesi, sifingozin ve yağ asitlerinin birleşmesinden oluşan seramid gibi moleküller, tümör protein 53 (TP53), sitokrom c, kaspazlar gibi proteinler ve mitokondriyonlar görev alır. Apopitoz sürecinde hücre içine sürekli Ca girişi söz konusudur. Ca iyonları; proteaz, transglutaminaz ve endonükleaz enzimlerinin aktivasyonunda, gen düzenlenmesinde ve yapısal hücre organizasyonunda önemli rol oynar (Elmore 2007).

1.9.2.1. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesi proapoptotik ve antiapoptotik genler olmak üzere birbirine göre zıt etkiye sahip 2 gruba ayrılır. Bcl-2 ailesi'nde yer alan genlerin dimerik yapısı (heterodimer/homodimer), bir hücrenin apoptoz eğilimine işaret eder. Hücrede proapoptotik genler fazlaysa hücre apoptoz eğilimi yüksek, buna karşın antiapoptotik genler daha fazlaysa hücrenin apoptoz eğilimi düşüktür. Proapoptotik genler sitozolik olup, sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını uyararak apoptoza neden olurlar. Antiapoptotik genler ise mitokondri dış membranında, endoplazmik retikulumda ve çekirdek membranında bulunurlar. Por oluşumuyla hücre içine Ca iyonlarının girişini kontrol ederler. Ayrıca kaspaz aktivasyonu ile birlikte, sitokrom c ve AIF salınımını baskılayarak apoptozu inhibe ederler (Elmore 2007).

Çizelge 1.2. Bcl-2 ailesi (Coşkun ve Özgür 2011).

Proapoptotik Genler	Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa
Antiapoptotik Genler	Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1

1.9.2.2. p53

p53, hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde hücre döngüsünü G1 fazında durduran, bu sayede hücreye DNA onarımı için zaman kazandıran bir transkripsiyon faktörüdür. Onarımın mümkün olmadığı durumlarda Bax, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve Fas sentezini aktive ederken, Bcl-2 ve Bcl-xL'yi inhibe eder ve apoptoza neden olur (Vousden ve Lu 2002).

1.9.2.3. Fas

Tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin önemli bir üyesidir. İmmün sistemde hücre apoptozunu düzenleyen Fas hücre reseptörü, öldürücü T hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler üzerinde yer alır. Fas proteini hücre membranında reseptörüne bağlanarak reseptörde trimerizasyona yol açar. Aktive olmuş reseptörler FADD reseptörleriyle birleşerek, Fas reseptörünün karboksil ucuna (-COOH) yakın bölgeyi uyarır. Bu uyarı prokaspazları aktive ederek apoptozu indükler. TNF reseptör ailesinin bir diğer üyesi olan TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand

(TRAIL) ve TRAIL reseptörleri de, Fas'a benzer şekilde apoptozu indüklemektedir (Curtin ve Cotter 2003, Spierings ve ark 2004).

1.9.2.4. Kaspazlar

Kaspazlar, sistein proteaz aktivitesine sahip bir enzim ailesi olup, hedef proteinlerde aspartik asitten sonraki peptid bağına etki ederler. Hücrede inaktif formda bulunmalarına karşın proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler. DNA onarımı ve replikasyonunda görev alan enzimleri baskılayarak ve hücrede yaklaşık 100 hedef proteini keserek hücre membranının tomurcuklanmasıyla karakterize apoptozu neden olurlar (Elmore 2007). 3 farklı tipte kaspaz vardır. Bunlar aşağıda çizelge 1.3.'de verilmiştir.

Çizelge 1.3. Kaspaz tipleri (Rai ve ark 2005).

Başlatıcı Kaspazlar	Kaspaz 2,8,9,10
Efektör Kaspazlar	Kaspaz 3,6,7
İnflamatuar Kaspazlar	Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14

1.9.3. Apoptoz mekanizması

Apoptoz, instrinsik ve ekstrinsik (doğrudan veya dolaylı mekanizma ile) olmak üzere iki yolla gerçekleşir. Apoptozu uyaran hücre içi sinyaller; hücre içi Ca düzeylerinde artış, DNA hasarı, hücre döngüsünde bozukluklar, pH'da düşüş ve hipoksidir. Apoptozu uyaran hücre dışı sinyaller ise üreme ve büyüme faktörlerinde yetersizlik, ölüm reseptörlerinin (Fas ve TRAIL) ve öldürücü T lenfosit aktivasyonları ile iskemi, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon gibi dış etkenlerdir. Hücre içi sinyaller instrinsik yolla, hücre dışı sinyaller de ekstrinsik yolla apoptozu neden olurlar. Her iki yolda da kaspazlar önemli rol oynar (Danial ve Korsmeyer 2004).

1.9.3.1. İnstrinsik yol

Hücre içi sinyallerle aktive olan proapoptotik proteinlerden Bid; Bcl-2'yi inaktif hale getirerek, Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşumunu sağlayarak, bu porlardan sitokrom c, Smac, endonukleaz-G, Ca ve apoptoz indükleyici faktör AIF salınımı gerçekleşir. Smac, inhibitör apoptotik faktör (IAF)'ü inhibe ederek apoptozu hızlandırır. IAF'ün hücre ortamında bulunması kaspaz 3 ve kaspaz 8'in aktifleşmesini engeller. AIF, çekirdek

translokasyonu hücre çekirdeğini parçalara ayırır. Endonukleaz-G de DNA'yı parçalar. Mitokondri membranında oluşan porlardan salınan sitokrom c, Apaf-1 ve ATP ile sitozolde "apoptozom" olarak bilinen bir kompleks oluşturur. Apoptozom, kaspaz 9'u aktive eder. Kaspaz-9 da, prokaspaz 3'ün aktif kaspaz 3'e dönüşümünü sağlar. Aktif kaspaz-3 de, inaktif kaspaz aktive edici DNaz (ICAD)'ı inaktif hale getirerek, kaspaz aktive edici DNaz (CAD)'ı serbestleştirir. CAD, hücre çekirdeğinde kromatin yoğunlaşmasıyla birlikte DNA'nın nukleozomal alt birimlere ayrılmasına neden olur (Elmore 2007).

1.9.3.2. Ekstrinsik yol

Hücre membranındaki ölüm reseptörlerine FasL, TRAIL ligandlarının bağlanmasıyla reseptörler trimerizasyona uğrar. Trimerik reseptörler; amino asitleri mRNA'ya taşıyan tRNA'lar olarak bilinen adaptör moleküller ve prokaspazla bir araya gelerek ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC)'ni oluşturur. DISC oluşumuyla inaktif haldeki prokaspaz-8'in aktif kaspaz-8'e dönüşümü sağlanır. Aktif kaspaz-8, iki farklı yolla kaspaz-3'ü aktifleştirir;

1-Kaspaz-8 ile doğrudan kaspaz-3'ün aktifleştirilmesi,

2-Kaspaz-8'in Bid'i kesmesi sonucu dolaylı olarak instrinsik yolda kaspaz-9'u aktifleştirdikten sonra kaspaz-3'ü aktive etmesi.

Doğrudan veya dolaylı olarak aktifleştirilen kaspaz-3, instrinsik yola benzer şekilde CAD aktivasyonu DNA fragmentasyonuna yol açar (Elmore 2007).

Bir başka ekstrinsik yol ise sfingolipid yoludur. Sfingomyelin, hücre membranının yapısal unsurlarından biridir. Radyasyon ve kemoterapötik ilaçlarla aktive olan sfingomyelinaz enzimi, sfingomyelin'i seramid'e dönüştürür. Seramidaz enzimi ile de seramid sfingozine dönüştürülür. Sfingozin de Bid sentezini artırarak apoptozu indükler (Ross ve Pawlina 2011).

1.9.4. Apoptozu belirlemede kullanılan yöntemler

Apoptozun belirlenmesinde morfolojik, immünohistokimyasal, biyokimyasal, immünolojik ve moleküler biyolojik yöntemler olmak üzere genel olarak 5 farklı yöntem kullanılır. Bunlar aşağıda çizelge 1.4.'de verilmiştir.

Çizelge 1.4. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler (Galluzzi ve ark 2009)

Morfolojik görüntüleme yöntemleri	İmmünohistokimyasal yöntemler
<ol style="list-style-type: none">1. Işık Mikroskobu<ol style="list-style-type: none">a. Hematoksilen boyamab. Giemsa boyama2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop<ol style="list-style-type: none">a. Propidium iyodür (PI)b. Hoechst dye3. Elektron Mikroskobu4. Faz Kontrast Mikroskobu	<ol style="list-style-type: none">1. Anneksin V Yöntemi2. TUNEL Yöntemi3. M30 Yöntemi4. Kaspaz-3 Yöntemi
Biyokimyasal yöntemler	İmmünojenetik yöntemler
<ol style="list-style-type: none">1. Agaroz Jel Elektroforezi<ol style="list-style-type: none">- DNA fragmentasyonu2. Western Blot<ol style="list-style-type: none">a. Substrat kırılmalarıb. Aktif kaspaz'ın belirlenmesic. Sitokrom c salınması3. Akım Sitometri	<ol style="list-style-type: none">1. Elısa<ol style="list-style-type: none">a. DNA fragmentasyonub. M30 düzeyi2. Fluorimetrik Yöntem<ol style="list-style-type: none">- Kaspaz aktivasyonu
Moleküler biyolojik yöntemler	
DNA mikrodizi analizi	

1.10. Karaciğer

KC, abdominal boşlukta diyafragmanın altında yer alan, yaklaşık 1500 gr ağırlığı ile vücudun en büyük bezi ve yine en büyük iç organıdır. KC, gastrointestinal sistem (GİS)'den emilen besin bileşenlerinin işlendiği ve vücudun diğer kısımlarının ihtiyacını karşılamak üzere depolandığı, normal metabolik süreçler sırasında oluşan veya dolaylı olarak vücuda dışarıdan alınan toksik maddelerin detoksifiye edildiği, sindirim kanalında lipit sindirimi için gerekli olan safranın salgılandığı ve başlıca albümin olmak üzere diğer taşıyıcı plazma proteinlerinin sentez edildiği çok önemli bir organdır. Metabolik işlevleri ile sindirim ve dolaşım sistemi arasında bir geçiş

bölgesi teşkil eder. KC’de kan dolaşımının yaklaşık %70-80’ i portal ven aracılığıyla, geriye kalan kısımda hepatik arterle sağlanır. GİS’den emilen besin bileşenlerinin büyük bir kısmı portal ven ile KC’e taşınırken, şilomikronlar gibi kompleks lipitler de lenf damarlarıyla taşınmaktadır (Junqueira ve Carneiro 2005, Ross ve Pawlina 2007).

1.10.1. Karaciğer histolojisi

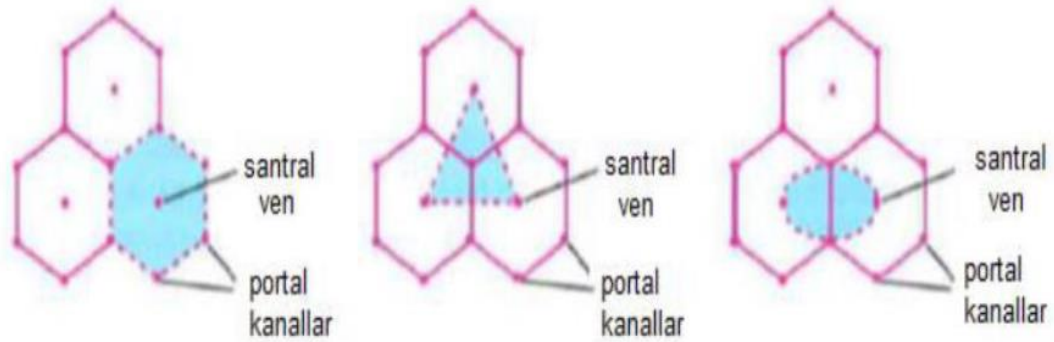
KC, anatomik olarak sağ ve sol lob olmak üzere 2 ana lobdan oluşur. Sağdaki büyük lob, soldaki lobun yaklaşık 6 katıdır. Sağ lob kendi içinde, alt kısmında 2 ayrı loba (dörtgen ve kuyruklu lob) sahiptir. KC, Glisson kapsülü olarak bilinen kollajen ve elastin gibi fibröz bağ dokularından oluşan bir zarla kaplıdır. Hilum kısmında giren (hepatik arter ile portal ven) ve çıkan (hepatik kanallar ile lenfatikler) damarlar ile kanallar bulunur. Bu dolaşım elemanları, KC lopçukları arasında sonlandıkları bölgelere kadar bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bu bölgelerden itibaren KC lopçuklarındaki sinüzoidal endotel hücrelerine ve hepatositlere destek sağlayan ince bir retiküler fibröz ağ oluşur (Junqueira ve Carneiro 2005, Ross ve Pawlina 2007).

Klasik KC lobülü poligonal şekilli ve ortalama 0,7x2 mm boyutlarında bir doku kitlesidir. Lobüllerin ortasında vena centralis yer alır. Lobüllerin kenarlarında ise portal alanlar bulunur. Portal alanı oluşturan yapılar; hepatik arterin bir kolu, portal ven’in bir kolu, lenfatikler, safra kanalları ve sinirlerdir. İnsan KC lobülünde 3-6 arasında portal alan bulunur (AL 2006).

KC lobülündeki hepatositler şeritler halinde dizilerek plak benzeri bir şekil oluştururlar. KC sinüzoidleri, bu plaklar arasında yer alan boşlukta bulunur. Sinüzoidler, kesintili endotel tabakasının düzensiz genişlemesiyle oluşan damarlardır. Endotel hücrelerinin hepatositlerden ayrımı, kesintili bir bazal lamina ve Disse boşluğu ile sağlanır. Bu boşlukta hepatositlerin mikrovilusları yer alır. Sonuçta, kan endotel duvarından rahatlıkla geçerek hepatosit yüzeyine ulaşır. Bu sayede sinüzoid lümeniyle hepatositler arasında madde alışverişi sağlanır. Sinüzoidler, endotel hücrelerinin yanında Kupffer hücreleri olarak bilinen makrofajları da içerir. Bu hücreler endotel hücrelerinin iç tarafa bakan kısmında bulunur. Önemli fonksiyonları yaşlı eritrositleri ortadan kaldırmak, hemoglobini sindirmek, immün sistemle ilgili protein yapılı bileşikler salgulamak ve kolondan dolaşıma geçen bakterileri yok etmektir. Disse boşluğunda KC yıldızsı (ito) hücreleri

bulunur. İto hücrelerinin yağ ve yağda çözünen A vitaminini depolama kabiliyetleri vardır. Bunun yanında A vitamininin vitamerlerinden olan retinoidlerin depolanması ve ihtiyaç anında salınması, bazı hücre dışı matriks proteinleri ile proteoglikanların sentezi ve sekresyonu gibi önemli işlevleri de vardır. İto hücreleri sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salgılanması ile prostoglandinler, tromboksan A2 gibi bazı düzenleyici bileşiklere yanıt olarak sinüzoid lümen çapının düzenlenmesine de katkı sağlarlar. Safraya pasif difüzyon ile karışan amino asitler ve glukoz, safra kanalında bulunan epitel hücreler tarafından aktif transport ile geri alınır. Sekretin hormonu tarafından uyarılan safra kanalı epitel hücrelerinin etkisi ile safra su ve bikarbonat salınımı gerçekleştirilir(Önür ve Beyler 2001, Junqueira ve Carneiro 2005).

Birbirine yakın üç KC lobülünün orta kısmında bulunan vena centralisler arasında kalan üçgen benzeri alanlar portal lobül olarak tanımlanmaktadır. Üçgenin merkezinde portal alan bulunur. Portal lobul KC'in ekzokrin işlevleri açısından son derece önemlidir (Ross ve Pawlina 2007).



Şekil 1.3. KC lobüllerinin şematik gösterimi (soldan sağa sırasıyla; klasik lobül, portal lobül, KC asinususu (Ross ve Pawlina 2007).

Birbirine komşu 2 klasik lobül içinde aynı lobüllerarası venden beslenen gruplar KC asinususu olarak bilinir. 2 vena centralis ile 2 portal aralığın birleşmesiyle sınırları oluşur. KC asinususunda dağıtıcı venlere olan mesafeye göre hücreler 3 bölgeye ayrılır (Bissel 1996);

Periferik bölge: O₂ ve besinsel açıdan en zengin bölgedir. Örneğin, glikojenler en fazla burada birikir. Rejenerasyon yeteneği yüksektir. Toksik maddelerle ilk etkileşen bölgedir.

Orta bölge: Periferik bölgeyle santral bölge arasında kalan kısımdır.

Santral bölge: O₂ açısından fakir bir bölgedir. İskemik hepatit ve viral toksisite durumlarında olduğu gibi yetersiz kanlanmaya bağlı en çok etkilenen bölgedir (Ross ve Pawlina 2007).

1.10.2. Karaciğer fizyolojisi

KC'in en hayati fizyolojik fonksiyonu, sindirim kanalından emilen ve kan yoluyla taşınan besin bileşenlerinin alımı, depolanması ve ihtiyaç anında periferel dokulara ve hücrelere dağıtımınıdır. KC'e arteriyel ve venöz sistem aracılığıyla dakikada 1500 ml kan gelmektedir. Bu miktarın 3/4'ü portal venle, geriye kalan kısmında hepatik arterle gelir. KC'in O₂ ihtiyacı ise yarı yarıya hepatik arter ve portal venle karşılanmaktadır (Skandalakis ve ark 2000).

1.10.3. Karaciğerin fonksiyonları

KC'in fonksiyonlarını; metabolik fonksiyonları, safra salgılanması, detoksifikasyon-inaktivasyon ve diğer fonksiyonları şeklinde 4 ana başlık altında incelenebilir.

1.10.3.1. Metabolik fonksiyonları

KC karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmalarında çok önemli role sahiptir. Kanda normal glukoz düzeylerinin sürdürülmesinde glukoz tampon işlevi görmektedir. Karbonhidrat metabolizmasında, glukozun glikojen formunda depolanması, glikojenoliz ile glikojenin ve pentoz fosfat yoluyla glukozun yıkımı, glukoneogenez ile glukoz eldesinde ve galaktoz ve fruktozun glukozla dönüşümü gibi pek çok anabolik ve katabolik süreçte KC yer alır (Barrett ve ark 2011).

Aminoasitlerden amin gruplarının uzaklaştırılması, amonyak gibi katabolitlerin üre formunda vücuttan atılması, endojen aminoasitlerin, taşıyıcı proteinlerin (albümin), koagülasyon mekanizmasında yer alan proteinlerin (protrombin ve fibrinojen vb.) ve lipoproteinler gibi plazma proteinlerinin sentezi ile aminoasitlerin birbirlerine dönüşümlerinin sağlanması KC'in protein metabolizmasındaki işlevlerini yansıtır (Onat ve ark 2006).

KC, lipit metabolizması yönüyle de son derece önemli görevlere sahiptir. Farklı vücut fonksiyonları için gerekli enerjinin açığa çıkmasını sağlayacak yağ asitlerinin sentezi ve oksidasyonunda, lipoprotein, kolesterol, fosfolipit, ve keton

cisimleri sentezinde, trigliserit oluşumunda, safra asitleri ve safra tuzlarının oluşturulmasında önemli rol oynar (Guyton ve Hall 1986).

1.10.3.2. Safra salgılanması

Safra salgılanması, KC'in en değerli fonksiyonlarından biridir. Hepatositler kan bileşenlerini alıp, bazı dönüşümler neticesinde bu bileşenleri safra kanaliküllerine salgılayarak ekzokrin bir faaliyet ortaya koyarlar. Safra bileşiminde; su, safra asitleri, elektrolitler, bilirubin, fosfolipitler ve kolesterol bulunur. Bu bileşiklerin yaklaşık %90'ı distal intestinal epitel hücrelerden emilimle sağlanır ve hepatositler aracılığıyla kandan safra kanaliküllerine aktarılır. Safra asitleri GİS'de lipitleri emülsifiye ederek lipaz enzimiyle sindirilmelerini sağlar (Junqueira ve ark 1993).

1.10.3.3. Detoksifikasyon ve inaktivasyon fonksiyonu

Başlıca ilaçlar olmak üzere endojen veya eksojen yollarla sağlanan kolesterol, tiroksin ve cinsiyet hormonları ile kalsiyum gibi makro minerallerin fazlasının detoksifiye edilmesini veya safra ile uzaklaştırılmasını sağlar. KC hasarında, çoğu zaman bu hormonlardan birinin ya da birkaçının vücutta aşırı birikimi söz konusudur. Pek çok ilaç KC'de sitokrom p450 enzim sistemiyle metabolize edilerek inaktif hale getirilmektedir. KC, vücutta çeşitli süreçlerde ortaya çıkan katabolik son ürünlerin zararsız hale getirilmesinde de önemli rol üstlenir. Örneğin, bilirubin KC'de glukuronik asitle bağlanarak dolaşımda çözünebilir hale getirildikten sonra safra ile vücuttan uzaklaştırılır. Protein yıkımından açığa çıkan ve vücut hücreleri için toksik bir bileşik olan amonyak da, KC'de üreye dönüştürülerek idrarla atılmaktadır (İliçin G 1996).

1.10.3.4. Karaciğerin diğer önemli fonksiyonları

KC'in normal kan volümü, hepatic venler ve sinuslardaki kanla birlikte yaklaşık 450 mililitredir. Sağ atriumda basınç artışına paralel KC'de de basınç yükselebilir. Bu durumda KC genişleyebilme yeteneğine sahip bir organ olduğundan, normal kan hacmine fazladan 0,5-1 lt daha kan ekleyebilir. Hepatic sinüslerde bulunan makrofajlar aracılığıyla, kolondan gelen mikroorganizmalar portal sistemde filtre edilebilmektedir. Koagülasyon mekanizması için gerekli protrombin, pıhtılaşma faktörleri (faktör V, VII, IX, X), fibrinojen ve globulin, gibi bileşikler KC'de

sentezlenir. KC'de yağda çözünen A ve D vitamini ile suda çözünen B₁₂ vitamini (kobalamin) depo edilebilmektedir (Guyton ve Hall 1986).

1.10.4. Karaciğer hasarı ve hasar oluşum mekanizmaları

Klinik açıdan KC hasarı, hasar süresine veya kalıcılığına bağlı olarak akut ve kronik hasarlar olmak üzere ikiye ayrılır. Akut hasarlar çoğunlukla, zararlı ajanın ortadan kaldırılması, hasar onarım süreçlerini takiben normal KC fonksiyonlarının tamamen eski haline dönmesiyle son bulur. Buna karşın kronik hasarlar kalıcı etkileriyle ön plana çıkar. Örneğin progresif fibrozis, kronik KC hasarının ayırt edici bir özelliği olup, ilerleyen süreçte siroz, KC yetmezliği veya hepatosellüler karsinom ile sonuçlanabilir. Kronik KC hasarı, kısmen zamana yayılan sürekli akut KC hasarını da yansıtır. Sürekli akut KC hasarları, hepatik fibrogenizi teşvik etmektedir. Bu süreç, özellikle kronik hepatit B için etkili tedavi yöntemlerinin kullanıma sunulması ile sınırlanmıştır. KC nakli gerektiği düşünülen hastalarda, bu antiviral tedavi yöntemlerinin önemli derecede iyileşme sağladığı görülmüştür. Ayrıca, hepatik fibrojenezin geri dönüşümlü bir bileşene sahip olduğunun belirlenmesiyle; KC hasarının inhibisyonu, ilerlemiş KC hastalığı için potansiyel bir terapötik strateji haline gelmiştir. Bu nedenle, KC hasarına aracılık eden mekanizmaların ve bu mekanizmaları yönlendiren moleküler sinyal yollarının belirlenmesi biyomedikal ve klinik açıdan son derece önemlidir (Malhi ve Gores 2008). KC hasarına aracılık eden 5 temel mekanizma aşağıda açıklanmıştır.

1.10.4.1. Apoptoz ve nekroz

KC'de morfolojik olarak gözlenen hücre ölümleri genel olarak apoptoz, nekroz veya apoptoz+nekroz kombinasyonu ile gerçekleşir. Apoptoz, morfolojik açıdan hücresel yuvarlama, sitoplazmik büzülme, kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma olarak tanımlanır. Aspartat kalıntılarından ayrılan proteazlar olarak bilinen efektör kaspazların aktivasyonu, bu morfolojinin ortaya çıkmasında önemli rol oynar. Nekroz ise morfolojik açıdan hücresel iyon dengesinin bozulması sonucu hücre şişmesi, karyoliz ve hücre membranının yırtılması olarak tanımlanır. Ayrıca bazı durumlarda aynı uyarıcı faktörle her iki morfoloji de görülebilir. Hücresel olarak KC'deki nekrozun, aşırı veya düzensiz apoptoza bağlı olarak gerçekleştiği bilinmektedir (Matsumura ve ark 2000, Malhi ve Gores 2008).

Apoptotik sinyal basamaklarının aktivasyonu ile ortaya çıkan şiddetli mitokondriyal bozukluklar, hücre ATP'nin tükenmesine ve sonuçta nekroza neden olur. KC'de en yaygın hücre tipi olan hepatositlerde görülen apoptoz, KC hasarında daha belirgindir. Diğer hücresel kısımlarda da apoptoz görülebilir. Örneğin, sinüzoidal endotel hücrelerin apoptozu iskemi-reperfüzyon hasarında, aktive edilmiş İto hücrelerinin apoptozu da fibrozis durumlarında görülür (Malhi ve Gores 2008).

1.10.4.1.1. Sitokeratin-18

Sitokeratin-18 (CK-18/M30), KC hücrelerinde görülen apoptozun şiddetini belirlemede kullanılan en önemli biyobelirteçlerden biridir. M-30, aspartat kalıntılarından kaspaz-3 öncülüğünde ayrılan proteolitik bir antijendir. Elisa yöntemiyle kanda kolayca saptanabilmektedir (Hetz ve ark 2007). Kronik KC hastalığı olan bireylerde, serum M-30 seviyelerinin önemli derecede yükseldiği, özellikle kolestaz ve kolanjit hastalarında en yüksek seviyelere çıktığı bildirilmektedir (Yagmur ve ark 2007). Ayrıca hepatik graft versus host (HGVH) ve steatohepatit hastalıklarında serum M-30 düzeylerinin benzer şekilde yükseldiği, steatohepatitli hastalarda serum M-30 düzeylerinin, KC dokusundaki M-30 düzeyleri ve inflamasyon ile de pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Serum M-30 düzeylerinde belirgin artışın hemen hemen tüm KC hastalıklarında ortaya çıkması, KC dokusu hasarında kaspazların rolünü de göstermektedir (Wieckowska ve ark 2006, Luft ve ark 2007).

1.10.4.2. Mitokondriyal bozukluklar

Mitokondriyal disfonksiyon, hepatosit hücre hasarlarının ve ölümlerinin en önemli nedenlerinden biridir. Mitokondri solunum zincirindeki metabolik fonksiyonlarının yanı sıra, iç ve dış membranlarında ve membranlar arası boşluklarda bir dizi proapoptotik proteini içerir. Hasar sonucu mitokondriyal dış membran geçirgenliği arttığında, bu apoptotik proteinlerin, sitokrom c'nin ve ikincil mitokondriyal kaspaz aktivatörlerinin (SMAC/DIABLO) salınımı gerçekleşir. Örneğin, iskemi-reperfüzyon hasarında, mitokondriyal dış membran geçirgenliği artarak, iç tarafta çözünmüş madde konsantrasyonu da artmaktadır. Bu durum iyonik dengenin bozulmasına, mitokondriyal matrisin şişmesine ve sonuçta dış mitokondriyal zarın yırtılmasına ve proapoptotik proteinlerin sitozole salınımı ile paralel hepatositlerin apoptozuna veya nekrozuna neden olmaktadır. Bu durum

ilerleyen dönemde KC yetmezliğine kadar götürebilecek inflamasyon derecesi yüksek sitolitik hepatite yol açmaktadır (Green ve Kroemer 2004, Baines ve ark 2005). Mitokondriyal bozukluklar, özellikle yağ asitlerinin beta-oksidasyon ile metabolize edilememesi sonucu, kanda doğrudan serbest yağ asidi miktarlarının yükselmesine, dolaylı olarak da serbest radikal ve laktat miktarlarının yükselmesine neden olmaktadır (ARICI 2008).

1.10.4.3. Doğuştan gelen immün sistem

İnflamasyon hem akut hem de kronik KC hasarının ayrılmaz bir bileşenidir. KC dokusunda yerleşik makrofajlar olan Kupffer hücreleri, dendritik hücreler, NK hücreleri ile NK-T hücrelerinden oluşan geniş hücre popülasyonu ile KC'in inflamasyona karşı bir bağışıklık organı olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Bu bağışıklık hücreleri ile, KC'in bağışıklık dışı hücreleri arasında yakın bir etkileşim söz konusudur. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleri, sadece inflamatuvar sitokinlerin, özellikle TNF- α 'nın kaynakları olmayıp aynı zamanda KC hasarına bağlı ortaya çıkan apoptozu indükleyen FasL ve TRAIL gibi ligandların da kaynağıdır. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminde FasL ve TRAIL ligand düzeyi fazla olan bireylerde KC hasarının daha şiddetli seyrettiği bildirilmektedir (Chen ve ark 2007, Szabo ve ark 2007).

1.10.4.4. Kolestatik karaciğer hasarı

Kolestatik KC hasarı, safra akışı bozukluklarına bağlı ortaya çıkan bir hasardır. Toksik safra asitlerinin yüksek hepatoselüler seviyeleri ile karakterizedir. Safra tuzu ile indüklenen KC hasarının mekanizmaları, *in vitro* modellerin yanı sıra safra kanalı bağlı deneysel hayvan modelleri ile *in vivo* olarak da incelenmiştir. Safra tuzu toksisitesinin, doğrudan deterjan aktivitesi için gerekli olan kritik misel konsantrasyonunun altında kalan lipofiliklik, konjugasyon durumu ve konsantrasyonu ile ilişkili olduğu; örneğin glisin ile konjuge kenodeoksikolik asidin, taurin ile konjuge kenodeoksikolik asitten daha toksik olduğu ve hepatosit apoptozunun kolestatik KC hasarlarının belirgin bir özelliği olduğu bildirilmiştir (Miyoshi ve ark 1999). Ayrıca glisin ile konjuge kenodeoksikolik asidin FasL ve TRAIL reseptör ekspresyonlarını artırarak, hepatosit apoptozuna neden olduğu bildirilmiştir (Faubion ve ark 1999, Higuchi ve ark 2001).

1.10.4.5. Hücre içi iyon dengesinin bozulması

Tedavi amaçlı kullanılan bazı ilaçlar, hepositlerde hücre içi proteinlerle kovalent bağlanarak, başlıca kalsiyum dengesi olmak üzere hücre içi iyon dengesinin bozulmasına neden olur. Hücreler deplazmolize olarak hücre membranı parçalanır ve hücre ölümü gerçekleşir (ARICI 2008).

1.11. Radyoterapi

RT, kanser hastalarında küratif amaçlı olarak, yani tümörü tamamen ortadan kaldırmanın mümkün olduğu durumlarda veya palyatif amaçlı olarak yani tümörü tamamen ortadan kaldırmanın mümkün olmadığı durumlarda kullanılır. Küratif RT primer, kombine ve koruyucu tedavi olarak kullanılır. Primer RT başlıca radyoduyarlılığı yüksek tümörlerde ana tedavi yöntemidir. Tedavide hedef kür sağlamaktır. Kombine tedavi ise kür şansını artıran 2 veya daha fazla tedavi yönteminin birlikte kullanıldığı tedavi yöntemidir. Daha çok ileri evre kanserli hastalarda KT ve cerrahi müdahalelerle birlikte kullanılır. Koruyucu RT de lokal ve bölgesel nüks riski bulunan hastalara uygulanır. Tedavide amaç lokal kontrolün sağlanmasıdır. Palyatif RT kür şansı bulunmayan kanser hastalarında, primer tümör ve metastazların bölgesel veya sistemik etkileşimleri sonucu ortaya çıkan komplikasyonların giderilmesinde kullanılır (Halperin ve ark 2013).

1.11.1. Radyoterapinin yan etkileri

RT sırasında veya RT sonrası özellikle ilk 3 ay içerisinde ortaya çıkan akut etkiler, tedavi alanı içerisine giren ve proliferasyon hızı yüksek hücrelerde ve dokularda (kemik iliği, gastrointestinal sistem mukozası, deri, tükürük ve salgı bezleri) görülür. Ciltte kızarıklık, gerilme, kuruma, dermatit ve hiperpigmentasyon görülebilir. RT uygulanan anatomik bölgeye bağlı olarak oral ve laringeal mukozit, özofajit, ve ödem, yutma güçlüğü, tükürük sıvısında koyulaşma, ağız kuruluğu ve tat duyusunda bozulmalar görülebilir. Kulak ve burun RT alanı içindeyse, orta ve dış kulak iltihabı, nazal kuruluk ve kaşıntı görülebilir. Akut etkilerin ortaya çıkmasında RT parametrelerinin (toplam doz, fraksiyon dozu, toplam tedavi süresi ve uygulanan radyasyon volümü) yanı sıra, hastanın yaşı ve genel durumu, RT öncesi veya eşzamanlı KT uygulaması ve RT uygulanması öncesinde geçirilmiş cerrahi operasyonların niteliği gibi faktörler de önemli rol oynar (Dörr ve Gabrys 2018).

