



**SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN
DALAK HASARI ÜZERİNE TANNİK ASİDİN OLASI
KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Duygu KİZİR

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike KARAMAN

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2022

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN DALAK HASARI ÜZERİNE
TANNİK ASİDİN OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of the Possible Protective Effect of Tannic Acid on Doxorubicin-Induced
Spleen Injury in Rats)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Duygu KİZİR

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike KARAMAN

Erzurum
Temmuz, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Duygu KİZİR tarafından hazırlanan “Sıçanlarda Doksorubisin ile İndüklenen Dalak Hasarı Üzerine Tannik Asidin Olası Koruyucu Etkisinin Araştırılması” başlıklı çalışması .. / .. / 20.. tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Genetik Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Yeliz DEMİR
Ardahan Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike KARAMAN
Atatürk Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN
Atatürk Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2021-9395

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Dr. Öğr. Üyesi Melike KARAMAN danışmanlığında sunulan “Sıçanlarda Doksorubisin ile İndüklenen Dalak Hasarı Üzerine Tannik Asidin Olası Koruyucu Etkisinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	8	30
Kuramsal Temeller	5	30
Materyal ve Yöntem	23	35
Bulgular ve Tartışma	1	20
Sonuç ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	10	25

***Not:** Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.*

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Duygu KİZİR	Dr. Öğr. Üyesi Melike KARAMAN
20.7.2022	20.7.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Lisansüstü Tez Projeleri (LÜTP) kapsamında Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından " FYL-2021-9395" numaralı " Sıçanlarda Doksorubisin İle İndüklenen Dalak Hasarı Üzerine Tannik Asidin Olası Koruyucu Etkisinin Araştırılması" başlıklı proje ile desteklenmiştir. Bu çalışmaya sağladığı finansal destekten dolayı Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarında desteğini her zaman hissettiğim, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak yol gösteren ve tez dönemim boyunca bana her türlü kolaylığı sağlayan çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Melike KARAMAN'a,

Deneyisel çalışmalarında ve tez yazım sürecinde büyük bir özveriyle bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan her daim hoşgörü ve sabırla benimle ilgilenen çok kıymetli hocalarım Sayın Doç. Dr. Yeliz DEMİR, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN'a,

Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarını kullanma imkânı veren Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında, her konuda bana yardımcı olan; bilgi, deneyimlerini benimle paylaşan, tezimin yazım sürecinde her konuda danıştığım ve her zaman yanımda olan başta Sayın Arş. Gör. Emine TORAMAN'a ve diğer Araş. Gör. hocalarıma,

Yüksek Lisans eğitimim ve tez sürecim boyunca yan yana olduğumuz, desteklerini her zaman hissettiğim çalışma arkadaşlarım Esra Nur YEŞİLKENT ve Medine KARAĞAÇ'a,

Bana olan güvenini ve sevgisini her daim hissettiren, her koşulda yanımda olan, benim için çok değerli Ebru YURTOĞLU ÇAĞLAYAN'a,

Her daim yanımda olan, sabırla ve büyük bir özveriyle beni destekleyip cesaretlendiren, maddi-manevi hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan hayattaki en büyük şanslarım olan annem Meryem KİZİR'e, babam Dursun KİZİR'e ve kardeşim Merve KİZİR'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Duygu KİZİR

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN DALAK HASARI ÜZERİNE TANNİK ASİDİN OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Duygu KİZİR

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike KARAMAN

Amaç: Tasarlanan mevcut çalışma; Doksorubisin (DOX) muamelesi ile oluşabilen dalak toksisitesi karşısında Tannik asidin (TA) protektif potansiyelinin olup olmadığını açıklamayı hedeflemektedir. Ek olarak, inflamatuvar sitokinleri ve antioksidan sistem elemanlarını inceleyerek TA'nın protektif etkilerinin potansiyel mekanizmasının aydınlatılmasını da amaçlamaktadır.

Yöntem: İki hafta boyunca kümülatif olarak uygulanan DOX maruziyetinin yanında TA ve DOX+TA kombinasyonunun uygulandığı dalak dokularında antioksidan sistem bileşenlerinin değişimi ile oksidatif hasar belirteçlerinin miktarları ve aktiviteleri incelendi. Ek olarak DOX ile ilişkili dalak toksisitesine neden olan moleküler belirteçlerin kullanılması ile apoptozis ve inflamasyonda kritik öneme sahip olan genlerin ekspresyon seviyeleri Real- Time PCR ile araştırıldı.

Bulgular: Sıçan dalak dokularında DOX'un glutatyon (GSH) seviyesinde azalmaya ve malondialdehit (MDA) seviyesinde ise artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Antioksidan sistem bileşenlerinden katalaz (CAT), glutatyon S-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPX) mRNA seviyelerinde ve enzim aktivitelerinde ise DOX'un baskılayıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca proinflamator sitokin markerlerinin (*IL-6* ve *Tnf-α*), apoptotik genlerin (*Casp3* ve *Bax*), hücre metabolizmasında görev alan diğer faktörlerin (*Cox*, *Alox* ve *Inos*) mRNA ekspresyon seviyeleri DOX uygulaması sonucu kontrole göre değişim göstermiştir. Ancak TA'nın DOX ile muamelesi sonucunda bu değişimlerin kontrol grubuna ait değerlere yaklaştığı bulunmuştur.

Sonuç: Bulgular, TA'nın DOX ile birlikte uygulanması sonucunda DOX'un dalaktaki oksidatif stres ve inflamasyon sisteminde meydana getirdiği üzerine düzenleyici etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Antrasiklin, Doksorubisin, Polifenol, Tannik asit, Dalak

Temmuz 2022, 78 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT OF TANNIC ACID ON DOXORUBICIN-INDUCED SPINE DAMAGE IN RATS

Duygu KİZİR

Advisor: Dr. Öğr. Üyesi Melike KARAMAN

Purpose: The current study designed; It aims to explain whether Tannic acid (TA) has a protective potential against spleen toxicity that may occur with doxorubicin (DOX) treatment. In addition, it aims to elucidate the potential mechanism of the protective effects of TA by examining inflammatory cytokines and antioxidant system elements.

Method: In addition to DOX exposure, which was applied cumulatively for two weeks, the changes in antioxidant system components and the amounts and activities of oxidative damage markers in spleen tissues where TA and DOX+TA combination were applied were examined. In addition, using molecular markers that cause DOX-related spleen toxicity, expression levels of genes that are critical in apoptosis and inflammation were investigated by Real-Time PCR.

Findings: It was observed that DOX caused a decrease in glutathione (GSH) level and an increase in malondialdehyde (MDA) level in rat spleen tissues. It has been determined that DOX has a suppressive effect on the mRNA levels and enzyme activities of the antioxidant system components catalase (CAT), glutathione-s-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX). In addition, mRNA expression levels of proinflammatory cytokine markers (IL-6 and Tnfa), apoptotic genes (Casp3 and Bax), and other factors involved in cell metabolism (Cox, Alox and Inos) showed a change compared to control after DOX application. However, as a result of the treatment of TA with DOX, these changes were found to approach the values of the control group.

Results: The findings showed that TA has a regulatory effect on the oxidative stress and inflammation system in the spleen as a result of the application of TA together with DOX.

Keywords: Anthracycline, Doxorubicin, Polyphenol, Tannic acid, Spleen

July 2022, 78 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
GİRİŞ.....	1
Hipotez ve Amaç.....	2
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Kanser	3
Kanser tanımı ve tedavi yöntemleri	3
Kemoterapi.....	4
Antrasiklinler.....	5
Doksorubisin	7
Dalak	10
Tannik Asit.....	11
İnflamasyon ve Kaynakları	12
Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Antioksidan Savunma Sistemleri.....	13
Glutasyon (GSH)	15
Süperoksit Dismutaz (SOD).....	16
Katalaz (CAT).....	17
Glutasyon Peroksidaz (GPx)	18
Glutasyon S-Transferaz (GST).....	18
Malondialdehit (MDA)	19
MATERYAL VE METOT	20
Kullanılan Cihazlar	20
Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	20
Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	22

Sıçanların bakımı ve çalışma planı	23
Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	24
Doku homojenizasyonu.....	24
Bradford yöntemiyle protein tayini	25
GPx aktivite ölçümü.....	26
GST aktivite ölçümü	27
GSH aktivite ölçümü.....	28
MDA ölçümü	28
Primer Dizaynı	28
Real Time PCR Uygulamaları	29
Dalak dokusundan total RNA izolasyonu	29
Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi	30
Komplementer DNA (cDNA) sentezi	31
Gen ekspresyon analizi	32
İstatistiksel Analiz	32
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	33
Dalak Dokusundan Saflaştırılan RNA'nın Nicel ve Nitel Analiz Sonuçları	33
Dalak Dokusunda Antioksidan Sistem Kantitatif Gen Ekspresyon Seviyeleri.....	34
Dalak Dokusunda Antioksidan Sistem Enzim Aktivite Sonuçları.....	36
Dalak Dokusunda Glutasyon (GSH) ve Malondialdehit (MDA) Seviyeleri.....	38
Dalak Dokusunda Proinflamatuvar Sitokinlerin Kantitatif Gen Ekspresyon Seviyeleri ..	39
Dalak Dokusunda Apoptoz Kantitatif Gen Ekspresyon Seviyeleri	42
SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	64

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Tez Dahilinde Kullanılan Cihazlar	20
Tablo 2. Tez Dahilinde Kullanılan Kimyasal Mazlemeler	21
Tablo 3. Protein Tayini Deney Protokolü	25
Tablo 4. SOD Aktivite Deney Ptotokolü	25
Tablo 5. CAT Aktivite Deney Ptotokolü	26
Tablo 6. Gpx Aktivite Deney Ptotokolü	27
Tablo 7. GST Aktivitesi Deney Protokolü.....	27
Tablo 8. GSH Aktivitesi Deney Protokolü	28
Tablo 9. MDA Ölçümünde Kullanılacak Çözeltiler Ve Miktarları	28
Tablo 10. Primerler	29
Tablo 11. cDNA Sentez Reaksiyonunun Bileşenleri.....	31
Tablo 12. cDNA Sentez Reaksiyon Protokolü	31
Tablo 13. Real-Time PCR Reaksiyon Karışımı.....	32
Tablo 14. Real-Time PCR Reaksiyon Şartları	32
Tablo 15. Sıçan Dalak Dokusundan İzole Edilen RNA'nın Konsantrasyonu	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bazı kemoterapik ajanlar ve etki mekanizmaları	4
Şekil 2. Antrasiklinlerin yaygın yan etkileri	5
Şekil 3. Doksorubisin' in yapısı	6
Şekil 4. Daunorubisin' in yapısı	6
Şekil 5. Epirubisin' in yapısı	6
Şekil 6. İdarubisin'in yapısı.....	7
Şekil 7. Doksorubisin'in çeşitli yan etkileri	8
Şekil 8. Doksorubisin'in etki mekanizması.....	9
Şekil 9. Dalak anatomisi.....	10
Şekil 10. Bir yetişkinin dalağının kaba görüntüsü	11
Şekil 11. Tannik asitin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 12. İnflamasyon kaynakları.....	13
Şekil 13. Enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri	15
Şekil 14. Reaktif oksijen türlerinin üretiminin çeşitli aktivatörleri ve inhibitörleri.....	15
Şekil 15. İndirgenmiş glutatyonun (GSH) molekül yapısı	16
Şekil 16. Glutatyon'un DNA sentezindeki ve antioksidan savunma sistemindeki reaksiyonları.....	16
Şekil 17. Süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyon.....	17
Şekil 18. Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon	17
Şekil 19. Glutatyon peroksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon	18
Şekil 20. DOX ve TA uygulama protokolü (DOX veya TA belirteci olmayan günlerde canlılara sadece su ve yem verildi)	24
Şekil 21. Sıçan dalak dokusundan izole edilen RNA'ya ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	33
Şekil 22. Kontrol ve sıçan uygulama gruplarına ait dalak dokularındaki <i>Gpx</i> mRNA ekspresyon seviyesi.....	34
Şekil 23. Kontrol ve sıçan uygulama gruplarına ait dalak dokularındaki <i>Sod</i> mRNA ekspresyon seviyesi.....	35
Şekil 24. Kontrol ve sıçan uygulama gruplarına ait dalak dokularındaki <i>Cat</i> mRNA ekspresyon seviyesi.....	35

Şekil 25. Kontrol ve sıçan uygulama gruplarına ait dalak dokularındaki <i>Gst</i> mRNA ekspresyon seviyesi.....	36
Şekil 26. Kontrol ve sıçan uygulama gruplarına ait dalak dokularındaki GPx enzim aktivitesi.....	36
Şekil 27. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki SOD enzim aktivitesi.....	37
Şekil 28. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki CAT enzim aktivitesi.....	37
Şekil 29. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki GST enzim aktivitesi.....	38
Şekil 30. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki GSH seviyesi	39
Şekil 31. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki MDA Konsantrasyonu.....	39
Şekil 32. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki <i>IL-6</i> ekspresyon seviyesi.....	40
Şekil 33. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki <i>Tnfa</i> ekspresyon seviyesi.....	40
Şekil 34. Kontrol ve sıçan uygulama gruplarına ait dalak dokularındaki <i>Inos</i> mRNA ekspresyon seviyesi.....	41
Şekil 35. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki <i>Alox5</i> ekspresyon seviyesi.....	42
Şekil 36. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki <i>Cox2</i> ekspresyon seviyesi.....	42
Şekil 37. Kontrol ve uygulama gruplarına ait dalak dokularındaki <i>Casp3</i> ekspresyon seviyesi.....	43
Şekil 38. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki <i>Bax</i> ekspresyon seviyesi.....	43
Şekil 39. STRING veritabanının da oluşturulan ve çalışmada incelenen hedeflerin ilişkisini gösteren PPI ağı	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µl	Mikro Litre
Alox5	Araşidonat 5-lipoksijenaz
BSA	Sığır Serum Albümin
Casp-3	Kaspaz 3
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer DNA
CDNB	2,4-Dinitroklorobenzen
cm	Santimetre
Cox2	Siklooksijenaz-2
Cu	Bakır
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DOX	Doksorubisin
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtBr	Ethidyum Bromür
g	Gram
g/L	Gram/Litre
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon Disülfid
GST	Glutasyon S-Transferaz
IL-6	İnterlökin 6
i.p	İntraperitoneal
kDa	Kilodalton
KT	Kemoterapi
L	Litre
L-Arg	Arjinin
M	Molar

MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mmol/L	Milimol/Litre
Mn	Manganez
mRNA	Mesajcı RNA
N	Normal
NADP+	Okside Nikotinamid Adanin Dinükleotid
NADPH	İndirgenmiş Nikotinamid Adanin Dinükleotid
NBT	Nitro Mavi Tetrazolyum Klorür
nm	Nanometre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PPI	Protein-Protein Etkileşimi
qPCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
rRNA	Ribozomal RNA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
sn	Saniye
SOD	Süperoksit Dismutaz
TA	Tannik Asit
TAE	Tris, Asetik asit, EDTA
TBA	Tiyobarbitürik asit
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör
Top II	Topoizomeraz II
U/mL	Unit/Mililitre
Zn	Çinko
μ mol/L	Mikromol/Litre

GİRİŞ

Kanser, organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz bir şekilde bölünmesi ve çoğalmasıyla oluşmasıdır. Kanserleşme sonucu oluşan hasarın giderilmesinde çeşitli kanser tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (Baykara, O. 2016). Bu tedavi yöntemleri; radyoterapi, kök hücre tedavisi, hormon tedavisi, cerrahi yöntemler, biyolojik tedavi, immünoterapi, hücre bazlı tedavi (kanser aşılı), gen terapi ve kemoterapidir (Baykara, O. 2016; Wang *et al.* 2018).

Kemoterapi (KT), kemoterapötik ajanların yardımıyla kanser hücrelerini öldürmeyi amaçlamaktadır ve antineoplastik ajanlar bu tedavi yönteminde en önemli role sahiptir (Amara-Mokrane *et al.* 1996; Ludke *et al.* 2012). Antineoplastik ajanlardan olan Hidroksidaunorubisin olarak da bilinen Doksorubisin (DOX) hem yetişkin hem de çocuk kanserlerinin tedavisinde kullanılan en güçlü ve geniş spektrumlu bir ilaçtır (Dudka *et al.* 2005). DOX, akut lenfoblastik lösemi, metastatik meme kanseri, hodgkin lenfoma, nonhodgkin lenfoma, over kanseri, akciğer kanseri ve sarkomaların tedavisinde yaygın olarak kullanılan antrasiklin antibiyotik grubunda olup hücresel onarım sürecini bozar (Lu, 2005). Böylece reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde artışa sebep olur.

ROS ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik oksidatif strese sebep olmakta (Handy *et al.* 2009) ve diyabet, inflamasyon, gastrointestinal bozuklukla da ilişkisi bulunmaktadır. DOX'un klinik kullanımı, hastalarda miyokard toksisitesinin gelişmesi ve normal hücrelere sitotoksik etki göstermesi nedeniyle sınırlıdır. Ayrıca DOX kullanımının dalak kasılmasına da yol açtığı bildirilmiştir. Tüm bunlar hasta sağlığını ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyebilecek istenmeyen yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle olumsuz etkilerin azaltılması için DOX ile birlikte koruyucu ajanlar kullanılmalıdır (Aung *et al.* 2017).

DOX toksisitesine karşı en çok kullanılan ve araştırılan antioksidan bileşikler arasında vitaminler, koenzim Q, flavonoidler, polifenoller ve bitkisel antioksidanlar vardır (Ahmed *et al.* 2013). Antioksidan bileşiklerden olan Tannik asit (TA) birçok bitkide ikincil metabolizma sonucu üretilirken günlük diyetle alınımı da söz konusudur (Xu *et al.* 2007).

TA, DOX maruziyetine bağlı olarak böbrek dokusunda oluşan oksidatif hasarın giderilebilmesine yardımcı olup oksijen türevi radikallerin oluşumuna da engel olabilmektedir (Aung *et al.* 2017). Bunun yanı sıra TA'nın anti-oksidatif (Gulcin *et al.* 2010), anti-

inflatuar (Soyacak *et al.* 2019), anti-apoptotik (Nie *et al.* 2016) ve anti-kanserojenik (Ren *et al.* 2019) özelliklerinin bulunması kemoterapiye bağılı oluşabilecek toksisiteye karşı koruyucu bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. Ancak DOX'un sebep olduğu dalak hasarı üzerine TA'nın koruyucu özelliğine literatürde rastlanılmamıştır.

Hipotez ve Amaç

Yapacağımız çalışma sonucunda elde edilmesi öngörülen bulgular;

- Kemoterapik ilaç olan DOX'a bağılı dalak hasarı üzerinde etkili olan noktaların belirlenmesi, ilgili faktörlerin saptanıp ve yönlendirilmesi için terapötik geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Bu doğrultuda endemik bitkilerden elde edilecek doğal ürünlerin araştırılan mekanizmalar üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılmasına yardım edilecek,
- Önemli konu başlıklarından olan “kemoterapi”, “beslenme” ve “doğal madde” çalışma alanlarına açıklık getirebilecektir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında anti-oksidatif, anti-mutajenik, anti-kanserojen, anti-mikrobiyal, anti-enflatuar ve anti-apoptotik aktiviteler dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip olan TA'nın DOX kaynaklı dalaktaki hasara karşı potansiyel koruyucu etkisinin belirlenmesi ve bu doğrultuda, DOX tarafından antioksidan savunma sistem unsurlarının seviyelerinde oluşabilecek değişimler üzerine tannik asit etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

Kanser

Kanser tanımı ve tedavi yöntemleri

Kanser, organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz bir şekilde bölünmesi ve çoğalmasıyla oluşmakta ve tek bir organı etkileyebildiği gibi uzaktaki organlara da yayılarak etki gösterebilen genellikle ölümcül yaygın hastalıkların başında gelmektedir (Mcguire, 2016). 3 önemli gen grubu kanserin oluşumunda çok büyük role sahiptir. Bunlar;

Tümör baskılayıcı genler: Hücrelerin bölünmesini, çoğalmasını kontrol eden, hasar sırasında DNA tamirini başlatan ve tamir girişiminin başarısız olması durumunda apoptozu tetikleyen genlerdir. En çok bilinen ve çalışılan örneği TP53 genidir.

DNA tamir genleri: Hasarlı olan DNA'yı tamir etmek için gerekli olan proteinleri o bölgeye çekerek genin işlevini yeniden kazandırır. Tamir mekanizmasının başarısız olması durumunda ise hücrenin nekrotik veya apoptotik olarak yok olmasına yardımcı olmaktadır.

Onkogenler: Kanserlerin başlangıcında rol oynayan ve kontrolünü kaybetmiş proteinleri kodlayan genlerdir. RAS ve MYC en çok bilinen onkogenlere örnek gösterilebilir (Baykara, 2016).

Kanserin sebepleri henüz kesin olarak bilinmemektedir. Ancak kanser için çeşitli risk faktörleri mevcuttur. Bunlar; yaşam şekillerine, yaşa, cinsiyete, aile öykülerine ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Reuter *et al.* 2020). Kanserlerin meydana gelmesine iyonizan ışınlara maruziyet, tütün ve tütün ürünlerinin kullanımı, alkol, obezite, yeteri kadar iyi beslenememe, virüsler ve mesleki hastalıklar sebep olabilmektedir (Sankpal *et al.* 2012). Başlıca kanser tedavi yöntemleri radyoterapi, kök hücre tedavisi, hormon tedavisi, cerrahi yöntemler, biyolojik tedavi, immünoterapi, hücre bazlı tedavi (kanser aşıları), gen terapi ve kemoterapidir. En çok kullanılan yöntemler arasında; radyoterapi, cerrahi yöntemler ve kemoterapi bulunmaktadır (Wang *et al.* 2018).

