



**SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN KAYNAKLI
NEFROTOKSİSİTE KARŞISINDA TANNİK
ASİT'İN KORUYUCU POTANSİYELİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Esra Nur YEŞİLKENT

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN
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 KAYNAKLI NEFROTOKSİSİTE KARŞISINDA
TANNİK ASİT'İN KORUYUCU POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Evaluation of the Protective Potential of Tannic Acid Against Doxorubicin-Induced
Nephrotoxicity in Rats)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra Nur YEŞİLKENT

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN

Erzurum
Temmuz, 2022



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN KAYNAKLI NEFROTOKSİSİTE KARŞISINDA
TANNİK ASİT'İN KORUYUCU POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN danışmanlığında, Esra Nur YEŞİLKENT tarafından hazırlanan bu çalışma, 18/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Doç. Dr. Yeliz Demir <i>Ardahan Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Melike KARAMAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun/....../.... tarih
ve sayılı kararı.

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 Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü Lisansüstü Tez Projeleri (LÜTP) kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2021-8683

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak *Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN* danışmanlığında sunulan “*Sıçanlarda Doksorubisin Kaynaklı Nefrotoksisite Karşısında Tannik Asit’in Koruyucu Potansiyelinin Değerlendirilmesi*” 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	0	30
Kuramsal Temeller	5	30
Materyal ve Metot	13	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	1	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	6	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.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Esra Nur YEŞİLKENT	Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN
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-2021-8683" numaralı "Sıçanlarda Doksorubisin Kaynaklı Nefrotoksisite Karşısında Tannik Asitin Koruyucu Potansiyelinin Değerlendirilmesi" başlıklı proje ile desteklenmiştir. Bu çalışmaya sağladığı finansal destekten dolayı öncelikli olarak Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup, yüksek lisansa başladığım ilk günden beri büyük bir özveriyle bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her daim hoşgörü ve sabırla benimle ilgilenen çok kıymetli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN'a,

Çalışmalarında yardım ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana yol gösteren, çok değerli hoclarım Doç. Dr. Yeliz DEMİR'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Melike KARAMAN'a,

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

Laboratuvar çalışmalarım sırasında, takıldığım her konuda bana yardımcı olan; bilgi, deneyimlerini benimle paylaşan, özellikle tezimin yazım sürecinde her sıkıştığım konuda danıştığım ve stresli tez dönemim boyunca yanımda olan başta Sayın Arş. Gör. Emine TORAMAN'a ve diğer araştırma görevlisi hocalarıma,

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca yan yana olduğumuz, desteğini her zaman hissettiğim çalışma arkadaşlarım Duygu KİZİR'e, Medine KARAĞAÇ'a,

Hayatımın her anında olduğu gibi tez dönemim boyunca büyük bir özveriyle beni destekleyip cesaretlendiren, maddi-manevi hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan hayattaki en büyük şanslarım olan annem Meryem YEŞİLKENT'e ve babam Bünyamin YEŞİLKENT'e, abim Sevban YEŞİLKENT'e, uzakta olmasına rağmen desteklerini her zaman hissettiğim abim Cihat Emre YEŞİLKENT'e, yengem Gülsüm YEŞİLKENT'e ve son olarak çok değerli kız kardeşim Ferhan YEŞİLKENT'e sonsuz teşekkür ederim.

Esra Nur YEŞİLKENT

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN KAYNAKLI NEFROTOKSİSİTE KARŞISINDA TANNİK ASİT'İN KORUYUCU POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Esra Nur YEŞİLKENT

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN

Amaç: Doksorubisin (DOX), etkin ancak böbrek dokusunda yol açtığı toksisiteden dolayı klinik etkinliği sınırlı kalan bir kemoterapi ilacıdır. Bu yüzden DOX kaynaklı nefrotoksisitenin altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasının yanı sıra DOX'un tedavi etkinliğini değiştirmeden ilacın yol açtığı hasarı minimize edebilecek ajanların belirlenmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, DOX maruziyeti ile oluşturulan böbrek toksisite modelinde tannik asitin (TA) böbrek dokusu üzerindeki koruyucu etkisi ve bu etkilerin potansiyel mekanizmalarının gen ve protein seviyesinde araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: İki haftalık süreçte kümülatif DOX maruziyetinin yanı sıra, TA ve DOX+TA kombinasyonu uygulanan diğer gruplardaki canlıların böbrek dokularında oksidatif hasar belirteçlerinin miktarları ile antioksidan sistem bileşenlerinin değişimleri gen ve protein seviyesinde incelendi. Ayrıca DOX ilişkili nefrotoksisiteye katkı sağlayan moleküler aktörlerin tanımlanması amacıyla inflamasyon, apoptozis ve hücre metabolizmasında kritik öneme sahip regülatör faktörlerin gen ifadesi seviyeleri Real-Time PCR ile araştırıldı.

Bulgular: Sıçan böbrek dokularında DOX'un glutatyon (GSH) seviyesinde azalmaya ve malondialdehit (MDA) seviyesinde ise artışa neden olduğu gözlenmiştir. Antioksidan sistem bileşenlerinden süperoksit dismutazın (SOD), katalazın (CAT), glutatyon-s-transferazın (GST) ve glutatyon peroksidazın (GPx) biyolojik aktivitelerinde ve mRNA seviyelerinde ise DOX'un önemli baskılamaya yol açtığı tespit edilmiştir. Ek olarak, böbrek hasar markırlarının (*Lcn2* ve *Kim-1*), inflamasyon markerlarının (*Cox-2*, *Tnfa* ve *Il-6*), apoptotik genlerin (*Casp3* ve *Casp9*), stres direnci ve hücre metabolizmanın düzenlenmesinde rol alan transkripsiyon faktörlerinin (*Foxo1* ve *Foxo3*) ve transkripsiyonda DNA'nın topolojisini düzenleyen *Top2b*'nin mRNA ifadelerinin DOX maruziyeti sonucunda olumsuz etkilendiği gözlenmiştir. Ancak, TA'nın DOX maruziyeti ile meydana gelen söz konusu tüm deregülasyonları tersine çevirebildiği gözlenmiştir.

Sonuç: DOX'un neden olduğu patolojik olguların altında yatan mekanizmaların anlaşılmasına yönelik çalışmalar devam etse de, TA uygulamasının klinikte kullanılan ilacın terapötik etkinliğini değiştirmeden kemoterapi kaynaklı nefrotoksisiteyi hafifletici alternatif, çok yönlü ve etkin bir yaklaşım olarak kabul edilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kemoterapi, Doksorubisin, Nefrotoksisite, Tannik asit, Sıçan

Temmuz 2022, 80 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

EVALUATION OF THE PROTECTIVE POTENTIAL OF TANNIC ACID AGAINST DOXORUBICIN-INDUCED NEPHROTOXICITY IN RATS

Esra Nur YEŞİLKENT

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN

Purpose: Doxorubicin (DOX) is an effective chemotherapy agent, but its clinical efficacy is limited due to the toxicity it causes in the kidney tissue. Therefore, in addition to elucidating the underlying mechanisms of DOX-induced nephrotoxicity, it is necessary to identify agents that can minimize the damage caused by the drug without changing the treatment efficacy of DOX. This thesis aimed to investigate the protective effect of tannic acid (TA) on kidney tissue and the potential mechanisms of these effects at the gene and protein level in the kidney toxicity model induced by DOX exposure.

Method: In addition to the cumulative DOX exposure during the two-week period, the amounts of oxidative damage markers and the changes in the antioxidant system components in the kidney tissues of the animals in the other groups treated with TA and DOX+TA combination were examined at the gene and protein level. In addition, in order to identify the molecular actors contributing to DOX-related nephrotoxicity, the gene expression levels of regulatory factors that have critical importance in inflammation, apoptosis, and cell metabolism were investigated by Real-Time PCR.

Findings: It was observed that DOX caused a decrease in glutathione (GSH) levels and an increase in malondialdehyde (MDA) levels in rat kidney tissues. It has been determined that DOX causes significant suppression in the biological activities and mRNA levels of the antioxidant system components, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-s-transferase (GST), and glutathione peroxidase (GPx). In addition, kidney damage markers (*Lcn2* and *Kim-1*), inflammation markers (*Cox-2*, *Tnfa*, and *Il-6*), apoptotic genes (*Casp3* and *Casp9*), transcription factors (*Foxo1* and *Foxo3*) involved in the regulation of stress resistance and cell metabolism, and mRNA expressions of *Top2b*, which regulates the topology of DNA in transcription, were negatively affected by DOX exposure. However, it has been observed that TA is able to reverse all the deregulations that occur with DOX exposure.

Results: Although studies to understand the mechanisms underlying the pathological cases caused by DOX continue, it is thought that TA treatment can be considered an alternative, versatile and effective approach to alleviating chemotherapy-induced nephrotoxicity without changing the therapeutic efficacy of the drug used in the clinic.

Keywords: Chemotherapy, Doxorubicin, Nephrotoxicity, Tannic acid, Rat

July 2022, 80 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
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Kanser	3
Kanser Tedavi Yaklaşımları.....	4
Kemoterapi.....	4
Antrasiklinler.....	5
Doksorubisin	7
Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres.....	10
Hücrel Antioksidan Sistem	12
Doğal Bileşiklerin Terapötik Etkileri.....	14
Tannik asit ve özellikleri.....	15
MATERYAL VE METOT	17
Kullanılan Cihazlar	17
Kullanılan Kimyasal Malzemeler	17
Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	19
Hayvan Bakımı ve Deneysel Çalışma Planı.....	20
Biyokimyasal Analizler.....	21
Doku homojenizasyonu.....	21
Bradford yöntemiyle protein tayini	21
GPx enzim aktivite ölçümü.....	22
GST enzim aktivite ölçümü	22
SOD enzimi aktivite ölçümü.....	23
CAT enzimi aktivite ölçümü.....	24
MDA ölçümü	24

GSH ölçümü.....	25
Moleküler Analizler	25
Primer dizaynı	25
Böbrek dokusundan total RNA izolasyonu.....	27
İzole Edilen RNA'ların Kalitatif ve Kantitatif Analizi.....	27
Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	28
Kantitatif Real Time PCR (qPCR) aşaması	29
İstatistiksel Analiz.....	30
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	31
Saflaştırılan RNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analiz Sonuçları	31
Antioksidan Sistem Bileşenlerinin Kantitatif Gen Ekspresyon Sonuçları.....	32
Antioksidan Sistem Bileşenlerinin Enzim Aktivite Sonuçları.....	34
GSH Seviyesi ve MDA Konsantrasyon Sonuçları.....	36
<i>Lcn2, Kim-1, Top2b, Cox-2, Casp3, Casp9, Foxo1 ve Foxo3</i> Genlerinin Ekspresyon Sonuçları	38
SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	65

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar.....	17
Tablo 2. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	18
Tablo 3. Protein Tayini İçin Miktarlar.....	22
Tablo 4. GPx Enzim Aktivitesi Ölçümü Kullanılacak Çözeltiler ve Miktarları.....	22
Tablo 5. GST Enzim Aktivitesi Ölçümü İçin Küvet İçeriği.....	23
Tablo 6. SOD Aktivite Deney Ptotokolü.....	24
Tablo 7. CAT Aktivite Deney Ptotokolü.....	24
Tablo 8. MDA Ölçümünde Kullanılacak Çözeltiler ve Miktarları.....	25
Tablo 9. İndirgenmiş Glutatyon Ölçümü Küveti İçeriği.....	25
Tablo 10. qPCR’da Kullanılmak Üzere Dizayn Edilmiş Primer Setlerine Ait Bilgiler.....	26
Tablo 11. cDNA Sentez Reaksiyon Bileşenleri.....	28
Tablo 12. cDNA Sentez Reaksiyon Protokolü.....	28
Tablo 13. Real-Time PCR Reaksiyon Karışımı.....	29
Tablo 14. Real-Time PCR Reaksiyon Şartları.....	29
Tablo 15. İzole Edilen RNA’ların Konsantrasyon Sonuçları.....	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri.....	3
Şekil 2. Bazı kemoterapik ajanlar ve etki mekanizmaları	5
Şekil 3. Antrasiklin yaygın yan etkileri	6
Şekil 4. Daunorubisin molekülünün kimyasal yapısı.....	6
Şekil 5. İdarubisin molekülünün kimyasal yapısı	6
Şekil 6. Doksorubisin molekülünün kimyasal yapısı	7
Şekil 7. Doksorubisin'in çeşitli etki mekanizmaları	8
Şekil 8. Doksorubisin'in olası yan etkileri	9
Şekil 9. ROS'ların üretiminin çeşitli aktivatörleri ve inhibitörler.....	11
Şekil 10. Süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyon.....	13
Şekil 11. Süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyon.....	13
Şekil 12. Glutasyon peroksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon	13
Şekil 13. Tannik asitin moleküler yapısı	15
Şekil 14. DOX ve TA uygulama protokolü (DOX veya TA belirteci olmayan günlerde canlılara sadece su ve yem verildi)	21
Şekil 15. İzole edilen total RNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü	31
Şekil 16. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Cat</i> mRNA ekspresyon seviyesi.....	32
Şekil 17. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Sod</i> mRNA ekspresyon seviyesi.....	33
Şekil 18. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Gpx</i> mRNA ekspresyon seviyesi.....	33
Şekil 19. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Gst</i> mRNA ekspresyon seviyesi.....	34
Şekil 20. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki CAT spesifik enzim aktivitesi	35
Şekil 21. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki SOD spesifik enzim aktivitesi	35
Şekil 22. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki GPX spesifik enzim aktivitesi	36
Şekil 23. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki GST spesifik enzim aktivitesi	36
Şekil 24. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki GSH seviyesi.....	37

Şekil 25. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki MDA konsantrasyonu	37
Şekil 26. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Lcn2</i> mRNA ekspresyon seviyesi	38
Şekil 27. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Kim-1</i> mRNA ekspresyon seviyesi	39
Şekil 28. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Top2b</i> mRNA ekspresyon seviyesi	39
Şekil 29. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Cox-2</i> mRNA ekspresyon seviyesi	40
Şekil 30. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Cas93</i> mRNA ekspresyon seviyesi	41
Şekil 31. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Casp9</i> mRNA ekspresyon seviyesi	41
Şekil 32. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Foxo1</i> mRNA ekspresyon seviyesi	42
Şekil 33. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Foxo3</i> mRNA ekspresyon seviyesi	43
Şekil 34. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Tnfa</i> mRNA ekspresyon seviyesi	43
Şekil 35. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki <i>Il-6</i> mRNA ekspresyon seviyesi	44
Şekil 36. STRING veritabanı aracılığı ile oluşturulan ve çalışmada incelenen hedeflerin ilişkisini gösteren PPI ağı. (PPI; protein-protein interaction).	49

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
°C	Santigrat Derece
µl	Mikro Litre
BSA	Sığır Serum Albümin
C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	Ksantin
CaCO ₃	Kalsiyum karbonat
Casp3	Kaspaz 3
Casp9	Kaspaz 9
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer DNA
CDNB	2,4-Dinitroklorobenzen
cm	Santimetre
Cox-2	Siklooksijenaz-2
Cu	Bakır
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DOX	Doksorubisin
DR	Daunorubisin
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtBr	Ethidyum Bromür
ETDA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
g	Gram
g/L	Gram/Litre
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon Disülfid
GST	Glutasyon S-Transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik asit
IL-6	İnterlökin 6
i.p	İntraperitoneal

kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Potasyum fosfat
Kim-1	Börek Hasar Molekülü-1
KOH	Potasyum Hidroksit
L	Litre
Lcn-2	Lipokalin 2
M	Molar
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mmol/L	Milimol/Litre
Mn	Manganez
mRNA	Mesajcı RNA
N	Normal
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
Na_3PO_4	Sodyum Fosfat
NADP^+	Okside Nikotinamid Adanin Dinükleotid
NADPH	İndirgenmiş Nikotinamid Adanin Dinükleotid
NaOH	Sodyum Hidroksit
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	Revolutions Per Minute
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
Top2b	Topoizomeraz-2-b
U/mL	Unit/Mililitre
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
Zn	Çinko
$\mu\text{mol/L}$	Mikromol/Litre



GİRİŞ

Geçmişten günümüze önemli bir halk sağlığı sorunu olan kanser, hücresel kontrollerden kaçışı ile bilinen ve aynı zamanda doku ve organlardaki hücrelerin düzensiz bölünmesi ve çoğalmasıyla ortaya çıkan karmaşık bir hastalıktır (Baykara, 2016). Daha iyi bir sağlık yönetimi için kanserin erken teşhisi ve tedavisi gereklidir. Kanser türüne ve hangi aşamada olduğuna bağlı olarak kemoterapi, cerrahi, radyasyon tedavisi, hormon tedavisi ve immünoterapi gibi tedavi yöntemleri mevcuttur (Wang *et al.* 2018).

Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek veya yok etmek için genellikle anti-kanser tedavi ilaçları olarak bilinen ilaçların uygulanmasıyla gerçekleştirilir. Bu ilaçların amacı, tümörlerin büyümesine ve gelişmesine müdahale eder ve hatta kanser hücrelerinin yok olmasını sağlar (Skeel and Khleif, 2011). Kemoterapi ekseriyetle kanser tedavisinde etkili bir yöntem olarak kabul edilir; ancak sağlıklı hücreleri veya dokuları da hedef alabilen bir yaklaşım olduğu için farklı organ toksisitelerine neden olabilir (Schirmacher, 2019). Kemoterapinin neden olduğu yan etkiler, tedavi için kullanılan ilaçların ve kanserin tipine, bulunduğu yere ve ayrıca bireyin tedaviye verdiği yanıtı bağlı olup bu zararlı yan etkiler genellikle kanser hastalarının yaşam kalitesini düşürmekle kalmaz, tedavide aksamalara da neden olabilir (Shapiro, 2016; Turcotte *et al.* 2017).

Kemoterapi amaçlı kullanılan, geniş spektruma sahip ve güçlü antineoplastik olarak bilinen doksorubisin (DOX), klinik etkinliği kanıtlanmış bir kanser ilacıdır (Pugazhendhi *et al.* 2018). DOX, mesane, meme, mide, akciğer, over ve tiroid gibi çok farklı kanser türlerinde tedavi protokolünde sık sık kullanılmaktadır (Mohan and Rapoport, 2010; Rivankar, 2014). Kanser kaynaklı ölüm oranlarını düşürseler de neden oldukları organ toksisitesi ve diğer yan etkiler söz konusu antrasiklin grubu ilaçların klinik etkinliklerini sınırlandırabilmektedir (Santos *et al.* 2020). Tedavi etkinliğini kısıtlayan bu durum karşısında DOX kaynaklı toksisiteyi giderebilecek veya azaltabilecek özellikle doğal ajanların tanımlanması ve bu ajanların etki mekanizmalarının aydınlatılmasına ihtiyaç vardır. Bu nedenle, DOX kaynaklı nefrotoksistede rol alan moleküler aktörlerin ve mekanizmaların anlaşılmasının yanı sıra DOX'un tedavi etkinliğini değiştirmeden söz konusu ilacın meydana getirdiği toksisiteyi minimize edebilecek ajanlara da ihtiyaç duyulmaktadır (Zhang *et al.* 2018).