RT sonrası yaklaşık 3-6 ay içerisinde gözlenen geç etkiler ise, tedavi alanı içerisine giren ve proliferasyon hızı düşük hücrelerde ve dokularda (yumuşak dokular, bağ dokuları, sinir dokusu hücreleri, kemikler) görülür. Bu dokularda tedavi sürecinde çoğu zaman akut etkiler görülmezken, geç dönemde önemli etkiler ve komplikasyonlar görülür. Akut etkilere nazaran genellikle kalıcıdır. Geç etkilerin ortaya çıkmasında, uygulanan RT'nin toplam ve fraksiyonel dozu son derece önemlidir. Geç etkilere yumuşak dokularda fibrotik değişiklikler, atrofi ve ülserasyonlar, deride atrofi, varis oluşumları, hipo veya hiperpigmentasyon, kemik nekrozu, işitme kayıpları, görme bozuklukları ve endokrin bozukluklar örnek olarak verilebilir (Dörr ve Gabryś 2018).

GİS ve üriner sistemde oluşan yan etkiler çoğu zaman geç etkiler olup, RT sonrası sıklıkla 2-5. yıllar arası gözlenir. Pelvik bölge ışınlamalarından sonra görülen geç etkiler arasında da fistül ve stenoz oluşumları ve ciddi kanamalar görülebilir. RT'nin en ciddi geç etkilerinden biri de tedavi sonrası ikincil kanser oluşumlarıdır. RT uygulanan kanser hastalarında, RT uygulanmayan hastalara kıyasla, artmış ikincil kanser insidansı ve geç etkilere bağlı düşük yaşam kalitesi dikkati çekmektedir. RT sonrası 5-10 yıllık zaman diliminde ikincil kanser oluşumlarının görülme sıklığı yaklaşık %4-8 arasındadır (Wenzel ve ark 2003, Dirier ve Andić 2010, Çelik 2014).

1.11.1.1. Radyoterapinin karaciğer üzerine yan etkileri

RT sonrası KC'de akut veya kronik etkiler ortaya çıkabilir. KC'de RT'nin akut etkileri arasında DNA hasarı, oksidatif stres, hepatositlerin apoptozu ile serbest radikaller ve ROT'inin neden olduğu akut inflamasyon yer alır. Bu akut etkilere bağlı gelişen hasarların çoğu onarılabilir hasarlardır. Ancak RT sırasında ve sonrasında gerekli klinik tedaviler uygulanmazsa, bu hasarlar kronik (kalıcı) radyasyona bağlı KC hasarı (RILD)'na dönüşebilir. RILD'nın klinik belirtilerini tespit etmek zordur, KC yetmezliğine kadar ilerleyebilir (Li ve ark 2021).

RILD ile ilgili yapılan klinik çalışmalarda, KC'ne RT uygulanan hastalarda ilk üç ay içinde venöz tıkanıklara bağlı hasarların gelişebileceğini göstermiştir. RILD'nda, fibrinlerin santral ven ve sinüzoidlerde birikmesiyle paralel kollajen birikimlerinin de arttığı ve bu durumlara bağlı olarak portal basıncın yükselmesine neden olduğu bildirilmiştir (Li ve ark 2021).

RILD'nın patolojik belirtileri; akut radyasyon hepatiti, pre-hepatik fibrozis, KC fibrozisi ve KC sirozu olmak üzere 4 farklı patolojik evrede incelenir. Akut radyasyon hepatiti genellikle RT sonrası 1 ay içinde KC'deki küçük kan damarlarında ve sinüzoidlerde genişleme, tıkanıklık ve kanama ile birlikte ortaya çıkar. Pre-hepatik fibrozis, genellikle RT sonrası 1-3 ay arasında ortaya çıkar. RT'den yaklaşık 6 ay sonra ortaya çıkan KC fibrozisi evresi, hepatik sinüzoidal kılcallık ile karakterizedir. Hepatositler elektron mikroskobu ile incelendiğinde, Disse boşluğu ve KC sinüzoidlerinde çok sayıda kollajen lif parçaları ve demetleri görülür. KC sirozu ise genellikle RT'den 9-12 ay sonra ortaya çıkar. Küçük kan damarlarının ve sinüslerin duvarlarında retikulum lifleri, laminin ve kollajen lifleri önemli ölçüde artar (Jiang ve ark 2006).

RT sadece KC'in morfolojik özelliklerini, KC'deki hücrelerin patolojisini ve etki mekanizmasını değiştirmekle kalmaz, aynı zamanda enzim aktiviteleri ve birçok biyomolekül metabolizması üzerine ciddi bazı yan etkilere neden olur. Plazma lipozomlarındaki değişiklikleri tanımlamak için düşük doz oksijen iyonlarına (¹⁶O) ve protonlarına (¹H) maruz bırakılan fare modelinin kullanıldığı bir çalışmada, RT sonrası gliserofosfolipid metabolizması, yağ asidi metabolizması ve amino asit metabolizması süreçlerinde önemli değişikliklerin ortaya çıktığı, bu değişikliklere ilaveten dislipidemi ve lipid peroksidasyonu da gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu değişikliklerin düşük doz yüksek LET'li radyasyona maruz kaldıktan sonra genel sağlık üzerinde uzun vadeli etkilerinin olabileceği bildirilmiştir (Christiansen ve ark 2006).

KC vücudun önemli bir metabolik organıdır. Pıhtılaşma faktörleri gibi önemli serum proteinlerinin sentezi, kolesterol ve steroid hormonlarının sentezi, glikojenler, ilaç metabolizması ve düşük radyasyon duyarlılığını sürdürmek için redoks dahil olmak üzere birçok önemli metabolik işlevi yerine getirir. İR'un KC fonksiyonu ve enzimler üzerindeki etkisi nedeniyle, hepatosit metabolizmasındaki değişiklikler kaçınılmazdır. Nagiev ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, ratların KC bölgesine 28,5 Gy/kg'lık tek doz ⁶⁰Co gama ışınları uygulanmış, uygulamadan 1 saat sonra üridin, sitidin ve nükleozit fosfat düzeylerinde önemli bir düşüş, yine uygulamadan 24 saat sonra pirimidin nükleozit monofosfat düzeylerinde ise önemli bir artış gözlemlenmiştir (Nagiev 1995, Li ve ark 2021).

Tüm vücut dokusunun radyasyona tepkisini incelemek için yapılan bir çalışmada, farelere 6 Gy gama ışınları ile RT uygulanmış, RT'den 12 saat sonra KC, serum ve idrarın metabolik analizi yapılmış, analiz sonuçlarında idrar ve KC 3-metilglutaril karnitin ve üridin düzeylerinin yükseldiğini gözlenmiştir (Golla ve ark 2017). Ayrıca RT'nin, DNA metilasyonuna bağlı gen ekspresyon modellerinde, KC hücrelerinin metabolizmasında önemli değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Antwi ve ark 2013).

Tüm vücut gama (3,0 ve 7,8 Gy) veya proton (3,0 Gy) ışınlamasından sonra C57BL/6 cinsi farelerin KC'indeki metabolik değişikliklerin incelendiği bir çalışmada, RT sonrası kolin, o-fosfokolin ve trimetilamin N-oksit düzeylerinin anlamlı bir şekilde düştüğü, buna karşın glutamin, fosfat, glutatyon, kreatinin, malik asit, betain ve 4-hidroksifenilasetik asit düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Bu bulgulara göre betain, 4-hidroksifenilasetik asit, kolin, glutamin ve trimetilamin N-oksit gibi bazı metabolitlerin, fare KC'inde RT hasarına karşı potansiyel ön tanı biyobelirteçleri olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (Xiao ve ark 2017).

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda RT'nin KC'deki gen modifikasyonlarına da etkisi incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada, mikrodizi ve tüm havuzlama stratejisi kullanılarak, sürekli düşük doz oranlı gama ışınımından (2Gy) sonra rat KC'lerinin transkriptomu analiz edilmiş; toplam 209 gen arasından 143 tanesinde aşağı ve yukarı yönde farklı ekspresyon düzeyleri gözlenmiştir. Bu genlerden de 27 tanesinin İR maruziyetinin düzenlenmesinde önemli rollerinin olduğunun daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konduğunu bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada, kültüre edilmiş rat hepatositlerine, tek doz 8 Gy RT uygulanmış, 6 saat sonra 10 genin yukarı yönde eksprese edildiği görülmüştür. KC'in lipid metabolizmasındaki rolü üzerine çok sayıda genin etkisinin bulunduğu bilinmektedir. RT'nin bu genlerin ekspresyonlarına etkileri, cDNA dizilerinin gen ekspresyon analizleriyle değerlendirildiği çalışmalar da yapılmıştır (Christiansen ve ark 2006, Li ve ark 2021).

1.12. Radyokoruyucu Ajanlar

Radyokoruyucu ajanlar, radyasyona karşı canlı organizmaları koruyan ve onlara direnç kazandıran maddelerdir. Bazı radyokoruyucular hedef doku ve hücrelerin radyoduyarlılıklarını etkilemeden normal doku ve hücreleri önemli oranda

korurlar. Bu maddeler vazokonstriksiyon ile birlikte vücutta önemli organların O₂ konsantrasyonlarını azaltarak yani hipoksik koşullar sağlayarak etkisini gösterir. Histamin, adrenalin, serotonin, NaCN ve CO bu maddelerin önemli örnekleridir (Prasad 2004, Prasad 2005) Günümüze kadar pek çok radyokoruyucu araştırılmış, elde edilen sonuçlar incelendiğinde bunların 2 veya 3 C'lu düz bir zincire sahip oldukları, zincirin farklı uçlarında tiyol (sülfidril/-SH) grupları ile amin vb. kuvvetli bazik grupların yer aldığı görülmüştür. Özellikle (-SH) gruplarının radikal süpürücü etkilerine bağlı olarak X ve gama ışınlarının olumsuz etkilerine karşı koruyuculuklarının yüksek olduğu bilinmektedir. (-SH) grupları O₂ yerine serbest radikallere bağlanarak radikal oluşumunu bloke eder (Jagetia 2007, Shirazi ve ark 2007).

Yapısında (-SH) grupları bulunan antioksidan maddelerin aktivitesinde, madde bileşiminde yer alan tiyol sayısı ve sülfür (S) atomlarının oksidasyon durumu önemli rol oynar. Radyokoruyucular kavramsal olarak ilk kez 1942 yılında Dale isimli bilim adamı tarafından terminolojiye dahil edilmiştir. Radyokoruyucu ilaçlara yönelik ilk araştırma ise 1949 yılında Patt ve ekibi tarafından yapılmıştır. Ratlar üzerinde uygulanan bu deneysel çalışmada, letal dozda uygulanan RT'den 15 dakika öncesinde hayvanlara intravenöz (i.v.) yolla sistein amino asidi uygulanmış, bu uygulamanın hayvanların sağ kalım sürelerini artırdığı gözlenmiştir (Patt ve ark 1949).

Radyokoruyucuların etki mekanizması, İR maruziyetinde suyun radyolizi sonucu açığa çıkan su metabolitlerinin endojen veya eksojen kaynaklı bazı maddelerce inaktif hale getirilmesine dayanır. Bu sayede bu metabolitlerin hücre içi bileşenlerle reaksiyona girmesi engellenir. Diğer bir etki mekanizması ise, İR maruziyetinde oluşan serbest radikallere radyokoruyucular tarafından hidrojen atomu bağlanmasıdır. Hücre mitozunun inhibisyonu, karma disülfid bileşiklerin oluşumu ve dokularda hipoksinin uyarılması ise diğer bir radyokoruyucu etki mekanizmasıdır. Örneğin aminotiyollerin radyokoruyucu etkisi, İR maruziyetinde hücrel proteinlerde yer alan tiyol bileşiklerindeki S atomlarının indirgenmesine ve yükseltgenmesine dayanır. Bu mekanizma ile hücrel proteinlerin yaklaşık %50'si serbest radikal hasarından korunur (Varanda ve Tavares 1998).

Tiyol ve disülfidler DNA'ya da bağlanabilir. DNA'ya bağlanmaları durumunda, DNA replikasyonunu geri dönüşümlü olarak inhibe eder ve DNA'nın yapısını stabil halde tutar. Bu durum DNA hasarının onarımına yönelik zaman kazandırır. Hücre ortamında O₂ konsantrasyonu yeterli düzeyde ise, koruyucu etkili tiyol grupları serbest radikaller tarafından oksidasyona uğrar. Oksidasyon aşamasında O₂'nin tüketilmesi, hücre içinde O₂ doyumluğunu azaltır ve bunun sonucunda tiyol grupları ve hücre proteinlerindeki S atomlarının oksidasyonu azalır. Yapılan çalışmalarda ortamın hipoksik koşullarda olmasının, başlıca tiyol bileşikleri gibi radyokoruyucu ajanların etkilerinin artırılmasına katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Prasad 2005). Radyokoruyucu ajanlar Çizelge 1.5.'de görüleceği üzere 4 grupta incelenir.

Çizelge 1.5. Radyokoruyucu ajanlar (Kelle 2008).

Tiyol bileşikleri	Tiyol içeren bileşikler	Farmakolojik ajanlar	Diğer radyokoruyucu ajanlar
Sisteamin	Tiourasil	Analjezikler	ATP gibi nükleik asit türevleri
Sistamin	Sülfoksitler	Trankilizanlar	Sodyum florasetat
Sistein	Tiazolinler	Kolinomimetikler	Paraaminopropiopen
2-merkaptetilguanidin	Tioüreler	Sempatomimetikler	Melitin ve diğer arı zehiri bileşenleri
	Sülfonlar	Alkol	Endotoksinler
		Dopamin	Adenozin
		Histamin	Camp
		Serotonin	Antibiyotikler
		Hormonlar	Lipitler
		Kolşisin	Eritropoetin
		Kalsiyum kanal blokörleri	Siyanid
			Hidroklorik merkaptetilamin
			WR-638
	WR-2721		
	WR-44923		

1.13. N-Asetilsistein

NAS, ilk kez 1960'lı yıllarda kullanıma sunulan, L-sistein amino asidine asetil grubu ve nitrojen (N) bağlanması ile oluşan bir bileşiktir. NAS'in kimyasal formülü C₅H₉NO₃S olup, molekül ağırlığı 163,19 gr/mol'dür. Tabii hali beyaz renkte ve kristal toz şeklindedir. Polaritesi yüksek sıvılarda örneğin etanol, su ve mineral asitlerde çözünürlükleri yüksektir. Kaynama noktası yaklaşık 110°C civarındadır.

Parasetamol gibi ilaç zehirlenmelerinde ve mukus sekresyonlarının parçalanmasında mukolitik etkileriyle tedavi seçeneklerinde ön plana çıkarlar. Mukolitik etkinliklerini özellikle bronşit, bronşektazi, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), pnömoni, amfizem ve kistik fibrozis hastalarında mukus yapısında yer alan mukoproteinlerde disulfid bağlarını kopararak mukusun sıvılaşmasını ve vücuttan kolaylıkla atılmasını sağlayarak gösterirler. Etkinlikleri yapılarında bulunan (-SH) gruplarından ileri gelir. Glutatyon (GSH) öncülü bir bileşiktir. GSH öncülü olarak son zamanlarda antioksidan etkileri de birçok çalışmada gösterilmiştir (Neal ve ark 2003). NAS antioksidan etkisini hücreleri serbest radikal saldırılarından 2 farklı şekilde koruyarak gösterir;

1- Yapısında yer alan serbest (-SH) grupları aracılığıyla O₂ radikalleriyle doğrudan reaksiyona girerek H₂O₂, HClO ve OH radikallerini temizlerler (Aruoma ve ark 1989).

2- GSH prekürsörü olarak işlev görürler. Moleküler yapısı nedeniyle hedef hücre içine kolayca girerek burada asetil grubundan ayrılır ve L-sisteine dönüşür. L-sistein de glutatyon sentezini aktive eder (Gillissen ve Nowak 1998).

GSH, hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Başlıca KC olmak üzere pek çok dokuda glisin, sistein ve glutamik amino asitlerinden sentezlenir. Hücresel proteinlerdeki (-SH) gruplarını redükte halde tutarak oksidasyona karşı bariyer görevi üstlenir ve bu sayede önemli proteinlerin ve enzimlerin işlevleri korunmuş olur. GSH aminoasitlerin hücre membranından geçişini ve vücut için zararlı bileşiklerin sağlar. Hemoglobinin oksidasyonunu engelleyerek methemoglobin oluşumunu önler. Kan hücrelerini ve retinayı oksidatif hasara karşı korur. Bağırsak epitel hücreleri ve lenfositlerin bölünmesi ve çoğalması için gereklidir. Spermatogenezde önemli rol oynar. İmmun sistemin güçlendirilmesinde; enfeksiyonların inhibisyonunda, T-lenfositlerin ve sitokinlerin aktivasyonunda rol oynarlar. GSH eksikliğinde vücut dokularında oksidatif stres artar. Serebrovasküler ve kardiyovasküler hastalıklar, Parkinson, Alzheimer gibi nörolojik hastalıklar, KC hastalıkları, anemi, kanser ve diyabet gibi pek çok hastalık ortaya çıkabilir (Spapen ve ark 1998, Sochman 2002).

1.13.1. NAS'in emilimi, atılımı ve biyoyararlanımı

NAS oral yoldan alındığında hızla emilir ve sonrasında başta KC olmak üzere akciğer ve böbreklere geçer. Gastrik ve intestinal sekresyonlara karşı stabildir. NAS, plazma ve akciğer dokusunda serbest halde bulunabileceği gibi, aynı zamanda hücrel proteinlere disülfid köprüleriyle geri dönüşümlü olarak bağlanmış halde de bulunabilir. Uygulama sonrası yaklaşık 1 saat içerisinde plazma konsantrasyonu en yüksek noktaya ulaşır. Vücutta birikmez, akciğer dokusunda konsantrasyonu daha yüksektir. KC'de metabolize olup, üriner ve solunum sistemi aracılığıyla vücuttan uzaklaşır (Flanagan ve Meredith 1991).

İnsanlarda oral yoldan alınan 100-600 mg/gün NAS'in hızla emilmesine karşın, biyoyararlanımın %10'dan daha az olduğunu bildirilmiştir (Flanagan ve Meredith 1991). Borgström ve ark. bu düşük biyoyararlanımın NAS'in GİS'de ve KC'de hızlı bir şekilde metabolize edilmesiyle ilişkili olabileceğini, buna karşın deneysel hayvan çalışmalarında, NAS'in hemen hemen tamamının deasetilasyon sonucu sistine metabolize edildiğini bildirmişlerdir (Borgström ve ark 1986).

1.13.2. NAS'in farmakokinetiği

NAS'in farmakokinetiği, N-asetilsistein ve N,N-diasetilsistein gibi çeşitli formlarda bulunabilmesi ve metabolize edilmeleri sonucunda açığa çıkan sistein, sistin, metiyonin, GSH disülfid karışımları vb. ürünlerin konsantrasyonlarının artması sebebiyle biraz karışıktır. İntravenöz (i.v.) uygulanmalarında yarılanma ömürlerinin 2-6 saat arasında olduğu ve uygulanan doz miktarının yaklaşık 1/3'ünün metabolize olmadan idrarla uzaklaştığı bildirilmiştir (Flanagan ve Meredith 1991).

1.13.3. NAS'in biyolojik etkileri

NAS, KC GSH'unun başlıca kaynağı olan sistein ihtiyacına katkı sağlar. Hasara uğramış hücrel proteinlerdeki disülfid bağlarını parçalayarak serbest radikalleri ve metal atomlarını uzaklaştırır. NAS'in antiinflamatuvar, antioksidan ve hücre koruyucu özelliklerinin yanında, özellikle küçük kan damarlarında kan akışını artırdığı ve endotelial koruma sağladığı bildirilmektedir (Spapen 2004). Yapılan çalışmalarda NAS'in serbest O₂ radikallerinden kaynaklı apoptozu ve bozulmuş redoks potansiyelini baskıladığını, bu baskılanmanın NAS yapısında bulunan (-SH)

gruplarının antioksidan ve nükleofilik özelliklerine bağlı olduğu bildirilmiştir (De Flora ve ark 2001).

Lipit preoksidasyonu, hücre membranındaki proteinlerin oksidasyonunu artıran, dolayısıyla hücre membranının normal işlevinin bozulmasına neden olan önemli bir faktördür. NAS, lipit ve protein oksidasyonunu engelleyen ve hücre bütünlüğünün devamında önemli etkileri olan bir bileşiktir (Valko ve ark 2007). Mitokondriyal oksidatif hasar, beyin yaşlanmasında ve yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıklarda rol oynar. NAS ile yapılan bazı çalışmalarda, NAS'in nöronal hücrelerde apoptotik hücre ölümünü önlediği ve yaşlı farelerde sinaptik mitokondri proteinlerini oksidatif hasardan koruduğu gösterilmiştir (Martinez ve ark 1996). Martinez ve ark.'nın 48 haftalık OF-1 cinsi fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada bu tiyolik bileşiğin diyetle uygulanmasının yaşa bağlı hafıza kaybını geciktirip geciktirmediğini araştırılmış; diyetlerinde % 0,3 NAS (w/w) bulunan farelerde, deneysel çalışmanın başlangıcından 23 hafta sonra, yaşlanma ile ilişkili hafıza eksikliklerinin kısmen giderildiği gözlenmiştir (Martinez ve ark 2000).

NAS'in kanser tedavisinde KT protokollerinde yer alan siklofosamid ve doksorubisin gibi sitotoksik ilaçlara karşı da koruyucu olduğu, klinik çalışmalarda ve deneysel hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (Holdiness 1991).

1.13.4. NAS'in radyokoruyucu etkileri

Serbest radikallerin temizlenmesi ve radyasyona bağlı oluşan DNA hasarının onarımında hidrojen atomu temini son derece önemlidir. GSH, bu noktada önemli bir hidrojen kaynağı olup, enzim yapısında olmayan ve çözünebilir bir antioksidan olmasının yanında, en yaygın tiyol-disülfit redoks tamponudur. NAS'in hücre içi sistein kaynağı ve dolayısıyla GSH'un prekürsörü olarak oksidatif stresle ilişkili hastalıklar başta olmak üzere radyasyona bağlı ortaya çıkan DNA hasarlarını da önlediği gösterilmiştir (Wanamarta ve ark 1989, Weiss 1997).

Askorbik asit, lipoik asit ve K vitamini gibi yaygın kullanılan antioksidanlar serbest O₂ radikallerini doğrudan nötralize ederken, NAS sistein prekürsörü olarak, vücutta GSH sentezi için gerekli sisteini temin ettiği için oksidatif strese bağlı gelişen hasar ve hastalıklarda daha etkili ve güvenli olduğu bildirilmektedir (Prescott 2005). Benzer mekanizma ile NAS'in vücut dokularında GSH düzeylerini artırarak

İR bağı hücrel hasarın onarılmasında önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Sridharan ve Shyamaladevi 2002).

Neal ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada C57BL/6 cinsi farelere 18 Gy tüm vücut RT uygulanmış, RT öncesi verilen NAS'in D ve L izomerlerinin akciğer, KC, dalak ve eritrositlerde radyokoruyucu etkileri incelemiş; D-NAS izomerinin akciğer dokuları ve eritrositlerde, L-NAS izomerinin ise dalak dokularında GSH depleksiyonunu inhibe ettiğini gözlemişlerdir (Neal ve ark 2003).

İR'un neden olduğu hepatik toksisite ve DNA hasarı üzerine NAS'in radyokoruyucu etkisinin araştırıldığı deneysel bir hayvan çalışmasında; 7 gün boyunca hayvanlara 1 gr/kg intraperitoneal (i.p.) NAS enjeksiyonu uygulanmış, son dozdan 1 saat sonra 6 Gy tüm vücut gama ışınlamasını takiben 24 saat sonra, hayvanlar sakrifiye edilmişlerdir. Hepatik toksisite belirteçleri olarak KC doku homojenatlarında malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), GSH ve toplam nitrat/nitrit (NO(x)) düzeyleri analiz edilmiş, DNA hasarı için ise agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Analiz sonuçlarında sadece RT uygulanan hayvanlarda MDA ve toplam NO(x) düzeylerinin önemli ölçüde arttığı, GSH, GSH-Px ve SOD düzeylerinin azaldığı, buna karşın RT öncesi NAS uygulanan hayvanlarda ise MDA, NO(x) ve DNA hasar düzeylerinde önemli bir düşüş ile birlikte GSH, GSHPx ve SOD düzeylerinde artış görülmüştür. Ayrıca KC dokularının histopatolojik incelemeleri de bu biyokimyasal sonuçları desteklemiştir (Mansour ve ark 2008).

İR'a bağı KC hasarı üzerine NAS'in radyokoruyucu etkisinin amifostin (WR-2721) ile karşılaştırıldığı bir hayvan çalışmasında; farklı deney gruplarında tek doz 1000 mg/kg NAS ve 200 mg/kg WR-2721 (i.p.) enjeksiyonu uygulanmış, uygulamadan 15 dakika sonra 6 Gy tüm vücut gama ışınlamasını takiben 72 saat sonra, hayvanlar sakrifiye edilmişlerdir. Toplanan KC dokuları ve serum örneklerinde GSH, MDA ve miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri analiz edilmiş; sadece RT uygulanan grupta doku ve serum GSH düzeylerinin kontrol ve diğer gruplara kıyasla anlamlı şekilde azaldığı, RT+NAS ve RT+WR-2721 gruplarında doku MDA düzeylerinin sadece RT uygulanan gruba kıyasla yine anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür. RT+WR-2721 grubunda ise serum MPO düzeylerinin RT grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüştür (Kilciksiz ve ark 2008).

İR'un neden olduğu böbrek hasarı üzerine NAS'in radyokoruyucu etkisinin incelendiği bir çalışmada, ratlara 7 gün boyunca 300 mg/kg NAS (i.p.) enjeksiyonu uygulanmış, deney süresinin 5. gününde 6 Gy tüm vücut X ışınlamasını takiben 96 saat sonra, hayvanlar sakrifiye edilmişlerdir. Hazırlanan doku homojenatlarında MDA ve GSH düzeyleri analiz edilmiş, elde edilen sonuçlarda RT grubuna kıyasla RT+NAS grubunda MDA düzeylerinin anlamlı şekilde azalırken, GSH düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca yapılan histopatolojik incelemelerde ve immunohistokimyasal analizlerde, RT grubunda renal korpüsküllerde ve tübüllerde genişleme, tübüllerarası boşluklarda tıkanıklıklar, artmış tübüler nekroz skorları (TNS) ile kaspaz-3 ekspresyonları dikkati çekerken, RT+NAS grubunda TNS ve kaspaz-3 düzeylerinin anlamlı şekilde düştüğü gözlenmiştir (Mercantepe ve ark 2019).

İR maruziyetinde ortaya çıkan over yetmezliği ve over rezerv kaybı üzerine NAS'in radyokoruyucu etkisinin incelendiği bir çalışmada, dişi farelere 7 gün boyunca 300 mg/kg NAS (i.p.) enjeksiyonu uygulanmış, deney süresinin 7. gününde 4 Gy tüm vücut X ışınlamasını takiben 24 saat sonra, hayvanlar sakrifiye edilmişlerdir. Biyokimyasal, histolojik ve immünohistokimyasal analizler kapsamında serum hormon (östrojen, progesteron, folikül stimüle edici hormon (FSH) ve antimüllerian hormon (AMH) düzeyleri, oksidatif stres belirteçlerinden GPx ve 8-OHdG düzeyleri, apoptoz ve hücre proliferasyon analizleri, over foliküllerinin gelişimi, endometrial luminal epitel hücreler üzerinde morfolojik gözlemler ve fertilité değerlendirmeleri yapılmış. Elde edilen sonuçlarda, NAS'in over ve endometrium fonksiyonunu başarılı bir şekilde restore ettiği, embriyo implantasyonunu ve folikül gelişimini iyileştirdiği ve granüloza hücrelerinde oksidatif stres ve apoptoz seviyesini azaltarak granüloza hücrelerinin çoğalmasını teşvik ederek anormal hormon seviyelerini azalttığı görülmüştür (Gao ve ark 2017).

İR ile indüklenen dermatite karşı NAS'in radyokoruyucu etkisinin amifostin (WR-2721) ile karşılaştırıldığı bir çalışmada; ratların sol arka bacaklarına tek doz 18 Gy RT uygulanmış, 45 günlük deney sürecinde hayvanlarda gelişen akut cilt reaksiyonları her 3 günde bir skorlanmış, 45 günün sonunda sakrifiye edilen hayvanların cilt dokularının histopatolojik değerlendirmeleri yapılmıştır. Klinik ve histopatolojik değerlendirmelerde; RT uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla dermatitin anlamlı olarak arttığı. RT+NAS ve RT+WR-2721 gruplarındaki dermatit

şiddetinin ise, RT grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ışığında, NAS ve WR-2721'in RT ile artan dermatit şiddetine karşı koruyucu etkilerinin klinik ve histopatolojik olarak benzer olduğu bildirilmiştir (Demirel ve ark 2010).

1.14. Ökse Otu

VA, dünya genelinde farklı isimlerle bilinen, başlıca Avrupa ile batı ve güney Asya'ya özgü yarı parazitik bir bitkidir. VA, binlerce yıldır Avrupa ve Asya'da halk tıbbında yaygın olarak kullanılan, özellikle Avrupa'da anksiyete, uykusuzluk, baş ağrısı, mide ve üriner sistem rahatsızlıkları başta olmak üzere kanser, hipertansiyon, diyabet ve ateroskleroz gibi çeşitli hastalıkları önlemede ve iyileştirmede faydalı etkileriyle öne çıkan bir bitki türü olmuştur. VA'ndan günümüze kadar izole edilen bileşikler arasında heterodimerik yapılı glikoproteinler, polisakaritler, lektinler, aminler, triterpenler, viskotoksinler, alkaloidler, lipitler, peptitler, siklitoller ve flavonoidleri yer almaktadır. VA bitkisinde bulunan bu bileşiklerin antioksidan, antikanser, antihipertansif, antidiyabetik, immün düzenleyici, sedatif, ve karacğer koruyucu etkileri başta olmak üzere geniş kapsamlı biyolojik aktivitelere sahip olduğu yapılan bilimsel çalışmalarla ortaya konmuştur. Örneğin Avrupa VA (VAE) bitkisi ile yapılan *in vitro* çalışmalarda, insan kanser hücre hatlarında hücre proliferasyonunu önemli oranda inhibe ettiği, benzer şekilde *in vivo* çalışmalarla da inflamasyonu ve kanser gelişimini önlediği bildirilmiştir. Avrupa'da fitofarmakolojik ürün üreticisi birçok firma tarafından Iscador, AbnobaViscum, Cephalektin, Eurixor, Helixor, Isorel ve Lektinol gibi VA ekstraktlarından elde edilen preparatlar, ticari olarak tüm dünyaya pazarlanmaktadır.



Şekil.1.4. Badem ağacı üzerinde yetişen VA'ları.

1.14.1. Botanik özellikleri ve coğrafi dağılımı

VA çift çenekli, böceklerle tozlanan, konakçı olarak yapraklarını dökmeyen çalılar ve elma, dişbudak, alıç, ihlamur, sedir, karaçam gibi geniş yapraklı yapraklarını döken ağaçların taçlarında yaygın olarak bulunan yarı parazitik bitkilerdendir. Meşe ve armutta çok nadiren büyüdüğü görülür. VA, bitkisi fotosentez yoluyla ihtiyaç duyduğu besin maddelerini sentezleyebilirken, ayrıca konakçı bitkilerden emici organları vasıtasıyla ek besinler de sağlayabilmektedir. 30-100 cm uzunluğunda, sarımsı renkte, düz ve dikotom dallara sahiptir. Yapraklar dil şeklinde, karşılıklı çiftler halinde, uca doğru genişleyen 2-8 cm uzunluğunda, 1-2.5 cm genişliğinde, sert dokulu ve mat sarı-yeşil renktedir. Çiçekleri göze çarpmayan, dalların çatallarında salkımlar halinde, sarımsı-yeşil renkte ve 2-3 cm çapındadır. Erkek ve dişi çiçeklerde taç yoktur. Meyveleri beyaz veya sarı renkli, dış kısımları pürüzsüz, sonbaharda olgunlaşan, nadiren çekirdek içeren ve viskoz yapıdadır. Konakçı ağaç türüne, meyve rengine, yaprak şekline ve boyutuna göre VA'nun sayısız alt türü sınıflandırılmıştır. Bunlar arasında öne çıkan alt türler arasında *V. album subsp. abietis* (Wiesb.); beyaz meyveli ve yaprakları yaklaşık 8 cm uzunluğunda, *V. album ssp. album* beyaz meyveli ve yaprakları 3-5 cm uzunluğunda; *V. album subsp. austriacum* (Wiesb.); sarı meyveli ve yaprakları 2-4 cm uzunluğunda, *V. album subsp. meridianum* (Danser); sarı meyveli ve yaprakları 3-5 cm uzunluğunda, *V. album subsp. creticum*; beyaz meyveli ve kısa yapraklı ve Çin florasında yer alan *Viscum album subsp. coloratum* (Kom) bulunmaktadır.