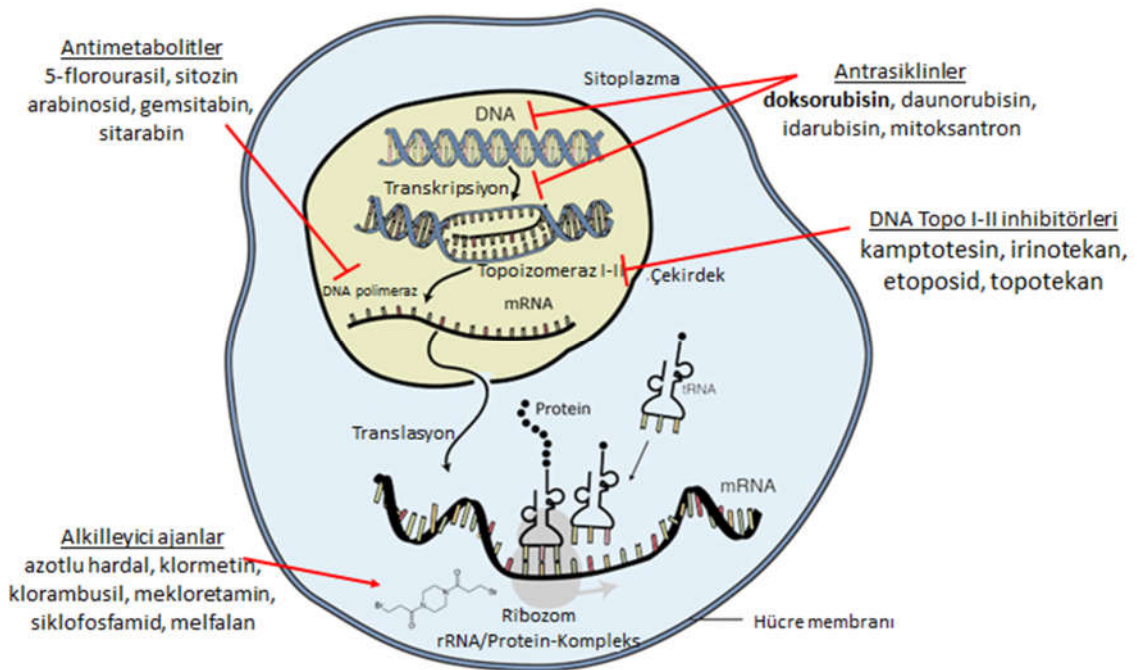
Radyoterapi: Kanserli hücreleri iyonizan ışınlar kullanarak yok etme prensibine dayanmaktadır. Vücudun sadece belli bir bölgesini hedef aldığı gibi, tüm vücudu da hedef alabilen radyoterapi hastanın ve hastalığın özelliklerine bağlı olarak Konformal Proton Işın Radyasyon Terapi (Conformal Proton Beam Radiation Therapy), Görüntü Rehberliğinde Radyoterapi (Image Guided Radiotherapy-IGRT) (Langen *et al.* 2001), 3 Boyutlu Konformal Radyoterapi (Three Dimensional Conformal Radiotherapy-3D-CRT) (Landberg *et al.* 1999)

ve Yoğunluk Aracılı Radyoterapi (Intensity Modulated Radiotherapy-IMRT) gibi çeşitleri uygulanmaktadır (Baskar, *et al.* 2012). Yukarıda verilen yöntemlerin temel amacı, öldürülmek istenen kanser hücreleri üzerinde maksimum etki gösterip, sağlıklı hücelere de minimum hasar sağlayan sistemlerin ortaya konmasıdır. Ancak radyoterapinin dezavantajlarından birisi zararlı hücreleri yok ederken sağlıklı hücelere de zarar verebilmesidir (Albain *et al.* 2019).

Cerrahi Yöntemler: Biyopsiden sonra tanı konmasında, gelişen kanserlerin engellenmesinde, metastaz veya yayılım olmayan durumlarda kanserli dokuların vücuttan atılmasında yaygın bir şekilde kullanılan bir yöntem olup çeşitli teknikleri bulunmaktadır. Bu teknikler; laparoskopik cerrahi, kriyo cerrahi, robotik cerrahi, lazer cerrahi ve elektro cerrahidir.

Kemoterapi

Kemoterapi: Kemoterapik ajanların yardımıyla kanser hücrelerini öldürmeyi veya yok etmeyi amaçlayan anti-kanser tedavi ilaçlarının uygulanmasıyla gerçekleştirilir. (Amara-Mokrane *et al.* 1996; Ludke *et al.* 2012). Kemoterapik ajanlar ve etki mekanizmaları **Şekil 1**'de gösterilmiştir. Kemoterapinin amacı; tümör hücrelerinin büyümesini ve gelişmesini engelleyerek kanser hücrelerinin yok olmasına yardımcı olmaktır (Skeel and Khleif, 2011). Kemoterapi, kanser tedavisinde etkili bir yöntem olmasına rağmen sağlıklı hücelere, dokulara veya organlara da zarar verebildikleri için çeşitli yan etkiler gösterebilirler (Schirmmacher, 2019). Bu yan etkiler kanser hastalarının yaşam kalitesinde düşümlere ve tedavilerde sorunlara sebebiyet vermektedir (Shapiro, 2016; Turcotte *et al.* 2017).



Şekil 1. Bazı kemoterapik ajanlar ve etki mekanizmaları (Kurreck, 2022'den düzenlenmiştir)

Kemoterapide kullanılan antineoplastik ajanlar oldukça önemli role sahiptir (Tikoo *et al.* 2011) ancak kemoterapötik ilaçların toksisitesi kanser tedavisinde önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak için çeşitli bitki ve bileşenleri araştırılıp kullanılmaktadır. Bitki ve bileşenleri tek başına veya diğer ajanlarla kombinasyon halinde uygulandıklarında kemoterapinin neden olduğu olumsuzlukları giderici veya hafifletici etki gösterebilir veya biyokimyasal süreçleri düzenleyebilir (Ahmed *et al.* 2013).

Antrasiklinler

Antrasiklinler sitotoksik antibiyotiklerdir ancak yüksek toksisiteye sahip oldukları için antibiyotik olarak kullanılmamaktadır (Rahman *et al.* 2007). İlaça kırmızı rengini veren tetrasiklik çekirdek ile ona glikosidik bir bağ ile bağlı bir amino şekerden (daunosamin) oluşan antrasiklin molekülü, tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon gruplarına sahiptir. Bunların işlevleri elektron alma ve elektron vermedir.

Antrasiklinler; kemoterapik ajan sınıfı olup;

- DNA baz çiftleri arasına girerek,
- Serbest oksijen radikallerini arttırarak,
- Topoizomerez II'yi (TopII) inhibe ederek,

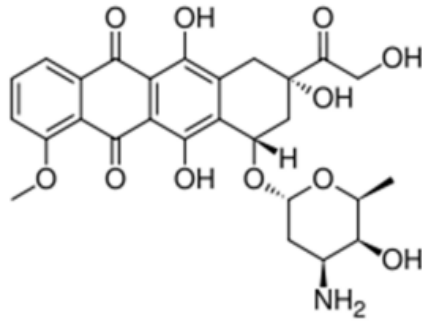
kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektedirler.

Antrasiklinlerin çeşitli yan etkileri gözlemlenmektedir. Görülen bu yan etkiler **Şekil 2**'de verilmiştir;

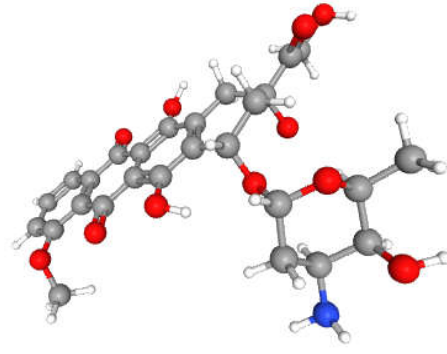


Şekil 2. Antrasiklinlerin yaygın yan etkileri

Sıklıkla kullanılan 4 çeşit antrasiklin mevcuttur (McGowan *et al.* 2017). Bunlar; Doksorubisin (Wallace, 2003) (**Şekil 3**), Daunorobisin (**Şekil 4**), Epirubisin (McEvoy GK, 2000) (**Şekil 5**) ve İdarubisin'dir (Hardman *et al.* 2001) (**Şekil 6**).

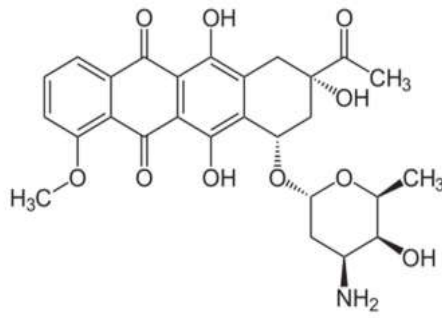


Kimyasal yapı

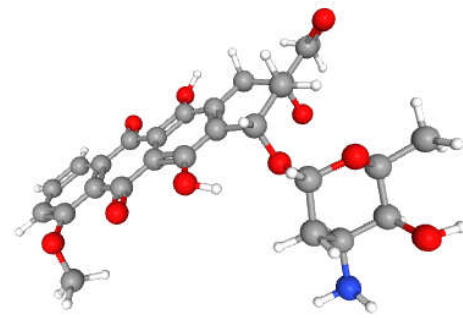


3D yapı

Şekil 3. Doksorubisin' in yapısı

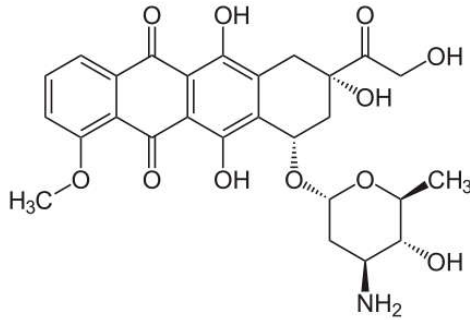


Kimyasal yapı

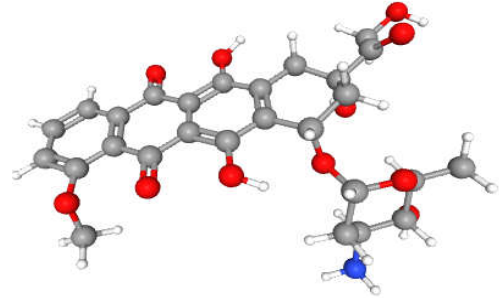


3D yapı

Şekil 4. Daunorubisin' in yapısı

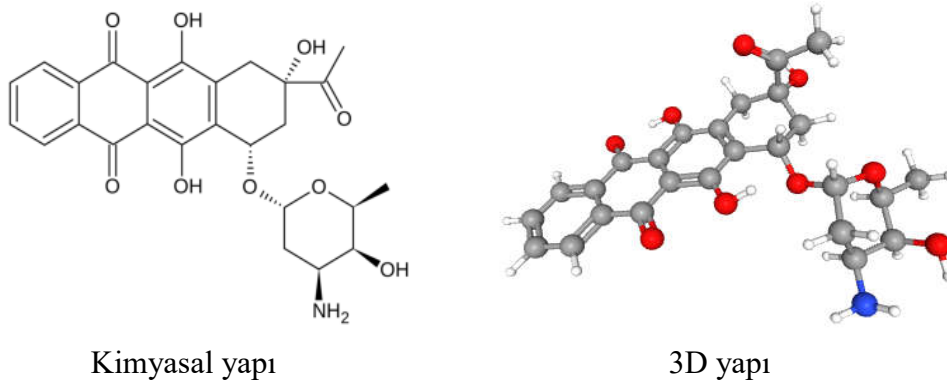


Kimyasal yapı



3D yapı

Şekil 5. Epirubisin' in yapısı (Epirubisin doksorubisinin 4 epimeridir)



Şekil 6. İdarubisin'in yapısı

İlk antrasiklin örneği *Streptomyces peucetius* bakterisinden türetilen Daunorubisindir. DOX daunorubisinden daha etkili olup daunorubisinden daha sonra üretilmiştir. DOX'un meydana gelmesi Daunorubisin molekülündeki 14. karbonun hidroksil grubu almasıyla gerçekleşmektedir (Hardman *et al.* 2001). DOX; en çok kullanılan antrasiklin grubu üyesi olup daunorubisin ve epirubisine kimyasal yapısı bakımından benzerlik göstermektedir.

Doksorubisin

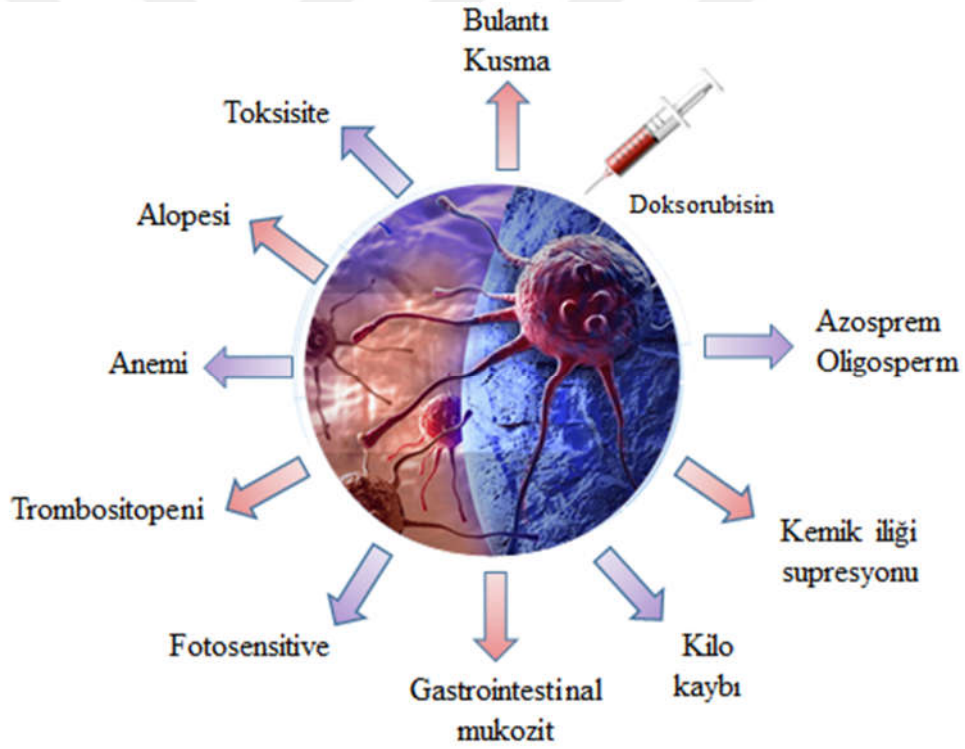
Doksorubisin tanımı ve yan etkileri

Antineoplastik ajanlardan biri olan ve Hidroksidaunorubisin olarak bilinen DOX, *Streptomyces peucetius* tarafından üretilen ikinci metabolit olup lipofilik özelliğe sahiptir (Cullu *et al.* 2003; Warpe *et al.* 2015). Bu bileşiğin tarihi, Farmitalia adındaki İtalyan araştırma şirketinin toprak mikroplarından üretilen antikanser bileşikleri bulma girişimiyle yaklaşık 1950'li yıllara dayanmaktadır (Dudka *et al.* 2005).

Doksorubisin, $C_{27}H_{29}NO_{11}$ kimyasal formülüne sahiptir. Bu bileşik, şiddetli lösemiler, lenfomalar ve solid organ tümörleri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan güçlü ve geniş spektrumlu bir ilaç olup hücresel onarım sürecini bozmaktadır (Shabalala *et al.* 2017; Gewitz, 1999; Minotti *et al.* 2004; Mross, 1991; Sayed-Ahmed *et al.* 2010). Böylece reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde artışa sebep olarak oksidatif stresi tetikler ve DNA hasarına yol açar (McGowan *et al.* 2017). Ayrıca DOX kullanımının dalak kasılmasına da yol açtığı bildirilmiştir. Tüm bunlar hasta sağlığını ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyebilecek istenmeyen yan etkilere sebep olduğu ve kusurlu immünometabolizmayı ve geri dönüşü olmayan makrofaj toksisitesini tetikleyerek enflamasyon-rezolüsyon sistemini bozduğu da tespit edilmiştir (Jadapalli *et al.* 2018).

Kemoteropötik ilaçların kullanımında karşılaşılan en büyük sorun toksisitedir. Bu yüzden verilen ilaçların toksitesi hakkında bilgi sahibi olunmalı ve izlenim yapılmalıdır (Hilmer *et al.* 2004). Ancak DOX ölümcül sonuçlara sebep olan kanser hastalarına faydalı

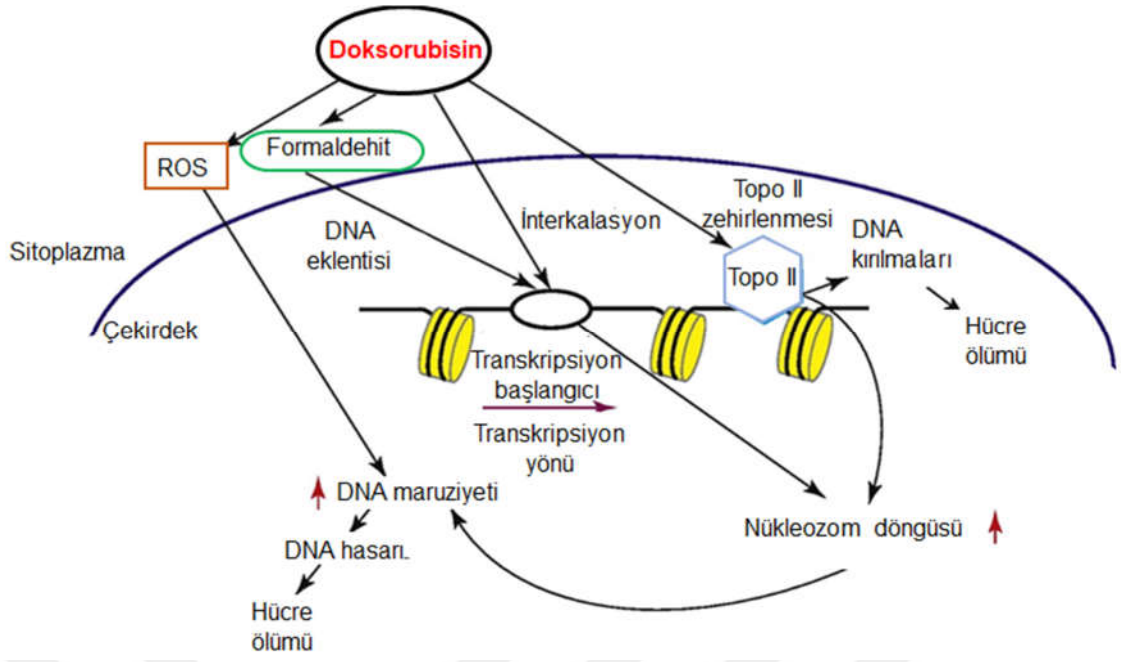
olması nedeniyle karşılaşılan toksisitenin ve diğer sorunların önemini azaltmaktadır (Kayaalp, 2002). DOX'un sebep olduğu yan etkilerin bazıları **Şekil 7**'de gösterilmiştir ve DOX'a en fazla maruz kalan organlar böbrekler ve karaciğer olduğu için DOX kaynaklı en yaygın yan etkiler hepatotoksisite ve nefrotoksisitedir (Park *et al.* 2012). DOX uygulaması sonucunda hastaların çoğunda alopesiye (saçkıran), flushinge (kızarıklık) ve tırnak üzerinde hiperpigmentasyona veya bantlaşmaya sebebiyet verebilir (Tacar *et al.* 2013). Doz ayarlaması kemik iliği supresyonu için oldukça öneme sahiptir (Bhinge *et al.* 2012). Ayrıca anemi ve trombositopeni de meydana gelebilir (Hilmer *et al.* 2004). Gastrointestinal mukozit ve stomatit (aftöz ülser) geri dönüşümü olan yan etkiler arasında yer almaktadır (Jayakaran, 2014). DOX tedavisinin ardından gonadlarda baskılanma, oligospermi, azospermi, amenore (adet düzensizliği), bulantı, diyare (ishal) ve anoreksiya (yeme bozukluğu) görülmektedir. Ayrıca kolonda da ülser veya nekroz meydana gelebileceği gözlemlenmiştir (Kesik ve ark. 2010; Gangadharan *et al.* 2017).



Şekil 7. Doksorubisin'in çeşitli yan etkileri (Goodman and JG 2001; Hajra *et al.* 2018)

Doksorubisin etki mekanizması

DNA baz çiftleriyle interkalasyon yaptığı, DNA ile ilişkili enzimlere bağlandığı ve bir dizi sitotoksik etki oluşturmak için çoklu moleküler yolları hedeflediği bilinen DOX'un etki mekanizması (**Şekil 8**) oldukça karmaşıktır ve tam olarak çözüme kavuşmamıştır (Tacar *et al.* 2013).

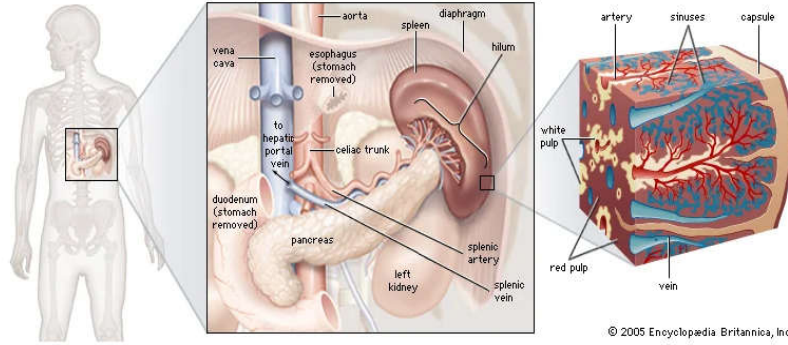


Şekil 8. Doksorubisin'in etki mekanizması (Yang *et al.* 2014'ten düzenlenmiştir)

Dalak

İnsan vücudundaki en büyük lenfoid organ dalaktır. Kırmızı, beyaz pulpalardan ve marjinal bölgeden meydana gelmektedir. Kırmızı pulpa ise dalak sinüsü ve dalak sinüslerinin arasında bulunan dalak kordonundan oluşur (Schmidt *et al.* 1988). İnsan dalağı vücudun sol tarafında, mide ile diyafram arasında uzanan sekizinci ila on birinci kaburgaların altında yer alır ve kabaca üçgen şeklinde uzun bir organdır. Yetişkinlerde bir çocuğun yumruğu büyüklüğüne ve 80-120 g ağırlığına sahiptir. Kadınlarda erkeklere oranla biraz daha büyüklük gösterir. Ortalama 13 ila 15 cm (5 ila 6 inç) uzunluğunda, 8 ila 10 cm (3 ila 4 inç) genişliğinde ve 4 cm (1,5 inç) kalınlığına sahiptir (Gray, 1977). Sıçanlarda bulunan dalağın ağırlığı yaklaşık olarak %0,2 olup dalağın en önemli işlevi, kanı vücutta zarar görmüş olan eski ve yabancı parçacıklardan temizlemektir ve insanlarda bulunan dalağın işleviyle benzer özellik göstermektedir.

Dalak anatomisine ve bir yetişkinin dalağının kaba görüntüsüne ait görsellere **Şekil 9** ve **Şekil 10**'da yer verilmiştir. Elastik liflere, yoğun fibröz dokuya ve düz kasa sahip olan dalak kapsül ile çevrili bir halde bulunarak dolaşımdaki ve kan havuzunda bulunan yabancı cisimleri ve kırmızı kan hücresi atıklarını işleyen bir filtrasyon aparatı görevini üstlenir. Ayrıca dalağa vücuttaki lenfositlerinin neredeyse dörtte birini içine alan en büyük ikincil lenfoid organ denilebilir (Kuper *et al.* 2002; Nolte *et al.* 2002; Balogh *et al.* 2004).



