

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN PANKREAS HASARINA
KARŞI EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT'IN BAZI GEN
EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Başak ARSLAN MENEKŞE

Yüksek Lisans Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Zooloji

OCAK 2023

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN PANKREAS HASARINA KARŞI
EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT'IN BAZI GEN EKSPRESYONLARI
ÜZERİNE ETKİLERİ

Tez Yazarı
Başak ARSLAN MENEKŞE

Danışman
Prof. Dr. Orhan ERMAN

OCAK 2023
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Başlığı: Sisplatin İle Oluşturulan Pankreas Hasarına Karşı Epigallokateşin-3-Gallat'ın Bazı Gen Ekspresyonları Üzerine Etkileri
Yazarı: Başak ARSLAN MENEKŞE
İlk Teslim Tarihi: 30.12.2022
Savunma Tarihi: 30.01.2023

TEZ ONAYI

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu tez aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından değerlendirilmiş ve akademik dinleyicilere açık yapılan savunma sonucunda OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

İmza

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERMAN
Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi
Onayladım

Başkan: Prof. Dr. Abdullah ASLAN
Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi
Onayladım

Üye: Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR
Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi
Onayladım

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

İmza

Prof. Dr. Burhan ERGEN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım “Sisplatin İle Oluşturulan Pankreas Hasarına Karşı Epigallokateşin-3-Gallat’ın Bazı Gen Ekspresyonları Üzerine Etkileri ” Başlıklı Yüksek Lisans Tezimin içindeki bütün bilgilerin doğru olduğunu, bilgilerin üretilmesi ve sunulmasında bilimsel etik kurallarına uygun davrandığımı, kullandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi, maddi ve manevi desteği olan tüm kurum/kuruluş ve kişileri belirttiğimi, burada sunduğum veri ve bilgileri unvan almak amacıyla daha önce hiçbir şekilde kullanmadığımı beyan ederim.

30.01.2023

Başak ARSLAN MENEKŞE



ÖNSÖZ

Bu çalışmada sisplatin ile pankreas doku hasarı oluşturulmuş sıçanlarda epigallokateşin-3 gallat'ın (EGCG) olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sisplatinin birçok organda olduğu gibi pankreas dokusunda da hasar oluşturduğu bildirilmektedir. Bu yüksek lisans tez çalışmasında, sıçanlara sisplatin verilerek pankreas doku hasarı oluşturulmuş, antienflamatuar ve antioksidatif özelliklere sahip olan EGCG'nin bu dokuda, kaspaz-3, TNF- α , IL-1 α , IL-6, HO-1 ve p53 proteinlerinin ifadesi ile DNA hasarına karşı etkisi, glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) ve katalaz (CAT) aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca pankreas dokusundan alınan örnekler histopatolojik olarak incelenmiştir.

'Sisplatin İle Oluşturulan Pankreas Hasarına Karşı Epigallokateşin-3-Gallat'ın Bazı Gen Ekspresyonları Üzerine Etkileri' başlıklı tez konumun belirlenmesi ve hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen, bana her konuda destek olan, yönlendiren ve tecrübelerini aktaran değerli hocam Sayın Prof. Dr. Orhan ERMAN'a ve Prof. Dr. Abdullah ASLAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın histopatolojik analizlerinin incelenmesi ve değerlendirilmesine sağlamış olduğu katkılarından dolayı Tıp Fakültesi Patoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bana desteğini ve yardımını esirgemeyen kıymetli hocalarım Dr. Seda BEYAZ ve Arş. Gör. Özlem GÖK'e teşekkür ederim.

Bu çalışmaya maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi (FÜBAP)'ne ve çalışmamızın deney hayvanları aşamasını yürüttüğümüz Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM)'nin değerli çalışanlarına ve bu süreç boyunca yardımlarını esirgemeyen Lütfi DEMİREL'e çok teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca bana her zaman ve her konuda destek olan canım aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi, sevgimi sunarım.

Bu tez çalışması, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP) tarafından **FF.21.03** protokol numaralı proje ile desteklenmiştir. Çalışmalar Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulunun 10/11/2020 tarih ve 423050 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

Başak ARSLAN MENEKŞE

ELAZIĞ, 2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	xi
EKLER LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Pankreasın Anatomik, Histolojik ve Fizyolojik Özellikleri	2
1.2. Epigallokateşin-3-gallat (EGCG) ve Antioksidan Özellikleri	5
1.3. Sisplatin (Cis)'in Yapısı ve Fonksiyonel Özellikleri.....	7
1.4. Apoptozis	9
1.5. Apoptoptik Markerlar.....	11
1.5.1. Kaspaz-3	11
1.5.2. İnterlökin-1 α (IL-1 α).....	13
1.5.3. Hem Oksijenaz -1 (HO-1).....	14
1.5.4. İnterlökin-6 (IL-6).....	16
1.5.5. p53	17
1.6. Glutatyon (GSH)	18
1.7. Katalaz (CAT).....	18
1.8. Malondialdehit (MDA)	18
2. MATERYAL VE METOT	20
2.1. Materyal	20
2.1.1. Kimyasal Maddeler	20
2.2. Metod	20
2.2.1. Deney Hayvanları ve Çalışma Grupları	20
2.2.2. Sisplatin (Cis) Hazırlanması ve Uygulanması	21
2.2.3. Epigallokateşin Gallat (EGCG) Hazırlanması ve Uygulanması	21
2.2.4. Western Blotlama Çalışması için Doku Homojenizasyonu	21
2.2.5. Western Blotlama Tekniği ile Kaspaz-3, IL-1 α , HO-1, IL-6, p53, Proteinlerinin Analizi.....	21
2.2.6. GSH Ölçümü.....	22
2.2.7. Katalaz (CAT) Aktivitesi Analiz Yöntemi.....	22
2.2.8. MDA Ölçümü Standart Eğri Çizimi	22
2.2.9. Pankreas Dokusu MDA Ölçümleri	22
2.2.10. Histopatolojik Analiz	24

2.2.11. İstatistiksel Analizler	25
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
3.1. GSH Ölçüm Sonuçları.....	26
3.2. Katalaz Ölçüm Sonuçları.....	27
3.3. MDA Ölçüm Sonuçları	29
3.4. Apoptotik Markerlar: Kaspaz-3, IL-1 α , HO-1, IL-6 ve p53 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri ...	31
3.4.1. Kaspaz-3 Ekspresyon Düzeyleri	31
3.4.2. IL-1 α Ekspresyon Düzeyleri	32
3.4.4. IL-6 Ekspresyon Düzeyleri	34
3.4.5. p53 Ekspresyon Düzeyleri	35
3.5. Histopatolojik Bulgular	36
4. SONUÇLAR.....	46
ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR.....	49
EKLER	57
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Sisplatin İle Oluşturulan Pankreas Hasarına Karşı Epigallokateşin-3-Gallat'ın Bazı Gen Ekspresyonları Üzerine Etkileri

Başak ARSLAN MENEKŞE

Yüksek Lisans Tezi

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2023, Sayfa: xiv+58

Bazı kanser türlerinde kemoterapi ilacı olarak kullanılan sisplatin, belirli limitlerden sonra hücrelerde DNA hasarı ve bazı organ hasarları meydana getirebilmektedir. Sisplatin ile yapılan hasar çalışmaları daha çok karaciğer, akciğer gibi organlar ve bazı kanser türleri üzerinedir. Pankreas dokusu üzerine yapılan hasar çalışmaları ise nispeten daha az olup özellikle insulin ile ilgilidir. Bu çalışmada sisplatinin pankreas dokusu üzerinde meydana getirdiği genel hasara karşı antioksidan ve antitümör özelliklere sahip EGCG'nin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, 28 adet erkek sıçan kullanılmış, 4 gruba ayrılmış ve 4 hafta devam etmiştir. Sisplatin ve EGCG intraperitoneal olarak verilmiştir. Malondialdehit, katalaz ve glutatyon seviyeleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kaspaz-3, IL-1 α , IL-6, p53, HO-1 protein ekspresyonları Western Blotlama yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca pankreas dokusunun histopatolojik incelemesi yapılmış ve bulgular istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bulgularımızda, EGCG'nin uygulandığı sıçan gruplarında, pankreas dokusunda malondialdehit seviyesinde azalış, katalaz aktivitesinde ve glutatyonun seviyesinde ise artış gözlenmiştir. EGCG ile tedavi edilen grupta (EGCG+Cis) enflamasyon göstergesi olan IL-1 α , IL-6 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin, sisplatin grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Histopatolojik incelemede sisplatin uygulanan grupta pankreas hasarının belirgin olarak olduğu ve tedavi grubunda ise azaldığı gözlenmiştir. Bu verilere göre, sisplatin ile oluşturulan pankreotoksistide, EGCG ile yapılan tedavinin antienflamatuvar etki göstererek, toksisiteyi önleyebileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pankreas, Sisplatin, EGCG, Protein Ekspresyonu, Apoptotik Markerlar

ABSTRACT

Effects of Epigallocatechin-3-Gallate Against Pancreatic Damage Induced by Cisplatin on Some Gene Expressions.

Başak ARSLAN MENEKŞE

Master's Thesis

FIRAT UNIVERSITY
Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

January 2023, Pages: xiv+58

Cisplatin, which is used as a chemotherapy drug in some types of cancer, can cause DNA damage in cells and some organ damage after certain limits. Damage studies with cisplatin are mostly on organs such as liver and lung and some types of cancer. Damage studies on pancreatic tissue are relatively few, and they are especially related to insulin. In this study, the protective effects of EGCG, which has antioxidant and antitumor properties, were investigated against the general damage caused by cisplatin on the pancreatic tissue. In the study, 28 male rats were used, divided into 4 groups and continued for 4 weeks. Cisplatin and EGCG were given intraperitoneally. Malondialdehyde, catalase and glutathione levels were measured spectrophotometrically. Caspase-3, IL-1 α , IL-6, p53, HO-1 protein expressions were determined by Western Blotting method. In addition, histopathological examination of the pancreatic tissue was performed and the findings were evaluated statistically. In our findings, a decrease in malondialdehyde level and an increase in catalase activity and glutathione level were observed in pancreatic tissue in rat groups to which EGCG was administered. It was observed that the expression levels of IL-1 α , IL-6 proteins, which are markers of inflammation, were significantly decreased in the EGCG-treated group (EGCG+Cis) compared to the cisplatin group. In the histopathological examination, it was observed that pancreatic damage occurred significantly in the cisplatin-administered group and decreased in the treatment group. According to these data, it has been shown that treatment with EGCG can prevent toxicity in cisplatin-induced pancreotoxicity by showing an anti-inflammatory effect.

Keywords: Pancreas, Cisplatin, EGCG, Protein Expression, Apoptotic Markers

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Pankreasın anatomik yapısı.....	2
Şekil 1.2. Ekzokrin pankreas yapısı	3
Şekil 1.3. Pankreasta kanallar	4
Şekil 1.4. Langerhans adacıklarının mikroskop görüntüsü	4
Şekil 1.5. Langerhans adacıklarındaki bazı önemli hücreler.....	5
Şekil 1.6. EGCG'nin moleküler yapısı.....	5
Şekil 1.7. EGCG'nin kimyasal yapısı	6
Şekil 1.8. Sisplatinin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 1.9. Sisplatin DNA sarmalında pürin bazlarının N-7 pozisyonuna kovalent bağ oluşturması	8
Şekil 1.10. Apoptoz mekanizması.....	9
Şekil 1.11. Kaspaz-3 proteinin yapısı.....	11
Şekil 1.12. Kaspazların aktif olduğu apoptoz yolları	12
Şekil 1.13. Apoptik uyarıcı sitokrom-c'nin Apaf-1'e bağlanmasıyla oluşan apoptozom proteini	13
Şekil 1.14. IL-1 α proteinin yapısı	14
Şekil 1.15. HO-1 proteinin yapısı	15
Şekil 1.16. Hem molekülünden bilirubin oluşumu.....	15
Şekil 1.17. IL-6 proteinin yapısı	17
Şekil 1.18. p53 proteininin fonksiyonel alanlarının şematik yapısı	17
Şekil 2.1. Çalışma gruplarına intraperitoneal (ip) enjeksiyon uygulama	21
Şekil 3.1. Gruplarda pankreas dokusu GSH aktivitesi sütun grafiği	26
Şekil 3.2. BSA (Bowin Serum Albumin) Standart Grafiği	27
Şekil 3.3. Gruplarda pankreas dokusu CAT aktivite seviyesi sütun grafiği	28
Şekil 3.4. BSA standart grafiği	28
Şekil 3.5. Gruplarda pankreas dokusu malondialdehit (MDA) aktivitesi sütun grafiği	30
Şekil 3.6. Pankreas doku MDA standart grafiği.....	30
Şekil 3.7. Gruplarda kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri sütun grafiği	31
Şekil 3.8. Gruplarda IL-1 α protein ekspresyon düzeyleri sütun grafiği	32
Şekil 3.9. Gruplarda HO-1protein ekspresyon düzeyleri sütun grafiği	33
Şekil 3.10. Gruplarda IL-6 protein ekspresyon düzeyleri sütun grafiği	34
Şekil 3.11. Gruplarda p53 protein ekspresyon düzeyleri sütun grafiği	35
Şekil 3.12. Kontrol grubu pankreas dokusu histolojisi ve Langerhans adacığı (HEx400)	38

Şekil 3.13. EGCG grubu pankreas dokusu histolojisi ve Langerhans adacığı (HEx400)	38
Şekil 3.14. Cis grubu pankreas dokusu histolojisi, Langerhans adacığı, inflamatuvar hücre grubu (daire) ve konjesyon (ok) (HEx400)	39
Şekil 3.15. EGCG+Cis grubu pankreas dokusu histolojisi, Langerhans adacığı ve inflamatuvar hücre (daire) (HEx400)	39



TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Araştırma Grupları (n=7).....	20
Tablo 3.1. Pankreas dokusu GSH seviyesi.....	26
Tablo 3.2. Pankreas dokusu CAT aktivite seviyesi.....	27
Tablo 3.3. Pankreas dokusu MDA seviyesi	29
Tablo 3.4. Deney gruplarında morfolojik değişiklikler.....	37



EKLER LİSTESİ

Sayfa

Ek-1. Etik Kurulu Kararı.....	57
--------------------------------------	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
cm	: Santimetre
CO	: Karbon Monoksit
dk	: Dakika
Fe	: Demir
gr	: Gram
gr/l	: Gram/Litre
gr/ml	: Gram/Mililitre
kDa	: Kilodalton
M	: Mol
mA	: Megaamper
mg / kg	: Miligram/Kilogram
mg/ml	: Miligram/Mililitre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
n/mol	: Newton/Mol
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat
rpm	: Revolutions Per Minute

Kısaltmalar

ACE2	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim-2
Akt	: Protein Kinaz B
AP-1	: Aktivatör Protein-1
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör
Bax	: Bcl-2-Associated X Protein
Bcl-2	: B-hücreli Lenfoma- 2
CA	: Canlı Ağırlığı
CAD	: Kaspaz Aktive Edici DNaz
CAF	: Kansere İlişkili Fibroblast
CAT	: Katalaz
Cis	: Sisplatin
DAMP	: Damage-Associated Molecular Patterns
DISC	: Death İnducing Signal Complex
DM	: Diabetes Mellitus
EA	: Ellagik Asit
EC	: Epikateşin
ECG	: Epikateşin-3-Gallat
EGC	: Epigallokateşin
EGCG	: Epigallokateşin-3-Gallat
ER	: Endoplazmik Retikulum

ERK	: Extracellular Signal Regulated Kinase
FADD	: Fas-Associating Protein with Dead Domain
Fas-L	: Fas Ligandı
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneş Hayvanları Araştırma Merkezi
GCL	: Glutamat Sistein Ligaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
HO-1	: Hem Oksijenaz -1
ICAD	: Inhibitor of the Caspase Activated DNase
IL-1 α	: İnterlökin-1alpha
IL-6	: İnterlökin-6
IL-6R	: IL-6 Reseptörü
İP	: İnterperitoneal
JAK	: Janus kinaz
JNK	: Jun-N-terminal kinaz
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase
mbIL-6R	: Membrane-Bound IL-6 Receptor
MDA	: Malondialdehit
miRNA	: Mikro Ribonükleik asid
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF- κ B	: Nükleer Faktör-Kappa B
NK	: Natural Killers
Nrf2	: NF-E2 Related Factor 2
OP	: Oleuropein
p53	: Protein 53
PAMP	: Pathogen Associated Molecular Pattern
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDAC	: Pankreas Duktal Adenokarsinom
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
Pro-IL-1 α	: Pro-İnterleukin-1-Alpha
PSC	: Pancreatic Stellate Cells
RJ	: Royal Jelly
ROS	: Reactive Oxygen Species
SOD	: Süperoksitdismutaz
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör-Alpha
TP53	: Tümör Proteini 53
TRADD	: TNFR-1 Associated Death Domain
TRAIL	: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

1. GİRİŞ

Pankreas, karın boşluğunun orta arkada sağda kaburgaya kadar uzanan bir organdır. Fonksiyonel olarak ekzokrin ve endokrin pankreas bölümlerinden oluşmaktadır. Ekzokrin pankreas sindirim enzimlerini salgılayan asiner hücreleri ve bu salgıların bağırsağa gittiği bir kanal içermektedir. Endokrin pankreas ise pankreasın küçük bir miktarını oluşturan Langerhans adacıklarını içererek önemli hormonları salgılamaktadır [1].

Sisplatinin, farklı birçok kanser tedavisinde kullanılan güçlü bir kemoterapötik ilaç olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [2]. Pankreas kanseri de organ kanserleri içerisinde görülme sıklığı bakımından 11. sırada yer almaktadır [3]. Birçok tümör tedavisinde olduğu gibi, bu kanserin tedavisinde kullanılan sisplatin, belirli limitlerin üzerinde verildiği zaman apoptik yolu aktive ederek, oksidatif stres ve enflamasyon yoluyla hücrel hasara neden olmaktadır [1]. Kemoterapide kullanılan bu ilaç güçlü bir hücrel toksindir. Ancak önemli yan etkilerle, organ toksisitesine neden olabilmektedir. Bu da birçok klinik tedavide sık kullanılmasına rağmen, kazanılmış direnç ve diğer dokulardaki ciddi toksik yan etkisi sebebiyle kullanımı büyük ölçüde sınırlandırılmıştır [4]. Sisplatinin, oto-, nöro-, nefro-, gastrointestinal, hematolojik, kardiy-, hepato- ve gonadotoksitesinin yanı sıra pankreatotoksitesiteye de neden olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir [5]. Sisplatinin serbest oksijen radikallerinin artışına bağlı olarak oksidatif stresi etkilediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [6,7] Reaktif oksijen türleri (ROS), dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran kararsız atomlardır ve etrafındaki moleküller ile etkileşime girerek, kararlı hale ulaşmak isteyebilirler [8]. Hücrelere bağlanarak belli bir düzeyde olması gereken hücre zarı akışkanlığını arttırdığı belirtilmiştir [9]. ROS üretiminin artması oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stresin artması kanser, diyabet gibi hastalıkların etiyolojisinde rolünün olduğu belirtilmiştir [8]. Ayrıca yapılan araştırmalarda aşırı ROS üretiminin, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) düzeyinde artışa neden olduğu gözlenmiştir [9].

Son yıllarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* araştırmalarda tedavi yöntemlerinde kullanılan kimyasalların yan etkileri, güvenilirliğinin az olması antioksidan özelliğindeki bazı bitkilerin hastalığın seyrini değiştirmesi açısından önemli olduğu ortaya konulmakta ve tedavilerde kullanılmaya başlandığı görülmektedir. Bu önemli fitokimyasal bitkilerden biri de yüksek miktarda epigallokateşin-3-gallat (EGCG) flavonoidi içeren yeşil çaydır. EGCG polifenolik kateşini, toplam polifenol içeriğinin yarısından fazlasını, yaklaşık %50-80'ini oluşturmaktadır [10, 11]. Güçlü bir antioksidan olan EGCG, antienflamatuvar özelliğiyle insülin üreten β hücrelerini korumaktadır. Antidiyabetik özelliğiyle ise insülin salgısını artırıp, apoptozu azaltarak pankreas β hücrelerinin çoğalmasını teşvik etmektedir. Diyabet durumunda insülin direncini ve oksidatif stresi de azaltmaktadır [11]. Ayrıca sinyal yollarını aktive ederek pankreas kanserine karşı kanserli hücre işlevini düzenleme ve hücre canlılığını engellemeye yönelik yüksek performansı

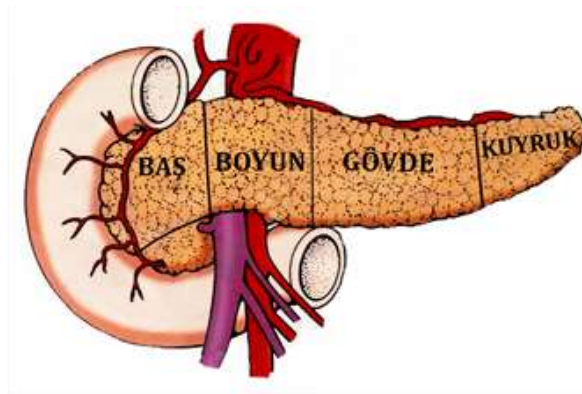
bulunmaktadır [10]. EGCG, adenokarsinom hücrelerini inhibe ederek migrasyon ve invazyonunun inhibisyonunda rol almaktadır. Bunu pankreatik kanser hücrelerinin G1 aşamasında büyümenin durmasına neden olarak ve ROS oluşumu yoluyla apoptozu indükleyerek gerçekleştirmektedir. Bu özellikleriyle EGCG'nin birçok toksik etkiyi elimine ettiği görülmüştür [12].

Sisplatin ile yapılan hasar çalışmalarının daha çok karaciğer, akciğer gibi organlar ve bazı kanser türleri üzerine yoğunlaştığı görülmüştür. Pankreas üzerine yapılan çalışmaların nispeten daha az ve özellikle insulin ile ilgili olduğu anlaşılmaktadır.

Bu nedenle bu yüksek lisans tezinde sıçanlar üzerinde sisplatin ile pankreas doku hasarı oluşturulmuş, oluşan hasara karşı antioksidan ve antitümör özelliklere sahip EGCG'nin koruyucu etkileri moleküler ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

1.1. Pankreasın Anatomik, Histolojik ve Fizyolojik Özellikleri

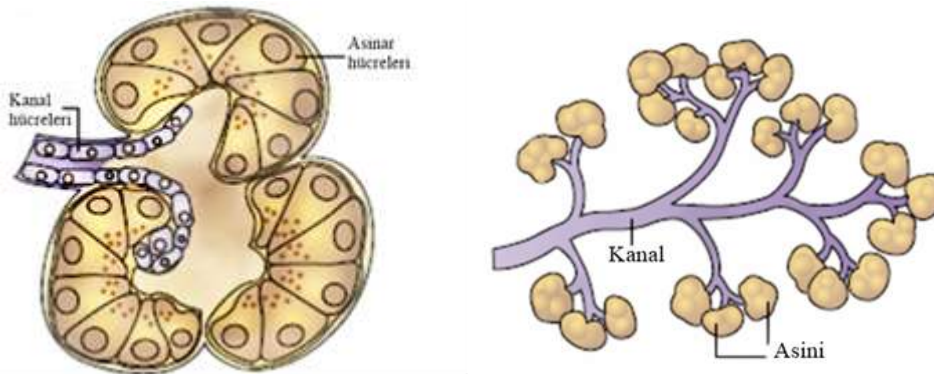
Pankreas, periton ile karın duvarı arasında yani omurganın bel bölümü önünde yer alan kompozit bir organdır. Yunanca'da pan (tüm, bütün) ve kreas (et) anlamına gelmektedir. Ortalama uzunluğu 15-20 cm, ağırlığı ise kadınlarda 55 gr, erkeklerde 70 gr kadardır. Anatomik olarak 4 kısımdan oluşmaktadır (Şekil 1.1) . Pankreasın ilk kısmı olan baş bölgesi düzdür ve on iki parmak bağırsağının ilk halkası içine yerleşmiştir. Boyun bölgesi baş ve gövdeyi birbirine bağlayan ince kısımdır. Gövde bölümü ise daha dardır ve son kısım olan kuyruk bölgesi dalağa yakındır. Ayrıca kuyruk bölgesi pankreas polipeptit hücrelerini bulunduran tek kısımdır. Pankreas histolojik olarak bakıldığında ekzokrin ve endokrin fonksiyon olarak 2 doku tipine sahiptir [13-15].