Polifenoller, vitaminler, flavonoidler ve bitkisel antioksidanlar gibi doğal bileşikler çeşitli farmakolojik özelliklere sahip oldukları için nefrotoksiste gibi olgular karşısında

kullanılmak için güvenli adaylar olarak görülmektedirler (Ahmed *et al.* 2013). Birçok bitkide ikincil metabolizma sonucu üretilen Tannik Asit (TA), günlük diyetle alınımı söz konusu olan (Xu *et al.* 2007) ve güçlü anti-oksidan (Gulcin *et al.* 2010), anti-kanserojenik (Ren *et al.* 2019), anti- inflamatuvar (Soyocak *et al.* 2019) özelliğe sahip doğal bir bileşiktir. TA bu özelliği açısından değerlendirildiğinde DOX maruziyetine bağlı olarak böbrek dokusunda meydana gelen oksidatif hasarın giderilebilmesine katkı sağlayabilecek potansiyelde olan doğal bir adaydır.

Bugüne kadar yapılan bazı çalışmalarda TA'in oksijen türevi radikalleri oluşumunu engelleyebileceği ve ilaç kullanımına bağlı böbrek hasarına karşı koruyucu özellikte olduğu gösterilmiştir (Aung *et al.* 2017). Ancak, DOX kaynaklı nefrotoksosite karşısında TA'in nefroprotektif etkinliği ve bu etkinlikten sorumlu moleküler mekanizmalar tam olarak tanımlanamamıştır (Ahmad and Sultana, 2012).

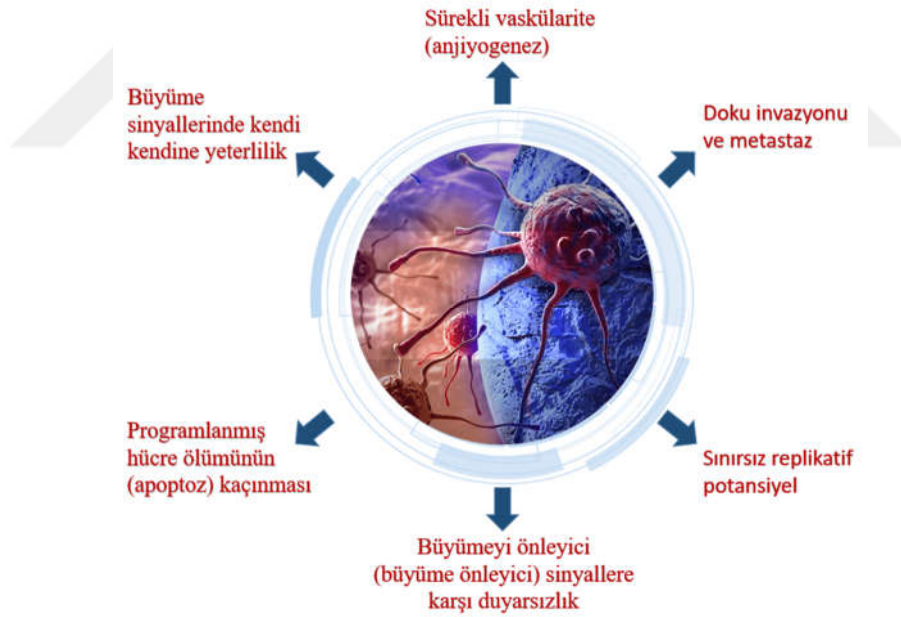
Kanser terapisinin daha farklı sağlık sorunlarına yol açmaması için bu olgulara neden olan mekanizmalarının aydınlatılması ve etkili yardımcı ajanların tanımlanması mevcut terapinin yenilenmesi veya yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük öneme sahiptir. Bu amaçla mevcut çalışmada;

- DOX'a bağlı nefrotoksosite oluşum mekanizmasında rol alan kritik noktaların belirlenmesi ve ilgili faktörlerin manipülasyonu için terapötik geliştirilmesine aracılık edilmesi,
- Özellikle ülkemiz florasında yer alan endemik bitkilerden elde edilecek doğal ürünlerin araştırılan mekanizmalar üzerindeki etkilerinin araştırılmasına katkı sunarak ürün/ilâç geliştirme çalışmaları ile ülkesel ekonomiye katkı sağlanabilmesi amaçlanmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

Kanser

Hücrelerin işleyişindeki bozulmalar sonucu ortaya çıkan ve kontrolsüz hücre çoğalması ile sonuçlanan kanser, dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir (WHO, 2018; Estanqueiro *et al.* 2015). Normal sağlıklı bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesinin nedenleri arasında kalıtsal mutasyonlar, UV ışığı, Xrays, kimyasallar, tütün ürünleri, virüsler ve çevresel faktörleri gibi daha birçok faktörün etkili olduğu bilinmektedir (Sankpal *et al.* 2012) Yaşlılık, kronik stres ve zayıflatıcı hastalık, daha öncesinden kemoterapi alımı, antibiyotik, analjezik, kortikosteroid vb. ilaçların kötüye kullanılması gibi herhangi bir faktör nedeniyle bağışıklık sistemi baskılanmış olan kişilerde kanser riski artmaktadır (Reuter *et al.* 2010). Kanserleşme sürecinde hücrenin fizyolojisinde meydana gelen ve yine hücre canlılığı açısından tehdit oluşturabilen temel değişiklikler saptanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri (Hanahan and Weinberg 2011).

Genom kararsızlığına yol açan bu altı ayırt edici özelliğin her birini hedefleyen antikanser ilaçları mevcuttur ve hastalığın teşhis edilip hangi aşamada olduğunun belirlenmesi için gelişmiş teknolojilerle uyum içinde kullanılan birçok ilaç sistemi var olmasına rağmen toksisite gibi mevcut yan etkileri düşündürücü bir konudur (Maciejowski and Lange 2017).

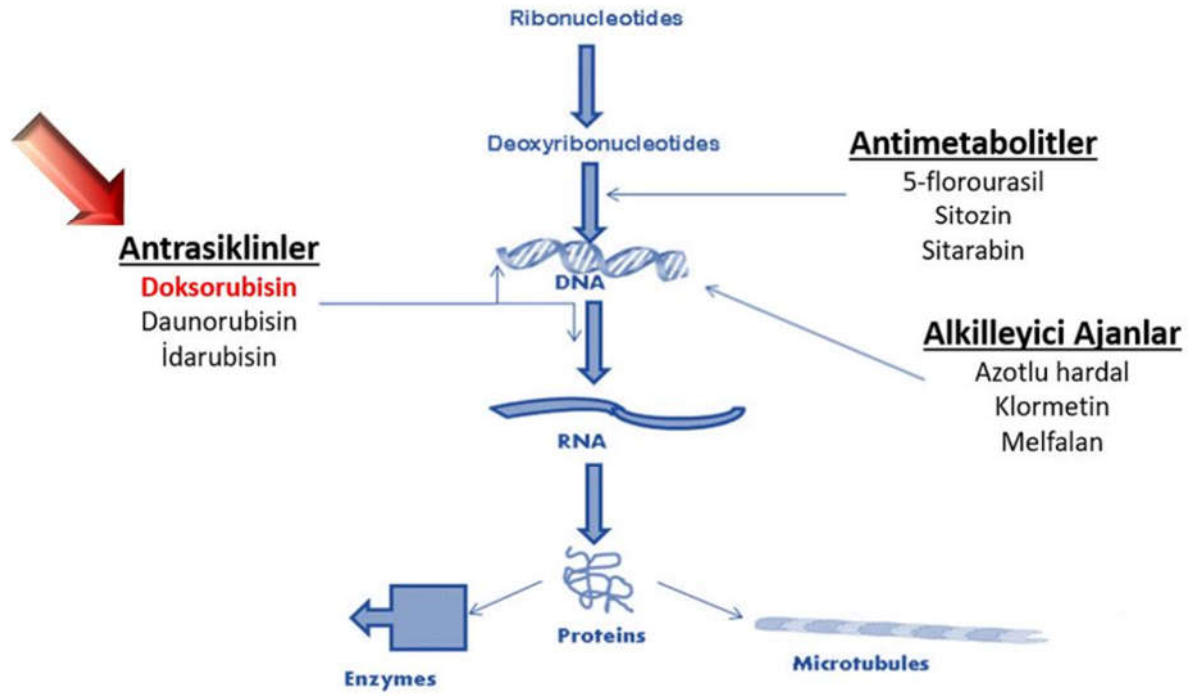
Kanser Tedavi Yaklaşımları

Kanser tedavisinde radyoterapi, cerrahi ve kemoterapi geleneksel tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır (Gatenby, 2009; Urruticoechea *et al.* 2010). Cerrahi, kanser tedavisinde başarısı ile bilinen ve kullanılan ilk yöntemlerden biri olup yaygın olarak bulunan solid vücut tümörleri için en ideal yaklaşımdır. Radyasyon tedavisinde ise enerjisi yüksek olan radyasyonun hücrelerin genetik materyaline zarar vererek onların bölünme ve çoğalma yetenekleri engellenebilmektedir. Kanser bulunduğu bölgeye lokal olarak uygulanan bir yöntem olan bu yaklaşım, hem normal hem de kanserli hücreleri etkileyen bir tedavi yöntemidir (Baskar *et al.* 2012). Kemoterapi, terapötik ajanların tek veya genellikle kombinasyonlar halinde uygulandığı öne çıkan geleneksel bir yaklaşımdır (Baudino, 2015). Kanser kemoterapisinde amaç, kanser hücrelerinin çoğalmasını, istilasını ve son nokta olan hastayı öldürmesini engellemektir (Ba *et al.* 2019).

Kemoterapi

Kemoterapi çeyrek asrı aşan bir süredir kullanılan stratejidir (Gustafson and Page 2013). Kanser hastaları için klinik uygulamalarda yaygın olarak tercih edilen kemoterapi kanser hücrelerini öldürmek için kimyasalların veya ilaçların uygulanmasını içeren sistemik bir yaklaşımdır (Volkova and Russell 2011). Tümör büyümesini engelleme ve yeniden ortaya çıkma olasılığını düşürerek kanseri iyileştirme potansiyeline sahip kemoterapi ile her geçen yıl kanserden etkilenen milyonlarca hastada terapi açısından başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Qin *et al.* 2017).

Tüm bu olumlu özelliklerine rağmen kemoterapi etkinliği hastanın bağışıklık sistemi, tümör patolojisi veya hastane koşulları gibi birçok faktörle ilişkilidir (Muraji *et al.* 2013; Ghiringhelli and Apetoh 2014; Schmidt *et al.* 2018). Günümüzde bu amaç için kullanılan pek çok farklı antikanser ilacı mevcuttur. Söz konusu bu ilaçların ortak noktaları hücre metabolizması açısından kritik mekanizmaları hedef almalarıdır (Huang *et al.* 2017). Başlıca ilaçlar ve etki mekanizmaları **Şekil 2**'de belirtilmiştir. Kemoterapik ilaçlar arasında yer alan antrasiklin grubu çok çeşitli maligniteler için kullanılan oldukça etkili kemoterapötik ajanlardır (Cai *et al.* 2019).



Şekil 2. Bazı kemoterapik ajanlar ve etki mekanizmaları (Kurreck, 2022’den düzenlenmiştir)

Antrasiklinler

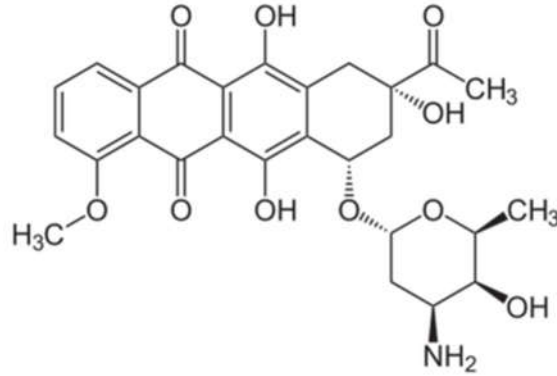
Kemoterapide erken teşhisin yanı sıra geliştirilen yeni tedavi yaklaşımları aracılığı ile kanser hastalarının iyileşme oranı artış göstermektedir. Bu yaklaşımlardan birisi olan antrasiklin kemoterapisi, modern kanser tedavisi döneminde önemli bir rol oynamaktadır (Sallustio and Boddy 2021). Antrasiklinler, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) temel olarak belirlenen ilaç model listesinde yerini almaktadır. Keşfedilmelerinin üzerinden yarım asır sonra bile teorik ve klinik araştırmalarda merak uyandırmaya devam etmektedirler (McEvoy and Snow 2019). Antrasiklinler, lösemi, lenfoma, meme kanseri, akciğer kanseri, multiple miyelom ve sarkom dahil olmak üzere çok çeşitli katı organ tümörlerinin ve hematolojik malignitelerin tedavisinde kullanılan oldukça etkili kemoterapötik ajanlardır (Volkova and Russell 2011; Cai *et al.* 2019). Antrasiklin molekülü, tetrasiklik çekirdek ve aminoşekerden (daunosamin) oluşur. Grubun tüm üyelerinin tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları vardır (Toroz and Gould 2019).

Kemoterapötik ajanların büyük çoğunluğu önemli yan etkilerle ilişkilendirilmektedir. Bu yan etkiler, genellikle etki mekanizmalarının bir yansıması olarak karşımıza çıkar (Şekil 3). Antrasiklin türevlerinin redoks döngüsünü manipüle ederek reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi üzerinden DNA hasarına yol açarak birçok farklı toksisitenin merkezinde yer aldığı hipotezi günümüzde yaygın olarak kabul edilmektedir (McGowan *et al.* 2017).

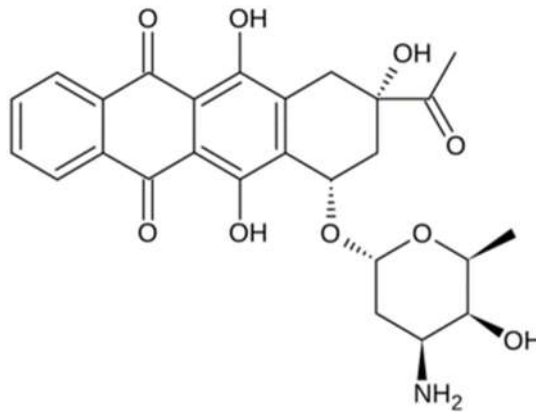


Şekil 3. Antrasiklin yaygın yan etkileri (Hajra *et al.* 2018)

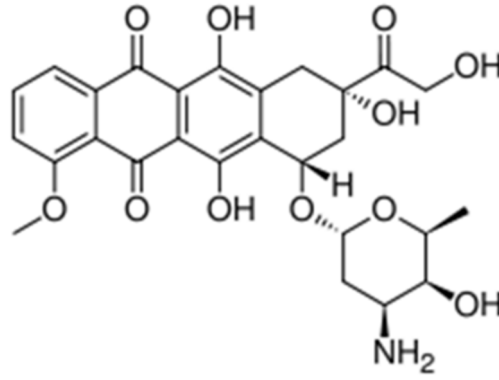
Epirubisin, daunorubisin, idarubisin ve DOX klinik etkinlikleri kanıtlanmış en yaygın antrasiklinlerdir ve bu antrasiklinlerin kimyasal yapısı **Şekil 4**, **Şekil 5** ve **Şekil 6**'da yer almaktadır (McEvoy GK, 2000; Hardman *et al.* 2001; Wallace, 2003; McGowan *et al.* 2017). İlk bulunan antrasiklin, doğal olarak bir actinobacteria türü olan *Streptomyces peucetius* tarafından üretilen daunorubisin'dir. Daunorubisin (DR) molekülündeki 14. karbonuna hidroksil grubu eklenmesi ile DOX meydana gelir. DOX'un bir stereoizomeri olan epirubisin, DOX'a göre daha yüksek hacme ve daha uzun yarı ömre sahiptir (Khasraw *et al.* 2012).



Şekil 4. Daunorubisin molekülünün kimyasal yapısı



Şekil 5. İdarubisin molekülünün kimyasal yapısı



Şekil 6. Doksorubisin molekülünün kimyasal yapısı

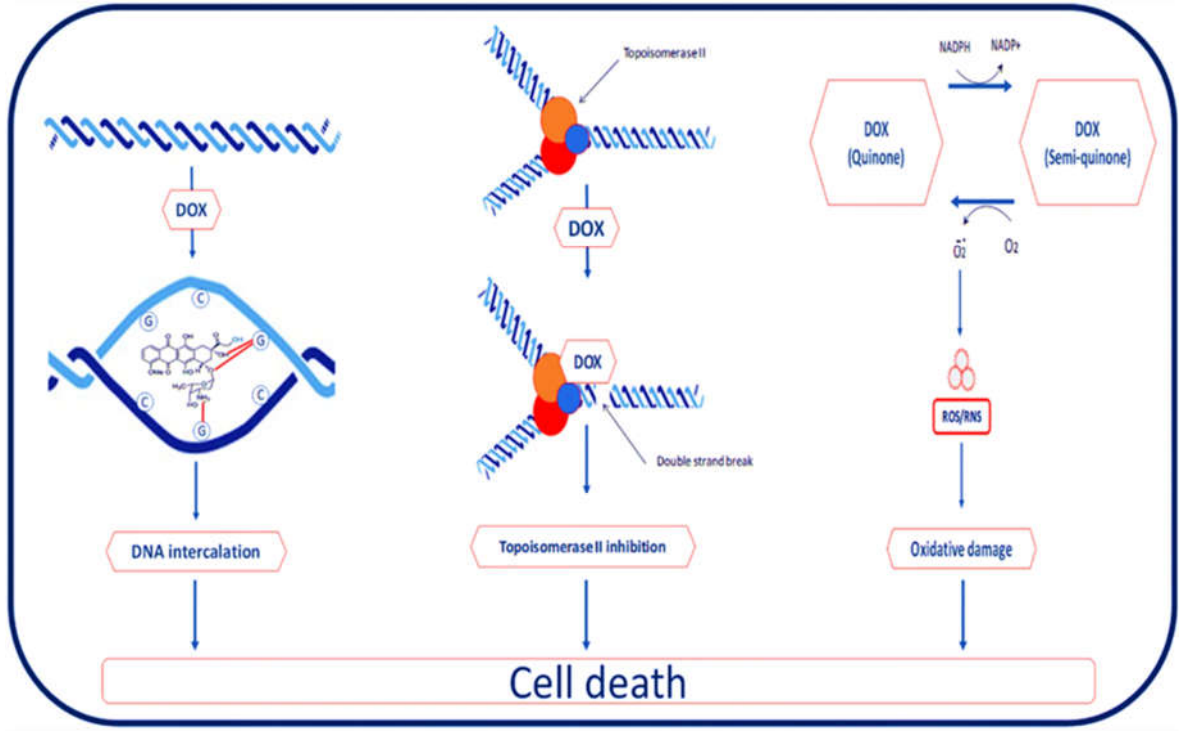
Doksorubisin

Antrasiklin türevi bir kemoterapötik ajan olan DOX (**Şekil 6**) günümüz kemoterapi yaklaşımlarında sıklıkla tercih edilen geniş spektrumlu antineoplastik bir ilaçtır (Lu, 2005). Etki mekanizması oldukça karmaşık olup hala tam olarak anlaşılamayan DOX'un DNA ile ilişkili enzimlere bağlandığı, DNA baz çiftleriyle interkalasyon yaptığı ve bir dizi sitotoksik etki oluşturmak için çoklu moleküler yolları hedeflediği bilinmektedir (Tacar *et al.* 2013). Bu etkinliğinin yanı sıra ne yazık ki DOX spesifik olarak tümörü hedef alamayıp vücuttaki diğer birçok hücre tipinin büyümesini de etkileyebilmektedir. Buna bağlı olarak bağışıklık sisteminde meydana gelen deregülasyon sonucunda bağışıklık hücrelerinin sayısı azalır ve neticede hasta mikrobiyal enfeksiyonlara karşı daha hassas hale gelerek iyileşme süreci önemli ölçüde etkilenmiş olur.