Şekil 9. Dalak anatomisi (Encyclopædia Britannica, 2005)



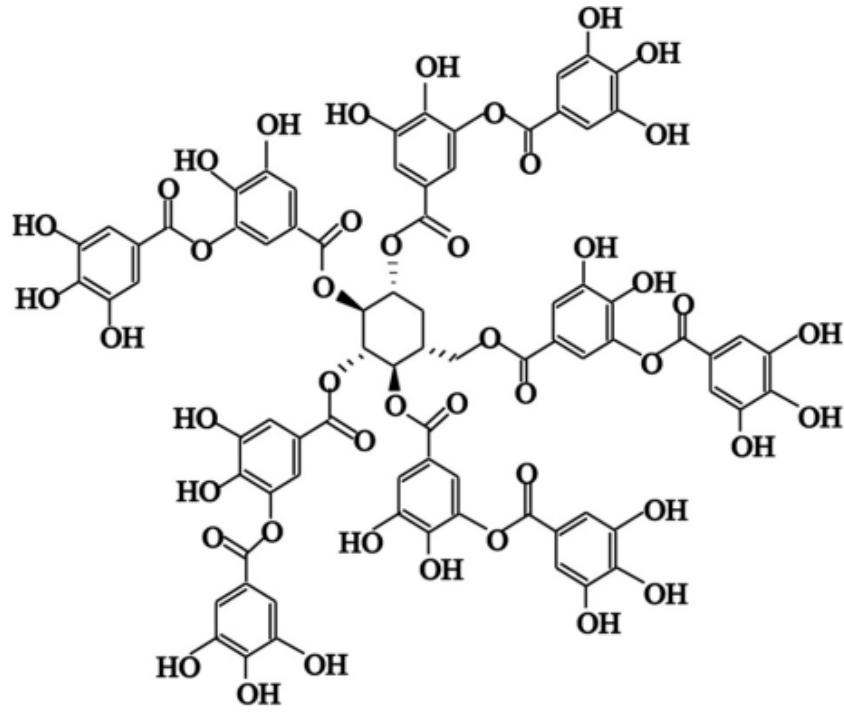
Şekil 10. Bir yetişkinin dalağının kaba görüntüsü (Zhang *et al.* 2020)

Tannik Asit

Araştırılan bitki bileşenlerinden olan Tannik asit (TA); alkaloidlere, amino asitlere, proteinlere ve çeşitli organik bileşiklere bağlanma ve çöktürme özelliklerine sahip olup özellikle yeşil çayda yaygın olarak bulunmaktadır (Kris-Etherton *et al.* 2002). Bu bileşik, suda çözünür hidrolize edilebilir tanenler grubunun bir formudur ve toksik olmayan çapraz bağlayıcı bir ajan olup antioksidan özelliğe sahiptir (Salminen and Karonen 2011). Ayrıca proliferasyonu inhibe etme, daha yüksek bir apoptotik hızı indüklemeye ve farklı kanserlerin metastazını yavaşlatma gibi çeşitli mekanizmalara sahiptir. Tanenler polifenol türüne ait örnek olup gıdalarda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. (Lopes *et al.* 1999).

Hurma, fasulye, kahve, çilek, çikolata, kırmızı şarap, kuru üzüm, ıspanak, üzüm, çay ve muz dahil olmak üzere çeşitli baklagiller, tahıllar, otlar, bitkisel içeceklerde ve meyvelerde bulunur (Chung *et al.* 1998b; Wu *et al.* 2004). Aslında tanenler temelde fiziksel olarak bitkilerin yüzey mumlarında veya vakuollerinde bulunur. Yapılan çeşitli çalışmalarda TA'nın güçlü anti-inflamatuar (Soyocak *et al.* 2019), anti-bakteriyel, anti-oksidatif (Gulcin *et al.* 2010), anti-apoptotik (Nie *et al.* 2016), anti-mutajenik ve anti-kanserojenik (Ren *et al.* 2019) özelliklere sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Hussain *et al.* 2016). Ayrıca yapılan çalışmalarda TA'nın DOX'un anti-kanser aktivitesinde arttırıcı, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin canlılıklarında azaltıcı ve meme tümörlerinde p53 ekspresyonunda arttırıcı etkileri gözlemlenmiştir (Naus *et al.* 2007; Tikoo *et al.* 2011). Farelerde TA'nın, polisiklik aromatik hidrokarbon karsinojenler tarafından indüklenen akciğer, deri ve ön mide tümörlerini inhibe ettiği görülmüştür (Khan *et al.* 1998; Vance *et al.* 1989).

TA'nın kimyasal yapısı **Şekil 11**'de gösterildiği gibi iki gallik asit molekülü ile beş hidroksil parçasının hepsinde esterlenmiş olan bir merkez, ve glikoz molekülünden oluşan bir deka-galloil glikozdur.



Şekil 11. Tannik asitin kimyasal yapısı (Zhang *et al.* 2017)

Tarihsel sürecine bakıldığında zehirleri emmek amacıyla panzehir olarak kullanılmış olup günümüzde ise döküntüleri tedavi etmek, serum lipid seviyesini düşürmek, meydana gelen kanamayı durdurmak, herhangi bir ağrı oluştuğunda ağrıyı hafifletmek, kan basıncını düşürmek, kan pıhtılaşmasını hızlandırmak veya karaciğer nekrozu üretmek amaçlarıyla kullanılmaktadır (Chung *et al.* 1998).

Ayrıca hidrojen bağı oluşturma, hidrofobik etkileşim ve elektrostatik etkileşim kurma özelliklerine de sahip olan TA; albümin, kolajen, jelatin gibi biyomakromoleküller ile doğrudan etkileşimde olup çeşitli hayvan hücreleriyle yapılan deneylerde kanser önleyici olarak kullanıldığı görülmüştür (Nepka *et al.* 1999; Sahiner *et al.* 2017).

Farelerde, koyunlarda, sığanlarda ve tavuklarda TA'nın etkisi araştırılmış olup % 60' ından fazlasının oral alımdan sonra bozulmadığını, fakat bir kısmının bağırsakta bulunan bakteriyel tannaz enzimiyle gallik aside hidroliz edildiği görülmüştür (Potter *et al.* 1968; Zhu *et al.* 1992; Terrill *et al.* 1994; Bravo *et al.* 1994; Nakamura *et al.* 2003). Bunun yanında TA'nın lipid oksidasyonunu baskıladığını bunu da radikalleri temizleyerek yaptığı görülmüştür (Maqsood *et al.* 2011).

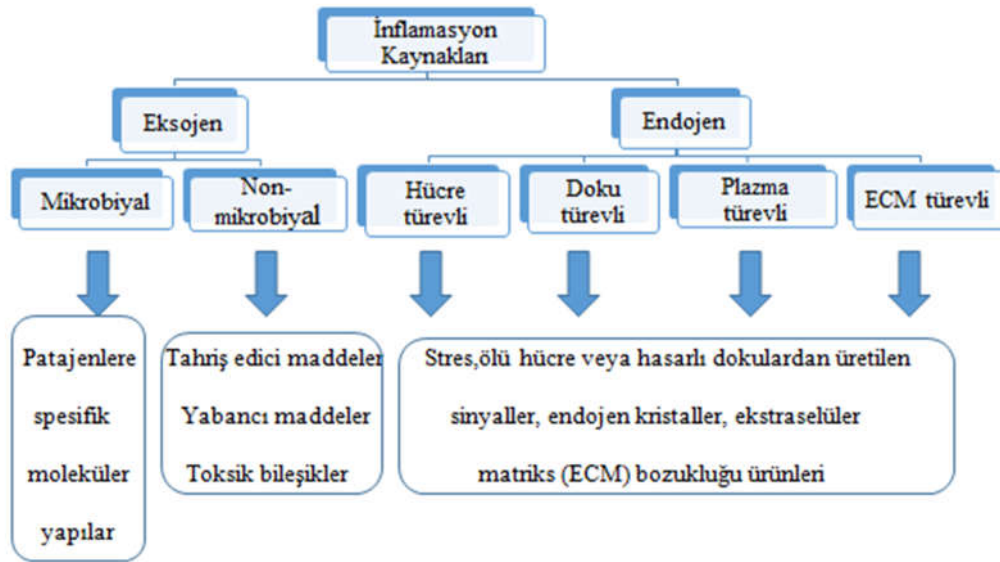
İnflamasyon ve Kaynakları

İnflamasyon, vücudun tahriş edici maddeler, hasarlı hücreler, patojenler gibi zarar veren uyarılara karşı meydana getirdiği kompleks bir biyolojik yanıttır (Anonymous 2016). Çeşitli inflamasyon kaynakları bulunmaktadır.

Bunlardan bazıları (Reuter *et al.* 2010);

- Mikrobiyal ve viral enfeksiyonlar,
- Radyasyona ve toksik kimyasallara maruz kalma,
- Otoimmün ve kronik hastalıklar;
- Obezite,
- Alkol tüketimi,
- Tütün kullanımı
- Yüksek kalori diyet faktörleridir.

İnflamasyon endojen ve eksojen uyaranlara karşı vücudun gösterdiği tepkidir (Anonymous 2016). İnflamasyon kaynakları **Şekil 12**'de gösterilmiştir.



Şekil 12. İnflamasyon kaynakları (Medzhitov, 2008)

İnflamasyon akut ve kronik olmak üzere iki evreden meydana gelmektedir. Akut inflamasyon; inflamasyonun başlangıç evresi olup aynı zamanda immün sistemin aktivasyonu ile bağlantılıdır. Ayrıca akut inflamasyon kısa sürelidir ve konakçı için de yararlıdır. Eğer inflamasyon uzun süreli olarak devam ederse kronik inflamasyon meydana gelir ve sonuçta diyabet, kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara olan yatkınlığı artırır (Reuter *et al.* 2010).

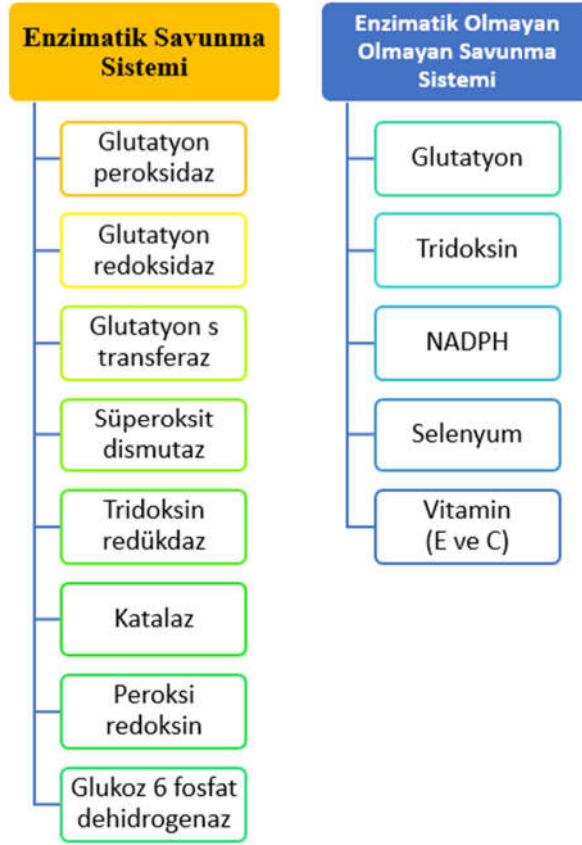
Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türleri (ROS) organizmaların fizyolojisinde çeşitli rollere sahip serbest radikallerdir (Wojtovich *et al.* 2012). Bunlar; Süperoksit (O_2^-), Hidroksil (OH^-), Peroksil (ROO^-) ve Hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi radikallerdir.

Serbest radikaller ikincil sinyal molekülleri olup iyon kanalları ve taşıyıcıları, aktivasyon protein-1 (Amstad *et al.* 1992), guanil siklaz (Palmer *et al.* 1987), NF- κ B (Schreck *et al.* 1991), kinaz, proteaz metabolik enzimler, G protein reseptörleri, GTPaz, fosfataz, translasyon regülatörleri, hücre döngüsü kontrol faktörleri, histon deasetilaz ve DNA metilaz'ın kontrolü için sinyal iletirler (Reth, 2002). Reaktif oksijen türlerinin temel kaynağı mitokondri olup, mitokondriyal solunum esnasında oksijenin eksik indirgenmesiyle süperoksit radikali meydana gelir (Turrens, 2003).

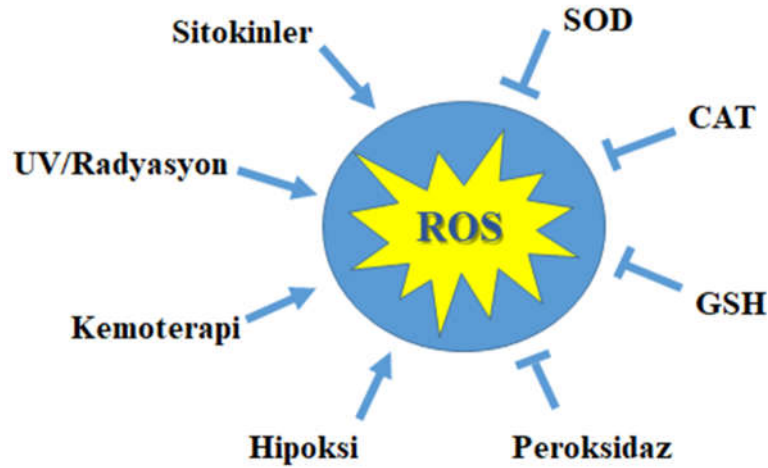
Süperoksit radikali; nitrik oksit sentetaz, NADPH oksidazlar ve ksantin oksidaz tarafından da meydana getirilir (Nathan and Ding 2010) ve süperoksit dismutaz enzimi katalizörlüğünde reaktifliği daha az olan hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Meydana gelen hidrojen peroksit ise metal iyonlarının varlığında fenton/haber-weiss reaksiyonları aracılığı ile reaktifliği daha fazla olan hidroksil radikaline dönüşür (Imai and Nakagawa 2003).

Fazla miktarlarda üretilen ROS'lar sahip oldukları yüksek aktivitelerden dolayı organizmalarda mutajenik, karsinojenik, toksik etkilere ve oksidatif strese neden olabilir (Adwas *et al.* 2019). Reaktif oksijen türleri proteinler, genetik materyal ve lipitler gibi makro molekülleri hedef almaktadır. Hedef olarak alınan lipitlerin peroksidasyona uğraması sonucu meydana gelen MDA, oksidatif stresin yani lipitlerin biyobelirtecidir (Tsikas, 2017). Serbest radikal zincir reaksiyonu makro moleküller ile çiftlenmemiş elektronların reaksiyona girmesiyle gerçekleşir. Organizmalar oksidatif stresin sebep olduğu zararlı etkileri ortadan kaldırmak için yapılarında antioksidan savunma sistemi bulundurlar (Birben *et al.* 2012) ve bunların zararlı etkilerine karşı organizmalar enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemlerine sahiptirler (Nathan and Cunningham-Bussel 2013; Rahal *et al.* 2014). Bu savunma sistemlerine **Şekil 13**'te yer verilmiştir.



Şekil 13. Enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri

Ayrıca ROS'ların üretiminin çeşitli aktivatörleri ve inhibitörleri vardır. Bu aktivatörler ve inhibitörler **Şekil 14**'te verilmiştir.

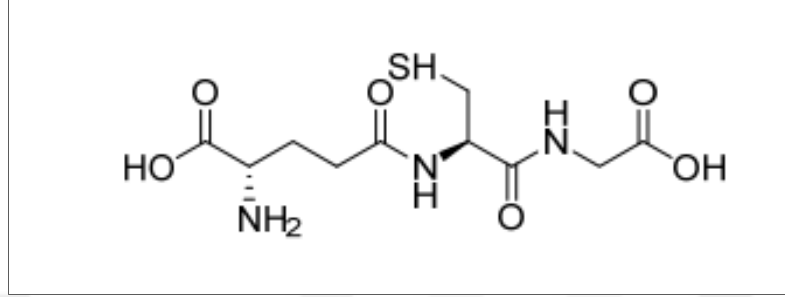


Şekil 14. Reaktif oksijen türlerinin üretiminin çeşitli aktivatörleri ve inhibitörleri

Glutasyon (GSH)

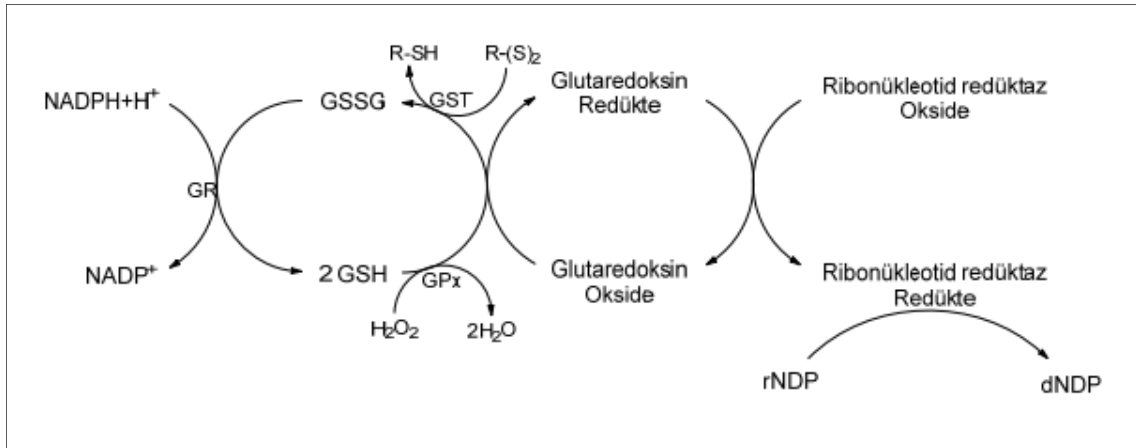
Glisin, glutamin ve sistein amino asitlerinden meydana gelen düşük molekül kütleli tiyol bileşiğine glutasyon denir (Meister and Anderson 1984). GSH; glutasyon sentetaz ve α -glutamil-sistein sentetaz enzimlerinin katalizörlüğünde iki aşamada elde edilir (Griffith,

1999). GSH yapısında bulunan tiyol grupları sayesinde detoksifikasyon, eksojen ve endojen bileşiklerin antioksidasyonunda önemli role sahiptir (Luberda, 2005). Ayrıca biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı enzimatik olarak korumaktadır (Di Mascio *et al.* 1991). Okside glutatyonun meydana gelmesi γ -glutamilsistein ile glisin arasında bulunan peptit bağının katalizlenmesiyle gerçekleşir (Oestreicher & Morgan, 2019). Okside glutatyonun molekül yapısına **Şekil 15**'de yer verilmiştir.



Şekil 15. İndirgenmiş glutatyonun (GSH) molekül yapısı

Oksidatif stres boyunca reaktif oksijen türlerine elektron vererek hücreyi oksidatif strese karşı koruyan GSH, rubuloz-5-fosfat sentezi için gerekli olan NADP^{+} 'nin oluşmasına katkı sağlayarak DNA sentezine (Thelander and Reichard 1979) ve hücre apoptozis sırasında seviyesini düşürerek hücrenin apoptosiz olmasına yardım eder (Franco *et al.* 2007). Ayrıca GSH hücre içerisinde birçok zararlı oksidanlarla reaksiyona girebilmektedir (Larson, 1988). GSH'ın DNA sentezindeki ve antioksidan savunma sistemindeki reaksiyonlarına **Şekil 16**'da yer verilmiştir.



Şekil 16. Glutatyon'un DNA sentezindeki ve antioksidan savunma sistemindeki reaksiyonları (Pallardó *et al.* 2009).

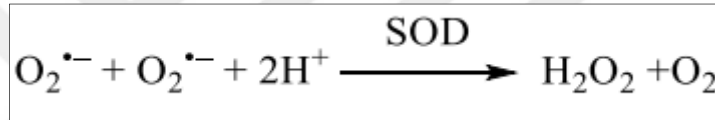
Süperoksit Dismutaz (SOD)

Ökaryotik organizmalarda hücre solunumunda elde edilen süperoksit radikalının toksik etkilerine karşı hücreyi koruyabilen antioksidan savunma sisteminin ilk hattı olan süperoksit dismutaz enzimi (SOD); süperoksiti detoksifiye etme özelliğine sahip tek ve çok

etkili enzimdir (Fridovich, 1978). SOD koruyucu özelliğe sahiptir ve bu özelliği radikallerin temizlenmesinde sitokrom sisteminin yetersiz kalması sonucu ortaya çıkmasıyla kendini göstermektedir (Çolak, 2011). Ökaryotik hücrelerde üç tip süperoksit dismutaz bulunur ve her biri farklı genler tarafından kodlanır (Choi *et al.* 2012). Bunlar;

- Mn koenzimine sahip olan Mitokondriyal süperoksit dismutaz; tetramer yapıda ve 80 kDa molekül kütesindedir.
- Cu/Zn koenzimlerine sahip olan sitozolik süperoksit dismutaz; dimer yapıda ve 32 kDa molekül kütesindedir.
- Cu/Zn koenzimlerine sahip olan Ekstraselüler süperoksit dismutaz; tetramer yapıdadır (Yost and Fridovich 1973; Huang *et al.* 2012).

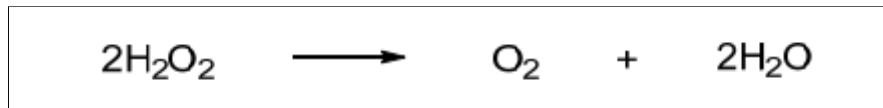
Ökaryotik hücrelerde SOD; süperoksiti, glutatyon, katalaz, peroksidaz ve peroksiredoksin tarafından suya detoksifiye edilen hidrojen peroksit'e dönüştüren reaksiyonu katalizleyerek (Şekil 17) radikallerin etkilerini azaltır (Mates, 2000).



Şekil 17. Süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Cunha-Oliveira *et al.* 2013; Che *et al.* 2016)

Katalaz (CAT)

İlk kez 1818'de hidrojen peroksitin keşfedilmesiyle fark edilen katalaz (CAT), 4 alt gruba sahip olup, her alt gruplarında ise NADPH ve hem grubu bulundurur. Bulundurduğu hem grubundan dolayı hemoprotein olarak da adlandırılır (Smith, 1983). Ayrıca CAT tetramer yapıda olup (Areekul and Boonme 1986) hayvan ve bitkiler dahil olmak üzere oksijeni kullanan bütün canlıların hücrelerinde yer alır ve hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü katalizler (Şekil 18) ve böylece hücreyi oksidatif strese karşı korur (Chelikani *et al.* 2004). Ayrıca CAT çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda oluşan oksidatif stresin engellenmesinde önemli role sahiptir (Goh *et al.* 2011).