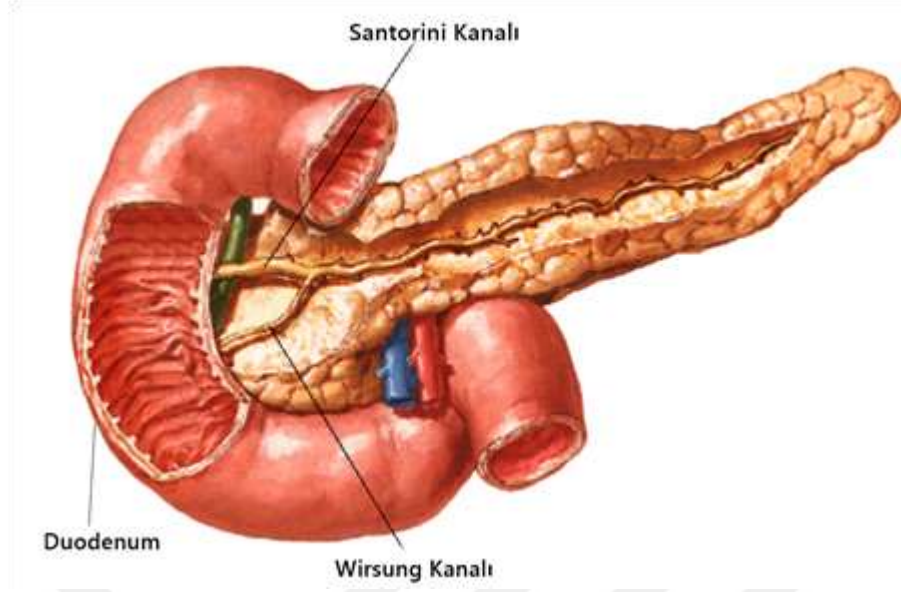
Şekil 1.1. Pankreasın anatomik yapısı [16]

1. **Ekzokrin Pankreas:** Pankreas kütlelerinin %80'ini oluşturan ekzokrin pankreas, asinus ve kanal hücrelerinden oluşur (Şekil 1.2). Bu hücreler protein sentezinin en çok yapıldığı ve

sindirim enzimlerinin sentezlendiği yerdir. Sindirim enzimleri, su ve sodyum bikarbonatı on iki parmak bağırsağa salgılamaktadır [17]. Pankreası oluşturan loblar, lobül adı verilen küçük loblardan oluşmaktadır. Bu lobüller en fazla 10 mm çapındadır. Her lobül, bir ana kanalı içine alan ve bezin salgı yapan bir parçasıdır. Her pankreatik lobül, asinus adı verilen yapılardan oluşur. Bir asinüs, kubbe benzeri bir yapı oluşturan piramidal asiner hücrelerin birleşimidir [18]. Asinuslar merkezi bir lümen etrafında tek sıra halinde dizilmiş poligonal epitel hücreler şeklindedir. Asinus çekirdekleri alt yüze yerleşik ve belirgin nükleollü yapılardır. Asiner hücreler, alt yüzü bazofilik, üst yüzü ise eozinofilik görünür. Bu durum, üst yüzeyde zimojen granüllerinin ve alt yüzde ise endoplazmik retikulumun (ER) fazla olmasından kaynaklanmaktadır [19]. Asinus hücreleri, asiner hücrelerinin üzüm salkımı şeklinde birleşmesiyle oluşarak bir sap ile kanala bağlıdır. Asiner hücreleri sindirim enzimlerini salgılar ve bu salgıları kanalcıklar vasıtasıyla ana kanala boşaltırlar [14]. Kanal sisteminin ilk kısmı interkalar ya da intralobüler kanal olarak adlandırılmaktadır. Bu kanal duvarları sentroasinar hücrelerden oluşan asinar lümenin içine uzanmaktadır. İnterlobüler kanallar goblet hücreleri içeren silindirik epitel ile kaplıdır. Salgılar, pankreasın çıkışı olan pankreatik kanallara dökülürler [20]. İkinci bir kanal ise, insanlarda tüm pankreas bezi boyunca uzanan Wirsung kanalıdır ve bu kanalla birleşir. Ana pankreatik kanal daha sonra ortak safra kanalının girişine bitişik duodenuma boşalır. Her iki kanalın en distal kısımları Vater ampullası olarak adlandırılır. Ampulla, Vater papillası yoluyla duodenuma açılır. Pankreasın distal kısmında ana kanaldan ayrılan ve Santorini denilen kanal duodenuma bağımsız olarak bağlanır [18] (Şekil 1.3). Pankreas bütün organik bileşiklerin sindirimde rol oynayan enzimleri salgılaması bakımından önemli bir ekzokrin fonksiyona sahiptir. Tripsin ve kimotripsin peptidleri parçalar, nükleazlar nükleik asitleri parçalar, amilaz karbonhidratları hidrolize ederek disakkaritleri oluşturur, lipazın ise yağların sindirimini sağladığı belirtilmiştir [21].

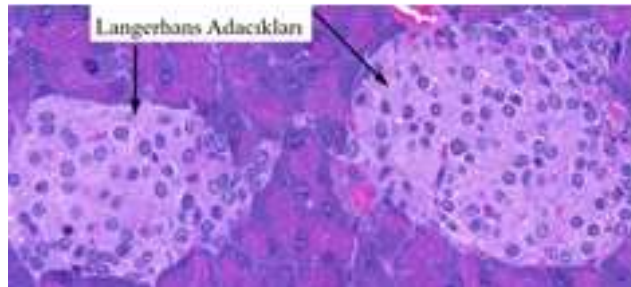


Şekil 1.2. Ekzokrin pankreas yapısı [22]

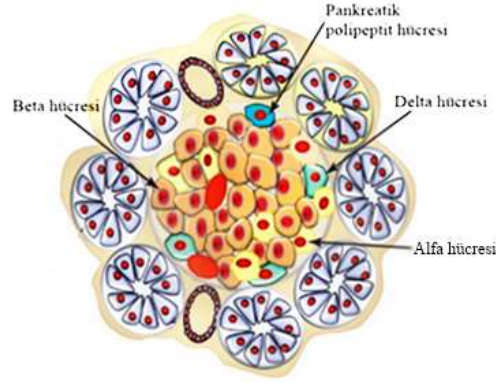


Şekil 1.3. Pankreasta kanallar [23]

- Endokrin Pankreas;** Pankreasın %20'sini oluşturan endokrin pankreas, ise polipeptit yapısındaki hormonların salgılandığı hücrelerin meydana getirdiği langerhans adacıklarından oluşmaktadır [14] (Şekil 1.4). Bu hücreler düzensiz dizilime ve oval şekle sahiptir. Bu adacıkların boyutu en fazla 700 µm çapında ve toplam kütlesi 0,5 ve 1,5 g arasında değişmektedir [18]. Langerhans adacıkları hem asidik, hem bazik boyalar ile boyanabilen bir sitoplazma içeriği ve yuvarlak şekilli çekirdeğe sahiptir [19]. Bu adacıkları oluşturan hücrelerden, Alfa hücreleri- glukagon, beta hücreleri-insülin, delta hücreleri-somatostatin, pankreatik polipeptit hücreleri-pankreatik polipeptit hormonlarını salgılamaktadır [21] (Şekil 1.5).



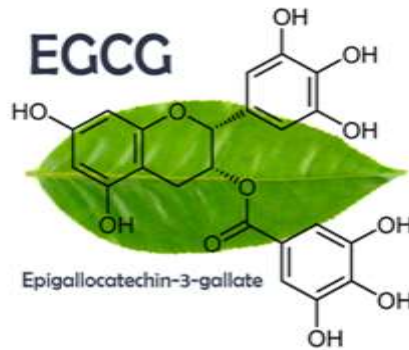
Şekil 1.4. Langerhans adacıklarının mikroskop görüntüsü [24]



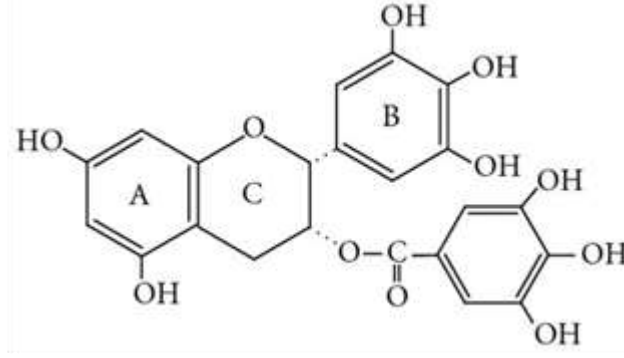
Şekil 1.5. Langerhans adacıklarındaki bazı önemli hücreler [25]

1.2. Epigallokateşin-3-gallat (EGCG) ve Antioksidan Özellikleri

Yeşil çay, *Camellia sinensis*'in fermente olmamış çay çeşididir [26]. Yeşil çay içeriğinde epigallokateşin-3 gallat (EGCG), epigallokateşin (EGC), epikateşin-3-gallat (ECG) ve epikateşin (EC) polifenollerini bulundurmaktadır [27] (Şekil 1.6). EGCG, yeşil çay yapraklarının total polifenolik miktarının en az yarısını oluşturarak en bol bulunan kateşindir [26]. Yeşil çay kateşinlerinin gallat yapısında 3. konumu esterleşmiş bir C halkası, katekol grubu olan B halkası ve 5. ve 7. konumunda hidroksil grubu olan bir A halkası bulunmaktadır [28]. Bu kateşinlerin, arasındaki işlevsel ve yapısal fark B halkasına bağlı hidroksil gruplarının sayısına ve galloil parçasının olup olmamasına bağlıdır [29]. EGCG, C halkası gallat grubunun varlığı ve fazla hidroksil grubuna sahip olması nedeniyle biyolojik etkinliği fazla olabilmektedir [30] (Şekil 1.7). Bu özellik EGCG'nin, yeşil çayın sağlık üzerine yararlarından sorumlu ana kimyasal aktif bileşen olmasını sağlayabilmektedir [31].



Şekil 1.6. EGCG'nin moleküler yapısı [32]



Şekil 1.7. EGCG'nin kimyasal yapısı [33]

Yeşil çayın içeriğinde flavanoller, flavandioller, flavonoidler ve fenolik asitleri bulunduran polifenoller bulunmaktadır. Yeşil çay polifenolleri çoğunlukla, yaygın olarak kateşinler olarak bilinen flavonoidlerdir. Bu flavonoidler, yeşil çayda diğer çaylardan daha fazla miktarda bulunan kateşinlerdir. Yeşil çayın esas kateşini olan EGCG, güçlü antioksidan özelliği nedeniyle kimyasal önleyici ve kansere fitoterapi etkisinin son zamanlarda fazlaca araştırıldığı görülmüştür [29].

EGCG'nin, farklı türdeki hastalıklarda antioksidan, antitoksik ve antitümör aktivitelerinin olduğu belirtilmiştir. Vücuttan zararlı serbest radikalleri uzaklaştırıp, oksidatif stresin neden olduğu hasarı azaltarak antioksidan etkinlik gösterebilmektedir. ROS'un etkisiz hale gelmesinde etkili olan glutatyon-S-transferazlar (GST), glutatyon peroksidaz (GPx), glutamat sistein ligaz (GCL) ve heme oksijenaz-1 (HO-1) ekspresyonunu indükleyerek antitoksik aktivite gösterebilmektedir. Tümör hücrelerinin büyümesini inhibe eder ve hücre döngüsü, gen ekspresyonu, transdüksiyon, transkripsiyon faktörlerini düzenleyerek antitümör etkinlik gösterebilmektedir [28]. Tümör hücrelerini *in vitro* ve *in vivo* olarak güçlü bir şekilde inhibe edebilir. Tümör gelişimini ve büyümesini baskılayabildiği, apoptozu indükleyerek biyoyararlılık gösterebildiği bilinmektedir. EGCG'nin nöroblastom, yumurtalık, mide ve nazofarenks gibi bazı kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu düzenleyerek metastaza ve anjiyogeneze müdahale de bulunacağı belirtilmiştir [29].

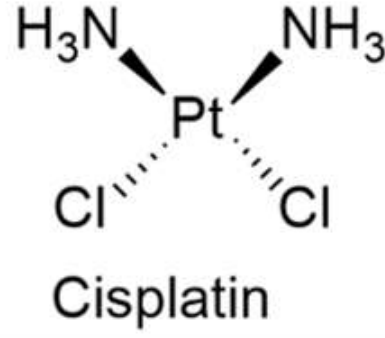
Yapılan bazı araştırmalarda EGCG'nin, antidiyabetik etkisi en fazla olan kateşin olduğu belirtilmektedir [34]. EGCG bu etki ile insülin direncini azaltarak tip 2 diyabet hastalık riskini en aza indirmektedir [35]. Böylece bu kateşinin pankreas patogenezi önleyici ve antiproliferatif etki göstererek koruyucu ajan olabileceği görülmektedir [36, 37]. Yeşil çay polifenollerinden özellikle EGCG, ROS'un hücre lipid membranlarına, proteinlere ve nükleik asitlere zarar vermesini önlemektedir. Bu durum EGCG'nin nükleer faktör-kB (NF-kB), aktivatör protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerini inhibe ederek, ROS'u vücuttan uzaklaştırması ile olmaktadır. EGCG'nin bu aktivitesi fenolik hidroksil grubunun daha kararlı hale gelme isteği ve galloil grubunun serbest radikal temizleyici özelliğinden kaynaklanmaktadır [38, 39]. Oksidatif

stres reaksiyon gösterdiğinde hücreyi korumak için katalaz (CAT), süperoksitdismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleriyle ortak çalışır. EGCG polifenolü ayrıca, büyümeyi durdurmak için MAPK yolakları gibi birçok yolağı etkileyerek, NF-κB aktivasyonunu baskılamakta ve TNF-α'nın ekspresyonunu inhibe etmektedir [40]. Antioksidan özellikteki EGCG savunma sistemine GST, SOD, CAT antioksidan enzimleri ve C ile E antioksidan vitaminleriyle birlikte katkı sağlamaktadır [41, 42].

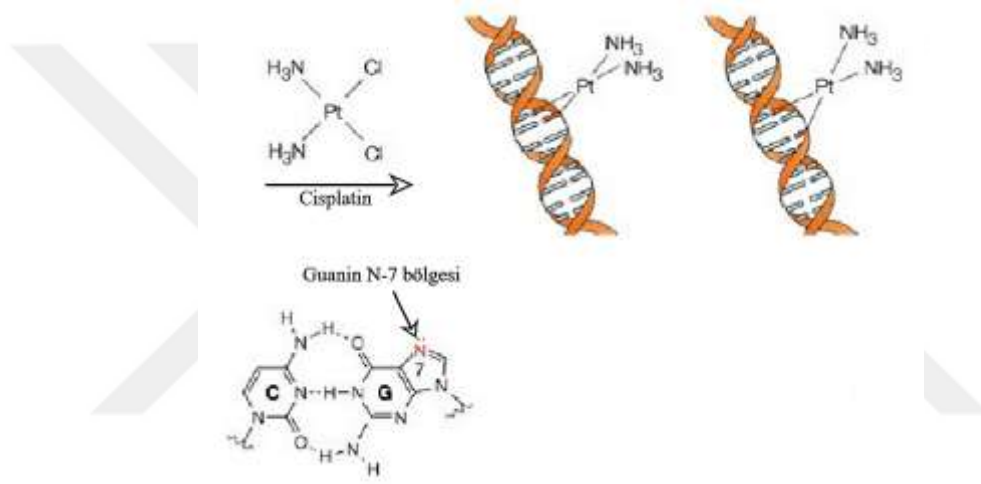
EGCG polifenolü *in vitro* ve *in vivo* koşullarda antiviral, antibakteriyel ve antifungal fonksiyonlara sahip tedavi edici ajan olduğu belirtilmiştir. Bu etkiler nedeniyle EGCG'nin, çoğu hastalıkta tedavi edici kabiliyet gösterebileceği düşünülmektedir. Çeşitli enfeksiyon, kanser ve salgın hastalıklara sebep olan viral etkenleri inhibe ederek antiviral etkinlik göstermektedir. Dış çürümelerini engelleyerek gram pozitif, gıda zehirlenmesine neden olan gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterir. Antibakteriyel etkisiyle ilaca dirençli bakterilerin etkisini azaltmaktadır. Bazı mantarlar sebep oldukları enfeksiyon sebebiyle ölümcül olabilmektedir. EGCG'nin patojen mantarlarda tek veya bazı maddelerle sinerjik olarak antiefektif bir etkisi bulunmaktadır [26, 43].

1.3. Sisplatin (Cis)'in Yapısı ve Fonksiyonel Özellikleri

Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II, CDDP) merkezde bir platin atomuna bağlı iki klor atomu ve iki amonyak grubunun oluşturduğu konfigürasyona sahip alkilleyici bir bileşiktir (Şekil 1.8). Cis malign hücrelerin tedavisinde en çok tercih edilen antikanser ilaçlarından biridir. İntravenöz veya intraperitoneal yolla vücuda verilen Cis, klor atomlarının ayrılıp yerine su veya hidroksil grubunun eklenmesiyle vücutta aktif olmaktadır. Bu ilaç akışkan olarak reaksiyon göstererek kanserli hücrelerde DNA hasarına neden olmaktadır. Bu hasar ilacın DNA zincirindeki bölgelere bağlanmasıyla olmaktadır. Bölgeler aynı zincir üzerinde ise DNA eklentisi, farklı zincir üzerinde ise DNA çapraz bağı olarak adlandırılmaktadır. Cis, tüm DNA bazları ile bağ kurduğu araştırmalarla belirlenmiştir, ancak pürin bazlarının (adenin, guanin) nükleofil gücü yüksek N-7 bölgesi ile reaktif olma isteği daha yüksektir (Şekil 1.9). Ayrıca *in vitro* çalışmalar Cis'in DNA ile birleşimi sonucu serbest radikallerin oluşmasının da kanserli hücrelere zarar verebileceğini göstermektedir [44].



Şekil 1.8. Sisplatinin kimyasal yapısı [45]



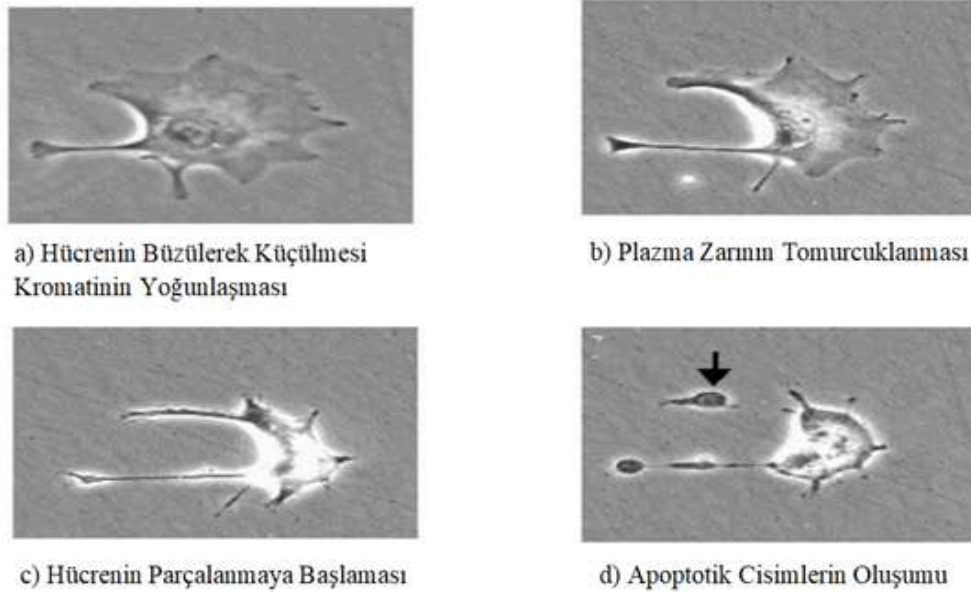
Şekil 1.9. Sisplatin DNA sarmalında purin bazlarının N-7 pozisyonuna kovalent bağ oluşturması [46]

Sisplatin DNA'ya zarar verip, platin atomlarının oluşturduğu elektrik akımıyla replikasyona engel olarak, apoptoza neden olup tümörlü hücrelerde etkinlik göstermektedir [47]. Geniş yelpazeli kullanım alanı, nüfuz etme gücü, tedavilerde yüksek tesiri ve çeşitli anti tümör ilaçlarla ortak güç etkinliğiyle kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [48]. Ancak bu ilacın dokulara toksik etkisi ve tedaviye direnç oluşturma nedenleri kullanımını sınırlandırılmaktadır [49]. Ayrıca ER ve mitokondri gibi sitoplazmik organel disfonksiyonuna neden olmaktadır. Apoptotik yolları aktive eder, oksidatif stres ve inflamasyon yoluyla hücre hasar oluşturmaktadır [50]. Oksidatif stres, sisplatin toksisitesinde önemli bir rol oynamakta ve ilk hedefi mitokondridir [51]. Oksidatif stresin uyarılmasının derecesi maruz kalma süresi ve ilacın dozuna bağlı olarak değişmektedir [52]. Süreye bağlı olarak artan stres, maruz bıraktığı hücrelerde, DNA hasarının yanı sıra hücre ölümünü harekete geçiren ROS'u indüklemektedir. Oksidatif stres altında artan ROS, proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar vererek apoptozu

uyarabilmektedir [51]. Tedaviye direnç oluşturma ise, sisplatinin çapraz bağlanması ve DNA'nın yapısını büyük ölçüde değiştirmesiyle ilişkilendirilebilmektedir. Çapraz bağlı olan DNA eklentileri, hasardan sorumlu protein ve diğer proteinler tarafından tanınması halinde, DNA onarımı ve sinyal mekanizmalarını aktif hale getirebilmektedir. Sonuçta, DNA başarıyla onarılır ve sisplatinine karşı direnç oluşabilmektedir. Bu onarma işlemi gerçekleşmediği durumda apoptik mekanizma başlatılabilmektedir [5]. Sisplatinin yüksek doza bağımlı yan etkileri nedeniyle klinik kullanımı kısıtlanmıştır [53].

1.4. Apoptozis

Apoptoz (a-po-toe-sis) hücrelerin planlı eliminasyonu olarak tanımlanmaktadır. Oluşan ekstrem durumlara karşı, apoptik enzimlerin uyarılması, hücrenin küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, plazma zarı tomurcuklanması (karyoreksis), DNA fragmantasyon ve apoptotik cisimlerin oluşumu sürecini içeren homeostatik bir mekanizmadır [54]. Hücre ölüm mekanizmalarından olan apoptoz, Şekil 1.10'da gösterilmiştir [55].



Şekil 1.10. Apoptoz mekanizması [55]

Daha sonra apoptotik hücreler, hücre içinde herhangi bir sızıntı olmadan makrofajlar, parankimal veya neoplastik hücreler tarafından inflamatuvar yanıt oluşturmada hızla fagosite edilmektedir. Apoptoza uğrayan hücreler, sitoplazmada organel bütünlüğü korunarak ve sağlam bir plazma zarı içinde parçalanmaktadır. Apoptoz, piknoz ve karyoreksis ile hücre ölümüne yol açmaktadır. Piknoz, kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve bu apoptozun en karakteristik

özelliğidir [54]. Zar ve organel yapısının korunması, nükleer büzüşme veya DNA parçalanması ile kromatinin yoğunlaşması, apoptozun morfolojik özellikleridir [56].