VA'nun coğrafi olarak dünya genelinde Kuzey Afrika'dan güney İngiltere'ye ve güney İskandinav bölgelerine, orta Avrupa'dan güneybatı Asya ve Japonya'ya kadar uzanan doğu Asya'ya kadar geniş bir alana yayıldığı görülmektedir.



Şekil.1.5. VA'nun coğrafi dağılımı (<https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Viscum+album>).

1.14.2. Kimyasal bileşimi

1.14.2.1. Viskotoksinler

Viskotoksinler düşük moleküler ağırlıklı (5 kDa), sistein açısından zengin ve bazik aminoasitlerin bir araya gelerek oluşturduğu protein yapılı bitki tiyoninleridir. VA bitkisinde, yapraklarda ve gövdede sentezlenir. Doğada amfipatiktirler. Toplam 46 aminoasitten oluşan polipeptit zincirleri, sistein yer alan kısımlardan birbirine 3 veya 4 disülfid bağıyla bağlanırlar. Disülfid bağları viskotoksinlere kompakt bir yapı kazandırırken, ısı ve proteazlar gibi denatüre edici faktörlere karşı yüksek oranda stabilite sağlamaktadır. Polipeptit zincirlerindeki aminoasit dizilimleri farklılıklarına göre, günümüze kadar 7 farklı (A1, A2, A3, B, B2, C1 ve 1-PS) izoformu tanımlanmıştır. İzofomlarda ve esas olarak dizilimlerinde farklılık gösterirler. VA'nda viskotoksin içeriği konakçı ağaç türüne bağlı olarak %0,05-0,1 arasında değişmektedir. Örneğin, *V. album ssp. album* (VAA)'de A2 ve A3 izoformları daha fazla bulunurken, *V. album ssp. austriacum*'da ise PS-V izoformu daha fazladır. *V. album ssp. abietis*'de A2 dışındaki tüm izoformlar bulunurken, A3 izoformunun daha baskın olduğu görülmektedir.

Viskotoksinlerin 3 boyutlu yapıları üzerine yapılan araştırmalar neticesinde, viskotoksinlerde belirli bir fosfat bağlama bölgesinin olduğu gözlenmiştir. Bu fosfat bağlama bölgesinin ve amfipatik yapılarının, kanser hücrelerinde hücre membranına etki ederek deformasyona neden olduğu ve bu sayede hücrelerde sitotoksiteyi indüklediği öngörülmektedir. Viskotoksinlerin yüksek yapısal homolojilerine ek olarak, biyolojik etkileri de farklı izoformlarına göre değişebilmektedir. Ayrıca viskotoksinlerin, yılan (kobra) kardiyotoksinleri ile yüksek yapısal ve farmakolojik benzerlik gösterdiği de bildirilmektedir.

1.14.2.2. Lektinler

Yüksek moleküler ağırlıklı polipeptitlerin bir karışımı olarak, VA'ndan izole edilen, major bileşiklerdendir. VA'nda bulunan ortalama lektin miktarı kuru ağırlık üzerinden %2'den az olmamakla birlikte yaklaşık 340-1000 µg/g arasında değişmektedir. VA'nda lektin içeriği kış mevsiminde en yüksek noktaya ulaşmaktadır. Filiz ve sürgün kısımları lektin içeriği yüksek kısımlardır. VA'nda farklı şeker bağlama özgülüğü olan üç farklı lektin (ML-I, ML-II, and ML-III) izole

edilmiştir. Bu üç farklı lektinin de, kan gruplarına bağlı olmaksızın insan eritrositleri üzerine yüksek reaktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Peumans ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, kışın yapraklarını döken ağaçlarda çoğunlukla ML-I formunun daha yaygın olduğunu, buna karşın iğne yapraklı köknar ve çam ağaçlarında yetişen VAE'lerinde ise ML-III formunun daha fazla olduğunu ve bu lektin formlarının ökaryotik hücrelerin ribozomlarında rRNA'yı parçalayarak protein sentezini inhibe ettiği ve apoptozu hızlandığını bildirmişlerdir.

1.14.2.3. Karbonhidratlar

VA'nda karbonhidrat olarak oligo ve polisakkaritler bulunur. Meyve ve yaprak kısımlarında yapısal olarak farklı VA polisakkaritler tanımlanmıştır. Yaprak ve gövde kısımları yüksek oranda metillenmiş bir homogalakuronan olan pektin ve arabinogalaktanlar, açısından zengin iken, meyveleri ise yan zincirleri arabinogalaktanlar olan ramnogalakuronanlar ve ksiloglukanlar gibi diğer polisakkaritler yönüyle daha zengindir. VA'nda monosakaritler ve polioller de tanımlanmış, ancak bu bileşiklerin VA ekstraktlarının hidroliziyle ortaya çıktığı gözlenmiştir. VA'larının polisakkarit içeriği konakçı bitki türüne bağlı olarak değiştiği; örneğin, ıhlamur ağacının erken döneminde %58 oranında inositol gözlenirken, ancak daha sonraki dönemlerde %44 oranla galaktozun daha baskın olduğu bildirilmiştir.

1.14.2.4. Polifenoller ve fenilpropanoidler

VA'nda bir dizi flavonoid, fenilpropanoid ve fenolik asit izole edilmiş ve bu bileşenlerin konakçı ağaç türüne göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin, kuş üzvezi ve elma VA'larında yüksek oranda salisilik asit ve rosmarinik asit tespit edilirken, konakçı ağacı dışbudak olan VA'larında ise yüksek oranda kafeik, p-hidroksibenzoik, salisilik, protokateşik, ferulik asit, sinapik asit içeriği tespit edilmiş ve bu fenolik asitlerin serbest veya glikozit formunda buldukları gözlenmiştir. VA'nda flavonoid olarak kalkonlar ve flavanonlar bulunur. Fakat bu bileşenler VA'nun alkollerle ekstraksiyonu sonucu daha çok glikozid formunda veya metoksil türevleri olarak ortaya çıkmaktadır. Kuersetin, kaempferol ve bunların mono, di ve trimetileterlerini içeren diğer flavonoidler de farklı VA türlerinin epikutikular (yüzey) mumlarından izole edilmiştir. Kuersetinin, VA ekstraktının asit hidrolizinden sonra ortaya çıktığı bildirilmiştir.

Fenilpropanoidler çeşitli fonksiyonel yapılara ve geniş spektrumlu tıbbi etkilere sahip, VA'unun önemli biyoaktif bileşikleridir. Koniferin, siringin ve siringarezinol gibi lignanlar, VA'unda yaprak ve gövde kısmında bulunan önemli fenilpropanoidlerdir.

1.14.2.5. Yağda çözünen bileşenler

Terpenoidler gibi yağda çözünen bileşikler, VA'unun ana bileşenlerindedir. VA'unun yağda çözünür ekstraktından oleanolik asit, β -amirin asetat, lupeol, lupeol asetat, betulinik asit, ursolik asit ile β -sitosterol, stigmasterol ve bunların esterlerini içeren bir fitosterol karışımı tanımlanmıştır. Ayrıca, ülkemizde yetişen VA'larından elde edilen ekstraktlarda palmitik, araşidik, lignoserik, behenik ve serotik asit gibi doymuş yağ asitleri ile oleik, linoleik ve linolenik asitler gibi doymamış yağ asitleri izole edilmiştir.

1.14.2.6. Mineral maddeler

VA'u bileşiminde potasyum, kalsiyum, sodyum, magnezyum, fosfat gibi makro minerallerle, selenyum, çinko, mangan, silika ve nikel gibi eser elementler de bulunmaktadır. Mineral madde açısından VA'nda kalsiyum, çözünmeyen oksalat formunda tespit edilmiştir. Meşe ve köknarda yetişen VA'nda yüksek oranda mangan içeriği bildirilmiştir.

1.14.2.7. Diğer kimyasal bileşenler

Siklik peptitler, aminler (histamin ve setilkolin), alkaloidler, jasmonik asit, sistein, glutatyon, askorbik asit ve ksantofil VA'nda bulunan diğer önemli bileşenlerdir.

1.14.3. VA'nun biyolojik etkileri

1.14.3.1. Antiinflamatuvar etkisi

Siklooksijenaz-2 (COX-2), birçok patolojik durumda proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, enfeksiyöz ajanlar, bakteriyel lipopolisakkarit vb. gibi çeşitli proinflamatuvar uyarıcılar aracılığıyla hücrelerin çoğunda aşırı eksprese edilen bir erken yanıt proteindir. COX-2, inflamasyonun önemli bir moleküler aracı olan prostaglandin E2 (PGE2)'nin biyosentezi için gerekli kritik bir enzimdir. İsviçre'de yetişen meşe ağaçları üzerinden toplanan VA'ndan elde edilen Iscador Qu Spez adlı

preparatın, A549 insan akciğer kanseri hücre hattında antiinflamatuvar etkisinin incelendiği bir çalışmada, ilgili preparatın COX-2 enzim aktivitesini seçici olarak inhibe ettiği ve bu sayede sitokin kaynaklı PGE2 sentezinin engellendiği gözlenmiştir (Saha ve ark 2015). Bir başka çalışmada yine bir ticari VA preparatı olan Isorel'in melanom üzerine etkisi fareler üzerinde incelenmiş, 100 mg/kg tek doz uygulanan Isorel intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonunun tümör boyutlarını küçülttüğü, antiinflamatuvar etkisi ile ödem oluşumunu azalttığı ve tümör nekrozunu tetiklediği bildirilmiştir (Zarkovic ve ark 1997). VAA ekstraktının etil asetat fraksiyonundan izole edilen 5 farklı flavonoid türevinin antinosiseptif ve antiinflamatuvar etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise, fareler üzerinde *p*-benzokinon ile indüklenen kıvrınma testi ve karagenan ile indüklenen arka ayak ödem modeli kullanılmış, 30 mg/kg'luk dozda uygulanan flavonoid türevlerinden 2'sinin, mide hasarı başta olmak üzere herhangi bir akut toksisiteye neden olmadan belirgin antinosiseptif ve antiinflamatuvar etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Orhan ve ark 2006).

1.14.3.2. İmmunmodülatör etkisi

VA bileşenleri önemli immunmodülatör etkilere sahiptir. VA'nun tüberküloz gibi akciğer kaynaklı patolojik durumlarda interferon gama (IFN- γ) yanıtlarını önemli ölçüde arttırdığı bildirilmektedir (Lyu ve Park 2007). Yapılan *in vivo* bir çalışmada VA QU FrF adlı VA preparatının, IL-12'ye bağlı bir mekanizma ile tümör gelişimini önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (Van Huyen ve ark 2006). Dendritik hücreler, immun yanıtın düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. VA Qu Spez'in insan dendritik hücreleri üzerinde etkilerinin incelendiği bir çalışmada; VA Qu Spez'in, IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını indüklediği ve CD4⁺ T hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı bildirilmiştir (Elluru ve ark 2008). Kore VA lektini (*V. album var. coloratum* agglutinin (VCA)) ile yapılan bir çalışmada, VCA ile inkübe edilen insan T hücrelerinin gen ekspresyon profilinin transkriptomal analizi sonucu; sitokinler, hücre adezyonu, hücre hareketliliği, hücre büyümesi, hücre onarım, hücre ölümü, stres ve dış uyarıcı faktörlere bağlı yanıt gibi pek çok immun fonksiyonda yer alan yaklaşık 3000 gen'in aktivasyonu ve inhibisyonu ortaya konmuştur (Lyu ve Park 2011). VCA'nın immünomodülatör etkisinin araştırıldığı bir diğer deneysel çalışmada, VCA'nın doz bağımlı olarak (4-64 ng/mL), konkanavalin A (ConA) ile uyarılan fare splenositlerinde IL-4 seviyelerini değiştirmeden IFN- γ salgılanmasını azalttığı bildirilmiştir (Lyu ve Park 2006).

%1 ve %2 Kore VA ekstraktı ile zenginleştirilmiş diyet uygulanan deneysel bir hayvan çalışmasında, Kore VA ekstraktının *Philasterides dicentrarchi* protozoonlarına karşı deniz orfozlarında solunum patlaması ve fagositik aktivite gibi doğuştan gelen immun yanıtları pozitif yönde etkilediği bildirilmiştir (Harikrishnan ve ark 2011). NK hücrelerin, tümör hücrelerini doğrudan yok edilmesinde önemli işlevlerinin olduğu tahmin edilmektedir. *In vitro* ve *in vivo* yapılan birçok çalışmada, VCA'in lenfositlerin, doğal öldürücü hücrelerin ve makrofajların modülasyonu yoluyla immun sistemi güçlendirdiği bildirilmektedir (Elluru ve ark 2006). VA ile yapılan klinik çalışmalarda VA'nun subkutan uygulamasının NK hücreler, B hücreleri, CD4⁺ T hücreleri ve sitotoksik T hücreleri dahil olmak üzere aktif lenfosit alt gruplarının bağıl sayısında artışa neden olduğu ve immun sistem fonksiyonlarına katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (Büssing ve ark 2007). İnsan immün hücre hatları üzerinde yapılan bir hücre kültürü çalışmasında, VAA ekstraktlarının nötrofillerin fagositik ve kandidasidal aktivitelerini artırdığı, epitel hücrelerin yapışma fonksiyonlarını azalttığı, CD4⁺CD25⁺ ve CD8⁺CD25⁺ T hücreleri ile CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NK hücrelerin sayısını artırdığı bildirilmiştir (Fidan ve ark 2008). Elma ve çam VA ekstraktlarıyla yapılan klinik çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş, bu ekstraktların kanser hastalarında CD4⁺ T hücrelerinin *in vitro* oligoklonal aktivasyonunu indüklediği bildirilmiştir (Fischer ve ark 1997). Ayrıca yapılan bir başka çalışmada da VA ekstraktlarının hücre öldürme kapasitelerinin konakçı ağaca özgü olduğu, lektin veya viskotoksin içeriği ile ilişkili olmadığı da bildirilmiştir (Büssing ve ark 1997).

1.14.3.3. Antioksidan etkisi

VA ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin, konakçı ağaca ve hasat zamanına bağlı olarak değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Farklı VA ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin incelendiği *in vitro* bir çalışmada, ıhlamur ve beyaz akasya ağacından elde edilen ekstraktların HeLa hücrelerinde H₂O₂'nin neden olduğu mitokondriyal DNA hasarını tamamen engellediği, çit akçağacından elde edilen ekstraktın ise mitokondriyal DNA hasarını sadece %50 oranında engellediği bildirilmiştir (Önay-Uçar ve ark 2012). Polifenolik bileşikler içeren VA'nun organik ekstraktlarının, antiglikasyon ve antioksidan özellikler gösterdiği bildirilmiştir (Choudhary ve ark 2010). Kore VA lektininin oksidatif stres koruyucu aktivitesi, LLC-PK1 renal epitel hücreleri kullanılarak *in vitro* olarak incelenmiştir. Kore VA

lektininin, 42.6 µg/mL IC₅₀ değeri ile güçlü bir radikal süpürücü potansiyeli hesaplanmış, konsantrasyona bağlı bir şekilde nitrik oksit (NO), süperoksit anyonu ve hidroksil radikallerine karşı önemli derecede serbest radikal söpürücü potansiyeli gösterilmiştir. Ayrıca lektin ile tedavi edilen LLC-PK1 hücrelerinde COX-2, indüklenebilir NO sentaz, SIN-1 ile indüklenecek nükleer faktör kapp B inhibisyonu ve inhibitör kapp B alfa'nın fosforilasyonu da görülmüştür (Kim ve ark 2010). Yapılan bir diğer çalışmada ise, farklı konukçu ağaçlardan toplanan VA'larının metanol ekstraktları, antioksidan aktivite potansiyelleri açısından incelenmiş; yaz mevsiminde ıhlamur ağacından toplanan VA'ndan elde edilen ekstraktın, en yüksek radikal temizleme ve antilipid peroksidasyon aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Önay Uçar ve ark 2006).

1.14.3.4. Antimikrobiyal etkisi

Bazı tıbbi bitkilerin antimikrobiyal etkinliklerinin incelendiği bir çalışmada, metanolik VA ekstraktı 32 patojenik mikroorganizmanın 9'una karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Sengul ve ark 2009). *Viscum album* spp. *album*'un yapraklarından elde edilen su ekstraktlarının Vero hücrelerinde insan parainfluenza virüsü tip 2 (HPIV-2) büyümesi üzerine etkileri açısından analiz edilmiş, 1 µg/mL ekstraktın HPIV-2 replikasyonunu engellediği ve konak hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki oluşturmaksızın virüs üretimini %99'dan fazla inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Karagöz ve ark 2003). Klinik bir çalışmada ise, kronik hepatit C'li 5 hastada, bir yıl boyunca Iscador subkutan enjeksiyon tedavisini takiben yan etkiler yaşamadan viral yükte %6-20 oranında bir azalma ve 2 hastada KC inflamasyonunun ortadan kalktığı görülmüştür (Tusenius ve ark 2001).

1.14.3.5. Antihipertansif etkisi

VA ekstrelerinin hipertansiyon tedavisinde geleneksel kullanımı, günümüzde yapılan bilimsel araştırmalarla doğrulanmıştır. Bu konuda yapılan hayvan çalışmalarıyla, etanolik VA ekstraktı uygulamasının kan basıncını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Etanolik VA ekstraktının etkisini esas olarak muskarin reseptörleri aracılığıyla gösterdiği bildirilmiştir (Radenkovic ve ark 2009). Ayrıca su ekstraktının da hipertansif hayvanlarda normotansif hayvanlara nazaran daha yüksek olan kan basıncında önemli bir düşüşe neden olduğu, ekstraktın aktivitesini esas

olarak sinir sistemi üzerine olumlu etkiler göstererek sağladığı, bu sayede periferik vasküler kan basıncını düşürdüğü bildirilmektedir (Ofem ve ark 2007).

V. album ssp. album'dan izole edilen fenolik bileşikler, fenilpropanoidler ve flavonoidlerin doza bağlı olarak cAMP-fosfodiesterazları inhibe ederek vasküler gevşemeye neden olduğu, buna paralel kan basıncının düşmesine katkı sağladıkları bildirilmiştir (Deliorman ve ark 2000).

1.14.3.6. Antidiyabetik etkisi

VA ekstrelerinin diyabet tedavisinde geleneksel kullanımı da, birtakım *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla doğrulanmıştır. Su ekstrelerinin, klonal B hücrelerinde doza bağlı olarak insülin salınımını artırdığı, bunun yanında VA'nun aktif bileşenlerinin ısıya dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Gray ve Flatt 1999). VA'nun antidiyabetik etkisiyle ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise, alloksan ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde hiperglisemik tavşanlar ve sıçanlarda VA'nun su ekstraktının serum insülin seviyelerinde yükselişe paralel, serum glikoz seviyelerinde önemli bir düşüşe yol açtığı gözlenmiştir (Ohiri ve ark 2003, Mohammad ve ark 2011).

Streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçan modeliyle gerçekleştirilen bir diğer çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. 3 hafta boyunca metanolik VA ekstraktı uygulanan diyabetik sıçanlarda, kan glukoz seviyelerinde önemli miktarda bir azalma ve normal sıçanlara göre iki kat daha yüksek α -amilaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Diğer çalışma bulguları da metanolik VA ekstraktının diyabetin neden olduğu böbrek fonksiyon bozukluğuna, KC enzimlerinin ve lipid profilinin normalleşmesine karşı potansiyel bir koruyucu etki gösterdiğini de ortaya koymuştur (Adaramoye ve ark 2012). Ayrıca VA bileşiminde yer alan bazı fenolik bileşiklerin, diyabetin birçok komplikasyonunun nedeni olan ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumunu da engellediği bildirilmektedir (Choudhary ve ark 2010).

1.14.3.7. Antikanser etkisi

VA üzerine yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde, bu çalışmaların büyük bir kısmında VA'nun antikanser aktivitesine yoğunlaşıldığı görülmektedir. Birçok klinik çalışmada VA tedavisinin kanser hastalarında yaşam kalitesini iyileştirdiği, yaşam süresini uzattığı ve tümör gerilemesini sağladığı gözlemlenmiştir.

Bu olumlu etkiler karşısında, VA ile desteklenen kanser tedavisinde hastalığın evresine ve hastanın tedaviye verdiği yanıtı göre çeşitli tedavi protokolleri, uygulama yöntemleri ve dozları kullanılmaya başlanmıştır (Jurin ve ark 1993).

Klinik araştırmalarda, VA ekstraktlarından izole edilen farklı bileşenlerin yine birbirinden farklı antikanser etkilere sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu bağlamda lektinler başta olmak üzere birçok VA bileşeninin kanser hücreleri üzerinde doğrudan sitotoksik etkiler gösterdiği veya hücre apoptozuna neden olduğu görülmüştür. Lektinlerde A ve B zincirlerinin her ikisi de sitotoksik etkilere sahiptir, ancak B zincirleri, tümör hücrelerinin seçiciliğini belirleyen varsayılan hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşime girerek sitotoksik etkinin azalmasına neden olmaktadır (Liu ve ark 2010). Lektinler, nükleer p53 ve Bcl-2 proteinlerinin azalmasına ve telomerik interaksiyonlara neden olarak apoptotik yolağın ve ML-III aktivitesinin indüklenmesini sağlar Bu'ssing et al. 1998. Lektinlerin, toksik olmayan konsantrasyonlarda, proinflatuar sitokinler IL-1, IL-6 ve TNF- α 'nın salgılanmasına neden olarak tümör büyümesini engellediği bildirilmektedir (Ribereau-Gayon ve ark 1996).

VA lektinleri, mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) bozulmasını ve kaspaz-3'ü uyararak Apaf-1 yolağı ile apoptozu indükleyebilmektedir. ML-I tarafından c-Jun N-terminal kinaz (JNK) stimülasyonu, proapoptotik proteinler Bax ve Bad'in yer değıştirmesine yol açmaktadır. ML-I Bcl-2'nin baskılanmasına, buna karşın TNF- α aktivasyonu ile apoptozu tetiklemektedir (Liu ve ark 2013). VA Qu FrF'in *in vitro* insan T hücre dizileri CEM'de ve monosit hücre dizileri HL-60 ve MM-6'da önemli derecede hücre toksisitesini indüklediği bildirilmiştir (Sooryanarayana ve ark 2001). Viskotoksin içermeyen VA ekstraktlarının, granülosit aktivitesini önemli ölçüde artırdığı ve bu etkinin VA lektin içeriğı ile ilişkili olabileceğı öne sürülmüştür (Stein ve ark 1999).

8 farklı konakçı ağaçtan (Iscucin Abietis, Pini, Populi, Mali, Salicis, Crataegi, Quercus ve Tiliae) elde edilen VA preparatları, Daoy, D342, D425 ve UW 288-2 medulloblastoma hücre hatlarına uygulanmış, elde edilen sonuçlar bu preparatların önemli sitotoksik etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Mitokondriyal aktivitede azalma ve apoptotik hücre ölümündeki artışın, kullanılan preparatın lektin içeriğı ve doz miktarıyla korelasyon gösterdiği, farklı ekstraktlar arasında hücre

duyarlılıkları yönünden ise ciddi bir farklılık bulunmadığı gözlenmiştir. ML-I, ML-II ve ML-III'ün Molt-4 lenfoblastik hücre hattı için pg konsantrasyonlarında bile toksik olduğu, ML-III'ün ise sitotoksitesi en yüksek lektin olduğu bildirilmiştir (Zuzak ve ark 2006).

Kore VA'ndan fraksiyonlanan başlıca sitotoksik bileşenler ile bu bileşenlerin ısıtıl işlem kaynaklı toksik etkinliklerindeki değişiklikler araştırıldığı bir çalışmada, ML-I maksimum toksisite göstermiş, ancak 30 dakika ısıtma ile bu etkinliğin kaybolduğu gözlenmiş, bu sonuçlar VA lektinlerinin tek başına apoptozu indüklemekten sorumlu olmadığını, apoptozun ancak diğer VA bileşenlerinin de katılımıyla mümkün olabileceğini ortaya koymuştur (Büssing ve Schietzel 1999). Viskotoksinler ve alkaloidlerin, sırasıyla 60 ve 180 dakika ısıtıldıktan sonra bile etkilerini koruduğu, ayrıca alkaloid fraksiyonunun MSV tümör hücrelerinde, tümör olmayan A31 hücrelerine göre daha etkili olduğu görülmüştür (Park ve ark 1999). İzole edilen KML-C'in, Ca^{2+}/Mg^{2+} bağımlı endonükleazların aracılık ettiği apoptozu indükleyerek çeşitli insan ve fare tümör hücrelerine karşı güçlü sitotoksite gösterdiği bildirilmiştir (Yoon ve ark 1999).

Birçok çalışmada VA bitkisinden elde edilen sulu ekstraktlar kullanılmış, ancak tüm VA bileşenlerinin, örneğin triterpenlerin suda çözünmediği gözlenmiştir. Akut lenfoblastik lösemi (ALL) üzerine yapılan *in vivo* bir çalışmada, VA'ndan izole edilen triterpenlerin çözünürlüğü arttırmak için siklodekstrinler kullanılmış, triterpen ve lektin kombinasyonu doz bağımlı olarak apoptozu indükleyerek hücre proliferasyonunda önemli bir inhibisyon sağlamıştır (Delebinski ve ark 2012). Benzer bir çalışmada VA'ndan izole edilen triterpenler siklodekstrinlerle kombine edilerek fare B16.F10 melanom hücrelerine uygulanmış, hücre apoptozunun belirgin şekilde indüklendiği gözlenmiştir (Strüh ve ark 2012).

Fareler üzerinde yapılan *in vivo* bir çalışmada polar olmayan süperkritik CO₂ VA ekstraktın, oksidatif stresi indükleyerek Ehrlich karsinom hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Cebović ve ark 2008).

VA ile yapılan antikanser çalışmalarında, viskotoksinler de güçlü sitotoksite göstermiş, ancak viskotoksin türüne göre sitotoksik aktivite farklılık göstermiştir. Bu konuda Yoshida sarkom hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada sitotoksik aktivitesi

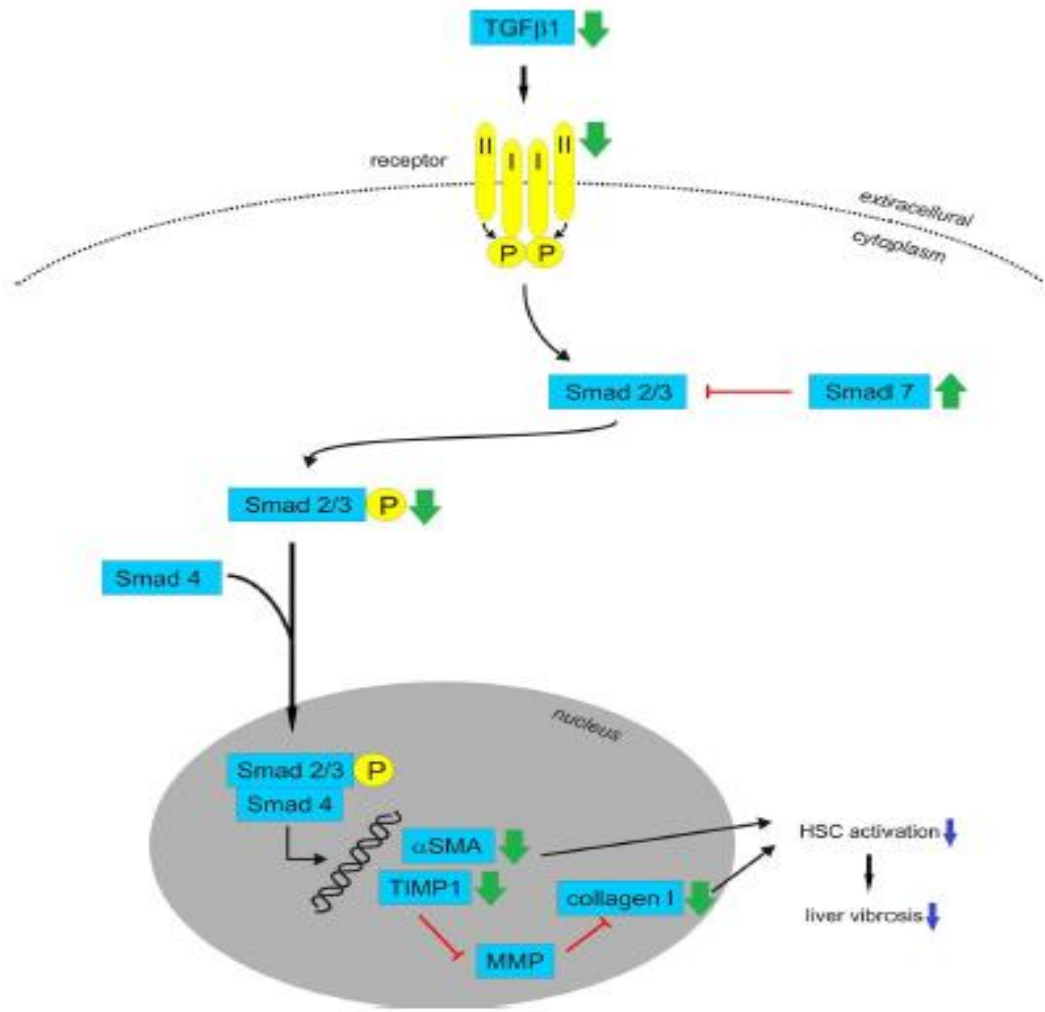
en yüksek viskotoksin formu olarak viskotoksin A3, sitotoksik aktivitesi en düşük viskotoksin formu olarak da viskotoksin B öne çıkmıştır (Schaller ve ark 1996).

Birçok hayvan çalışmasının yanı sıra randomize olmayan, randomize ve kohort çalışmaları, VA ekstraktlarının meme ve jinekolojik kanserlerde potansiyel terapötik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlar konvansiyonel tedavi sonrası yaşam kalitesinde iyileşme, yan etkilerin giderilmesi ve sağkalımda artış olduğunu göstermiştir (Kienle ve ark 2009). Pankreas kanserli hastalarda yapılan bir klinik çalışmada da Iscador Qu Spez (s.c.) uygulamasının genel sağkalım oranlarında artış sağladığı gözlenmiştir (Tröger ve ark 2013). Bir cilt kanseri (kutanöz skuamöz hücreli karsinom) vakasında da benzer olumlu sonuçlar raporlanmış, yüksek doz VA ekstresi ile 10 aylık tedaviden sonra patolojik değişikliklerin ortadan kalktığı bildirilmiştir (Werthmann ve ark 2013).

1.14.3.8. Karaciğer koruyucu etkisi

KC hücre hasarının önemli biyobelirteçleri artmış serum ALT, AST ve alkalın fosfataz (ALP) düzeyleridir. KC hasarı üzerine ratlar üzerinde yapılan birçok çalışmada, farklı VA türlerinin serum ALT, AST ve ALP düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (Abdel-Salam ve ark 2010, Ogbonnanya ve ark 2010, Yusuf ve ark 2015). Ayrıca, limon ağaçları üzerinde yetişen VA'larının sulu ekstraktlarının, yüksek tuzla beslenen ve STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda serum bilirubin düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (Effiong ve ark 2014, Udo ve ark 2014). Klinik çalışmalarda da bazı hazır VA preparatlarının (Iscador ve AbnobaViscum) serum ALT ve AST düzeylerinde önemli gerilemeler sağladığı bildirilmiştir (Tusenius ve ark 2005). Tusenius ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, Iscador ile tedavi edilen kronik hepatit C'li beş hastadan ikisinde, HCV-RNA düzeylerinde 6-20 kat oranında azalmalarla birlikte, serum ALT ve AST düzeylerinde de iyileşmeler gözlenmiştir (Tusenius ve ark 2001). Huber ve ark.'nın yaptığı bir başka çalışmada ise, kronik hepatit C'li ve yüksek ALT düzeylerine sahip hastaların hiçbirinde AbnobaViscum Quercus ile tedavinin serum ALT ve HCV-RNA düzeylerinde tam veya kısmi bir normalleşme gözlenememiştir. Bu nedenle kronik hepatit C'li hastalarda VA ekstraktlarının KC koruyucu etkisi netlik kazanamamıştır (Huber ve ark 2001). VA'nun KC koruyucu etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, bu etki mekanizmasına TGF- β /Smad sinyal yolağının aracılık ettiği düşünülmektedir.