Şekil 18. Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Cunha-Oliveira *et al.* 2013; Tehrani and Moosavi-Movahedi 2018)

Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Aerobik organizmalarda hidroperoksitlerin indirgenme reaksiyonunu katalizleyen GPx oksidatif strese karşı savunma mekanizmasında önemli rol oynamaktadır ve proteinleri 5 sınıfa ayrılır (Chu, 1994). Bunlar;

GPx1; İlk olarak Mills tarafından 1957 yılında tanımlanmıştır ve kırmızı kan hücrelerinin sitoplazmasında yüksek miktarda üretilir. Ayrıca GPx1 hücreleri oksidasyona bağlı meydana gelen hemolize karşı korur (Imai and Nakagawa 2003; Drevet 2006).

GPx2; gastrointestinal hücrelerin sitoplazmasında bulunur.

GPx3; plazmada bulunur ve ekstrasellüler GPx ya da plazma GPx olarak isimlendirilir (Takahashi *et al.* 1990).

GPx4; memelilerin kalp, testis ve beyin hücrelerinde ifade edilir ve fosfolipit hidroperoksit glutasyon peroksidaz olarak isimlendirilir (Duan *et al.* 1988).

GPx5; yalnızca memelilerin kauda epididimisinde ifade edilir ve Epididimal GPx olarak da adlandırılır ve GSH'ı GSSG'ye oksitleyerek hidrojen peroksidin suya dönüşümünü katalizlemektedir (Ghyselinck *et al.* 1993).

Hidrojen peroksitin, GSH yardımıyla indirgenmesi sonucu su ve glutasyon disülfid (GSSG) meydana gelir (Şekil 19) (Bhabak and Mugesh 2010).



Şekil 19. Glutasyon peroksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Cunha-Oliveira *et al.* 2013)

Glutasyon S-Transferaz (GST)

Yaklaşık 25 kDa molekül kütlesine sahip alt birimlerden oluşan GST; sentetik ksanobiyotikleri, oksidatif stres sonucu elde edilen hidroksialkenleri, endojen lipitleri ve DNA hiperoksitlerini substrat olarak kullanabilmekte ve hücrede biyomoleküllere zarar verebilmektedir (Berhane *et al.* 1994). GST'nin lipid peroksitlerini hedef alabilme özelliği sayesinde antioksidan sistemde rolü olduğu görülmüştür (Josephy, 2010). Mitokondriyel GST, membran-bağımlı mikrozomal GST ve sitozolik GST adında üç temel GST ailesi mevcuttur (Birben vd. 2012).

Malondialdehit (MDA)

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, serbest oksijen radikal tepkimeleri sonucu meydana gelir ve oldukça reaktif ürün özelliği gösterir (Otteneder *et al.* 2003). Hücrelerdeki membranlar ve çeşitli organeller yapılarında doymamış yağ asitleri bulundurulur. Yağ asitlerinin yapılarında yer alan çift bağlara oksijen bağlanır ve ROS'ların üretimi gerçekleşir. Üretilen ROS'lar hücre membranında yer alan doymamış yağ asitlerinin çeşitli ürünlere (MDA, Nitrit oksit, etan, alkol gibi) yıkılmasına sebep olarak oksidatif hasarı oluşturur (Serarslan ve ark. 2007).



MATERYAL VE METOT

Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar **Tablo 1**'de verilmiştir.

Tablo 1. Tez Dahilinde Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Marka
Blotlama (Semidry Blotter) Cihazı	Bio-Rad
Buzdolabı (+4°C)	Uğur
Çeker Ocak	Space Series Fume Cupboard
Derin Dondurucu (-20°C)	Vestel FT 280, Siemens
Derin Dondurucu (-86°C)	New Brunswick Premium U410
Distile Su (dH ₂ O) Üretme Cihazı	mp MINI Pure
Elektroforez (Dikey) Cihazı	Bio-Rad
Elektroforez (Yatay) Cihazı	Bio-Rad
Fusion FX Görüntüleme Cihazı	Vilber Lourmat
Güç Kaynağı	Thermo EC 135-90
Hassas Terazi	Denver Instrument
Homojenizatör	Benchmark Scientific
Isıtıcı Bloğu	Lab Line
Kesim Aletleri	Fine Science Tools
Kar Üretme Cihazı	Scotsman
Magnetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A
Mikrodalga Fırın	Beko MD 1500
Mikropipet Takımı	Eppendorf
Mini Santrifüj	Aosheng 40
Nanodrop	Thermo Scientific Multiscan GO
Otoklav	HMC Hırayama
PCR	Bio-Rad C1000 Thermal Cycler
pH Metre	Mettler Toledo
Real-Time PCR	Qiagen
Soğutmalı Santrifüjler	Hettich Mikro 220R
UV-VIS Spektrofotometre	Beckman Coulter
Vorteks	Wisd WiseMix VM-10
Çalkalamalı su banyosu	Memmert

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler **Tablo 2**'de verilmiştir.

Tablo 2. Tez Dahilinde Kullanılan Kimyasal Mazlemeler

Kimyasallar	Marka
Agaroz	Sigma
Etanol	Sigma
Etidyum bromür	Sigma
Hidrojen peroksit	Sigma
Hidroklorik asit	E. Merck AG
İndirgenmiş glutatyon	Sigma
Kalsiyum karbonat	Sigma
Ksantin	Sigma
Ksantin oksidaz	Sigma
Potasyum fosfat	E. Merck AG
Lysis Reagent	EcoTech
Reverse Transcriptase Buffer	Bio-Rad
RNas OUT	Thermo Scientefic
Sığır serum albümin	Sigma
Sodyum hidroksit	Riedel de Haen
5X iScript Reaksiyon karışımı	Bio-Rad
iScript Ters transkriptaz	Bio-Rad
Nükleaz free-su	Bio-Rad
Wash Buffer 1-2	EcoTech
CDNB	EcoTech
Elusyon Buffer	EcoTech
50X TAE	Thermo Scientefic
6X DNA loading dye	Thermo Scientefic
DNA ladder	Thermo Scientefic
SYBR Green	Bio-Rad
EDTA	Sigma
DTT	Sigma
NBT	Sigma
Sodyum karbonat	Sigma
Amonyum sülfat	Sigma
Sodyum fosfat	Sigma
GR enzimi	Sigma
GSH	Sigma
NADPH	Sigma
Potasyum hidroksit	Sigma
Trizma	Sigma
Asetik asit	Sigma
Metanol	Sigma
SDS	Sigma
TBA	Sigma
TritonX-100	Sigma

Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

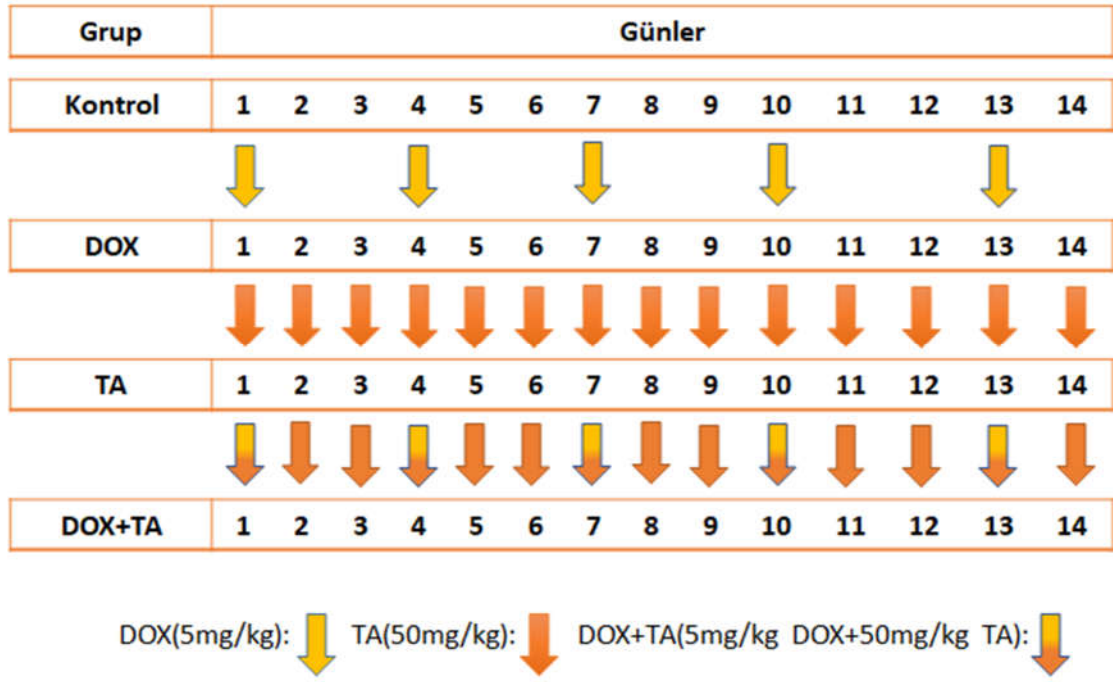
1. 1X TAE solüsyonu: 245 mL saf su içerisine 5 mL 50X TAE eklendi.
2. 0,3 mmol/L Ksantin: 9,31 mg ksantin 200 mL saf suda karıştırıldı ve 0,1 N NaOH'den iki damla damlatılarak çözünmesi sağlandı.
3. 150 µmol/L nitroblue tetrazolium (NBT) çözeltisi: 12,30 mg NBT alındı ve toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf su alınarak çözünmesi sağlandı.
4. 400 mmol/L sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi: 4,00 g Na_2CO_3 alındı ve toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf su alınarak çözünmesi sağlandı.
5. 1g/L Sığır Serum Albümin (BSA): 25 mg BSA alındı ve toplam hacim 25 mL olacak şekilde saf su alınarak çözünmesi sağlandı.
6. 0,167 U/mL ksantin oksidaz: stok ksantik oksidaz çözeltisi içerisinden alınarak 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltisi ile seyreltme yapıldı.
7. 2M Amonyum sülfat çözeltisi: 2,64 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ alındı ve toplam hacim 10 mL olacak şekilde saf su alınarak çözünmesi sağlandı.
8. 0,8 mM Bakır klorür ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi: 13,64 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alındı ve toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf su alınarak çözünmesi sağlandı.
9. 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH: 7,4): 6,81 g KH_2PO_4 alınarak suda çözünmesi sağlandıktan sonra 1N NaOH ile pH'sı 7,4'e ayarlanarak toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
10. 30 mM Hidrojen peroksit (H_2O_2): %30'luk H_2O_2 den 0,34 mL alındı ve fosfat tamponu yardımıyla 100 mL'ye tamamlandı.
11. 100 mM Potasyum fosfat tamponu (pH: 7,5): 13,62 g KH_2PO_4 alınarak suda çözünmesi sağlandıktan sonra 1N NaOH ile pH'sı 7,5 olarak ayarlanarak toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
12. 50 mM Tris-HCl (pH: 8,0): 0,60 g tris tartılarak yaklaşık 80 mL saf suda çözünmesi sağlandı. 1 M HCl ile pH'sı 8,0'e ayarlandı. Ardından toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
13. 2 mM NADP^+ : 7,63 mg NADP^+ tartılarak bir miktar saf suda çözünmesi sağlandı. Sonra toplam hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.
14. 2 mM NADPH: 8,33 mg NADPH tartılarak bir miktar saf suda çözünmesi sağlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.
15. 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH: 6,5): 1,36 g KH_2PO_4 alınarak yaklaşık 80 mL saf suda çözünmesi sağlandı. pH'sı 6,5 olarak ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

16. 20 mM indirgenmiş glutatyon (GSH): 30,73 mg GSH alınarak saf suda çözünmesi sağlandı ve toplam hacmi saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.
17. 25 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB): 50,65 mg CDNB alınarak yaklaşık 8 mL etil alkolde çözünmesi sağlandı ve sonrasında toplam hacmi etil alkol ile 10 mL'ye tamamlandı.
18. 1 M Tris-HCl (pH: 8,0): 12,11 g tris alınarak yaklaşık 80 mL saf suda çözünmesi sağlandı. HCl ile pH'sı 8,0 olarak ayarlandı. Ardından toplam hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
19. 7 mM t-bütil hidroperoksit: 5 M'lık Stok t-bütil hidroperoksit çözeltisinden 0,14 mL alınarak toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
20. Coomassie Brilliant Blue çözeltisi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi 50 mL %95'lik etanolde çözdürülerek çözeltiye %95'lik 100 mL fosforik asit eklendi. Saf su ile çözeltinin toplam hacmi 1000 mL'ye tamamladı ve elde edilen çözelti karanlık ortamda saklandı.

Sıçanların bakımı ve çalışma planı

Çalışmada kullanılacak olacak olan canlıların (*Rattus norvegicus*, n=20, 180±20 g, erkek) bakımı ve deneysel uygulamaları Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK)'ndan alınan Etik Kurul Onay Belgesi'ne (2019-16/252) uygun olarak Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM)'nde gerçekleştirilecektir. Sıçanlar standart ortam koşullarında (nem; %40-60, ışık; 12 saat karanlık/12 saat ışık, ısı; 20-22°C) muhafaza edilecektir.

DOX uygulaması yapılacak olan 180±20 g ağırlığındaki sıçanlar (n=20, 9-10 haftalık, erkek Sprague Dawley) 12 saat ışık-12 saat karanlık döngüde, %40-60 nem ve oda sıcaklığında tutuldu. Üç uygulama grubu ve bir uygulama yapılmayan kontrol grubu olmak üzere toplam dört grup oluşturuldu. Çalışmada canlılara uygulanacak olan kümülatif DOX dozu literatürde belirtilen çalışmalar referans alınarak belirlendi (Desai ve ark., 2013; Ali ve ark., 2020; To ve ark., 2003; Indu ve ark., 2014) ve **Şekil 20**'de belirtilen uygulama protokolü gerçekleştirildi.



Şekil 20. DOX ve TA uygulama protokolü (DOX veya TA belirteci olmayan günlerde canlılara sadece su ve yem verildi)

Kontrol grubundaki (n=5); canlılar deney boyunca normal düzeninde beslendi ve bu süre zarfında her gün serum fizyolojik enjekte (i.p) edildi. Enjeksiyondan kaynaklanan stres faktörünü bütün gruplarda eşitlemek amacıyla DOX grubuna DOX uygulanmayan günlerde serum fizyolojik (i.p) enjekte edildi. Son uygulamadan 24 saat sonra servikal dislokasyon yöntemi ile kesim yapıldı ve sıçanların tüm gruplarından alınan dalak dokularında antioksidan sistem unsurlarındaki (SOD, CAT, GST ve GPx) değişimler gen ve enzim düzeyinde incelendi. Ayrıca MDA ve GSH ölçümleri yapıldı. Ek olarak dalak dokularında Cox2, Alox5, Inos, IL-6, Tnf- α , Casp3 ve Bax genlerine ait mRNA ekspresyon seviyeleri qPCR yöntemi ile tespit edildi. Bu doğrultuda yapılan işlemler aşağıda belirtilmiştir.

Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Doku homojenizasyonu

- Dalak örnekleri 0,25 mg/ml olacak şekilde fosfat tamponu (50 mM, pH 7,0) içine alındı.
- Homojenizatör kullanılarak 20000 rpm hızda 30 sn süreyle homojenize edildi.
- Elde edilen homojenatlar 4 °C’de 15000 rpm’de 45 dk santrifüj edildi.
- Süpernatantlar enzim aktivitelerinin ölçümünde kullanıldı (Görözen, 2010).

Bradford yöntemiyle protein tayini

Hazırladığımız homojenatın protein miktarı Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Bradford Yöntemi, Comassie Brilliant Blue G-250 boyasının protein ile oluşturduğu kompleksin 595 nm dalga boyundaki absorbansının ölçülmesi temeline dayanan yöntemdir. Sığır serum albümin ile farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı vortekslendi ve 10 dk karanlıkta inkübe edildi. Daha sonra standart çözeltilerin optik dansiteleri 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlar ile standart eğri grafiği ve denklemi oluşturuldu. Homojenatlardaki protein miktarı **Tablo 3**'teki küvet içeriği ile belirlendi ve ölçümler her numune için 3 kez tekrarlandı.

Tablo 3. Protein Tayini Deney Protokolü

Stok çözeltiler	Kontrol küvet (µl)	Standart küvet (µl)
Commassie Brillant Blue G-250	4900	4900
Saf Su	100	-
Homojenat	-	100

SOD aktivite ölçümü

Sun *et al.* (1988) tarafından belirtilen protokole (**Tablo 4**) göre SOD aktivite tayini yapıldı. Süperoksit dismutaz enzimi solunum sırasında oluşan süperoksit radikalının H₂O₂'e ve O₂'e dönüşümünü katalizlemektedir. Absorbans değerleri kullanılarak enzim aktiviteleri aşağıda yer alan formül kullanılarak hesaplandı.

$$SOD \text{ aktivitesi } \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{OD_{k\ddot{o}r} - OD_{numune}}{OD_{k\ddot{o}r}} \times 25$$

Tablo 4. SOD Aktivite Deney Ptotokolü

	Kör tüpü		Numune Tüpü
Reaktif Karışımı	2450 µl	☒	2450 µl
Numune	500 µl		-
Distile su	-	-	500 µl
Ksantin Oksidaz	50 µl		50 µl
20 °C'de 25 dk inkübasyon			
CuCl ₂ .2H ₂ O	50 µl		50 µl

CAT aktivite ölçümü

CAT aktivite tayini, Aebi (1984) tarafından belirtilen yönteme göre yapıldı. Ölçümler için **Tablo 5'**de verilen protokol takip edildi ve 240 nm'de 15'er sn aralıklarla 1 dk boyunca absorbens ölçümü yapıldı. Absorbans değerleri kullanılarak enzim aktiviteleri aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$CAT\ aktivitesi \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{A \cdot V_t}{\epsilon \cdot t \cdot V_o}$$

A = 240 nm'deki absorbens değeri

V_t = Toplam reaksiyon hacmi (mL)

V_  = örnek hacmi (mL)

  = H₂O₂'nin molar ekstinksiyon katsayısı (0.0396 cm²/ mol)

t = Reaksiyon zamanı (dakika)

Tablo 5. CAT Aktivite Deney Ptotokolü

	K�r tüpü		Numune Tüpü
Fosfat tamponu	1500 �l	�	1490 �l
Hidrojen peroksit	1500 �l		1500 �l
Numune	-	-	10 �l

GPx aktivite  l  m 

GPx aktivite tayini, Beutler (1984) tarafından belirtilen yönteme göre yapıldı. Ölçümler için **Tablo 6'**da verilen protokol takip edildi. K r olarak da saf su kullanıldı. 340 nm'de 10 dakika süreyle her 5 dakikadaki absorbens değişiminin ölçümü yapıldı. Absorbans değerleri kullanılarak enzim aktiviteleri aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$GPX\ aktivitesi \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\Delta A}{t} \times \frac{V_t}{6,22 \cdot V_o}$$

 A= 340 nm'deki zamana bağlı absorbens farkı

V_t= Toplam hacim

t= Zaman

V_ = örnek hacim

6.22= 1 cm'lik ışık yolunda 1 nmol NADPH'ın verdiği absorbens değeri

Tablo 6. Gpx Aktivite Deney Ptotokolü

	Numune tüpü
Saf su	660 µl
Tris tamponu	100 µl
GSH	20 µl
GR	100 µl
NADPH	100 µl
Numune	10 µl
t-butil hidroperoksit	10 µl

GST aktivite ölçümü

GST enzim aktivitesi oda sıcaklığında Habig et al. (1974) metoduna göre yapıldı. GST aktivite ölçümü **Tablo 7**'de belirtilen miktarlardaki çözeltiler kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerle ait spektrofotomerik ölçümler 3 dk süreyle 340 nm'de kuvarz küvetler kullanılarak yapıldı. Elde edilen bu değerler protein tayini sonuçları yardımı ile bir araya getirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplandı.

$$\text{Enzim Ünitesi/ml} = (\Delta\text{OD} / \epsilon_{\text{ext}}) \times (V_T / V_E) \times S_F$$

ΔOD : 340 nm dalga boyundaki optik dansite değişimi

ϵ : CDNB'nin molar ekstinksiyon katsayısı

V_T : Toplam küvet hacmi

V_E : Homojenat ya da enzim hacmi

S_F : Seyreltme faktörü

t = Zaman

Tablo 7. GST Aktivitesi Deney Protokolü

Bileşenler	Kör (µl)	Numune (µl)
Potasyum fosfat tamponu (1M)	200	200
dH ₂ O	730	729
Homojenat	-	1
CDNB	20	20
GSH	50	50
Toplam	1000	1000

GSH aktivite ölçümü

Sıçan dalak dokusunda GSH miktarı Ellman (1959) metodu ile hesaplandı. Bu metodun temelinde, bir ekivalent 5,5'- dityobis (2-nitrobenzoat)'un bir ekivalent tiyol grubu ile reaksiyonu sonucunda oluşan 2-nitro-5-tyobenzoat'ın 410 nm dalga boyundaki absorbansının ölçülmesi yer almaktadır. GSH aktivite ölçümü **Tablo 8**'de belirtilen miktarlardaki çözeltiler vortekslendi ve 5 dk inkübe edildi. Daha sonra 410 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Ölçümler her numune için 3 kez tekrarlandı. Sonuçlar standarda ait veriler kullanılarak hesaplandı.

Tablo 8. GSH Aktivitesi Deney Protokolü

Stok çözeltiler	Kontrol (µl)	Numune (µl)
200mM KH ₂ PO ₄ /50mM EDTA	270	240
6 mM DTNB	30	30
Süpernatant (std. GSH)	-	30

MDA ölçümü

MDA ölçümü için Placer *et al.* (1966) tarafından modifiye edilen yöntem kullanıldı. Ölçümler için **Tablo 9**'da verilen protokol takip edildi. Küvet içeriği 100°C'de 20 dk inkübe edilip soğutulmasını takiben 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve elde edilen üst faz absorbansları 532 nm'de ölçüldü (Renk ayırıcı; 3:1 TCA-TBA solüsyonu, Standart; Tetraetoxipropan). Sonuçlar standarda ait veriler kullanılarak hesaplandı.

Tablo 9. MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler ve Miktarları

Bileşenler	Kör (µl)	Standart (µl)	Örnek
Örnek	-	-	0.25
Standart	-	0.25	-
Serum fizyolojik	0.25	-	-
Ayıraç	0.25	0.25	0.25

Primer Dizaynı

Gen ekspresyon ölçümü yapılacak olan hedef genlere ait sekanslar <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> veritabanı kullanılarak elde edildi. Ardından bu genlere ait primerler <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> yardımıyla tasarlandı. Tasarlanan primerlere **Tablo 10**'da yer verilmiştir.