Apoptoz, hücre döngüsünün planlı işleyişinde, bağışıklık sisteminde görevli mekanizmalarla etkileşimi, hormonal organ büyümesini normale döndürme, embriyonik ve organ oluşumu süreçleri gibi çeşitli mekanizmalarda rolü olduğu için hayati bir olaydır [54, 57]. Bu yüzden apoptoz mekanizması doğru ve dengeli bir şekilde işleyiş göstermelidir. Organizmada sebepsiz artan apoptoz, bakteriyel ve viral hastalıklar, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, kalp hastalıkları, atrofi gibi hastalıklara, azalan apoptoz ise kanser ve otoimmün hastalıklara sebep olabilmektedir [58, 59]. Bu nedenle hücreyi, apoptik mekanizmayı tetikleyen stres faktörleri, ultraviyole radyasyon (UV), ilaç ve toksinler gibi farklı etkenlere karşı korumak gerekmektedir [60].

Hücreler dışsal veya içsel, bazı hücrelerde ise hem dışsal hem de içsel uyarılara maruz kalabilmektedir. Dışsal yol, ölüm reseptörlerinin TNF ailesiyle etkileşimiyle başlar. Ölüm reseptörleri, yapısal olarak hücre içi protein-protein etkileşim alanı tarafından oluşturulur. Bu reseptörlerden gelen sinyal kompleksi kaspazı aktifleştirir ve bu da ölüme neden olur. İçsel yolda ise, farklı stres uyarılarına karşı yanıtlar mitokondride birleşen sinyallerle verilir. Mitokondride apoptoz da rol alan birçok molekül bulunur. Apoptotik sinyal sitokrom- c salınımını, o da kaspazı aktive eder ve bu da ölüme neden olur. Her iki yolla da aktive olan apoptoz mekanizmasında kaspazlar görev yapmakta ve hücre ölümüne sebep olmaktadır. [61].

Apoptoz sürecinin dengeli ve kontrollü bir şekilde ilerlemesinde önemli genler ve etkileşim ağları bulunmaktadır. Bu süreçte yer alan genleri düzenleyen mikroRNA (miRNA)'lardır. miRNA'lar apoptotik yollarda pro-apoptotik ve anti-apoptotik olarak iki şekilde rol almaktadır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik denge, hücrelerin apoptotik uyarılara karşı duyarlılığını etkiler. Uyarılara karşı miRNA'nın yanıt olarak pro-apoptotik veya anti-apoptotik rolü hücrelerin akıbetini belirler. Hücrelerin iç ve dış uyarılar tarafından apoptik tetiklenmesi durumunda, sinyal reseptörleri sürecin uygun ve kesintisiz devamlılığı için çalışmaktadır [62].

Apoptoz'un, DNA hasarının bir sonucu olarak indüklenerek, zararlı hücreleri uzaklaştırıp, tümör büyümesini durdurduğu bilinmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda bu sürecin sorunsuz olması, kanserin ilerleyebilmesi ve ilaç tedavilerine karşı oluşabilecek direnç ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, apoptozun deregülasyonu kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilir [61]. Kanser gelişiminin tüm aşamalarında, SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzimler ile AKT, MAP ve NF-κB gibi birçok protein artış şeklinde regüle edilir. Anti-apoptotik proteinler ve p53 gibi tümör baskılayıcı genler ise azalma şeklinde regüle edilmektedir. Bu hücrel sinyal iletim yollarında yer alan proteinlerin artış veya azalış şeklinde regüle edilmesiyle kanserin apoptoz ve anjiyogenez gibi tüm aşamaları etkilenmektedir [40]. Çalışmalar kanser hücrelerinin apoptoz geçirmesine engel mekanizmalar arasında antiapoptotik moleküllerin

etkisinin önemli olduğunu vurgulamaktadır. Bu çalışmalar, B-hücreli Lenfoma- 2 (Bcl-2) proteinin, hücrenin hayatta kalmasındaki rolünün büyük olduğu bildirmiştir. Bu bulgular kanser hücrelerinin apoptoz aktivasyonuna direnç gösteren proteinleri eksprese edebileceğini göstermektedir. Kanser hücrelerinin bertarafı için yapılan çalışmalarda, Bcl-2 proteini hedefli ilaçların uygulanması önerilse de, bu proteinlerin kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlara karşı dirençli hale getirebildiği gözlenmiştir. Bu da tedavide kullanılan ilaçların inhibisyon etkinliğinin zayıf olması gibi özelliklerinden dolayı tüm kanser hücrelerini öldürmediğini göstermiştir [63].

Sisplatinin kanserli hücelerde apoptozu inhibe etmesi dozuna bağlı olarak değişir. Yüksek dozda c-Jun N terminal kinaz (JNK) aktive olur ve apoptoz gerçekleşir. JNK'nin sisplatin dirençli hücelerde uyarılması daha düşüktür. Ayrıca, *in vitro* olarak sisplatin direnç kazanmış melanom hücresi, sisplatin tedavisine daha az apoptotik tepki gösterir [64].

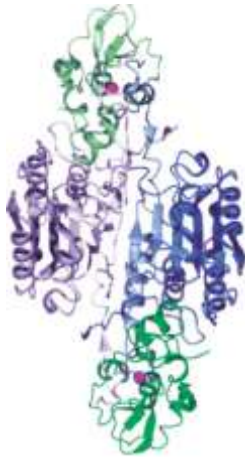
1.5. Apoptoptik Markerlar

1.5.1. Kaspaz-3

Kaspazlar, sistein proteazlarından oluşan ve apoptozda önemli rol oynayan enzimlerdir. Kaspaz-3 proteininin yapısı Şekil 1.11'de gösterilmiştir [66]. Sitoplazmada inaktif olarak bulunan kaspazlar proteolitik kaskad yoluyla apoptozun ilk evrelerinde birbirlerini aktive ederler.

Üç gruba ayrılırlar;

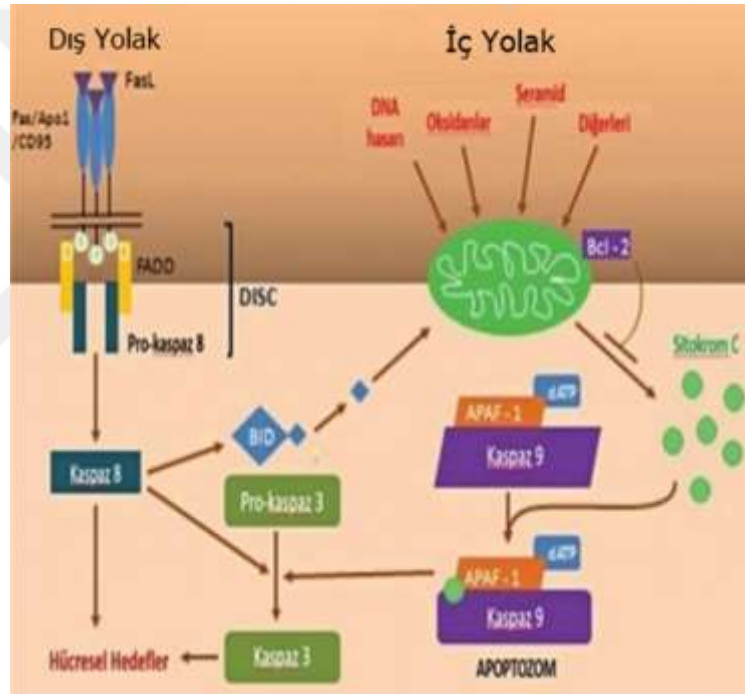
- 1) Başlatıcı (Kaspaz- 2, 8, 9 ve 10)
- 2) Efektör (Cellat) (Kaspaz-3, 6 ve 7)
- 3) İnflamatuar (Kaspaz-1, 4 ve 5) [65]



Şekil 1.11. Kaspaz-3 proteinin yapısı [66]

Kaspazlar, hücre içi sinyallere (iç yolak) yanıt olarak ve hücre yüzeyi ölüm reseptörlerine yanıt olarak (dış yolak) aktifleştirilirler (Şekil 1.12).

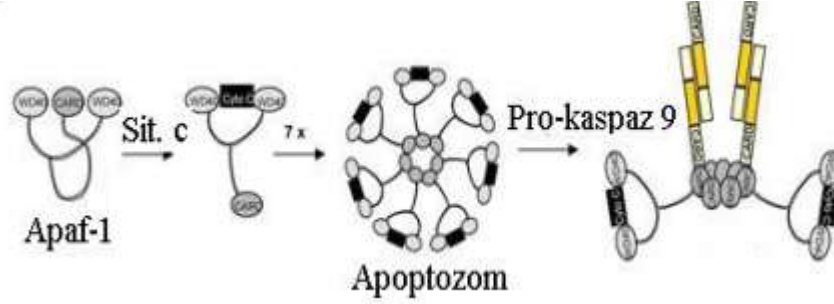
İç yolak; hücre içinde apoptozu indükleyen etkenlere karşı yanıt olarak hücre içinde başlatılır. Mitokondri tarafından salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör)'e bağlanır. Bu komplekse ATP'nin katılmasıyla sitozolik bir protein olan "apoptozom" meydana gelir. Bu da prokaspaz-9 molekülünü aktif kaspaz-9'a dönüştürür (Şekil 1.13). Aktif olan kaspaz-9, prokaspaz-3'ü aktif hale getirerek hücre ölümü gerçekleştirilir [67, 68]. Aktif olan kaspaz-3 ise inaktif kaspaz aktive edici DNaz (ICAD)'ı inaktif hale getirerek, kaspaz aktive edici DNaz (CAD)'ı serbest duruma getirir. Bu durum sonucunda kromatin yoğunlaşmakta ve DNA parçalanmaktadır [69].



Şekil 1.12. Kaspazların aktif olduğu apoptoz yolları [70]

Dış yolak; apoptozu indükleyen hücre yüzeyinde meydana gelen sinyallerdir. Hücre ölüm sinyalleri arasında Fas ligandı (Fas-L) ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) yer alır. Bu ölüm ligandları Fas ile ilişkili ölüm bölgesini (FADD)'nin ve TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD)'nın adaptör proteinlerini içerir. Bu ölüm ligandları ve adaptör proteine bağlantısı sinyal kompleksi (DISC) olarak adlandırılmaktadır. Procaspases-8 ve -10, DISC tarafından aktive edilir. Daha sonra kaspaz-3, -6 ve -7 aktive edilir ve proteinlerin bölünmesi ile hücre ölümü gerçekleşir [71]. Her iki yolla da aktif olan kaspaz-3, DNaz enzimini aktive ederek DNA'nın alt birimlerine parçalanmasına neden olmaktadır [72]. Kaspaz-3 hücre

döngüsünün başlatılmasına katkıda bulunur. p21 DNA polimeraz- δ kofaktörünün, çoğalan hücre nükleer antijenine (PCNA) bağlanması ile hücre çoğalması sağlanır. p21 PCNA bağlanma bölgelerinde, kaspaz-3 tarafından bölünerek, PCNA'nın salınmasına neden olur. Ayrıca kaspaz-3, doku kayıplarının iyileşme sürecinde dokuların şekil ve normal hücre sayılarını kazanmalarını sağlar [73].



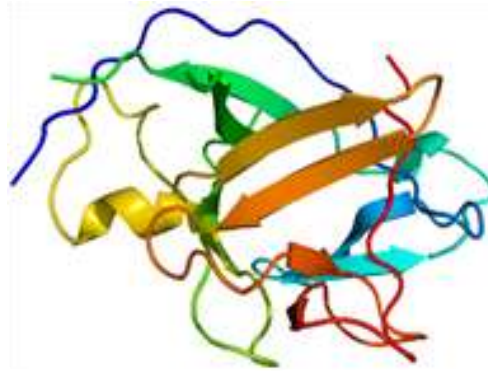
Şekil 1.13. Apoptik uyarıcı sitokrom-c'nin Apaf-1'e bağlanmasıyla oluşan apoptozom proteini [67]

1.5.2. İnterlökin-1 α (IL-1 α)

İnterlökin-1 (IL-1) sitokininin, enfeksiyona ve zarar verici enflamasyona verilen yanıtlar için IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere 2 proinflamatuvar üyesi vardır. IL-1 α proteininin yapısı, Şekil 1.14'de gösterilmiştir [84]. IL-1 α , makrofajlar tarafından salgılanan, enflamatuvar yanıtları başlatan ve "alarm sitokini" olarak tanımlanan birincil sitokindir. IL-1 α , 271 amino asitlik bir öncü protein (Pro-IL-1 α) olarak üretilerek, proteazlar tarafından salgılanan 17 kDa formlarına işlenen, 31 kDa'lık öncüler olarak sentezlenmektedir [74]. IL-1 α , sitokini insanda 2. kromozomun uzun kolunda bulunmaktadır [75]. IL-1 α 'nın transkripsiyonu için, Sp1 proteini, NF- κ B'de IL-1 α promotör bölgesini aktive etmektedir. Ayrıca IL-1 α kendi gen ekspresyonunu otokrin bir şekilde indükleyerek, promotör dizisini uyarmakta ve kendisini aktive edebilmektedir. Stres tepkileri üzerine IL-1 α , kalpain, sitotoksik T-lenfositler, doğal öldürücü (NK), granzim-B ve mast hücre kinaz gibi proteazlar tarafından işlenmektedir [76]. N-terminal amino asitlerin çıkarılmasıyla işlendikten sonra oluşan peptitler, olgun form IL-1 α olarak adlandırılmaktadır. Pro-IL-1 α , IL-1 α kadar aktiftir ve IL-1 α 'dan farklı olarak çekirdeğe geçebilir, ayrıca zara bağlı olarak da bulunmaktadır [77]. İnflamatuvar yanıtlarla ilgili IL-1 α , birçok hücre ve doku tarafından üretilmektedir [78]. Timus, dalak, lenf düğümleri, akciğer ve karaciğer gibi organların makrofajlarında üretilmektedir. Nötrofiller, keratinositler, epitel ve endotel hücreleri, lenfositler, düz kas hücreleri ve fibroblastların da dahil olduğu belli hücre tiplerinde de üretimi gerçekleşmektedir [79]. IL-1 α üretimi, hücrelerde oluşan hasarın veya enfeksiyonun ardından DAMP (hasarla ilişkili moleküler model) proteinlerin salınması veya PAMP (patojenle ilişkili moleküler model) yapılarının doğuştan tanınması üzerine gerçekleşir. Oksidatif stres, lipitin aşırı

yüklenmesi, hormonal uyarı, sitokinlere maruz kalma gibi fizyolojik uyarıcılara yanıt olarak hızla eksprese edilmektedir [80]. Uyarıcıların sinyaline karşı aktif hale gelen IL-1 α proteini bağışıklık sisteminin tepkisini düzenleyerek, proinflamatuvar etkileri indüklemektedir. Enflamatuvar ve immün cevaplarla ilişkili transkripsiyon faktörleri olan NF- κ B, AP-1, JNK MAPK'ler, p38 gibi faktörlerin aktivasyonunu gerçekleştirmektedir [81]. IL-1 α ekspresyonu, büyüme faktörlerine ve proinflamatuvar uyarılara göre değişerek artış gösterebilir. Miktarı, hücreden hücreye farklılık göstermekle birlikte, endotel ve epitel hücrelerinde fazla olabilmektedir [80].

IL-1 α iki fonksiyonlu bir sitokindir. Hücre zarına bağlı IL-1 α , antitümör immün cevapları başlatırken, IL-1 α 'nın hücre içinde bulunan prekürsörleri gen ekspresyonu, diferansiyasyon ve hücre büyümesi gibi homeostatik fonksiyonları kontrol etmektedir [75]. Bu biyoaktif proteinin rolleri göz önüne alındığında, başlattığı genel enflamatuvar yanıtlar, diğer sistemik yanıtları etkilemesi nedeniyle çeşitli hastalıkların patogeneziine sebep olabilmektedir. Bu hastalıklardan bazıları, COVID-19, deri iltihabı, KOAH, perikardit, Behçet ve Sjögren sendromudur [81]. Ayrıca yapılan araştırmalara göre, pankreas duktal adenokarsinom (PDAC) enflamasyonu IL-1 α tarafından yönlendirilmektedir. Tümör hücreleri tarafından eksprese edilen IL-1 α 'nın aşırı ekspresyonu, tümör hücrelerinin yayılmasına neden olabilmektedir [82]. IL-1 α 'nın pankreatik azalması ise, glikoz tolerans homeostazını bozabilmektedir. Yani vücut glikoz homeostazını desteklemek gibi fizyolojik fonksiyonu bulunmaktadır [83].

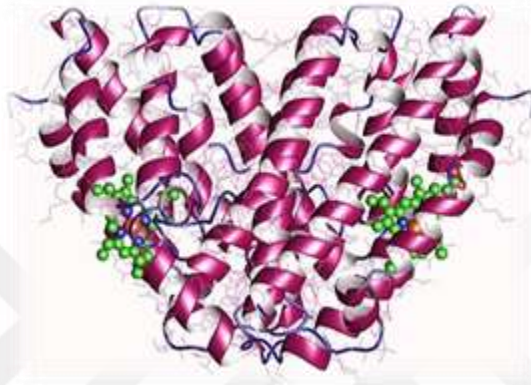


Şekil 1.14. IL-1 α proteinin yapısı [84]

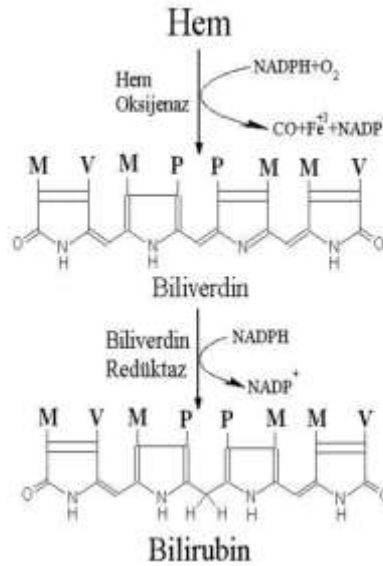
1.5.3. Hem Oksijenaz -1 (HO-1)

Hem oksijenaz (HO), hem molekülünü safra pigmentlerinden biliverdine katalize eden bir enzimdir. HO-1 proteininin yapısı, Şekil 1.15'de gösterilmiştir [87]. Reaksiyon esnasında, hem molekülünün α -methen köprüsündeki karbon atomu, karbon monoksit (CO) olarak, demir (Fe) ise +2 formunda salınmaktadır. Hem oksijenaz enzim aktivitesi için bu reaksiyonda oksijen ve NADPH'a ihtiyaç duymaktadır. Reaksiyon sonucu oluşan biliverdin, biliverdin redüktaz enzimi

ile bilirubine dönüşür (Şekil 1.16). HO-1 indüklenebilir bir formda olarak 32 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Normal şartlarda birçok hücrede HO-1 protein ekspresyonu düşük düzeyde gözlenmektedir. Pankreas, böbrek, kalp, akciğer, beyin ve derinin de içinde bulunduğu birçok hücrede eksprese edilebilir [85]. Enflamasyon, iskemi, hipoksi, hiperoksi, hipertermi veya radyasyon gibi hücresel stres zamanlarında aktive olan antioksidan ve oksidan homeostazının korunması için önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca salınan Fe⁺² antioksidan fonksiyon gösterirken, CO antienflamatuar ve antiapoptotik fonksiyon göstermektedir [86].



Şekil 1.15. HO-1 proteinin yapısı [87]



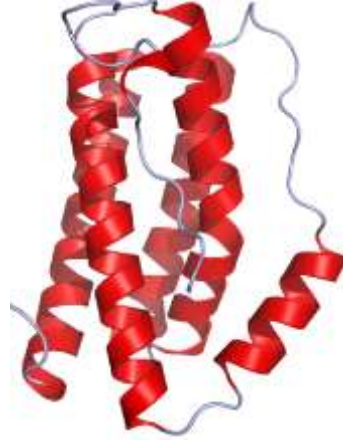
Şekil 1.16. Hem molekülünden bilirubin oluşumu [88]

1.5.4. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6 proteini, 27 amino asitlik bir sinyal peptidi ve iki potansiyel NH₂ bağılı glikosilasyon bölgesi ile 212 amino asit içermektedir. IL-6 proteininin yapısı, Şekil 1.17'de gösterilmiştir [95]. Molekül ağırlığı 21 ile 28 kDa aralığında değişkenlik göstermektedir. IL-6 geni kromozom 7p21 ile eşlenmektedir [89]. Dört heliksten oluşan sarmallı demet yapısındadır. Üç farklı reseptör bağlama bölgesine sahiptir. [90].

IL-6, kazanılmış ve doğuştan gelen bağışıklık sistemlerinde enflamasyonun artmasında görev almaktadır. Bu proteinin immün düzenleyici etkilerine ek olarak, iskelet kası hücreleri, adipositler, hepatositler, pankreatik β-hücreleri üzerindeki etkisiyle glikoz dengesini ve metabolizmasını etkilediği öne sürülmektedir. Bağışıklık sistemi dışındaki dokularda olduğu gibi çoğu hücre tipinde de hem immün düzenleme, hem de immün olmayan olaylarda önemli bir etkiye sahip pleiotropik bir sitokindir. Bu proteinin hastalıklardaki patogeneze bakıldığında, regülasyonunun immün aracılı hastalıklarda ve enflamatuar faktörlerin düşük enflamasyona neden olduğu bazı hastalıklarda, koruyucu ya da zararlı bir rol oynayabildiği şeklindedir [89]. Akut faz reaksiyonlarını, immün yanıtları, hematopoezi ve çeşitli iç organları konak savunması için uyararak üzere bir patojenden veya doku hasarı bölgesinden gelen savunma sinyallerini iletir [91].

Temel sinyal iletiminde rolü olan bu sitokin, sinyal düzensizliği, romatoid artrit, enflamatuar barsak hastalığı, multipl skleroz ve çeşitli kanser türleri gibi hastalıkların başlamasına ve sürdürülmesine sebep olmaktadır [92]. Glikoprotein 130 (gp130) ve IL-6 reseptörü (IL-6R) yoluyla sinyal verir. IL-6R esas olarak hepatositlerde ve bağışıklık hücrelerinde bulunurken, gp130 neredeyse vücudun tüm hücrelerinde bulunmaktadır [93]. IL-6R, glikozile edilmiş bir tip I membran 80 kDa proteindir. IL-6'nın bağlanması için gerekli değildir, ancak salgı yoluyla hücre içi ilerleyiş sırasında reseptörü stabilize etmektedir. Gp130, glikosile edilmiş bir tip I membran 130-150 kDa proteindir. Altı hücre dışı, bir transmembran ve bir sitoplazmik alandan oluşmaktadır. Hedef hücrelerde, IL-6 ilk önce zara bağılı sinyal vermeyen a-reseptör IL-6R'ye (mbIL-6R) bağlanır. Bu IL-6 ve IL-6R kompleksi daha sonra iki gp130 molekülüne bağlanır. Janus kinaz (JAK) yolunun aktive edilmesiyle başlar. Daha sonra sırasıyla sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörü (STAT), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) sinyal iletim yollarının aktivasyonunu içeren IL-6-sinyal transdüksiyonuna yol açmaktadır [90, 94].



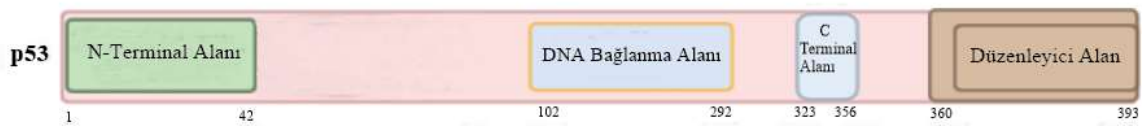
Şekil 1.17. IL-6 proteinin yapısı [95]

1.5.5. p53

Hücre döngüsü, apoptoz kontrolü ve hücre genomik bütünlüğünün düzenlenmesine katılır ve transkripsiyon baskılayıcı faktör olarak görev yapar. Tümör proteini 53 (TP53) geni tarafından kodlanan proteindir. Ağırlığı 53 kDa olup, hücre döngüsünü düzenlediği ve bundan dolayı da kanseri önlemede işlev gördüğü için önemli bir tümör baskılayıcı proteindir [96, 97]. DNA hasarı, hipoksi ve oksidatif stres dahil olmak üzere farklı stres faktörlerine yanıt olarak geçici veya kalıcı hücre döngüsü durdurma ve apoptozu tetikleyen hücresel stres sensörüdür [98]. p53, bu fonksiyonlarını genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek ya da ilgili proteinler ve DNA ile direkt etkileşime girerek sağlamaktadır. Hücre döngüsünü p21 proteini ile G1 aşamasında durdurmaktadır. Ayrıca DNA tamiri ile DNA sentezi mekanizmasında ve apoptoz da rol oynayan bazı proteinlerin transkripsiyonlarını düzenlemekte, bazılarıyla ise direkt olarak etkileşmektedir. DNA'da gerçekleşen kırılma veya telomer hasarları gibi durumlarda ise DNA'ya direkt bağlanarak, sarmalın çözülmesine engel olmaktadır [99].

p53 proteini 393 amino asitten oluşur ve fonksiyonel olarak 4 alan içermektedir (Şekil 1.18);

- 1 - 42 amino asitten oluşan N- terminal alanı,
- 102 - 292 amino asitten oluşan DNA bağlanma alanı,
- 323- 356 amino asitten oluşan C terminal alanı,
- 360- 393 amino asitten oluşan düzenleyici alan [100].