Hepatik fibrozisin, hücre dışı matris (ECM) proteinlerinin aşırı birikimi ile karakterize olduğu kabul edilmektedir. Dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1), hepatik stellat hücreleri (HSC)'nin aktivasyonunu sağlayan, ECM proteinlerinin sentezini uyarıp, buna karşın ECM proteinlerinin yıkımını inhibe eden önemli bir sitokindir. TGF- β 1 aktiflendiğinde, reseptörlerine bağlanarak aktivitelerini smad'a bağımlı ve bağımsız yollarla, otokrin ve parakrin olarak farklı şekillerde gösterebilmektedir. Smad'lar, sinyalleri hücre yüzeyi reseptörlerinden doğrudan çekirdeğe ileten sinyal iletim molekülleridir. Smad sinyal iletim yollarının, TGF- β 1 ile indüklenen kollajen sentezine aracılık ettiği ve KC hasarı sürecinde çok önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Dokuz farklı smad bildirilmiş ve kendi içlerinde üç gruba ayrılmıştır. TGF- β 1 reseptörüne bağlandığında, smad-2 ve smad-3 fosforile olarak smad 4 ile bağlanır ve hedef genin translasyonu ve ekspresyonu için çekirdeğe doğru birlikte hareket ederler. Smad-7, smad-2 ve smad-3 aktivasyonunu negatif olarak düzenleyen ve TGF- β 1 reseptörünü hedefleyerek işlev gören bir inhibitör smad'dır (Szurpnicka ve ark 2020). Karbon tetraklorür (CCl₄) ile KC hasarı oluşturulan ratlar üzerinde yapılan *in vivo* bir çalışmada, VA alkaloid fraksiyonları ile tedaviden sonra TGF- β 1, TGF- β 1 reseptörü ve fosforile smad-2 protein düzeylerinin azaldığı, smad-7 düzeylerinin ise arttığı gözlenmiştir. Bunun yanında kollajen-I ve metalloproteinaz doku inhibitörlerinin (TIMP-1) mRNA düzeylerinin de aşağı yönde regüle edildiği ve aktive edilmiş HSC'nin belirteci olan α -düz kas aktin (α -SMA)'lerinin de bloke edildiği bildirilmiştir (Jiang ve ark 2014). HSC-T6 hücre serisiyle yapılan *in vitro* bir çalışmada ise, VA alkaloid fraksiyonları ile tedavinin smad-7 ekspresyonunu indüklediğini ve α -SMA, TGF- β 1, TGF- β 1 reseptörleri, smad-2 ile TIMP-1 ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Szurpnicka ve ark 2020).



Şekil 1.6. VA'nun KC koruyucu etki mekanizması (Szurpnicka ve ark 2020).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan kimyasallar

- Folin reaktifi: Sigma-Aldrich Folin & Ciocalteu F9252-100 ml
- Na₂CO₃ (Sodyum karbonat): Merck CAS No: 497-19-8 / 106392
- Gallik asit: Sigma-Aldrich Gallic Acid CAS No: 149-91-7-100 g
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl): Sigma-Aldrich CAS No: 1898-66-4 / 5 g
- Troloks: Sigma-Aldrich CAS No: 135806-59-6
- Askorbik asit: Sigma-Aldrich L-Ascorbic acid - CAS No: 50-81-7-100 g
- Amonyum molibdat: Merck 101180 / 250 g
- Na₂HPO₄.12 H₂O (Disodyum hidrojen fosfat): Merck 106579 / 1 kg
- Triton X-100: Sigma-Aldrich CAS No: 9036-19-5
- Paraformaldehit: Merck CAS No: 30525-89-4 | 104005
- Potasyum klorür: Sigma-Aldrich CAS No: 7447-40 / 500 g
- Etanol: Sigma-Aldrich Ethanol - CAS No: 64-17-5 / 2,5 l
- Metanol: Sigma-Aldrich Methanol - CAS No: 67-56-1 / 2,5 l
- Amonyum Persülfat: Bio-rad Cat. no: 161-0700 / 10 g
- Akrilamid: Bio-rad Cat. no: 161-0101 / 500 g
- Bisakrilamid: Bio-rad Cat. no: 161-0201 / 50 g
- Temed: Bio-rad Cat. no: 161-0800 / 5 ml
- Sodyum dodesil sülfat (SDS): Bio-rad Cat. no: 161-0301 / 100 g
- Tris: Bio-rad Cat. no: 161-0716 / 500 g
- Glisin: BBI Solutions Lot no: G615BA0021 / 500 g

- Tween-20: Biorad Cat. no: 1706531 / 100 ml
- Bovine serum albümine (BSA): Bioshop Lot no: 1F71721 / 25 g
- Hazır Jel-1,0 mm*10 kuyucuk: NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10-well Cat no: NP0321BOX
- Örnek yükleme tamponu: ClearBand (2X) Cat. no: LSB-2x / 15 ml
- PVDF membran-60 cm²: iBlot™ Transfer Stack, PVDF, regular size Cat. no: IB401001
- Filtre kağıdı: Bio-rad Mini Trans-Blot Filter paper Cat. no:1703932
- Protein marker: Intron GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder Cat. no: 24052 / 250 µl
- Bax primer antikoru: Bax Monoclonal Antibody (6A7) Cat. no: MA5-14003
- Bcl-2 primer antikoru: Bcl-2 Monoclonal Antibody (100/D5) Cat. no: MA5-11757
- β-Aktin primer antikoru: beta Actin Loading Control Monoclonal Antibody (BA3R) Cat. no: MA5-15739
- Sekonder antikor: Goat Anti-Mouse IgG1 (HRP) preadsorbed (ab98693) Abcam, UK
- ECL substrat kiti: Miracle-Star™ Western Blot Detection System Lot no: 203210354
- DAPI kapatma solüsyonu: ab104139 Fluoroshield Mounting Medium With DAPI 20 ml Abcam
- Protein Block (64226), Abcam, UK
- TRITC Goat Anti-Rabbit (Ig G) Secondary Antibody ab6718, Abcam, UK
- Kaspaz-3 primer antikoru: Anti-Caspase-3 antibody, ab4051, Abcam, UK
- Kaspaz-9 primer antikoru: sc-56076-caspase-9-Santa Cruz Biotechnology, USA
- Ketazol % 10-10 ml flk veteriner anesteziik

- Ksilazol-20 ml flk veteriner anesteziik
- CK-18 elisa kiti: Elabscience Lot no: J2ATV48SR3
- 8-OHdG elisa kiti: Elabscience Lot no: K41CRBJJ7Y
- TAK kiti: Rel Assay Diagnostics Lot no: MS22128A
- TOK kiti: Rel Assay Diagnostic Lot no: MS221420
- Total protein analiz kiti: Invitrogen Qubit™ Protein Assay Kit, 100 assays Lot no: 2127432
- Ripa lizis tamponu: Santa Cruz Cat no: sc-24948 Lot no: C2219, 50 ml
- N-asetilsistein: Asist 300 mg/3mL (%10) solüsyon içeren ampül, Bilim İlaç, Türkiye

2.1.2. Cihazlar ve laboratuvar gereçleri

- Bitki öğütücü: Empero Sd.06 Bitki Bakliyat Öğütücü Parçalayıcı
- 6'lı Balon ısıtıcı: Daihan WHM12295-500 ml
- Döner buharlaştırıcı: Buchi R100
- Liyofilizatör: Scanvac Cool safe 110-4 Pro / H10110046
- Laminar akımlı kabin: Steril VBH Compact
- Mikropipet (1000, 200, 10µl): Gilson
- Santrifüj: Sigma 3K30
- Spektrofotometre: Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis
- Ultra saf su cihazı: ELGA Purelab Option
- Orbital çalkalayıcı: GFL 3017
- Kuru blok ısıtıcı: IKA Thermal Block Heater
- Rutin otoanalizör: Beckman Coulter AU5800
- Termal döngüleyici: T100 Thermal Cycler –Bio-rad

- Jel dökme için cam plakalar (kısa/uzun): Bio-rad Cat. no: 1653308 / 1653311
- Florometre: Qubit 2.0 Fluorometer-Thermo Fisher
- Western Blot Elektroforez Tankı: Invitrogen Xcell Sure Lock™ EI0001
- Western Blot Elektroforez Tankı: Bio-rad Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell
- Güç kaynağı: Bio-rad PowerPac HC High-Current Electrophoresis Power Supply
- Western Blot transfer cihazı: IBlot Gel Transfer Device™ 10071023
- Western görüntüleme cihazı: VILBER Fusion FX
- Kriyostat cihazı (Thermo Shandon Cryostat 210160GB)
- Buzdolabı (+4 °C ve -20°C): ALTUS AL 302
- -40°C buzdolabı: SANYO MDF-U425
- -80°C buzdolabı: SANYO MDF-U5186S
- Elisa okuyucu: CLARIOstar ELISA Reader
- Sıcak su banyosu: WiseBath fuzzy systems
- Steril filtre: 0,45µm Lot no: N0403113103
- 15 ml'lik Falcon tüp: KIRGEN 15ml polypropylene conical tube
- 50 ml'lik Falcon tüp: KIRGEN 50ml polypropylene conical tube
- Eppendorf tüp-2 ml
- Enjektör-5 ml
- Enjektör-1 ml
- Bistüri ucu
- Patoloji kabı

2.2. Yöntem

2.2.1. Bitki örneklerinin toplanması

Nisan-Haziran 2019 döneminde şehir merkezi dışındaki Konya ili ve çevre ilçelerinde yayılış gösteren doğal ağaç toplulukları arasındaki farklı konakçı ağaçlar üzerinden (söğüt, badem, ahlat) toplanan VA örneklerinde, Necmettin Erbakan Üniversitesi (N.E.Ü.) Meram Meslek Yüksekokulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Süleyman DOĞU tarafından tür tayini yapılarak, her bir türden şahit örnekler alınmıştır. Bu şahit örnekler N.E.Ü. Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı (ABD) bünyesinde yer alan herbaryumda kayıt altına alınmıştır (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. VA örnekleri herbaryum bilgileri.

Lokasyon	Konakçı Ağaç	Tür Adı	Herbaryum Kayıt Numarası
Konya-Seydişehir karayolu 50.km	Söğüt	<i>Salix alba L.</i>	3077
Konya-Beyşehir karayolu Akyokuş mevki	Badem	<i>Amygdalus communis L.</i>	3078
Konya-Seydişehir karayolu 60.km	Ahlat	<i>Pyrus elaeagnifolia spp. kotschyana</i>	3079

2.2.2. VA ekstraktlarının hazırlanması

Tüm örnekler direk güneş ışığına maruz bırakılmadan, kapalı ve havalandırabilir bir ortamda gövde, dal ve yaprak kısımları bütün olarak yaklaşık 1 (bir) ay süreyle kurutulduktan sonra, paslanmaz çelik hazneli bitki öğütücüde (9000 devir/dk) öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz örnekler, 500 ml'lik balon jöjelerin kullanıldığı 6'lı mantolu balon ısıtıcı düzeneğinde, soxhlet ekstraksiyon yöntemiyle, 50-55°C'de, 8 saat süreyle 1:10 (w/v) oranında %96'lık saflıkta etanol ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Balonlardaki örnekler, 1 gün süre ile +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Ardından rotary evaporatör yardımıyla örneklerdeki çözücüler uzaklaştırılarak, -110°C'de liyofilize edilmiş ve kuru ekstraktlara dönüştürülmüştür.



Şekil 2.1. Kurutma aşamasındaki BVA örnekleri.



Şekil 2.2. Ekstraksiyon, çözücü uzaklaştırma ve liyofilizasyon aşamaları.

2.2.3. TFM, TAK ve TAA analizleri

Ekstraktların TFM içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Bir tüp içerisine 0,5 mL ekstraktan (1 mg/ml) alındıktan sonra, üzerine 2,5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (0,2N) ve 2,0 ml Na_2CO_3 (75 g/l) eklenerek karıştırılmıştır. Örnekler karanlık ortamda 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 765 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Bu işlemler tüm ekstraktlar için ayrı ayrı uygulanmıştır. Kalibrasyon eğrisi ve sonuçları oluşturmak için 5-100 ppm konsantrasyonlarda gallik asit standart çözeltileri mg gallik asit eşdeğeri (mgGAE)/g kuru ağırlık üzerinden ifade edilmiştir. Ekstraktların total fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu metodu ile standart olarak gallik asit kullanılarak belirlenmiştir. Tüm deneyler birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrarlanmıştır.

Ekstraktlarda TAK düzeyleri fosfomolibdat testi ile belirlenmiştir. Yöntemin prensibi Mo (VI) anyonunun Mo (V)'e indirgenmesi ve asidik koşullarda yeşil renkte fosfat/Mo (V) kompleksi oluşumuna dayanmaktadır. Bitki ekstraktlarının derişimleri 1 mg/ml şeklinde hazırlanmıştır. Standart olarak da 0,5 mg/ml ile 0,0375 mg/ml arasında beş farklı konsantrasyonda askorbik asit kullanılmıştır. Yöntemde kullanılacak reaktif çözeltisi için; herbirinden 25 ml olacak şekilde 0,6 M H_2SO_4 , 28 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve 4 mM amonyum molibdat hazırlanarak karıştırılarak reaktif

çözeltisi hazır hale getirilmiştir. Bir tüpe derişimi 1 mg/ml olan ekstraktan 0,1 ml alınıp, üzerine 1 ml reaktif çözeltisinden eklenmiştir. Tüpler karıştırılarak thermal block'ta 95°C'de 90 dakika inkübe edildikten sonra çözeltiler oda sıcaklığına getirilip absorbansları 695 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Aynı işlemler standart olarak kullanılan askorbik asit için de yapılarak, antioksidan aktivite mg askorbik asit eşdeğeri (mgAE/g) olarak hesaplanmıştır. Tüm deneyler birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrarlanmıştır.

Toplam antioksidan aktivite (TAA) 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) antioksidan testine göre belirlenmiştir. Ekstraktan alınan 0.1 mL (1 mg/ mL) üzerine 3.9 mL metanolde çözülmüş DPPH (6×10^{-5} M) eklenmiştir. Normal şartlar altında 30 dakika inkübe edildikten sonra 515 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Standart olarak 0.03-0.5 mM aralığında 5 farklı konsantrasyonda Troloks standart çözeltileri hazırlanmıştır. Antioksidan aktivite prosedürleri standart çözelti olan Troloks için de tekrarlanmıştır. Sonuçlar mmol Troloks Eşdeğeri TE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir. Tüm deneyler birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrarlanmıştır.

2.2.4. Deneysel çalışma

Deneysel çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi (SÜDAM) Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 28.12.2018 tarih ve 2019-15 karar sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda, SÜDAM'den temin edilen ve çalışma öncesi sağlık kontrolleri yapılan 38 adet 6-10 haftalık Wistar Albino ırkı erkek rat kullanılmıştır. Yem ve su ihtiyaçları isteğe bağlı olarak karşılanmıştır. Hayvanların barınma ortamları ışık (12/12 saat ışık/karanlık-07.30/19.30), ısı ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) ve nem ($\%55 \pm 5$) düzeyleri açısından kontrol altında tutulmuştur. Hayvanlar rastgele ve ağırlık kontrolleri yapılarak 5 gruba ayrılmıştır.

2.2.4.1. Deney grupları

Kontrol Grubu: Herhangi bir ekstrakt, ilaç ve radyoterapi (RT) uygulaması yapılmayan gruptur. Bu grupta yer alan ratlar deneysel çalışma için ayrılmış ve 14. günün sonunda anestezi altında kalpten kan alımından sonra servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek, KC doku örnekleri toplanmıştır. Serum ve doku örnekleri -80°C 'de analiz edilinceye kadar saklanmıştır. (n=6)

RT Grubu: Bu grupta yer alan ratlara çalışmanın 1. gününde 12 Gy lik tek doz RT uygulanmış ve 14. günün sonunda anestezi altında kalpten kan alımından sonra servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek, KC doku örnekleri toplanmıştır. Serum ve doku örnekleri -80 °C’de analiz edilinceye kadar saklanmıştır. (n=8)

RT+VA Grubu: Bu grupta yer alan ratlara çalışmanın 1. gününde 12 Gy lik tek doz RT uygulanmış ve deney süresi boyunca 500 mg/kg BVA ekstraktı gavaj ile verilmiştir. 14. günün sonunda anestezi altında kalpten kan alımından sonra servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek, KC doku örnekleri toplanmıştır. Serum ve doku örnekleri -80 °C’de analiz edilinceye kadar saklanmıştır. (n=8)

RT+NAS Grubu: Bu grupta yer alan ratlara çalışmanın 1. gününde RT’den 1 saat önce 275 mg/kg/48 saat i.p. NAS uygulandıktan sonra, 12 Gy lik tek doz RT uygulanmış ve 14. günün sonunda anestezi altında kalpten kan alımından sonra servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek, KC doku örnekleri toplanmıştır. Serum ve doku örnekleri -80 °C’de analiz edilinceye kadar saklanmıştır. (n=8)

RT+NAS+VA Grubu: Bu grupta yer alan ratlara deney süresi boyunca 500 mg/kg BVA ekstraktı gavaj ile verilmiştir. Çalışmanın 1. gününde RT’den 1 saat önce 275 mg/kg/48 saat i.p. NAS uygulandıktan sonra, 12 Gy lik tek doz RT uygulanmış ve 14. günün sonunda anestezi altında kalpten kan alımından sonra servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek, KC doku örnekleri toplanmıştır. Serum ve doku örnekleri -80 °C’de analiz edilinceye kadar saklanmıştır. (n=8)

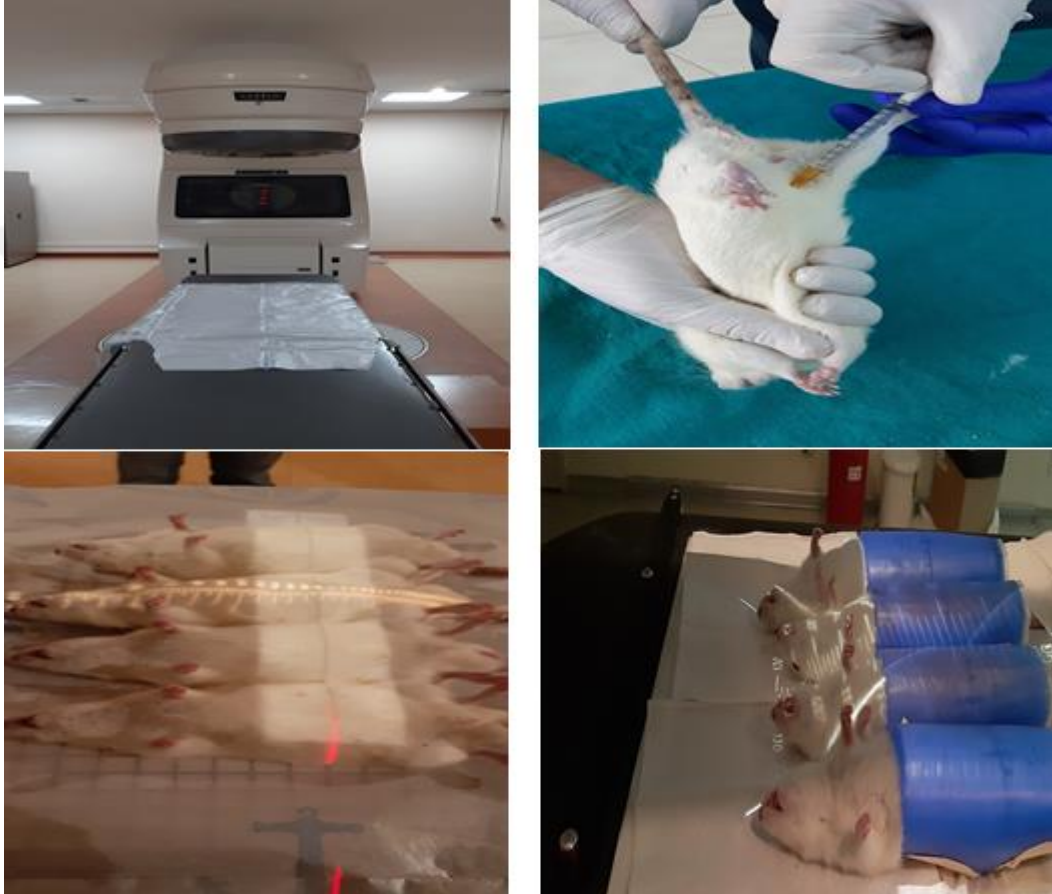
DeneySEL çalışma sonunda RT uygulanan deney gruplarında ikişer ölüm gerçekleşmiş olup, çalışma her grupta altışar hayvan ile tamamlanmıştır.

2.2.4.2. BVA ekstraktı ve NAS doz seçimi

Çalışmamızda farklı konakçı ağaçlar (badem, ahlat, söğüt) üzerinden toplanan VA örneklerindem elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde, toplam antioksidan kapasite ve antioksidan aktivite analizleri sonucunda öne çıkan VA türü olarak belirlenen BVA, Orhan ve ark.’nın çalışmalarında kullandıkları VA dozu 500 mg/kg ile kullanılmıştır (Orhan ve ark 2005). Çalışmada uygulanan NAS dozu ise, Sprong ve ark.’nın çalışmalarında uyguladığı 275 mg/kg/48 saat (i.p.) ile belirlenmiştir (Corinne Sprong ve ark 1998).

2.2.4.3. Radyoterapi uygulaması

Ratlar i.p. enjeksiyonla uygulanan anestezi altında, supin pozisyonda dört ekstremitesi bantlanarak sabitlenmiş, lineer hızlandırıcı cihazında kaynak-eksen mesafesi tekniğiyle 2,0 cm derinlikte (0,5 cm'lik bolus ile), anterior 4 x 4 cm² tek alanda ve tek fraksiyonda 12 Gy doz ile tüm abdomene RT uygulanmıştır. RT uygulaması S.Ü. Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi ABD'nda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.3. Anestezi altında RT uygulaması.

2.2.5. Doku homojenatlarının hazırlanması

Falkon tüpler içerisinde 1'er gr doku örnekleri üzerine 9 ml çalışma solüsyonu (0,15 M KCl) eklenerek, buz üstünde 9500 rpm'de 1-2 dk süreyle homojenize edilmiştir. Homojenatlar eppendorf tüplerine aktararak 4000g'de 20 dk +4°C'de santrifüj edilerek süpernatantlar ayrılmıştır. Ayrılan süpernatantlar TOK ve TAK analizlerinde kullanılmıştır.

2.2.6. Kan örneklerinin toplanması

TAK, TOK, ALT ve AST ölçümleri için ratlardan düz tüplere alınan kan örnekleri, 10 dk süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek serum kısımları ayrılmış ve

eppendorf tüplere belli miktarlarda porsiyonlanarak çalışma gününe kadar -80°C’de saklanmıştır.

2.2.7. Serum ALT ve AST düzeylerinin belirlenmesi

Serum örneklerindeki ALT ve AST düzeyleri S.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarındaki rutin biyokimya otoanalizöründe (Beckman Coulter AU5800, USA) belirlenmiştir.

2.2.8. Serum ve doku örneklerinde TAK ve TOK düzeyleri ve OSİ’lerinin belirlenmesi

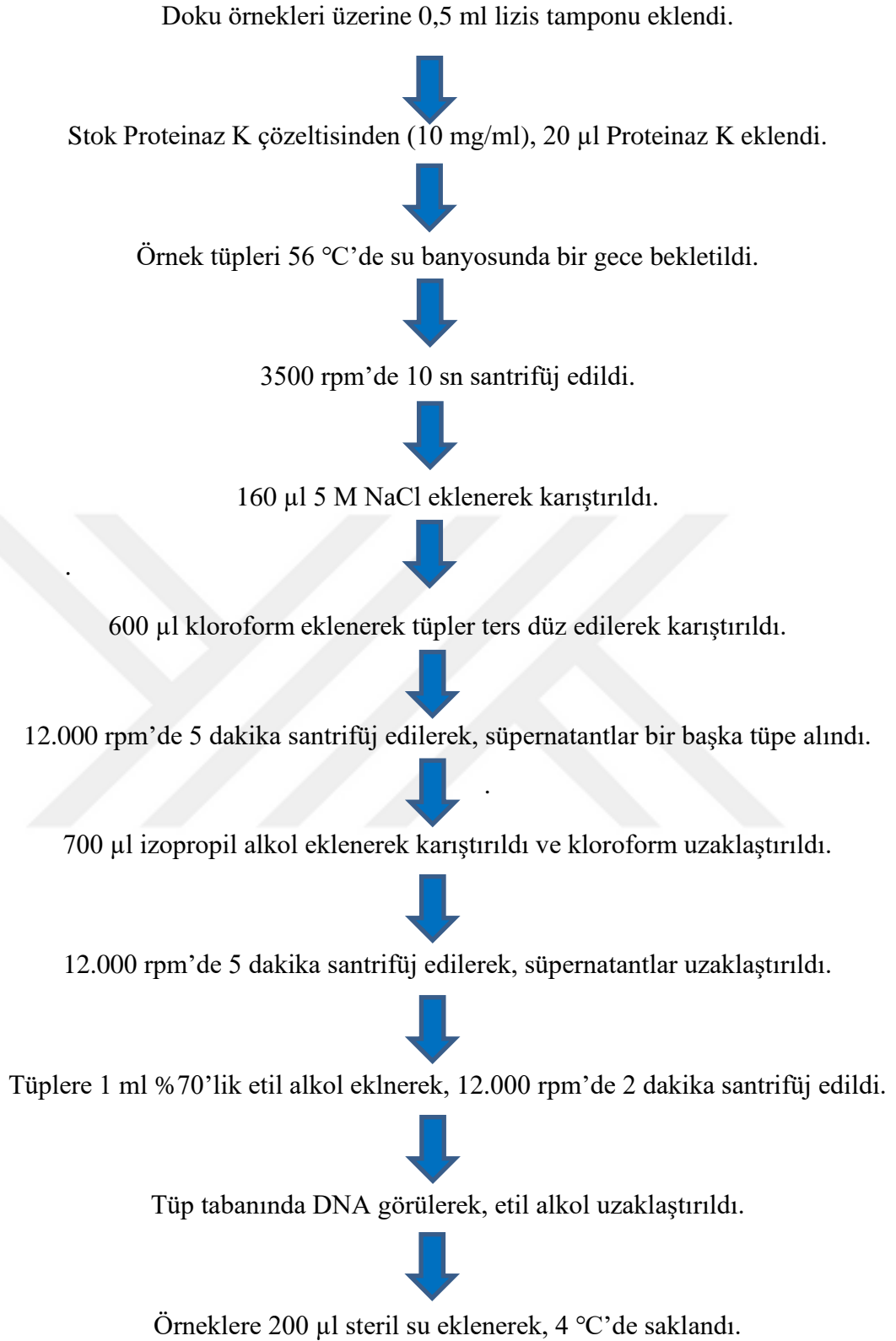
Serum ve KC doku örneklerinde TAK ve TOK düzeyleri hazır ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik olarak S.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarındaki rutin biyokimya otoanalizöründe (Beckman Coulter AU5800, USA) belirlenmiştir. OSİ’leri TOK/TAK formülüyle hesaplanmıştır.

2.2.9. Karaciğer doku örneklerinde 8-OHdG düzeylerinin belirlenmesi

Karaciğer dokularında DNA izolasyonunu takiben, 8-OHdG düzeyleri hazır ticari kit ile ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Doku örnekleri ilk aşamada çizelge 2.2.’de bileşimi verilen lizis tampon çözeltisi ile muamele edilmiştir. Ardından DNA izolasyonu aşağıda şekil 2.3.’de verilen protokole göre yapılmıştır.

Çizelge 2.2. Lizis tampon çözeltisi bileşimi (100 ml için).

Bileşen Adı	Miktar
5 M NaCl	4 ml
1,5 M Tris pH (8,5)	6,66 ml
0,5 M EDTA	1 ml
% 10 SDS	2 ml.
dH ₂ O	100 ml’ye tamamlanır.



Şekil 2.4. DNA izolasyon protokolü.

2.2.10. Serum M-30 Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum M-30 düzeyleri hazır ticari kit ile ELISA yöntemiyle belirlenmiştir.

2.2.11. Karaciğer doku örneklerinden protein izolasyonu

KC dokularından protein izolasyonu Ripa lizis tampon kiti (Santa Cruz Katalog no: sc-24948) ile yapılmıştır. 1 ml Ripa başına; 10 µl PMSF, 10 µl sodyum ortovanadat ve 10-20 µl proteaz inhibitör kokteyl solüsyonu ilave edilerek 1X Ripa lizis tamponu hazırlanmıştır. 100'er mg doku örnekleri tartılarak, 1,5 ml'lik mikrofij tüplerde üzerlerine 300'er µl Ripa ilave edilmiş ve ultrasonik homojenizatörde buz üzerinde homojenize edilmiştir. Elde edilen doku homojenatları 14000 rpm, +4°C ve 15 dk süreyle santrifüj edilerek süpernatantları ayrılmıştır. Pellet kontaminasyonunu önlemek için ayrılan süpernatantlar tekrar santrifüj edilerek alikotlanmıştır. Alikotlanan örnekler çalışma gününe kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.12. Karaciğer doku örneklerinde total protein analizi

Total protein analizi florometrik olarak Qubit 2.0 cihazıyla yapılmıştır. Analiz öncesi hazır ticari kitte (Qubit™ Protein Assay Kit, Invitrogen) yer alan protein reaktifi ve tampon çözeltileri ile 1:200 oranında çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Standart sayısınınca, şeffaf 500 µl'lik eppendorflara bu çalışma solüsyonundan 190 µl konularak, üzerilerine 10'ar µl standart eklenerek 15-20 sn pipetaj yapılmış, sonrasında 15 dk karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra yine örnek sayısınınca, şeffaf 500 µl'lik eppendorflara bu çalışma solüsyonundan 199 µl konmuş, üzerlerine 1'er µl örnek eklenerek 15-20 sn pipetaj yapılmış, sonrasında yine 15 dk karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda öncelikle standartlar cihazda okutularak kalibrasyon eğrisi elde edilmiş, devamında örnekler sırasıyla okutularak cihazda okunan değer 200/1 ile çarpılarak çıkan sonuç µg/ml cinsinden ifade edilmiştir.

2.2.13. Karaciğer doku örneklerinde Western Blot yöntemi ile apoptotik protein (bcl-2, bax) ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

2.2.13.1. Elektroforez öncesi protein örneklerinin hazırlanması

Protein örneklerinin hazırlığında, jelle yüklenecek eşit protein miktarları her bir örnek için 30 µg proteine karşılık gelen hacim miktarı üzerinden (µl cinsinden) hesap edilmiştir. Jellerde kuyucuklara yüklenecek her bir 25 µl protein örneği (protein+distile su+10 µl 2X örnek yükleme tampon), kuru blok ısıtıcıda 90°C'de 5 dk inkübe edilerek protein denatürasyonu sağlanmış ve yükleme için hazır hale getirilmiştir.

2.2.13.2. SDS-PAGE jel elektroforezi

Proteinlerin elektroforezleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid (SDS-PAGE) hazır ve dökme %10'luk jellerde yapılmıştır. %10'luk dökme jellerde, ayırma ve yükleme jeli bileşimleri çizelge 2.3. ve çizelge 2.4.'de verilmiştir. Jel dökme aşamasında; kasetler arasında sabitlenen cam plakalar arasına tarak yüksekliğinin yaklaşık 0,5 cm altına kadar ayırma jelinin pipetlenmesini takiben 7 dk sonra, 70 µl izopropil alkol ilave edilerek, ayırma jeli ile yükleme jeli arasında düz bir ayırım çizgisinin oluşması sağlanmıştır. Yaklaşık 40-60 dk'lık bir süre jelin donması beklenmiştir. Bu sürenin sonunda, izopropil alkol uzaklaştırılarak hazırlanan yükleme jeli camlar arasına pipetlenmiş ve vakit geçirmeden tarak jel üzerine batırılarak sabitlenmiştir. Yükleme jelinin donması içinde yaklaşık 1 saat beklenmiştir. Daha sonra kasetlerden çıkarılan jel kalıplarının dış yüzeyi distile suyla yıkanarak, tarak çıkarılmadan +4°C'de yürütme tamponu içerisinde buzdolabına konmuştur. Yürütme tamponu için gerekli Tris-Glisin (10X) çözeltisi ve 1X yürütme tamponu çözeltisi bileşimleri çizelge 2.5. ve çizelge 2.6.'da verilmiştir.

Çizelge 2.3. Ayırma jeli bileşimi.

Bileşen Adı	Miktar
Akrilamid/Bisakrilamid (Acr/Bis-Acr)	4 ml
Tris pH (8,8)	3,5 ml
Distile su (dH ₂ O)	2,5 ml
Amonyum persülfat (APS)	30 µl
TEMED	10 µl

Çizelge 2.4. Yükleme jeli bileşimi.