Tablo 10. Primerler

Gen	5'–3' primer dizisi	Tm (°C)	Erişim Numarası
Cox2	F: AACACACACAAGCACAATAGACG	60.15	M64496.1
	R: GGAGGGAAGGGCGATTAG	59.61	
Alox5	F: TGGCATCTAGGTGCAGTGTG	59.89	(Jones <i>et al.</i> 2013)
	R: CCTCCAGGTTCTTGCGGAAT	60.10	
IL-6	F: AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	59.84	NM_012675.3
	R: TACTGGTCTGTTGTGGGTGG	60.33	
Tnf- α	F: AGGAGGGAGAACAGCAACTC	59.45	NM_012675.3
	R: TGTATGAGAGGGACGGAACC	59.93	
Casp 3	F: AGGAGCAGTTTTGTGTGTGTG	59.79	NM_012922.2
	R: AGTTTCGGCTTTCCAGTCAG	59.47	
Bax	F: AGGGTGGCTGGGAAGGC	59.92	(Behroozaghdam <i>et al.</i> 2015)
	R: TGAGCGAGGCGGTGAGG	59.50	
Sod	F: GGTCCACGAGAAACAAGATGA	60.10	NM_017050.1
	R: CAATCACACCACAAGCCAAG	60.15	
Cat	F: ACATGGTCTGGGACTTCTGG	59.96	NM_012520.2
	R: CCATTTCGCATTAACCAGCTT	60.10	
Gpx	F: TCGGACATCAGGAGAATGG	59.57	NM_030826.4
	R: AGGTAAAGAGCGGGTGAGC	59.44	
Inos	F: GGATATCTTCGGTGCAGTCTT	59.40	(Sartoretto <i>et al.</i> 2019)
	R: CTGTAACTCTTCTGGGTGTCAGA	60.20	
β -actin	F: TGTGGATTGGTGGCTCTATC	60.17	(Kelm-Nelson <i>et al.</i> 2016)
	R: AGAAAGGGTGTAACACGCAG	60.20	

Real Time PCR Uygulamaları**Dalak dokusundan total RNA izolasyonu**

Canlılardan alınan doku örneklerinden total RNA izole etmek için ticari kit (EcoPURE total RNA kit, EcoTech) kullanıldı ve üretici firmanın önerdiği protokol takip edildi. İzole edilen genetik materyale ait konsantrasyon ve saflık derecesi Nanodrop cihazı ile ölçüldü. RNA izolasyonu için aşağıdaki protokol takip edildi:

1. Dalak dokusundan 30 mg örnek alınıp üzerine 5 adet beats ve 400 μ l Lizis Buffer eklendi.
2. Homojenizatörde parçalama yapıldı.

3. Hücre kalıntısını peletlemek için oda sıcaklığında maksimum hızda 2 dakika santrifüj yapıldı.
4. Süpernatant mikrosantrifüj tüpüne alındı.
5. Süpernatantla aynı hacimde etanol eklendi ve 10 saniye vorteks yapıldı.
6. Toplama tüplerine kolon yerleştirildi.
7. 5. adımdaki karışım (süpernatant – etanol) kolona eklendi.
8. Oda sıcaklığında maksimum hızda 30 saniye santrifüj yapıldı.
9. Süzüntü döküldü, üzerine 400 µl Wash Buffer 1 eklendi ve 30 saniye santrifüj yapıldı.
10. Süzüntü döküldü, üzerine 500 µl Wash Buffer 2 eklendi ve 30 saniye santrifüj yapıldı.
11. Kolon santrifüj tüpüne yerleştirildi.
12. Kolonun tam ortasına 40 µl Elusyon tampon eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
13. Maksimum hızda 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.
14. Elde edilen RNA -80 °C'ye bırakıldı.

Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi

Saflaştırılmış proteinlerin ve nükleik asitlerin molekül ağırlıkları, miktarları ve alt tiplerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan jel elektroforezi moleküler bir yöntem olup poliakrilamid jellerin ve agarozun kullanıldığı elektroforez yöntemidir. Çalışma prensibi ise çözünmüş moleküllerin elektriksel bir alanda elektrik yüklerine göre göç etmelerine dayanır (Kocpinar, 2015). RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezinde incelenmesi için aşağıdaki işlemler yapıldı.

- 1.88 ml 20 x MOPS solüsyonu içerisine 0.3 g agaroz ve 28.5 ml ddH₂O eklendi ve kaynatıldı. Daha sonra 37°C'ye kadar soğuması beklenildi. Ardından 6.68 µl formamid ve 5.5 µl Etidyum bromür eklendi ve jel donmaya bırakıldı.
- 1 µl RNA ve 3.5 µl ddH₂O üzerine 0.5 µl 20x MOPS solüsyonu eklendi. Daha sonra 5 µl formamid eklenerek 65°C'de 15dk inkübasyon gerçekleştirildi. Ardından agaroz jele 5-7'şer µl olacak şekilde yüklenen RNA örnekleri 80V (Volt)'da 30 dk boyunca yürütüldü ve yürütme işleminin ardından jelin görüntüsü alındı.

İzole edilen nükleik asitlerin miktar tayininde spektrofotometrik yöntemler kullanılır. Absorbsiyon temeline dayanan bu yöntemde biyolojik bir kaynaktan saflaştırılan nükleik

asitlerdeki kontaminasyonu saptayarak miktar tayininin yapılması için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapılır. Elde edilen RNA örneklerinin spektroskopik ölçümü nanodrop ile yapılır, konsantrasyonu ve saflığı belirlendi.

Komplementer DNA (cDNA) sentezi

cDNA sentez işlemi ticari kit (**Tablo 11**) (iScript cDNA sentez kiti; BIO-RAD) kullanılarak, üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre yapıldı. Sentez işlemi bitirildikten sonra elde edilen ürünler qPCR aşamasında kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

Tablo 11. cDNA Sentez Reaksiyonunun Bileşenleri

Bileşenler	µL
5X iScript Reaksiyon karışımı	4
iScript Ters transkriptaz	1
Nükleaz free-su	Değişken
Kalıp RNA	Değişken
Toplam hacim	20

cDNA sentezi için aşağıdaki protokol takip edildi:

1. RNA örnekleri buz üzerine alındı. Sonrasında 5X iScript Reaksiyon Karışımı, iScript Ters Transkriptaz ve Nuclease-free su kullanılmadan önce vorteks yardımıyla karıştırıldı.
2. Steril PCR tüplerine sıralı bir şekilde uygun miktarlarda karışım hazırlanarak üzerlerine uygun miktarda izole edilen RNA’lar eklendi.
3. cDNA sentezi için **Tablo 12**’de verilen protokol basamakları cihazda ayarlandı ve tüpler cihaza yerleştirilip reaksiyon başlatıldı.
4. Reaksiyon sonlandırılıp tüpler cihazdan alındı ve sentezlenen cDNA’lar Real time PCR işlemlerinde kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

Tablo 12. cDNA Sentez Reaksiyon Protokolü

Reaksiyon Protokol	Zaman- Sıcaklık
Bağlanma	5 dakika 25°C
Ters transkriptaz	20 dakika 46°C
RT inaktivasyon	1 dakika 95°C
Opsiyonel adım	4°C bekleme
Reaksiyon Protokol	5 dakika 25°C

Gen ekspresyon analizi

Kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi maksadıyla Real-Time PCR analizi yapıldı. Bu nedenle dokulardan izole edilmiş total RNA'dan revers transkriptaz enzimiyle hazırlanan cDNA'lar kullanıldı. Real-Time PCR reaksiyon karışımı ve Real-Time PCR reaksiyon şartları **Tablo 13** ve **Tablo 14**'te verildi.

SYBR Green kullanılarak genlerin (*Cox2*, *Alox5*, *Inos*, *IL-6*, *Tnf- α* , *Casp3*, *Bax*, *Sod*, *Cat*, *Gpx*, β -actin) ekspresyon miktarları ölçüldü.

Tablo 13. Real-Time PCR Reaksiyon Karışımı

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
Master Mix	12,5 μ l
Forward Primer	0,25 μ l
Reverse Primer	0,25 μ l
Su	9,5 μ l
Cdna	2,5 μ l
Toplam	25 μ l

Tablo 14. Real-Time PCR Reaksiyon Şartları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
50 °C	2 dk	1 döngü
95 °C	10 dk	1 döngü
95 °C	10 sn	45 döngü
60 °C	1 dk	45 döngü

Sonuçlar Δ Ct metodu (Livak and Schmittgen 2001) kullanılarak değerlendirildi

İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler 3 tekerrür olacak şekilde gerçekleştirildi Elde edilmiş olan verilere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi uygulandı. Veri değerlendirmesi için GraphPad Prism version 5.00 paket programı (GraphPad Software, San Diego, USA) kullanıldı (^{ns}p>0,05, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001).

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Dalak Dokusundan Saflaştırılan RNA'nın Nicel ve Nitel Analiz Sonuçları

Total RNA jelde yürütüldüğünde 28S (veya 23S) ve 18S (veya 16S) rRNA bantları görülmektedir ve 18S rRNA bandı 28S rRNA bandının neredese yarısı kadar bir parlaklık oluşturması, 2:1 oranında toplam RNA'nın parçalanmadan elde edildiğinin en büyük kanıtıdır.

Sıçan dalak dokusundan izole edilen RNA'nın jel görüntüsü ve konsantrasyon sonuçları **Şekil 21** ve **Tablo 15**'te verilmiştir.



Şekil 21. Sıçan dalak dokusundan izole edilen RNA'ya ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

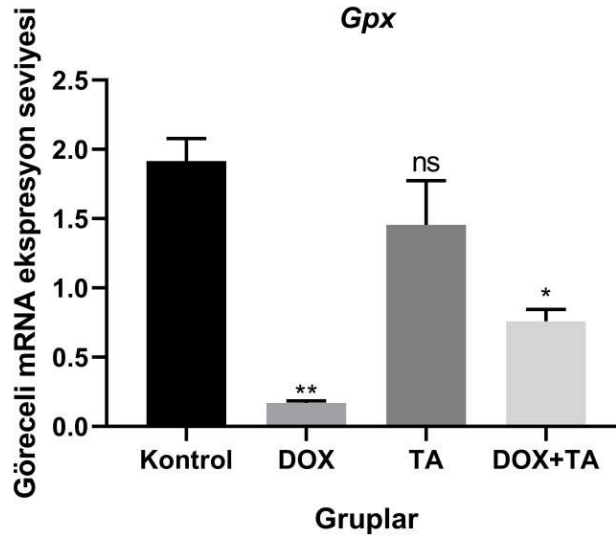
Tablo 15. Sıçan Dalak Dokusundan İzole Edilen RNA'nın Konsantrasyonu

Örnekler	Konsantrasyonlar (ng/μl)	Saflık ($A_{260/280}$)
K1	452	1,95
K2	668	2,10
K3	407	2,05
T1	414	1,97
T2	350	1,98
T3	307	2,80
D1	134	2,00
D2	252	1,96
D3	245	2,12
DT1	201	1,95
DT2	409	2,60
DT3	299	1,95

(K: Kontrol, TA: Tannik Asit, D: Doksorubisin DT: Doksorubisin + Tannik Asit)

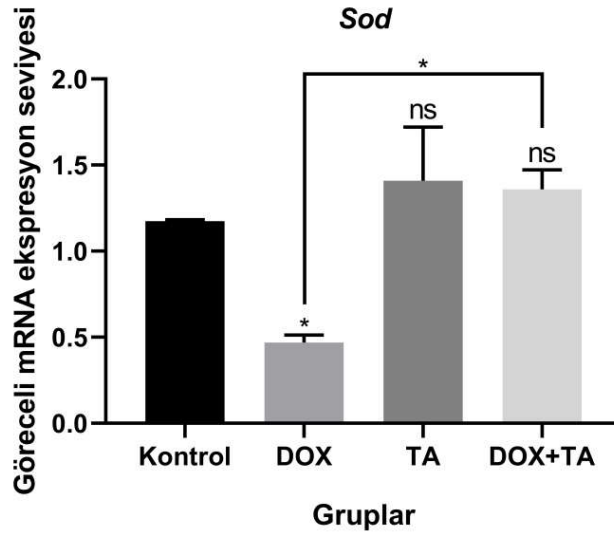
Dalak Dokusunda Antioksidan Sistem Kantitatif Gen Ekspresyon Seviyeleri

Sonuçlar göz önüne alındığında DOX uygulanan grupta Glutatyon peroksidaz (*Gpx*) mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olmuştur. DOX+TA (kombine grup) uygulanan grupta da azalma meydana gelmiştir ancak bu azalma kontrol grubuna yakındır. TA uygulanan gruba bakıldığında ise oluşan azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. *Gpx* ekspresyon seviyeleri **Şekil 22**'de verilmiştir.



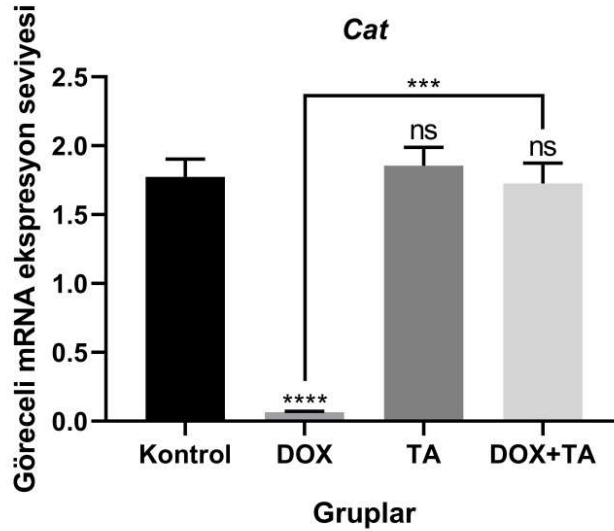
Şekil 22. Kontrol ve sıçan uygulama gruplarına ait dalak dokularındaki *Gpx* mRNA ekspresyon seviyesi

Elde edilen sonuçlara bakıldığında kontrol grubuna kıyasla, Süperoksit dismutaz (*Sod*) göreceli mRNA ifadesinde DOX uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gözlenirken, TA ve DOX+TA uygulanan gruplarda anlamlı bir artış gözlemlenmedi. DOX ve DOX+TA uygulanan gruplar kendi aralarında kıyaslandığında ise anlamlı bir artış gözlemlendi *Sod* ekspresyon seviyeleri **Şekil 23**'te verilmiştir.



Şekil 23. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki *Sod* mRNA ekspresyon seviyesi

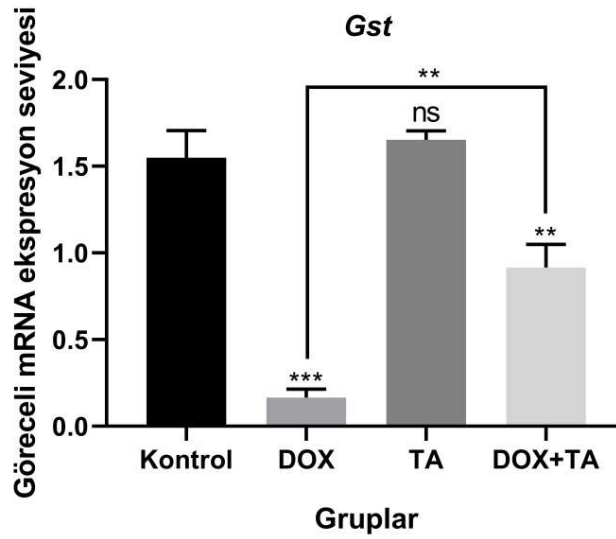
Katalaz (*Cat*) göreceli mRNA ifadesine bakıldığında kontrol grubuna kıyasla, DOX uygulanan grupta anlamlı derecede azalma meydana gelirken, TA ve DOX+TA uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim meydana gelmedi. DOX ve DOX+TA uygulanan gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında ise kombine grupta görülen artış anlamlıdır. *Cat* mRNA ekspresyon seviyeleri Şekil 24’te verilmiştir.



Şekil 24. Kontrol ve sıçan uygulama gruplarına ait dalak dokularındaki *Cat* mRNA ekspresyon seviyesi

Glutasyon S-transferaz (*Gst*) mRNA ekspresyonu göz önüne alındığında kontrol grubuna kıyasla, DOX ve DOX+TA uygulanan gruplarda anlamlı derecede azalma gözlemlendi. TA uygulanan grupta ise anlamlı bir artış meydana gelmedi. DOX ve DOX+TA uygulanan gruplar kendi içlerinde kıyaslandığında kombine grupta meydana gelen artışın

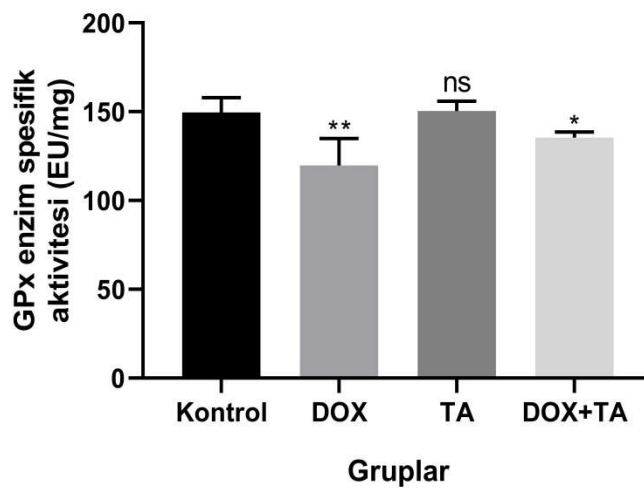
istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. *Gst* mRNA ekspresyon seviyeleri **Şekil 25**'de verilmiştir.



Şekil 25. Kontrol ve sıçan uygulama gruplarına ait dalak dokularındaki *Gst* mRNA ekspresyon seviyesi

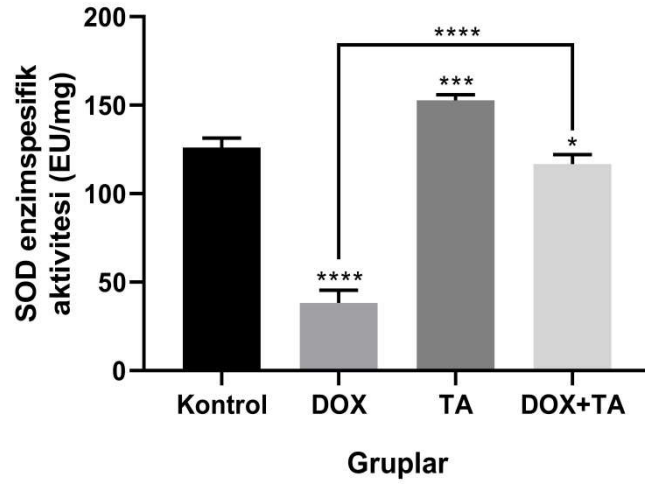
Dalak Dokusunda Antioksidan Sistem Enzim Aktivite Sonuçları

Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak kontrol grubuna kıyasla, Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesinde DOX uygulanan grupta anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. DOX+TA uygulanan grupta da anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ancak DOX'a kıyasla daha az azalma meydana gelmiştir. TA uygulanan grupta ise oluşan azalma istatistiksel olarak anlamsızdır. GPx enzim aktivitelerine **Şekil 26**'da yer verilmiştir.



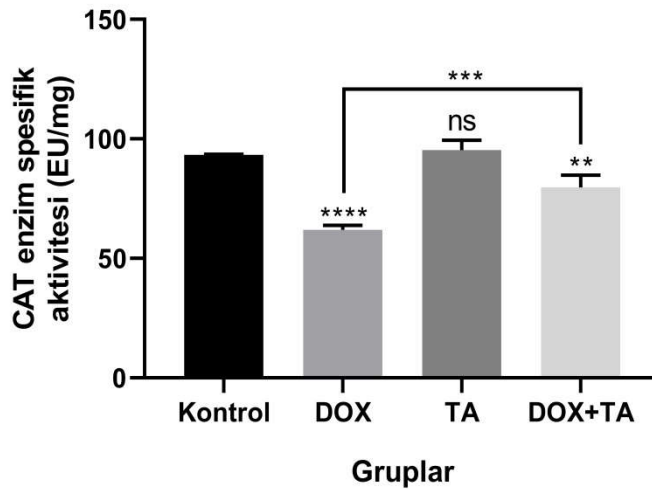
Şekil 26. Kontrol ve sıçan uygulama gruplarına ait dalak dokularındaki GPx enzim spesifik aktivitesi

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi sonuçlarına bakıldığında kontrol grubuna kıyasla, DOX uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelirken, TA uygulanan grupta anlamlı bir artış meydana gelmiştir. DOX+TA uygulanan gruptaki değişim ise anlamsızdır. DOX ve DOX+TA uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kombine grupta anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. SOD enzim aktivitelerine **Şekil 27**'de yer verilmiştir.



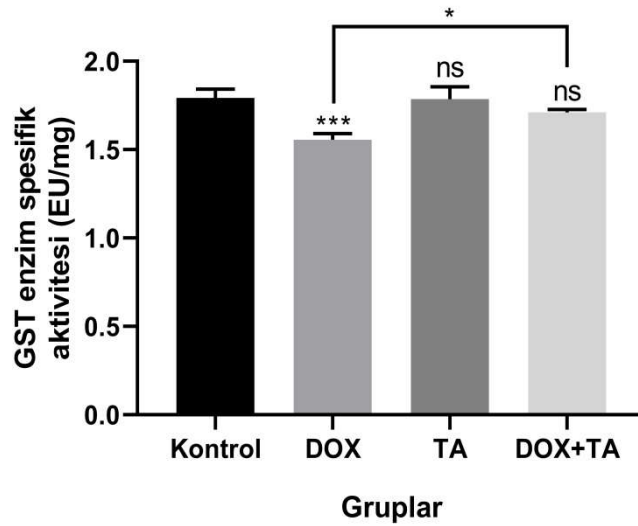
Şekil 27. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki SOD enzim spesifik aktivitesi

Katalaz (CAT) enzim aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla, DOX ve DOX+TA (kombine grup) uygulanan gruplarda anlamlı bir azalma görülmüştür. DOX+TA ve DOX uygulanan gruplar karşılaştırıldığında DOX'a kıyasla kombine grupta meydana gelen artış anlamlıdır. TA uygulanan grupta ise anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. CAT enzim aktivitelerine **Şekil 28**'de yer verilmiştir.