Söz konusu etkilerin şiddeti ve oluşum hızı çoğunlukla ilacın dozuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir (İbrahim *et al.* 2009; Xiao *et al.* 2017). Organ işlev bozukluğu, kanser ünitesinde yaygın bir olgu olması nedeniyle kanser terapisi uygulanan hastalar üzerinde önemli sonuçlara yol açabileceği için kemoterapide dikkate alınması gereken kritik sağlık sorunlarının başında gelir (Superfin *et al.* 2007).

Doksorubisin'in etki mekanizması

DOX, henüz tam olarak aydınlatılamamış etki mekanizmasına sahip bir terapötik ajandır (Farhane *et al.* 2015). Mevcut literatür kaynaklarına göre iki temel mekanizma önerilmektedir. Bunlardan birincisi DOX'un DNA sarmalına interkalasyonu sonucunda topoizomeraaz aracılı zincir kırılmasıdır. Diğer etkenin ise çoğunlukla serbest radikallerin oluşumu üzerinden hem DNA hem de membran proteinleri gibi kritik öneme sahip biyomoleküllerin zarar görmesi nedeniyle hücre canlılığının sonlanması olduğu büyük kabul görmektedir (Meredith and Dass 2016). Önerilen temel ve diğer genel etki mekanizmaları **Şekil 7**'de özetlenmiştir.

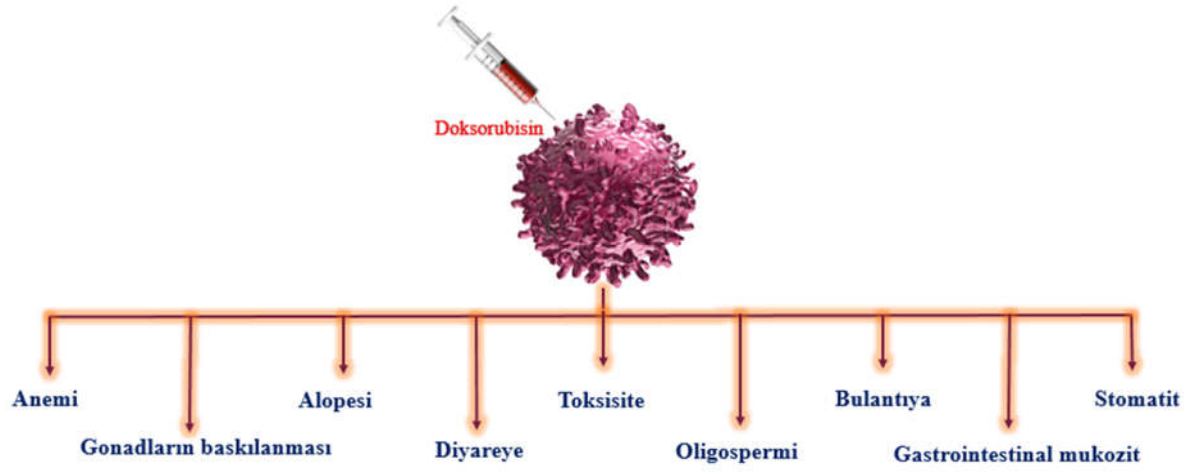


Şekil 7. Doksorubisin'in çeşitli etki mekanizmaları (Yang *et al.* 2014' dan düzenlenmiştir.)

Doksorubisin' in yan etkileri

DOX'un etki mekanizması tam olarak aydınlatılamadığı için hücresel metabolizmada sebep olabileceği toksik etkiler ve bunların altında yatan moleküler mekanizmalar da bu yüzden kesin olarak bilinmemektedir. DOX'un kanser terapilerinde kullanımını sınırlandıran, tedavi sırasında ve sonrasında hastalarda gözlenen temel yan etkiler **Şekil 8'**de özetlenmektedir.

DOX uygulanan hastaların neredeyse tamamında alopesi (saçkıran), flushing (kızarıklık), ek olarak tırnak üzerinde hiperpigmentasyona veya bantlaşmaya neden olabilir (Tacar *et al.* 2013; Wang *et al.* 2010). Doz ayarlaması çok önemli olup kemik iliği supresyonu için hayati önem taşımaktadır (Bhinge *et al.* 2012). Bu etkilerin yanı sıra trombositopeni ve anemi de kendini gösterebilir (Hilmer *et al.* 2004). Stomatit (aftöz ülser) ve gastrointestinal mukozit sık görülmesine rağmen geri dönüşümü olan yan etkilerdendir (Jayakaran, 2014). DOX tedavisi sonrasında gonadların baskılanması, oligospermi, azospermi veya amenore (adet düzensizliği) gibi ciddi sonuçlara neden olabilir. Gastrointestinal sistemi içinde yer alan bulantı, diyare (ishal) ve hatta anoreksiyaya (yeme bozukluğu) kadar uzanan kritik etkilere neden olabilir, kolonda da ülser veya nekroz oluşabildiği gözlemlenmiştir (Kesik ve ark. 2010; Gangadharan *et al.* 2017). DOX'un kalp, karaciğer ve ince bağırsakta görünmesinin yanı sıra esas olarak böbrekte birikimi gözlemlenmiştir (Jang *et al.* 2013). Nefrotoksisite, bir anti-kanser ilacı olarak DOX'un bilinen en yaygın olumsuz etkilerinden biridir (Park *et al.* 2012).



Şekil 8. Doksorubisin'in olası yan etkileri (Goodman and JG 2001; Hilmer *et al.* 2004; Wang *et al.* 2010; Park *et al.* 2012; Tacar *et al.* 2013).

Kanser tedavisinde kullanılacak olan ilacın hücre veya dokulardaki akümülayonu söz konusu ajanın farmakokinetik parametrelerini dolayısı ile anti tümöral aktivitesini etkileyen temel problemdir (Soetaert *et al.* 2020). Yaygın olarak kullanılan ve diğer antrasiklin grubu üyelerinden biri olan DR'ye kıyasla DOX'un kalp, karaciğer, ince bağırsak ve özellikle böbrekte birikim gösterdiği kanıtlanmıştır (Carvalho *et al.* 2009). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada birbirinden bağımsız DR ve DOX uygulamalarından 120 saat sonra böbrek hücrelerinin hiçbirinde DR'ye yönelik neredeyse hiç immünoreaktivite kalmazken DOX için distal tübül hücreleri başta olmak üzere birçok farklı renal hücre tipinde immünoreaktivitenin gücünü koruduğu gözlenmiştir (Shin *et al.* 2010). DOX'un sahip olduğu hidroksil grubunun bu birikim eğiliminin altında yatan ana unsur olduğu düşünülmektedir (Lee and Harris 2011). Fizyolojik fonksiyonları göz önünde bulundurulduğunda DOX'a en çok maruz kalan organlar şüphesiz karaciğer ve böbreklerdir. Bu nedenle DOX kaynaklı bilinen en yaygın yan etkiler hepato- ve özellikle nefrotoksisitedir (Park *et al.* 2012).

Doksorubisin'e bağlı nefrotoksisite

Böbrekler, vücuda alınan bütün ilaçların metabolizmasına benzer şekilde kemoterapi ilaçlarının da vücuttan atıldıkları organdır. Bu ilaçların oluşturdukları metabolitlerin böbrekleri daha duyarlı hale getirdiği bilinmektedir (Lichtman *et al.* 2007). Glomerül, tübül, damarlar semptomatik olmayan kreatinin yüksekliğinden, diyalizi gerektiren akut böbrek yetmezliğine kadar giden böbrek fonksiyon bozukluğuna yol açabilmektedir (Özkocaman, 2007). DOX'un böbreklerde meydana getirdiği toksisitenin glomerüler hücrelerde hasar oluşumuna yol açarak nefropati ve proteinüriye neden olduğu bilinmektedir (Lee and Harris 2011). DOX, glomerüler endotelial hücreler, glomerüler bazal membran ve epitel hücreler dahil olmak üzere glomerüler

filtrasyon bariyerinde değişikliklere neden olmaktadır. Ek olarak epitel hücre kalınlığında azalma ve glomerüler endotel hücre gözenek boyutunda artış olabilmektedir (Jeansson *et al.* 2009). DOX kaynaklı nefrotoksisitenin kesin mekanizması bilinmemekle birlikte, serbest radikal oluşumu, oksidatif hasar ve membran lipid peroksidasyonuna aracılık ettiğini düşünölmektedir (Su *et al.* 2015).

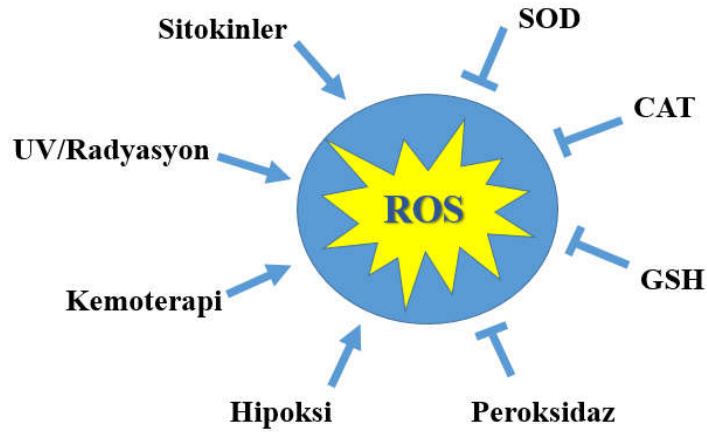
DOX'un neden olduğu renal doku hasarı mekanizmalarından birisi de glomerölüsün lipid peroksidasyonuna yol açan serbest radikal oluşumudur. DOX kaynaklı serbest radikal üretimi, hücresel oksidoredüktazların aracılık ettiği tek elektron indirgenmesiyle bağlantılıdır. Reaksiyon, NADPH-sitokrom P450 redüktaz gibi indirgenmiş bir flavoenzimin desteklediği DOX yarı kinon radikalinin oluşumunu tetikleyen DOX'tan bir elektron kaybı ile başlamaktadır (Pawłowska *et al.* 2003). Oluşan ROS'ların DNA, lipidler ve diğer hücre bileşenleri gibi çeşitli hücresel makromoleküllerle etkileşime girmesinin doza bağlı organ toksisitesinin ana mekanizması olduğu öne sürölmektedir (Lee and Lee 2007). Bu nedenle, DOX gibi kemoterapi ilaçları kullanılırken nefrotoksisite ile ilişkili risk faktörleri göz önünde bulundurulmalı, organ fonksiyonları takip edilerek kümülatif dozaj sınırlandırılmalıdır (Cai *et al.* 2019).

DOX'a bağlı toksisite mekanizmasında; serbest radikallerin oluşumu, antioksidan sistem enzimlerinde azalma ve lipid peroksidasyonunda artma gözlemlenmiştir (Singal *et al.* 1997; Wojtacki *et al.* 2000). Serbest radikallerin indüklediği MDA gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin de patogeneze katkısı olduğu gösterilmiştir (Singal *et al.* 1997; Zhou *et al.* 2006). Antrasiklinlerde bulunan kinon/hidrokinon grupları, peroksitleri ve serbest radikallerin aktivasyonuna yol açma potansiyeline sahiptir. DOX, doku ve hücrelerdeki toksisitesinde serbest radikallerin rolü, çok çeşitli bilimsel araştırmaların konusu olmuştur (Cummings *et al.* 1991; Zhang *et al.* 2012; Lin *et al.* 2016; Antonucci *et al.* 2021).

Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Paylaşılmamış bir ya da birden fazla elektronu olan atomik veya moleküler yapıda olup, bu elektron/elektronların üzerinde olduğu oksijen molekülleri “Serbest radikal” olarak tanımlanır (Burton and Jauniaux 2011). Farklı aktivitelere sahip reaktif oksijen türleri (ROS) hücresel fizyolojide ve organizma üzerinde çeşitli rollere sahip serbest radikallerdir (Wojtovich *et al.* 2012). Hücre içerisinde ROS'ların üretimini etkileyen çeşitli aktivatörler ve inhibitörler bulunur (**Şekil 9**). Süperoksit, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve ozon gibi sinyal moleküllerinin yanı sıra, nitrik oksit ve nitrojen oksit gibi serbest radikalleri de içerir (Nathan and Ding 2010). Üretilen bu serbest radikaller, dengede tutulduklarında, zararlarının yanında yararları da vardır (Valko *et al.* 2007). ROS'lar, vücutta sinyal iletimi ve fagositlerin

etkinliğinin sürekliliğinde önemli rol oynamaktadır (Dupré-Crochet *et al.* 2013; Schieber and Chandel 2014; Brown and Griendling 2015).



Şekil 9. ROS'ların üretiminin çeşitli aktivatörleri ve inhibitörler

ROS'ların temel kaynağı mitokondri olup mitokondriyal solunum esnasında indirgenen oksijenin varlığı sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşur (Turrens, 2003). Oluşan süperoksit radikali, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizörlüğü eşliğinde daha az reaktif olan hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülür. Hidrojen peroksit ise metal iyonlarının varlığında (Fenton/haber-wiess reaksiyonları aracılığı ile) ya da direkt olarak süperoksit radikali ile (Harber-Weiss reaksiyonu) tepkimeye girerek çok daha reaktif olan ve en çok bilinen hidroksil radikaline ($OH^{\cdot}$) dönüşümü gerçekleşir (Imai and Nakagawa 2003; Halliwell and Gutteridge 2015). Ayrıca, DOX'un kimyasal yapısı göz önüne alındığında, moleküler oksijenle (bir elektron alıcısı) reaksiyona girebilir ve hızlı bir şekilde temel bileşiğe geri dönebilen kararsız bir metabolit olan bir semikinona indirgenebilen kinon grupları içerir ve bu döngü mitokondri içerisinde süperoksit radikallerinin oluşumunu tetikleyerek toksisiteye sebep olur (Ichikawa *et al.* 2014; Raj *et al.* 2014; Salazar-Mendiguchía *et al.* 2014; Varricchi *et al.* 2018).

Herhangi bir sebepten kaynaklanan yüksek miktarda üretilen ROS, antioksidan savunma sistemlerindeki yetersizlikten dolayı var olan dengenin bozulması ile oluşan doku hasarı oksidatif stres olarak tanımlanır (Nathan and Ding 2010; Gur *et al.* 2021). Oksidatif strese giren hücrede radikallerin ana hedefleri olan şekerler, çoklu doymamış yağlar, proteinler ve nükleik asitlere hasar vererek dokularda işlev kaybına yol açarlar ve böylece birçok hastalığın patogenezi ortaya çıkmış olur (Suzuki *et al.* 1997; El-Shenawy, 2010; Gur *et al.* 2021).

Serbest radikallerin oluşumu ile oksidatif strese giren hücrede bir takım hasarın yanında enflamasyon göze çarpmaktadır. Oksidatif stres ve enflamatuvar cevabın arasındaki ilişkiye dair kanıtlar giderek artmaktadır (Ganong, 2002; Küçükler ve ark. 2021). Hasarlı dokuda lökositlerin (nötrofiller ve monositler) birikimi görülmesinin (Ganong, 2002) yanı sıra

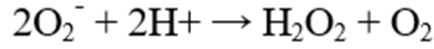
transkripsiyon faktörlerinden olan nükleer faktör kappa B (NF-kB) hücre döngüsü kontrolü, hücre göçü, apoptoz ve enflamasyon da dahil olmak üzere bir dizi fizyolojik süreci düzenler (Caglayan ve ark. 2019; Özdemir ve ark. 2020; Küçükler ve ark. 2020). NF-kB kaskadı çeşitli inflamatuvar durumlarında görülmesiyle oksidatif stresin ve sitokinlerin bu kaskadı anormal şekilde aktive ettiği bilinmektedir (Kandemir ve ark. 2020; Temel *et al.* 2020). Ayrıca, İnterlökin 1 beta (IL-1 β) gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarını tetikleyerek enflamatuvar sürecini başlattığı için NF-kB'nin aktivasyonunun düzgün bir şekilde inhibe edilmesi gerekmektedir (Caglayan ve ark. 2019). Yapılan birçok araştırmada, çok çeşitli toksik ajanların NF-kB aktivasyonuna yol açarak pro-enflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β) seviyelerinde artışa neden olduğu ve böylece enflamatuvar sürecini aktive ederek doku hasarına yol açtığı sonucuna varılmıştır (Benzer ve ark. 2018; Celik ve ark. 2020).

Sonuç olarak, serbest radikaller son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron bulundurdıkları için kolay bir şekilde diğer moleküllerle reaksiyona girer ve organizmalarda yüksek hasar oluşturan toksik bileşikler olup bu toksik bileşikler farklı mekanizmalarla ortadan kaldırılmaya çalışılır. Bu farklı mekanizmalar; koruma ve tamir etme özellikleri olan antioksidan savunma sistemleridir (Valko *et al.* 2007).

Hücrel Antioksidan Sistem

Antioksidanlar, hücre içerisinde kendiliğinden var olan, bulunması gereken düşük miktarlardaki ROS ve reaktif metabolitlerin zararlı etkilerini en aza indiren ajanlar olarak bilinir. Çeşitli sebepler (radyasyon, kemoterapötikler vb.) ile var olan dengenin bozulması ile artan oksidanlara bağlı olarak oluşan oksidatif stresin giderilmesi için çeşitli antioksidanlar kullanılmaktadır (Ďuračková ve Gvozdjáková 2008). Enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Enzimatik olmayan savunma sisteminde; Glutasyon (GSH), Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), vitaminler (E ve C), albumin ve selenyum gibi enzimatik olmayan kimyasal bileşiklere sahiptir (Rahal *et al.* 2014). Enzimatik savunma sisteminde ise süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon S-transferaz, glutasyon peroksidaz gibi savunma sistemleri bulunur (Nathan and Cunningham-Bussel 2013).

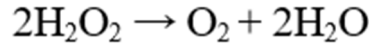
Süperoksit dismutaz enzimi(SOD), ökaryotik organizmalarda hücre solunumu sırasında üretilen bu radikalin süperoksiti detoksifiye eden tek enzim olarak karşımıza çıkmaktadır (**Şekil 10**) (Van Raamsdonk and Hekimi 2012). Ayrıca bu enzim hücre içinde çok etkin bir enzimatik antioksidandır. Süperoksit radikallerinin daha az toksik etkili hidrojen peroksite dönüşmesini sağlayarak bu radikallerin etkisini azaltmayı hedeflemektedir (Mates, 2000). Bu olay sırasında, SOD enziminin aktif bölgesi için gerekli olan Zn, önemli bir elementtir.



Şekil 10. Süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Cunha-Oliveira *et al.* 2013)

Fizyolojik işlevi, oksijeni katabolize eden hücrelerde bu enzim, süperoksit serbest radikalının zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece, lipid peroksidasyonunun baskılanması sağlanır (Farahmand *et al.* 2013).

Peroksizom enzimlerinden biri olan katalaz, yapısında dört adet hem grubu bulunur. Kan, karaciğer, mukoz membran, kemik iliği ve böbrekte yüksek miktarda bulunan bir hemoproteindir. Katalaz enzimi oksidazların neden olduğu ve hücreler için toksik olan hidrojen peroksitin suya dönüşümü katalaz enzimi ile gerçekleştirilir (**Şekil 11**) (Nordberg and Arner 2001; Kirkman and Gaetani 2007).