Bileşen Adı	Miktar
Acr/Bis-Acr	750 µl
Tris pH (6,8)	800 µl
dH ₂ O	1,8 ml
APS	20 µl
TEMED	4 µl

Çizelge 2.5. Tris-Glisin (10X) çözeltisi bileşimi (1 lt için).

Bileşen Adı	Miktar
Tris baz	30,3 gr
Glisin	144 gr
dH ₂ O	1lt'ye tamamlanır.

Çizelge 2.6. Yürütme tampon (1X) çözeltisi bileşimi (1 lt için).

Bileşen Adı	Miktar
Tris-Glisin (10X)	100 ml
dH ₂ O	900 ml
% 10'luk SDS	10 ml

Dikey elektroforez setinin kullanıldığı çalışmamızda, marker eklenen kuyucuklara 4 µl marker, örnek yüklenecek kuyucuklara ise 25 µl örnek pipetlenerek, ilk aşamada marker ve örneklerin yükleme jelinin tabanına oturması için 90 voltta 20 dk süreyle, ikinci aşamada ise 120 voltta yaklaşık 90 dk süreyle elektroforez işlemi uygulanmıştır.

2.2.13.3. Proteinlerin jelden membrana transferi (blotlama)

Bu aşamada jelde yürütülen proteinlerin, transfer cihazında yüksek volt elektrik akımıyla PVDF membrana aktarımı (blotlama) sağlanır. Çalışmamızda semi-dry (yarı-kuru) transfer düzeneği kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak çizelge 2.7.'de bileşimi verilen transfer tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra PVDF membranlar 30-60 sn metanolde sallandıktan sonra, pens yardımıyla silkelenerek metanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra membranlar, transfer tampon çözeltisine konarak çalkalayıcıda 60 rpm'de 10-20 dakika sallanmıştır. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra transfer cihazına transfer tamponu ile ıslatılmış kalın filtre kağıtları konarak, üzerine PVDF membranlar yerleştirilmiştir. Membranlar üzerine cam plakalar arasından çıkartılan jeller yerleştirilerek, üzerine tekrar transfer tamponu ile ıslatılmış ince filtre kağıtları konarak kapatılmıştır. Transfer işlemi 2 kez, 7 dk süre ve 25 volt elektrik akımı ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.7. Transfer tampon (1X) çözeltisi bileşimi (1 lt için).

Bileşen Adı	Miktar
Tris-Glisin (10X)	100 ml
Metanol	200 ml
dH ₂ O	700 ml

2.2.13.4. Bloklama

Bloklama, membranla antikorlar arasındaki spesifik olmayan, yani istenmeyen bağlanmaları engellemek için uygulanır. Bu amaçla çalışmamızda her bir membran için; 0,1 gr BSA'nın, 10 ml tris tampon çözeltisi (TBS-T) içerisinde çözündürülmesi ile elde edilen %1'lik BSA çözeltisi kullanılmıştır. TBS ve TBS-T çözeltilerinin bileşimi çizelge 2.8. ve 2.9.'da verilmiştir. Transfer işlemi tamamlanan membranlar %1'lik BSA çözeltisinde 1 saat süreyle çalkalayıcı üzerinde bloklanmıştır. Daha sonra membranlar 3 kez, 10'ar dk ve 8'er ml TBS-T çözeltisi ile yıkanarak primer antikorlarla inkübasyon aşamasına geçilmiştir.

Çizelge 2.8. TBS (10X) çözeltisi bileşimi (1 lt için).

Bileşen Adı	Miktar
NaCl	88 gr
Tris baz	24 gr
HCl ekleyerek pH 8,0'e ayarlanır.	~ 4 ml
dH ₂ O	1lt'ye tamamlanır.

Çizelge 2.9. TBS-T (1X) çözeltisi bileşimi (1 lt için).

Bileşen Adı	Miktar
TBS (10X)	100 ml
dH ₂ O	900 ml
Tween-20	4 ml

2.2.13.5. Primer antikorlar ile inkübasyon

Primer antikorlarla inkübasyon aşamasında membranlar, çalışılacak antikorlara göre; sırasıyla 1:50, 1:50, 1:2000 oranında %1'lik 10 ml BSA çözeltisiyle seyreltilen Bax, Bcl-2 ve β -aktin primer antikor çözeltileriyle 1 gece buzdolabında +4°C'de ve 60 rpm'de çalkalayıcı üzerinde sallanmıştır. Daha sonra membranlar 3 kez, 10'ar dk ve 8'er ml TBS-T çözeltisi ile yıkanarak, primer antikorlardan kurtarılmış ve sekonder antikorla inkübasyon aşamasına geçilmiştir.

2.2.13.6. Sekonder antikor ile inkübasyon

Sekonder antikorla inkübasyon aşamasında her bir membran, 1:5000 oranında %1'lik 10 ml BSA çözeltisiyle seyreltilen rat dokusuna özgü sekonder antikor çözeltisiyle 1 saat süreyle, oda sıcaklığında ve 60 rpm'de çalkalayıcı üzerinde sallanmıştır. Daha sonra membranlar 3 kez, 10'ar dk ve 8'er ml TBS-T çözeltisi ile yıkanarak, sekonder antikordan kurtarılmış ve ECL substratı ile muamele ve görüntüleme aşamasına geçilmiştir.

2.2.13.7. ECL substratı ile muamele ve görüntüleme

Çalışmamızda kullandığımız kemilüminesans ECL substrat kiti içeriğinde yer alan reaktiflerle, 2 ml'lik eppendorf içinde her bir membran çifti için 1,4 ml ECL substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltilerden eşit miktarda alınarak, görüntüleme cihazının (VILBER Fusion FX) tepsisine pens yardımıyla yerleştirilen her bir membranda, çalışılan gene ait bant görüntüsünün alınacağı öngörülen bölgeye damlatılmıştır. Membran üzerine damlatılan ECL substrat çözeltisinin membran üzerinde yayılması için tepsi aşağı-yukarı hareket ettirilerek 5 dk süreyle karanlıkta

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda membran görüntülemeleri yapılmıştır.

2.2.13.8. Bax, Bcl-2 ve β -aktin bant görüntülerinin sayısal verilere dönüştürülmesi

ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) programı ile bant görüntülerinin yüzde alan hesaplamaları yapılarak sayısal veriler elde edilmiştir.

2.2.13.9. Bax ve Bcl-2 verilerinin normalizasyonu

Deney gruplarında Bax ve Bcl-2 düzeyleri, Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, USA) firması tarafından yayınlanan normalizasyon yöntemine göre; ilk olarak her bir β -aktin değeri, ilgili deney grubundaki en yüksek β -aktin değerine bölünerek normalizasyon faktörü elde edilmiş, sonrasında ilgili deney grubundaki her bir Bax ve Bcl-2 değeri bu normalizasyon faktörüne bölünerek normalize edilmiştir.

2.2.14. Karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesi ve immünohistokimyasal boyama yöntemleriyle kaspaz 3 ve kaspaz 9 antijen düzeylerinin belirlenmesi

KC doku örneklerinin histopatolojik değerlendirilmesi ve kaspaz antijen düzeylerinin analizi S.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD'nde yapılmıştır.

Sakrifikasyon sonrası toplanan KC doku örnekleri, taze hazırlanmış ve soğutulmuş %4'lük paraformaldehit fiksatifinde, fiksatif/doku hacim oranı 10:1 olacak şekilde +4°C'de 24 saat bekletilmiş, sonrasında frozen kesit hazırlığı için %30'lük sükröz (1 ml sodyum azid ile) içerisine alınarak dokular dibe çökene kadar en az 24 saat tekrar bekletilmiştir. Ardından KC doku örnekleri kriyomatriks içine istenilen alan açılarak dikkatli bir şekilde gömülmüş, kriyostat cihazı ile poly-L-lysine kaplı lamlara 5 μ m kalınlığında seri kesitler alınmıştır. Alınan kesitler frozen cihazındaki -20 °C'yi muhafaza edecek şekilde dondurucuya kaldırılmıştır.

Genel histopatolojik değerlendirmede, Hematoksilen&Eozin (H&E) ile boyanan frozen kesitler inflamasyon alanı, inflamasyon belirteçleri (lenfosit infiltrasyonu, ödem), apoptotik hücre değişiklikleri (hücresel şişme, apoptotik cisim, kromatin kondensasyonu), olası iyileşme/hasar alanları açısından

değerlendirilmiştir. H&E ile boyama protokolü, Şekil 2.4.'de yer alan işlem sırasına göre uygulanmıştır.

Doku preparatları 1 gece 57°C'de etüvde bırakılarak deparafinize edildi.



Ksilende 2 kez 30'ar dk bekletildi.



Azalan konsantrasyonlardaki (%90-80-70-60-50'lik) etil alkol çözeltilerinden geçirildi.



Akan su altında 5 dk yıkandı.



Hematoksilende 5 dk bekletildi.



Akan su altında tekrar 5 dk yıkandı.



Asit alkole batırılıp çıkartıldı.



Akan su altında tekrar 5 dk yıkandı.



Eozinde 2-3 dk bekletildi.



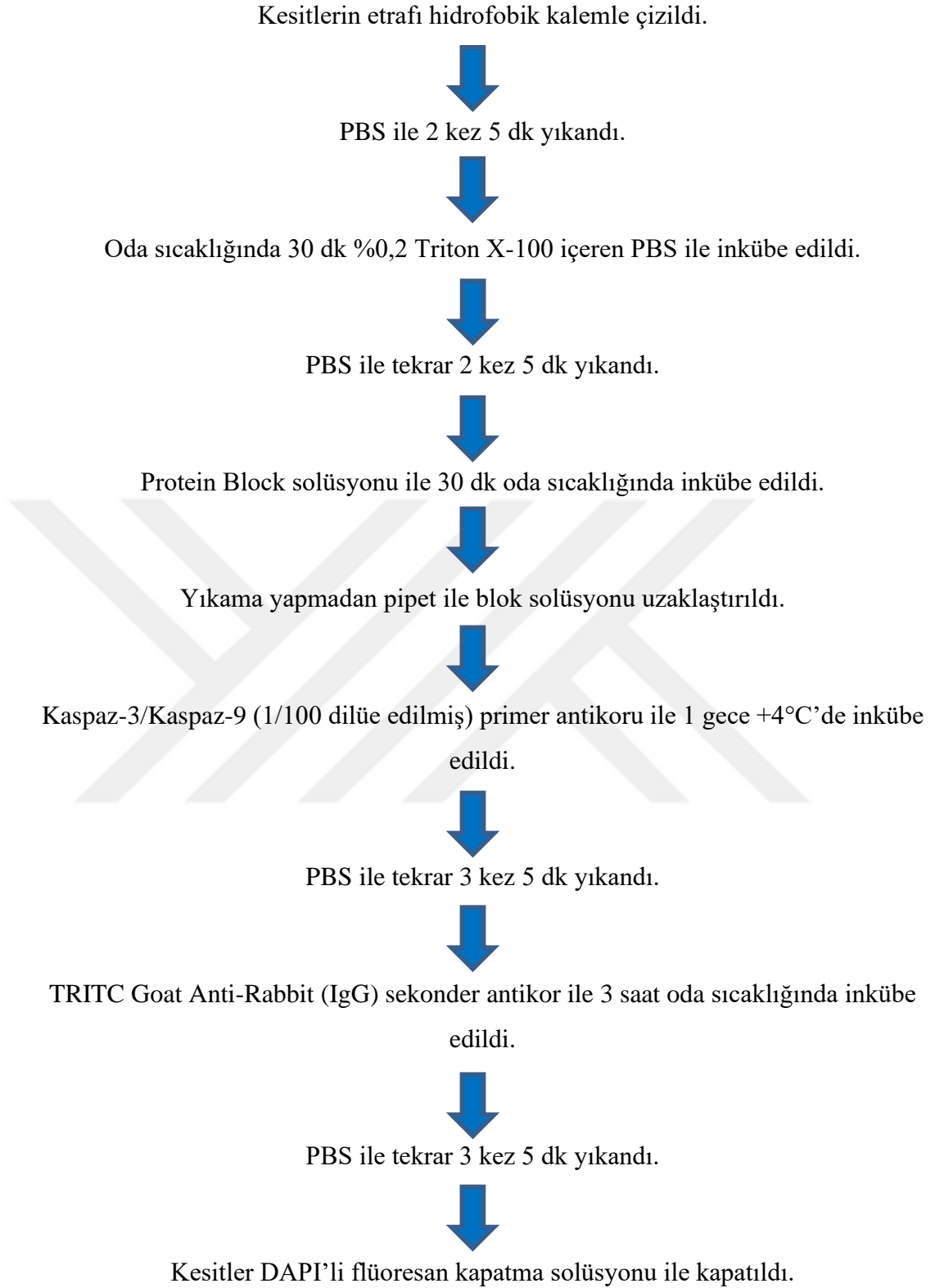
Artan konsantrasyonlardaki (%50-60-70-80-90'lık) etil alkol çözeltilerinden geçirildi.



Dokular üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

Şekil 2.5. H&E ile boyama protokolü.

İmmünohistokimyasal boyamalar için ise, hazırlanan frozen kesitler dondurucudan çıkartılarak, sakrifikasyondan görüntülemeye kadar geçen zamana bağlı olarak öngörülen antijen miktarının azalması veya maskelenmesi sorununun giderilmesi amacıyla, kesitlere ilk olarak Triton-X100 ve proteinaz K ile antijen retrieval (geri kazanım) prosedürü uygulanmıştır. Daha sonra kesitlere Şekil 2.5.'de yer alan protokoldeki işlem sırasına göre konjuge kaspaz-3 ve kaspaz-9 antikoları ile işaretleme yapılmıştır. Tüm işlemler karanlık ortamda ve nem ortamı (humidified chamber) oluşturularak yapılmıştır. Boyanan preparatlar, foto ataçmanlı Olympus BX51 Trinoküler floresan mikroskopta Texas Red ve UV filtreler ile incelenerek değerlendirilmiş ve görüntüler alınmıştır. Görüntüleme aşamasında öncelikle 4X ve 10X büyütme ile görüntüleme alanının haritası çıkarılmış, belirlenen alanlar 20X büyütmede her birinden rastgele 4'er alan seçilerek DP72 kamera ile kaydedilmiştir. UV filtresi kullanılarak floresan mikroskop altında; çekirdekleri DAPI ile mavi renkte işaretlenen hücreler belirlenmiş ve sayımları yapılmıştır. Sayımı yapılan 100 hücredeki Texas Red filtreyle kırmızı renkte işaretlenen kaspaz 3 ve kaspaz 9 apoptotik hücre sayımları ImageJ programı (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) kullanılarak yapılmış, [Apoptotik İndeks=(Apoptotik hücre sayısı/canlı hücre sayısı)x100] formülüyle apoptotik hücre indeksleri hesaplanmıştır.



Şekil 2.6. İmmünohistokimyasal boyama protokolü.

2.3. İstatistiksel Analizler

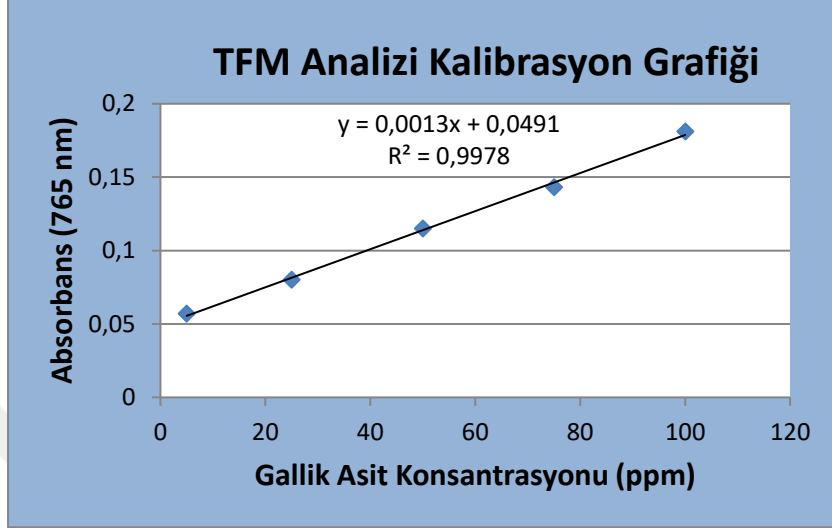
Tüm istatistiksel analizler, R istatistik programının 3.6.0. sürümü kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normallik kontrolü Shapiro-Wilk's testiyle, varyansların homojenlik değerlendirmesi ise Levene's testi kullanılarak yapılmıştır. Sayısal değişkenler ortalama \pm standart sapma veya çeyrekler arası açıklıkla (%25-75) medyan olarak ifade edilmiştir. Çalışma bulguları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunup bulunmadığı ANOVA tek yönlü varyans analizi ve devamında Tukey HSD post-hoc testiyle, Welch F testi ve devamında Games-Howell post-hoc testi veya Kruskal-Wallis H ve devamında Benjamini-Hochberg düzeltmeli Dunn testi yapılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.



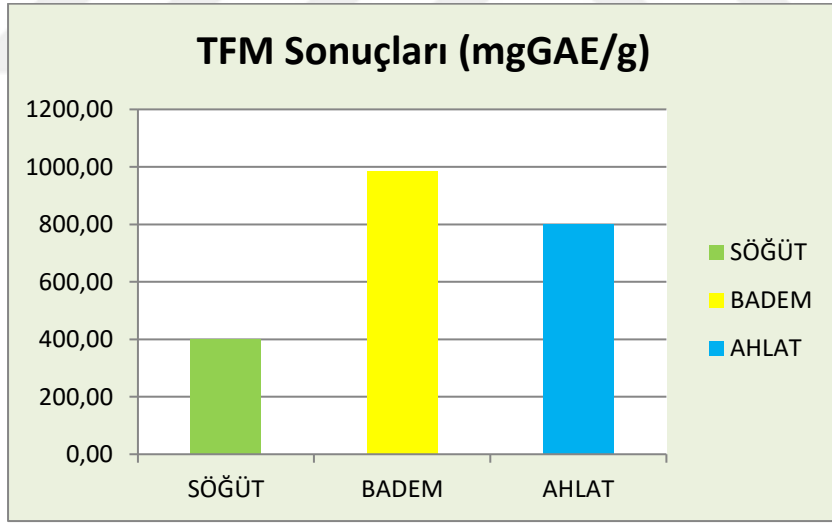
3. BULGULAR

3.1. TFM, TAK ve TAA Sonuçları

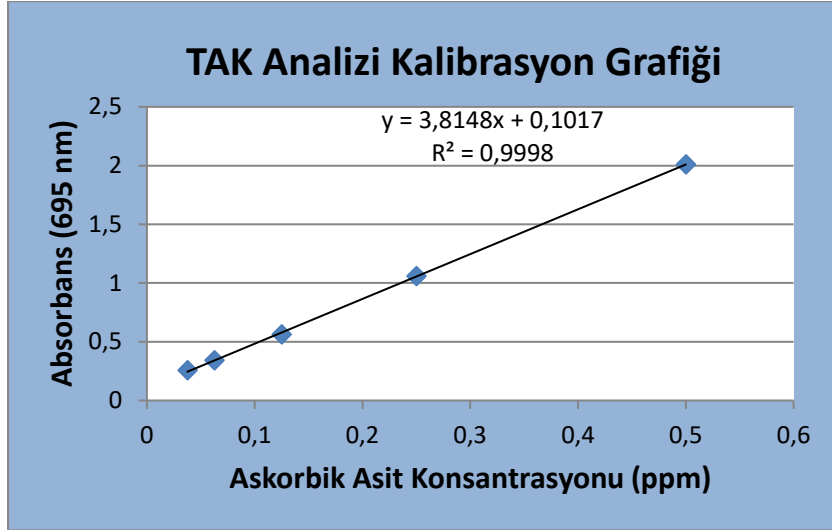
Yapılan TFM, TAK ve TAA analizleri neticesinde öne çıkan VA türü olarak badem ağaçları üzerinden toplanan VA belirlenmiştir.



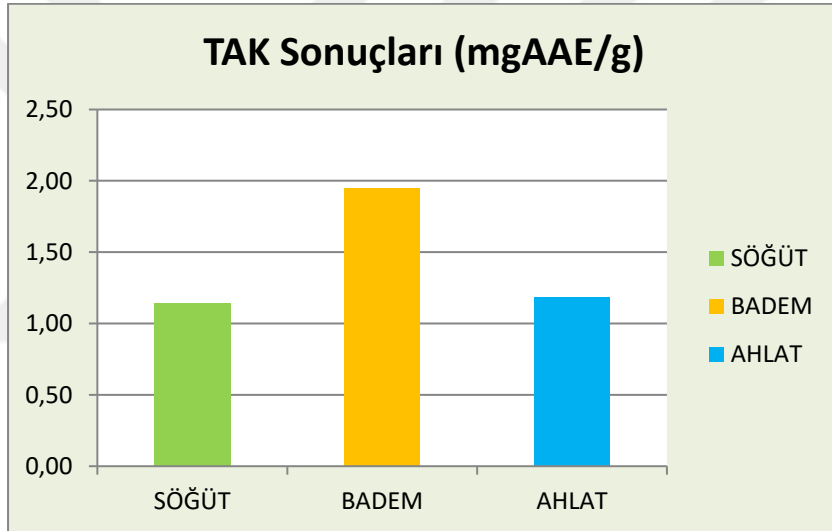
Şekil 3.1. TFM analizi kalibrasyon grafiği.



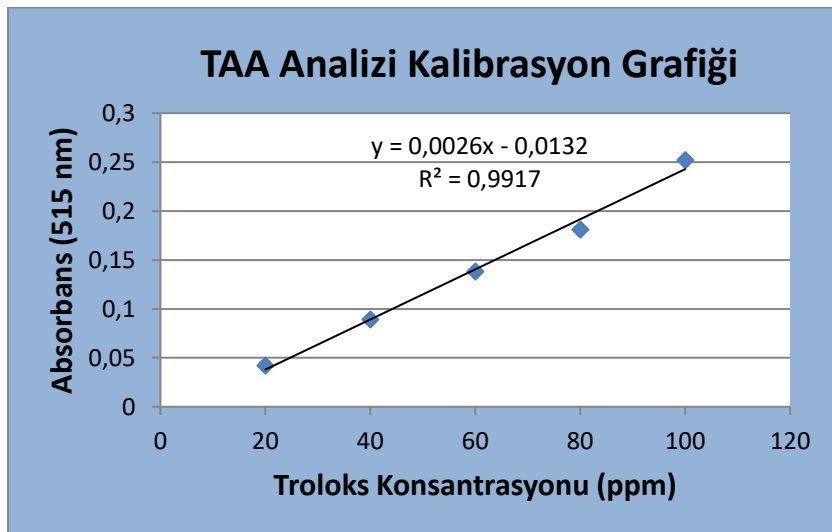
Şekil 3.2. Farklı VA türlerine ait TFM sonuçları.



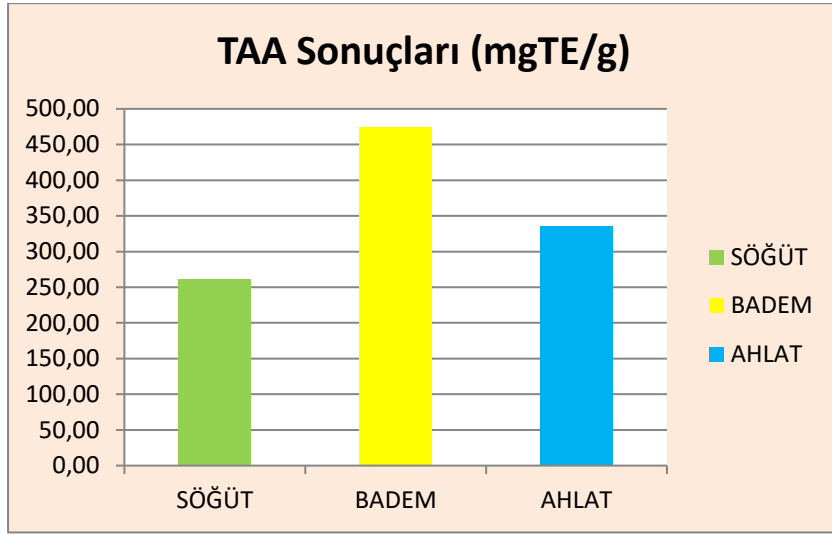
Şekil 3.3. TAK analizi kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.4. Farklı VA türlerine ait TAK sonuçları.



Şekil 3.5. TAA analizi kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.6. Farklı VA türlerine ait TAA sonuçları.

3.2. Serum Örneklerinde Biyokimyasal Sonuçlar

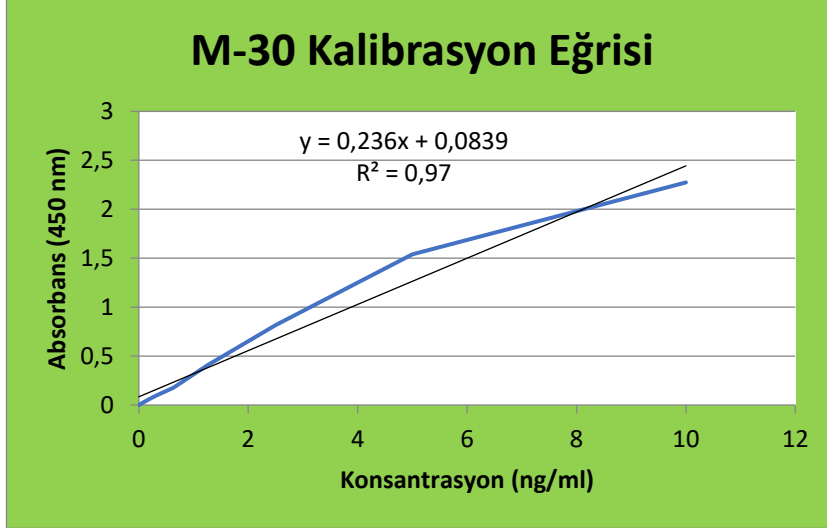
Çalışma grupları arasında serum TOK düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık ($p=0,046$) tespit edilmiştir (Çizelge 3.1.). RT+NAS grubunda TOK düzeylerinin, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha düşük olduğu gözlenmiştir. Diğer parametreler (ALT, AST, TAK, OSİ, M-30) bakımından ise çalışma grupları arasında anlamlı bir fark (sırasıyla $p=0,705$; $p=0,235$; $p=0,066$; $p=0,087$; $p=0,165$) bulunamamıştır.

Çizelge 3.1. Gruplar arası serum ALT, AST, TAK, TOK, M-30 düzeylerinin ve OSİ'lerinin karşılaştırılması.

Parametre	Kontrol (n=6)	RT (n=6)	RT+NAS (n=6)	RT+VA (n=6)	RT+NAS+VA (n=6)	p değeri
ALT (U/L)	45,50 (45,00-56,50)	48,00 (37,50-88,50)	51,00 (44,75-58,00)	41,00 (32,25-43,00)	48,50 (41,00-59,00)	0,705 ¹
AST (U/L)	80,50 (76,50-87,50)	95,00 (84,75-131,50)	85,50 (76,75-106,25)	75,00 (60,50-89,50)	101,50 (91,25-114,00)	0,235 ¹
TAK ($\mu\text{mol/L}$)	1,19 (1,14 - 1,23)	1,04 (0,90-1,06)	1,12 (0,98-1,15)	0,98 (0,92-1,05)	1,15 (1,01-1,19)	0,066 ¹
TOK ($\mu\text{mol/L}$)	6,06 (4,42 - 8,66) ^a	5,70 (4,09-6,39)	2,35 (1,42-3,18) ^b	3,75 (2,38-6,61)	3,25 (2,96-3,94)	0,046 ¹
OSİ	5,08 (3,77-7,27)	5,50 (3,52-7,18)	2,19 (1,46-2,98)	4,07 (2,36-7,44)	3,16 (2,62-4,09)	0,087 ¹
M-30 (ng/ml)	2,64 (2,56-2,84)	2,54 (2,00-3,77)	4,76 (4,35-5,10)	3,93 (2,76-4,66)	3,90 (3,65-4,41)	0,165 ¹

Aynı satırdaki farklı harfler, post-hoc testler kullanılarak yapılan karşılaştırmalardan sonra gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

¹ Kruskal Wallis testi / Benjamini-Hochberg düzeltilmeli Dunn post-hoc testi.



Şekil.3.7. M-30 kalibrasyon eğrisi.

3.3. Karaciğer Doku Örneklerinde Biyokimyasal Sonuçlar

KC doku örneklerinde 8-OHdG düzeyleri açısından çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık ($p=0,001$) tespit edilmiştir (Çizelge 3.2.). RT uygulanan tüm gruplarda genel olarak 8-OHdG düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla, RT grubundan başlamak üzere sırasıyla RT-NAS; RT+VA; RT-NAS+VA gruplarında anlamlı şekilde azaldığı, RT+VA ve RT-NAS+VA gruplarında ise, RT grubuna kıyasla daha düşük olduğu, RT-NAS, RT+VA ve RT-NAS+VA grupları arasında ise benzer olduğu görülmüştür. Aynı şekilde RT ve RT+NAS grupları arasında da 8-OHdG düzeylerinin benzer olduğu dikkati çekmiştir. Diğer parametreler (TAK, TOK, OSİ, Bax ve Bcl-2) açısından ise çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık (sırasıyla $p=0,105$; $p=0,298$; $p=0,111$; $p=0,069$; $p=0,469$; $p=0,186$) bulunamamıştır.

Çizelge 3.2. Gruplar arası KC doku örneklerinde TAK, TOK, 8-OHdG, Bax, Bcl-2 düzeylerinin ve OSİ'lerinin karşılaştırılması.

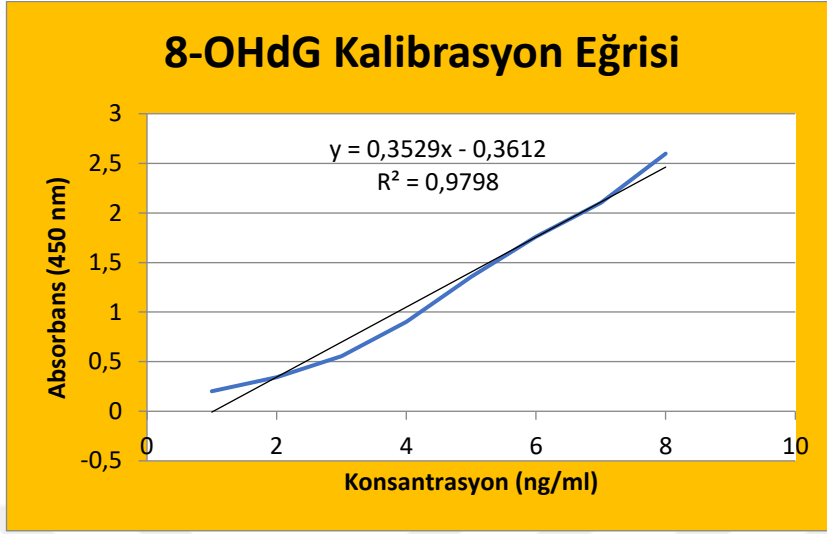
Parametre	Kontrol (n=6)	RT (n=6)	RT+NAS (n=6)	RT+VA (n=6)	RT+NAS+VA (n=6)	p değeri
TAK ($\mu\text{mol/l}$)	1,82 \pm 0,21	1,68 \pm 0,18	1,70 \pm 0,19	1,93 \pm 0,24	1,89 \pm 0,10	0,105 ¹
TOK ($\mu\text{mol/l}$)	316,29 (296,95-325,75)	383,49 (341,86-420,59)	326,52 (304,73-351,66)	296,77 (283,83-326,61)	320,05 (280,43-359,53)	0,298 ²
OSİ	168,28 (162,97-171,36)	241,87 (207,31-260,28)	197,84 (175,36-232,04)	163,69 (142,83-179,76)	169,03 (147,28-190,78)	0,111 ²
8-OHdG (ng/ml)	9,13 \pm 0,25 ^a	8,71 \pm 0,15 ^c	8,30 \pm 0,33 ^{bc}	8,15 \pm 0,13 ^b	7,85 \pm 0,50 ^b	0,001 ³
Bax	21,02 (18,86-22,70)	25,01 (17,97-31,88)	18,39 (16,58-20,18)	18,84 (17,35-20,84)	19,96 (16,97-23,26)	0,469 ²
Bcl-2	20,63 (18,86-22,15)	28,21 (24,85-29,56)	17,15 (15,30-19,61)	19,83 (18,69-21,15)	20,25 (15,40-21,38)	0,186 ²

Aynı satırdaki farklı harfler, post-hoc testler kullanılarak yapılan karşılaştırmalardan sonra gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

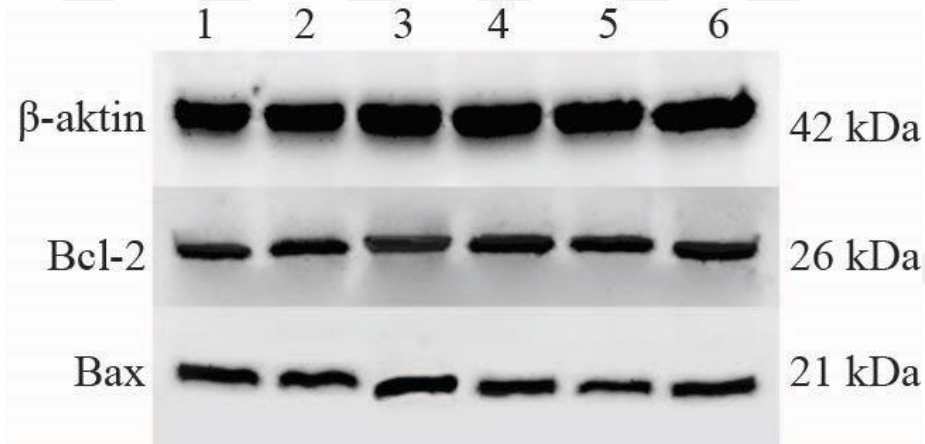
¹ Kruskal Wallis testi / Benjamini-Hochberg düzeltilmeli Dunn post-hoc testi.