Şekil 28. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki CAT enzim spesifik aktivitesi

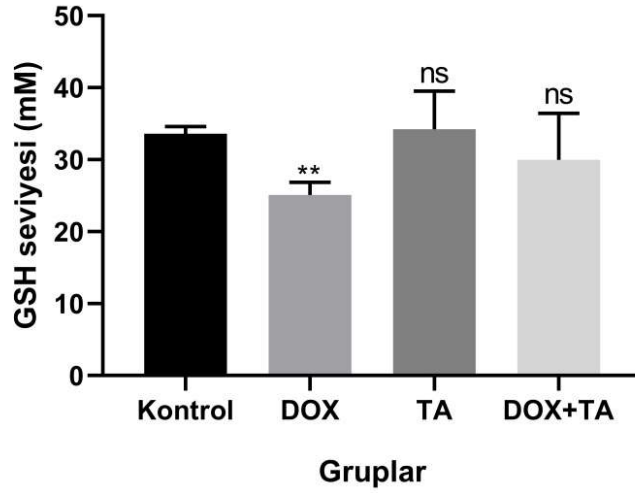
Glutasyon S-transferaz (GST) enzim aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla, DOX uygulanan grupta meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlıyken, DOX+TA uygulanan grupta meydana gelen azalma ve TA uygulanan grupta meydana gelen artış önemsizdir. Ancak DOX+TA ve DOX uygulanan gruplar karşılaştırıldığında DOX'a kıyasla kombine grupta meydana gelen artış anlamlıdır. GST enzim aktivitelere **Şekil 29**'da yer verilmiştir.



Şekil 29. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki GST enzim spesifik aktivitesi

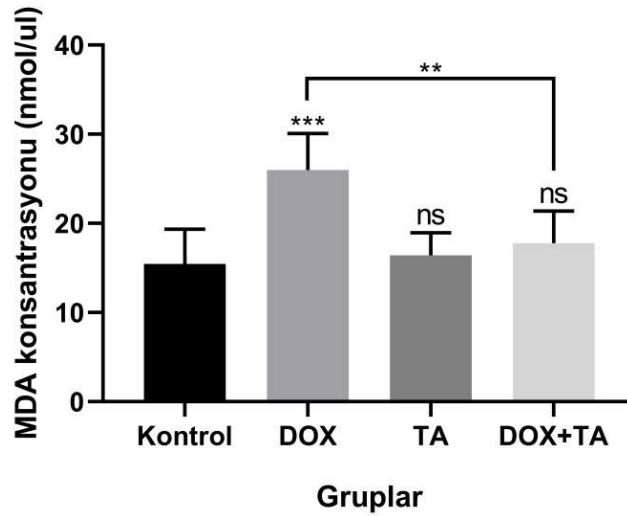
Dalak Dokusunda Glutasyon (GSH) ve Malondialdehit (MDA) Seviyeleri

Elde edilen sonuçlara bakıldığında kontrol grubuna kıyasla, Glutasyon (GSH) seviyesinde DOX uygulanan grupta anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. TA uygulanan grupta meydana gelen artış ve DOX+TA uygulanan grupta oluşan azalış ise istatistiksel olarak önemsizdir. GSH seviyeleri **Şekil 30**'da gösterilmiştir.



Şekil 30. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki GSH seviyesi

MDA konsantrasyonuna bakıldığında kontrol grubuna kıyasla, MDA seviyesinde DOX uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. TA uygulanan grupta meydana gelen artış ve DOX+TA uygulanan grupta ise önemli olmayan bir artış görülmüştür. DOX uygulanan gruba kıyasla kombine grupta meydana gelen azalma anlamlıdır. MDA konsantrasyonlarına Şekil 31'de yer verilmiştir.

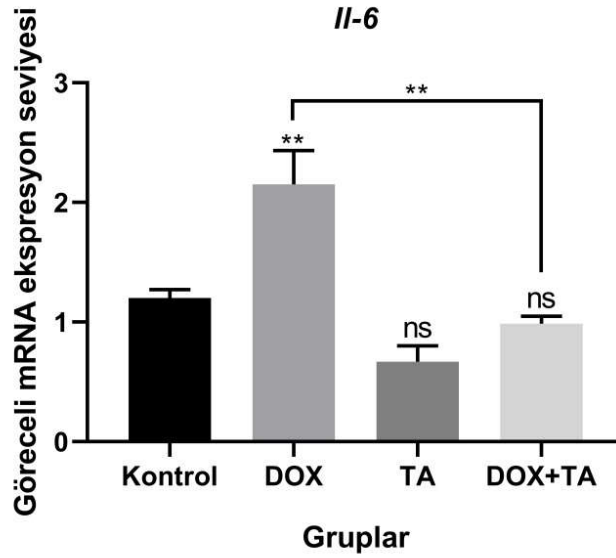


Şekil 31. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki MDA Konsantrasyonu

Dalak Dokusunda Proinflamatuvar Sitokinlerin Kantitatif Gen Ekspresyon Seviyeleri

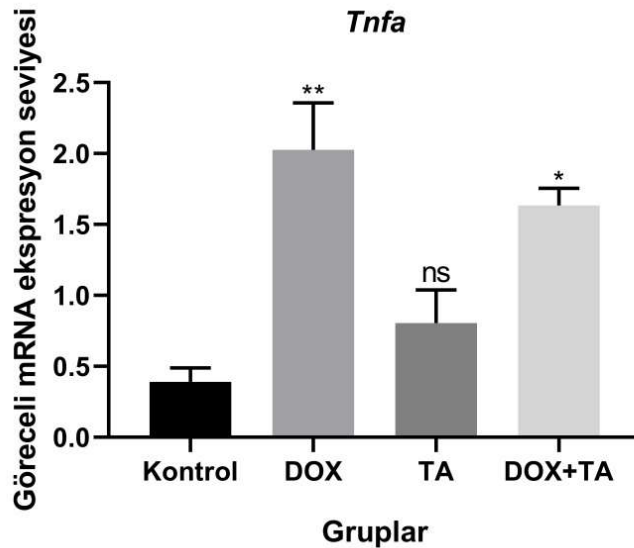
Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak kontrol grubuna kıyasla, İnterlökin-6 (*Il-6*) göreceli mRNA ekspresyon seviyesinde DOX uygulanan grupta istatistiksel olarak meydana gelen artış anlamlıdır. Ancak TA ve DOX+TA uygulanan gruplarda meydana gelen azalma önemsizdir. DOX ve DOX+TA uygulanan gruplara kendi içinde kıyaslandığında ise

DOX+TA uygulanan grupta meydana gelen azalma anlamlıdır. *IL-6* mRNA ekspresyon seviyeleri **Şekil 32**'de verilmiştir.



Şekil 32. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki *IL-6* ekspresyon seviyesi

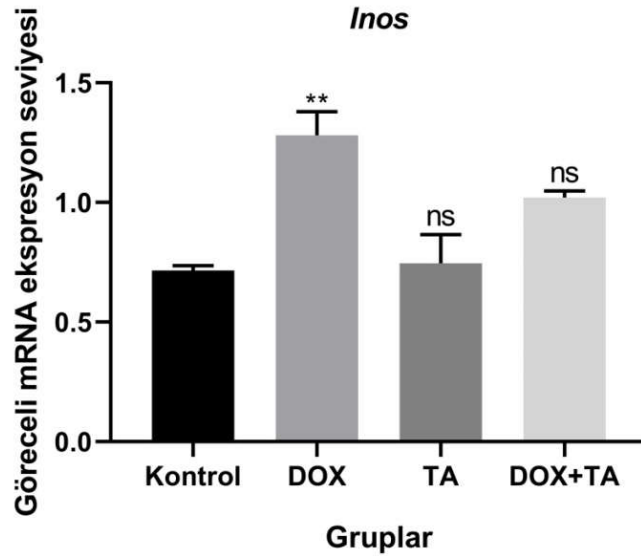
Sonuçlara bakıldığında kontrol grubuna kıyasla, Tümör nekroz faktör alfa (*Tnfa*) mRNA ekspresyon seviyesinde DOX ve DOX+TA uygulama yapılan gruplarda görülen artış anlamlıdır. Ancak DOX+TA uygulama yapılan grupta meydana gelen artış DOX kıyasla daha az olup kontrole daha yakındır. TA uygulama yapılan gruba bakıldığında ise görülen istatistiksel artma önemsizdir. *Tnf- α* mRNA ekspresyon seviyeleri **Şekil 33**'te gösterilmiştir.



Şekil 33. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki *Tnfa* ekspresyon seviyesi

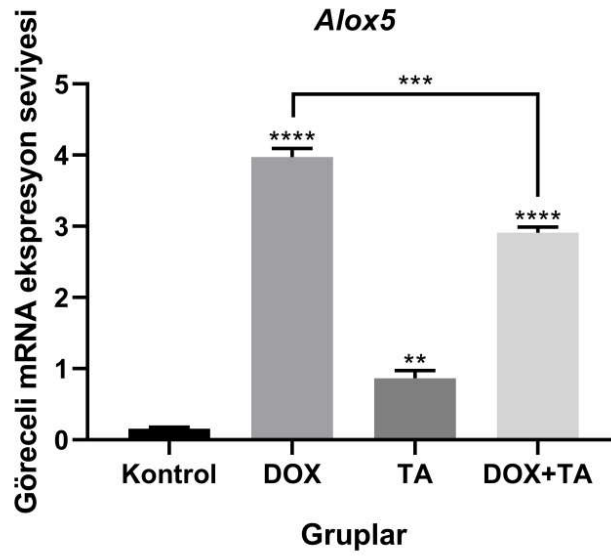
Dalak Dokusunda *Inos*, *Alox5* ve *Cox2* Genlerinin Kantitatif Ekspresyon Seviyeleri

Nitrit oksit sentetaz (*Inos*) mRNA ekspresyonu göz önüne alındığında kontrol grubuna kıyasla, DOX uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede artış görülmüştür. TA ve DOX+TA uygulanan gruplarda oluşan artış ise anlamlı değildir. DOX ve DOX+TA uygulanan gruplar kendi içlerinde kıyaslandığında kombine grupta görülen azalış anlamlı değildir. *Inos* mRNA ekspresyon seviyeleri Şekil 34'te gösterilmiştir.



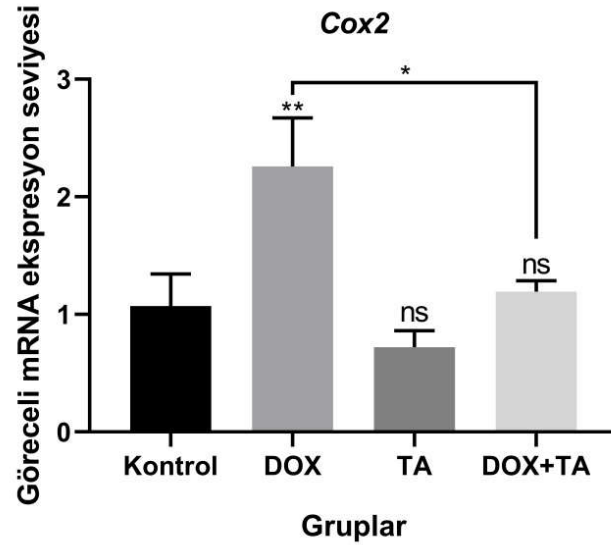
Şekil 34. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki *Inos* mRNA ekspresyon seviyesi

Araşidonat 5-lipoksijenaz (*Alox5*) göreceli mRNA ekspresyon seviyesinin sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla, DOX, TA ve DOX+TA uygulama yapılan gruplarda anlamlı bir artış görülmüştür. DOX ve DOX+TA uygulama yapılan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise DOX' la uygulama yapılan gruba kıyasla kombine grupta anlamlı bir azalma meydana geldiği görülmüştür. *Alox5* mRNA ekspresyon seviyeleri Şekil 35'de gösterilmiştir.



Şekil 35. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki *Alox5* ekspresyon seviyesi

Kontrol grubuna kıyasla, Siklooksijenaz-2 (*Cox2*) mRNA ifadesinde DOX uygulanan grupta meydana gelen artış anlamlıdır. Ancak TA uygulanan grupta meydana gelen azalma ve DOX+TA uygulanan grupta meydana gelen artış önemsizdir. DOX ve DOX+TA uygulanan gruplara bakıldığında ise DOX uygulanan gruba göre kombine grupta meydana gelen azalmanın anlamlı olduğu görülmüştür. *Cox2* mRNA ekspresyon seviyeleri **Şekil 36**'da gösterilmiştir.

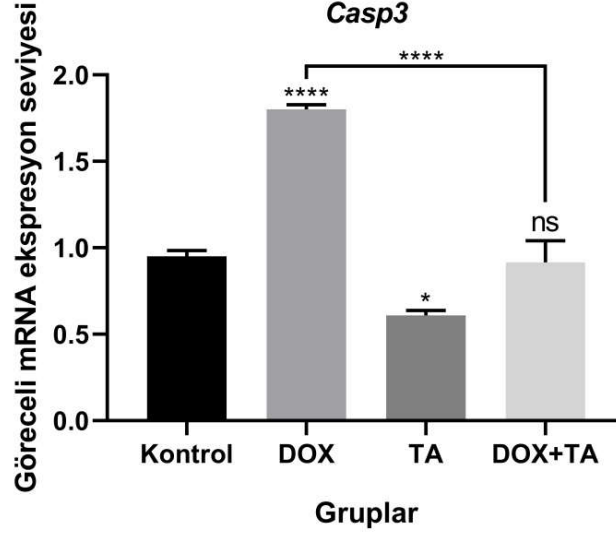


Şekil 36. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki *Cox2* ekspresyon seviyesi

Dalak Dokusunda Apoptoz Kantitatif Gen Ekspresyon Seviyeleri

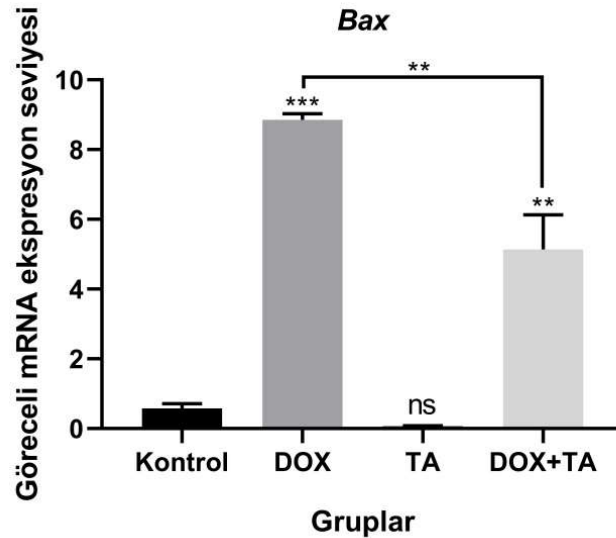
Sonuçlara bakıldığında Kaspaz 3 (*Casp3*) göreceli mRNA ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna kıyasla, DOX uygulanan grupta meydana gelen artış ve TA uygulanan grupta

gözlemlenen azalış anlamlıdır. Ancak DOX+TA uygulanan grupta meydana gelen azalma önemsizdir. DOX ve DOX+TA uygulanan gruplar kendi içlerinde incelendiğinde DOX uygulanan gruba kıyasla DOX+TA (kombine grup) uygulanan grupta anlamlı bir artış meydana gelmiştir. *Casp3* mRNA ekspresyon seviyeleri **Şekil 37**'de gösterilmiştir.



Şekil 37. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki *Casp3* ekspresyon seviyesi

Kontrol grubuna kıyasla, *Bax* mRNA ekspresyon seviyesinde DOX ve TA uygulanan gruplarda oluşan artış anlamlıdır. Ancak DOX uygulanan gruba kıyasla DOX+TA uygulanan grupta anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. TA uygulanan grupta da gözlemlenen azalma önemsizdir. *Bax* mRNA ekspresyon seviyelerine **Şekil 38**'de yer verilmiştir.



Şekil 38. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan dalak dokularındaki *Bax* ekspresyon seviyesi

Antikanser tedavisi hızlı büyüme gösteren kanser hücrelerine yönelik olsa da kullanılan kemoterapötik ilaçlar diğer hızla büyüyen sağlıklı ve normal hücrelerde de hasar oluşturabilmektedir (Gao *et al.* 2019). Oluşan bu hasar, hemostazda bozukluğa neden olduğu için istenmeyen fizyolojik sonuçlar meydana getirebilmekte ve birçok organda olumsuz etkiler oluşturabilmektedir (Van Cutsem and Arends 2005; Demaria *et al.* 2017). Dolayısıyla tedavi sürecinde veya ilerisinde meydana gelebilecek yan etkiler canlıların fizyolojisinde daima kötü sonuçlara sebebiyet vermese bile kanser tedavisinde endişelere yol açmaktadır. Bu yüzden sadece hedef odaklı terapötiklerin geliştirilmesi veya tedavi etkinliğini değiştirmeden kullanılan ilacın oluşturduğu yıkıcı toksisiteyi azaltabilecek yardımcı ajanların belirlenerek koruyucu mekanizmalarının açıklanmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Li and Liu 2018). DOX bağlantılı dalak hasarını daha iyi anlayabilmek için yapılan mevcut tez çalışmasında; DOX uygulamasıyla oluşturulan deneysel modellerde maruziyet sonucunda meydana gelen toksisite antioksidan sistem bileşenlerinin, majör inflamatuvar ve apoptotik sistem üyelerinin incelenmesi ile değerlendirildi. Ayrıca, incelenen parametreler aracılığı ile TA'nın protektif mekanizması aydınlatılmaya çalışıldı.

Alox5 (Araşidonat 5-lipoksijenaz); inflamasyon ve immün cevap gibi önemli fizyolojik süreçlerde görev alan bir moleküldür. Temelde oksidatif stres tepkisi ve kanser gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynamaktadır (Zhou *et al.* 2015). Alox5 hücre ölümünü, inflamasyon ve lipid peroksidasyonu olmak üzere 2 şekilde düzenleyebilir. Yapılan çalışmalarda Alox5'in protein fosforilasyonu aracılığıyla inflamasyonu tetiklediği ve apoptoza yol açtığı ortaya çıkarılmıştır (Sun *et al.* 2015). Ek olarak Alox5'in ifadesinde meydana gelen artışın karsinogeneze sebebiyet verdiği görülmüştür (Sarveswaran *et al.* 2015). Bu bilgilere bakıldığında DOX'un inflamatuvar sistem uyarımı üzerinden sağlıklı hücrelerde de apoptoz yolağında aktive etme yaparak doku hasarına neden olabileceği hipotezinin oluşturulmasına neden olmaktadır. Mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlar incelendiğinde DOX maruziyeti sonucunda Alox5 ifadesinde meydana gelen artışın inflamasyon ve lipid peroksidasyon belirteçlerinin fazlaca ifade edilmesiyle karsinogeneze sebebiyet verdiği görülmektedir. Ayrıca DOX ile birlikte TA uygulamasının belirtilen gen ifadelerinde önemli ölçüde azalma meydana getirerek kontrol grubuna yaklaştırdığı ve dolayısıyla hasar sonucu bozulan hücresel dengenin yeniden düzelebileceğini kanıtlanmıştır.

Mitokondri, hücresel ROS'un başlıca kaynağıdır (Cadenas and Davies 2000). ROS'ların hem mitokondriyal hem de tüm hücre fonksiyonunda fizyolojik ve patolojik etkiler gösterdiği görülmüştür (Zorov *et al.* 2014). Redoks dengesi ilk olarak CAT, SOD ve GPx enzimleri yardımıyla gerçekleşmektedir. Böylece enzimlerin gen ifadelerinde ve biyolojik

aktivitelerinde gerçekleşen azalma hücreyi oksidatif hasara karşı dirençsiz yapmaktadır (Apel and Hirt 2004). Hayvan modellerinde bu faktörler fonksiyonel işlevlerini tam anlamıyla yerine getiremediklerinde inflamasyon, yaşlanma, nörodejenerasyon ve kanser gibi çeşitli sorunları ortaya çıkarmıştır (Liguori *et al.* 2018; Ceylan ve ark. 2019). GST enziminin aracılık ettiği reaksiyonlarla hücrelerde oluşan bu oksidant moleküllerinin detoksifikasyonu giderilmektedir. GST, indirgenmiş GSH'ı bir substrat olarak kullanıp toksik bileşikler ve serbest radikalleri detoksifiye etmektedir (Francis and Haubruge 2005). Böylelikle azalma gösteren GSH bu metabolitle doğrudan etkileşime girer ve hücrenin toksisitesini giderici esas bileşenlerden olan GST ve GPx'in etkinliğini kısıtlar. Yapılan çalışmaların sonuçları GSH miktarı ile oksidatif hasar arasındaki karşıt ilişkiyi ortaya koymaktadır (RG, 2005). Artan lipid peroksidasyonu oksidatif hasarın bir diğer belirteci olup hücre ve dokularda hasar meydana getirmektedir (Bartsch and Nair 2006). Mevcut çalışmada DOX'a maruz bırakılan sıçanların dalak dokularında GSH seviyelerinde ve CAT, SOD, GPx ve GST enzimlerinin biyolojik aktivitelerinde önemli derecede azalış gözlemlenmiştir. MDA seviyelerinde ise DOX uygulanan grupta artma meydana gelmiştir. TA uygulamasının yukarıda belirtilen bileşenlerin DOX maruziyeti sonucunda oluşan tepkileri tamamıyla zıt yönde etkileyerek antioksidan savunma sistemini yeniden güçlendirmiştir. Elde edilen bu veriler TA'nın DOX ile hasar gören hücresel antioksidan sistemini onarılabileceğini göstermektedir.

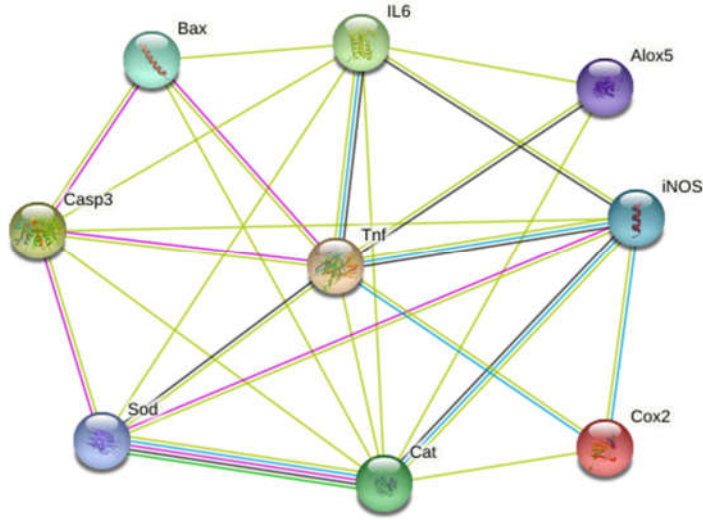
Sitokrom c oksidaz 2 (COX2) hücrelerin tümünde ifade edilen bir gendir (Shoubbridge, 2001; Xu *et al.* 2021). COX, mitokondriyal solunum zincirinin son enzimidir (Ross, 2011) ve elektronların indirgenmiş sitokrom c'den oksijene transferini katalize eder (Sinkler *et al.* 2017). COX aktivitesinde meydana gelen hasarlar, genellikle yüksek düzeyde metabolik dokuları etkileyen önemli patolojilerle ilişkilidir. Hücrelere zarar verici herhangi bir uyarın olmadığında *Cox2* sınırlı bir şekilde ifade edilir (Matsumura, 2009). Ancak inflamasyon ve apoptoz sürecinde söz konusu olan genin ifadesinde önemli derecede artış meydana gelmektedir (Shelton *et al.* 2011). Son yapılan çalışmalarda, insan hematopoietik hücrelerinde *Cox*'un aşırı ifade edilmesiyle TNF- α 'nın sitotoksitesinin engellendiği görülmüştür (Li *et al.* 2015). Çalışmamızın sonuçlarıyla verilen bilgiler doğrulanmıştır. Bulgular, DOX muamelesinin ardından *Cox2*'nin ifadesinde kontrol grubuna oranla önemli oranda artış olduğu görülmektedir. Ancak TA kullanımından sonra meydana gelen artmada azalma görülmüştür. Bu da DOX ile oluşan hasarın TA yardımıyla giderilebileceğini göstermiştir.