Şekil 1.18. p53 proteininin fonksiyonel alanlarının şematik yapısı [101]

1.6. Glutasyon (GSH)

Glutasyon, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar da bol miktarda bulunmaktadır [102]. Özellikle memeli dokularında karaciğerde yüksek konsantrasyonda bulunan bir bileşiktir. Hücrede bulunma miktarına göre en fazla sitozol, sonra mitokondri en az da ER'de bulunur.

GSH'ın hücrede,

1. Serbest radikallerin temizlenmesi,
2. Proteinleri korumak,
3. DNA sentezi ve
4. Bağışıklık fonksiyonu düzenleme gibi önemli görevleri vardır.

Oksidatif stresi azaltmada, redoks dengesini korumada çok önemli bir role sahiptir [103]. Organizmaların maruz kaldığı oksidatif strese karşı indirgenmiş formuyla, toksik maddelerin hücreden uzaklaştırılmasını sağlar [104].

Glutasyon seviyesinde denge çok önemlidir. Bazı kanser çeşitlerinin, yetersiz glutasyon seviyeleri ile ilişkilerinin bulunduğu belirtilmektedir [103]. Ayrıca, bazı vitaminler için koruyucu etki, aminoasit transportu, peroksit metabolizması, iskelet-kas bütünlüğü ve birçok enzim aktivitesinden sorumlu olduğu için, eksikliği hücre ölümüyle sonuçlanabilmektedir [105].

1.7. Katalaz (CAT)

Katalaz, tüm aerobik organizmalarda bulunan önemli antioksidandır. Hücrede hidrojen peroksidin su ve oksijene dönüştürülmesini nötralize ederek redoks homeostazını koruyan bir enzimdir [106]. Hücrede peroksizom gibi organellerde fazla miktarda, mitokondri ve ER'da ise daha az miktarda bulunmaktadır [107]. Peroksizomlarda, hidrojen peroksidin nötralizasyonundan sorumludur. Bu yüzden peroksizomların yoğun olduğu kan, kemik iliği, böbrek ve karaciğer gibi yapılarda en yüksek aktiviteyi göstermektedir [108].

Bazı metabolik durumlarda oksidatif stres meydana gelmektedir. Oluşan oksidatif strese bağlı olarak ise Alzheimer, Parkinson, diyabet ve bazı kanser çeşitleri gibi hastalıklarda ortaya çıkmaktadır. Katalaz enzimi bu hastalıklara karşı terapötik bir ajan olarak görev yapar. Ayrıca eksikliği de, diabetes mellitus, vitiligo, Wilson hastalığı ve anemi gibi hastalıklara sebep olabilmektedir [106].

1.8. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden bir tanesidir. Serbest radikaller ile yağ asitlerinin tepkimesi sonucu çok sayıda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan yapılar oluşur. Lipid peroksidasyon ürünleri arasında hücrede en fazla bulunan ürünlerden biridir.

ROS aracılığıyla oluşan lipid peroksidasyonu, hücree zarında hasar meydana getirmektedir. Kontrol edilemeyen peroksidasyon, diğer dokularda hasara sebep olabilmektedir [109].

Hücrede MDA, oksidatif stresin bir göstergesidir. Bu durum, Alzheimer, kanser, diyabet ve Parkinson gibi çeşitli hastalıkların oluşmasıyla ilişkilendirilmiştir [110]. Mutajenik, karsinojenik özelliğinde olan MDA, DNA ile reaksiyona girerek hasara neden olmaktadır [111].



2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler

Primer antikorlar, kaspaz-3 (sc-56053), IL-1 α (sc-12741), HO-1 (sc-390991), IL-6 (sc-28343), p53 (sc-126), sekonder antikor (sc-516102) Santa Cruz Biotechnology tarafından sağlanmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar, BioRad, BioSho, Merck'ten, Epigallokateşin-3 gallat (FE09970) Carbosynth'den, sisplatin ise (CAS-Nr: 15663-27-1) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir.

2.2. Metod

2.2.1. Deney Hayvanları ve Çalışma Grupları

Hayvan deneyleri aşaması, F.Ü. Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun toplantı tarihi 04.11.2020, protokol numarası 2019-141, toplantı sayısı 2020/13 ile F.Ü. Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (FÜDAM)'nde gerçekleştirilmiştir. Gruplara günlük 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde periyot uygulanmıştır. Hayvanların başlangıç canlı ağırlıkları birbirlerine yakın olarak ayarlanıp gruplar belirlenmiştir.

Gruplarımız şu şekildedir:

Kontrol Grubu: Standart diyet uygulanan grubumuzdur.

EGCG Grubu: 50 mg / kg canlı ağırlığında (CA) EGCG uygulanan grubumuzdur.

Sisplatin (Cis) Grubu: 7 mg/kg canlı ağırlığında Cis uygulanan grubumuzdur.

Sisplatin (Cis)+EGCG Grubu: 50 mg/kg canlı ağırlığında EGCG ve 7 mg/kg canlı ağırlığında Cis uygulanan grubumuzdur (Tablo 2.1).

Çalışma süresi boyunca yem ve su, ad libitum olarak verilmiştir. Çalışma 4 hafta süreyle devam etmiştir. Bu sürenin sonunda sıçanlara ait pankreas dokuları alınarak gerekli incelemeler yapılmıştır.

Tablo 2.1. Araştırma Grupları (n=7)

Gruplar	Uygulama	Deneme Süresi
Kontrol Grubu	Standart diyet	4 hafta
EGCG Grubu	EGCG (50 mg/kg CA, ip)	4 hafta
Cis Grubu	Cis (7 mg/kg CA, ip)	4 hafta
EGCG + Cis Grubu	EGCG (50 mg/kg CA, ip) + Cis (7 mg/kg CA, ip)	4 hafta



Şekil 2.1. Çalışma gruplarına intraperitoneal (ip) enjeksiyon uygulama

2.2.2. Sisplatin (Cis) Hazırlanması ve Uygulanması

2 mg/ml miktarında Cis %0,9 izotonik NaCl çözeltisinde çözdürülerek, intraperitoneal (ip) enjeksiyon yoluyla, tek doz olarak, çalışmanın 3. gününde gerçekleştirilmiştir [112].

2.2.3. Epigallokateşin Gallat (EGCG) Hazırlanması ve Uygulanması

EGCG, 0,2 gr ağırlığında tartılıp, 15 ml alınan %0,9 izotonik NaCl çözeltisinde çözdürülmüştür. Bu çözelti hayvanlara ikinci haftadan itibaren, haftada üç defa 50 mg/kg canlı ağırlığı (CA) olarak ip yoluyla verilmiştir [113] (Şekil 2.1).

2.2.4. Western Blotlama Çalışması için Doku Homojenizasyonu

Pankreas dokusu, parçalara ayrılmış şekilde alındı ve lizis tampon (0,5 M Tris; (pH: 8), EDTA, β -merkapt etanol, phenylmethyl sulfonyl fluoride-PMSF) içerisinde homojenize edilerek 15.000 rpm'de 45 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant başka bir tüpe alınarak -80 °C'de bırakıldı [123].

2.2.5. Western Blotlama Tekniği ile Kaspaz-3, IL-1 α , HO-1, IL-6, p53, Proteinlerinin Analizi

Proteinler sodyumdodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi kullanılarak %12'lik jelde yürütüldü. Western blotlama analizi, poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin ayrılması, proteinlerin membrana transferi, ilgili proteinin görünür duruma getirilmesi olmak üzere üç aşamada gerçekleştirildi. Bloklama aşaması %5 yağsız süt tozu ile gerçekleştirildi.

Primer antikorlar 1:1000 oranında %5 yağsız süt tozu içerisinde seyreltilerek kullanıldı. Primer antikor inkübasyonundan sonra, Tween 20 içerisinde 3 kez yıkamaları tamamlandı. Daha sonra, sekonder antikorlar 1:10000 oranında %10 yağsız süt tozu içerisinde seyreltilerek kullanıldı. Sekonder antikor inkübasyonu ve yıkama işlemlerinden sonra proteinler, Western blotlama yöntemiyle nitroselüloz membrana alınıp, sentez oranına bakılarak [114,115,116] protein yoğunlukları belirlenmiştir (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA).

2.2.6. GSH Ölçümü

GSH ölçümleri için 0,5 ml süpernatant, 2 ml Na₂HPO₄2H₂O fosfat tampon çözeltisi ve 0,2 ml 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi bir tüpte karıştırıldı. 3.000 rpm 10 dk santrifüj edilmiş sarı renk oluşumunun ardından spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda değerler okunmuştur. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden belirlendi [117].

2.2.7. Katalaz (CAT) Aktivitesi Analiz Yöntemi

Katalaz enziminin aktivite tayini Lück [118] yöntemine göre yapıldı. Katalaz ölçümünde kullanılmak üzere spektrofotometrede 240 nm'de absorbans 0.7-0.9 oluncaya kadar Na-K-fosfat tampon çözeltisine derişik (%35'lik) H₂O₂ ilave edildi. Numunelerin katalaz içeriğini belirlemek için hazırlanan bu karışımdan 1000 µl alınıp spektrofotometre küvetine kondu. Üzerine çalışma aralığına bağlı olarak 30 µl başlayıp gittikçe artan konsantrasyonlarda doku süpernatantı eklendi. Vorteks yapıldı. Spektrometrede 240 nm'de ölçümü yapıldı [119].

2.2.8. MDA Ölçümü Standart Eğri Çizimi

Günlük standart MDA stoklardan (1,1,3,3 tetramethoksiopropan) 10 µl alınarak, saf su ile 100 mililitreye ayarlanmıştır. Eğri çizimi için saf suyla, 40, 20, 10, 8, 5, 4 oranlarında seyreltme yapılarak, 15-30-60-75-121-151 n/mol derişimde çalışma standartı oluşturulmuştur [120].

2.2.9. Pankreas Dokusu MDA Ölçümleri

Pankreas doku örnekleri 0,5 gr tartılarak her dokunun üzerine %1,15lik KCl'den 4,5 ml ilave edilerek mekanik homojenizatörde parçalanmıştır. MDA tayini Ohkawa vd. [121] yöntemi baz alınarak bazı değişikliklerle ölçülmüştür. 0,5 ml homojenat %10'luk TBA solüsyonunu ile birlikte deney tüpünde karıştırıldı. 15 dk boyunca tüpler 95°C kaynar suda bekletildi. Bunu takiben tüpler, içinde soğuk su bulunan bir kaba daldırılıp bir süre beklendikten sonra 4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 10 dk boyunca 5000 rpm'de santrifüje edildi. Sonrasında tüplerden, önceden hazırlanmış kapaklı deney tüplerine 2'şer ml süpernatant alındı ve üzerlerine 1'er ml %0,67'lik TBA katılıp tüpler sıkıca kapatılarak iyice karıştırıldı. Akabinde, yine 15 dk

kaynatma ve soğutma işlemi yapıldı. Daha sonra örnekler 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüldü [122].

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN®3 Cell jel elektroforezi sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Proteinleri ayırma işlemi aşağıdaki gibi hazırlanmıştır [114].

Ayırma Jeli Hazırlanması (%12); 3,35 ml distile su, 1,5 M Tris hidrojen klorür (pH; 8,8) 2,5 ml, %10 sodyum dodesil sülfat, 100 µl, %30 akrilamid/bis 4 ml, %10 amonyumpersülfat, 75 µl, tetramethyl-endiamin 15 µl.

Yükleme Jeli Hazırlanması (%4); 6,1 ml distile su, 0,5 M Tris hidrojen klorür (pH; 6,8) 2,5 ml, %10 sodyum dodesil sülfat, 100 µl, %30 akrilamid/bis 1,3 ml, %10 amonyumpersülfat 60 µl, tetramethyl-endiamin 12 µl.

Hazırlanan örnekleri kuyuya yüklemeye önce, eşit şekilde SDS-PAGE SAB boya eklenerek 5 dk kaynatıldıktan sonra elektroferez işlemi 30 mA'de gerçekleştirilmiş ve western blotlama tekniğine geçilmiştir [114].

SDS-PAGE İçin 5x Tank (Yürütme) Tamponu (5x Running Buffer)

0,025 M Trizma Base 15 g/ml, 0,192 M glisin'den 72 gr/ml, %0,1 sodyum dodesil sülfat 5 gr/l, distile su ile 1x Running buffer'a seyreltilerek solüsyon hazırlanmıştır.

SDS-PAGE için örnek uygulama tamponu (SAB: Sample Amplification Buffer); %10 sodyum dodesil sülfat 1 gr/10 ml, %50 M Tris hidrojen klorür (pH; 6,8) 5 ml/10 ml, %10 gliserolden 1 ml/10 ml, %2,5 2 merkaptto etanol 0,25 ml/10 ml, %0,05 ibromofenolmavisi 0,005 gr/10 ml, %2 DTT 0,2 gr/10 ml distile suyla 10 ml'ye tamamlanmıştır.

SDS-PAGE işleminden sonra protein boyama solüsyonu;

Jel sistem üstünden çıkartılır ve bu jel üzerindeki proteinler boyanmadan önce jel üzerine sabitlemiştir. Sabitleme işleminden sonra distile suyla yıkanarak boyama işlemine alınmıştır. %40 metanol, %10 asetikasit içerikli çözeltinin boyaması coomassie brilliant blue ile yapılmıştır. [124].

Western blotlama transfer tamponu 5X; Glisin'den 4,3 g/300 ml, Trizma Base 5,81 gr/300 ml, metanol 75 ml/300 ml, distile suyla 300 ml'ye ayarlanmıştır.

Phosphate Buffered Saline(PBS) 9X; 1,45 M NaCl 84,74 gr/l, 0,075 M Na₂HPO₄.12 H₂O 26,8 gr/l, 0,025 M NaH₂PO₄.12 H₂O 3,9 gr/l.

PBS Tween-20; PBS 1000 ml, Tween-20 2 ml.

Bloklama işlemi için %5'lik süt tozu kullanılarak yapılmıştır.

Western blotlama tekniği ardından nitroselüloz membranda protein görüntüleme solüsyonu;

1 M Tris (pH; 6,8'de) 1,33 ml/40 ml, 3,3'-diaminobenzidin tablet dört tablet, %30 H₂O₂ 40 µl/40 ml, distile suyla 40 ml'ye ayarlanmıştır.

Western Blotlama Tekniği ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Western blotlama, BIO-RAD Mini-PROTEAN®3 Cell jel elektroforez sistemi kullanarak yapılmıştır. Bu teknikten önce SDS-PAGE ile proteinlerin jelde ayrımı gerçekleştirilmiştir. Jel ebatıyla eşit olacak şekilde nitroselüloz transfer membran kesilip, filtre kâğıdı ile beraber transfer tamponunda bekletilmiştir. Elektroforezden sonra jel de transfer tampon içinde bekletildikten hemen sonra western blotlamaya özgü kaset kapağı açılıp alt kısmına filtre kâğıdı, üste ise jel bırakılmıştır. Hava kabarcığı olmayacak şekilde nitroselüloz membran ve yeniden bir filtre kağıdı konularak kaset kapağı kapatılıp elektroforez tanka yerleştirilmiştir. Buz ünitesi tanka bırakılarak transfer tamponu doldurulduktan sonra güç kaynağına bağlanarak 250 mA'da 90 dk akım sağlanmıştır. Blotlama işleminde ısı yayılımının düzenli olması için, manyetik karıştırıcıda gerçekleştirilmiştir. Blotlama işleminin ardından membran, PBS Tween-20'de 15 dk yıkanmış ve 4 °C'de 1 gece süt tozunda bloklama yapılmıştır. Akabinde 90 dk oda ısısında bekletilerek 1/1000 oranında seyreltilmiş olan primer antikor eklenmiştir. Daha sonra tekrardan 90 dk oda ısısında 25 °C'de bekletilip, PBS çalışma solüsyonuyla 15 dk süreyle yıkanmıştır. 1/10000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor eklenip 90 dk süreyle oda ısısında bekletilmiştir. PBS çalışma solüsyonuyla 15 dk yıkandıktan sonra son hacim 40 ml saf su ile tamamlanıp dört tablet-20 mg 3,3'-diaminobenzidin, 1,33 ml 1 M Tris (PH; 6,8), %30'luk 40 µl H₂O₂ içinde bantlar belirgin hal alana kadar bekletilmiştir. Distile su içine alınıp reaksiyon sonlandırılmıştır [97, 125].

2.2.10. Histopatolojik Analiz

Araştırma işlemi sonrasında pankreas dokularından alınmış olan kesitler, %4'lük formaldehit solüsyonunda fikse edildikten sonra boyama işlemleri gerçekleştirilip mikroskopik görüntüleri alınmıştır [97, 125].

2.2.11. İstatistiksel Analizler

Tüm veriler SPSS 22 paket programında varyans analiziyle değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar One-Way ANOVA Post Hoc Tukey, LSD ve Duncan testleri ile belirlenmiştir.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

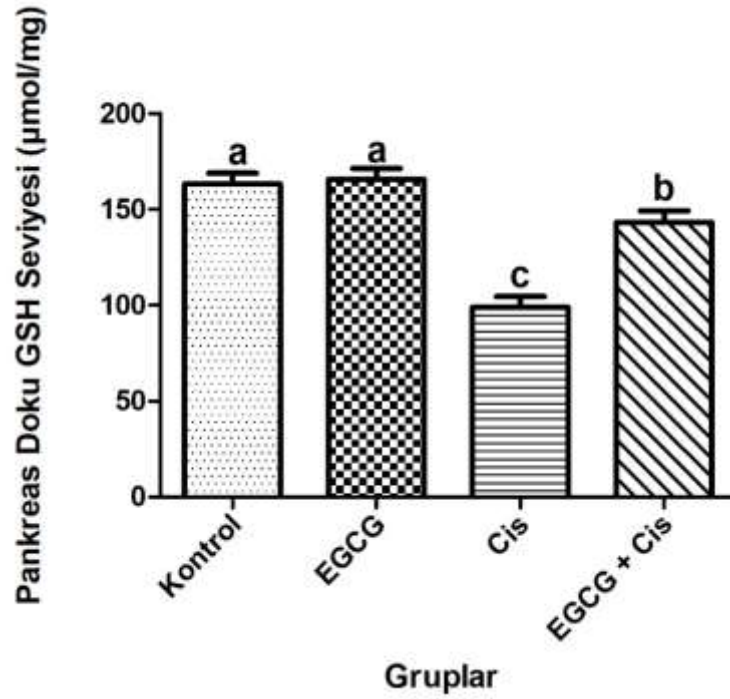
3.1. GSH Ölçüm Sonuçları

3.1.1. Pankreas Doku GSH Ölçüm Sonuçları

Tablo 3.1. Pankreas dokusu GSH seviyesi

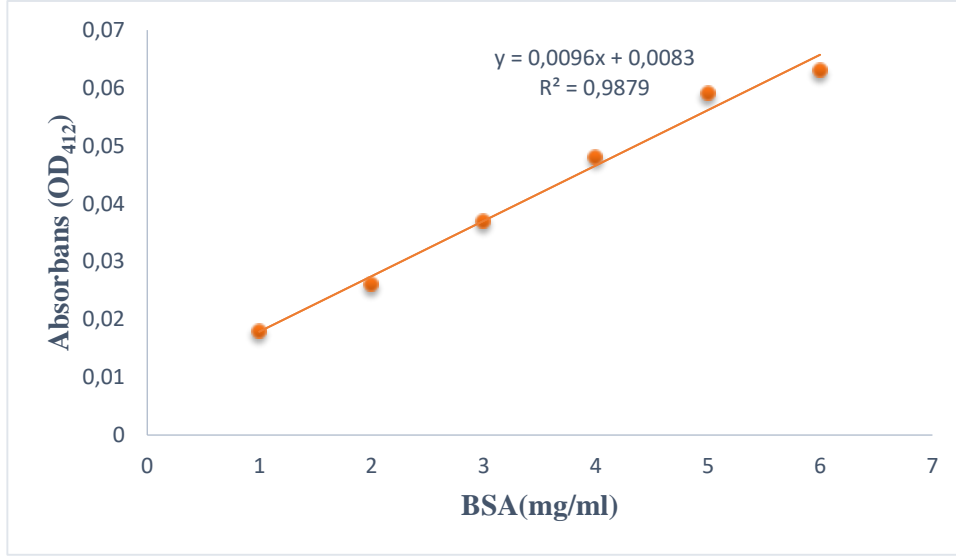
Gruplar	Pankreas Dokusu GSH Seviyesi ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)
Kontrol	$163,22 \pm 6,35^a$
EGCG	$165,68 \pm 5,75^a$
Cis	$98,85 \pm 3,05^c$
EGCG + Cis	$143,43 \pm 3,75^b$

a–c: Sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). One-way ANOVA *Post Hoc* LSD Test



Şekil 3.1. Gruplarda pankreas dokusu GSH aktivitesi sütun grafiği

a–c: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). One-way ANOVA *Post Hoc* LSD Test



Şekil 3.2. BSA (Bowin Serum Albumin) Standart Grafiği

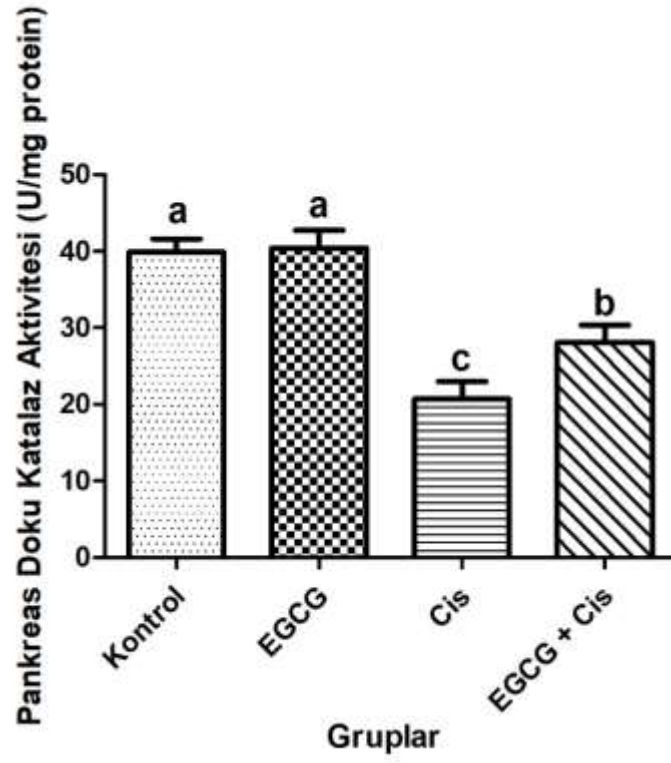
Pankreas dokusunda GSH $x=(y-0,0083)/0,0096$ formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. 'y' değeri 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülen GSH değeridir ($y = 0,0096x+0,0083$). GSH seviyelerinin en yüksek EGCG grubunda, en düşük Cis grubunda olduğu, kontrol ve EGCG grupların da GSH seviyelerinin birbirine yakın olduğu ve aralarındaki farkın önemli olmadığı ($p>0,05$), Cis ve Cis+EGCG gruplarında ise GSH seviyelerinin daha düşük olduğu ve diğer gruplarla arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). EGCG'nin sisplatinin neden olduğu düşük GSH seviyesini artırdığı görülmüştür. Bu bulgular, sisplatinin antioksidan savunma sistemi üzerinde hasar oluşturduğunu, bu hasara karşı EGCG'nin koruyucu etki sağladığını göstermektedir (Tablo 3.1, Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).