² Tek Yönlü ANOVA testi / Tukey HSD post-hoc testi.

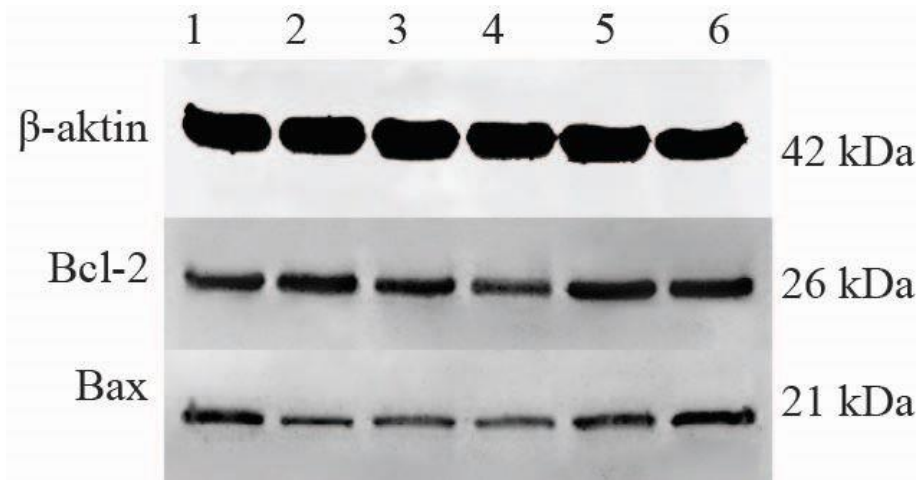
³ Welch F-testi / Games-Howell post-hoc testi.



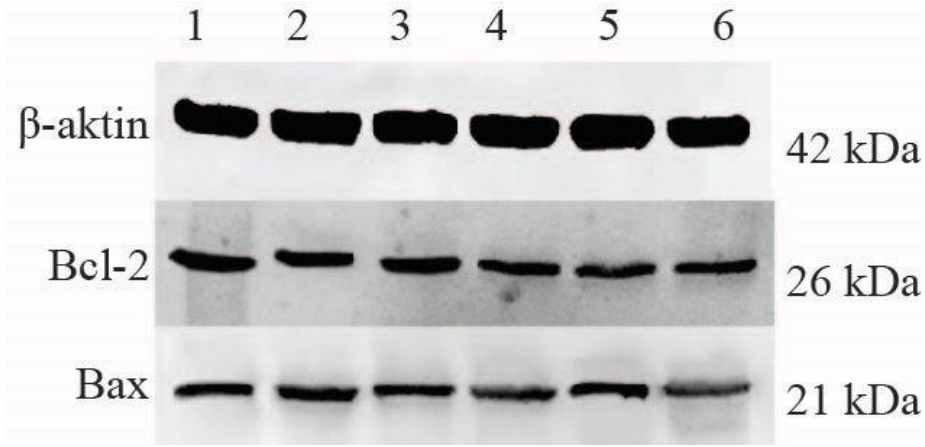
Şekil.3.8. 8-OHdG kalibrasyon eğrisi.



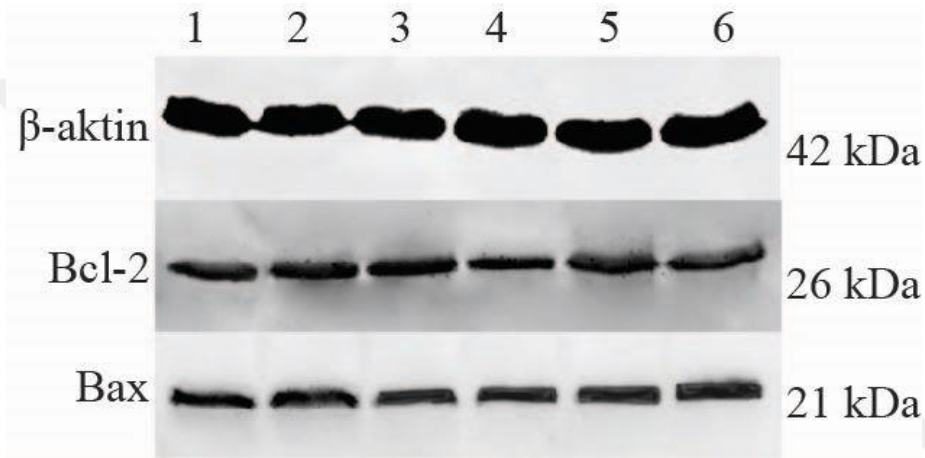
Şekil.3.9. Kontrol grubu Western Blot bant görüntüleri (n=6).



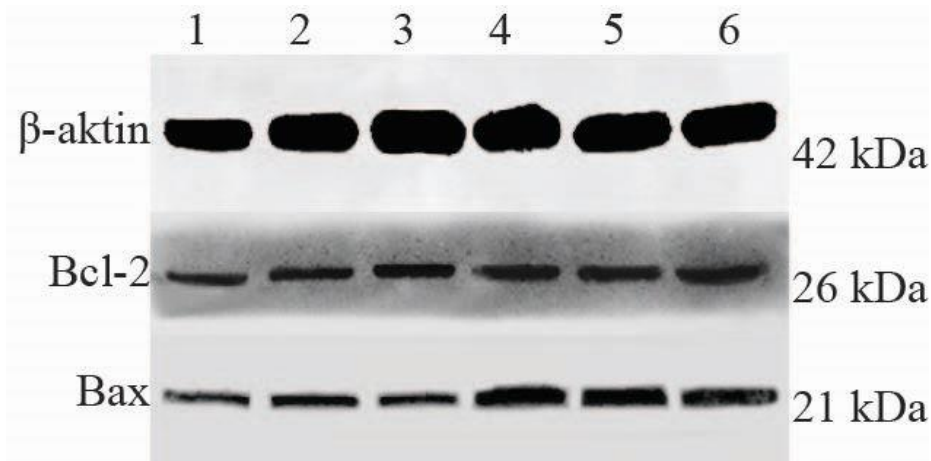
Şekil.3.10. RT grubu Western Blot bant görüntüleri (n=6).



Şekil.3.11. RT+NAS grubu Western Blot bant görüntüleri (n=6).



Şekil.3.12. RT+VA grubu Western Blot bant görüntüleri (n=6).



Şekil.3.13. RT+NAS+VA grubu Western Blot bant görüntüleri (n=6)

3.4. İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları

Çalışma grupları arasında KC doku örneklerinde kaspaz-3 ile boyanan apoptotik hücre sayıları, Dapi ile işaretlenen canlı hücre sayıları ve apoptotik hücre indeksleri bakımından anlamlı bir farklılık (sırasıyla $p=0,353$; $p=0,075$; $p=0,144$) bulunamamıştır (Çizelge 3.3.).

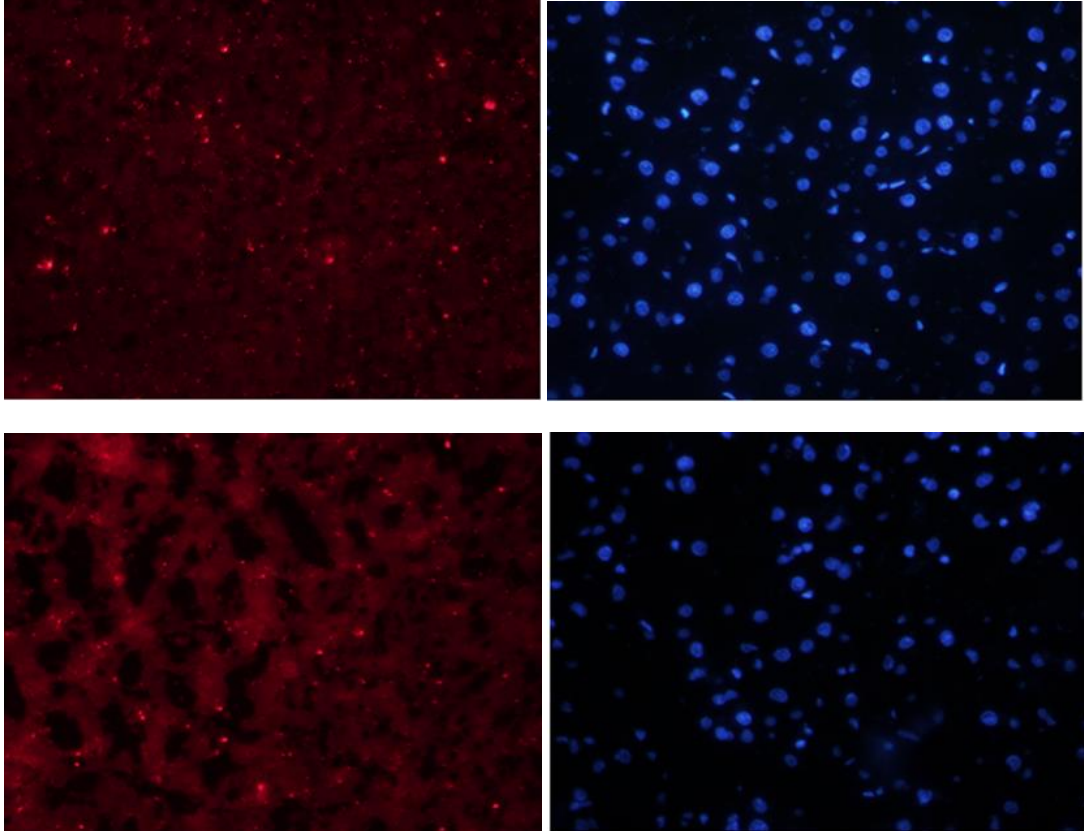
Çalışma başlangıcında elimizde mevcut olan kaspaz-9 antikoruna ile, ilk yapılan immünohistokimyasal boyamalarda sonuç alınamamış, bunun üzerine proje bütçemizde kaspaz-9 antikoruna temin etmeye bütçe bulunmadığından kendi imkanlarımız ile kaspaz-9 antikoruna temin edilmiş, fakat satın alınan antikor ile elimizdeki mevcut KC doku preparatları aradan geçen zaman göz önünde bulundurularak retrieval (geri çağırma) prosedürü ile yeniden boyama ve görüntüleme işlemlerine tabi tutulmuş, fakat istenen sonuçlar yine elde edilememiştir.

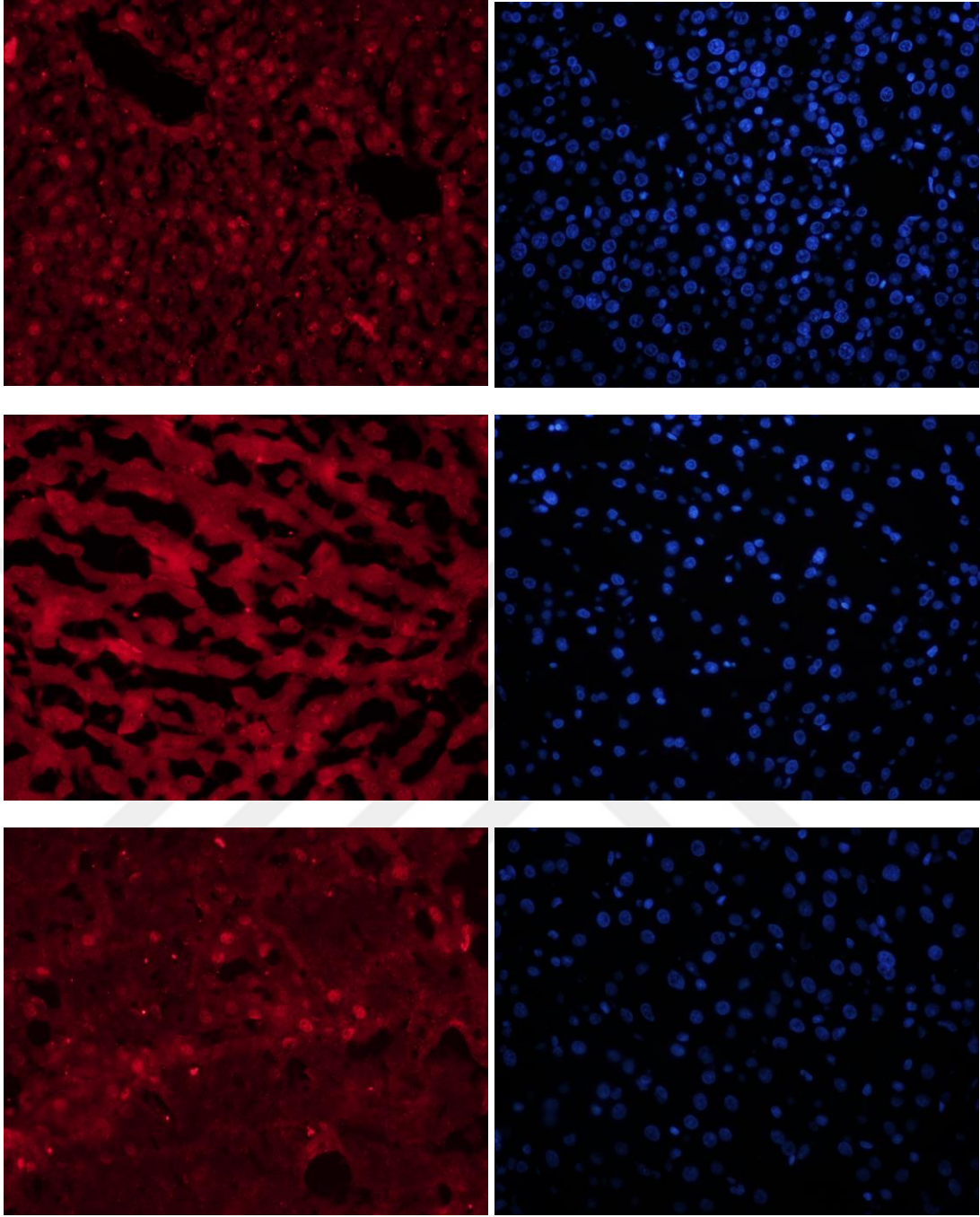
Çizelge 3.3. Gruplar arası kaspaz-3 düzeylerinin ve API'lerinin karşılaştırılması.

Parametre	Kontrol (n=6)	RT (n=6)	RT+NAS (n=6)	RT+VA (n=6)	RT+NAS+VA (n=6)	p değeri
Kaspaz-3	22,23 (18,07-23,53)	21,77 (20,38-24,20)	20,93 (20,18-23,40)	20,03 (18,10-20,60)	28,11 (23,22-39,25)	0,353 ¹
Dapi	164 (153,44-164,81)	211,08 (207,23-220,44)	239,88 (188,13-387,63)	202,88 (162,13-225,81)	180,66 (153,63-228,79)	0,075 ¹
API	12,78 (11,96-14,20)	10,65 (9,97-11,91)	9,25 (7,23-11,35)	10,06 (8,87-11,44)	14,32 (11,66-18,04)	0,144 ¹

Aynı satırdaki farklı harfler, post-hoc testler kullanılarak yapılan karşılaştırmalardan sonra gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

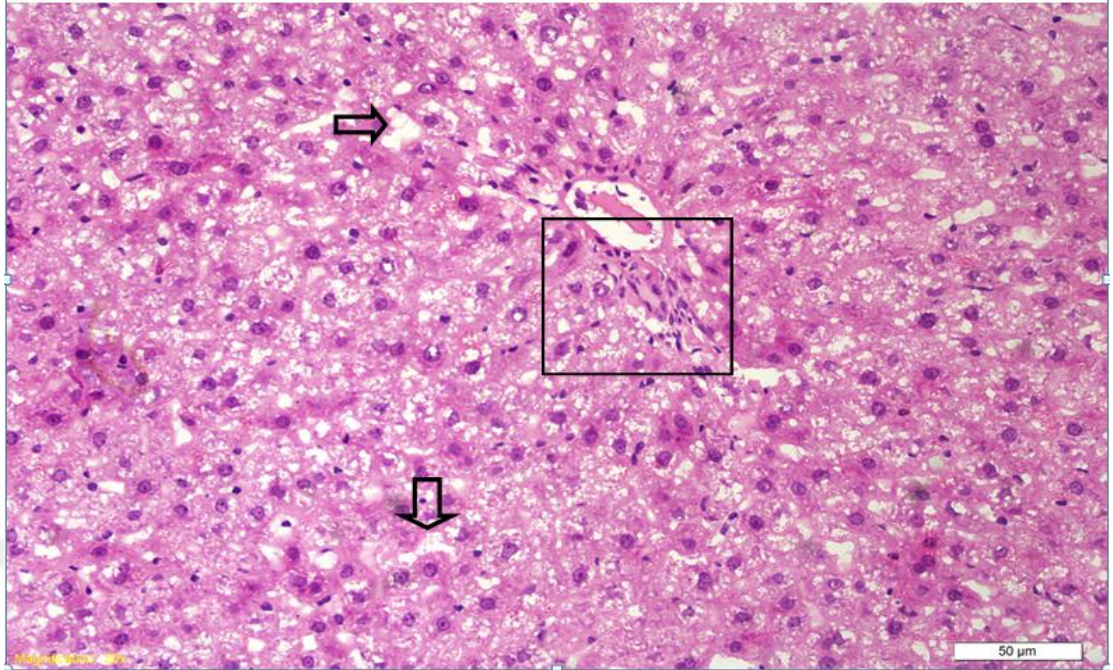
¹ Kruskal Wallis testi / Benjamini-Hochberg düzeltilmeli Dunn post-hoc testi.



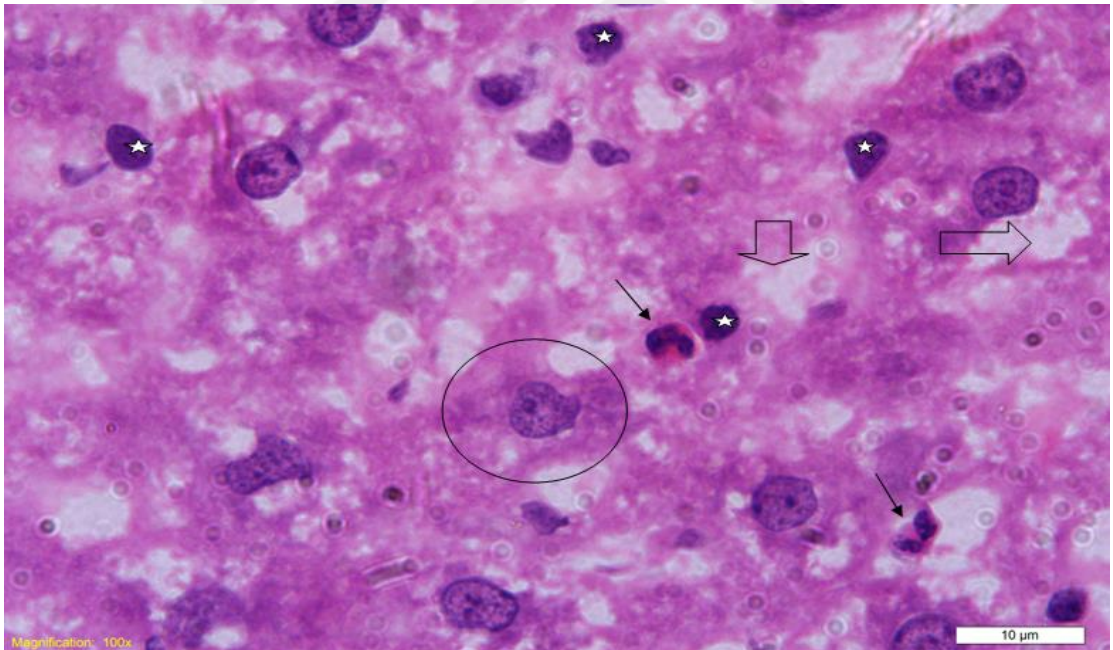


Şekil 3.14. KC doku preparatlarında kaspaz-3 ve Dapi pozitif hücreler (Sırasıyla yukarıdan aşağıya; Kontrol, RT, RT+NAS, RT+VA, RT+NAS+VA).

3.5. Histopatolojik Değerlendirmeler



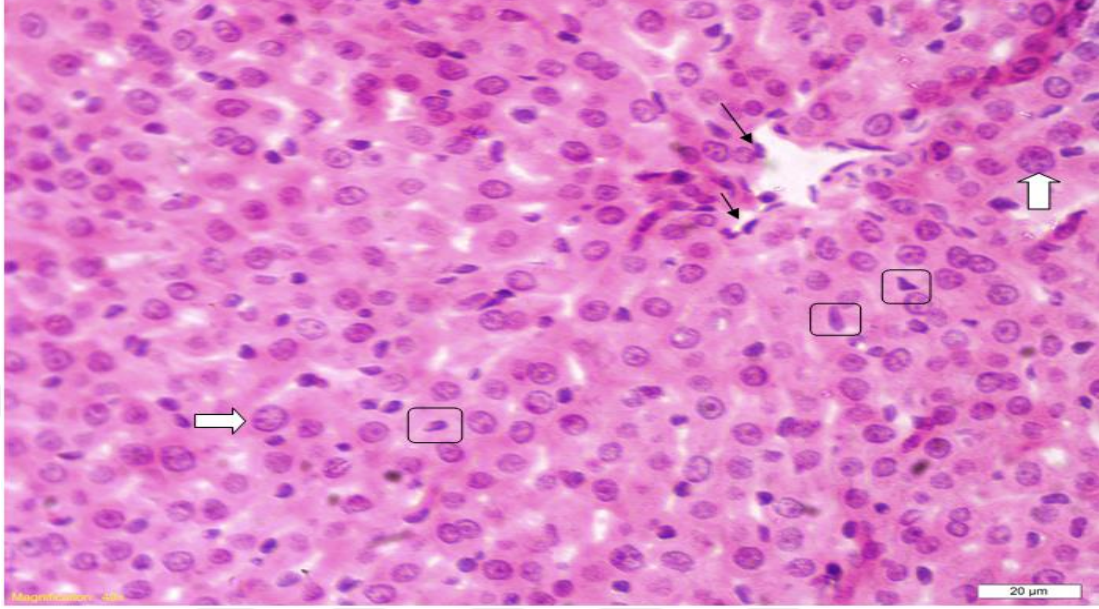
Şekil 3.15. H&E ile boyanan RT grubu KC doku preparatının X20 magnifikasyon ile ışık mikroskobu altında görüntüsü.



Şekil 3.16. H&E ile boyanan RT grubu KC doku preparatının X100 magnifikasyon ile ışık mikroskobu altında görüntüsü.

RT Grubu: X20 objektif büyütmesi ile hepatosit hücre sınırlarının silindiği, sayılarının net bir şekilde azaldığı, hepatosit kordonlarının ışınsal diziliminin ve KC mimarisinin bozulduğu gözlenmiştir. Sentrilobüler hepatik venül civarında Kupffer hücre artışı (kare) ve minimal bir ödem saptanmıştır. Parankimde yaygın vakuolizasyon gözlenmiştir. Vakuolizasyon alanları kalın ok ile gösterilmiştir (Şekil

3.15.). X100 büyütmede kondanse hücreler; apoptotik süreçteki piknotik hücre yıldız ile, yer yer nötrofiller ok ile gösterilmiştir. Hücreler arası alanda ve parankimada da yaygın vakuoler dejenerasyon izlenmiştir. Sınırları bozulmuş hepatosit hücresi daire içinde gösterilmiştir (Şekil 3.16.).



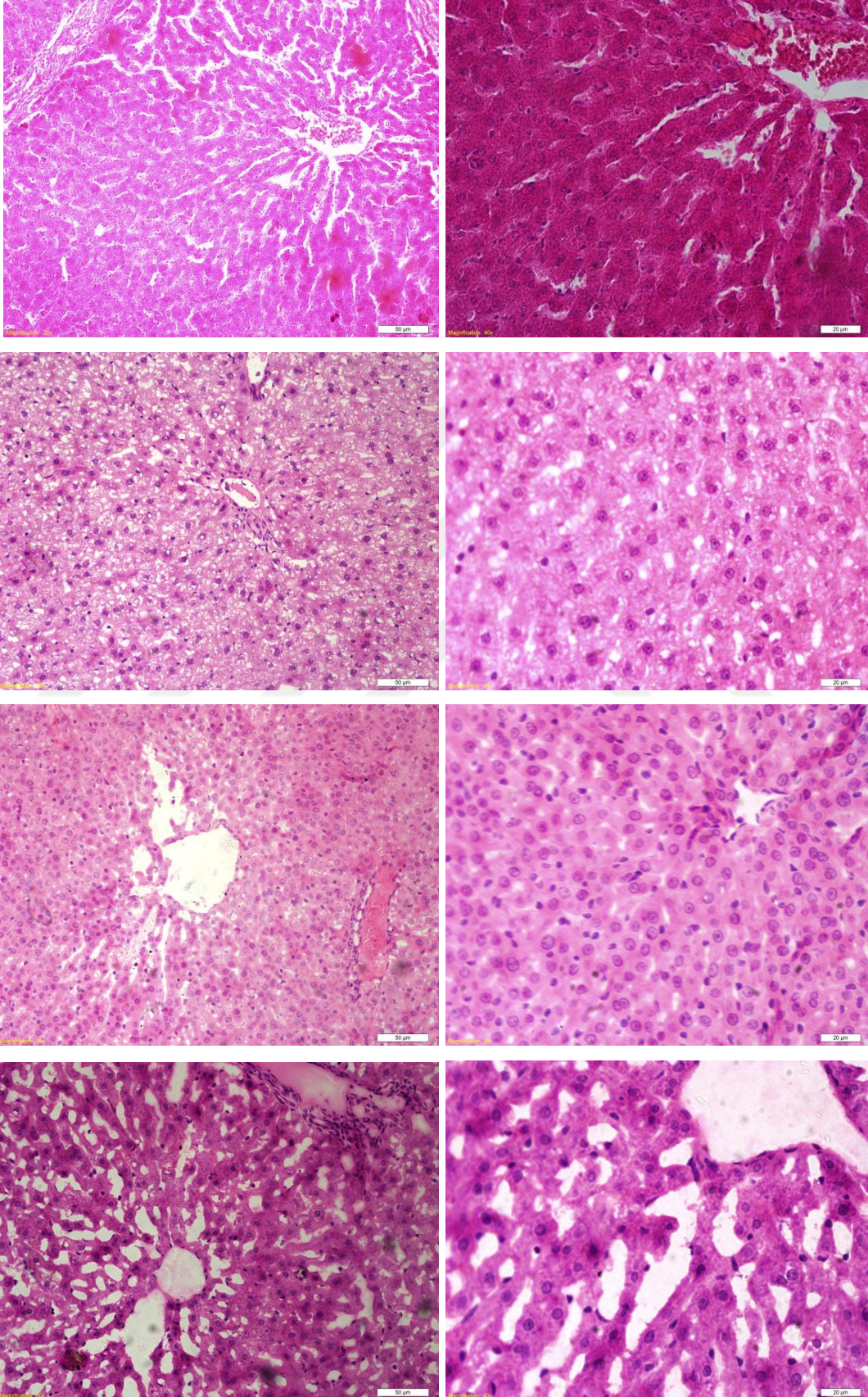
Şekil 3.17. H&E ile boyanan RT+NAS grubu KC doku preparatının X40 magnifikasyon ile ışık mikroskobu altında görüntüsü.

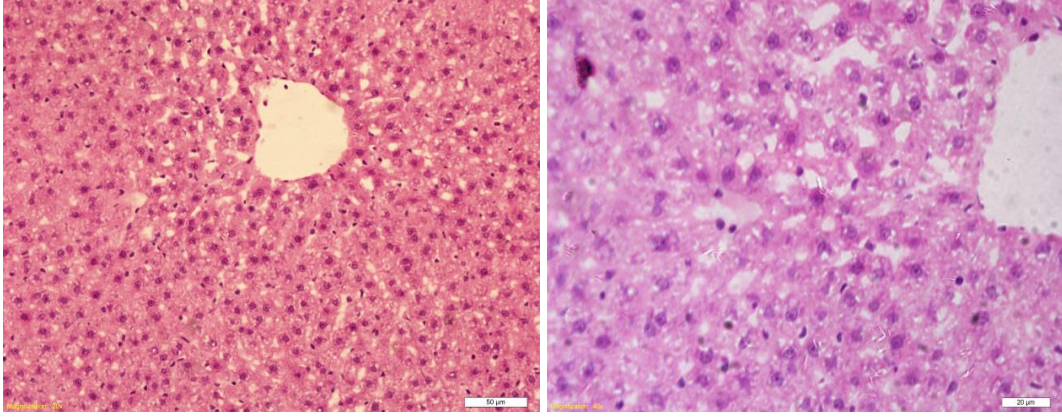
RT+NAS Grubu: X20 objektif büyütmesi ile hücre proliferasyonunda belirgin artışla birlikte sinüzoidal yapının değiştiği görülmüştür. Kesit alanına giren portal vende ve devamındaki dağıtıcı dalında konjesyon alanları ve periportal lokalizasyonlu hafif inflamasyon gözlenmiştir. X40 ve X100 büyütmelerde reaktif hücre proliferasyonu net bir şekilde gözlenmiştir. RT sonrası normal histolojiye dönüş sürecindeki farklı apoptoz aşamaları, hücresel şişme; beyaz ok ile, piknotik hücre; kare içinde işaretlenmiştir. Makrofajlar mekik şekilli olarak ok ile gösterilmiştir (Şekil 3.17.).

RT+VA Grubu: X20 objektif büyütmesi ile hepatosit bütünlüğün ve radyal mimarinin RT grubuna göre daha iyi korunduğu, sınırlarının daha net olduğu izlenmiştir. Portal alanda inflamasyon ve genişleme dikkati çekmiştir. Benzer şekilde santral ven ve sinüzoidal kapillerde de genişleme izlenmiştir. RT+NAS grubundaki kadar yoğun olmasa da proliferatif alanlar gözlenmiştir.

RT+NAS+VA Grubu: X20 objektif büyütmesi ile portal triad etrafında çok hafif inflamasyon ve minimal vakuolizasyon görülmüştür. Yaygın, fakat RT+NAS

grubuna kıyasla minimal proliferasyon ve göreceli sinüzoidal genişlemeler izlenmiştir.





Şekil 3.18. H&E ile boyanan KC doku preparatlarının ışık mikroskobu altında görüntüleri (Sırasıyla yukarıdan aşağıya; Kontrol, RT, RT+NAS, RT+VA, RT+NAS+VA).



4. TARTIŞMA

Günümüz kanser tedavisinde uygulanan modern RT teknikleri, tedavideki başarı oranlarını ve RT uygulanan hedef doku ve çevresindeki komşu dokulardaki kontrol imkanını artırsa da, RT'nin sağlıklı dokular üzerine zararlı etkilerini tamamen ortadan kaldırmaya yeterli olamadıkları görülmektedir. İR'un biyolojik sistemler üzerine hasar etkisi, daha çok dolaylı etkisinden ileri gelen serbest radikal kaynaklıdır. RT ile uygulanan tedavi protokollerinde hedeflenen tedavi başarısı ve tedavi sürecinde ortaya çıkabilecek hasarlar açısından uygulanan radyasyon türü, dozu ve uygulama periyodu gibi faktörler son derece önemli olup, bu faktörler pek çok araştırmaya konu olduğu dikkat çekmektedir. Radyasyon hasarını önlemek veya azaltmak için kullanılan medikal ajanların pahalı ve RT uygulanan hastalarda tam bir etkinlik sağlayamaması, alternatif ve tamamlayıcı etkilere sahip bitkisel temelli tedavi metodlarının araştırılmasını teşvik etmiştir. Özellikle tez çalışmamızda bitkisel kaynak olarak VA'nun seçilmesinin en önemli sebebi; VA'nun kanser tedavisinde KT ve RT süreçlerinde ortaya çıkabilecek istenmeyen yan etkilerin azaltılmasına katkı sağlayabilecek, bileşiminde birçok biyoaktif bileşen bulunmasıdır. Yaptığımız literatür taramalarında VA'nun radyokoruyucu etkileri konusunda kısıtlı çalışma bulunduğu görülmüştür.