DOX'a bağlı oksidatif stres mekanizmasındaki Nitrik oksit (NO) önemli bir inflamatuvar belirteci olup L-Arg aracılığıyla iNOS tarafından üretilir (Ghigo *et al.* 2016).

iNOS düzenlemesinin merkezinde inflamasyon belirteci olan NF- κ B yer alır (Vannini *et al.* 2015). iNOS enziminin aktifleşmesi lipopolisakkaritler (LPS) ve çeşitli sitokinlerin (IL, TNF- α gibi) uyarılmasıyla sağlanır (Aktan, 2004). NO reaksiyon ürünü olan reaktif nitrojen türleri, DOX'un ortaya çıkardığı kardiyak disfonksiyonun patogeneğinde bulunmaktadır (Pacher *et al.* 2003). Yapılan çalışmalarda, indüklenabilir NOS formunun (iNOS) artmış regülasyon yoluyla NO oluşumunun, DOX ile indüklenen sitotoksitenin temel mekanizmalarından olduğu düşünülmektedir (Andreadou *et al.* 2007; Abo-Salem, 2012). DOX ile indüklenen inflamatuvar belirteçler, *Tnf- α* ifadesinde ve NF- κ B'nin regülasyonunda ve ayrıca proapoptotik protein olan *Bax*'ın ekspresyonunun hem karaciğerde hem de böbrekte artış meydana getirdiği görülmüştür (El-Moselhy and El-Sheikh 2014). *Bax*'ın, çok hücreli organizmalarda tümör baskılayıcı gen olarak bilinen p53 mekanizması üzerinden *Casp3* ifadesini aşırı arttırarak apoptoz mekanizmasını tetiklediği bildirilmiştir (Tsang *et al.* 2005; Sengupta *et al.* 2017). Mevcut çalışmadan elde edilen bulgular DOX uygulanan sıçanlarda *Tnf- α* mRNA ekspresyon seviyesinde ve buna paralel olarak *Inos*, *Casp3* ve *Bax*'ın ifadelerinde de önemli derecede artma meydana geldiğini göstermektedir. Ancak DOX ve TA'nın kombine uygulamasının ardından *Tnfa*, *Bax*, *Casp3* ve *Inos* seviyelerinde azalma meydana geldiği görülmektedir. Bu sonuçlar DOX ile hasara uğrayan hücrenin TA ile normalleşebileceğini göstermektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Hücrenin metabolizmasında gerçekleşen biyolojik olayların temelinde proteinler yatmaktadır. Hücrelerin işleyişini, hastalıkların ve ilaçların etki mekanizmalarını ortaya koymak için ilgili proteinler bir arada değerlendirilmelidir (Kann, 2007). Çünkü proteinler ya birbirleriyle ya da hücredeki diğer moleküllerle etkileşim halindedir (Barabasi and Oltvai 2004). Proteinlerin etkileşimleri ve mekanizmaları Protein-protein etkileşimi (PPI) ağları yardımıyla anlaşılmaktadır (Safari-Alighiarloo *et al.* 2014). Bu yüzden STRING online veritabanı (Jensen *et al.* 2009) yardımıyla mevcut tez çalışmasında hedeflenen genler için bir PPI ağı oluşturulmuştur. Yapılan analiz sonucunda incelenen genlerin etkileşim halinde olduğu **Şekil 39**'da gösterilmiştir. PPI ağına bakıldığında DOX'un sebep olduğu toksisiteye karşı TA'nın koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir.



Şekil 39. STRING veritabanının da oluşturulan ve çalışmada incelenen hedeflerin ilişkisini gösteren PPI ağı (PPI; protein-protein interaction).

Sonuç olarak çalışmada, DOX 'un kümülatif uygulamasının ardından sıçanların dalak dokularında inflamatuvar, antioksidan ve apoptotik sistem üzerinde hasar meydana getirdiği görülmektedir. Ayrıca, TA ve DOX'un kombine kullanımının DOX maruziyet sonucu oluşan dalak hasarını koruduğu görülmüştür.

DOX'un meydana getirdiği patolojik olayların altında yatan mekanizmaların tam anlamıyla anlaşılmasını sağlayacak çalışmalara devam edilse de, TA muamelesinin kullanılan

ilacın terapötik aktivitesinde herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermeden kemoterapi kaynaklı dalak toksistesini azaltmaya yönelik etkili bir yaklaşım olduğu düşünölmektedir.



KAYNAKLAR

- Abo-Salem, O. M. (2012). The protective effect of aminoguanidine on doxorubicin-induced nephropathy in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 26(1), 1-9.
- Adwas, A. A., Elsayed, A., Azab, A. E., & Quwaydir, F. A. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng*, 6(1), 43-47.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105 121-6.
- Ahmed, F., Urooj, A. and Karim, A. A. (2013). Protective effects of *Ficus racemosa* stem bark against doxorubicin-induced renal and testicular toxicity. *Pharmacognosy Magazine*, 9 (34), 130-134.
- Akomolafe, S. F., Akinyemi, A. J. and Anadozie, S. O. (2014). Phenolic Acids (Gallic and Tannic Acids) Modulate Antioxidant Status and Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. *Int Sch Res Notices*, 2014 984709.
- AKTAN, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences.*, 75 ; 639–653.
- Albain, KS ve ark. (2009). Evre III küçük hücreli dışı akciğer kanseri için cerrahi rezeksiyonlu veya cerrahi rezeksiyonsuz radyoterapi artı kemoterapi: faz III randomize kontrollü bir çalışma. *Lancet* 374, 379-386.
- Ali, A., Kaymak, E., Karabulut, D., Doğanyığıt, Z., Ceylan, T., Toluk, A., & Özdamar, S. (2020). Comparison of the acute and cumulative dose administrations in doxorubicin-induced hepatotoxicity via evaluation of the histopathological changes and inflammation in rats. *Experimental and Applied Medical Science*, 1(3), 73-81.
- Altieri, P., Barisione, C., Lazzarini, E., Garuti, A., Bezante, G. P., Canepa, M., Spallarossa, P., Tocchetti, C. G., Bollini, S., Brunelli, C. and Ameri, P. (2016). Testosterone Antagonizes Doxorubicin-Induced Senescence of Cardiomyocytes. *Journal of the American Heart Association*, 5 (1).
- Amara-Mokrane, Y. A., Lehucher-Michel, M., Balansard, G., Duménil, G. and Botta, A. (1996). Protective effects of α -hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*, 11 (2), 161-167.
- Amstad, P. A., Krupitza, G. and Cerutti, P. A. (1992). "Mechanism of c-fos induction by active oxygen." *Cancer Res* 52(14): 3952-3960.
- Andreadou, I., Sigala, F., Iliodromitis, E. K., Papaefthimiou, M., Sigalas, C., Aligiannis, N., ... & Kremastinos, D. T. (2007). Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42(3), 549-558.
- Anonymous. (2016). "Inflammation." from <https://en.wikipedia.org/wiki/Inflammation>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Areekul, S., and Boonme, Y. (1986). Catalase activity in red cell and liver of mice infected with *Plasmodium berghei*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 17(1), 48-52.

- Aung, T. N., Qu, Z. P., Kortschak, R. D. and Adelson, D. L. (2017). Understanding the Effectiveness of Natural Compound Mixtures in Cancer through Their Molecular Mode of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (3).
- Balogh, P., Horvath, G., and Szakal, A. K. (2004). Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J Histochem Cytochem* 52, 1287–98.
- Barabasi, A. L., & Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature reviews genetics*, 5(2), 101-113.
- Bartsch, H., & Nair, J. (2006). Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 391(5), 499-510.
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3), 193.
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık bilimleri Dergisi*, 5; (3), 156-160)
- Behroozaghdam, M., Hashemi, M., Javadi, G., Mahdian, R., & Soleimani, M. (2015). Expression of bax and bcl2 Genes in MDMA-induced Hepatotoxicity on Rat Liver Using Quantitative Real-Time PCR Method through Triggering Programmed Cell Death. *Iranian Red Crescent medical journal*, 17(11), e24609
- Berhane, K., Widersten, M., Engstrom, A., Kozarich, J. W. and Mannervik, B. (1994). "Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(4): 1480-1484.
- Beutler, E. (1984). *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. Grune and Starton, p, New York.
- Bhabak, K. P., & Muges, G. (2010). Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. *Acc Chem Res*, 43(11), 1408-1419.
- Bhinge, K. N., Gupta, V., Hosain, S. B., Satyanarayanajois, S. D., Meyer, S. A., Blaylock, B., ... & Liu, Y. Y. (2012). The opposite effects of doxorubicin on bone marrow stem cells versus breast cancer stem cells depend on glucosylceramide synthase. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(11), 1770-1778.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5(1), 9-19.
- Birben, E., U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum and O. Kalayci (2012). "Oxidative Stress and Antioxidant Defense." *The World Allergy Organization journal* 5(1): 9-19.
- Bolis FM., Holcenberg JS. (1989) Poplack DG. General principles of chemotherapy. Pizzo PA, Poplack DG (eds). *Principle and Practice Pediatric Oncology*. JB. Lippincott Company,: 186-189.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bravo L., Abia R., Eastwood M.A., Saura-Calixto F. (1994). Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output, *Br. J. Nutr.* 71 933–946.

- Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology and medicine*, 29(3-4), 222-230.
- Ceylan, H., Budak, H., Kocpinar, E. F., Baltaci, N. G., & Erdogan, O. (2019). Examining the link between dose-dependent dietary iron intake and Alzheimer's disease through oxidative stress in the rat cortex. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 56, 198-206.
- Che, M., Wang, R., Li, X., Wang, H. Y., & Zheng, X. S. (2016). Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug discovery today*, 21(1), 143-149.
- Chelikani, P., Fita, I., and Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208.
- Chen, X. Y., Zhang, Y., Zhu, Z. N., Liu, H. L., Guo, H. C., Xiong, C., Xie, K. R., Zhang, X. F. and Su, S. W. (2016). Protective effect of berberine on doxorubicin-induced acute hepatorenal toxicity in rats. *Molecular Medicine Reports*, 13 (5), 3953-3960.
- Choi, Y. J., Lee, J. Y., Chung, C. P., and Park, Y. J. (2012). Cell-penetrating superoxide dismutase attenuates oxidative stress-induced senescence by regulating the p53-p21(Cip1) pathway and restores osteoblastic differentiation in human dental pulp stem cells. *Research Support, Non-U.S. Gov't. Int J Nanomedicine*, 7, 5091-5106.
- Chu, F. F. (1994). "The human glutathione peroxidase genes GPX2, GPX3, and GPX4 map to chromosomes 14, 5 and 19, respectively." *Cytogenet Cell Genet* 66(2): 96-98.
- Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W. (1998b). Tannins and human health: a review. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 38, 421.
- Chung, King-Thom; Wong, Tit Yee; Wei, Cheng-I; Huang, Yao-Wen; Lin, Yuan (1998). "Tannins and Human Health: A Review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38 (6): 421-64.
- Cullu E, Ozkan I, Culhaci N, Alparslan B, Dikicioğlu E, Savk SO. (2003) Doksorubisinin sıçan iskelet kasında kemomiyektomi etkisi. *Acta Orthop Traumatol Turc*; 37: 323-329.
- Cunha-Oliveira, T., Rego, A. C. and Oliveira, C. R. (2013). "Oxidative stress and drugs of abuse: An update." *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 10(4): 1-14.
- Çakır, Ş. (2016). Tip60 Geninin Fare Karaciğer Dokusundaki İnflamasyon Yolağı Üzerine Etkisinin Gen Ve Protein Seviyesinde Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Erzurum.
- Çetinkaya Y., Kabakçı MG., Aydemir K. (2015) Antrasiklinler ve kalp. *İlaç ve Tedavi Dergisi*; 8: 214-218.
- Çolak E. (2011). Karbon tetrakloridin (ccl4) indüklediği karaciğer hasarı ve oksidatif stres üzerine *Cynara scolymus* L. yaprağı ekstraktının etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir
- Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S. U., Alimirah, F., ... & Campisi, J. (2017). Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer discovery*, 7(2), 165-176.
- Desai, A. G., Qazi, G. N., Ganju, R. K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A. K., Bedi, Y. S., Taneja, S. C. and Bhat, H. K. (2008). Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Current Drug Metabolism*, 9 (7), 581-591.

- Desai, V. G., Herman, E. H., Moland, C. L., Branham, W. S., Lewis, S. M., Davis, K. J., George, N. I., Lee, T., Kerr, S., & Fuscoe, J. C. (2013). Development of doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity in the B6C3F1 mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol*, 266(1), 109-121.
- Di Mascio P., Murphy ME., Sies H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr*; 53: 194-200.
- Djabir, Y. Y., Arsyad, M. A., Sartini, S. and Lallo, S. (2017). Potential Roles of *Kleinhovia hospita* L. Leaf Extract in Reducing Doxorubicin Acute Hepatic, Cardiac and Renal Toxicities in Rats. *Pharmacognosy Research*, 9 (2), 168-173.
- Dorr, R. T. (1994). Pharmacologic management of vesicant chemotherapy extravasations. *Cancer Chemotherapy Handbook*. Appleton & Lange,, 109-118.
- Drevet, J. R. (2006). "The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story." *Mol Cell Endocrinol* 250(1-2): 70-79.
- Duan, Y. J., Komura, S., Fiszer-Szafarz, B., Szafarz, D. and Yagi, K. (1988). "Purification and characterization of a novel monomeric glutathione peroxidase from rat liver." *J Biol Chem* 263(35): 19003-19008.
- Dudka J., Jodynis-Liebert J., Korobowicz E., Burdan F., Korobowicz A., Szumilo J., Tokarska E., Klepacz R., Murias M. (2005). Activity of NADPH-cytochrome P-450 reductase of the human heart, liver and lungs in the presence of (-)- epigallocatechin gallate, quercetin and resveratrol: an in vitro. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97(2):74-9.
- Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." *Arch Biochem Biophys* 82(1): 70-77.
- el-Nahas, A. F. and el-Ashmawy, I. M. (2004). "Reproductive and cytogenetic toxicity of metronidazole in male mice." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 94(5): 226-231.
- El-Moselhy, M. A., & El-Sheikh, A. A. (2014). Protective mechanisms of atorvastatin against doxorubicin-induced hepato-renal toxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(1), 101-110.
- Encyclopedia Britannica, (2005) Inc (<https://www.britannica.com/science/spleen-anatomy/images-videos>)
- Ener RA, Meglathery SB, Styler M. (2004). Extravasation of systemic hematological therapies. *Annals of Oncology*; 15: 858-862.
- Francis, F., Vanhaelen, N., & Haubruge, E. (2005). Glutathione S-transferases in the adaptation to plant secondary metabolites in the *Myzus persicae* aphid. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 58(3), 166-174.
- Franco, R., Panayiotidis, M. I. and Cidlowski, J. A. (2007). "Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation." *J Biol Chem* 282(42): 30452-30465.
- Fridovich, I. (1978). "The biology of oxygen radicals." *Science* 201(4359): 875-880.
- Gangadharan, A., Choi, S. E., Hassan, A., Ayoub, N. M., Durante, G., Balwani, S., ... & Suh, K. S. (2017). Protein calorie malnutrition, nutritional intervention and personalized cancer care. *Oncotarget*, 8(14), 24009.
- Gao, Q., Zhou, G., Lin, S. J., Paus, R., & Yue, Z. (2019). How chemotherapy and radiotherapy damage the tissue: comparative biology lessons from feather and hair models. *Experimental dermatology*, 28(4), 413-418.

- Gewitz D. A. (1999). A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* 57:727–741.
- Ghigo, A., Li, M., & Hirsch, E. (2016). New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(7), 1916-1925.
- Ghyselinck, N. B., Dufaure, I., Lareyre, J. J., Rigaudiere, N., Mattei, M. G. and Dufaure, J. P. (1993). "Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis." *Mol Endocrinol* 7(2): 258-272.
- Goh, J., Enns, L., Fatemie, S., Hopkins, H., Morton, J., Pettan-Brewer, C., & Ladiges, W. (2011). Mitochondrial targeted catalase suppresses invasive breast cancer in mice. *BMC Cancer*, 11, 191. doi: 10.1186/1471-2407-11-191
- Goodman Gillman, A., & JG, L. L. H. (2001). The pharmacological basis of therapeutics 10 th edition. Published by international edition, 690, 573-574.
- Görözen, C. K. (2010). Kursunla Lipid Peroksidasyon Oluşturulan Ratlarda Köpekbalığı Karaciğeri Yağının Etkileri. Erciyes Üniversitesi, Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji Ana Bilim Dalı, Kayseri.
- Gray, H. (1977). Muscles and fasciae of the thorax. Gray's anatomy. New York, NY: Bounty Books, 350-6.
- Gray, H. (1977). Muscles and fasciae of the thorax. Gray's anatomy. New York, NY: Bounty Books, 350-6.
- Griffith, O. W. (1999). "Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis." *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 922-935.
- Gulcin, I., Huyut, Z., Elmastas, M. and Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3 (1), 43-53.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974). "Glutathione S-Transferases - First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation." *Journal of Biological Chemistry* 249(22): 7130-7139.
- Hajra, S., Patra, A. R., Basu, A. and Bhattacharya, S. (2018). Prevention of doxorubicin (DOX)-induced genotoxicity and cardiotoxicity: Effect of plant derived small molecule indole-3-carbinol (I3C) on oxidative stress and inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101 228-243.
- Handy, D. E., Lubos, E., Yang, Y., Galbraith, J. D., Kelly, N., Zhang, Y. Y., Loscalzo, J. (2009). Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't. *J Biol Chem*, 284(18), 11913-11921.
- Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics.
- Hawkins, B., & American Society of Health-System Pharmacists. (2003). Best practices for health-system pharmacy: positions and guidance documents of ASHP. Amer Soc of Health System.
- Hilmer, S. N., Cogger, V. C., Muller, M., & Le Couteur, D. G. (2004). The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. *Drug metabolism and disposition*, 32(8), 794-799.

- Huang, C. Y., Ju, D. T., Chang, C. F., Reddy, P. M., & Velmurugan, B. K. (2017). A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *Biomedicine*, 7(4).
- Huang, T. T., Zou, Y. and Corniola, R. (2012). "Oxidative stress and adult neurogenesis- effects of radiation and superoxide dismutase deficiency." *Semin Cell Dev Biol* 23(7): 738-744.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C., Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016.
- Ibrahim, M.A., Ashour, O.M., Ibrahim, Y.F., El-Bitar, H.I., Gomaa, W., Abdel-Rahim, S.R. (2009). Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonism equally improve doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Pharmacological research* 60, 373-381.
- Imai, H. and Nakagawa, Y. (2003). "Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells." *Free Radic Biol Med* 34(2): 145-169.
- Indu, R., Azhar, T. S., Nair, A., & Nair, C. K. K. (2014). Amelioration of doxorubicin induced cardio-and hepato-toxicity by carotenoids. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(1), 62-67.
- Jacevic, V., Djordjevic, A., Srdjenovic, B., Milic-Tores, V., Segrt, Z., Dragojevic-Simic, V. and Kuca, K. (2017). Fullerenol nanoparticles prevents doxorubicin-induced acute hepatotoxicity in rats. *Experimental and Molecular Pathology*, 102 (2), 360-369.
- Jadapalli, J. K., Wright, G. W., Kain, V., Sherwani, M. A., Sonkar, R., Yusuf, N. and Halade, G. V. (2018). Doxorubicin triggers splenic contraction and irreversible dysregulation of COX and LOX that alters the inflammation-resolution program in the myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 315 (5), H1091-H1100.
- Jayakaran, T. G. (2014). The effect of drugs in the oral cavity-A review. *Journal of pharmaceutical sciences and research*, 6(2), 89.
- Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., ... & von Mering, C. (2009). STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D412-D416.
- Jin, W. Y., Xue, Y. R., Xue, Y. C., Han, X., Song, Q. T., Zhang, J. P., Li, Z. L., Cheng, J., Guan, S. J., Sun, S. J. and Chu, L. (2020). Tannic acid ameliorates arsenic trioxide-induced nephrotoxicity, contribution of NF-kappa B and Nrf2 pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 126.
- Jones, M. L., Mark, P. J., Keelan, J. A., Barden, A., Mas, E., Mori, T. A., & Waddell, B. J. (2013). Maternal dietary omega-3 fatty acid intake increases resolvin and protectin levels in the rat placenta. *Journal of lipid research*, 54(8), 2247-2254.
- Joseph, P. D. (2010). Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genomics Proteomics*, 2010, 876940. doi: 10.4061/2010/876940
- Kalaiselvi P., Pragasa V., Chinnikrishnan S., Veena CK., Sundarapandiyan R., Varalakshmi P. (2005). Counteracting adriamycin-induced oxidative stress by 55 administration of N-acetyl cysteine and vitamin E. *Clin Chem Lab Med*; 43: 834-840.