Şekil 11. Süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Cunha-Oliveira *et al.* 2013)

Oksidatif strese karşı savunma sisteminde önemli rol oynayan bir enzim olan Glutasyon peroksidaz enzimi (GPx), aerobik solunum gerçekleştiren organizmalarda hidroperoksitlerin indirgenme reaksiyonunu katalizlemektedir (**Şekil 12**). GPx'in kırmızı kan hücrelerinin sitoplazmasında yüksek miktarda eksprese olduğu ve bu hücreleri oksidasyona bağlı oluşan hemolize karşı koruduğu belirtilmiştir (Imai and Nakagawa 2003; Drevet, 2006).



Şekil 12. Glutasyon peroksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Cunha-Oliveira *et al.* 2013)

Glutasyonun (GSH), eksojen ve endojen toksin özellikteki maddelerin hücreler üzerindeki etkisini önleyen hücre içinde görev yapan bir polipeptittir (Borba, 2016). Glutasyon S-Transferaz (GST)'lar, potansiyel olarak tehlikesi olan bileşiklere nükleofilik saldırı düzenleyip katalize eden enzimlerdir. GST gibi bazı enzimlerin eksikliğinde organizmanın karsinojenlere toleransı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. (Zheng *et al.* 2002). İnsanlarda bulunan mitokondriyal GST, peroksizomlarda da bulunan GST-kappa olduğu bilinmektedir. GST'ler biyolojik ortamda homo ya da heterodimerler olarak bulunur ve aktiviteleri farklı olan iki bölgeye sahiptir. GST enzimleri, hücre zarlarında bulunan lipid

peroksidasyonunu ve ROS'lerden meydana gelen bileşikler hedeflediği bulunmuştur (Sheehan *et al.* 2001; Huber *et al.* 2008).

Birçok araştırmada, ROS miktarındaki artış ve antioksidan enzim sistemlerindeki dengesizliğin oksidatif stres ile sonuçlandığı ek olarak antioksidan özellikte olan ve diyet olarak alınabilen flavonoidler olarak bilinen çok çeşitli meyve, sebze ve bitkisel ürünlerin ROS'un meydana getirdiği olumsuz etkileri en aza indirdiği bulunmuştur (Agati *et al.* 2012; Kandemir ve ark. 2020; Aksu ve ark. 2021). Bütün bu yaklaşımlar dikkate alındığında, kemoterapi gibi yan etkileri oldukça göz önünde olan tedaviler sırasında flavonoidler gibi antioksidan özellikte olan maddelerin tedavi sırasında protektif özellik gösterebileceği için kombine tedavi stratejilerinin uygulanabileceği düşünülmektedir.

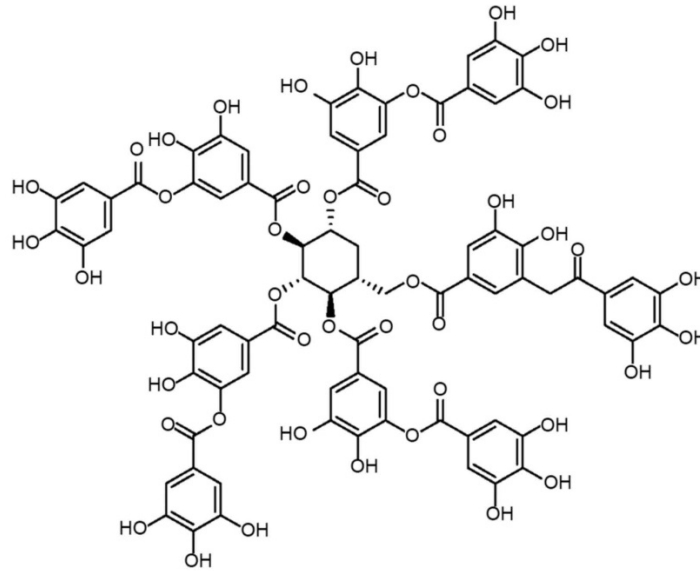
Doğal Bileşiklerin Terapötik Etkileri

Epidemiyolojik, deneysel ve metabolik çalışmalar, beslenmenin; çeşitli patolojilerin başlaması, gelişmesi ve ilerlemesi aşamalarında önemli bir etken olarak rol oynadığını göstermektedir. Diyetin sadece temel vitamin ve mineralleri sağlamakla kalmayıp aynı zamanda farklı patoloji formlarına karşı koruma sağlayabilen önemli kemopreventif ajanları içerebildiği de yine yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (Surh, 2003). Kemopreventif özellikleri çoğunlukla ROS'u temizleme şeklinde bir mekanizma ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, bitki kaynaklı fenoliklerin antioksidan, pro-oksidan etkisi, apoptotik DNA parçalanmasına aracılık edebileceğinden, antikanser ve apoptozu indüklemeye özellikleri önemli bir mekanizma olabilir (Galati and O'brien 2009). Bu doğrultuda kapsamlı olarak incelenen kemopreventif ajanlar arasında bitkisel polifenoller de bulunmaktadır (Amararathna *et al.* 2016). Flavonoidler, polifenol bileşiklerin içinde yer almakta olup, farklı kanser dokuları üzerinde güçlü antikanser etkileri olan polifenolik bileşikler ailesinin bir üyesidir (Wilmsen *et al.* 2005). Hesperidin, kumarik asit, gallik asit, metil gallat, etil gallat, propil gallat, kurkumin ve tannik asit flavonoidlerden olup bu bileşikler birçok bitkisel gıda ve ilaçta bulunmaktadır (Garg *et al.* 2001; Kamaraj *et al.* 2009; Galati and O'brien 2009; Lip *et al.* 2013; Kamaraj *et al.* 2011; Maruf *et al.* 2015). Doğal olan bu bileşikler geleneksel olarak kanserlerin tedavisi için kullanılmaktadır (Hsiao and Liu 2010). Son yapılan araştırmalarda da, antioksidanların kanser üzerindeki faydalı etkileri bildirilmiştir (Noda and Wakasugi 2001; Sosa *et al.* 2013). Doğal bileşiklerin kanser önleyici ya da koruyucu aktiviteleri, detoksifiye edici ve antioksidan enzim sistemlerini destekleyerek spesifik olarak transkripsiyon faktörlerini hedefine alması ile beraberinde; anti-inflamatuar, antitümör anti-metastaz etkileri ortaya çıkarılmıştır (Aravindaram and Yang 2010). Günümüzde sentetik olan antioksidanlara kıyasla etkinlikleri

yüksek ve yan etkileri düşük olmaları nedeniyle doğal antioksidanlar daha fazla ilgi görmüştür (Jeong *et al.* 2014).

Tannik asit ve özellikleri

Flavonoidler; meyve, sebze, kuruyemiş, çay vb. bitki türevli bileşenlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yeşil çayda bulunan tannik asit (TA), suda çözünabilir bir tür polifenol olan spesifik tanen formudur (Kris-Etherton *et al.* 2002; Salminen and Karonen 2011) (**Şekil 13**) ve bitkilerin farklı dokularında fizyolojik gelişiminde rol oynadığı tespit edilmiştir (Top *et al.* 2017). Bu bileşikler insanlar tarafından tüketilen birçok gıdada ve hayvanlar tarafından tüketilen yemlerin besleyici değeri üzerinde büyük bir öneme sahiptir. Günlük diyetle tüketimi mümkün olabilen tanenlerin birçok diyetle polifenollerin önemli bir kısmını oluşturdıkları ileri sürülmektedir (Serrano *et al.* 2009). Bu bileşiklerin antioksidan enzim (glutasyon peroksidaz, katalaz ve kinon redüktaz), faz II enzim (glutasyon-S-transferaz) aktivitelerinin artırılmasında ve lipid peroksidasyon inhibisyonunda rol aldığını savunan teoriler ortaya atılmıştır (Katiyar and Mukhtar 1997; Bagchi *et al.* 2002). Bu özellikler bitkisel polifenollerin kemopreventif ajan potansiyellerinin bulunduğunu ortaya koymaktadır. Artan kanıtlar, doğal polifenollerin tüketiminin birçok hastalığın önlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Lee and Lee 2007; Leong *et al.* 2008; Kumar *et al.* 2012). Ancak bu bileşiklerin kemopreventif etkilerinin mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır.



Şekil 13. Tannik asitin moleküler yapısı (Xue *et al.* 2020).

TA ile yapılan araştırmalarda TA'nın birçok özelliği ortaya konulmuştur. Anti-oksidatif, anti-mutajenik, anti-kanserojen, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır (Cowan, 1999; Khan *et al.* 2000; Erdelyi *et al.* 2005; Rehman *et al.* 2012). Ayrıca yapılan son çalışmalarda TA'nın miyokardiyal hasar üzerindeki kalp

dokusunu koruyucu etkileri (Hu *et al.* 2005) ve karaciğer fibrozu üzerinde iyileştirici etkileri (Chu *et al.* 2016) gibi daha birçok aktiviteye sahip olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca albümin, kolajen, jelatin gibi makro moleküller ile etkileşime geçme yeteneğine sahip olup çeşitli hayvan hücreleriyle yapılan deneylerde kanser önleyici olarak kullanıldığı görülmüştür (Nepka *et al.* 1999; Sahiner *et al.* 2017). Bu nedenle, TA'nın DOX kaynaklı nefrotoksisiteyi etkili bir şekilde önleyebileceğini düşünülmektedir.



MATERYAL VE METOT

Kullanılan Cihazlar

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

Tablo 1. Tez Kapsamında 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 Terazî	Denver Instrument
Homojenizatör	Benchmark Scientific
Isıttıcı 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 Hiirayama
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 maddeler **Tablo 2**'de verilmiştir.

Tablo 2. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kimyasal	Marka
Agaroz	Sigma
Etanol	Sigma
Etidyum bromür	Sigma
Hidrojen peroksit	Sigma
Hidroklorik asit	E.Merck AG
İndirgenmiş Glutasyon	Sigma
Kalsiyum karbonat	Sigma
Ksantin	Sigma
Ksantin oksidaz	Sigma
Potasyum fosfat	E.Merck AG
Lysis Reagent	EcoPURE
RNas OUT	Thermo Scientefic
Reverse Transcriptase Buffer	Bio-Rad
Sığır serum albumin	Sigma
Sodyum hidroksit	Riedel de Haen
EDTA	Sigma
5x iScript reaksiyon karışımı	Bio-Rad
iScript ters transkriptaz	Bio-Rad
Nükleaz-free su	Aosheng 40
DTT	Sigma
Wash Buffer 1	EcoTech
Wash Buffer 2	EcoTech
Elüsyon Buffer	EcoTech
50x TAE	Thermo Scientefic
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientefic
DNA Ladder	Thermo Scientefic
Syber Green	Bio-Rad
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
CDNB	Sigma

Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Tez kapsamında kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

- ✓ 0,3 mmol/L Ksantin: 9,31 mg ksantin tartılarak üzerine 200 mL saf suda eklendi. Daha sonra üzerine iki damla kadar 0,1 N NaOH'den damlatıldı ve çözünmesi sağlandı.
- ✓ 150 µmol/L Nitroblue tetrazolium (NBT) çözeltisi: 12,30 mg NBT tartılarak bir kabın içerisine alındı ve toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf su eklendi ve çözülmesi sağlandı.
- ✓ 400 mmol/L Sodyum karbonat çözeltisi: 4,00 g Na₂CO₃ tartılarak bir kabın içerisine alındı ve toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf su eklendi ve çözülmesi sağlandı.
- ✓ 1g/L Sığır serum albümin (BSA): 25 mg BSA tartılarak bir kabın içerisine alındı ve toplam hacim 25 mL olacak şekilde saf su eklendi ve çözülmesi sağlandı.
- ✓ 0,167 U/mL ksantin oksidaz: +4°C den alınan stok ksantin oksidaz çözeltisi içerisine 2 M (NH₄)₂SO₄ çözeltisi eklendi ve seyreltildi.
- ✓ 2M Amonyum sülfat çözeltisi: 2,64 g (NH₄)₂SO₄ tartılarak bir kabın içerisine alındı ve toplam hacim 10 mL olacak şekilde saf su eklendi ve çözülmesi sağlandı.
- ✓ 0,8 mM Bakır klorür (CuCl₂.2H₂O) çözeltisi: 13,64 mg CuCl₂.2H₂O tartılarak bir kabın içerisine alındı ve toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf su eklendi ve çözülmesi sağlandı.
- ✓ 50 mM Potasyum fosfat (pH: 7,4): 6,81 g KH₂PO₄ tartılarak bir kabın içerisine alındı ve üzerine bir miktar su eklenerek çözünmesi sağlandı. 1N NaOH ile pH'sı 7,4'e ayarlandı ve toplam hacim 1L olacak şekilde saf su eklendi ve çözülmesi sağlandı.
- ✓ 30 mM Hidrojen peroksit: %30'luk H₂O₂ den 0,34 mL alınarak fosfat tamponu ile 100 mL olacak şekilde saf su eklendi.
- ✓ 100 mM Potasyum fosfat tamponu (pH: 7,5): 13,62 g KH₂PO₄ tartılarak bir kabın içerisine alındı ve suda çözündükten sonra 1N NaOH ile pH'sı 7,5'e ayarlandı ve toplam hacim 1 L olacak şekilde saf su eklendi.
- ✓ 50 mM Tris-HCl (pH: 8,0): 0,60 g tris tartılarak bir kabın içerisine alındı ve yaklaşık olarak 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacmi 100 mL olacak şekilde saf su eklendi.
- ✓ 2 mM NADP⁺ : 7,63 mg NADP⁺ tartılarak bir kabın içerisine alındı ve bir miktar saf su içerisinde çözüldü. Toplam hacmi 5 mL olacak şekilde saf su eklenerek tamamlandı.

- ✓ 2 mM NADPH: 8,33 mg NADPH tartılarak bir kabın içerisine alındı ve bir miktar saf suda çözüldü. Toplam hacim 5 mL olacak şekilde saf su eklenerek tamamlandı.
- ✓ 100 mM Potasyum fosfat tamponu (pH: 6,5): 1,36 g KH_2PO_4 tartılarak bir kabın içerisine alındı ve yaklaşık 80 mL saf su içerisinde çözüldü. pH'sı 6,5 olarak ayarlandı ve toplam hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- ✓ 20 mM İndirgenmiş glutatyon (GSH): 30,73 mg GSH tartılarak bir kabın içerisine alındı ve bir miktar saf suda çözüldü ve toplam hacmi 5 mL olacak şekilde saf su eklenerek tamamlandı.
- ✓ 25 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB): 50,65 mg CDNB tartılarak bir kabın içerisine alındı ve yaklaşık 8 mL etil alkolde çözüldü. Toplam hacmi 10 mL olacak şekilde alkol eklenerek tamamlandı.
- ✓ 1 M Tris-HCl (pH: 8,0): 12,11 g tris tartılarak bir kabın içerisine alındı ve yaklaşık 80 mL saf suda çözüldü. HCl ile pH'sı 8,0'e ayarlandı ve toplam hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- ✓ 7 mM t-bütil Hidroperoksit: 5M'lık Stok t-bütil hidroperoksit çözeltisi içerisinde 0,14 mL alınıp toplam hacmi 100 mL olacak şekilde saf su eklenerek tamamlandı.
- ✓ 1X TAE solüsyonu: 245 mL saf su ölçülerek içerisine 5 mL 50X TAE eklendi.
- ✓ Coomassie Brilliant Blue çözeltisi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi tartılarak bir kabın içerisine alındı ve 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Çözelti içerisine %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi ve çözeltinin toplam hacmi 1 L olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Hazırlanmış olduğumuz çözelti karanlık ortamda muhafaza edilmesi için folyo ile sarıldı ve 4°C ye kaldırıldı.

Hayvan Bakımı ve Deneysel Çalışma Planı

Çalışmada kullanılan canlıların (*Rattus norvegicus*, n=20, 180±20 g, erkek) (Şekil 14) bakımı ve deneysel uygulamaları Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK)'ndan alınan Etik Kurul Onay Belgesi'ne (2021-3/65) uygun olarak Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM)'nde gerçekleştirildi.

Sıçanlar standart ortam koşullarında (nem; %40- 60, ışık; 12h/12h, ısı; 20-22°C) muhafaza edildi. Çalışmada kullanılan canlılara uygulanacak kümülatif DOX dozu literatürde belirtilen çalışmalardan referans alınarak belirlendi. (Desai *et al.* 2013; Ali ve ark. 2020; To *et al.* 2003; Indu *et al.* 2014)

Grup	Günler													
Kontrol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	↓			↓			↓			↓			↓	
DOX	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
TA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
DOX+TA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

DOX(5mg/kg): ↓ TA(50mg/kg): ↓ DOX+TA(5mg/kg DOX+50mg/kg TA): ↓

Şekil 14. DOX ve TA uygulama protokolü (DOX veya TA belirteci olmayan günlerde canlılara sadece su ve yem verildi)

- ✓ Kontrol (n=5); canlılar deney süresince normal düzeninde beslendi ve bu süre zarfında her gün serum fizyolojik enjekte (i.p) edildi.
- ✓ Enjeksiyondan kaynaklanan stres faktörünü bütün gruplarda eşitlenmek amacıyla DOX grubuna DOX uygulanmayan günlerde serum fizyolojik enjekte (i.p) edildi.
- ✓ Tüm uygulamalardan 24 saat sonra servikal dislokasyon yöntemi ile kesim yapıldı ve sıçanlardan alınan böbrek dokuları hızlı bir şekilde alındıktan sonra deneysel aşamalara kadar soğutucuda muhafaza edildi.

Biyokimyasal Analizler

Doku homojenizasyonu

Biyokimyasal analiz işlemlerinin ilk basamağı olan dokuların parçalanması için 50mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA- Na_2 ve 1mM DTT ile hazırlanan (pH=7,4) homojenat tamponu ile dokular homojenizatör yardımıyla parçalandı. Homojenizatörden alınan dokular 10.000 rpm, +4°C, 30 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısım steril tüplere aktarıldı. Ardından süpernatantlar enzim aktivite ölçümü için kullanıldı.

Bradford yöntemiyle protein tayini

Comassie Brilliant Blue G-250 boyasının protein ile oluşturduğu kompleksin 595 nm dalga boyundaki absorbansının ölçülmesi esasına dayanan Bradford (1976) metodu, hazırlanan

homojenatın protein miktarını belirlemek için kullanıldı. Sığır serum albümin ile yapılan standart çözeltiler farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. Standart çözeltilerin optik dansiteleri 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve ardından ölçülen değerler ile standart eğri grafiği ve denklemi oluşturuldu. Homojenatlardaki protein miktarı her numune için 3 kez tekrar olacak şekilde **Tablo 3**'teki küvet içeriği ile belirlendi.

Tablo 3. Protein Tayini İçin Miktarlar

Bileşenler	Kör (µl)	Numune (µl)
Coommassie Brilliant Blue G-250	4900	4900
Saf su	100	-
Homojenat	-	100

GPx enzim aktivite ölçümü

GPx aktivite ölçümünde **Tablo 4**'de belirtilen miktarlar ve çözeltiler kullanıldı (Habig *et al.* 1974). Kuvarz küvete tert-bütıl hidroperoksit solüsyonuna kadar çözelti eklenip 340 nm'de 5-10 dk absorbans ölçülüp değişimin sabitlenmesinin ardından hemen Tert-bütıl hidroperoksit ilave edildi. Bunu takiben 3 dk süreyle 340 nm'de ölçüm yapılarak enzim aktiviteleri (EU/mL) hesaplandı.