Avrupa genelinde özellikle Almanca'nın konuşma dili olduğu yerleşim bölgelerinde VA, yüz yılı aşkın bir süredir tamamlayıcı etkileriyle, kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bölgelerde VA preparatları belirli bir izole lektin düzeyinde standardize edilerek, farklı markalar (Iscador, Lektinol, Cefalektin, Eurixor, Helixor, Iscucin, Isorel, AbnobaViscum vb.) adı altında fitoterapötik olarak satışa sunulmaktadır (Freuding ve ark 2019). VA'ndan izole edilen başlıca antikanser etkili bileşikler lektinler ve viskotoksinlerdir. VA ile ilgili yapılan kapsamlı çalışmalarla fenolik bileşikler, triterpen asitler ve non-polar bileşikler gibi diğer bileşiklerin de kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, tüm bitkiden elde edilen VA ekstraktının tümör hücrelerini inhibe etmede izole bileşiklerden daha güçlü olduğu ve birbirleri arasında güçlü sinerjistik etkileşimlerin olduğu bildirilmiştir (Felenda ve ark 2019). VA'nun kanser tedavisinde çok yönlü faydalı etkiler gösterdiği, bunların bir taraftan halsizlik, yorgunluk, uyku, bulantı, kusma, iştah, psikolojik sorunlar ve ağrıyı azalttığı ve uygulanan geleneksel tedavi yan

etkilerini azaltarak hastaların yaşam kalitesini yükselttiği, diğer taraftan ise sitotoksik etkileriyle kanser hücrelerinde apoptoza neden oldukları bildirilmektedir. VA'nun antikanser aktivitesi üzerine yapılan hücre kültürü çalışmalarıyla, VA'nun hücre proliferasyonunda mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve PI3K/AKT dahil olmak üzere pekçok sinyal yolağına etki ettiği ve bu yollarda önemli roller üstlendiği gösterilmiştir (Park ve ark 2012). Ayrıca, VA'nun kanser hücrelerinde hücre siklusunun durmasına, mitokondriyal membran geçirgenliğinin bozulmasına yol açtığı, kaspaz aktivasyonlarıyla Bax ve Bcl-2 gibi proapoptotik ve antiapoptotik protein ifade düzeylerine etki ettiği ortaya konmuştur. Farklı VA türlerinden elde edilen ekstraktların dendritik hücrelerin olgunlaşması, aktivitelerinin artması, lökosit, lenfosit ve nötrofil gibi alt lökosit elemanları sayıları ile sitokin sekresyonlarının artması gibi önemli immün düzenleyici etkilerinin de olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Kim ve ark 2018).

Son yıllarda, KC kanseri tedavisinde cerrahi müdahale, KT, RT ve kombinasyon tedavisi gibi multidisipliner terapötik yaklaşımlar önerilmektedir. Bu tedaviler arasında RT, orta evre ve cerrahi müdahale için uygun olmayan KC kanserli hastalarda etkili bir tedavi yöntemi olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, RT uygulaması sağlıklı çevre dokularda oluşturduğu radyotoksisite sebebiyle, özellikle uygulama dozu bakımından sınırlamalar gerektirmekte ve RILD da dahil olmak üzere bazı istenmeyen komplikasyonlara neden olmaktadır. RILD, RT sırasında veya birkaç hafta içinde akut bir yanıt olarak veya RT'den aylar veya yıllar sonra geç yanıt olarak ortaya çıkan önemli bir KC hastalığıdır. RILD, KC kanseri tedavisinde RT'nin önemli bir sınırlayıcı faktörü olmasının yanında, KC kanserli hastalarda yüksek mortalite oranları ile de ilişkili bir faktördür. Ayrıca KC, GİS'e yakınlığı ve büyük boyutu nedeniyle GİS kanserlerinin RT ile tedavisinde sıklıkla ışınlanan organlardan biridir. KC, ayrıca allojenik kemik iliği veya hematopoietik kök hücre nakli hazırlık aşamasında da radyasyona maruz kalabilmektedir. Kupffer hücreleri, sinüzoidal endotelial hücreler ve hepatik stellat hücreleri gibi nonparankimal hepatik hücrelerin radyoduyarlılığı yüksek hücreler olduğu bilinmektedir. Bu hücreler, radyasyon sırasında KC yapısının ve işlevinin bozulmasına neden olarak, KC fibrozuna yol açan çeşitli maddeler salgılamaktadır. Radyasyona bağlı ortaya çıkan bu durum, RILD'ı olan hastalarda daha ciddi sorunlara neden olmaktadır (Kim ve Jung 2017). Bu sebeple RT sürecinde ortaya çıkan yan etkiler sıkı takip edilmelidir. Yan etkilerin

azaltılması için, fiziksel açıdan radyasyon dozunun normal dokulardan uzak tutmanın yanısıra, hedefe yönelik planlamalarla İR'un hücre ve doku düzeyinde etkinliğinin düzenlenmesi büyük önem taşımaktadır (Shadad ve ark 2013).

Edem ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, Nijerya'da avokado ağaçları üzerinden toplanan afrika VA'larından (*Loranthus micranthus*) elde edilen sulu ekstraktlar, farklı dozlarda (275, 551 ve 827 mg/kg) 3 hafta boyunca Wistar albino erkek ratlara oral yoldan uygulanmıştır. Çalışma sonunda serum ALT ve AST düzeyleri analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, 551 ve 827 mg/kg ekstrakt uygulanan hayvanlarda ALT düzeylerinin, ekstrakt uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı ($p<0,05$), buna karşın AST düzeylerinde ekstrakt uygulanan tüm doz gruplarında, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir (Edem ve Usoh 2009).

Bangladeş'de tropikal ağaç türlerinden biri olan maun ağaçları üzerinden toplanan VA'larının (*Dendrophloe falcate Linn*) yapraklarından elde edilen sulu ve etanolik ekstraktların, CCl₄ ile indüklenen KC hasarında antioksidan ve hepatoprotektif etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada ise, 7 gün boyunca Long Evans cinsi ratlara oral yoldan 200 mg/kg doz ile sulu ve etanolik VA ekstraktları uygulanmıştır. Çalışma sonunda serum ALT, AST, ALP ve bilirubin düzeyleri ile histopatolojik analizler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda hem sulu, hem de etanolik ekstrakt uygulanan gruplarda serum ALT ve AST düzeylerinde, CCl₄ ile KC hasarı oluşturulan gruba kıyasla anlamlı düşüşler görüldüğü bildirilmiştir. Histopatolojik değerlendirmeler sonucunda da, mikroveziküler steatoz ve hepatik nekroz açısından ekstrakt uygulanan her iki grupta da, kontrol grubuna kıyasla önemli iyileşmeler görülmüştür (Haque ve ark 2014).

Parasetamol ile indüklenen KC hasarında, kola ve kakao konakçı ağaçları üzerinden toplanan VA yapraklarının metanolik ekstraktlarının kullanıldığı deneysel bir çalışmada, Wistar albino cinsi ratlara 7 gün boyunca 1000 mg/kg kola ve kakao VA ekstraktı uygulanmıştır. Çalışma sonunda yapılan biyokimyasal analizlerde serum ALT, AST ve ALP düzeylerinin, parasetamol ile hasar oluşturulan gruba kıyasla önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca kakao VA'nun 1000-5000mg/kg arasındaki dozlarda uygulanmasının bu enzim düzeylerinde anlamlı bir farklılık oluşturmadığı, buna karşın 4000 ve 5000 mg/kg dozlarda kola VA ekstraktı uygulamasının bu enzimlerde önemli yükselişlere neden olduğu gözlenmiştir.

Histopatolojik değerlendirmeler yönünden ise kola VA'na kıyasla, kakao VA'nun hepatoprotektif etkisinin daha güçlü olduğu ve parasetamol hasarına karşı ciddi oranda iyileşmeler sağladığı bildirilmiştir (Yusuf ve ark 2015).

Patrick-Iwuanyanwu ve ark.'nın Nijerya'da yaptıkları bir başka çalışmada, karbon tetraklorür (CCl₄) ile indüklenen KC hasarında VA'nun hepatoprotektif etkisi; çözücü olarak metanol, bütanol ve etil asetat'ın kullanıldığı, soxhlet ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen afrika VA (*Tapinanthus bangwensis*, Engl. & K. Krause) ekstraktları 400 mg/kg doz ile 7 gün boyunca Wistar albino erkek ratlara oral yoldan uygulanarak incelenmiştir. Çalışma sonunda serum ALT, AST, ALP ve bilirubin düzeyleri ile lipit peroksidasyonun belirteçlerinden biri olan tiyobarbitürik asit (TBARS) düzeyleri analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda sırasıyla metanol, etil asetat ve bütanol ekstraktlarının uygulandığı gruplarda, kontrol grubuna kıyasla serum ALT, AST ve TBARS düzeylerinin, artan oran ile önemli derecede azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca yapılan akut toksisite testlerinde 2000 mg/kg'a kadar metanolik VA ekstraktı uygulamalarında herhangi bir mortalite gözlenmemiştir. Histopatolojik değerlendirmeler incelendiğinde ise, bütanol ve etil asetat ekstraktlarının hepatoprotektif etkilerinin daha yüksek olduğu, bu ekstraktların uygulandığı gruplarda normal görünüme sahip hepatositler ile santral ven yapıları düzgün sinüzoidler gözlenmiştir (Patrick-Iwuanyanwu ve ark 2010).

Adaramoye ve ark.'nın 2012 yılında yaptıkları bir başka çalışmada ise, STZ ile diyabet oluşturulan hayvanlarda VA'nun antidiyabetik ve antihiperlipidemik etkisi, kola ağaçları üzerinden toplanan Afrika VA'larından (*Kola acuminata*) elde edilen metanolik ekstraktların; 50 mg/kg ve 100 mg/kg olmak üzere 2 farklı dozda, 21 gün boyunca 10-12 haftalık Wistar albino erkek ratlara oral yoldan uygulanarak incelenmiştir. Deneysel çalışma sonrasında serum ALT, AST, ALP ve GGT düzeyleri analiz edilmiş, elde edilen sonuçlarda STZ ile diyabet oluşturulan grupta, kontrol grubuna kıyasla tüm parametreler açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığı görülmüştür. Bu durumun sebebi olarak deney süresinin kısa oluşu gösterilmiş ve deney süresinin 6-8 haftaya çıkarılması gerektiği ileri sürülmüştür. Buna karşın 100 mg/kg ekstrakt uygulanan grupta ise, STZ grubuna kıyasla önemli derecede düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (Adaramoye ve ark 2012).

Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya benzer şekilde RT uygulanan tüm gruplarda, kontrol grubuna kıyasla serum ALT ve AST düzeyleri bakımından anlamlı

bir farklılık bulunamamıştır. Deneysel çalışmamızın 14 gün süreyle planlanmış olmasının, beklenen farklılıkların ortaya çıkmamasında önemli bir etken olabileceği ihtimali, yine bu çalışmada öne sürülen deney süresinin daha uzun bir süreyle planlanması görüşüyle paralellik göstermektedir.

CCl₄'ün neden olduğu hepatotoksisite üzerine, dişbudak ağacı üzerinden toplanan ve su ile ekstrakte edilen hazır ticari VA preparatının (AbnobaViscum fraxini 20 mg/1 ml ampül (VAF)) koruyucu etkisi silmarin ile karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Bu amaçla hayvanlar 6 gruba (kontrol, CCl₄, VA-1, VA-2, silmarin, VA-2+silmarin) ayrılarak, 30 gün boyunca VA-1 grubuna 0,1 mL/kg/haftada bir kez subkutan (s.c.) enjeksiyon ile VAF, VA-2 grubuna 0,2 mL/kg/haftada bir kez s.c. VAF, silmarin grubuna oral yoldan (i.g.) 25 mg/kg/gün silmarin ve VA-2+silmarin grubuna da 0,2 mL/kg/haftada bir kez (s.c.) VAF+25 mg/kg/gün silmarin (i.g.) uygulanmıştır. Çalışma sonunda yapılan biyokimyasal analizlerde, CCl₄ ile hasar oluşturulan gruba kıyasla VA-1, VA-2, silmarin ve VA-2+silmarin gruplarında sırasıyla serum ALT düzeylerinin, %51,2; %65,6; %48,9; %73,1, AST düzeylerinin: %52,6; %61,1; %51,8, %67,6 oranında anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Histopatolojik incelemelerde haftada bir kez 0,1 mL/kg VAF ekstraktı uygulanan grupta, portal venlerde ödemi işaret eden belirgin genişlemeler ve tıkanıklıklar ile KC dokusunun normal yapısında hafif bozulmalar gözlenirken, 0,2 mL/kg/haftada bir kez VAF uygulanan grupta ise, minimal fibrozis varlığında kontrol grubuna yakın şekilde doku mimarisinin onarıldığı gözlenmiştir (Abdel-Salam ve ark 2010).

Bizim çalışmamızda da bu çalışmanın histopatolojik bulgularına benzer şekilde, RT ile indüklenen KC hasarına karşı BVA ekstraktı uygulanan çalışma grubunda, KC doku kesitlerinde portal alanda inflamasyon, santral ven ve sinüzoidal kapillerde genişlemeler varlığında hepatosit bütünlüğünün ve radyal mimarinin RT grubuna kıyasla daha iyi korunduğu, sınırlarının daha net olduğu izlenmiştir. Ayrıca bu grupta, RT+NAS grubundaki kadar yoğun olmasa da, proliferatif alanlar dikkati çekmiştir. RT+NAS grubunda ise, kesit alanına giren portal vende ve devamındaki dağıtıcı dalında konjesyon alanları ve periportal lokalizasyonlu hafif inflamasyon gözlenirken, belirgin reaktif hücre proliferasyonu dikkati gözlenmiştir.

CCl₄'ün neden olduğu oksidatif stres üzerine VA alkalisi (MA)'nin antioksidan etkisinin ratlar üzerinde araştırıldığı bir çalışmada serum, KC ve böbrek

doku örneklerinde malondialdehit (MDA) düzeyleri, KC ve böbrek dokularında glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST) aktiviteleri ile idrar örneklerinde 8-OHdG düzeyleri incelenmiştir. 90 mg/kg CCl₄ uygulanan grupta, KC ve böbrek dokularındaki MDA seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı, buna karşın GSH seviyeleri ve SOD, GSPx ve GR enzim aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. CCl₄+MA uygulanan grupta ise her iki doku örneğindeki MDA düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ve SOD, GSPx ve GR düzeylerinde ise önemli ölçüde artış olduğu gözlenmiştir. CCl₄ uygulanan ve MA ile tedavi edilen gruplar arasında 8-OHdG'nin idrarla atılımında ise anlamlı bir fark bulunduğu dikkati çekmiştir (Shi ve ark 2006).

İran'da meşe ağaçları üzerinden toplanan VA'larının su ekstraktları, 4 gün boyunca sıçanlara farklı dozlarda 500 mg/kg ve 1000 mg/kg i.g. ile uygulanmış, son uygulamadan 1 saat sonra 70 mg/kg subkutan yolla alloksan enjeksiyonunu takiben 24., 48. ve 72. saatlerde toplanan serum örneklerinde FRAP yöntemiyle antioksidan aktivite analizleri yapılmış, elde edilen sonuçlarda 500 mg/kg VA ekstraktının 48. ve 72. saatlerde, 1000 mg/kg VA ekstraktının ise tüm zaman dilimlerinde serum antioksidan aktivite düzeylerini anlamlı şekilde artırdığı bildirilmiştir (Mohammad ve ark 2011).

Avrıp VA'nun üç alt türünün (*sp. album*, *sp. avusturya*, *ssp. abietis*) i.g. ile uygulanan 500 mg/kg dozda su ve etanolik ekstraktlarının, normoglisemik ve STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda akut hipoglisemik etkileri ile böbrek, KC ve kalp dokularındaki MDA ve GSH düzeyleri yönünden antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, VAAB ve VAAL türlerine ait su ekstraktlarının, diyabetik kontrol grubuna kıyasla MDA düzeylerini, VAAB, VAAL ve VAAU türlerine ait su ekstraktları ile VAAL türüne ait etanol ekstraktının yine diyabetik kontrol grubuna kıyasla GSH düzeylerini anlamlı şekilde azalttığı bildirilmiştir (Orhan ve ark 2005).

VA ekstraktlarının streptozotosin (STZ) kaynaklı diyabetik sıçanlar üzerindeki antidiyabetik ve antioksidan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, TAK ve TOK analizleri elisa yöntemi ile ölçülmüş, VA verilen grupta, diyabet grubuna göre TOK ($p<0,05$) düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı, TAK düzeylerinin ise arttığı ($p<0,05$) görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar, VA'nun diyabetik

komplikasyonların oluşumunu önlemeye yardımcı olabilecek güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Ahmed ve ark 2019).

0.5, 1 ve 2 ng/kg olmak üzere farklı dozlarda i.p. enjeksiyonla uygulanan ML-I'in, enjeksiyon sonrası 1., 6., 12. ve 24. saatlerde TNF- α , NO, TAK ve TOK düzeylerine etkisinin tavşanlar üzerinde araştırıldığı bir çalışmada, 0.5 ng/kg ML-I uygulanan grupta TNF- α düzeyinin tüm zaman dilimlerinde kontrol ve diğer ML-1 uygulanan gruplara kıyasla yüksek olmakla birlikte, 1. saat sonunda en yüksek değerine ulaştığı ($p<0.01$) gözlenmiştir. 0.5 ve 1 ng/kg lektin dozlarının 1. saatte NO düzeyini önemli derecede azalttığı ($p<0,05$), buna karşın 1 ve 2 ng/kg ML-1 dozlarının 12. saat sonunda NO düzeyini önemli oranda arttırdığı ($p<0,05$) ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak bir farkın bulunmadığı bildirilmiştir. 0.5 ng/kg ML-I uygulanan grupta, 1 saat itibariyle TAK değerlerinin 6, 12 ve 24. saatlere kıyasla daha yüksek ($p<0,05$) olduğu, TOK düzeylerinde ise gruplar arası tüm zaman dilimlerinde anlamlı bir farklılık bulunmadığı görülmüştür (Harmankaya ve Özcan 2017).

Çalışmamızda serum örneklerinde RT+NAS grubunda TOK düzeylerinin, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha düşük olduğu, buna karşın TAK düzeyleri ve OSİ'leri bakımından çalışma grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür. Benzer şekilde KC doku örneklerinde de TAK ve TOK düzeyleri ile OSİ'leri bakımından tüm çalışma grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Her ne kadar KC doku örneklerinde çalışma grupları arasında OSİ'leri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamasa da, RT grubuna kıyasla RT+VA ve RT+NAS+VA gruplarında OSİ'lerindeki düşüş oranı dikkat çekmektedir. Elde edilen bu sonuçlar varlığında, BVA ekstraktının serum ve doku örneklerinde OSİ'leri üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

VA metanolik (VaM) ve metanol-hekzan (VaMH) ekstraktlarının farelerin splenik lenfositlerinde gama radyasyon hasarına karşı radyoprotektif ve mitojen proliferasyonuna etkilerinin incelendiği *in vitro* bir çalışmada hem VaM hem de VaMH, 10-100 μ g doz aralığında doza bağımlı bir şekilde kanser hücrelerinde konkavalin A (Con A) tarafından indüklenen lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiği, kanser hücre döngüsünü G2/M fazında durdurarak apoptoza uğramalarını sağladığı ve splenositlerde radyasyona bağlı DNA hasarını önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir (Murthuza ve ark 2016).

Saflaştırılmış veya rekombinant ML-I'in insan melanom hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca ML-I'e maruziyetin bir sonucu olarak birkaç *in vitro* çalışmada da apoptoz gösterilmiştir. Hücre apoptozunun uyarılmasında ML-I'in A-zincirinin daha etkili bir bileşen olduğu, B-zincirinin ise çok etkili olmadığı bildirilmiştir. Bu önemli sonuç, ML-I tarafından indüklenen apoptozun, ölüm reseptörü aracılı bir sinyal mekanizmasından kaynaklanma olasılığının düşük olduğunu, bunun yerine ML-I'in A-zincirinin doğrudan ribozom inhibe edici etkilerinden kaynaklandığını ortaya koymuştur (Thies ve ark 2008).

Bazı tümör hücrelerinin ML'ler ile eşzamanlı muamelesi, hücreleri TNF- α tarafından apoptozun indüklenmesine karşı daha duyarlı hale getirmiş, bu durum TNF- α ölüm reseptörleri ailesi ile ML-I arasında bir etkileşimin olduğunu düşündürmüştür. Bununla birlikte, Jurkat lösemik T hücrelerinde, ML-I ölüm reseptörü sinyalizasyonundan bağımsız olarak kaspaz-8 aktivasyonu ile apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Bantel ve ark 1999).

ML-I'in, apoptozun mitokondriyal yolunu kontrol eden kaspaz-3 üzerindeki doğrudan aktive edici etkisi, birkaç farklı hücre türü ile gösterilmiştir. Örneğin, insan nötrofil hücrelerinde, ML-I'in kaspaz-3 aktivasyonu ile güçlü bir apoptoz indükleyicisi olduğu bildirilmiştir. Hepatokarsinom Hep 3B hücrelerinde, ML-I'in mitokondriyal transmembran potansiyelini değiştirdiği, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROT) seviyelerini arttırdığı, antiapoptotik miyeloid lösemi-1 (Mcl-1) protein ekspresyonunu azalttığı, kaspaz aktivasyonu ile nötrofil apoptozuna ve hücre iskeletini oluşturan paksilin ve vimentin proteinlerinin degradasyonuna yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca, p53^{+/+} ve p53^{-/-} fare tümör hücreleri ile yapılan araştırmalarda da ML-I'in, p53'ten bağımsız olarak mitokondriyal membran potansiyelini değiştirerek ve kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Lyu ve ark 2002).

Kore VA lektininin (*Viscum album L. coloratum agglutinin* (VCA)) insan hepatoma hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozu üzerine etkileri ve bu etkilerin altında yatan mekanizmaları araştırılmış; VCA'nın hem SK-Hep-1 (p53-pozitif) hem de Hep 3B (p53-negatif) hücrelerinde p53 ve p21'den bağımsız olarak, her iki hücre hattında da kaspaz-3 aktivasyonu ile Bcl-2'yi baskıladığı, buna karşın Bax'ı aktive ederek apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Lyu ve ark 2002).

Çalışmamızda BVA başta olmak üzere NAS uygulanan çalışma gruplarında da IR maruziyetinde proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

İnsan hepatokarsinom Hep3B hücrelerinde Kore VA lektinleri ile indüklenen apoptozda reaktif oksijen türlerinin ve mitokondriyal membran potansiyelinin etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada VCA'nın uygulaması, hücrelerde ROT miktarında önemli bir artışa ve mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına neden olmuştur. NAS+VCA uygulanan hücrelerde ise, VCA tarafından uyarılan ROT indüksiyonunun azaldığı, bu durumun Hep3B hücrelerinde apoptozu önlediği görülmüştür. Bu sonuçlar VCA aracılı hücre apoptozunda oksidatif stresin önemli rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca VCA uygulanan Hep3B hücrelerinde meydana gelen apoptozda mitokondriyal membran geçirgenliğinde, Bax translokasyonunda, sitokrom c salınımında ve kaspaz-3 aktivitesinde hızlı değişiklikler olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark 2004).

Hindistan ve Çin'de yetişen VA türleri arasında yer alan *Viscum articulatum Burm*'in su ekstraktı, Jurkat E6.1 ve THP1 lösemi hücre hatlarına uygulanmış; çalışma bulgularında VA ekstraktının ilgili lösemi hücre hatları üzerine önemli derecede sitotoksik etkiler gösterdiği, hücre içi ROT miktarını artırdığı, ROT aracılı DNA fragmentasyonuna sebep olduğu ve hücre döngüsünü G2/M safhasında durdurarak kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonu ile her iki lösemi hücre hattında da ekstrinsik apoptoz yolunu indüklediği bildirilmiştir (Mishra ve ark 2018).

Çalışmamızda ise tüm deney grupları arasında KC doku örneklerinde kaspaz-3 ile boyanan apoptotik hücre sayıları, Dapi ile işaretlenen canlı hücre sayıları ve API indeksleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde, IR'un neden olduğu kaspaz-3 aktivasyonunda hem VA'nun, hem de NAS'in tek başına veya birlikte kullanıldıklarında belirgin bir etkilerinin olmadığı görülmüştür.

CCl₄ neden olduğu KC hasarında VA ekstraktı ve probiyotiklerin (P) etkilerinin incelendiği bir çalışmada, hemoksijenaz-1 (HO-1) ve 8-OHdG seviyeleri analiz edilmiş; akut CCl₄ maruziyetinin, akut çalışma grupları arasında serum HO-1 ve 8-OHdG seviyeleri açısından anlamlı bir farklılığa neden olmadığı, kronik VAP grubunda VA ekstresi ile probiyotik tedavisinin, kronik CCl₄ grubuna kıyasla serum

HO-1 seviyelerini önemli ölçüde artırdığı, buna karşın kronik çalışma grupları arasında serum 8-OHdG seviyelerinde ise anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (Erdaş ve ark 2021).

Cooke ve ark., farelerin tüm vücut ışınlanmasına maruz bırakıldığında, KC DNA'sında 8-OHdG seviyesinin yaklaşık 0,5 Gy'den itibaren arttığı, buna karşın yüksek doz grubunda (10, 30 Gy) yükselen 8-OHdG seviyelerinin RT'den 24 saat sonra azaldığını bildirilmişlerdir. Bu sonuçlar, organizmalarda DNA onarımı ve antioksidatif kapasite gibi radyasyondan bir korunma mekanizmasının varlığını da ortaya koymuştur (Cooke ve ark 2008).

Bir diğer çalışmada, RT ile 8-OHdG düzeyleri arasındaki ilişkiye dair birçok seçenek düşünülse de bu ilişki arasındaki temel farkın, hastaların RT aldıklarında sahip oldukları kanser tipine göre değiştiği, örneğin prostat kanserli hastalarda RT sonrası 8-OHdG düzeylerinde artış, buna karşın rahim ağzı kanserli hastalarda RT sonrası 8-OHdG düzeyinde düşüş, meme, yemek borusu ve dil kanserli hastalarda ise RT sonrası 8-OHdG düzeyinde değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Yamazaki ve ark 2005).

Gao ve ark.'nın yaptığı bir başka çalışmada ise, 4 RT seansından sonra serum 8-OHdG seviyelerinin 196,71 ng/mL'den 147.21 ng/mL'ye düştüğü, bu sonuçtan hareketle RT'ye kümülatif maruz kalma dozu ile 8-OHdG arasında doğrusal bir ilişki olmadığı öne sürülmüştür (Gao ve ark 2019).

Bizim çalışmamızda da bu literatür bilgilerine paralel şekilde, KC doku örneklerinde 8-OHdG düzeyleri açısından çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. RT uygulanan tüm gruplarda genel olarak 8-OHdG düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla, RT grubundan başlamak üzere sırasıyla RT-NAS; RT+VA; RT-NAS+VA gruplarında anlamlı şekilde azaldığı, RT+VA ve RT-NAS+VA gruplarında ise, RT grubuna kıyasla daha düşük olduğu, RT-NAS, RT+VA ve RT-NAS+VA grupları arasında ise benzer olduğu görülmüştür. Aynı şekilde RT ve RT+NAS grupları arasında da 8-OHdG düzeylerinin benzer olduğu dikkati çekmiştir.

Standardize VA ekstraktlarından biri olan Iscador Malus (Iscador M) ile inkübe edilen HaCaT hücrelerinde hangi apoptotik yolun kullanıldığının araştırıldığı bir çalışmada, Iscador M ile muamele edilmiş hücrelerin bir kısmının, genel olarak

apoptotik yolların aktivasyon göstergeleri olan bölünmüş M-30 ve aktive edilmiş kaspaz 3 için, hücrelerin bir kısmının da ölüm reseptörleri yolunun aktivasyonunun göstergesi olan aktif kaspaz 8 ve mitokondriyal yolun katılımını gösteren Bax için pozitif olduğu gözlenmiştir. Ayrıca Iscador M muamelesinden sonra apoptotik hücrelerde sitokrom C için yaygın bir boyama gözlenmiş, bu durumun mitokondriyal yolda sitokrom C sızıntısını gösterdiği bildirilmiştir (Harmsma ve ark 2006).

Bizim çalışmamızda ise M-30 düzeyleri bakımından çalışma grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma sonuçları serum ve KC doku örneklerinde biyokimyasal parametreler açısından değerlendirildiğinde, BVA ekstraktının tek başına veya NAS ile birlikte uygulandığında, İR maruziyetinde oksidatif stresin azaltılması veya önlenmesi başta olmak üzere radyoprotektif etkisinin gözlenemediği, immünohistokimyasal analiz sonuçları açısından değerlendirildiğinde ise, BVA ekstraktı uygulanan deney gruplarına ait KC dokularında, apoptotik sürecin önemli düzenleyicileri olan kaspaz-3'lerin aktivasyonunda ve API'lerde anlamlı bir farklılık bulunmadığı görülmüştür. Histopatolojik değerlendirmeler sonucunda da, RT+NAS ve RT+VA gruplarında hepatosit bütünlüğünün ve radyal mimarinin RT grubuna kıyasla daha iyi korunduğu, sınırlarının daha net olduğu izlenirken, RT+NAS grubunda, RT+VA grubuna göre daha belirgin reaktif hücre proliferasyonu ile birlikte iyileşme derecesinin daha iyi olduğu dikkat çekmiştir.

Elde edilen çalışma sonuçlarımıza göre, BVA'nun radyoprotektif etkinliğinin histolojik bulgularda NAS ile karşılaştırılabilir düzeyde yakın olmasına rağmen, biyokimyasal bulgular BVA'nun radyoprotektif etkinliğini net bir şekilde ortaya koyamamıştır. Farklı ekolojik şartlarda ve yıl içerisinde farklı zamanlarda toplanacak VA örneklerinin kimyasal bileşimlerinin birbirinden farklı olabileceği, VA ile yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bu sebeple farklı bölgelerden farklı zamanlarda toplanacak BVA'na ait örneklerden yine farklı ekstraksiyon yöntemleri ve çözücüler kullanılarak elde edilecek ekstraktlar ile daha uzun deneysel çalışma süreleriyle planlanacak kapsamlı çalışmalarla BVA'nun radyoprotektif etkinliğinin daha net bir şekilde ortaya konabileceği kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Salam OM, Sleem AA, Shaffie NM, 2010. Effect of *Viscum album* on acute hepatic damage caused by carbon tetrachloride in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 40, 3, 421-6.
- Adaramoye O, Amanlou M, Habibi-Rezaei M, Pasalar P, Ali M-M, 2012. Methanolic extract of African mistletoe (*Viscum album*) improves carbohydrate metabolism and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5, 6, 427-33.
- <https://www.afad.gov.tr/kbrn/radyasyon-nedir>, Erişim Tarihi, 28.12.2022.
- Ahmed AK, Nihat M, Handan M, 2019. Investigation of the antidiabetic effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extract in experimental diabetes in rats. *Van Veterinary Journal*, 30, 2, 121-5.
- Al K, 2006. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. Çeviri Editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, Ankara, Palme Yayıncılık, 531-64.
- Ames BN, 1989. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radical Research Communications*, 7, 3-6, 121-8.
- Antwih DA, Gabbara KM, Lancaster WD, Ruden DM, Zielske SP, 2013. Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways. *Epigenetics*, 8, 8, 839-48.
- Arcı S, 2008. Toksik hepatit. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 2, 113-9.
- Arslan N. The Effects of Radiation on Biological Systems. *Nuclear Medicine Seminars*, 178-84.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J, 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 6, 6, 593-7.
- Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D, 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*, 327, 1-2, 48-60.
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, 2005. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434, 7033, 658-62.
- Bantel H, Engels IH, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S, 1999. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Research*, 59, 9, 2083-90.
- Barrett LF, Mesquita B, Gendron M, 2011. Context in emotion perception. *Current Directions in Psychological Science*, 20, 5, 286-90.
- Barshishat-Kupper M, Tipton AJ, McCart EA, McCue J, Mueller GP, Day RM, 2014. Effect of ionizing radiation on liver protein oxidation and metabolic function in C57BL/6J mice. *International Journal of Radiation Biology*, 90, 12, 1169-78.
- Baytop T, 1984. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün) Türkiye’de Kullanılan Tıbbi Bitkiler. *ĐÜ Yayın*, 3255, 203-4.
- Bisht B, Bhatnagar P, Gururani P, Kumar V, Tomar MS, Sinhmar R, Rathi N, Kumar S, 2021. Food irradiation: Effect of ionizing and non-ionizing radiations on preservation of fruits and vegetables—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 372-85.
- Bissel D, 1996. Hepatic fibrosis and cirrhosis. *Hepatology: a textbook of liver disease*, 196, 506-25.
- Bolus NE, 2001. Basic review of radiation biology and terminology. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 29, 2, 67-73.
- Borgström L, Kågedal B, Paulsen O, 1986. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 31, 2, 217-22.
- Brenner DJ, Hall EJ, 2007. Computed tomography—an increasing source of radiation exposure. *New England Journal of Medicine*, 357, 22, 2277-84.
- Büssing A, Schietzel M, 1999. Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Res*, 19, 1a, 23-8.
- Büssing A, Stumpf C, Tröger W, Schietzel M, 2007. Course of mitogen-stimulated T lymphocytes in cancer patients treated with *Viscum album* extracts. *Anticancer Research*, 27, 4C, 2903-10.
- Büssing A, Suzart K, Schweizer K, 1997. Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts. *Anticancer Drugs*, 8 Suppl 1, S9-14.
- Carlberg I, Mannervik B, 1985. [59] Glutathione reductase. In: *Methods in Enzymology*. Eds: Elsevier, p. 484-90.
- Cebović T, Spasić S, Popović M, 2008. Cytotoxic effects of the *Viscum album* L. extract on Ehrlich tumour cells in vivo. *Phytother Res*, 22, 8, 1097-103.