3.2. Katalaz Ölçüm Sonuçları

Tablo 3.2. Pankreas dokusu CAT aktivite seviyesi

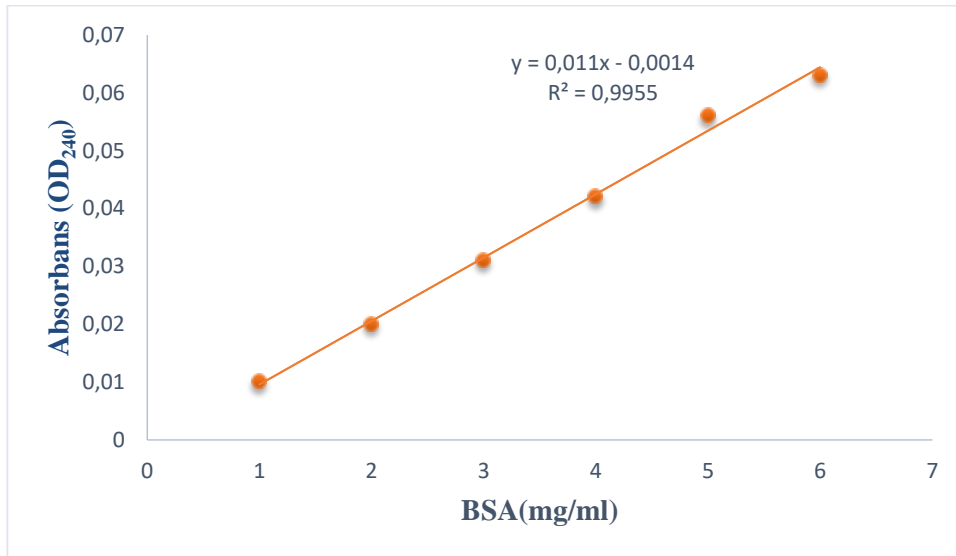
Gruplar	Pankreas Dokusu CAT Aktivite Seviyesi (U/mg protein)
Kontrol	$39,87 \pm 3,21^a$
EGCG	$40,41 \pm 3,48^a$
Cis	$20,69 \pm 2,02^c$
EGCG + Cis	$28,05 \pm 3,28^b$

a-c: Sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$). One-way ANOVA *Post Hoc* LSD Test



Şekil 3.3. Gruplarda pankreas dokusu CAT aktivite seviyesi sütun grafiği

a-c: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). One-way ANOVA *Post Hoc* LSD Test



Şekil 3.4. BSA standart grafiği

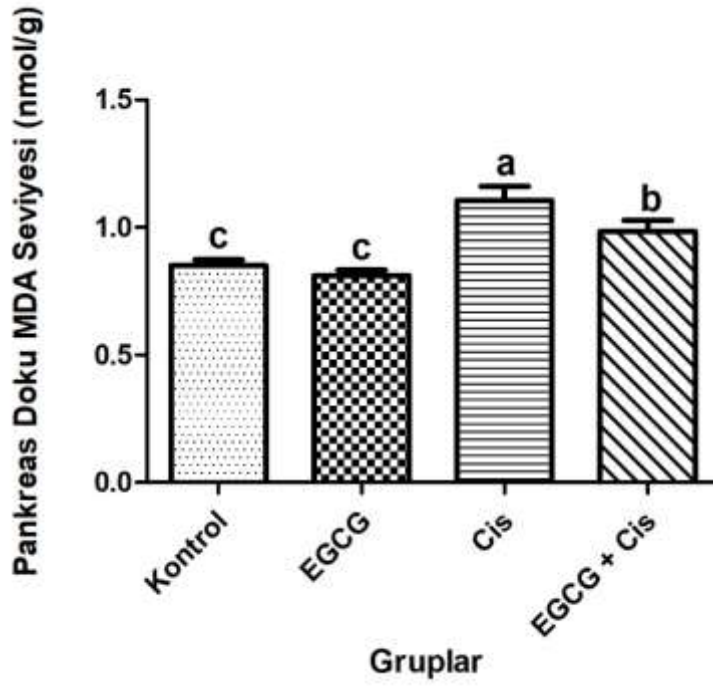
Pankreas dokusunda CAT hesaplaması ' $y=0,011x-0,0014$ ' formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda ölçülmüş ve CAT standart eğrisi çizilmiştir. CAT seviyelerinin en yüksek EGCG grubunda, en düşük Cis grubunda olduğu, kontrol ve EGCG grupların da CAT seviyelerinin birbirine yakın olduğu ve aralarındaki farkın önemli olmadığı ($p>0,05$), Cis ve Cis+EGCG gruplarında ise CAT seviyelerinin daha düşük olduğu ve diğer gruplarla arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). EGCG'nin sisplatinin neden olduğu düşük CAT aktivitesini artırdığı görülmüştür. Bu bulgular, sisplatinin antioksidan savunma sistemi üzerinde hasar oluşturduğunu, bu hasara karşı EGCG'nin CAT aktivitesini arttırarak koruyucu etki sağladığını göstermektedir (Tablo 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).

3.3. MDA Ölçüm Sonuçları

Tablo 3.3. Pankreas dokusu MDA seviyesi

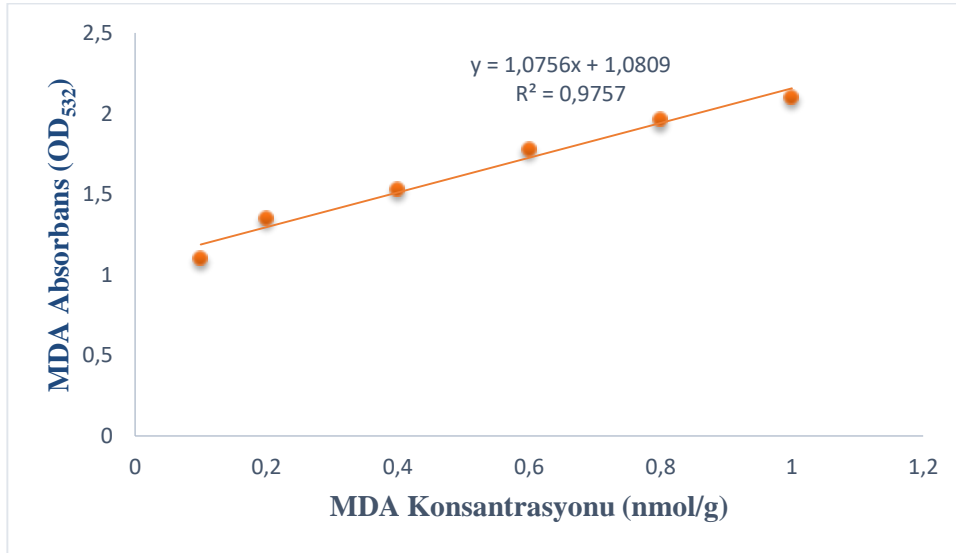
Gruplar	Pankreas Dokusu MDA Seviyesi (nmol/g)
Kontrol	$0,850 \pm 0,03^c$
EGCG	$0,810 \pm 0,03^c$
Cis	$1,139 \pm 0,25^a$
EGCG + Cis	$1,006 \pm 0,17^b$

a–c: Sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). One-way ANOVA *Post Hoc* LSD Test



Şekil 3.5. Gruplarda pankreas dokusu malondialdehit (MDA) aktivitesi sütun grafiği

a–c: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). One-way ANOVA *Post Hoc* LSD Test



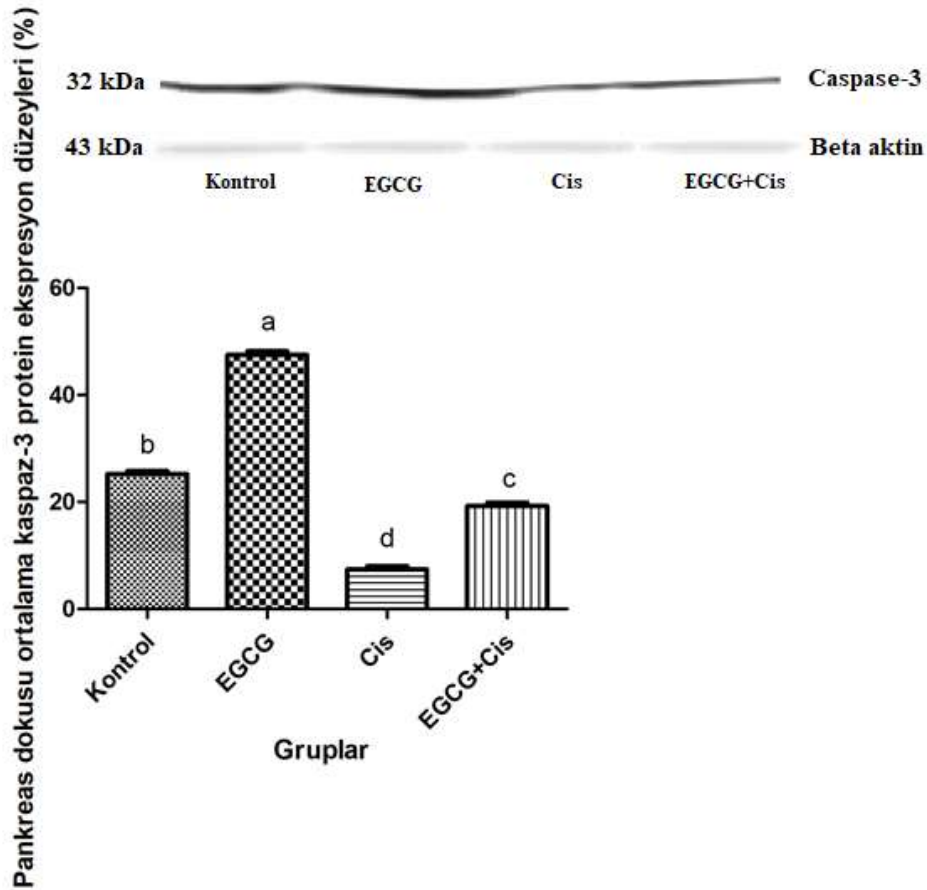
Şekil 3.6. Pankreas doku MDA standart grafiği

Pankreas dokusunun da MDA seviyesi $y=1,0756x-1,0809$ yararlanılarak hesaplanmış spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülerek elde edilen verilere göre MDA standart eğrisi oluşturulmuştur (Tablo 3.3, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6).

Pankreas dokusu MDA seviyesinin en yüksek Cis grubunda, en düşük EGCG grubunda olduğu, kontrol ve EGCG gruplarının MDA seviyelerinin birbirine yakın olduğu ve aralarındaki farkın önemli olmadığı ($p>0,05$), Cis ve Cis+EGCG grupları ile diğer iki grup arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Bulgularımız, EGCG'nin sisplatinin neden olduğu yüksek MDA seviyesini düşürdüğünü göstermektedir (Tablo 3.3, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6).

3.4. Apoptotik Markerlar: Kaspaz-3, IL-1 α , HO-1, IL-6 ve p53 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri

3.4.1. Kaspaz-3 Ekspresyon Düzeyleri

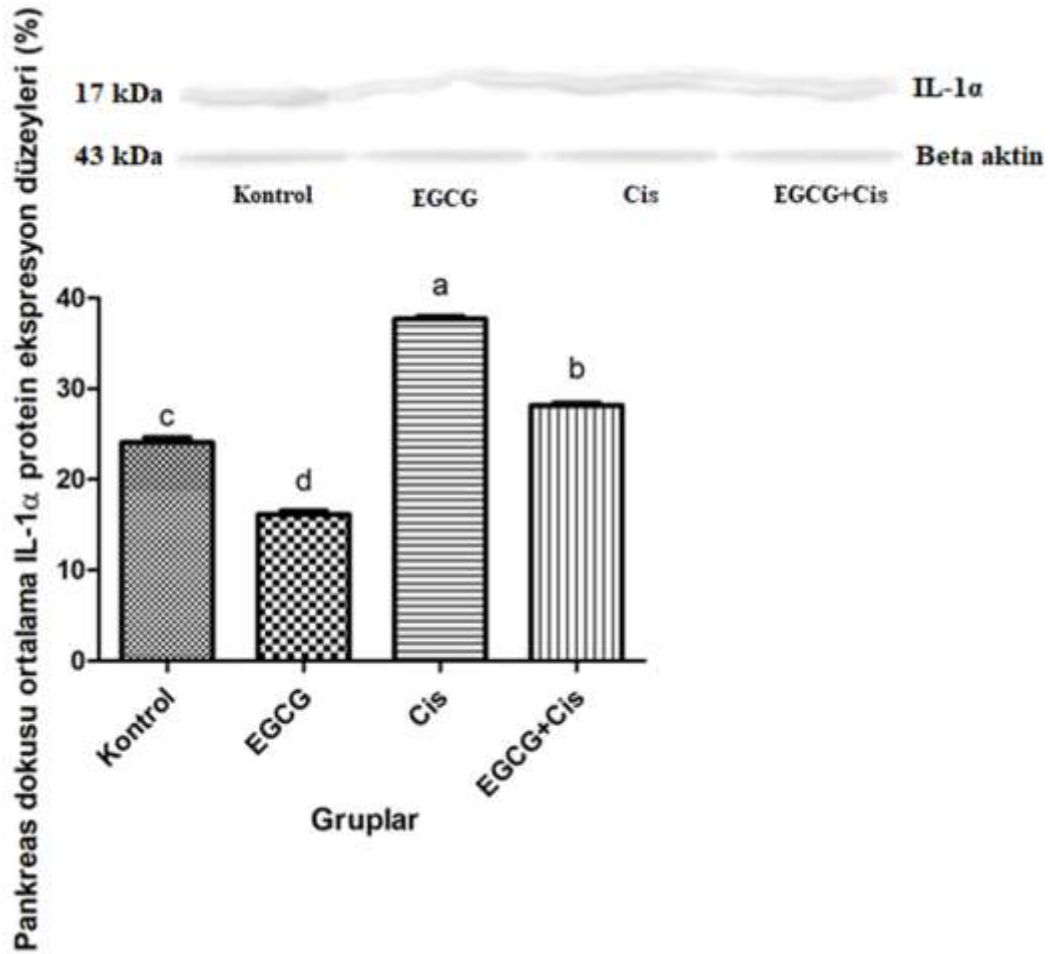


Şekil 3.7. Gruplarda kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri sütun grafiği

a-d: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). One-way DUNCAN *Post Hoc* LSD Test

Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesi değerleri incelendiğinde, EGCG grubunda en yksek seviyede bulunmuştur. EGCG grubuna kıyasla Cis verilen grupta önemli bir azalma belirlenmiştir ve aralarındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). EGCG ile tedavi edilen grupta, kaspaz-3 proteinin ekspresyon düzeyinin Cis uygulanan gruba göre önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.7). Bu sonuçlara göre, sisplatinin pankreatoksisiteye neden olduğu ve EGCG tedavisinin uygulanmasıyla pankreatoksisiteyi önemli oranda önleyebileceğini söyleyebiliriz.

3.4.2. IL-1 α Ekspresyon Düzeyleri

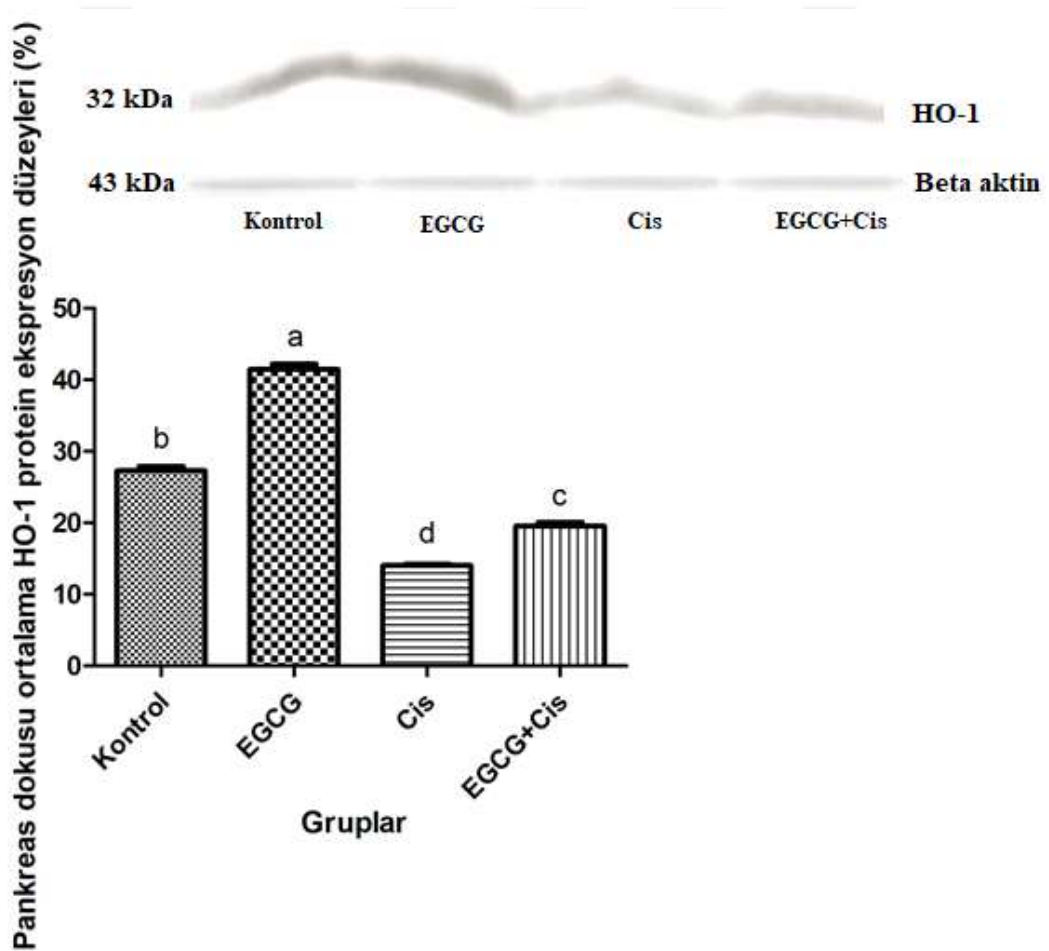


Şekil 3.8. Gruplarda IL-1 α protein ekspresyon düzeyleri sütun grafiği

a-d: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). One-way DUNCAN *Post Hoc* LSD Test

IL-1 α protein ekspresyon seviyesi düzeyinin, en yüksek Cis grubunda, en düşük EGCG grubunda olduğu, Cis ve EGCG grupları arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Kontrol ve EGCG +Cis grupları arasındaki protein ekspresyon seviyeleri birbirine yakın olduğu buna rağmen aradaki farkın önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). EGCG ile tedavi olan grupta IL-1 α proteinin ekspresyon seviyelerinin Cis uygulanan gruba göre önemli ölçüde azalma gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.8). Bu sonuçlara göre, Cis grubundaki IL-1 α seviyesindeki artış, enflamatuvar yanıtın oluştuğunu ve buna karşın EGCG tedavisinin pankreatoksisiteyi önemli ölçüde önleyebileceğini söyleyebiliriz.

3.4.3. HO-1 Ekspresyon Düzeyleri

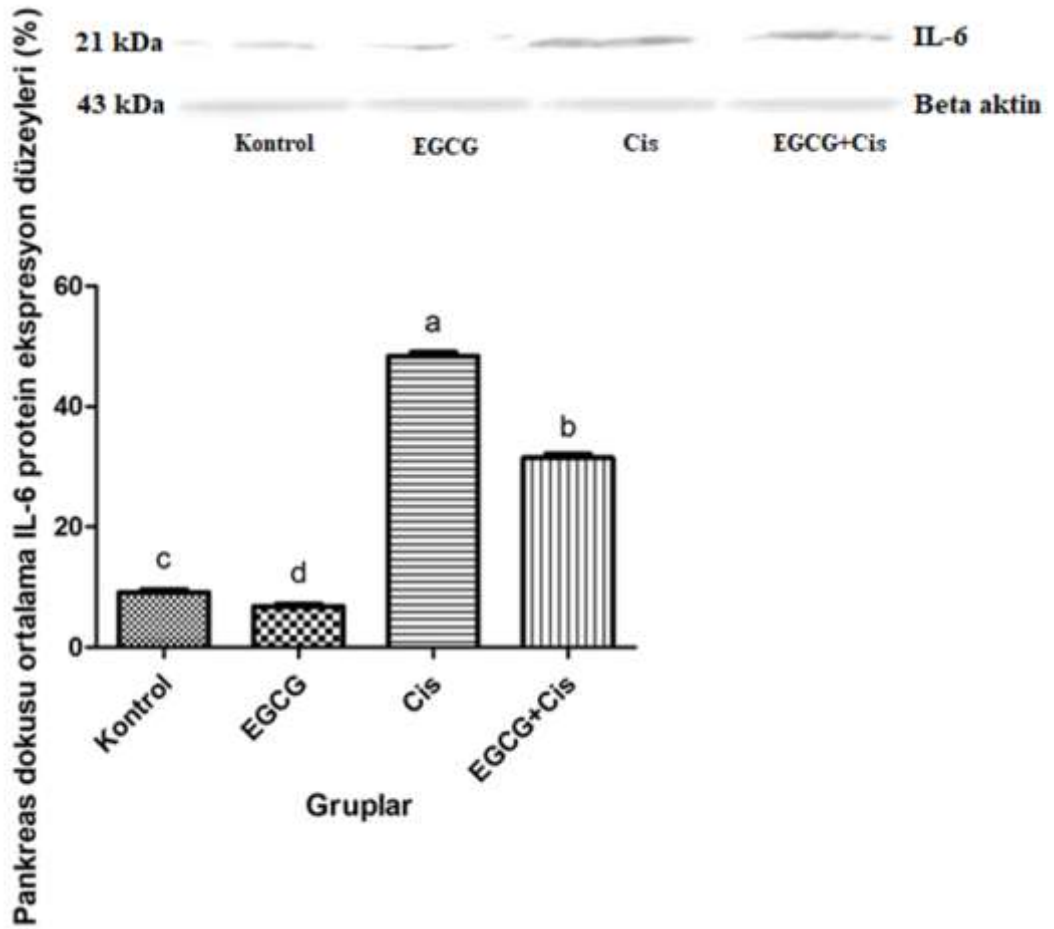


Şekil 3.9. Graplarda HO-1protein ekspresyon düzeyleri sütun grafiği

a-d: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). One-way DUNCAN *Post Hoc* LSD Test

HO-1 protein ekspresyon seviyesi düzeyinin, en yüksek EGCG grubunda, en düşük Cis grubunda ortaya çıktığı belirlenmiştir. EGCG grubunun protein ekspresyon seviyesi Cis grubuna göre daha yüksek değerde olduğu için arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Cis ve EGCG +Cis gruplarının protein ekspresyon seviyeleri yakın değerde ve arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). EGCG ile tedavi olan grupta HO-1 proteinin ekspresyon seviyesinin Cis uygulanan gruba göre arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.9). Bu sonuçlara göre, EGCG tedavisinin pankreatoksisiteyi önemli ölçüde önleyebileceğini söylenebiliriz.