Tablo 4. GPx Enzim Aktivitesi Ölçümü Kullanılacak Çözeltiler ve Miktarları

Bileşenler	Kör (µl)	Numune (µl)
Potasyum fosfat tamponu (1M)	100	100
dH ₂ O	590	580
GSH	100	100
Glutasyon redüktaz	100	100
NADPH	100	100
Homojenat	10	10
Tert-bütıl hidroperoksit	-	10
Toplam	1000	1000

GST enzim aktivite ölçümü

Glutasyon-S-transferaz enzim aktivitesi oda sıcaklığında Habig *et al.* (1974) metoduna göre belirlendi. GST aktivite ölçümü **Tablo 5**'te belirtilen miktarda çözelti kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklere 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

t : Zaman

S_F : Seyreltme faktörü

Tablo 5. GST Enzim Aktivitesi Ölçümü İçin Küvet İçeriği

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

SOD enzimi aktivite ölçümü

SOD enzim aktivite ölçümü, Sun ve ark. (1988) yöntemi modifiye edilerek ölçüldü. Doku örnekleri %0,9'luk izotonik çözelti ile 3 defa yıkandıktan sonra fosfat tamponuna alındı. 1:5 tampon-doku karışımı homojenizatör yardımıyla 30 Hz' 3+3 dk süreyle parçalandı. 10000 g'de 4°C'de 30 dk santrifüj edildikten sonra sıvı kısmın absorbansları 560 nm'de 3 dk süreyle ölçüldü (Beckman Coulter DU-730). Ölçümler için **Tablo 6**'da verilen protokol takip edildi. Absorbans değerleri kullanılarak enzim aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

Tablo 6. SOD Aktivite Deney Ptotokolü

Bileşenler	Kör (µl)	Numune (µl)
Reaktif Karışımı	200	200
Numune	730	729
Distile su	-	1
Ksantin Oksidaz	20	20
20 °C’de 25 dk inkübasyon		
CuCl ₂ .2H ₂ O	50	50
560 nm’de absorbens ölçümü		

CAT enzimi aktivite ölçümü

CAT enzim aktivitesi, Aebi (1984) yöntemi ile ölçüldü. CAT aktivite ölçümünde SOD enziminde kullanılan homojenat hazırlama prosedürü kullanıldı (**Tablo 7**). Homojenatlara ait absorbens ölçümleri 240 nm’de 3 ml’lik kuvarz küvetler kullanılarak 15’er sn aralıklarla 1 dk boyunca yapıldı (Beckman Coulter DU-730).

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

A = 240 nm’deki absorbens değeri

Vt = Toplam reaksiyon hacmi (mL)

Vö = Örnek hacmi (mL)

ε = H₂O₂’nin molar ekstinksiyon katsayısı (0.0396 cm²/µmol)

t = Reaksiyon zamanı (dakika)

Tablo 7. CAT Aktivite Deney Ptotokolü

Bileşenler	Kör (µl)	Numune (µl)
Fosfat tamponu	1500	1490
Hidrojen peroksit	1500	1500
Numune	-	10

MDA ölçümü

MDA ölçümü için Placer *et al.* (1966) tarafından modifiye edilen yöntem kullanıldı.

Tablo 8’deki içeriği oluşturulduktan sonra küvet içeriği 100°C’de 20 dk inkübe edilip

soğutulmasını takiben 3.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilecek ve elde edilen üst faz absorbansları 532 nm’de ölçüldü. Sonuçlar standarda ait veriler kullanılarak hesaplandı.

Tablo 8. MDA Ölçümünde Kullanılacak Çözeltiler ve Miktarları

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

GSH ölçümü

Fare böbrek dokusunda indirgenmiş GSH miktarı modifiye Ellman (1959) metodu ile belirlendi. **Tablo 9**’de belirtilen miktarlar hazırlandıktan sonra yaklaşık olarak 5 dakika inkübasyona bırakıldı ve ardından 412 nm dalga boyundaki absorbansının ölçülmesi esasına dayanan bu yöntem her numune için 3 kez tekrarlandı. Sonuçlar standarda ait veriler kullanılarak hesaplandı.

Tablo 9. GSH Ölçümü Küveti İçeriği

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

Moleküler Analizler

Primer dizaynı

Gen ekspresyon ölçümü yapılacak hedef genlere ait özgün primer dizileri gen sekansları <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> veri tabanından elde edildikten sonra <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> online yazılımı kullanılarak tasarlandı. Dizayn edilen primerlerin hedef özgünlükleri ise NCBI içerisindeki <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> modülü kullanılarak doğrulandı. Tasarlanan primerler **Tablo 10**’da verilmiştir.

Tablo 10. qPCR’da Kullanılmak Üzere Dizayn Edilmiş Primer Setlerine Ait Bilgiler

No	Gen Sembolü	Erişim Numarası	Dizi	Tm (°C)
1.	<i>Kim-1_F</i>	AF035963.1	5’-TGTATTGTTGCCGAGTGGAG-3’	59.72
2.	<i>Kim-1_R</i>		5’-TGTGGGTCTTGTGAGGA-3’	60.07
3.	<i>Cox-2_F</i>	L25925.1	5’-TTCGGGAGCACAACAGAGTG-3’	59.97
4.	<i>Cox-2_R</i>		5’-TGGAACAGTCGCTCGTCATC-3’	60.11
5.	<i>Lcn2_F</i>	NM_130741.1	5’-TGTTCCCACCGACCAATG-3’	59.31
6.	<i>Lcn2_R</i>		5’-GAAAGATGGAGCGGCAGA-3’	60.03
7.	<i>Cat_F</i>	NM_012520.2	5’-ACATGGTCTGGGACTTCTGG-3’	59.96
8.	<i>Cat_R</i>		5’-CCATTCGCATTAACCAGCTT-3’	60.10
9.	<i>Sod_F</i>	NM_017050.1	5’-GGTCCACGAGAAACAAGATGA-3’	60.10
10.	<i>Sod_R</i>		5’-CAATCACACCACAAGCCAAG-3’	60.15
11.	<i>GPx_F</i>	NM_030826.4	5’-TCGGACATCAGGAGAATGG-3’	59.57
12.	<i>GPx_R</i>		5’-AGGTAAAGAGCGGGTGAGC-3’	59.44
13.	<i>Gst_F</i>	NM_001010921.1	5’-TTCTGACCCCTTCCCTCTG-3’	59.67
14.	<i>Gst_R</i>		5’-TGGCTGGCTTTCTCTGACTG-3’	59.97
15.	<i>Foxo3_F</i>	NM_001106395.1	5’-ACTGAGGAAAGGGGAAATGG-3’	60.39
16.	<i>Foxo3_R</i>		5’-TGCTGGGTTAGGAAGATGGC-3’	59.69
17.	<i>Casp9_F</i>	NM_031632.1	5’-TGTGGTGGTGAGCAGAAAGA-3’	60.36
18.	<i>Casp9_R</i>		5’-TCCTGGTATGGGACAGCATC-3’	59.95
19.	<i>Casp3_F</i>	NM_012922.2	5’-AGGAGCAGTTTTGTGTGTGTG-3’	59.79
20.	<i>Casp3_R</i>		5’-AGTTTCGGCTTCCAGTCAG-3’	59.47
21.	<i>Top2b_F</i>	NM_001100858.1	5’-ACCATCATTTGGTCTGAAGC-3’	59.65
22.	<i>Top2b_R</i>		5’-AGCGACTGTTTGACTTGGAAC-3’	59.39
23.	<i>Actb_F</i>	NM_031144.3	5’-TGTGGATTGGTGGCTCTATC-3’	59.78
24.	<i>Actb_R</i>		5’-AGAAAGGGTGTAACGCAG-3’	60.33
25.	<i>Il-6_F</i>	NM_012675.3	5’-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3’	59.84
26.	<i>Il-6_R</i>		5’-TACTGGTCTGTTGTGGGTGG-3’	60.33
27.	<i>Tnfa_F</i>	NM_012675.3	5’-AGGAGGGAGAACAGCAACTC-3’	59.45
28.	<i>Tnfa_R</i>		5’-TGTATGAGAGGGACGGAACC-3’	59.93

Böbrek dokusundan total RNA izolasyonu

Canlılardan alınan böbrek doku örneklerinden total RNA izole etmek için ticari kit (EcoPURE Total RNA Kit, EcoTech) kullanıldı. İzole edilen genetik materyale ait konsantrasyon ve saflık derecesi Nanodrop cihazı ile ölçüldü. Protokol doğrultusunda aşağıdaki adımlar izlendi:

- ✓ 30 mg donmuş böbrek dokusundan tartılarak ependorf tüpüne alındı.
- ✓ Ependorf tüpüne 400 µl Lizis Buffer ve 5 adet bits eklendi.
- ✓ Homojenizatör cihazında parçalama yapıldı.
- ✓ Ardından hücre kalıntısını peletlemek için oda sıcaklığında, maksimum hızda 2 dakika santrifüj yapıldı.
- ✓ Süpernatanta eşit miktarda etanol eklendi ve 10 saniye vorteks yapıldı.
- ✓ Toplama tüpüne filtreli kolon yerleştirildi ve etanol + süpernatant karışımı kolona eklendi.
- ✓ Oda sıcaklığında, maksimum hızda, 30 saniye santrifüj yapıldı.
- ✓ Altta kalan süzüntü atılır ve kolon tekrar temiz bir tüpe yerleştirildi.
- ✓ Sonrasında kolona 400 µl Wash Buffer 1 eklendi ve 30 saniye santrifüj yapıldı.
- ✓ Tekrardan altta kalan süzüntü atıldı ve kolon tüpe yerleştirilip üzerine 500 µl Wash Buffer 2 eklendi ve 30 saniye santrifüj yapıldı.
- ✓ Ardından kolon steril santrifüj tüpüne yerleştirildi ve kolonun tam ortasına 40 µl Elüsyon Tamponu eklenip oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.
- ✓ Son olarak maksimum hızda 30 saniye santrifüj yapıldı ve altta kalan süzüntü olan RNA -80 °C de saklandı.

İzole Edilen RNA'ların Kalitatif ve Kantitatif Analizi

Saflaştırılmış nükleik asit ve proteinlerin molekül ağırlığı, miktarı ve alt tiplerinin belirlenmesinde kullanılan jel elektroforezi yaygın olarak kullanılan moleküler bir yöntem olup agaroz ve poliakrilamid jellerin kullanıldığı, moleküllerin elektriksel bir alanda elektrik yüklerine göre göç etmeleri prensibine dayanır. Göç hızı; molekülün yapısına ve büyüklüğüne, ortamın yoğunluğuna, uygulanan akıma ve iyonik kuvvete bağlı olarak değişiklik göstermektedir. (Kocpınar 2015).

1.88 ml 20 x MOPS solüsyonu içerisine 0.3 gr Agaroz ve 28.5 ml ddH₂O eklendi. Kaynamaya bırakılan çözelti 37 °C'ye kadar soğutuldu. 6.68 µl formamid ve hemen ardından 5.5 µl Etidium bromür eklendi. Hazırlanan jelin katılaşması için bırakılır. 1 µl RNA ve 3.5 µl ddH₂O karıştırılıp üzerine 0.5 µl 20 x MOPS solüsyonu eklendi. Ardından 5 µl formamid

eklenerek 65 °C’de 15 dk inkübasyona bırakıldı. Son olarak sırasıyla örnekler jel üzerinde bulunan kuyulara yüklendi. Agaroz jel içerisinde bulunan kuyulara 5-7’şer µl olacak şekilde yüklenen RNA örnekleri 80V 30 dk boyunca yürütüldü. Yürütme işleminin ardından görüntüleme cihazı ile jelin görüntüsü alındı.

Biyolojik kaynaklardan saflaştırılan nükleik asitlerin kantitatif tayininde absorpsiyon temeline dayanan spektrofotometrik yöntemler, nükleik asitlerdeki kontaminasyonu saptamak için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapılır. NanoDrop spektrofotometrede ölçüm sırasında 2 µL RNAase free water kör olarak kullanıldı. İzole edilen RNA’lardan 2 µL alınarak kullanıldı ve absorbanları köre karşı belirlendi. RNA konsantrasyonu $A_{260/280}$ nm oranına göre hesaplandı ve sonuçlar ng/µL olarak ifade belirtildi. Elde edilen RNA örneklerinin spektroskopik ölçümü Nanodrop cihazı ile ölçülerek saflığı ve konsantrasyonu belirlendi.

Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Bir genin ekspresyon seviyesini tespit edebilmek için mRNA seviyesinin kantitatif olarak belirlenmesi gerekir. mRNA yapısı nedeni ile laboratuvar şartlarında kolaylıkla parçalanmasından dolayı gen ekspresyonu analiz yöntemlerinde öncelikle mRNA’nın komplementeri olan cDNA, PCR kullanılarak sentezlenmesi gerekir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında; izolasyonu yapılan mRNA’lar uygun sıcaklıkta muhafaza edilmesinin ardından cDNA sentez işlemi için ticari bir kit olan iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad) kullanıldı. cDNA sentezi için PCR tüplerinde hazırlanan bileşenler **Tablo 11** ve reaksiyon protokolü **Tablo 12**’de gösterildi.

Tablo 11. cDNA Sentez Reaksiyon Bileşenleri

BİLEŞENLER	µl
5x iScript Reaksiyon Karışımı	4
iScript Ters Transkriptaz	1
Nuclease-free Su	Değişken
Kalıp RNA	Değişken
Toplam Hacim	20

Tablo 12. cDNA Sentez Reaksiyon Protokolü

Reaksiyon Protokolü	dk	°C
Bağlanma	5	25
Ters Transkriptaz	20	46
RT inaktivasyonu	1	95
Opsiyonel Basamak	∞	+4

cDNA sentezi için aşağıdaki protokol uygulandı.

- ✓ İlk olarak RNA örnekleri buz üzerine yerleştirildi ve daha sonra 5x iScript Reaksiyon Karışımı, iScript Ters Transkriptaz ve Nuclease-free su kullanılmadan önce vorteks kullanılarak karıştırıldı.
- ✓ Steril PCR tüplerine sırasıyla uygun miktarlarda karışım hazırlandı ve üzerlerine uygun miktarda izole edilen RNA'lar eklendi.
- ✓ Yukarıdaki tablo'da verilen cDNA sentez kitinin protokol basamakları cihazda ayarlandı ve tüpler cihaza yerleştirilip reaksiyon başlatıldı.
- ✓ Reaksiyon sonlandırılıp tüpler cihazdan alındı ve sentezlenen cDNA'lar Real time PCR işlemlerinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Kantitatif Real Time PCR (qPCR) aşaması

Kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi dorultusunda Real-Time PCR analizi yapıldı. Real-Time PCR reaksiyon karışımı (**Tablo 13**) ve reaksiyon şartları (**Tablo 14**) aşağıda verilmiştir. Bu amaçla böbrek dokularından izole edilmiş total RNA'dan Revers Transkriptaz (RT) enzimi ile hazırlanan cDNA'lar kullanıldı. Kullanılan SYBR Green ile genlerin ekspresyon miktarları ölçüldü.

Tablo 13. Real-Time PCR Reaksiyon Karışımı

PCR reaksiyon karışım içeriğı	Miktar (µl)
Master Mix	12.5
Forward Primer	0. 25
Reverse Primer	0.25
Su	9.5
cDNA	2,5
Toplam	25

Tablo 14. Real-Time PCR Reaksiyon şartları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
50	2	1
95	10	
95	10	
60	1	

Normalizasyon için referans (housekeeping) olarak β -*aktin* geni kullanıldı ve sonuçlar Δ Ct metodu (Livak and Schmittgen 2001) kullanılarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler 3 tekerrür olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen verilere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey çoklu karşılaştırma 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

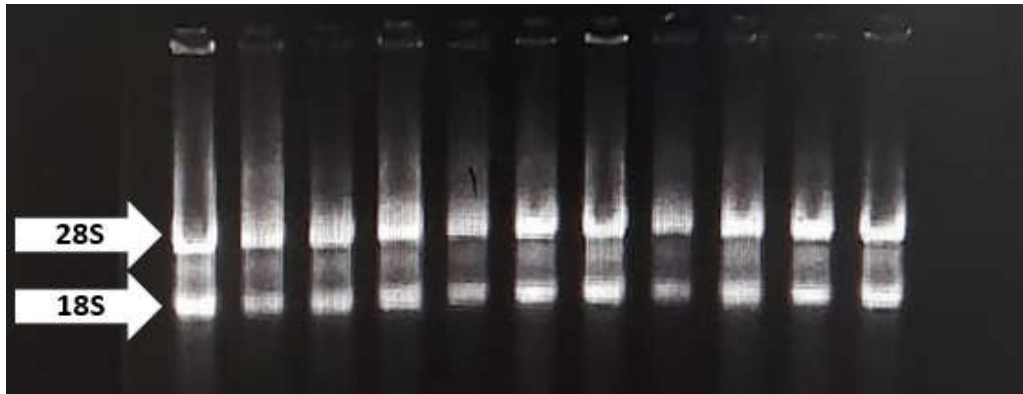
Saflaştırılan RNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analiz Sonuçları

Total RNA'nın görüntüsü jelde oldukça belirli bir şekilde görünen 28S (veya 23S) ve 18S (veya 16S) rRNA bantlarına aittir. 18S rRNA bandı ve 28S rRNA bandının yaklaşık olarak yarısı kadar bir parlaklık oluşturması, 2:1 oranında toplam RNA'nın parçalanmadan elde edildiğinin en belirgin göstergesidir. Sıçan böbrek dokusundan izole edilen RNA'nın Nanodrop ile ölçülen konsantrasyonu **Tablo 15**'te jel ve görüntüsü **Şekil 15**'te gösterilmiştir.