- Chen Y, Wei H, Sun R, Dong Z, Zhang J, Tian Z, 2007. Increased susceptibility to liver injury in hepatitis B virus transgenic mice involves NKG2D-ligand interaction and natural killer cells. *Hepatology*, 46, 3, 706-15.
- Choudhary M, Maher S, Begum A, Abbaskhan A, Ali S, Khan A, (2010). *Chem Pharm Bull* 951, Tokyo: 58, 980-2.
- Choudhary MI, Maher S, Begum A, Abbaskhan A, Ali S, Khan A, 2010. Characterization and antiglycation activity of phenolic constituents from *Viscum album* (European Mistletoe). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58, 7, 980-2.
- Christiansen H, Batusic D, Saile B, Hermann RM, Dudas J, Rave-Frank M, Hess CF, Schmidberger H, Ramadori G, 2006. Identification of genes responsive to gamma radiation in rat hepatocytes and rat liver by cDNA array gene expression analysis. *Radiation Research*, 165, 3, 318-25.
- Cooke MS, Olinski R, Loft S, Analysis ESCoUL, 2008. Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17, 1, 3-14.
- Corinne Sprong R, Winkelhuyzen-Janssen AML, Aarsman CJ, van OIRSCHOT JF, van der Bruggen T, Sweder van Asbeck B, 1998. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157, 4, 1283-93.
- Coşkun G, Özgür H, 2011. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20, 3, 145-58.
- Cotran R, Kumar V, Collins T, 1999. *Robbins Pathologic Basis of Disease* 6th ed. Philadelphia, Pa: Saunders, 1019-20.
- Curtin JF, Cotter TG, 2003. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular signalling*, 15, 11, 983-92.
- Çelik AS, 2014. Radyoterapi sonucu gelişen yan etkiler ve hemşirelik yaklaşımı. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3, 3, 933-47.
- Danial NN, Korsmeyer SJ, 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 2, 205-19.
- De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM, 2001. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis*, 22, 7, 999-1013.
- Delaney GP, Barton MB, 2015. Evidence-based estimates of the demand for radiotherapy. *Clinical Oncology*, 27, 2, 70-6.
- Delebinski CI, Jaeger S, Kemnitz-Hassanin K, Henze G, Lode HN, Seifert GJ, 2012. A new development of triterpene acid-containing extracts from *Viscum album* L. displays synergistic induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Prolif*, 45, 2, 176-87.
- Deliorman D, Çalış İ, Ergun F, Doğan BSU, Buharaloğlu CK, Kızılcık İl, 2000. Studies on the vascular effects of the fractions and phenolic compounds isolated from *Viscum album* ssp. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 1-2, 323-9.
- Demirel C, Kilciksiz S, Evirgen-Ayhan S, Gurgul S, Erdal N, 2010. The preventive effect of N-acetylcysteine on radiation-induced dermatitis in a rat model. *J Buon*, 15, 3, 577-82.
- Dirier A, Andiç F, 2010. Radyoterapiye Bağlı Sekonder Maligniteler/Secondary Malignant Diseases Related to Radiotherapy. *Türkiye Klinikleri. Tıp Bilimleri Dergisi*, 30, 2, 746.
<https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Viscum+album>, Erişim Tarihi, 28.12.2022.
- Dörr W, Gabryś D, 2018. The Principles and Practice of Re-irradiation in Clinical Oncology: An Overview. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 30, 2, 67-72.
- Dröge W, 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 1, 47-95.
- Dubois A, Dorval ED, Steel L, Fiala NP, Conklin JJ, 1987. Effect of ionizing radiation on prostaglandins and gastric secretion in rhesus monkeys. *Radiation Research*, 110, 2, 289-93.
- Durak I, Kaçmaz M, Çimen MB, Büyükkoçak Ü, Öztürk HS, 2001. Blood oxidant/antioxidant status of atherosclerotic patients. *International Journal of Cardiology*, 77, 2-3, 293-7.
- Edem D, Usuh I, 2009. Biochemical changes in Wistar rats on oral doses of mistletoe (*Loranthus micranthus*). *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4, 3, 94-7.
- Effiong OO, Udo NV, Monday EN, 2014. Reduction in serum bilirubin concentration following administration of crude leaf extract of *Viscum album* (mistletoe) in high salt fed rats. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 3, 352.
- Elgazzar AH, Kazem N, 2015. Biological Effects of Ionizing Radiation. In: *The pathophysiologic basis of nuclear medicine*. Eds: Springer, p. 715-26.

- Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR, 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 1, 663-98.
- Elluru S, Van Huyen J-PD, Delignat S, Prost F, Bayry J, Kazatchkine MD, Kaveri SV, 2006. Molecular mechanisms underlying the immunomodulatory effects of mistletoe (*Viscum album L.*) extracts Iscador. *Arzneimittelforschung*, 56, 06, 461-6.
- Elluru SR, Van Huyen J-PD, Delignat S, Kazatchkine MD, Friboulet A, Kaveri SV, Bayry J, 2008. Induction of maturation and activation of human dendritic cells: A mechanism underlying the beneficial effect of *Viscum album* complementary therapy in cancer. *BMC Cancer*, 8, 1, 1-8.
- Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35, 4, 495-516.
- Erdaş M, Akyüz F, Can B, Özkoç M, Öz S, Dönmez DB, 2021. In vivo effects of *Viscum album* and probiotics against carbon tetrachloride-induced liver injury. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 53, 2, 139-48.
- Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ, 1999. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *The Journal of Clinical Investigation*, 103, 1, 137-45.
- Feinendegen L, 2002. Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Human & Experimental Toxicology*, 21, 2, 85-90.
- Felenda JE, Turek C, Stintzing FC, 2019. Antiproliferative potential from aqueous *Viscum album L.* preparations and their main constituents in comparison with ricin and puromycin on human cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 236, 100-7.
- Fidan I, Ozkan S, Gurbuz I, Yesilyurt E, Erdal B, Yolbakan S, Imir T, 2008. The efficiency of *Viscum album ssp. album* and *Hypericum perforatum* on human immune cells in vitro. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 30, 3, 519-28.
- Fischer S, Scheffler A, Kabelitz D, 1997. Stimulation of the specific immune system by mistletoe extracts. *Anticancer Drugs*, 8 Suppl 1, S33-7.
- Flanagan RJ, Meredith T, 1991. Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. *The American journal of medicine*, 91, 3, S131-S9.
- Freuding M, Keinki C, Micke O, Buentzel J, Huebner J, 2019. Mistletoe in oncological treatment: a systematic review. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145, 3, 695-707.
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan N, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death & Differentiation*, 16, 8, 1093-107.
- Gao W, Liang JX, Ma C, Dong JY, Yan Q, 2017. The protective effect of N-acetylcysteine on ionizing radiation induced ovarian failure and loss of ovarian reserve in female mouse. *Biomed Res Int*, 2017, 4176170.
- Gao Y, Wang P, Wang Z, Han L, Li J, Tian C, Zhao F, Wang J, Zhao F, Zhang Q, 2019. Serum 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine level as a potential biomarker of oxidative DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood. *Dose-Response*, 17, 1, 1559325818820649.
- Gillissen A, Nowak D, 1998. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Respiratory Medicine*, 92, 4, 609-23.
- Girotti AW, 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 39, 8, 1529-42.
- Golla S, Golla JP, Krausz KW, Manna SK, Simillion C, Beyoğlu D, Idle JR, Gonzalez FJ, 2017. Metabolomic analysis of mice exposed to gamma radiation reveals a systemic understanding of total-body exposure. *Radiation Research*, 187, 5, 612-29.
- Gray A, Flatt P, 1999. Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe). *Journal of Endocrinology*, 160, 3, 409-14.
- Green DR, Kroemer G, 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 5684, 626-9.
- Guyton AC, Hall JE, 1986. *Textbook of medical physiology*, Saunders Philadelphia, p. 883-888.
- Hainfeld JF, Dilmanian FA, Slatkin DN, Smilowitz HM, 2008. Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60, 8, 977-85.
- Hall EJ, Giaccia AJ, 2006. *Radiobiology for the Radiologist*, Philadelphia, p.
- Halperin EC, Brady LW, Wazer DE, Perez CA, 2013. *Perez & Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology*, Lippincott Williams & Wilkins.

- Haque A, Tahmina AS, Sarker I, Hossain M, Islam S, Islam A, 2014. Antioxidant and hepatoprotective effects of aqueous and ethanol extracts of *Dendrophthoe falcate* linn leaves. *Archives*, 1, 90-101.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo M-S, 2011. Korean mistletoe enriched diet enhances innate immune response in kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against *Philasterides dicentrarchi*. *Veterinary Parasitology*, 183, 1-2, 146-51.
- Harmankaya A, Özcan A, 2017. Effect of different doses of mistletoe lectin-I on the levels of tumor necrosis factor- α , nitric oxide, total antioxidant and oxidant capacity in rabbits. *Van Veterinary Journal*, 28, 1, 41-5.
- Harmsma M, Ummelen M, Dignef W, Tusenius KJ, Ramaekers FC, 2006. Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador on cell cycle and survival of tumor cells. *Arzneimittelforschung*, 56, 6a, 474-82.
- Haume K, Rosa S, Grellet S, Śmiałek MA, Butterworth KT, Solov'yov AV, Prise KM, Golding J, Mason NJ, 2016. Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer Nanotechnology*, 7, 1, 1-20.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR, 2005. Glutathione transferases. *Annual review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 1, 51-88.
- Hetz H, Hoetzenecker K, Hacker S, Faybik P, Pollreisz A, Moser B, Roth G, Hoetzenecker W, Lichtenauer M, Klinger M, 2007. Caspase-cleaved cytokeratin 18 and 20 S proteasome in liver degeneration. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 21, 5, 277-81.
- Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, Gores GJ, 2001. The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 42, 38610-8.
- Holdiness MR, 1991. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clinical Pharmacokinetics*, 20, 2, 123-34.
- Holliday R, Grigg G, 1993. DNA methylation and mutation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 285, 1, 61-7.
- Huber R, Lütke R, Klassen M, Müller-Buscher G, Wolff-Vorbeck G, Scheer R, 2001. Effects of a mistletoe preparation with defined lectin content on chronic hepatitis C: an individually controlled cohort study. *European Journal of Medical Research*, 6, 9, 399-405.
- İliçin G ÜS, Biberöğlü K, Akalın S, Süleymanlar G., 1996. *Temel İç Hastalıkları*. Güneş Kitabevi, p. 1077-1167.
- Jagetia GC, 2007. Radioprotection and radiosensitization by curcumin. *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, 301-20.
- Jiang P, Wang Y, Yu H, 2006. CT and MR imaging appearance of radiation-induced liver injury after conformal radiation therapy. *Chinese Journal of Clinical Oncology and Rehabilitation*, 13, 6, 516.
- Jiang Y, Wang C, Li Y-Y, Wang X-C, An J-D, Wang Y-J, Wang X-J, 2014. Mistletoe alkaloid fractions alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis through inhibition of hepatic stellate cell activation via TGF- β /Smad interference. *Journal of Ethnopharmacology*, 158, 230-8.
- Junqueira LCU, Carneiro J, 2005. *Basic Histology: text & atlas*, McGraw-Hill Professional.
- Junqueira LCU, Carneiro J, Kelley RO, 1993. *Basic Histology*. 380-94.
- Jurin M, Žarković N, Hrženjak M, Ilić Z, 1993. Antitumorous and immunomodulatory effects of the *Viscum album* L. preparation Isorel. *Oncology*, 50, 6, 393-8.
- Kalapos MP, 2008. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico-Biological Interactions*, 171, 3, 251-71.
- Karagöz A, Öney E, Arda N, Kuru A, 2003. Antiviral potency of mistletoe (*Viscum album* ssp. *album*) extracts against human parainfluenza virus type 2 in Vero cells. *Phytotherapy Research*, 17, 5, 560-2.
- Kelle I, 2008. Radyoprotektif Etkili Ajanlar. *Dicle Tıp Dergisi*, 35, 1, 69-76.
- Kendall G, 2000. Second-event theory reviewed. *Journal of Radiological Protection: Official Journal of the Society for Radiological Protection*, 20, 1, 79-80.
- Khong P, Ringertz H, Donoghue V, Frush D, Rehani M, Appelgate K, Sanchez R, 2013. ICRP publication 121: radiological protection in paediatric diagnostic and interventional radiology. *Annals of the ICRP*, 42, 2, 1-63.
- Kienle GS, Glockmann A, Schink M, Kiene H, 2009. *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28, 1, 1-33.

- Kilciksiz S, Demirel C, Erdal N, Gürgül S, Tamer L, Ayaz L, Ors Y, 2008. The effect of N-acetylcysteine on biomarkers for radiation-induced oxidative damage in a rat model. *Acta medica Okayama*, 62, 6, 403-9.
- Kim BK, Choi MJ, Park KY, Cho EJ, 2010. Protective effects of Korean mistletoe lectin on radical-induced oxidative stress. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33, 7, 1152-8.
- Kim J, Jung Y, 2017. Radiation-induced liver disease: current understanding and future perspectives. *Exp Mol Med*, 49, 7, e359.
- Kim W-H, Park WB, Gao B, Jung MH, 2004. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Molecular Pharmacology*, 66, 6, 1383-96.
- Kim Y, Kim I, Park C-H, Kim JB, 2018. Korean mistletoe lectin enhances natural killer cell cytotoxicity via upregulation of perforin expression. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 36, 3, 175-83.
- Kuttan G, Kuttan R, 1993. Reduction of leukopenia in mice by *Viscum Album* administration during radiation and chemotherapy. *Tumori Journal*, 79, 1, 74-6.
- Li T, Cao Y, Li B, Dai R, 2021. The biological effects of radiation-induced liver damage and its natural protective medicine. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 167, 87-95.
- Lindahl T, 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 6422, 709-15.
- Liu B, Bian H-j, Bao J-k, 2010. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*, 287, 1, 1-12.
- Liu Z, Luo Y, Zhou TT, Zhang WZ, 2013. Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? *Cell Proliferation*, 46, 5, 509-15.
- Luft T, Conzelmann M, Benner A, Rieger M, Hess M, Strohhaecker U, Görner M, Hegenbart U, Ho AD, Dreger P, 2007. Serum cytokeratin-18 fragments as quantitative markers of epithelial apoptosis in liver and intestinal graft-versus-host disease. *Blood*, The Journal of The American Society of Hematology, 110, 13, 4535-42.
- Lyu S-Y, Park W-B, 2006. Mistletoe lectin (*Viscum album coloratum*) modulates proliferation and cytokine expressions in murine splenocytes. *BMB Reports*, 39, 6, 662-70.
- Lyu S-Y, Park W-B, 2007. Effects of Korean mistletoe lectin (*Viscum album coloratum*) on proliferation and cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells and T-lymphocytes. *Archives of Pharmacal Research*, 30, 10, 1252-64.
- Lyu S-Y, Park W-B, 2011. Gene network analysis on the effect of *Viscum album var. coloratum* in T cells stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies. *Archives of Pharmacal Research*, 34, 10, 1735-49.
- Lyu SY, Choi SH, Park WB, 2002. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Archives of Pharmacal Research*, 25, 1, 93-101.
- Malhi H, Gores GJ, 2008. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology*, 134, 6, 1641-54.
- Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM, Hanafi N, 2008. Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats. *Biochem Pharmacol*, 75, 3, 773-80.
- Martínez M, Hernández AI, Martínez N, 2000. N-Acetylcysteine delays age-associated memory impairment in mice: role in synaptic mitochondria. *Brain Research*, 855, 1, 100-6.
- Martínez M, Hernández AI, Martínez N, Ferrándiz ML, 1996. Age-related increase in oxidized proteins in mouse synaptic mitochondria. *Brain Research*, 731, 1-2, 246-8.
- Matsumura H, Shimizu Y, Ohsawa Y, Kawahara A, Uchiyama Y, Nagata S, 2000. Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *The Journal of Cell Biology*, 151, 6, 1247-56.
- Maxwell SR, 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49, 3, 345-61.
- McDorman KS, Pachkowski BF, Nakamura J, Wolf DC, Swenberg JA, 2005. Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in Long-Evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chemico-Biological Interactions*, 152, 2-3, 107-17.
- Mercan U, 2004. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15, 1, 91-6.
- Mercantepe T, Topcu A, Rakici S, Tumkaya L, Yilmaz A, Mercantepe F, 2019. The radioprotective effect of N-acetylcysteine against x-radiation-induced renal injury in rats. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26, 28, 29085-94.
- Mishra R, Sharma S, Sharma RS, Singh S, Sardesai MM, Sharma S, Mishra V, 2018. *Viscum articulatum* Burm. f. aqueous extract exerts antiproliferative effect and induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells. *J Ethnopharmacol*, 219, 91-102.

- Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ, 1999. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology*, 117, 3, 669-77.
- Mohammad ES, Mahdi P, Ali-Akbar M, Mostafa L, Seyyed MM, Mitra M, 2011. Antihyperglycemic and antioxidant activity of *Viscum album* extract. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5, 3, 433-6.
- Möckel B, Schwarz T, Zinke H, Eck J, Langer M, Lentzen H, 1997. Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. *Arzneimittel-forschung*, 47, 10, 1145-51.
- Murthuza S, Manjunatha B, Checker R, Sharma D, Santosh Kumar S, 2016. Radioprotective and antiproliferative activity of *Viscum album* in lymphocytes exposed to gamma radiation. *Journal of Radiation and Cancer Research*, 7, 1, 17-8.
- Nagiev E, 1995. Effect of ionizing radiation and physical loads on pyrimidine-5'-nucleotidase activity in rat liver subcellular fractions. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* (1978), 67, 6, 79-83.
- Narimanov A, Popova O, Murav'eva D, 1992. Changes in the sensitivity of mice to the action of gamma irradiation by *Viscum album* L. polysaccharides. *Radiobiologia*, 32, 6, 868-72.
- Neal R, Matthews RH, Lutz P, Ercal N, 2003. Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 6, 689-95.
- Neal R, Matthews RH, Lutz P, Ercal N, 2003. Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. *Free Radic Biol Med*, 34, 6, 689-95.
- Ofem O, Eno A, Imoru J, Nkanu E, Unoh F, Ibu J, 2007. Effect of crude aqueous leaf extract of *Viscum album* (mistletoe) in hypertensive rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 39, 1, 15.
- Ogbonnanya A, Mounmbegna E, Monago C, 2010. Effect of ethanolic extract of mistletoe (*Viscum album* L.) leaves on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Pharmacy Research*, 3, 8, 1888-91.
- Ohiri F, Esimone C, Nwafor S, Okoli C, Ndu O, 2003. Hypoglycemic properties of *Viscum album* (mistletoe) in alloxan-induced diabetic animals. *Pharmaceutical Biology*, 41, 3, 184-7.
- Onat T, Emerk K, Sözmen EY, 2006. İnsan biyokimyası. *Palme Yayıncılık*, 666.
- Orhan DD, Aslan M, Sendogdu N, Ergun F, Yesilada E, 2005. Evaluation of the hypoglycemic effect and antioxidant activity of three *Viscum album* subspecies (European mistletoe) in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 98, 1-2, 95-102.
- Orhan DD, Küpeli E, Yesilada E, Ergun F, 2006. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from *Viscum album* ssp. *album*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61, 1-2, 26-30.
- Önay Uçar E, Erol Ö, Kandemir B, Mertoğlu E, Karagöz A, Arda N, 2012. *Viscum album* L. extracts protects HeLa cells against nuclear and mitochondrial DNA damage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- ÖnayUçar E, Karagöz A, Arda N, 2006. Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*, 77, 7-8, 556-60.
- Önür ND, Beyler AR, 2001. Safra asitleri metabolizması. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 54, 1, 65-76.
- Pan CC, Kavanagh BD, Dawson LA, Li XA, Das SK, Miften M, Ten Haken RK, 2010. Radiation-associated liver injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 76, 3 Suppl, S94-100.
- Park JH, Hyun CK, Shin HK, 1999. Cytotoxic effects of the components in heat-treated mistletoe (*Viscum album*). *Cancer Lett*, 139, 2, 207-13.
- Park Y-K, Do YR, Jang B-C, 2012. Apoptosis of K562 leukemia cells by *Abnobaviscum* F®, a European mistletoe extract. *Oncology Reports*, 28, 6, 2227-32.
- Patrick-Iwuanyanwu KC, Onyeike EN, Wegwu MO, 2010. Hepatoprotective effects of methanolic extract and fractions of African mistletoe *Tapinanthus bangwensis* (Engl. & K. Krause) from Nigeria. *Excli Journal*, 9, 187.
- Patt H, Tyree E, Straube R, Smith D, 1949. Cysteine protection against X irradiation. *Science*, 110, 2852, 213-4.
- Prasad K, 2005. Rationale for using multiple antioxidants in protecting humans against low doses of ionizing radiation. *The British Journal of Radiology*, 78, 930, 485-92.
- Prasad K, Cole W, Kumar B, Prasad KC, 2002. Pros and cons of antioxidant use during radiation therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 28, 2, 79-91.
- Prasad KN, 2004. Rationale for using high-dose multiple dietary antioxidants as an adjunct to radiation therapy and chemotherapy. *The Journal of Nutrition*, 134, 11, 3182S-3S.
- Prasad KN, 2020. *Handbook of radiobiology*, CRC press.
- Prescott L, 2005. Oral or intravenous N-acetylcysteine for acetaminophen poisoning? *Annals of Emergency Medicine*, 45, 4, 409-13.

- Radenkovic M, Ivetic V, Popovic M, Brankovic S, Gvozdenovic L, 2009. Effects of mistletoe (*Viscum album* L., Loranthaceae) extracts on arterial blood pressure in rats treated with atropine sulfate and hexocycline. *Clinical and Experimental Hypertension*, 31, 1, 11-9.
- Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK, 2005. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 4, 3, 138-44.
- Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdul CM, 2014. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid Redox Signal*, 21, 2, 260-92.
- Renehan AG, Booth C, Potten CS, 2001. What is apoptosis, and why is it important? Education and debate. *Bmj*, 322, 7301, 1536-8.
- Ribereau-Gayon G, Dumont S, Muller C, Jung M-L, Poindron P, Anton R, 1996. Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Letters*, 109, 1-2, 33-8.
- Ross MH, Pawlina W, 2007. *Histologia: Texto y Atlas*, Ed. Médica Panamericana.
- Ross MH, Pawlina W, (2011). *Histology A Text and Atlas 6th edition*, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business: 93-7.
- Saha C, Hegde P, Friboulet A, Bayry J, Kaveri SV, 2015. *Viscum album*-mediated COX-2 inhibition implicates destabilization of COX-2 mRNA. *PLoS One*, 10, 2, e0114965.
- Sakallı Çetin E, Özcelik N, 2007. Apoptotic mechanism of mistletoe (*viscum album*) extract used in the treatment of cancer: review. *J Med Sci*, 27, 533-9.
- Schaller G, Urech K, Giannattasio M, 1996. Cytotoxicity of different viscotoxins and extracts from the European subspecies of *Viscum album* L. *Phytotherapy Research*, 10, 6, 473-7.
- Scott MD, Lubin BH, Zuo L, Kuypers FA, 1991. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 118, 1, 7-16.
- Sengul M, Yildiz H, Gungor N, Cetin B, Eser Z, Ercisli S, 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22, 1.
- Sert C, Çelik MS, 1996. Radyasyondan koruyucu ajanlar. *Türkiye Klinikler J Med Sci*, 16, 292-8.
- Shadad AK, Sullivan FJ, Martin JD, Egan LJ, 2013. Gastrointestinal radiation injury: prevention and treatment. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19, 2, 199.
- Shi ZM, Feng P, Jiang DQ, Wang XJ, 2006. Mistletoe alkali inhibits peroxidation in rat liver and kidney. *World J Gastroenterol*, 12, 25, 4052-5.
- Shirazi A, Ghobadi G, Ghazi-Khansari M, 2007. A radiobiological review on melatonin: a novel radioprotector. *Journal of Radiation Research*, 48, 4, 263-72.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A, 2012. Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62, 1, 10-29.
- Skandalakis J, Skandalakis P, Skandalakis L, 2000. *Cerrahi Anatomi ve Teknik 2. baskı*. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 123-228.
- Smith DH, DeCosse JJ, 1986. Radiation damage to the small intestine. *World Journal of Surgery*, 10, 2, 189-94.
- Sochman J, 2002. N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: what do we know and what would we like to know?! *Journal of the American College of Cardiology*, 39, 9, 1422-8.
- Sooryanarayana J-PDVH, Delignat S, Bloch M-F, Kazatchkine MD, Kaveri SV, 2001. Variable sensitivity of lymphoblastoid cells to apoptosis induced by *Viscum album* Qu FrF, a therapeutic preparation of mistletoe lectin. *Chemotherapy*, 47, 5, 366-76.
- Spapen H, 2004. N-acetylcysteine in clinical sepsis: a difficult marriage. *Critical Care (London, England)*, 8, 4, 229-30.
- Spapen H, Zhang H, Demanet C, Vleminckx W, Vincent J-L, Huyghens L, 1998. Does N-acetyl-L-cysteine influence cytokine response during early human septic shock? *Chest*, 113, 6, 1616-24.
- Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, de Jong S, 2004. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52, 6, 821-31.
- Sridharan S, Shyamaladevi CS, 2002. Protective effect of N-acetylcysteine against gamma ray induced damages in rats--biochemical evaluations. *Indian J Exp Biol*, 40, 2, 181-6.
- Stein G, Pfüller U, Schietzel M, 1999. Viscotoxin-free aqueous extracts from European mistletoe (*Viscum album* L.) stimulate activity of human granulocytes. *Anticancer Research*, 19, 4B, 2925-8.

- Strüh CM, Jäger S, Schempp CM, Scheffler A, Martin SF, 2012. A novel triterpene extract from mistletoe induces rapid apoptosis in murine B16.F10 melanoma cells. *Phytother Res*, 26, 10, 1507-12.
- Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Seminars In Liver Disease*, 339-50.
- Szurpnicka A, Kowalczyk A, Szterk A, 2020. Biological activity of mistletoe: in vitro and in vivo studies and mechanisms of action. *Archives of Pharmacal Research*, 43, 6, 593-629.
- Thariat J, Hannoun-Levi J-M, Sun Myint A, Vuong T, Gérard J-P, 2013. Past, present, and future of radiotherapy for the benefit of patients. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 1, 52-60.
- Thies A, Dautel P, Meyer A, Pfüller U, Schumacher U, 2008. Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model. *British Journal of Cancer*, 98, 1, 106-12.
- Tröger W, Galun D, Reif M, Schumann A, Stanković N, Milićević M, 2013. *Viscum album* [L.] extract therapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a randomised clinical trial on overall survival. *European Journal of Cancer*, 49, 18, 3788-97.
- Tusenius K, Spoek J, Kramers C, 2001. Iscador Qu for chronic hepatitis C: an exploratory study. *Complementary Therapies in Medicine*, 9, 1, 12-6.
- Tusenius KJ, Spoek AM, van Hattum J, 2005. Exploratory study on the effects of treatment with two mistletoe preparations on chronic hepatitis C. *Arzneimittelforschung*, 55, 12, 749-53.
- Udo NV, Effiong OO, Oka VO, Aluko EO, Ofutet EO, 2014. Comparative effects of Aloe vera gel and aqueous leaf extract of *Viscum album* on bilirubin excretion in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 4, 1, 99.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 1, 44-84.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 1, 44-84.
- Van Huyen J-PD, Delignat S, Bayry J, Kazatchkine MD, Bruneval P, Nicoletti A, Kaveri SV, 2006. Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Letters*, 243, 1, 32-7.
- Varanda EA, Tavares D, 1998. Radioprotection: mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 4, 5-21.
- Vousden KH, Lu X, 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2, 8, 594-604.
- Wanamarta AH, van Rijn J, Blank LE, Haveman J, van Zandwijk N, Joenje H, 1989. Effect of N-acetylcysteine on the antiproliferative action of X-rays or bleomycin in cultured human lung tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 115, 4, 340-4.
- Ward JF, 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 35, 95-125.
- Weiss JF, 1997. Pharmacologic approaches to protection against radiation-induced lethality and other damage. *Environmental Health Perspectives*, 105 Suppl 6, Suppl 6, 1473-8.
- Wendel A, 1981. [44] Glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology*. Eds: Elsevier, p. 325-33.
- Wenzel L, Vergote I, Cella D, 2003. Quality of life in patients receiving treatment for gynecologic malignancies: special considerations for patient care. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 83, 211-29.
- Werthmann PG, Sträter G, Friesland H, Kienle GS, 2013. Durable response of cutaneous squamous cell carcinoma following high-dose peri-lesional injections of *Viscum album* extracts—A case report. *Phytomedicine*, 20, 3-4, 324-7.
- Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE, 2006. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 44, 1, 27-33.
- Xiao X, Hu M, Zhang X, Hu JZ, 2017. NMR-based metabolomics analysis of liver from C57BL/6 mouse exposed to ionizing radiation. *Radiation Research*, 188, 1, 44-55.
- Yagmur E, Trautwein C, Leers M, Gressner A, Tacke F, 2007. Elevated apoptosis-associated cytokeratin 18 fragments (CK18Asp386) in serum of patients with chronic liver diseases indicate hepatic and biliary inflammation. *Clinical Biochemistry*, 40, 9-10, 651-5.

- Yamazaki H, Inoue T, Koizumi M, Tanaka E, Yoshioka Y, Nakamura H, Shuo X, Inoue T, 2005. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion as a biomarker for estimating DNA oxidation in patients undergoing external radiotherapy and/or brachytherapy. *Oncology Reports*, 13, 5, 847-51.
- Yesilada E, Deliorman D, Ergun F, Takaishi Y, Ono Y, 1998. Effects of the Turkish subspecies of *Viscum album* on macrophage-derived cytokines. *Journal of Ethnopharmacology*, 61, 3, 195-200.
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Shimazaki K, Song SK, Lee KH, Kim SH, Park CH, Azuma I, Kim JB, 1999. Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Lett*, 136, 1, 33-40.
- Yusuf L, Oladunmoye M, Ogundare A, 2015. Hepatoprotective effect of methanolic leave extracts of *V. album* on paracetamol-induced laboratory animals. *Int J Pharmacol Phytochem Ethnomedicine*, 1, 46-54.
- Zarkovic N, Zarkovic K, Grainca S, Kissel D, Jurin M, 1997. The *Viscum album* preparation Isorel inhibits the growth of melanoma B16F10 by influencing the tumour-host relationship. *Anti-Cancer Drugs*, 8, S17-22.
- Zuzak TJ, Rist L, Eggenschwiler J, Grotzer MA, Viviani A, 2006. Paediatric medulloblastoma cells are susceptible to *Viscum album* (Mistletoe) preparations. *Anticancer Res*, 26, 5a, 3485-92.



7. EKLER

EK-A: Etik Kurul Kararı

ÖKSE OTU (VISCUM ALBUM L.)
EKSTRAKTININ KARACİĞER
DOKUSUNDA İYONİZE
RADYASYON MARUZİYETİNDE
RADYOPROTEKTİF ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Yazar Hakan Vatansev

Gönderim Tarihi: 02-Ara-2022 03:26PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 1969173303

Dosya adı: Hakan_VATANSEV-Doktora_Tezi-02.12.2022.docx (18.95M)

Kelime sayısı: 22425

Karakter sayısı: 154453

ÖKSE OTU (VİSCUM ALBUM L.) EKSTRAKTININ KARACİĞER DOKUSUNDA İYONİZE RADYASYON MARUZİYETİNDE RADYOPROTEKTİF ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 7	% 6	% 1	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	www.yumpu.com İnternet Kaynağı	<% 1
3	doczz.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
5	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	pubs.rsc.org İnternet Kaynağı	<% 1
7	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1

8. ÖZGEÇMİŞ