3.4.4. IL-6 Ekspresyon Düzeyleri



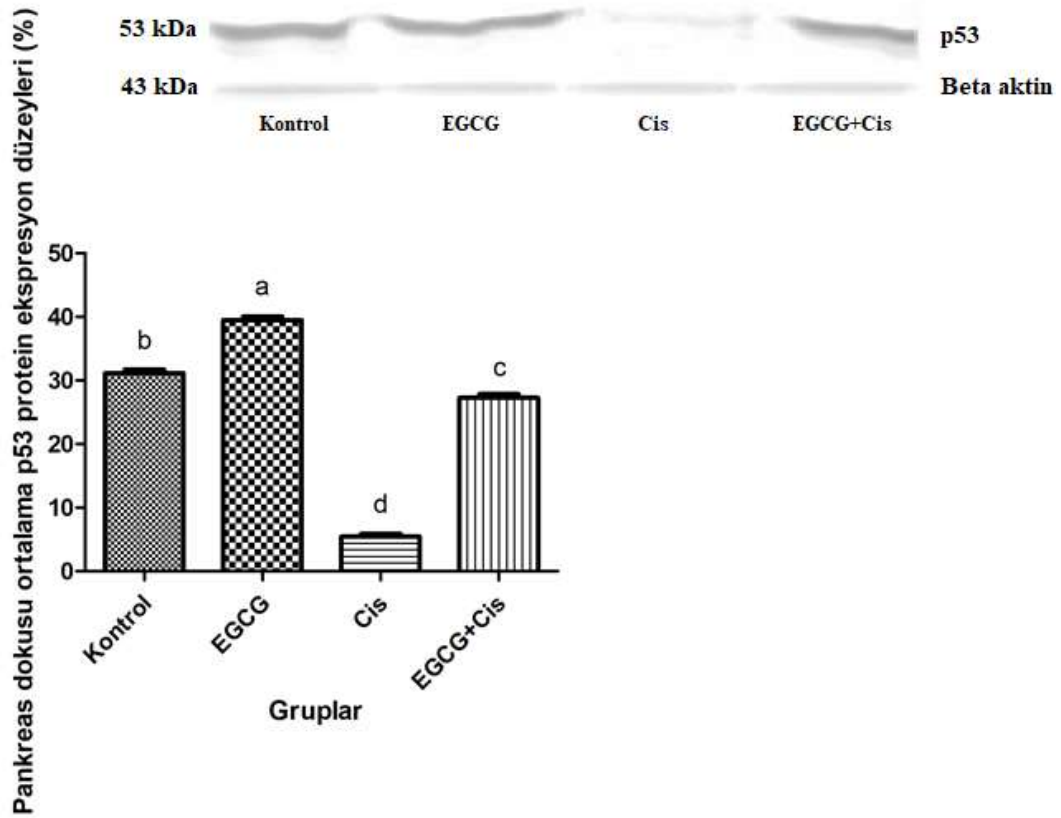
Şekil 3.10. Gruplarda IL-6 protein ekspresyon düzeyleri sütun grafiği

a-d: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). One-way DUNCAN *Post Hoc* LSD Test

IL-6 protein ekspresyon düzeyinin gruplar arasında, en yüksek değerinde Cis en düşük ise EGCG uygulanan grupta ortaya çıktığı gözlenmiştir. Cis grubuna kıyasla Cis+EGCG ile tedavi edilen grupta IL-6'nın ekspresyon düzeyinde azalma gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol grubunun

protein ekspresyon seviyesi EGCG grubuna göre daha yüksek değerde olduğu için arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 3.10). Sisplatinin IL-6 ekspresyon düzeyini artırarak doku içerisinde enflamasyona yol açtığı ve EGCG tedavisinin uygulanmasıyla IL-6 düzeyinin düşmesi sağlanıp oluşan pankreatoksisiteyi karşı önemli ölçüde antienflamatuar etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

3.4.5. p53 Ekspresyon Düzeyleri



Şekil 3.11. Gruplarda p53 protein ekspresyon düzeyleri sütun grafiği

a-d: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). One-way DUNCAN *Post Hoc* LSD Test

p53 protein ekspresyon seviyesi gruplar arasında en yüksek EGCG, en düşük değer ise Cis uygulanan grupta olduğu belirlenmiştir. EGCG grubunun protein ekspresyon seviyesi Cis uygulanan gruba göre daha yüksek değerde olduğu için arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$). EGCG ile tedavi olan grupta Cis uygulanan gruba göre p53 proteinin ekspresyon seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.11). Bu sonuçlara göre, EGCG grubundaki p53 seviyesinde meydana gelen artışın, enflamatuar yanıtın bir göstergesi olduğu ve EGCG tedavisinin pankreatoksisiteyi önemli ölçüde engelleyebileceğini söyleyebiliriz.

3.5. Histopatolojik Bulgular

Çalışmamızda pankreas dokusunda, kontrol ve EGCG grubunda belirgin bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır (Şekil 3.12, Şekil 3.13).

Sisplatin uygulanan gruptaki sıçanlarda, pankreas dokusu adacık hücrelerinde, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, Langerhans adacıklarında hidropik dejenerasyon ve konjesyonun olduğu belirgin şekilde gözlenmiştir. Pankreasın ekzokrin salgı yapan dokusunda ise fibrozis ve asini hücrelerinde şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu tespit edilmiştir (Şekil 3.14).

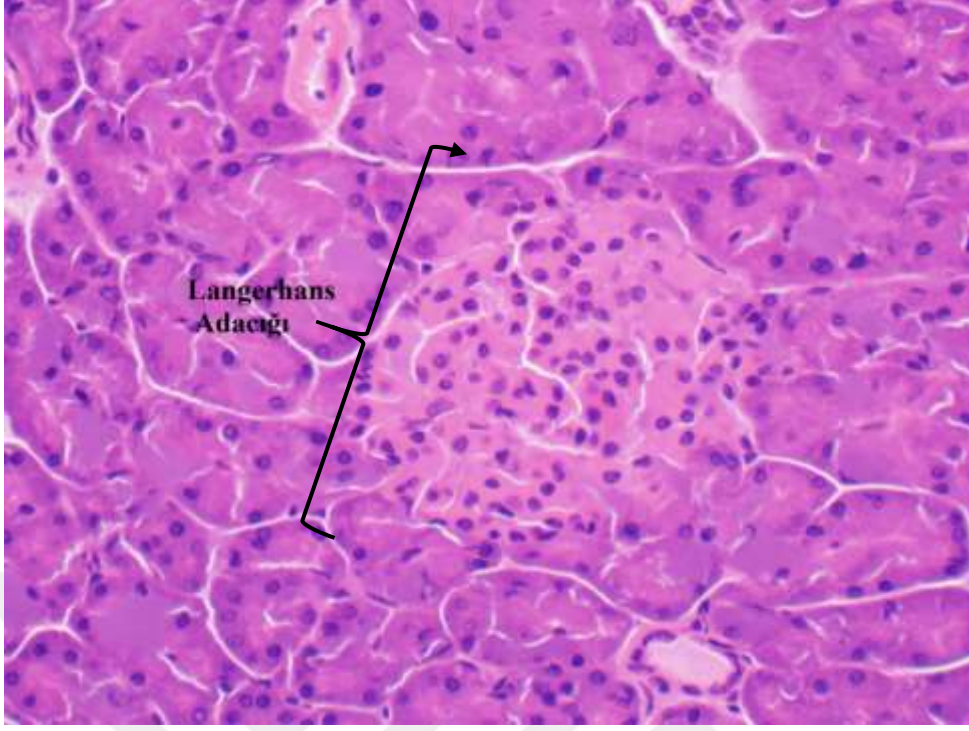
EGCG+Cis verilen tedavi gruplarında çoğunlukla normal histolojik görünüm olmakla beraber, birkaç olguda konjesyon ve Langerhans adacıklarında inflamatuvar hücre infiltrasyonu hafif şiddette olduğu belirlenmiş, fibrozis ise gözlenmemiştir. Ancak pankreas dokusu asini hücrelerinde inflamatuvar hücre infiltrasyonunun, hidropik dejenerasyonunun ve konjesyonun hafif şiddette olduğu görülmüştür (Şekil 3.15).

Tüm gruplarımızda nekrozun varlığına rastlanmamıştır (Tablo 3.4). Bulgularımız, EGCG tedavisinin, sisplatinin pankreas dokusunda yapmış olduğu hasarı azalttığını, böylece EGCG'nin tedavi edici ve iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

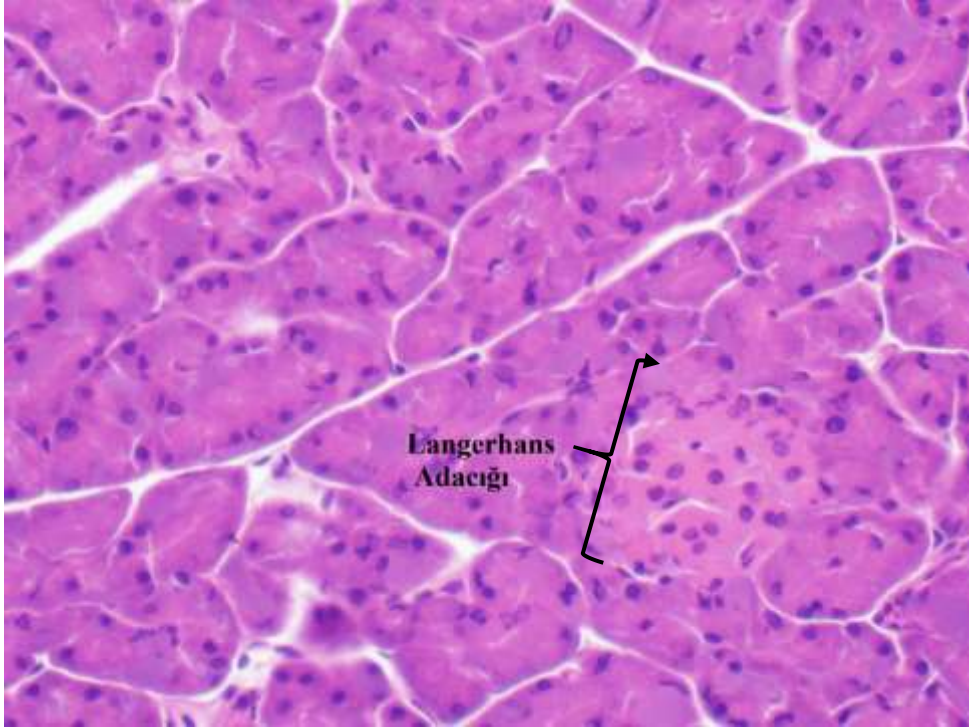
Tablo 3.4. Deney gruplarında morfolojik değişiklikler

GRUPLAR		İNFLAMATUAR HÜCRE İNFİLTRASYON			LANGERHANS ADACIKLARI		Asini Dilatasyon	
		Konjesyon	Fibrozis	Asini	Adacık	Hidropik Dejenerasyon		Nekroz
KONTROL	1.	-	-	-	-	-	-	-
	2.	-	-	-	-	-	-	-
	3.	-	-	-	-	-	-	-
	4.	-	-	-	-	-	-	-
	5.	+	-	-	-	-	-	-
	6.	-	-	-	-	-	-	-
	7.	-	-	-	-	+	-	-
EGCG	1.	+	-	-	-	-	-	-
	2.	-	-	-	-	-	-	-
	3.	-	-	-	-	-	-	-
	4.	-	-	-	-	+	-	-
	5.	-	-	-	-	-	-	-
	6.	-	-	-	-	-	-	-
	7.	+	-	-	-	-	-	-
CİSPLATİN	1.	++	-	-	++	++	-	+
	2.	+	-	-	+	+	-	-
	3.	+	+	-	++	++	-	+
	4.	++	-	-	+	+	-	+
	5.	+	-	-	++	+	-	+
	6.	+	-	+	+	+	-	+
	7.	+	+	-	+	+	-	+
EGCG + CİSPLATİN	1.	+	-	-	+	+	-	+
	2.	-	-	-	-	-	-	-
	3.	+	-	-	-	-	-	-
	4.	+	-	-	+	+	-	-
	5.	-	-	-	+	+	-	+
	6.	-	-	-	-	-	-	-
	7.	-	-	-	-	-	-	-

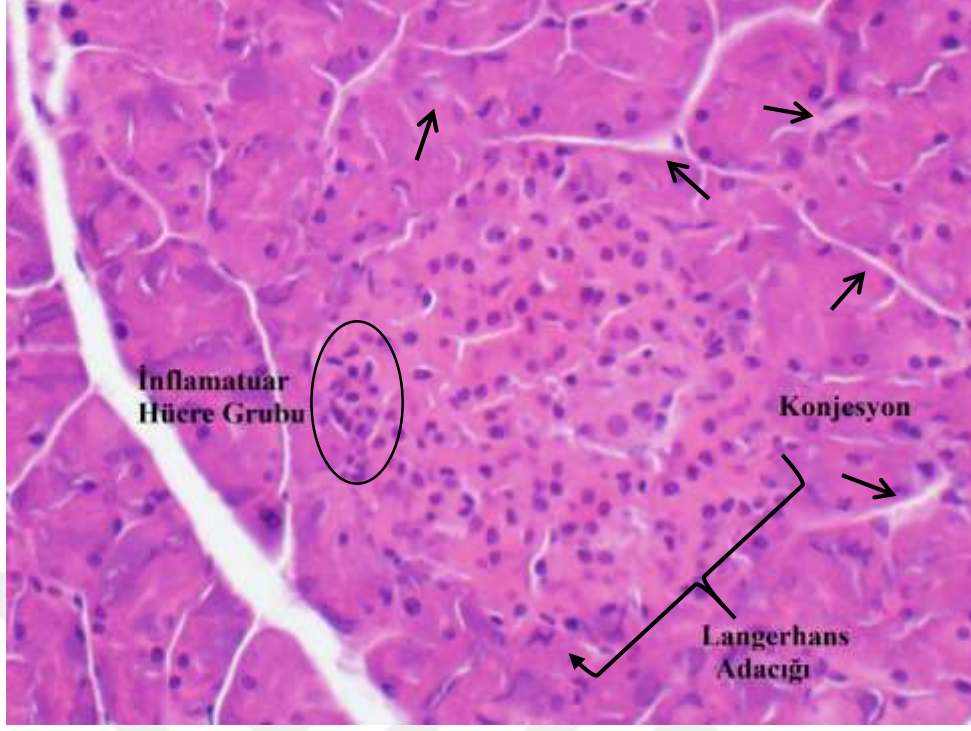
- : Yok, -/+ : hafif, + : orta, ++ : şiddetli



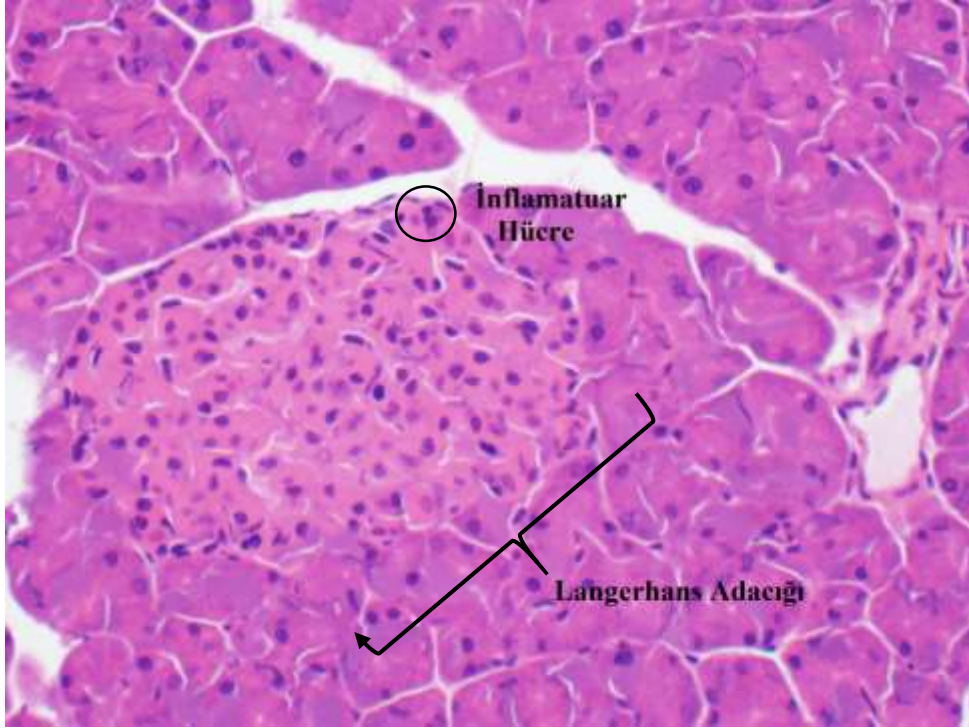
Şekil 3.12. Kontrol grubu pankreas dokusu histolojisi ve Langerhans adacığı (HEx400)



Şekil 3.13. EGCG grubu pankreas dokusu histolojisi ve Langerhans adacığı (HEx400)



Şekil 3.14. Cis grubu pankreas dokusu histolojisi, Langerhans adacığı, inflamatuvar hücre grubu (daire) ve konjesyon (ok) (HEx400)



Şekil 3.15. EGCG+Cis grubu pankreas dokusu histolojisi, Langerhans adacığı ve inflamatuvar hücre (daire) (HEx400)

Yeşil çay, yapısında protein, karbonhidrat, lipid, vitamin ve polifenollerin bulunduğu oldukça zengin içeriğe sahip bir bitkidir. Bu muhteşimlik, büyük oranını polifenoller oluşturur ve EGCG yeşil çayda en bol bulunan kateşindir. EGCG, antiinflamatuvar, antiartritlik, antibakteriyel, antikarsinojenik, antioksidan, antiviral ve antimitojenik etkileriyle çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir [42]. Ayrıca EGCG'nin hücre içi sinyalleşme yolunu modüle ederek, akciğer, prostat, mide ve pankreas gibi çeşitli kanser türlerine karşı kemoterapötik etki potansiyelinde olduğu gösterilmiştir [10].

EGCG'nin pankreas karsinomu üzerindeki antiproliferatif etkisinin araştırıldığı çalışmada, hücre döngüsünün durmasını daha erken bir aşamada gerçekleştirerek apoptozu indüklediği bildirilmiştir [37].

Zhang vd. [28], EGCG'nin, COVID-19'a karşı koruyucu etkilerini araştırmışlardır. EGCG antioksidan aktivitesiyle, Nrf2'yi aktive ederek, virüsün hücre girişinde etkili olan anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE2)'yi baskıladığını belirtmiştir. SARS-CoV-2 ile uyarılan mitokondriyal ROS'a (SARS-CoV-2 replikasyonunu destekleyen) ve nötrofil hücre dışı tuzaklarının neden olduğu ROS patlamasına karşı koruma sağladığını ifade etmiştir. EGCG'nin, potansiyel olarak SARS-CoV-2'nin yaşam döngüsünü engellediğini, sitokin fırtınası ile ilişkili akut akciğer hasarı/akut solunum sıkıntısı sendromu için koruyucu olduğunu, trombositleri aktive ederek tromboza ve akciğer fibrozuna karşı koruyucu etkilere sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Yeşil çayın bazı faktörler tarafından indüklenen pankreas hücreleri üzerinde etkisinin araştırıldığı çalışmada, EGCG'nin diyabetik hastalarda insülin üretimini arttıran, β -hücrelerinin fonksiyonlarını düzenleyen, demir şelatlayıcı ve ROS temizleyici etkiler gösterdiği belirtilmiştir. Sonuçta EGCG'nin doza bağlı olarak, demir ve ROS seviyelerini azalttığı bulunmuştur [125].

Yadav [7], Cis'in sıçanların, pankreas ve testislerini nasıl etkilediğini araştırdığı çalışmasında, pankreas dokusunda vazokonstriksiyon ve mikro infiltrasyon gözlendiğini belirtmiştir. Ayrıca lipid peroksidasyonunun arttığını ve glutasyon seviyesinin azaldığını tespit etmiştir. Bu bulguların, sisplatinin, oksidatif stres nedeniyle diyabet ve testis toksisitesine neden olabileceğini ifade etmiştir.

Bulgularımız sıçanlara uygulanan sisplatinin pankreatoksisiteye neden olduğunu göstermektedir. Kanser tedavisinde kullanılan bu ilacın normal hücrelere olacak hasarı ileri bir boyut kazanmadan, EGCG ile yapılan tedavilerle iyileşme sağlanabileceği ve tedaviyi olumlu bir yönde ilerletebileceğini göstermiştir.

Aslan vd. [126], karbon tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulan pankreas hasarına karşı ellagik asidin (EA) tedavi edici etkisini araştırmışlar ve EA'nın, pankreatik yıldız (PSC) ve β -pankreas hücreleri üzerinde antidiyabetik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. EA'nın, EA + CCl₄ grubunda kaspaz-3 ve Nrf-2 protein ifadeleri, katalaz aktiviteleri ve GSH düzeylerinde artışa,

VEGF, Bcl-2, NF-κB ve Akt protein ifadelerinde ve MDA düzeylerinde ise azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Tang vd. [10], pankreas kanseri hücrelerinde EGCG'nin, STAT3 sinyal yoluna müdahale ederek tümör hücrelerini baskıladığını göstermişlerdir. EGCG, kanser hücrelerinin göçünü ve istilasını engellemektedir. Bu engeli AsPC-1 ve PANC-1 hücrelerinde doza bağlı bir şekilde kaspaz-3 aktivitesini indükleyerek gerçekleştirmiştir. Bu bulgulara göre, EGCG'nin kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu indükleyebileceğini belirtmişlerdir.

Bulgularımıza göre kaspaz-3 aktivitesinin, en yüksek EGCG grubunda, en düşük Cis grubunda olduğu ve aralarındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). EGCG ile tedavi edilen grupta, kaspaz-3'ün arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, sisplatinin kaspaz-3'ü inaktivite ederek pankreatoksisiteye neden olduğu görülmüştür. EGCG tedavisinin pankreatoksisiteyi önemli ölçüde önleyebileceği söylenebilir. Sonuçlarımız daha önce yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir [10].

Hoffmann vd. [127], yaptıkları çalışmada ise EGCG'nin, pankreatik adenokarsinomda tümörjenik faktörleri inhibe eden IL-1 ekspresyonunu azaltarak indükleyici etki gösterdiği ve böylece kemopreventif özelliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir.

IL-1α'nın, pankreasın β-hücrelerinin fonksiyonuna ve glikoz dengesine katkısını araştırmak için yapılan in vivo çalışmaya göre, hem erkek hem de dişi sıçanlarda glikozla uyarılan insülin sekresyonunu ve β-hücresi kütlelerini destekleyerek, glukoz homeostazında önemli fizyolojik bir rolü olduğu sonucuna varılmıştır [83].

Xu vd. [128], pankreas kanseri hücreleri ve stromal hücreler arasındaki etkileşimler tarafından teşvik edilen metastatik süreçte hepatosit büyüme faktörü ve IL-1 α'nın rolünü araştırmışlardır. IL-1α ve hepatosit büyüme faktörünün, kanser hücrelerinin proliferasyonu ve anjiyogenezde önemli bir rolü olduğunu, kanser hücreleri tarafından üretilen IL-1α'nın hepatosit büyüme faktörünün salgılanmasını teşvik ettiğini ve pankreas kanseri hücrelerinde metastatik gücü arttırdığını belirtmişlerdir.

IL-1α aşırı ekspresyonunun pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) hastalarında kötü sonuçlara sebep olabileceğinin araştırıldığı çalışmada, enflamasyonun PDAC hastalığı için destekleyici bir özellik olduğu ve IL-1α tarafından yönlendirildiği belirtilmiştir. IL-1α, tümör hücreleri tarafından eksprese edilir ve salgılanır, etkisini kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF) üzerinde gösterir. Bu bulgular, IL-1α ekspresyonunu ve PDAC'deki aktivitesinin inhibisyonunu, CAF'lerdeki enflamatuvar faktörlerin seviyelerini büyük ölçüde azalttığını ve IL-1α'nın etkisini azaltmanın da, tümör yayılımını düşürmeye yarayabileceğini ifade etmişlerdir [82].

Çalışmamızda IL-1α protein ekspresyon seviyelerinde, Cis grubuna kıyasla EGCG verilen grupta önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir. Kontrol ve EGCG+Cis grupları arasındaki farkın önemli olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). EGCG'nin IL-1α proteinin ekspresyon düzeyini önemli

oranda azalttığı tespit edilmiştir. Bulgularımız, EGCG'nin tedavide olumlu yönde etki ettiğini göstermektedir.