Tablo 15. İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyon Sonuçları

Örnekler	Konsantrasyon (µl)	Saflık ($A_{260/280}$)
K1	425	1,92
K2	992	2,1
K3	828	1,98
T1	651	2,15
T2	882	2,06
T3	1064	1,90
D1	701	2,0
D2	828	2,13
D3	860	1,95
DT1	832	1,97
DT1	652	2,09
DT1	696	2,11

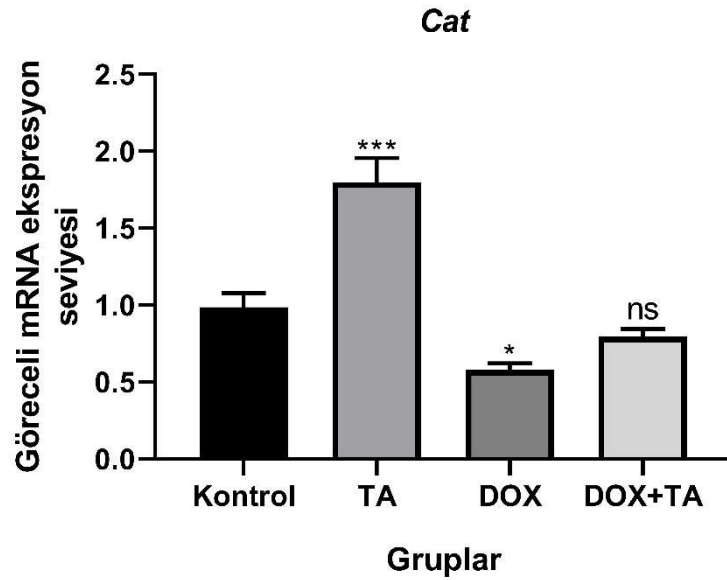
(K; Kontrol, T; Tannik Asit, D; Doksorubisin, DT; Doksorubisin-Tannik Asit)



Şekil 15. İzole edilen total RNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü

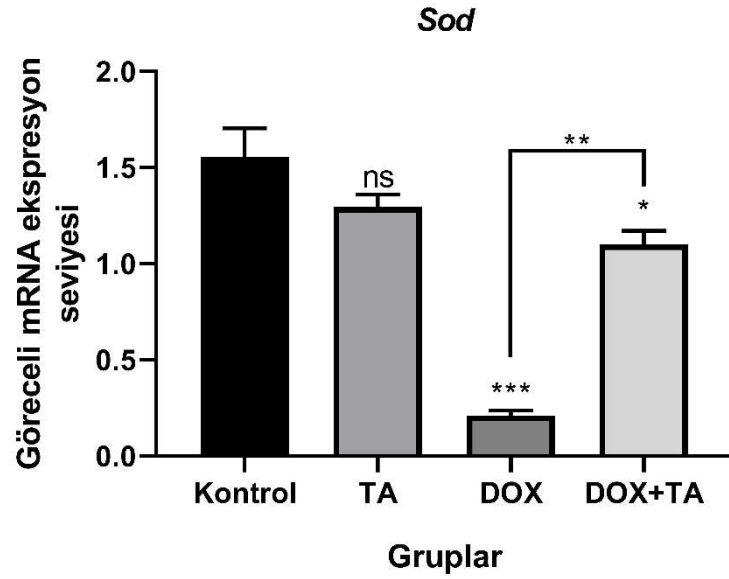
Antioksidan Sistem Bileşenlerinin Kantitatif Gen Ekspresyon Sonuçları

Cat mRNA ekspresyon seviyesi sonuçlarına göre, kontrol grubuna kıyasla yalnızca TA uygulanan grubun gen ekspresyon seviyesinde anlamlı derecede artma gözlenirken kontrole kıyasla DOX uygulanan grubunda ise anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. Ancak kontrol grubuna kıyasla TA ile birlikte DOX uygulanan kombine grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 16).



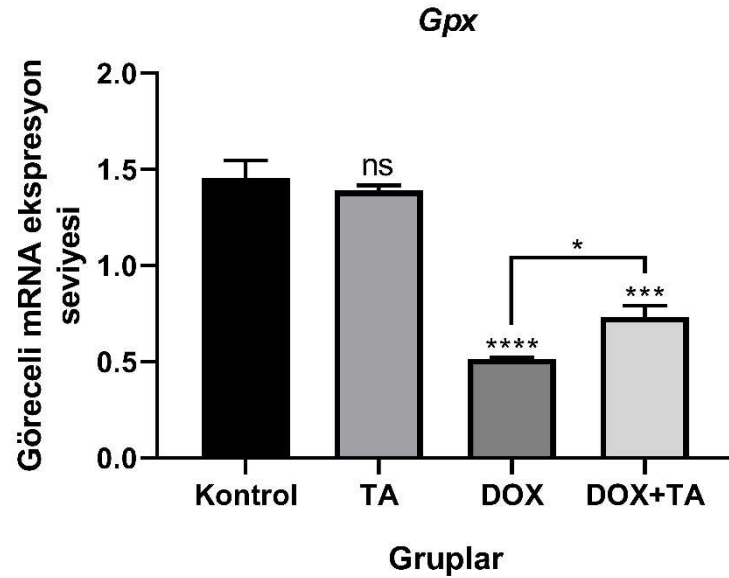
Şekil 16. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Cat* mRNA ekspresyon seviyesi

Kontrol grubuna kıyasla, TA uygulanan grupta, *Sod* mRNA transkript miktarında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Ancak kontrol grubuna kıyasla tek başına DOX uygulanan grupta önemli derecede azalış gözlemlendi. DOX ile birlikte TA uygulanan kombine grupta söz konusu genin ekspresyon seviyesi, kontrol grubuna kıyasla önemli derecede bir azalış olduğu gözlemlendi. DOX'un tek başına neden olduğu söz konusu genin ifadesindeki azalış, TA uygulaması ile tolere edilmiş ve genin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 17).



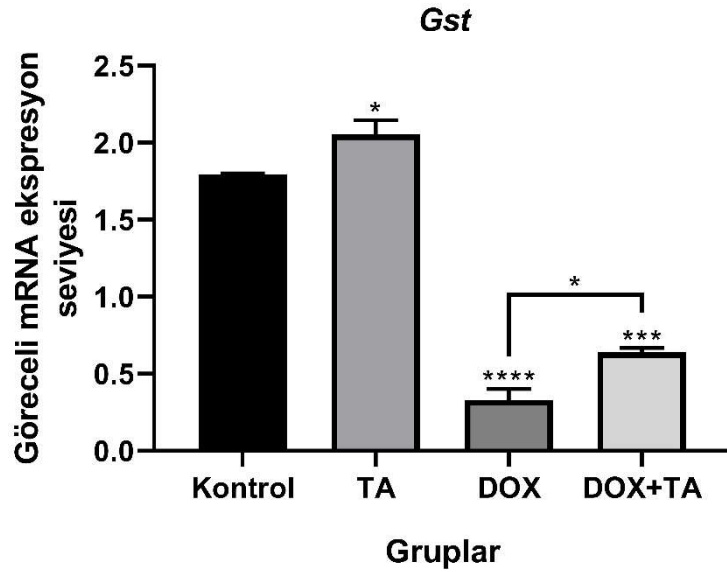
Şekil 17. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Sod* mRNA ekspresyon seviyesi

Gpx mRNA ekspresyon seviyesi incelendiğinde TA uygulanan grup, kontrol grubuna göre kıyaslandığında, gen ifadesinde istatistiksel olarak önemli bir fark gözlemlenmedi. Ancak, yalnızca DOX uygulanan grupta ise anlamlı bir azalma tespit edildi. Kontrol grubuna kıyasla DOX ile kombine olarak TA uygulanan grupta anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi. Tek başına DOX uygulanan gruba kıyasla kombine (DOX+TA) uygulama grubunda anlamlı derecede bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Gpx* mRNA ekspresyon seviyesi

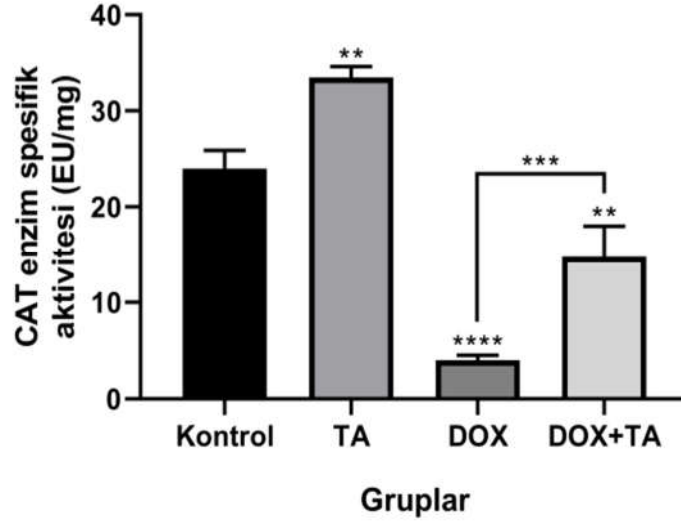
Gst mRNA gen ifadesi analiz sonuçlarına göre, tek başına TA uygulamasının söz konusu genin mRNA ifadesinde kontrol grubuna kıyasla önemli seviyede bir artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Ancak DOX uygulanan grupta ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna kıyasla DOX ve TA'nın kombine olarak uygulandığı grupta gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi. Tek başına DOX ile muamele edilen gruba kıyasla kombine uygulama yapılan grupta *Gst* ifadesinde anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Gst* mRNA ekspresyon seviyesi

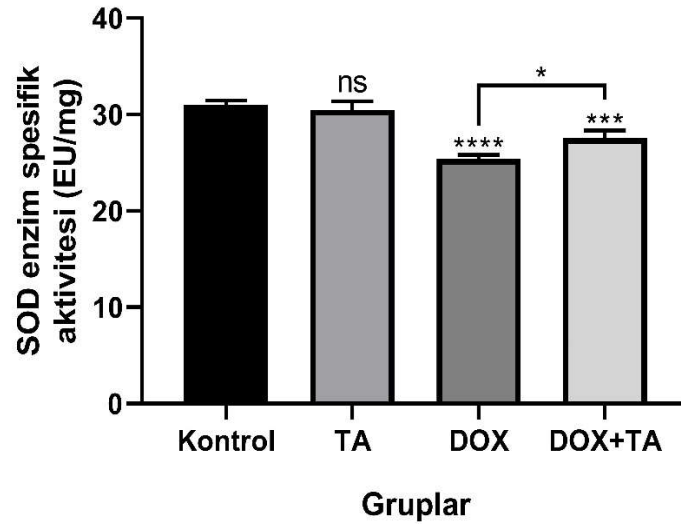
Antioksidan Sistem Bileşenlerinin Enzim Aktivite Sonuçları

TA uygulanan grupta, kontrol grubuna göre kıyaslandığında, CAT enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Kontrol grubuna kıyasla maruziyete bağlı olarak tek başına DOX uygulanan grupta enzim aktivitesinde önemli derecede bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. DOX+TA grubunda ise tek başına DOX uygulamasına göre daha yüksek enzim aktivitesi olduğu gözlemlendi (Şekil 20).



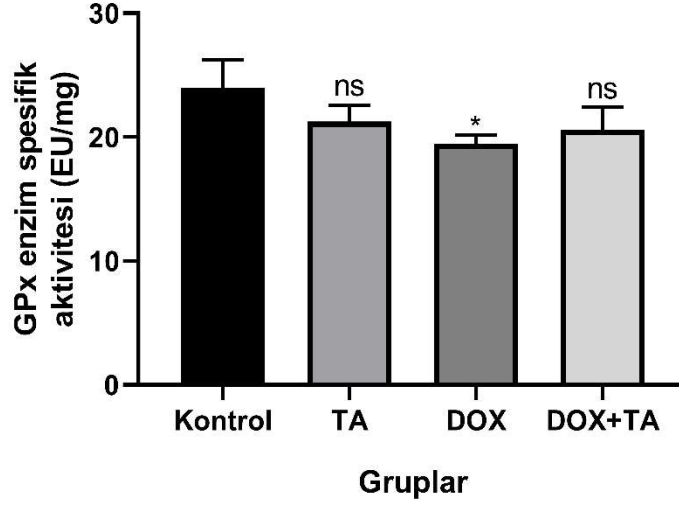
Şekil 20. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki CAT enzim spesifik aktivitesi

SOD enzim aktivitesinin tek başına TA uygulandığında önemli derecede bir değişikliğe uğramadığı gözlenmiştir. Kontrole kıyasla DOX ve DOX+TA gruplarında enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu gözlemlendi. Ancak, tek başına DOX uygulamasına göre TA'nın enzim aktivitesini biraz daha arttırarak kontrol grubuna yaklaştırdığı gözlenmiştir (Şekil 21).



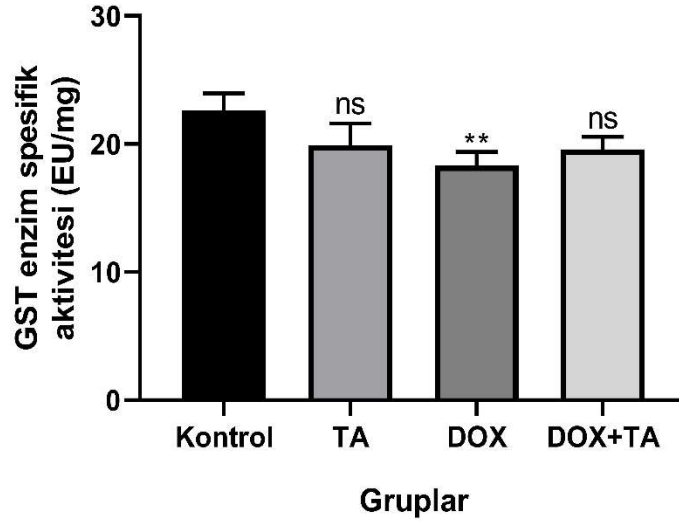
Şekil 21. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki SOD enzim spesifik aktivitesi

GPx enzim aktivitesi, DOX maruziyetine bağlı olarak önemli derecede azalmıştır. Tek başına TA uygulaması ise enzim aktivitesinde önemli bir değişikliğe yol açmamıştır. DOX'la birlikte TA uygulanan (kombine grup) grupta ise enzim aktivitesinin bir miktar azaldığı ancak bu azalmanın önemli seviyede olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 22).



Şekil 22. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki GPX enzim spesifik aktivitesi

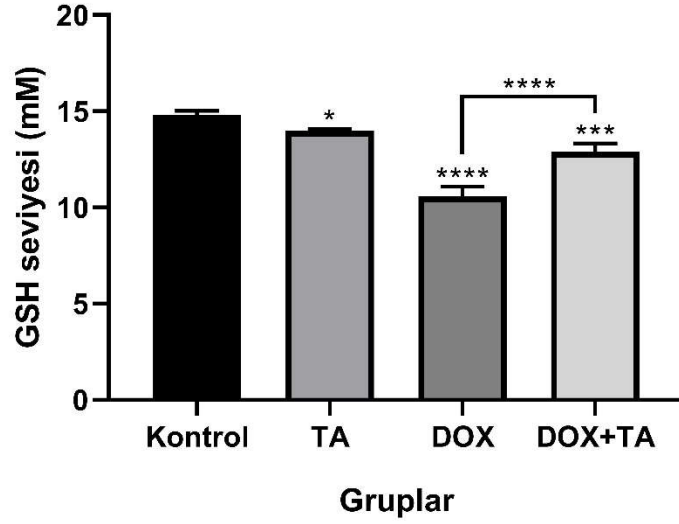
GST enzim aktivitesi sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla tek başına DOX uygulamasının GST'nin biyolojik aktivitesinde ciddi bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Fakat DOX ile birlikte TA uygulandığı zaman enzim aktivitesindeki bu azalışın engellenerek aktivitenin yeniden uygulama yapılmayan kontrol grubu seviyelerine yaklaştığı tespit edilmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki GST enzim spesifik aktivitesi

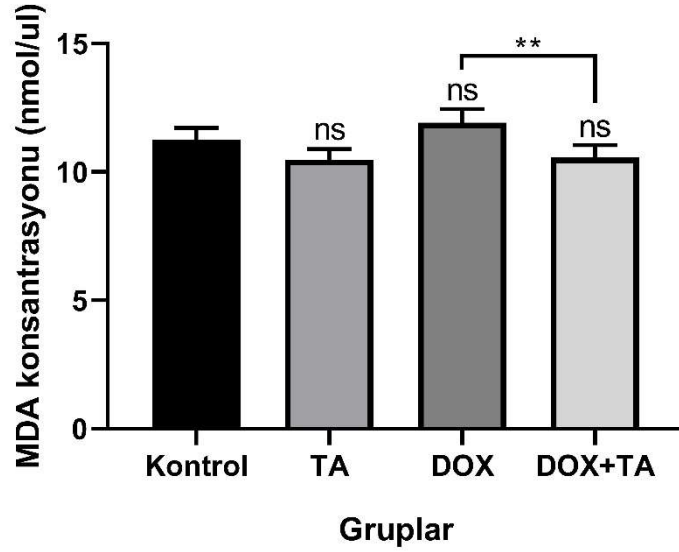
GSH Seviyesi ve MDA Konsantrasyon Sonuçları

Kontrol grubuna kıyasla GSH seviyesinin DOX uygulanan grupta önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, bu azalışım TA desteği ile kısmen engellediği ve kontrol grubu değerlerine biraz daha yakınlaştığı gözlenmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki GSH seviyesi

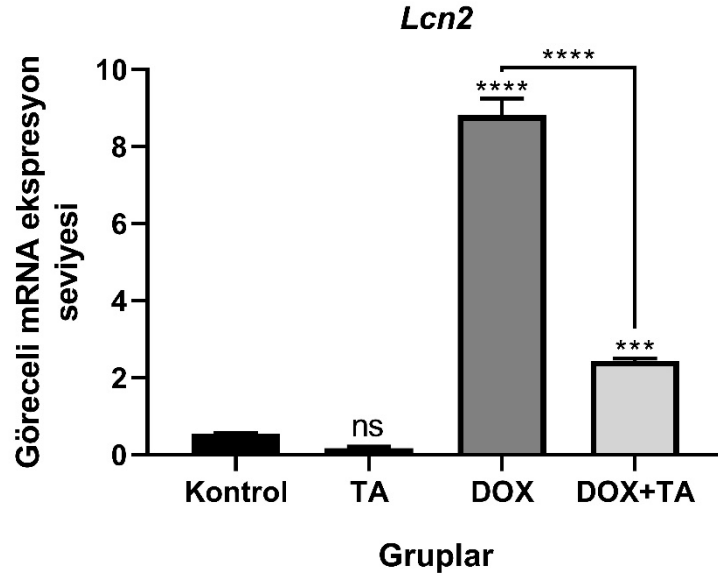
MDA konsantrasyon sonuçları incelendiğinde (Şekil 25) kontrol grubuna kıyasla, diğer uygulama yapılan gruplarda önemli derecede bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Ancak, tek başına DOX uygulanan gruba kıyasla, DOX ve TA'nın DOX maruziyeti sonucu kısmen artan lipid peroksidasyonunu baskılayabildiği tespit edilmiştir.



Şekil 25. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki MDA konsantrasyonu

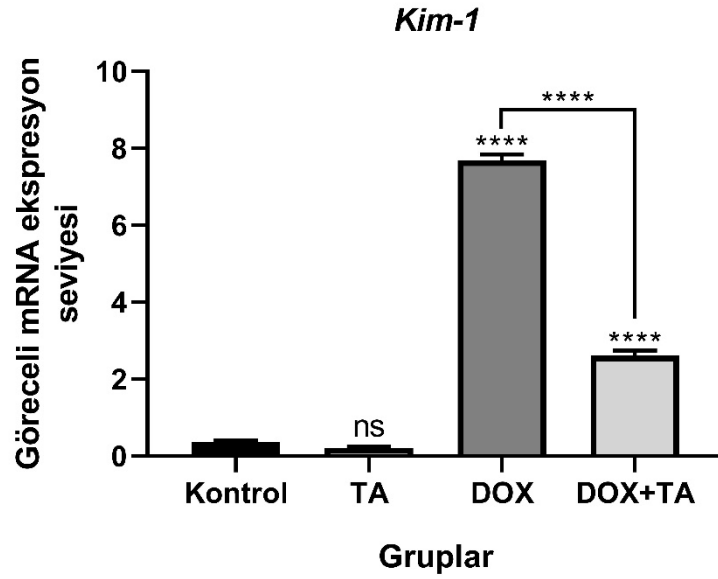
***Lcn2*, *Kim-1*, *Top2b*, *Cox-2*, *Casp3*, *Casp9*, *Foxo1* ve *Foxo3* Genlerinin Ekspresyon Sonuçları**

Böbrek hasar belirtici olan *Lcn2* geninin mRNA transkript miktarının DOX uygulaması sonucunda dramatik bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Tek başına TA ise genin ifadesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. DOX ile birlikte TA uygulanan kombine (DOX+TA) grupta ise *Lcn2*'nin agresif artışı oldukça yeniden baskılanabilmiştir (Şekil 26).