- Kann, M. G. (2007). Protein interactions and disease: computational approaches to uncover the etiology of diseases. *Briefings in bioinformatics*, 8(5), 333-346.
- Kayaalp, O. (2002). *Farmakolojiye Giriş, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. Ankara.*
- Kesik, V., Kurt, B., Tunc, T., Karslioglu, Y., Citak, E. C., Kismet, E., & Koseoglu, V. (2010). Melatonin ameliorates doxorubicin-induced skin necrosis in rats. *Annals of plastic surgery*, 65(2), 250-253.
- Khan, N.S., Hadi, S.M. (1998). Structural features of tannic acid important for DNA degradation in the presence of Cu(II). *Mutagenesis* 13, 217.
- Kim, HA, Lee, KH ve Lee, BH (2014). Sıçanların hipokampal dilim kültüründe melatoninin kainik asit kaynaklı oksidatif hasara karşı nöroprotektif etkisi. *Uluslararası Moleküler Bilimler Dergisi* , 15 (4), 5940-5951.
- Kim, S. H., Lee, I. C., Baek, H. S., Shin, I. S., Moon, C., Bae, C. S., ... & Kim, H. C. (2014). Mechanism for the protective effect of diallyl disulfide against cyclophosphamide acute urotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 110-118.
- Kocahan, S., Dogan, Z., Erdemli, E. and Taskin, E. (2017). Protective Effect of Quercetin Against Oxidative Stress-induced Toxicity Associated With Doxorubicin and Cyclophosphamide in Rat Kidney and Liver Tissue. *Iran J Kidney Dis*, 11 (2), 124-131.
- Kocpinar, E. F. (2015). Tip60 Geninin Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Karaciğer Spesifik Tip60 Nakavt Farelerde Araştırılması Atatürk Üniversitesi.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., ... & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113(9), 71-88.
- Kuper, D. F., de Heer, E., Van Loveren, H., and Vos, J. G. (2002). Immune System. In *Handbook of Toxicologic Pathology* (W. M. Haschek, C. G. Rousseaux and M. A. Wallig, eds.), Vol. 2, pp. 585–646. Academic Press, San Diego.
- Kurreck, J. (2022). Silencing-Technologien zur Analyse von Genfunktionen. In *Bioanalytik* (pp. 997-1012). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Kuzu, M., Kandemir, F. M., Yildirim, S., Kucukler, S., Caglayan, C., & Turk, E. (2018). Morin attenuates doxorubicin-induced heart and brain damage by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 443-453.
- Küçükhüseyin C. *Kanser kemoterapisi. Özüner Z. Temel ve Klinik Farmakoloji. 3. Baskı İstanbul: Barış Kitabevi, 1995: 1116-1117.*
- Landberg, T., Chavaudra, J., Dobbs, J. A., Gerard, J. P., Hanks, G., Horiot, J. C., ... & Svensson, H. (1999). Report 62. *Journal of the ICRU*, (1), NP-NP.
- Langen KM, Jones DT. (2001). Organ hareketi ve yönetimi. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 50 :265–278.
- Larson RA. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*; 27: 969-978.
- Li, D., Han, Y., Zhuang, Y., Fu, J., Liu, H., Shi, Q., & Ju, X. (2015). Overexpression of COX-2 but not indoleamine 2, 3-dioxygenase-1 enhances the immunosuppressive ability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(5), 1309-1316.

- Li, F., Luo, P., & Liu, H. (2018). A potential adjuvant agent of chemotherapy: sepia ink polysaccharides. *Marine Drugs*, 16(4), 106.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., ... & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757.
- Lip, H., Yang, K., MacAllister, S. L., & O'Brien, P. J. (2013). Glyoxal and methylglyoxal: autoxidation from dihydroxyacetone and polyphenol cytoprotective antioxidant mechanisms. *Chemico-biological interactions*, 202(1-3), 267-274.
- Lipshultz SE., Alvarez JA., Scully RE. (2008). Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart*; 94: 525-533.
- Liu, L. L., Li, Q. X., Xia, L., Li, J., & Shao, L. (2007). Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Toxicology*, 231(1), 81-90.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lopes, G.K.B., Schulman, H.M., Hermes-Lima, M. (1999). Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica Biophysica Acta* 1472, 142.
- Lu P. (2005). Monitoring cardiac function in patients receiving doxorubicin. *Sem Nucl Med*; 35: 197-201.
- Luberda, Z. (2005). "The role of glutathione in mammalian gametes." *Reprod Biol* 5(1): 5-17.
- Ludke, A., Sharma, A. K., Bagchi, A. K. and Singal, P. K. (2012). Subcellular basis of vitamin C protection against doxorubicin-induced changes in rat cardiomyocytes. *Molecular and cellular biochemistry*, 360 (1-2), 215-224.
- Makkar H.P.S., Singh B., Dawra R.K. (1988). Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen, *Br. J. Nutr.* 60 287.
- Maqsood S., Benjakul S. (2011). Retardation of haemoglobin-mediated lipid oxidation of Asian sea bass muscle by tannic acid during iced storage, *Food Chem.* 124 1056–1062.
- Mates JM. (2000). Effect of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygenspecies toxicology. *Toxicology*: 153; 83-104.
- Matsumura, F. (2009). The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochemical pharmacology*, 77(4), 608-626.
- McEvoy, G. K. (Ed.). (2000). *AHFS drug information, 2000*. American society of health-system pharmacists.
- McGowan, J. V., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J. M., & Yellon, D. M. (2017). Anthracycline chemotherapy and cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*; 31 (1): 63-75.
- Mcguire, S. (2016). *Dünya Kanser Raporu 2014*. Cenevre, İsviçre: Dünya Sağlık Örgütü, uluslararası kanser araştırma ajansı, WHO Press, 2015. *Adv. Nutr.* 7, 418-419.
- Medzhitov, R. (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." *Nature* 454(7203): 428-435.
- Meister, A. and Anderson, M. E. (1984). "Glutathione." *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711- 760.

- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Development in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56:185–229
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*, 56(2), 185-229. Hardman JG., Limbird LE., 2001.
- Mohammed, W. I., Radwan, R. A., & Elsayed, H. M. (2019). Prophylactic and ameliorative effect of N-acetylcysteine on doxorubicin-induced neurotoxicity in Wister rats. *Egyptian Journal of Basic and Clinical Pharmacology*, 9.
- Mordente A., Meucci E., Martorana GE., Giardina B., Minotti G. (2001). Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. *IUBMB Life*; 52: 83-88.
- Mross K. (1991). New Anthracycline Derivates: What for? *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1991;27:1542–1544.
- Müller I., Niethammer D., Bruchelt G. (1998) Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review). *Int J Mol Med*; 491-495.
- Nakamura Y., Tsuji S., Tonogai Y. (2003). Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: application to tannic acid metabolism in the rat, *J. Agric. Food Chem.* 51 331–339.
- Nathan, C. and Cunningham-Bussel, A. (2013). "Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species." *Nat Rev Immunol* 13(5): 349- 361.
- Nathan, C. and Ding, A. (2010). "SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI)." *Cell* 140(6): 951-951 e952.
- Naus P.J., Henson R., Bleeker G., Wehbe H., Meng F., Patel T. (2007). Tannic acid synergizes the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human cholangiocarcinoma by modulating drug efflux pathways, *Hepatol J.* 46 222–229.
- Nepka, C. H., Asproдини, E. and Kouretas, D. (1999). Tannins, xenobiotic metabolism and cancer chemoprevention in experimental animals. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 24(2), 183-189.
- Nie, F. Y., Liang, Y., Jiang, B., Li, X. B., Xun, H., He, W., Lau, H. T. and Ma, X. F., (2016). Apoptotic effect of tannic acid on fatty acid synthase over-expressed human breast cancer cells. *Tumor Biology*, 37 (2), 2137-2143.
- Nolte, M. A., Hamann, A., Kraal, G., and Mebius, R. E. (2002). The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. *Immunology* 106, 299–307.
- Oestreicher, J., & Morgan, B. (2019). Glutathione: subcellular distribution and membrane transport. *Biochemistry and Cell Biology*, 97(3), 270–289.
- Otteneider, M., Daniels, J. S., Voehler, M., & Marnett, L. J. (2003). Development of a method for determination of the malondialdehyde–deoxyguanosine adduct in urine using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 315(2), 147-151.
- Otteneider, M., Daniels, J. S., Voehler, M., & Marnett, L. J. (2003). Development of a method for determination of the malondialdehyde–deoxyguanosine adduct in urine using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 315(2), 147-151.

- Öz, E., Erbaş, D., Sürücü, H. S., & Düzgün, E. (2006). Prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity by melatonin. *Molecular and cellular biochemistry*, 282(1), 31-37.
- Pacher, P., Liaudet, L., Bai, P., Mabley, J. G., Kaminski, P. M., Virág, L., ... & Szabó, C. (2003). Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation*, 107(6), 896-904.
- Pallardó, F. V., Markovic, J., García, J. L. and Viña J. (2009). "Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation." *Molec. Asp.of Med.* 30: 77- 85.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature* 327(6122): 524-526.
- Park, E. J., Kwon, H. K., Choi, Y. M., Shin, H. J., & Choi, S. (2012). Doxorubicin induces cytotoxicity through upregulation of perk–dependent ATF3.,
- Placer ZA., Cushman LL., Johnson BC. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*, 16, 359-364.
- Potter D.K., Fuller H.L. (1968). Metabolic fate of dietary tannins in chickens, *J. Nutr.* 96 187–191.
- Pugazhendhi, A., Edison, T. N. J. I., Velmurugan, B. K., Jacob, J. A. and Karuppusamy, I. (2018). Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sciences*, 200 26-30.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S. and Dhama, K. (2014). "Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay." *Biomed Res Int* 2014: 761264.
- Rahman, A. M., Yusuf, S. W., & Ewer, M. S. (2007); Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine*. 2 (4): 567-583.
- Ramakrishnan, G., Raghavendran, H. R. B., Vinodhkumar, R., & Devaki, T. (2006). Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chemico-biological interactions*, 161(2), 104-114.
- Rawat, P. S., Jaiswal, A., Khurana, A., Bhatti, J. S., & Navik, U. (2021). Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111708.
- Ren, Y. T., Li, X. L., Han, B., Zhao, N., Mu, M., Wang, C., Du, Y., Wang, Y. L., Tong, A. P., Liu, Y., Zhou, L. X., You, C. and Guo, G. (2019). Improved anti-colorectal carcinomatosis effect of tannic acid co-loaded with oxaliplatin in nanoparticles encapsulated in thermosensitive hydrogel. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 128 279-289.
- Ren, Y., Li, X., Han, B., Zhao, N., Mu, M., Wang, C., ... & Guo, G. (2019). Improved anti-colorectal carcinomatosis effect of tannic acid co-loaded with oxaliplatin in nanoparticles encapsulated in thermosensitive hydrogel. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 128, 279-289.
- Reprinted with permission from Weiss L, Tavaossoli M. (1970). Anatomical hazards to the passage of erythrocytes through the spleen. *Semin Hematol* 7:372
- Reth, M. (2002). "Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation." *Nature Immunology* 3(12): 1129-1134.

- Reuter, S., S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi and B. B. Aggarwal (2010). "Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?" *Free radical biology & medicine* 49(11): 1603-1616.
- RG, A. (2005). The physiological and biochemical effects of diabetes on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system. *Med. J. Of Islamic Academy of Sci*, 15(1), 31-42.
- Ross, J. M. (2011). Visualization of mitochondrial respiratory function using cytochrome c oxidase/succinate dehydrogenase (COX/SDH) double-labeling histochemistry. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (57), e3266.
- S Lahoti, T., Patel, D., Thekkemadom, V., Beckett, R., & D Ray, S. (2012). Doxorubicin-induced in vivo nephrotoxicity involves oxidative stress-mediated multiple pro-and anti-apoptotic signaling pathways. *Current neurovascular research*, 9(4), 282-295.
- Safari-Alighiarloo, N., Taghizadeh, M., Rezaei-Tavirani, M., Goliaei, B., & Peyvandi, A. A. (2014). Protein-protein interaction networks (PPI) and complex diseases. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench*, 7(1), 17.
- Sahiner, N., Sagbas, S., Aktas, N. and Silan, C. (2016). Inherently antioxidant and antimicrobial tannic acid release from poly (tannic acid) nanoparticles with controllable degradability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142, 334-343.
- Salminen, J. P., & Karonen, M. (2011). Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional ecology*, 25(2), 325-338.
- Sankpal, U. T., Pius, H., Khan, M., Shukoor, M. I., Maliakal, P., Lee, C. M., ... & Basha, R. (2012). Environmental factors in causing human cancers: emphasis on tumorigenesis. *Tumor Biology*, 33(5), 1265-1274.
- Sartoretto, S. M., Santos, F. F., Costa, B. P., Ceravolo, G. S., Santos-Eichler, R., Carvalho, M. H. C., ... & Akamine, E. H. (2019). Involvement of inducible nitric oxide synthase and estrogen receptor ESR2 (ER β) in the vascular dysfunction in female type 1 diabetic rats. *Life sciences*, 216, 279-286.
- Sarveswaran, S., Chakraborty, D., Chitale, D., Sears, R., & Ghosh, J. (2015). Inhibition of 5-lipoxygenase selectively triggers disruption of c-Myc signaling in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(8), 4994-5006.
- Sayed-Ahmed M.M., Al-Shabanah O.A., Hafez M.M., Aleisa A.M., Al-Rejaie S.S. (2010). Inhibition of Gene Expression of Heart Fatty Acid Binding Protein and Organic Cation/Carnitine Transporter in Doxorubicin Cardiomyopathic Rat Model. *Eur. J. Pharmacol.* 640:143–149.
- Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International journal of oncology*, 54(2), 407-419.
- Schmidt EE, Macdonald IC, Groom AC. (1988). Microcirculatory pathways in normal human spleen, demonstrated by scanning electron microscopy of corrosion casts. *Am J Anat*; 181:253–66.
- Schreck, R., Rieber, P. and Baeuerle, P. A. (1991). "Reactive Oxygen Intermediates as Apparently Widely Used Messengers in the Activation of the Nf-Kappa-B Transcription Factor and Hiv-1." *Embo Journal* 10(8): 2247-2258.
- Sengupta, A., Manna, K., Datta, S., Das, U., Biswas, S., Chakrabarti, N., & Dey, S. (2017). Herbicide exposure induces apoptosis, inflammation, immune modulation and

- suppression of cell survival mechanism in murine model. *RSC advances*, 7(23), 13957-13970.
- Serarslan, G., Altuğ, E., Kontas, T., Atik, E., & Avcı, G. (2007). Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clinical and Experimental Dermatology: Experimental dermatology*, 32(6), 709-715.
- Shabalala S., Muller CJF., Louw J., Johnson R.. (2017) Jul 1. Polyphenols, autophagy and doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Life Sci.*;180:160-170.
- Shapiro, C. L. (2016). Highlights of recent findings on quality-of-life management for patients with cancer and their survivors. *JAMA oncology*, 2(11), 1401-1402.
- Shelton, R. C., Claiborne, J., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Reddy, R., Aschner, M., Lewis, D. A., & Mirnics, K. (2011). Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. *Molecular psychiatry*, 16(7), 751-762.
- Shivakumar, P., Rani, M. U., Reddy, A. G. and Anjaneyulu, Y. (2012). A study on the toxic effects of Doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicol Int*, 19 (3), 241-4.
- Shoubridge, E. A. (2001). Cytochrome c oxidase deficiency. *American journal of medical genetics*, 106(1), 46-52.
- Sinkler, C. A., Kalpage, H., Shay, J., Lee, I., Malek, M. H., Grossman, L. I., & Hüttemann, M. (2017). Tissue-and condition-specific isoforms of mammalian cytochrome c oxidase subunits: from function to human disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Siswanto, S., Arozal, W., Juniantito, V., Grace, A. and Agustini, F. D. (2016). The effect of mangiferin against brain damage caused by oxidative stress and inflammation induced by doxorubicin. *HAYATI Journal of Biosciences*, 23 (2), 51-55.
- Skeel, R. T., & Khleif, S. N. (Eds.), 2011. *Handbook of cancer chemotherapy*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Smith EL., Hill RL., Lehmal R. (1983). *Principle of biochemistry*. 7th ed. USA: McBray Hill Inc.: 382383.
- Soyocak, A., Kurt, H., Cosan, D. T., Saydam, F., Calis, I. U., Kolac, U. K., Koroglu, Z. O., Degirmenci, I., Mutlu, F. S. and Gunes, H. V. (2019). Tannic acid exhibits anti-inflammatory effects on formalin- induced paw edema model of inflammation in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 38 (11), 1296-1301.
- Sun, Y., Oberley, L. W. and Li, Y. (1988). A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide-Dismutase. *Clinical Chemistry*, 34 (3), 497-500.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C.R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of pharmacy and pharmacology* 65, 157-170.
- Takahashi, K., Akasaka, M., Yamamoto, Y., Kobayashi, C., Mizoguchi, J. and Koyama, J. (1990). "Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences." *J Biochem* 108(2): 145-148.
- Tehrani, H. S., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 140, 5-12.
- Terrill T.H., Waghorn G.C., Woolley D.J., McNabb W.C., Barry T.N. (1994) Assay and digestion of ¹⁴C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep, *Br. J. Nutr.* 72 467–477.

- Thelander, L. and Reichard, P. (1979). "Reduction of ribonucleotides." *Annu Rev Biochem* 48: 133-158.
- Tikoo, K., Sane, M. S. and Gupta, C. (2011). Tannic acid ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity and potentiates its anti-cancer activity: Potential role of tannins in cancer chemotherapy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 251 (3), 191-200.
- To, H., Ohdo, S., Shin, M., Uchimaru, H., Yukawa, E., Higuchi, S., Fujimura, A., & Kobayashi, E. (2003). Dosing time dependency of doxorubicin-induced cardiotoxicity and bone marrow toxicity in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(6), 803-810.
- Torti, F. M., Bristow, M. M., Lum, B. L., Carter, S. K., Howes, A. E., Aston, D. A., ... & Billingham, M. E. (1986). Cardiotoxicity of epirubicin and doxorubicin: assessment by endomyocardial biopsy. *Cancer research*, 46(7), 3722-3727.
- Tsang, W. P., Ho, F. Y., Fung, K. P., Kong, S. K., & Kwok, T. T. (2005). p53-R175H mutant gains new function in regulation of doxorubicin-induced apoptosis. *International journal of cancer*, 114(3), 331-336.
- Tsikis, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical biochemistry*, 524, 13-30.
- Turcotte, L. M., Liu, Q. I., Yasui, Y., Arnold, M. A., Hammond, S., Howell, R. M., ... & Neglia, J. P. (2017). Temporal trends in treatment and subsequent neoplasm risk among 5-year survivors of childhood cancer, 1970-2015. *Jama*, 317(8), 814-824.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *J Physiol* 552(Pt 2): 335-344.
- Van Cutsem, E., & Arends, J. (2005). The causes and consequences of cancer-associated malnutrition. *European journal of oncology nursing*, 9, S51-S63.
- Vance, R.E., Teel, R.W. (1989). Effect of tannic acid on rat liver S9 mediated mutagenesis, metabolism and DNA binding of benzo[a]- pyrene. *Cancer Letters* 47, 37.
- Vannini, F., Kashfi, K., & Nath, N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox biology*, 6, 334-343.
- Vargel İ, Erdem A, Ertoy D, Pınar A, Erk Y, Altundağ MK, Güllü İ. (2002). Effects of growth factors on doxorubicin-induced skin necrosis: documentation of histomorphological alterations and early treatment by GM-CSF and G-CSF. *Ann Plast Surg*; 49: 646-653.
- Vásquez-Garzón, V. R., Arellanes-Robledo, J., García-Román, R., Aparicio-Rautista, D. I., & Villa-Treviño, S. (2009). Inhibition of reactive oxygen species and pre-neoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism. *Free radical research*, 43(2), 128-137.
- Volkova, M., Russell, R.. (2011). Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Current cardiology reviews* 7, 214-220.
- Wallace, K. B. (2003). Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacology & toxicology*, 93(3), 105-115.
- Wang J, Lei K, Han F. (2018): Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22(12):3855-3864.
- Warpe, V. S., Mali, V. R., Arulmozhi, S., Bodhankar, S. L. and Mahadik, K. R. (2015). Cardioprotective effect of ellagic acid on doxorubicin induced cardiotoxicity in wistar rats. *Journal of Acute Medicine*, 5 (1), 1-8.

- William EE. (1989). Clinical pharmacology of cancer chemotherapy in children, anthracyclines. Saunders. *Pediatr Clin North Am. Clinical Pharmacology*; 36: 1206-1209M.
- Wojtovich, A. P., Nadtochiy, S. M., Brookes, P. S. and Nehrke, K., 2012. "Ischemic preconditioning: the role of mitochondria and aging." *Exp Gerontol* 47(1): 1-7.
- Wolf BM, Baynes WJ. (2006). The anticancer drug, doxorubicin, causes oxidant stress-induced endothelial dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1760: 267- 271.
- Wu, L.T., Chu, C.C., Chung, J.G., Chen, C.H., Hsu, L.S., Liu, J.K., Chen, S.C. (2004). Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. *Mutation Research* 556, 75.
- Xu, C., Shu, W. Q., Qiu, Z. Q., Chen, J. A., Zhao, Q., & Cao, J. (2007). Protective effects of green tea polyphenols against subacute hepatotoxicity induced by microcystin-LR in mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, 24(2), 140-148.
- Xu, Y., Cheng, L., Sun, J., Li, F., Liu, X., Wei, Y., ... & Wang, Y. (2021). Hypermethylation of Mitochondrial Cytochrome b and Cytochrome c Oxidase II Genes with Decreased Mitochondrial DNA Copy Numbers in the APP/PS1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, 46(3), 564-572.
- Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1845(1), 84-89.
- Yang, Q. J., Yang, G. J., Wan, L. L., Han, Y. L., Huo, Y., Li, J., Huang, J. L., Lu, J., Gan, R. and Guo, C. (2017). Protective Effects of Dexrazoxane against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Metabolomic Study. *Plos One*, 12 (1).
- Yost, F. J., Jr. and Fridovich, I. (1973). "An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 248(14): 4905-4908.
- Zhang, J. P., Cui, L. J., Han, X., Zhang, Y. Y., Zhang, X., Chu, X., Zhang, F. H., Zhang, Y. and Chu, L. (2017a). Protective effects of tannic acid on acute doxorubicin-induced cardiotoxicity: Involvement of suppression in oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93 1253-1260.
- Zhang, J. P., Song, Q. T., Han, X., Zhang, Y. Y., Zhang, Y., Zhang, X., Chu, X., Zhang, F. H. and Chu, L. (2017b). Multi-targeted protection of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by tannic acid. *International Immunopharmacology*, 47 95-105.
- Zhang, J., Cui, L., Han, X., Zhang, Y., Zhang, X., Chu, X., ... & Chu, L. (2017). Protective effects of tannic acid on acute doxorubicin-induced cardiotoxicity: Involvement of suppression in oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 1253-1260.
- Zhang, J., Song, Q., Han, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, X., ... & Chu, L. (2017). Multi-targeted protection of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by tannic acid. *International Immunopharmacology*, 47, 95-105.
- Zhang, Q. Y., Wang, F. X., Jia, K. K. and Kong, L. D. (2018). Natural Product Interventions for Chemotherapy and Radiotherapy-Induced Side Effects.
- Zhou, G. X., Ding, X. L., Wu, S. B., Zhang, H. F., Cao, W., Qu, L. S., & Zhang, H. (2015). Inhibition of 5-lipoxygenase triggers apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncology reports*, 33(2), 661-668.

- Zhu J., Filippich L.J., Alsalam M.T. (1992). Tannic acid intoxication in sheep and mice, *Res. Vet. Sci.* 53 280–292.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909-950.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Duygu KİZİR
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Şükrü Paşa Anadolu Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Genetik Bilim Dalı (2022)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	