Zhang vd. [129], TNF- α inhibisyonu ve IL-10'un artmasıyla oluşan pankreas hasarına HO-1'in etkisini araştırmışlardır. HO-1 indüksiyonu, oksidatif stresi azaltıp, akut pankreatitte IL-10 ekspresyonunu arttırmıştır. Ayrıca sistemik enflamatuvar yanıtı ve organ hasarını azalttığından, yeni ve etkili bir terapötik tedavi sağlayabileceğini belirtmişlerdir.

EGCG'nin, Nrf2 ekspresyonuna odaklanarak fare pankreas adacıkları üzerindeki koruyucu etkilerinin incelendiği çalışmada, Nrf2'nin EGCG tarafından indüklendiğini ve antioksidan enzim olan HO-1 ve ROS üretiminin baskılanmasıyla pankreas adacıklarının canlılığının korunduğu tespit edilmiştir [130].

HO-1'in, pankreasında içinde bulunduğu çeşitli organlarda koruma sağlamak için stresle indüklenebilir bir enzim olduğunun araştırıldığı çalışmada, sitoprotektif, anti-enflamatuvar ve anti-apoptotik aktiviteleri ile enflamatuvar hastalıklar için önemli olabileceği belirtilmiştir. Ağır metaller, şok ve ROS gibi oksidatif strese neden olan uyarıların, HO-1'in artışına neden olduğu tespit edilmiştir [131].

Zeytinyağından elde edilen hidrokstitirozol (HT), anti-enflamatuvar ve antioksidan özellikler gösteren bir bileşiktir. Bu bileşiğin akut pankreatit üzerine etkisinin incelendiği çalışmada, dişi farelere uygulanan HT tedavisi sonrası, pankreas dokusunda IL-1 β ve IL-6 düzeyleri azalırken, Nrf2 ve HO-1 düzeylerinin arttığı belirlenmiştir [132].

Çalışmamızda HO-1 seviyesinin, en yüksek EGCG, en düşük Cis grubunda olduğu belirlenmiştir. EGCG grubunun HO-1 seviyesi, Cis grubuna göre daha yüksek değerlerde ve aralarındaki farkın önemli olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Cis ve EGCG+Cis gruplarının protein ekspresyon seviyeleri yakın değerlerde ve arasındaki farkın önemli olmadığı bulunmuştur ($p < 0,05$). Tedavi grubunda HO-1 proteinin seviyesinin, Cis uygulanan gruba göre arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, EGCG'nin anti-enflamatuvar etkisinin pankreatoksisiteyi önemli ölçüde önleyebileceği şekilde yorumlanabilir.

Pankreas adacıklarında IL-6 fonksiyonunun incelendiği çalışmada, IL-6 pankreas α hücrelerinin düzenleyicisi olarak ifade edilmiştir. Ayrıca, pro-glukagon üretimini ve glukagon sekresyonunu düzenleyerek α hücre proliferasyonunu arttırdığı ileri sürülmüştür. Fazla miktarda glikoz ve serbest yağ asidi palmitat tarafından indüklenen α hücrelerinin, apoptozu inhibe ettiği belirtilmiştir [133].

IL-6'nın, insan pankreatik stellat hücre aktivasyonuna katkısının araştırıldığı çalışmada, bu proteinin IL-6R ve STAT3 yolunun aktivatörü yoluyla pankreatik stellat hücrelerde TGF- β 1 üretimini indüklediği ileri sürülmüştür. Böylece TGF- β 1 sinyal yolunun yukarı regülasyonu yoluyla pankreatik yıldız hücre aktivasyonunu ve kollajen 1 sentezini desteklediği belirtilmiştir [134].

Tip 1 diyabet gelişimindeki rolünün araştırıldığı çalışmada, IL-6'nın, oksidatif stresi azaltarak β hücreleri için koruyucu bir rolü olduğu bulunmuştur. IL-6 ekspresyonunun, tip 1 diyabetli hastaların insülin eksikliği olan adacıklarında oldukça azaldığı gözlenmiştir [135].

Cao vd. [136], EGCG'nin pankreastaki enflamasyon üzerine etkisini araştırmışlardır. Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçan grubuna EGCG verildiğinde, pankreaslarında insülin direnç değerinin büyük ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca bu grubun IL-6 seviyeleri yükselirken, diğer faktörleri azalmıştır. Buna göre EGCG'nin enflamasyonu baskıladığı ve sıçanların pankreasında insülin duyarlılığını arttırdığı kanısına varmışlardır.

Çalışmamızda, IL-6 protein ekspresyon düzeyinin, Cis grubunda oldukça fazla sentezlendiği görülmüştür. Cis+EGCG grubuna kıyasla Cis grubunda önemli bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). EGCG verilen grupta ise pankreas doku IL-6 ekspresyon düzeyinde anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Sisplatinin IL-6 düzeyini artırarak doku içerisinde inflamasyona yol açtığı ve EGCG tedavisinin uygulanmasıyla IL-6 düzeyinin düşmesini sağlayarak antiinflatuar etki edebileceğini söyleyebiliriz. Bu sonuçlar, sisplatinin inflamasyon yanıtı arttırdığını dolayısıyla inflamasyonun ileri ve ciddi bir boyuta gelmesine yol açtığını göstermektedir. Bulgularımız daha önceki çalışmalarla büyük oranda benzerlik göstermektedir.

Ahmed vd. [137], streptozotosin (STZ)'nin diyabete bağlı nefropati üzerine enalapril ve parikalsitol'ün etkisini değerlendirmişlerdir. Diyabetik sıçanlarda p53 ve kaspaz-3 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını, enalapril ve parikalsitol ile tedavi sonucunda azaldığını belirtmişlerdir. Ayrıca anti-apoptotik protein Bcl-2 ekspresyonunun arttığını tespit etmişlerdir. Enalapril ve parikalsitolün birlikte verilerek oluşan eşzamanlı etkisinin, bunların tek başına olan etkisine göre p53 ve kaspaz-3 ekspresyonunu azaltmada daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Diyabetin 3 ana nedeni, insülin üretimindeki eksiklikler, glikoz homeostazının bozulması ve insülin direncinin gelişimidir. p53'ün bu yollar üzerinde etkisinin önemli olduğunun belirtildiği çalışmada, tip 1 ve 2 diyabetin sebeplerinden biri pankreas β hücrelerinin işlev bozukluğu olduğu vurgulanmıştır. Bu hücreler, kan dolaşımına insülin salgılamaktan sorumludur ve bu da, glikoz alımını uyararak dolaşımdaki glikoz seviyesini düşürmektedir. Pankreatik β hücre fonksiyonunun kaybı, insülin sekresyonunu azaltır ve diyabet ile sonuçlanır. Sinyal yolları, pankreatik β hücre fonksiyonunu düzenlemek için p53 üzerinde birleşirler. p53'ün, yağ birikimini azaltarak diyabeti engellediği belirtilmiştir [138].

EGCG'nin erkek sıçanlarda Doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı oksidatif stres, enflamatuar ve apoptotik belirteçler üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmada, EGCG ile tedavinin Doksorubisin kaynaklı histopatolojik değişikliklere karşı koruma sağladığı, glutasyon tüketimi, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerini azalttığı bulunmuştur. Doksorubisinin, NF- κ B, p53, kaspaz-3, -12 ekspresyonunu azalttığı, buna karşılık EGCG tedavisinin ise bu etkileri arttırdığı belirtilmiştir [139].

Bulgularımız, p53 seviyesinin en yüksek EGCG, en düşük ise Cis uygulanan grupta olduğu belirlenmiş ve bu iki grup arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Tedavi grubunda, Cis uygulanan gruba göre p53 seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.11). EGCG grubunda p53 seviyesindeki artış, inflamatuvar yanıtının oluştuğunu göstermektedir. EGCG tedavisinin pankreatoksisiteyi önemli ölçüde önleyebileceğini söyleyebiliriz. Bulgularımız daha önce yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir [139].

Khan ve Mukhtar [139], tip 2 diyabette EGCG'nin anti-diyabetik etkisini araştırmışlardır. Diabetes mellitus (DM), farelerde mekanizmayı bozarak, yara iyileşmesinin gecikmesine neden olabilmekte ve yara iyileşme sürecini kısalttığını belirtmişlerdir. EGCG ile tedavi sonrasında, SOD ve GSH seviyelerinde artış, ROS, MDA seviyelerinin de ise azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca EGCG'nin, adiposit farklılaşmasını inhibe ettiğini, oksidatif stresin baskılanması ve mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesi yoluyla insülin direncinin düzenlendiğini gözlemlemişlerdir.

Sıçanlarda emosyonel stresine karşı oluşan pankreas hasarında EGCG'nin potansiyel koruyucu etkilerinin araştırıldığı histolojik çalışmada, EGCG grupları ve kontrol gruplarına göre stres oluşturulan gruplarda, IL-1 β , IL-6, MDA seviyelerinin daha yüksek, GSH, SOD ve CAT seviyelerinin ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. EGCG'nin, anti-diyabetik ve anti-oksidatif stres özellikleri sebebiyle emosyonel strese karşı koruyucu bir ajan olduğu vurgulanmıştır [140].

CCl₄ ile oluşturulan testis hasarına karşı Ellagik asit (EA)'in koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada, EA'nın, oksidatif hasarı azaltarak kansere karşı etkili bir ilaç olabileceği belirtilmiştir CCl₄ grubundaki, kaspaz-3 ve Nrf-2 protein sentezi seviyeleri EA + CCl₄ grubu ile karşılaştırılmıştır. EA + CCl₄ grubunda bu protein seviyeleri artarken, VEGF, Bcl-2, NF- κ B ve Akt protein sentezi seviyeleri azalmıştır. Ayrıca GSH seviyeleri ve CAT aktivitesi yükselirken, MDA seviyesi azalmıştır [141].

Aslan vd. [142], pankreas dokusunda florürün neden hasara karşı arı sütü (RJ)'nin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Kontrol grubu ve RJ grupları karşılaştırıldığında RJ, Bax, kaspaz-3 ve kaspaz-6'nın ekspresyonunda artışa NF- κ B ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonlarında ise azalışa neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca RJ, pankreas hasarında GSH seviyesini ve CAT aktivitesini arttırdığı, MDA seviyesini ise azalttığı bulunmuştur.

Oleuropein'nin sıçanlarda Cis ile indüklenen pankreas toksisitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, Cis'in dokudaki total oksidatif stres, MDA ve 8-OHdG düzeyini kontrol grubuna göre önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. Ayrıca pankreasta ciddi doku hasarları tespit edilmiştir. Yüksek dozda verilen OLE'nin, dokularda 8-OHdG oluşumlarını ve MDA düzeyini önemli ölçüde azalttığı ifade edilmiştir [4].

Çalışmamızda, GSH seviyesinin en yüksek EGCG grubunda, en düşük Cis grubunda olduğu, Cis ve tedavi grupları arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). EGCG'nin

sisplatinin neden olduğu düşük GSH seviyesini artırdığı görülmüştür. Bulgularımız, sislptinin neden olduğu hasara karşı EGCG'nin antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Bulgularımızda, MDA seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak büyük farklılıklar görülmektedir. En yüksek seviye Cis, en düşük ise EGCG grubunda gözlenmiştir. Tedavi grubunun MDA düzeyi Cis grubuna göre daha düşük çıkmıştır. Bu iki grup arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark vardır ($p<0,05$). Sonuç olarak EGCG'nin, pankreas dokusunda MDA düzeyini düşürerek, sislptinin neden olduğu hasarı tedavi etmede etkin bir role sahip olduğunu söyleyebiliriz [4].

Bulgularımızda, CAT aktivitesinin EGCG grubunda en yüksek, Cis grubunda ise en düşük olduğu görülmüştür. Cis ve tedavi grupları arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). EGCG uygulamasının düşük CAT aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir.

Bulgularımızda, sislptinin, antioksidan savunma sistemlerinden MDA seviyesini artırdığı, GSH ve CAT aktivitesini azalttığını ve böylece oksidatif metabolizmayı aktifleştirdiğini, antioksidan sistemlerinin bozulmasına ve hasara yol açtığını göstermiştir. EGCG'nin ise antioksidan etki göstererek, sislptin kaynaklı hasara karşı koruyucu olduğunu göstermiştir [4, 140, 142].

4. SONUÇLAR

Bu yüksek lisans çalışmasının sonuçları değerlendirildiğinde, erkek sıçanlarda cisplatin kaynaklı oluşturulan pankreas hasarına karşı EGCG'nin tedavi edici ve iyileştirici etkisi konusunda oldukça güçlü bir madde olduğunu söyleyebiliriz.

- ✓ Bu sonuçları destekleyen biyokimyasal incelemelere göre; pankreas dokusunda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyesinin, kontrol ve EGCG gruplarında anlamlı bir farklılık gözlenmemiş, Cis verilen hasar gruplarında artış, EGCG+Cis verilen tedavi gruplarında ise azaldığı gözlenmiştir. Pankreas dokusunda antioksidan savunma mekanizmasının bir göstergesi olan GSH seviyesinin, Cis verilen hasar gruplarında azaldığı, EGCG+Cis verilen tedavi gruplarında ise arttığı gözlenmiştir. Pankreas dokusunda CAT aktivitesinin, Cis verilen hasar gruplarında azaldığı, EGCG+Cis verilen tedavi gruplarında ise arttığı gözlenmiştir.
- ✓ Moleküler biyolojik analiz incelemelere göre; kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyinin kontrol, EGCG ve EGCG+Cis gruplarında arttığı, Cis verilen hasar gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar kaspaz-3'ün doku kayıplarının iyileşme sürecinde dokuların normal hallerini kazanmalarını sağladığı tespit edilmiştir. IL-1 α protein ekspresyon düzeyinin EGCG+Cis verilen tedavi gruplarında azaldığı, Cis verilen hasar gruplarında anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar IL-1 α 'nın enfeksiyona ve zarar verici enflamasyona sebep olduğunu ortaya koymuştur. HO-1 protein ekspresyon düzeyinin EGCG+Cis verilen tedavi gruplarında arttığı, Cis verilen hasar gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar hücrel stres durumlarında antioksidan ve oksidan homeostazının korunmasına yardımcı olduğu tespit edilmiştir. IL-6 protein ekspresyon düzeyinin EGCG+Cis verilen tedavi gruplarında azaldığı, Cis verilen hasar gruplarında anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar IL-6'nın enflamasyonun artmasında etkili olduğunu ortaya koymuştur. p53 protein ekspresyon düzeyinin kontrol, EGCG ve EGCG+Cis gruplarında arttığı, Cis verilen hasar gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar p53'ün genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek hücrel stresi ortadan kaldırdığı ortaya koymuştur.
- ✓ Sisplatin toksisitesi pankreas dokusunda fonksiyonel ve histopatolojik yönden bozukluklar oluşturarak etkisini göstermiştir. Sisplatin uygulanan gruptaki sıçanlarda, pankreas dokusu adacık hücrelerinde, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, Langerhans adacıklarında hidropik dejenerasyon ve konjesyonun olduğu belirgin şekilde gözlenmiştir. Pankreasın ekzokrin salgı yapan dokusunda ise fibrozis ve asini hücrelerinde şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu tespit edilmiştir. EGCG+Cis

verilen tedavi gruplarında çoğunlukla normal histolojik görünüm olmakla beraber, birkaç olguda konjesyon ve Langerhans adacıklarında inflamatuvar hücre infiltrasyonunun hafif şiddette olduğu belirlenmiş, fibrozis ise gözlenmemiştir. Ancak pankreas dokusu asini hücrelerinde inflamatuvar hücre infiltrasyonunun, hidropik dejenerasyonunun ve konjesyonun hafif şiddette olduğu görülmüştür. Tüm gruplarımızda nekrozun varlığına rastlanmamıştır.

- ✓ Bulgularımız, EGCG tedavisinin, sisplatinin pankreas dokusunda yapmış olduğu hasarı azalttığını, böylece EGCG'nin tedavi edici ve iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



ÖNERİLER

Kemoterapi tedavisine uzun süreli maruz kalma ve ilacın dozuna bağı olarak hastalarda pankreas dokusunda hasar meydana getirebilmektedir. Sisplatinin bu yan etkisine karşı, antitümör, antioksidan ve antiapoptoz özelliklere sahip olan EGCG'nin, pankreotoksisiteyi azaltıcı etkiye sahip olduğu ve inflamasyon yaratan proteinleri baskılayarak pankreası koruduğı söylenebilir. EGCG kanser hücrelerinde apoptozu indükleme, proliferasyonu ve anjiyogenezi inhibe etme yeteneğı ile alternatif tedavi konusunda umut vaat etmektedir. Sisplatine maruz kalan pankreasın, iyileşme sürecinde EGCG, tedavi potansiyelini artırabilir. EGCG'nin, hasta sağlığını koruması ve tedavi edici yönü göz önüne alındığında takviye ilaç olarak kullanılabileceğı söylenebilir.



KAYNAKLAR

- [1] Saisho, Y. (2016). Pancreas volume and fat deposition in diabetes and normal physiology: consideration of the interplay between endocrine and exocrine pancreas, *The Review of Diabetic Studies: RDS*, 13(2-3), 132-147.
- [2] Yay, A., Onses, M.S., Sahmetlioglu, E., Ceyhan, A., Pekdemir, S., Onder, G.O., Sezer, G., Sarıca, Z.S., Aydın, F. (2020). Raman spectroscopy: A novel experimental approach to evaluating cisplatin induced tissue damage, *Talanta*, 207, 120343.
- [3] Ilic, M., Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer, *World Journal of Gastroenterology*, 22 (44), 9694-9705.
- [4] Bakir, M., Geyikoglu, F., Koc, K., Cerig, S. (2018). Therapeutic effects of oleuropein on cisplatin-induced pancreas injury in rats. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(3), 671-678.
- [5] Qi, L., Luo, Q., Zhang, Y., Jia, F., Zhao, Y., Wang, F. (2019). Advances in toxicological research of the anticancer drug cisplatin, *Chemical Research in Toxicology*, 32(8), 1469-1486.
- [6] Altıntaş, R. (2020). *Ratlarda Cisplatin Kaynaklı Nefrotoksisite Üzerine Karadut (Morus nigra L.) Ekstraktının Koruyucu Etkisinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [7] Yadav, Y., C. (2019). Effect of cisplatin on pancreas and testes in Wistar rats: Biochemical parameters and histology, *Heliyon*, 6(4), e03688.
- [8] Büyüksulu, N., Yiğitbaşı, T. (2015). Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres, *Clinical and Experimental Health Sciences*, 5(3), 197-203.
- [9] Fofelle, F., Fromenty, B. (2016). Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity, *Pharmacology Research & Perspectives*, 4(1), e00211.
- [10] Tang, S.N., Fu, J., Shankar, S., Srivastava, R.K. (2012). EGCG enhances the therapeutic potential of gemcitabine and CP690550 by inhibiting STAT3 signaling pathway in human pancreatic cancer, *Plos One*, 7(2), e31067.
- [11] Babu, P.V. A., Liu, D., Gilbert, E.R. (2013). Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(11), 1777-1789.
- [12] Almatroodi, S.A., Almatroudi, A., Khan, A.A., Alhumaydhi, F.A., Alsahli, M.A., Rahmani, A.H. (2020). Potential therapeutic targets of epigallocatechin gallate (EGCG), the most abundant catechin in green tea, and its role in the therapy of various types of cancer, *Molecules*, 25, 3146.
- [13] <https://tr.wikipedia.org/wiki/Pankreas>, Erişim: 27 Aralık 2022.
- [14] Leung, P.S. (2010). *The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas: The RAS in the Pancreas*, Springer Science & Business Media, China.
- [15] <https://www.hurriyet.com.tr/kelebek/saglik/pankreas-nedir-vucudun-neresi-pankreas-iltihabi-ne-anlama-geliyor-41380004>, Erişim: 27 Aralık 2022.
- [16] Emir, C.A. (2016). *Periampuller Bölge Tümörlerinde Mirnaların Rolünün Araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- [17] Pandol, S.J. (2010). *The Exocrine Pancreas*, San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, California.
- [18] Dolensek, J., Rupnik, M.S., Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas, *Islets*, 7(1), e1024405.
- [19] Akbaş, G. (2018). *Pankreas Duktal Adenokarsinomlarında Stromal Komponente Yönelik Uygulanan İmmünohistokimyasal Belirteçlerin Prognoz ve tedavideki yeri*, Uzmanlık Tezi, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- [20] Uygur, T. (2016). *Pankreas Dokusunda Hücre Yüzeyine Bağlı Glikokonjugat Profillerinin Mikroskopik İşaretleme Yöntemleri ile İrdelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- [21] Topal, A. (2006). *Sıçan Pankreas Dokusu Üzerine Borik Asit Uygulamasının Histolojik ve Biyokimyasal Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [22] <https://www.tipacilar.com/pankreas/>, Erişim: 27 Aralık 2022.
- [23] <https://acartuzuner.com.tr/2019/01/27/pankreas-kanseri-nedir/>, Erişim: 27 Aralık 2022.
- [24] <https://slideplayer.biz.tr/slide/2449527/>, Erişim: 27 Aralık 2022.
- [25] Özdek, U. (2017). *Diplotaenia Turcica Kök Ekstratının Diyabetik Rat Pankreası Lipit Peroksidasyonu, Antioksidanlar Ve İmmunohistokimyası Üzerine Etkisi*, Doktora Tezi, Van Yüzcüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [26] Reygaert, W. C. (2018). Green tea catechins: Their use in treating and preventing infectious diseases, *Biomed Research International*, 9105261.
- [27] Kadioğlu, S., Öztürk, Y.E.(2021). Yeşil Çay ve Sağlık, *Black Sea Journal of Health Science*, 4(3), 341-350.
- [28] Zhang, Z., Zhang, X., Bi, K., He, Y., Yan, W., Yang, C. S., Zhang, J. (2021). Potential protective mechanisms of green tea polyphenol EGCG against COVID-19, *Trends in Food Science & Technology*, 114, 11-24.
- [29] Rady, I., Mohamed, H., Rady, M., Siddiqui, I.A., Mukhtar, H. (2018). Cancer preventive and therapeutic effects of EGCG, the major polyphenol in green tea, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(1), 1-23.
- [30] Kim, S.R., Seong, K.J., Kim, W.J., Jung, J.Y. (2022). Epigallocatechin Gallate Protects against Hypoxia-Induced Inflammation in Microglia via NF-κB Suppression and Nrf-2/HO-1 Activation, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 4004.
- [31] Li, X., Zhang, Y., Zhao, C., Zhang, B., Peng, B., Zhang, Y., Wang, J., Wang, S. (2022). Positive effects of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) intervention on insulin resistance and gut microbial dysbiosis induced by bisphenol A, *Journal of Functional Foods*, 93, 105083.
- [32] <https://www.worldteanews.com/Insights/research-reveals-egcg-may-reduce-antibiotic-resistance-bacterial-infections>, Erişim:11.09.2022
- [33] https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of--Epigallocatechin-3-gallate-EGCG-contains-three-heterocyclic_fig3_225294067, Erişim: 20 Kasım 2022.
- [34] Wu, X., Yang, M., He, Y., Wang, F., Kong, Y., Ling, T.J., Zhang, J. (2022). EGCG-derived polymeric oxidation products enhance insulin sensitivity in db/db mice, *Redox Biology*, 51, 102259.
- [35] Roychoudhury, S., Agarwal, A., Virk, G., & Cho, C.L. (2017). Potential role of green tea catechins in the management of oxidative stress-associated infertility, *Reproductive Biomedicine Online*, 34(5), 487-498.
- [36] Otsuki, M., Asaumi, H. (2013). Green Tea (–)Epigallocatechin-3-Gallate and its Effects on Pancreatic Stellate Cells, *Tea in Health and Disease Prevention*, Academic Press, Japan.
- [37] Qanungo, S., Das, M., Haldar, S., Basu, A. (2005). Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells, *Carcinogenesis*, 26(5), 958-967.
- [38] Forester, S.C., Lambert, J.D. (2011). The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention, *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(6), 844-854.
- [39] Keleşoğlu, B. (2012). *Siyah ve Yeşil Çay ile Atıklarının Oksidatif DNA Hasarına Yönelik Etkilerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [40] Singh, B.N., Shankar, S., Srivastava, R.K. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications, *Biochemical Pharmacology*, 82(12), 1807-1821.
- [41] Frei, B., Higdon, J.V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies, *The Journal of Nutrition*, 133(10), 3275-3284.