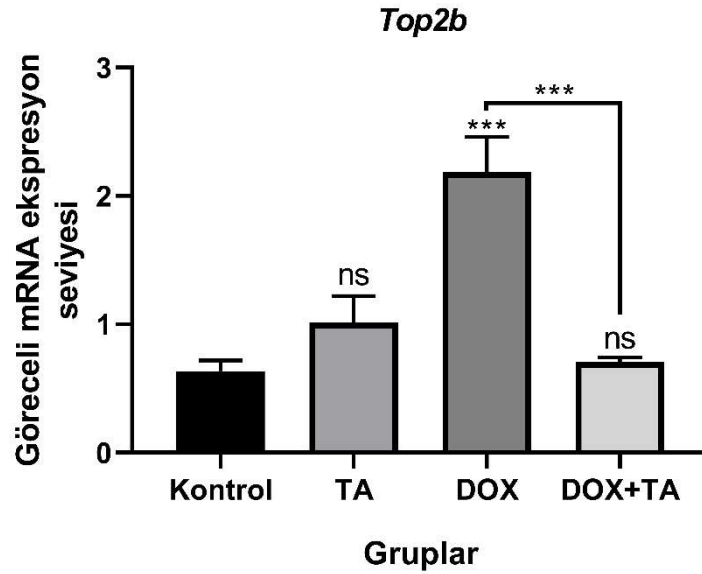
Şekil 26. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Lcn2* mRNA ekspresyon seviyesi

Elde edilen bulgulara göre *Kim-1* geninin ekspresyon seviyesinin DOX'a yanıt olarak önemli seviyede arttığı gözlenmiştir. Tek başına TA uygulamasının ise *Lcn2*'de olduğu gibi genin ifadesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. DOX ile birlikte TA uygulanan kombine (DOX+TA) grupta ise *Kim-1*'in agresif artışı yeniden baskılanabilmiştir (Şekil 27).



Şekil 27. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Kim-1* mRNA ekspresyon seviyesi

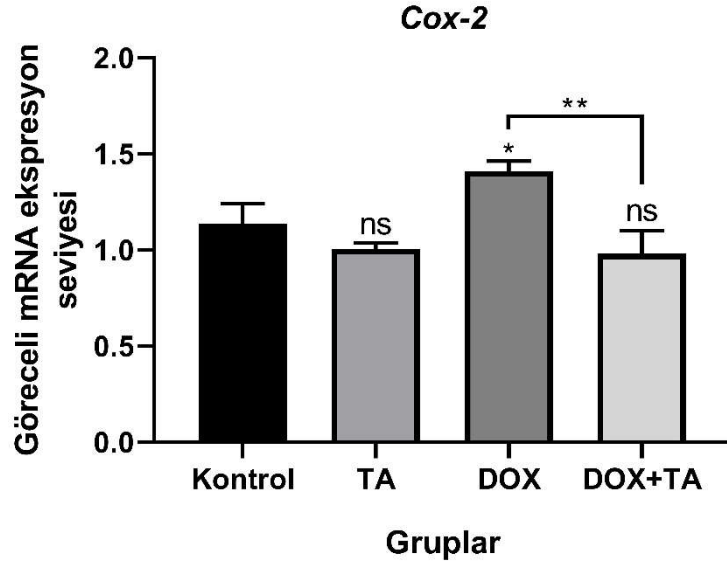
Top2b göreceli mRNA ekspresyon seviyesinde, tek başına TA uygulanan grup kontrole göre kıyaslandığında anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Ancak DOX uygulanan grupta ise gen ifade seviyesinde anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur. Yalnızca DOX uygulanan gruba kıyasla DOX+TA uygulanan grupta aşırı gen ifadesinde anlamlı düzeyde bir azalma meydana geldiği bulunmuştur (Şekil 28).



Şekil 28. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Top2b* mRNA ekspresyon seviyesi

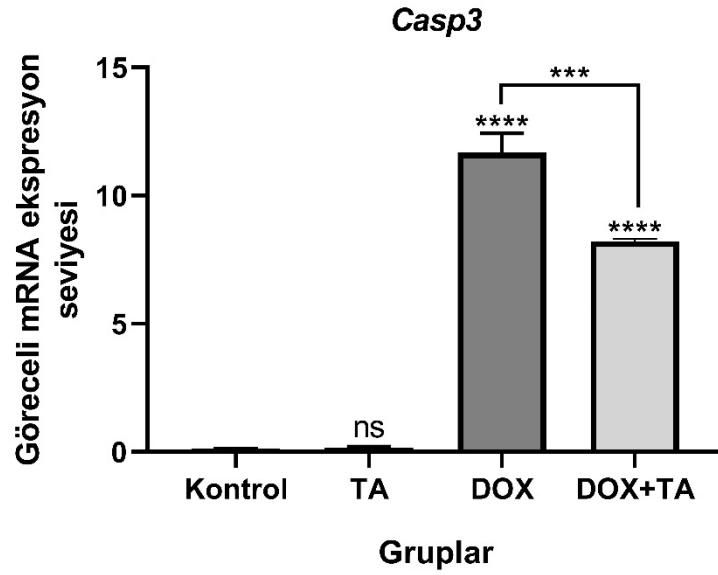
Kontrol grubuna göre kıyaslandığında, tek başına TA uygulaması yapılan grupta *Cox-2* mRNA ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark meydana gelmediği gözlenmiştir. Ancak DOX uygulanan grupta ise *Cox-2* ifadesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede bir artış

olduğu tespit edilmiştir. DOX ile eş zamanlı TA uygulanan kombine grupta (DOX+TA) ise genin ekspresyon seviyesinin azalarak yeniden kontrol grubu seviyelerine indirgendiği gözlenmiştir. *Cox-2* gen ifadesindeki bu azalışın tek başına DOX uygulanan gruba kıyasla istatistiki açıdan oldukça önemli ve anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 29).



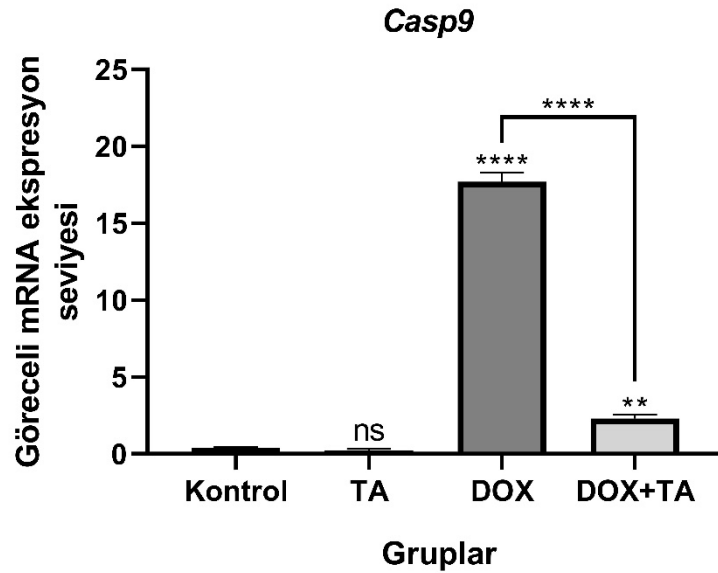
Şekil 29. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Cox-2* mRNA ekspresyon seviyesi

Casp3 geninin mRNA ifade seviyesi incelendiğinde, TA uygulanan grupta kontrol grubuna göre bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Ancak, tek başına DOX uygulaması yapılan grup ve DOX ile birlikte TA şeklinde kombine uygulanan grupta ise kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış olduğu bulunmuştur. Ayrıca DOX uygulanan gruba göre DOX ve TA kombinasyonu uygulanan grupta *Casp3* mRNA seviyesinde istatistiki açıdan oldukça önemli bir azalmanın meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 30).



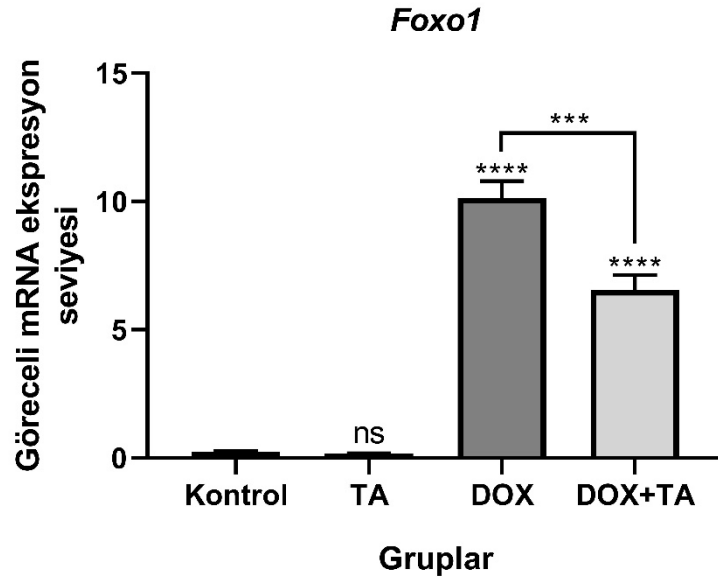
Şekil 30. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Casp-3* mRNA ekspresyon seviyesi

Casp9 geninin mRNA ekspresyon seviyesi incelendiğinde, tek başına TA uygulanan grupta gen ifadesinde anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Ancak, DOX uygulanan grupta ise göreceli *Casp9* miktarında önemli derecede artış olduğu tespit edilmiştir. DOX ile birlikte TA uygulanan grupta ise gen ifadesi oldukça fazla artış göstermekle birlikte bu artışın TA desteği ile önemli seviyede baskılandığı tespit edilmiştir (Şekil 31).



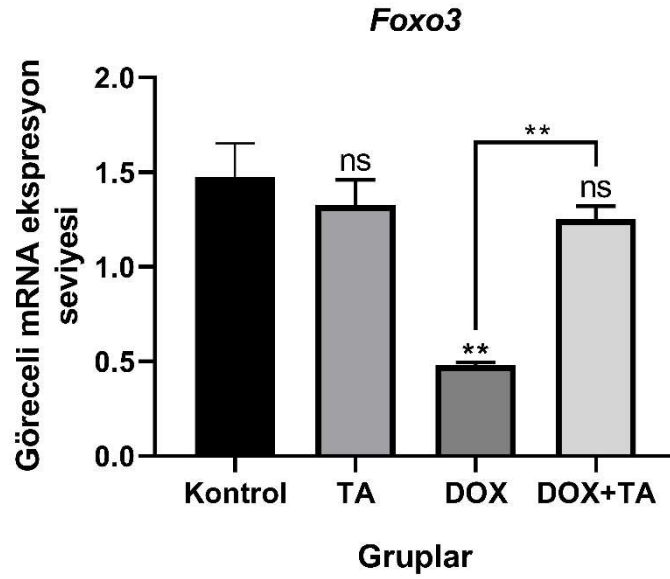
Şekil 31. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Casp9* mRNA ekspresyon seviyesi

Elde edilen sonuçlara göre, *Foxo1* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde, DOX uygulanan ve DOX+TA (kombine) uygulanan gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği görülmüştür. Ancak tek başına TA uygulanan grupta, kontrole kıyasla anlamlı bir değişim bulunmamıştır. DOX ve DOX+TA (kombine) uygulanan gruplar kendi aralarında kıyaslandığında, DOX uygulanan gruba göre kombine uygulama grubunda *Foxo1* ifadesinde istatistiksel olarak önemli derecede bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 32).



Şekil 32. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Foxo1* mRNA ekspresyon seviyesi

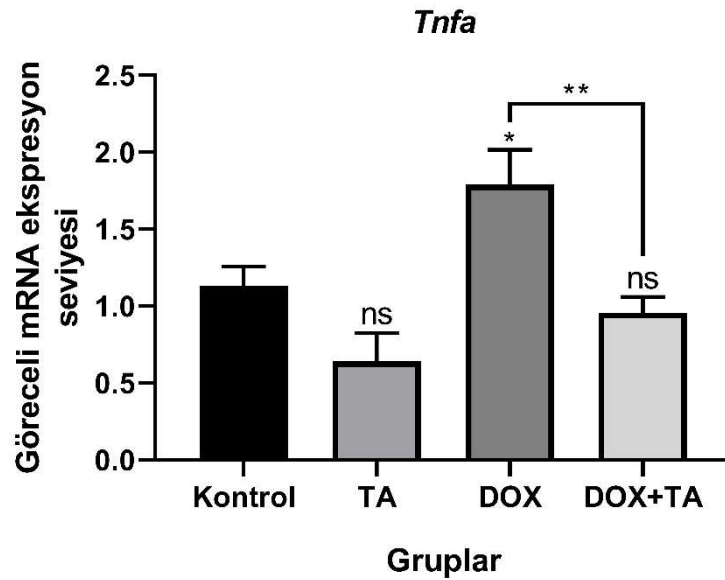
Sonuçlar göz önüne alındığında, *Foxo3* geninin mRNA seviyesinin, TA ve DOX+TA (kombine) uygulanan gruplarda önemli seviyede azalmadığı gözlenmiştir. Ancak DOX ile muamele edilen grup kontrole göre kıyaslandığında gen ifadesinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. DOX ve DOX+TA (kombine) uygulanan gruplar birbiri ile kıyaslandığında ise DOX uygulanan gruba göre kombine grupta istatistiksel olarak önemli derecede bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 33).



Şekil 33. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Foxo3* mRNA ekspresyon seviyesi

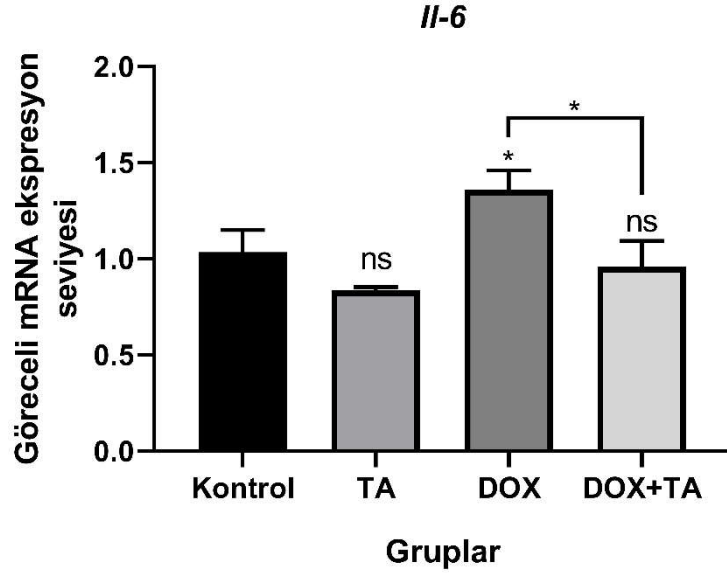
Proinflatuar Sitokin Genlerinin Ekspresyon Sonuçları

Tnfa geninin mRNA ekspresyon seviyesi incelendiğinde, TA ve DOX+TA (kombine) uygulanan gruplarda göreceli *Tnfa* ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Ancak, kontrol grubuna kıyasla DOX uygulanan grupta ise anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. DOX uygulanan gruba göre kıyaslandığında kombine uygulama yapılan grupta anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi (Şekil 34).



Şekil 34. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Tnfa* mRNA ekspresyon seviyesi

Kontrole göre kıyaslandığında, *Il-6* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde TA ve DOX+TA (kombine) uygulanan gruplarda önemli derecede bir fark gözlenmemiştir. Kontrol grubuna kıyasla DOX uygulanan grupta ise istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu bulunmuştur. DOX uygulanan grup, kombine uygulama grubuna kıyaslandığında *Il-6* ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu bulunmuştur (Şekil 35).



Şekil 35. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçan böbrek dokularındaki *Il-6* mRNA ekspresyon seviyesi

Antikanser tedavisi her ne kadar hızlı büyüme potansiyeline sahip kanser hücrelerine yönelik olsa da kullanılan kemoterapötik ilaçlar vücutta dolaşım gösterebildikleri için diğer hızlı büyüyen sağlıklı ve normal hücrelere de zarar verebilmektedirler (Corrie, 2011). Bu durum kaçınılmaz olarak hemostazı bozduğu için istenmeyen fizyolojik sonuçlara neden olabilmekte ve birçok organı olumsuz etkileyebilmektedir (Ayla ve ark. 2011). Dolayısı ile tedavi sırasında veya sonrasında oluşabilecek yan etkiler canlı fizyolojisini her zaman en kötü senaryoya sürüklemese de kanser tedavisine bakışta endişelere neden olmaktadır (So *et al.* 2019). Bu nedenle sadece hedef odaklı terapötiklerin geliştirilmesi ve/veya tedavi etkinliğini değiştirmeden kullanılan ilacın meydana getirdiği yıkıcı toksisiteyi minimize edebilecek yardımcı ajanların tespit edilerek koruyucu mekanizmalarının aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Başta kardiyak, hepatik ve nefrotik toksisite olmak üzere kemoterapi kaynaklı organ ve doku toksisitesi terapi etkinliğini sınırlandıran temel olgulardır (Goel and Aggarwal 2010). Nefrotoksiste, antikanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan DOX'un bilinen önemli olumsuz etkilerinden olup nefropati, proteinüri, glomerüler filtrasyon bariyeri ve glomerüler endotel

hücre gözenek boyut bozukluğu gibi patolojik çıktılarla karakterize edilmektedir (Troxell *et al.* 2016). Literatürdeki mevcut çalışmalar incelendiğinde DOX uygulamasından kaynaklanan nefrotoksisitenin altında çoğunlukla bozulan antioksidan sistem cevabının ön plana çıkarıldığı, ancak söz konusu sistem bileşenlerinin düzenleyicisi olarak fonksiyon gösteren faktörler ile hücre canlılığını düzenleyen diğer mekanizma üyeleri göz ardı edildiği görülmektedir (Torres and Simic 2012). DOX bağlantılı nefrotoksisiteyi daha iyi anlayabilmek için yapılan mevcut tez çalışması kapsamında; DOX uygulanarak oluşturulan deneysel modellerde maruziyet sonucu oluşan toksisite moleküler böbrek hasar markerlarının, antioksidan sistem bileşenlerinin, kritik rejenerasyon ve transkripsiyon faktörlerinin, majör inflamatuvar ve apoptotik sistem üyelerinin incelenmesi ile değerlendirildi. Ek olarak incelenen parametreler aracılığı ile TA'nın protektif mekanizması aydınlatılmaya çalışıldı.

Hücrel homeostaz ökaryotik genom bileşenlerinin koordineli bir şekilde düzenlenmesi ile sağlanmaktadır (Barrett *et al.* 2012). Düzenlemenin ilk safhasında çeşitli iç ve dış uyaranlara karşı geçici ancak çok hızlı bir şekilde aktive olabilen "ani-erken genler (IEGs)" yer almaktadır (Jiang *et al.* 2001). Bu genlerin transkripsiyonel sinyalleri uyaran etken karşısında yeni protein sentezinden önce aktive olarak koruma mekanizmasının başlatılmasını sağlamaktadır. Bu grupta yer alan COX-2 (Cyclooxygenase-2), tüm hücrelerde ifade edilen "housekeeping" bir gendir (Guo *et al.* 2021). Hücreyi tehdit eden herhangi bir uyaran bulunmadığı normal şartlarda *Cox-2* ifadesi sınırlıdır ve temel seviyede gerçekleşmektedir (Tiwari *et al.* 2019). Ancak inflamasyon gibi süreçlerde söz konusu genin ifadesi keskin bir şekilde yukarı yönlü değişmektedir (Gómez-Valenzuela *et al.* 2021). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar proinflamatuvar sitokinlerin uyarımı ile *Cox-2* ifadesinde önemli artış meydana geldiğini göstermektedir. Yang ve ark. (2021) yaptığı çalışma TNF sinyalizasyonunun FoxO transkripsiyon faktörleri üzerinden *Cox-2* ifadesini düzenlediğini göstermiştir. Bu araştırmacılar insan kardiyak fibroblast hücrelerinde FoxO1 inhibitörü ve *Foxo1* siRNA'sının varlığında TNF aracılı *Cox-2* ifadesinin baskılandığını kanıtlamışlardır (Yang *et al.* 2021). Çalışmamızdan elde edilen bulgular bu farklı bilgilerle uyum içindedir. Sonuçlar, DOX maruziyeti sonucunda *Cox-2* ifadesinin uygulama yapılmayan gruplara kıyasla yüksek oranda arttığını göstermektedir (**Şekil 29**). Ek olarak *Cox-2* ifadesinde düzenleyici rolleri olan *Foxo1* (**Şekil 32**) ve *Tnf-a*'nın (**Şekil 34**) ifadelerinin de artış gösterdiği görülmüştür. Ancak söz konusu genlerdeki bu agresif artış TA uygulaması ile önemli ölçüde azalmıştır (**Şekil 29, 32 ve 34**). Bu bulgular, DOX ile bozulan hücrel işleyişin TA ile onarılabileceğini kanıtlamaktadır.