- [42] Chacko, S.M., Thambi, P.T., Kuttan, R., Nishigaki, I. (2010). Beneficial effects of green tea: a literature review, *Chinese Medicine*, 5(1), 1-9.
- [43] Steinmann, J., Buer, J., Pietschmann, T., Steinmann, E. (2013). Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea, *British Journal of Pharmacology*, 168(5), 1059-1073.
- [44] Barabas, K., Milner, R., Lurie, D., Adin, C. (2008). Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications, *Veterinary and Comparative Oncology*, 6(1), 1-18.
- [45] https://www.softschools.com/formulas/chemistry/cisplatin_formula/446/, Erişim: 15.08.2022.
- [46] Nepomuceno, J.C. (2011). *Antioxidants in Cancer Treatment*, Universidade Federal de Uberlândia/Instituto de Genética e Bioquímica, Brazil.
- [47] Bhosle, J., Hall, G. (2009). Principles of cancer treatment by chemotherapy, *Surgery (Oxford)*, 27(4), 173-177.
- [48] Zhou, J., Fan, Y., Zhong, J., Huang, Z., Huang, T., Lin, S., Chen, H. (2018). TAK1 mediates excessive autophagy via p38 and ERK in cisplatin-induced acute kidney injury, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(5), 2908-2921.
- [49] Zhu, S., Pabla, N., Tang, C., He, L., Dong, Z. (2015). DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity, *Archives of Toxicology*, 89(12), 2197-2205.
- [50] Manohar, S., Leung, N. (2018). Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature, *Journal of Nephrology*, 31(1), 15-25.
- [51] Dasari, S., Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378.
- [52] Dasari, S., Njiki, S., Mbemi, A., Yedjou, C.G., Tchounwou, P.B. (2022). Pharmacological effects of cisplatin combination with natural products in cancer chemotherapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1532.
- [53] Sabuncuoğlu, S., Özgüneş, H. (2011). Sisplatin Toksisitesi: Oksidatif Stresin Önemi Ve Antioksidanların Etkisi, *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 74(1), 18-25.
- [54] Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- [55] Akşit, H. (2007). *DeneySEL Olarak Oluşturulan Fibrosarkomalarda Programlanmış Hücre Ölümünün Çekirdekdeki DNA Parçalanması Tayini Ve İmmunohistokimyasal Olarak Gösterilmesi*, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [56] Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis, *Cell and Tissue Research*, 301(1), 5-17.
- [57] Öktem, S., Özhan, M.H., Özöl, D. (2001). Apoptozisin önemi, *Toraks Dergisi*, 2(1), 91-95.
- [58] Xu, X., Lai, Y., Hua, Z.C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials, *Bioscience Reports*, 39, BSR20180992.
- [59] Doğan, D. (2008). *Spinal Kord İskemi Oluşturulan Sıçanlarda Kaspaz-3 Aktivitesi ve Melatoninin Koruyucu Etkisinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [60] Afford, S., Randhawa, S. (2000). Apoptosis, *Molecular Pathology*, 53(2), 55-63.
- [61] Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies, *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603-619.
- [62] Cavalcante, G.C., Schaan, A.P., Cabral, G.F., Santana-da-Silva, M.N., Pinto, P., Vidal, A.F., Ribeiro-dos-Santos, A. (2019). A cell's fate: an overview of the molecular biology and genetics of apoptosis, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 4133.
- [63] Mohammad, R.M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.Y., Lin, L.T., Siegelin, M.D., Fimognari, C., Kumar, N.B., Dou, Q.P., Yang, H., Samadi, A.K., Russo, G.L., Spagnuolo, C., Ray, C.K., Chakrabarti, M., Morre, J.D., Coley, H.M., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A.G., Amedei, A., Nicolai, E., Amin, A., Ashraf, S.S., Helferich, W.G., Yang, X., Boosani, C.S., Guha, G.,

- Bhakta, D., Ciriolo, M.R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S.I., Keith, W.N., Bilsland, A., Halicka, D., Nowsheen, S., Azmi, A.S. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer, *In Seminars in Cancer Biology*, 35(0), 78-103.
- [64] Kartalou, M., Essigmann, J.M. (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 478(1-2), 23-43.
- [65] Erdağ, E. (2016). *Doksorubisin'in Hepatoselüler Karsinoma (HCC)'daki Antitümör Etkisinde Kaempferol'ün Rolü*, Doktora Tezi, Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [66] Riedl, S.J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C., Salvesen, G. S. (2001). *Structural Basis for the Inhibition of Caspase-3 by XIAP*. *Cell*, 104(5), 791-800.
- [67] Atagün, G., Eren, Z., Gürkanlı, İ. (2011). Apoptoziste mitokondrinin rolü. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 9-53.
- [68] Gewies, A. (2003). Introduction to apoptosis, *Apo Review*, 3(1), 1-26.
- [69] Yılmaz, C. (2017). *Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Granzim-B Ve APAF-1 Düzeylerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [70] Dağdeviren, T. (2021) Programlı Hücre Ölümü; Apoptoz, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(3), 120-135.
- [71] Pfeffer, C.M., Singh, A.T.(2018). Apoptoz: antikanser tedavisi için bir hedef, *Uluslararası Moleküler Bilimler Dergisi*, 19 (2), 448.
- [72] Güvenç, D., Güvenç, T. (2017) Apoptotik Hücre Ölümü ve Toksikolojik Yanıtta Önemi. *Animal Health Production and Hygiene*, 6(2), 499-504.
- [73] Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K. (2008). Caspases an update, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 151(1), 10-27.
- [74] Voronov, E., Dotan, S., Krelm, Y., Song, X., Elkabets, M., Carmi, Y., Rider, P., Cohen, I., Romzoba, M., Kaplanov, I., Apte, R. N. (2013). Unique versus redundant functions of IL-1 α and IL-1 β in the tumor microenvironment, *Frontiers in Immunology*, 4, 2013.00177.
- [75] Çakır, I. (2013). *Mide Kanseri Olgularında Kan Ve Mide Leptin Seviyesi İle Mide Leptin Reseptör, Kan Solubl Leptin Reseptör, Tnf-A, Il-6 Ve Solubl Il-1 Decoy (Tuzak) Reseptör Seviyelerindeki Değişim*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [76] Van Den Eeckhout, B., Tavernier, J., Gerlo, S. (2021). Interleukin-1 as innate mediator of T cell immunity, *Frontiers in Immunology*, 11, 621931.
- [77] Kawaguchi, Y., Nishimagi, E., Tochimoto, A., Kawamoto, M., Katsumata, Y., Soejima, M., Kanno, T., Kamatani, N., Hara, M. (2006). Intracellular IL-1 α -binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1 α in systemic sclerosis fibroblasts, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14501-14506.
- [78] England, H., Summersgill, H.R., Edey, M.E., Rothwell, N.J., Brough, D. (2014). Release of interleukin-1 α or interleukin-1 β depends on mechanism of cell death, *Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 15942-15950.
- [79] Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S., Masumoto, J. (2019). The role of interleukin-1 in general pathology, *Inflammation and Regeneration*, 39(1), 1-16.
- [80] Di Paolo, N.C., Shayakhmetov, D.M. (2016). Interleukin 1 α and the inflammatory process, *Nature Immunology*, 17(8), 906-913.
- [81] Cavalli, G., Colafrancesco, S., Emmi, G., Imazio, M., Lopalco, G., Maggio, M. C., Sota, J., Dinarello, C. A. (2021). Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases, *Autoimmunity Reviews*, 20(3), 102763.

- [82] Tjomsland, V., Bojmar, L., Sandström, P., Bratthäll, C., Messmer, D., Spångeus, A., Larsson, M. (2013). IL-1 α expression in pancreatic ductal adenocarcinoma affects the tumor cell migration and is regulated by the p38MAPK signaling pathway, *PLoS One*, 8(8), e70874.
- [83] Collier, J.J., Batdorf, H.M., Martin, T.M., Rohli, K.E., Burk, D.H., Lu, D., Cooley, R.C., Karlstad, D.M., Jackson, W.J., Sparer, E.T., Zhang, J., Mynatt, L.R., Burke, S.J. (2021). Pancreatic, but not myeloid-cell, expression of interleukin-1 α is required for maintenance of insulin secretion and whole body glucose homeostasis, *Molecular Metabolism*, 44, 101140.
- [84] https://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_1-alpha, Erişim: 29.10.2022.
- [85] Ayıkgöz, Y. (2019). *Kardiyopulmoner Bypass Sırasında Nuclear Factor Erythroid2related Factor 2 (NRF2), Tümör Nekroz Faktör Alfa Protein (TNF-A), Heme Oxygenase-1 (HO-1) Değişimi/Nuclear Factor Erythroid2-Related Factor 2 (NRF2), Tumor Necros Factor Alpha (TNF-A), Heme Oxygenase-1 (HO-1) Cardiopulmonary Bypass*, Doktora Tezi, Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [86] Tsuchihashi, S.I., Fondevila, C., Kupiec-Weglinski, J.W. (2004). Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury, *Annals of Transplantation*, 9(1), 84-87.
- [87] https://en.wikipedia.org/wiki/Heme_oxygenase, Erişim: 09.10.2022.
- [88] Otuzbir, A. (2010). *İndirek Hiperbilirubinemili Yenidoğanlarda Hazırlayıcı Faktörler ve Etyoloji*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [89] Kristiansen, O. P., Mandrup-Poulsen, T. (2005). Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?, *Diabetes*, 54(2), 114-124.
- [90] Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. (2011). The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(5), 878-888.
- [91] Kamimura, D., Ishihara, K., Hirano, T. (2003). *IL-6 Signal Transduction and its Physiological Roles: the Signal Orchestration Model*, Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Springer Japan.
- [92] Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *Biochemical Journal*, 374(1), 1-20.
- [93] Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G.H., Akbarzadeh, M., Lamertz, L., Huber, H.J., Ahmadian, R.Z., Moll, M J., Scheller, J. (2018). The balance of interleukin (IL)-6, IL-6 soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6 sIL-6R sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling, *Journal of Biological Chemistry*, 293(18), 6762-6775.
- [94] <https://www.bezelyedergi.net/post/sitokinler-i%CC%87nterl%C3%B6kin-6-il-6>, Erişim: 22.10.2022
- [95] https://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_6, Erişim: 05.10.2022.
- [96] Ananiev, J., Tchernev, G., Patterson, J.W., Gulubova, M., Ganchev, G. (2011). p53-“the guardian of genome”, *Acta Medica Bulgarica*, 37(2), 72-82.
- [97] Beyaz, S. (2021). *Fulleren Nanopartikülünün Meme Kanserine Karşı Koruyucu Etkilerinin In Vivo, In Vitro ve In Silico Analizlerle Araştırılması*, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [98] Biegging, K. T., Mello, S. S., Attardi, L. D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression, *Nature Reviews Cancer*, 14(5), 359-370.
- [99] Koçak, N., Yıldırım, İ.H., Yıldırım, S.C. (2011). Cellular functions of p53 and p53 gene family members p63 and p73, *Dicle Tıp Dergisi*, 38(4), 530-535.
- [100] May, P., May, E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein, *Oncogene*, 18(53), 7621-7636.
- [101] <https://www.bioinforange.com/bioinforeviews/biyobilimler/mbg/p53-tumor-baskilayici-geninin-kanserdeki-rolu/>, Erişim: 16.11.2022.

- [102] Tekeli, H. ve Bildik, A. (2012). Karbon Tetraklorür İle Oluşturulan Karaciğer Hasarında Glutatyon (GSH) ve Glutatyon S-Transferaz (GST) Aktivitesi Üzerine N-Asetil Sisteinin Etkisi, *Balikesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(2), 83-87.
- [103] Minich, D.M., Brown, B.I. (2019). A review of dietary (phyto) nutrients for glutathione support, *Nutrients*, 11, 2073.
- [104] Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis, *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2), 42-59.
- [105] Çalışkan, A.M. (2009) *Ratlarda Alkol Bağımlılığı Modelinde Akamprosatin Beyin Glutatyon, Glutatyon Peroksidaz, Malondialdehit, Kalsiyum Atpaz ve Nmda Reseptörleri Üzerine Etkileri*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [106] Nandi, A., Yan, L.J., Jana, C.K., Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9613090.
- [107] Karabulut, H., Gülay, M.Ş. (2016). Antioksidanlar, *Mehmet Akif Ersoy Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.
- [108] Gündüz, A. (2021). *Köpeklerde Ovaryohistektomi Operasyonunda Lidokain ve Meloksikam Uygulamalarının Postoperatif Glutatyon Peroksidaz, Katalaz ve Malondialdehit Konsantrasyonları Üzerine Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [109] Sezginer, M.M. (2016). *Sığır Tüberkülozunda Malondialdehit ve Superoksit Dismutazın İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [110] Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E. Ş., Yılmaz, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX), *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369.
- [111] Eker, B. (2011). *Serbest Radikal Hasarının Göstergesi Olarak Idrarda Malondialdehit Ölçümü*, Uzmanlık Tezi, Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [112] Yang, C., Guo, Y., Huang, T., Zhao, J., Huang, X., Tang, H., An, N., Pan, Q., Xu, Y., Liu, H. (2018). Asiatic acid protects against cisplatin-induced acute kidney injury via anti-apoptosis and antiinflammation, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107, 1354-1362.
- [113] Tipoe, G.L., Leung, T.M., Liong, E.C., Lau, T.Y.H., Fung, M.L., Nanji, A.A. (2010). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Reduces Liver Inflammation, Oxidative Stress and Fibrosis in Carbon Tetrachloride (CCl₄)-induced Liver Injury in Mice, *Toxicology*, 273(1-3), 45-52.
- [114] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- [115] Aslan, A., Gök, Ö., Erman, O., Kuloğlu, T. (2018). Ellagic acid impedes carbontetrachloride-induced liver damage in rats through suppression of NF-kB, Bcl-2 and regulating Nrf-2 and caspase pathway, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 662-669.
- [116] Koçak, A., Ural, C., Sifil, S., Sezer, B., Çakırlar, H., Tunga, E.E., Akokay, P., Karagülle, H.D., Pekçetin, Ç., Çavdar, Z. (2020). Tıp eğitiminde özel çalışma modülü: sisplatin kaynaklı testis hasarında alfa lipoik asidin koruyucu etkilerinin araştırılması, *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 29(3), 173-180.
- [117] Kolgazı, M., Oztosun, G., Yalcin, M., Unan, Z.N., Arsoy, E., Oral, S., Cılingir, S., Elmas, A.M., Arbak, S. (2021). p-Coumaric acid has an ameliorative effect on peptic ulcer: a macroscopic, microscopic and biochemical analysis, *Marmara Medical Journal*, 34(1), 6-11.
- [118] Lück, H. (1965). *Catalase, in "Methods of Enzymatic Analysis"*, Academic Press, New York and London.
- [119] Takım, K., Kutlu, T. (2019). Dimetil benzantrazen uygulanan ratlarda tunceli dağ sarımsağı (*Allium tuncelianum*) ve vitamin E'nin bağırsak dokusundaki lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerine etkisi, *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 8(2), 191-197.

- [120] Antmen, Ş.E. (2005). *Beta Talasemide Oksidatif Stres*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [121] Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
- [122] Denk, B. (2019). *DeneySEL Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Apitoksin'in Oksidan-Antioksidan Statü ve Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkilerinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [123] Aslan, A. (2011). *Ratlarda Azoksimetan Uygulanarak Oluşturulan Kolorektal Kanserde Likopenin Siklooksijenaz-2 (Cox-2), Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, p53 Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi*, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [124] Aslım, H.P., Bulut, O. (2021). Western blot, *Journal of Advances in Veterinary Bio Science and Techniques*, 6(1), 45-56.
- [125] Koonyosying, P., Uthaiyibull, C., Fucharoen, S., Koumoutsea, E.V., Porter, J.B., Srichairatanakool, S. (2019). Decrement in cellular iron and reactive oxygen species, and improvement of insulin secretion in a pancreatic cell line using green tea extract. *Pancreas*, 48(5), 636-643.
- [126] Aslan, A., Beyaz, S., Gok, O., Can, M.I., Erman, F., Erman, O. (2021). The impact of ellagic acid on some apoptotic gene expressions: a new perspective for the regulation of pancreatic Nrf-2/NF-κB and Akt/VEGF signaling in CCl₄-induced pancreas damage in rats, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 43(2), 145-152.
- [127] Hoffmann, J., Junker, H., Schmieder, A., Venz, S., Brandt, R., Multhoff, G., Falk, W., Radons, J. (2011). EGCG downregulates IL-1RI expression and suppresses IL-1-induced tumorigenic factors in human pancreatic adenocarcinoma cells, *Biochemical Pharmacology*, 82(9), 1153-1162.
- [128] Xu, D., Matsuo, Y., Ma, J., Koide, S., Ochi, N., Yasuda, A., Funahashi, H., Okada, Y., Takeyama, H. (2010). Cancer cell-derived IL-1α promotes HGF secretion by stromal cells and enhances metastatic potential in pancreatic cancer cells, *Journal of Surgical Oncology*, 102(5), 469-477.
- [129] Zhang, F.H., Sun, Y.H., Fan, K.L., Dong, X.B., Han, N., Zhao, H., Kong, L. (2017). Protective effects of heme oxygenase-1 against severe acute pancreatitis via inhibition of tumor necrosis factor-α and augmentation of interleukin-10, *BMC Gastroenterology*, 17(1), 1-7.
- [130] Wada, Y., Takata, A., Ikemoto, T., Morine, Y., Imura, S., Iwahashi, S., Saito, Y., Shimada, M. (2019). The protective effect of epigallocatechin 3-gallate on mouse pancreatic islets via the Nrf2 pathway, *Surgery Today*, 49(6), 536-545.
- [131] Chang, M., Xue, J., Sharma, V., Habtezion, A. (2015). Protective role of hemeoxygenase-1 in gastrointestinal diseases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(6), 1161-1173.
- [132] Fusco, R., Cordaro, M., Siracusa, R., D'Amico, R., Genovese, T., Gugliandolo, E., Peritore F.A., Crupi, R., Impellizzeri, D., Cuzzocrea, S., Di P.R. (2020). Biochemical evaluation of the antioxidant effects of hydroxytyrosol on pancreatitis-associated gut injury, *Antioxidants*, 9, 781.
- [133] Ellingsgaard, H., Ehses, J.A., Hammar, E.B., Van Lommel, L., Quintens, R., Martens, G., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Berney, T., Pipeleers, D., Halban, A.P., Schuit, C.F., Donath, Y.M. (2008). Interleukin-6 regulates pancreatic α-cell mass expansion, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), 13163-13168.
- [134] Zheng, M., Li, H., Sun, L., Brigstock, D.R., Gao, R. (2021). Interleukin-6 participates in human pancreatic stellate cell activation and collagen I production via TGF-β1/Smad pathway, *Cytokine*, 143, 155536.
- [135] Rajendran, S., Anquetil, F., Quesada-Masachs, E., Graef, M., Gonzalez, N., McArdle, S., Chu, T., Krogvold, L., Dahl-Jørgensen, K., von Herrath, M. (2020). IL-6 is present in beta and alpha cells in human pancreatic islets: Expression is reduced in subjects with type 1 diabetes, *Clinical Immunology*, 211, 108320.
- [136] Cao, Y., Bao, S., Yang, W., Zhang, J., Li, L., Shan, Z., Teng, W. (2014). Epigallocatechin gallate prevents inflammation by reducing macrophage infiltration and inhibiting tumor necrosis factor-α signaling in the pancreas of rats on a high-fat diet, *Nutrition Research*, 34(12), 1066-1074.

- [137] Ahmed, O.M., Ali, T.M., Abdel Gaid, M.A., Elberry, A.A. (2019). Effects of enalapril and paricalcitol treatment on diabetic nephropathy and renal expressions of TNF- α , p53, caspase-3 and Bcl-2 in STZ-induced diabetic rats, *Plos One*, 14(9), e0214349.
- [138] Kung, C.P., Murphy, M.E. (2016). The role of the p53 tumor suppressor in metabolism and diabetes, *The Journal of Endocrinology*, 231(2), 61-75.
- [139] Khan, N., Mukhtar, H. (2018). Tea polyphenols in promotion of human health, *Nutrients*, 11, 39.
- [140] Faheem, N.M., Ali, T.M. (2021). The counteracting effects of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on the immobilization stress-induced adverse reactions in rat pancreas, *Cell Stress and Chaperones*, 26(1), 159-172.
- [141] Aslan, A., Gok, O., Beyaz, S., Uslu, H., Erman, F., Erman, O., Baspinar, S. (2022). Ellagic acid inhibits proinflammatory intermediary manufacture by suppressing NF- κ B/Akt, VEGF and activating Nrf-2/caspase-3 signaling pathways in rat testicular damage: a new way for testicular damage cure and in silico approach, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 32(6), 463-476.
- [142] Aslan, A., Can, M.I., Beyaz, S., Gok, O., Parlak, G., Gundogdu, R., Özercan, İ.H., Erman, O. (2022). A new approach on the regulation of NF- κ B and Bax protein signaling pathway activation by royal jelly in fluoride-induced pancreas damage in rats, *Tissue and Cell*, 79, 101913.

EKLER

Ek-1. Etik Kurulu Kararı



T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARARLARI

Oturum Tarihi
04/11/2020

Oturum Saati
10:00

Oturum Sayısı
2020/13

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 04/11/2020 tarihinde saat 10:00'da Kurul Başkanı Prof. Dr. Mustafa İSSİ başkanlığında, aşağıda imzaları bulunan kurul üyelerinin katılımıyla toplanarak gündemdeki konuları görüşmüş ve aşağıdaki kararları almıştır.

Prof. Dr. Orhan ERMAN tarafından yürütülecek olan "**Sisplatin İle Oluşturulan Pankreas Hasarına Karşı Epigallokatesin 3-Gallat'ın Kaspaz-3, TNF- α , IL-1 ve IL-6 Gen Ekspresyonları Üzerine Etkileri**" başlıklı araştırma projenizde daha önceden onay aldığımız 2019/141 protokol nolu projede kullanılan **28 Adet Wistar Albino Rat**'tan alınan dokuların kullanılacağı ve hayvanlar üzerinde yapılacak girişimlerde hayvan kullanım etiği ilkelerine uyulacağı beyan edilmiştir. Bu çerçevede aşağıda ismi bulunan araştırmacılara ait bu çalışmanın "Firat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesi" hükümleri yönünden uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

1. Prof. Dr. Orhan ERMAN
2. Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN
3. Doç. Dr. Abdullah ASLAN
4. Dok. Öğr. Seda BEYAZ
5. Dok. Öğr. Özlem GÖK
6. Yük. Lis. Öğr. Nuran TOPRAKOĞLU
7. Yük. Lis. Öğr. Başak ARSLAN

Kurul Üyeleri:

Prof. Dr. Mustafa İSSİ
Prof. Dr. Gülşüm ÖKSÜZTEPE
Prof. Dr. Sinan CANPOLAT
Prof. Dr. Asiye BAŞUSTA
Doç. Dr. Serkan DÜNDAR
Doç. Dr. Burcu GÜL BAYKALIR
Dr. Öğr. Üyesi Eşef BOLAT
Vet. Hek. Ebru GÖKDERE
Onur UYGUR (Bulunmadı)
Murat DAĞHAN (Bulunmadı)

Başkan
E-İmzalıdır
Prof. Dr. Mustafa İSSİ
Kurul Başkanı

Prof. Dr. Gülşüm ÖKSÜZTEPE

Prof. Dr. Sinan CANPOLAT

Prof. Dr. Asiye BAŞUSTA

Doç. Dr. Serkan DÜNDAR

Doç. Dr. Burcu GÜL BAYKALIR

Dr. Öğr. Üyesi Eşef BOLAT



T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARARLARI

Oturum Tarihi
04/11/2020

Oturum Saati
10:00

Oturum Sayısı
2020/13

Ebru GÖKDERE