LCN2 (Lipocalin-2), apoptosis, inflamasyon ve immün cevap gibi önemli fizyolojik süreçlerde rol alan pleiotropic bir molekül olarak bilinmektedir (Olson *et al.* 2021). Oldukça

sıkı düzenlenen bir ifade mekanizmasına sahip olan LCN2'nin akut böbrek hasarında yüksek oranda ve kolayca indüklendiği, yapılan farklı hücre kültürü ve model organizma çalışmaları ile tespit edilmiştir. Bu nedenle KIM-1 (Kidney injury molecule-1; Böbrek hasar molekülü-1) ile birlikte böbrek hasarı tespitinde güvenilir bir marker olarak kabul görmektedir (Bonnard *et al.* 2021). Tümör mikro çevresinden salınan interlökin ve tümör nekrozis faktör gibi sitokinler önemli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu ve *Lcn2* promotör bölgesine bağlanmasını tetikleyerek genin transkripsiyonunu uyarırlar (Karlsen *et al.* 2010). Yapılan farklı çalışmalar LCN2'nin aşırı ifadesinin kanser hücrelerinin göç ve istilasını kolaylaştırdığını göstermektedir (Yang *et al.* 2009; Tung *et al.* 2013; Ding *et al.* 2015). Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda DOX'un inflamatuvar sistem uyarımı üzerinden sağlıklı hücrelerde de apoptoz yolağının aktifleştirerek doku hasarı oluşturabileceği hipotezinin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Xu *et al.* 2012). Nitekim mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlar DOX maruziyeti sonucunda *Il-6* ve *Tnf- α* 'nın ifadesinin arttığını (Şekil 34 ve 35), bu inflamatuvar faktörlerin aracılığıyla da *Lcn2* aktivasyonu (Şekil 26) üzerinden *Casp3* ve *Casp9*'un aşırı ifade edilerek (Şekil 30 ve 31) kanserleşme mekanizmasının tetiklendiğini göstermektedir. Ek olarak DOX ile birlikte TA uygulamasının söz konusu gen ifadelerinin önemli ölçüde azalarak kontrol seviyelerine yaklaştığı dolayısı ile bozulan hücresel dengenin yeniden normalleşebileceği kanıtlanmıştır.

DOX kaynaklı metabolik deregülasyonun önemli nedenlerinden diğeri de antioksidan sistemin baskılanarak uyarıcı karşısında hücresel koruma cevabının yetersiz kalmasıdır (Qi *et al.* 2020). DOX kaynaklı nefrotoksisitenin temelinde oksidatif hasarın yer aldığı vurgulanmaktadır (Su *et al.* 2015). Antioksidan sistemde yer alan protein ve metabolitler oksidatif stresin yol açtığı hücresel ve dokusal hasarı önleyerek fizyolojik dengeyi korumaktadır (Pisoschi and Pop 2015). Çevresel maruziyet sonucu alınan mikrobisleyiciler veya tedavi amaçlı kullanılan ajanlar redoks reaksiyonlarını katalize ederek ROS oluşumuna neden olurlar (Zhang *et al.* 2021). Hücresel redoks dengesi başta CAT, SOD ve GPx olmak üzere farklı enzimler aracılığıyla sağlanmaktadır. Dolayısı ile bu enzimlerin gen ifadelerinde ve biyolojik aktivitelerinde meydana gelen bir azalma hücreyi oksidatif hasara karşı korumasız hale getirmektedir (Rahman *et al.* 2012). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar bu faktörlerin fonksiyonlarını tam olarak yerine getiremediklerinde nörodejenerasyon, kanser, inflamasyon ve yaşlanma gibi önemli sorunların meydana geldiğini göstermektedir (Liguori *et al.* 2018; Ceylan ve ark. 2019; Hayes *et al.* 2020). Hücrede meydana gelen oksidan moleküller GST enziminin aracılık ettiği detoksifikasyon reaksiyonları ile de giderilmektedir (Kalyanaraman, 2013). GST, toksik xenobiyotikler ve serbest radikalleri indirgenmiş GSH'ı bir substrat olarak kullanarak detoksifiye etmektedir (Enayati *et al.* 2005). Dolayısı ile azalan GSH bu metabolitle

doğrudan etkileşime giren ve hücrel detoksifikasyonun esansiyel bileşenleri olan GST ve GPx'in etkinliğini sınırlandırır (Harris and DeNicola 2020). Yapılan birçok bağımsız çalışma GSH miktarı ile oksidatif hasar arasındaki ters ilişkiyi kanıtlamaktadır (Sastre *et al.* 2003; Frisard and Ravussin 2006; Rains and Jain 2011). Oksidatif hasarın bir diğer belirteci ise artan lipid peroksidasyonu olup bu süreç hücrel ve dokusal hasarla sonuçlanmaktadır (Gallelli *et al.* 2018). Bu çalışmada DOX uygulanan canlıların böbrek dokularında CAT, SOD, GPx ve GST enzimlerinin biyolojik aktivitelerinde ve GSH seviyelerinde önemli oranda azalış olduğu saptanmıştır (**Şekil 20, 21, 22, 23 ve 24**). Lipid peroksidasyon belirteci olan MDA seviyeleri ise DOX uygulanan grupta artış göstermiştir (**Şekil 25**). TA uygulamasının söz konusu bileşenlerin DOX karşısında verdiği tepkileri tamamen ters yönde değiştirerek antioksidan savunma sistemini yeniden güçlendirmiştir. Elde edilen bu bulgular DOX ile bozulan hücrel antioksidan sisteminin TA ile onarılabileceğini kanıtlamaktadır.

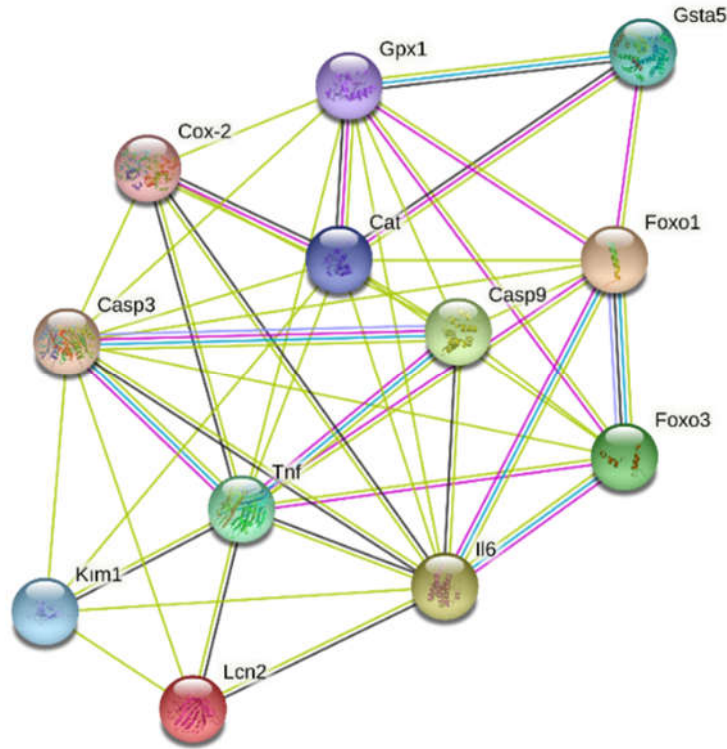
Genom kompleksliği göz önünde bulundurulduğunda belirli şartlar altında sadece gerekli genlerin ifade edilerek hızlı yanıt oluşturulması oldukça karmaşık bir süreçtir. Bu süreç DNA zincirinde ilgili genin düzenleyici sekanslarına bağlanarak hedef genin ifadesini modüle edebilen ve transkripsiyon faktörleri olarak bilinen proteinler aracılığı ile yönetilmekte ve hücrenin maruz kaldığı çevresel etmenlere cevap olarak bir genin transkripsiyonu artırılıp (aktivatör) veya engellenebilmektedir (represör) (Schroder *et al.* 2004). Dolayısı ile bu faktörlerin ifadelerinin kontrolü ilgili oldukları yolları anlama ve kontrol etme açısından oldukça etkili bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Üzerinde en çok çalışma yapılan transkripsiyon faktörlerinden olan ve FoxO ailesinin bir üyesi olan FOXO3 (forkhead box 3), ailenin diğer üyelerinden FOXO4 ve 6 ile birlikte her yerde ifade edilmektedir (Lee and Dong 2017; Tia *et al.* 2018). Mitokondriyal gen ifadesinin düzenlenmesi gibi birçok önemli sinyal yolağında rol alan FOXO3 otofaji sitimülasyonu, hücre döngüsü düzenlenmesi ve oksidatif stresin azaltılmasında önemli etkilere sahiptir (Ponugoti *et al.* 2012; Farhan *et al.* 2017). Son çalışmalar, FOXO3'ün ROS eliminasyonunda aktif rol alan MnSOD ve CAT ifadesi üzerinde doğrudan etkili olarak stres uyaranlarına karşı sensör ve düzenleyici fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir (Vurusaner *et al.* 2012; Lu *et al.* 2018; Hu *et al.* 2019). Bu nedenle FOXO3 ifadesinin kontrol edilmesi hücrel stres metabolizmasının sağlığı için oldukça önemlidir (Salminen *et al.* 2013). Çalışmamızdan elde edilen bulgular DOX enjekte edilen canlılarda *Foxo3* mRNA seviyesinin ciddi oranda azaldığını ve buna paralel olarak SOD ve CAT aktiviteleri ile ilgili proteinlerin gen ifadelerinin önemli ölçüde azaldığını göstermektedir. Ancak, DOX ile birlikte TA uygulandığı zaman *Foxo3* ile bu transkripsiyon faktörünün düzenlemesine tabi olan *Sod* ve *Cat* genlerinin ifadelerinin tek başına DOX uygulamasına göre önemli ölçüde artışa geçtiğini göstermektedir (**Şekil 16 ve 17**). Bu veriler, DOX ile bozulan

redoks dengesinin TA aracılı *Foxo3* manipölasyonu üzerinden antioksidan enzim genlerinin uyarılması ile giderilebileceğini kanıtlamaktadır.

Oksidatif strese ek olarak doksorubisinin kanser hücrelerini öldürmede ana etki mekanizmalarından birisi de DNA'nın replikasyonu, tamiri ve kromatinlerin yeniden şekillenmesi gibi temel hücresel süreçlerde rol alan topoizomerazların inhibisyonudur (Zhu *et al.* 2016; Marinello *et al.* 2018). DNA topoizomeraz II beta, insanlarda *TOP2B* geni tarafından kodlanan bir topoizomeraz ailesi üyesidir (Austin *et al.* 2018). Önceki çalışmalar, kardiyak hücrelerde antrasiklin aracılı DNA hasarına cevap olarak meydana gelen p53 aktivasyonu için *Top2b* gereksinimine vurgu yapmaktadır (Tocchetti *et al.* 2018). *Top2b*^{flox/flox} fare modeli ile yapılan çalışmalar DOX'un hücre ölüm sürecini tetikleyen Top2-doksorubisin-DNA üçlü yapısını oluşturduğunu kanıtlamıştır (Zhang *et al.* 2012). Elde edilen bulgular *Top2b* geni silinen hücrelerde DOX aracılı çift zincir kırıklarının oluşmadığı ve ROS üretimi ile ilişkili transkriptomda herhangi değişiklik gerçekleşmediğini göstermiştir. Ek olarak, *Top2b* delesyonunun ilerleyici kalp hasarını da engellediği ve dolayısı ile DOX kaynaklı kardiyotoksisiteye esasen topoizomeraz II beta'nın aracılık ettiği kabul edilmektedir. Mevcut bulgular doğrultusunda *Top2b* ifadesi yüksek olan hastaların DOX kaynaklı organ toksisitesine daha duyarlı ve/veya yatkın olabileceği düşünülmektedir. Dolayısı ile özellikle sağlıklı hücrelerde *Top2b* ifadesini kontrol edebilmek DOX'un neden olduğu *Top2b* aracılı olumsuz klinik çıktıları minimize edebilmek adına oldukça önemlidir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar DOX ile birlikte sağlıklı böbrek dokusunda *Top2b* mRNA seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli derecede arttığını, TA ile birlikte DOX uygulanan grupta ise *Top2b*'nin kontrol seviyesine indirgendiği görülmektedir (**Şekil 28**).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Hücrel metabolizmada meydana gelen biyolojik fonksiyonların temel aktörleri şüphesiz proteinlerdir (Tu and McKnight 2006). Bu makromoleküller izole formlarında bulunmayıp çoğunlukla birbirleriyle ve hücredeki diğer moleküllerle etkileşim göstermektedirler (Barabási and Oltvai 2004). Bu nedenle hücre işleyişi, hastalık mekanizması ve ilaç etki mekanizması gibi kompleks süreçleri anlayabilmek için ilgili proteinlerin bir arada değerlendirilmeleri gerekmektedir (Kann, 2007). Günümüzde -omik teknolojilerinin sağladığı kazanımlar sayesinde hücrel süreçleri kimliklendirmek adına biyolojik ağların oluşturulması mümkün olabilmektedir (Vernon *et al.* 2018). Protein-protein etkileşimi (PPI) ağları bu amaç için sıklıkla kullanılan ve karmaşık mekanizmaları anlamlandırmaya yardımcı olmada aracılık eden biyoinformatik tabanlı bir araçtır (Safari-Alighiarloo *et al.* 2014). Bu nedenle STRING online veritabanı (Jensen *et al.* 2009) kullanılarak mevcut çalışmada hedeflenen genler için bir PPI ağı oluşturulmuştur. PPI ağ analizi sonuçları çalışmada incelenen genlerin tamamının bir arada bulunduğunu ve birbirleriyle etkileşim içerisinde olduğunu göstermiştir (Şekil 36). Bu sonuç da yine DOX'un manipüle ettiği tüm bu kritik faktörlerin tek başına TA ile manipüle edilebileceğini, yani TA'nın DOX toksisitesine karşı bütüncül bir koruyuculuk sağlayabileceğini kanıtlamaktadır.



Şekil 36. STRING veri tabanı aracılığı ile oluşturulan ve çalışmada incelenen hedeflerin ilişkisini gösteren PPI ağı.

Sonuç olarak, bu çalışma, kümülatif DOX uygulamasının sıçanların böbrek dokularında antioksidan, inflamatuvar ve apoptotik sistem üzerinden hasara yol açtığını göstermektedir. Ek olarak, TA'nın DOX ile birlikte kullanımının DOX kaynaklı böbrek hasarına karşı koruma sağladığı ortaya konulmuştur. Bu bağlamda, DOX'un neden olduğu patolojik olguların altında yatan mekanizmaların kesin olarak anlaşılmasına yönelik çalışmalar devam etse de, TA uygulamasının klinikte kullanılan ilacın terapötik etkinliğini değiştirmeden kemoterapi kaynaklı nefrotoksisiteyi hafifletmede alternatif, çok yönlü ve etkin bir yaklaşım olarak kabul edilebileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- A Baudino, T. (2015). Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Current drug discovery technologies*, 12(1), 3-20.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant science*, 196, 67-76.
- Ahmad, S. T., & Sultana, S. (2012). Tannic acid mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Human & experimental toxicology*, 31(2), 145-156.
- 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.
- Aksu, E. H., Kandemir, F. M., & Küçükler, S. (2021). Ameliorative effect of hesperidin on streptozotocin-diabetes mellitus-induced testicular DNA damage and sperm quality degradation in Sprague–Dawley rats. *Journal of Food Biochemistry*, 45(10), e13938.
- Al Maruf, A., Lip, H., Wong, H., & O'Brien, P. J. (2015). Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal-or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. *Chemico-biological interactions*, 234, 96-104.
- 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.
- Amararathna, M., Johnston, M. R., & Rupasinghe, H. P. (2016). Plant polyphenols as chemopreventive agents for lung cancer. *International journal of molecular sciences*, 17(8), 1352.
- Antonucci, S., Di Sante, M., Tonolo, F., Pontarollo, L., Scalcon, V., Alanova, P., Menabò, R., Carpi, A., Bindoli, A., Rigobello, M. P., Giorgio, M., Kaludercic, N., & Di Lisa, F. (2021). The Determining Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Monoamine Oxidase Activity in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Antioxidants & redox signaling*, 34(7), 531–550.
- Aravindaram, K., & Yang, N. S. (2010). Anti-inflammatory plant natural products for cancer therapy. *Planta medica*, 76(11), 1103-1117.
- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768-780.
- ATLI, H. (2015). Doksorubisin ile oluşturulan deneysel böbrek hasarında Cardamom'un böbrek dokusu üzerine koruyucu etkilerinin incelenmesi/The investigation of protective effects of Cardamom on renal tissue in doxorubicin induced experimental renal damage.
- 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).
- Austin, C. A., Lee, K. C., Swan, R. L., Khazeem, M. M., Manville, C. M., Cridland, P., ... & Cowell, I. G. (2018). TOP2B: the first thirty years. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2765.
- Ayla, S., Seckin, I., Tanriverdi, G., Cengiz, M., Eser, M., Soner, B. C., & Oktem, G. (2011).

- Doxorubicin induced nephrotoxicity: protective effect of nicotinamide. *International journal of cell biology*, 2011.
- Ayla, Ş., Oktar, H., Tanrıverdi, G., Cengiz, M., Özkılıç, A. Ç., Can, G., ... & Batur, Ş. (2009). Doksorubisin Nedenli Sıçan Hepatotoksitesine Nikotinainidin (Koruyucu) Etkisi. *Anadolu University Journal of Sciences & Technology*, 10(1).
- Ba, M. C., Ba, Z., Cui, S. Z., Gong, Y. F., Chen, C., Lin, K. P., Wu, Y. B., & Tu, Y. N. (2019). Thermo-chemotherapy inhibits the proliferation and metastasis of gastric cancer cells via suppression of EIF5A2 expression. *OncoTargets and therapy*, 12, 6275–6284.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Ray, S. D., Sen, C. K., & Preuss, H. G. (2002). Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 260-270.
- Barabási, A. L., & Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature reviews. Genetics*, 5(2), 101–113.
- Barrett, L. W., Fletcher, S., & Wilton, S. D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and molecular life sciences*, 69(21), 3613-3634.
- 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)
- Benzer, F., Kandemir, F. M., Ozkaraca, M., Kucukler, S., & Caglayan, C. (2018). Curcumin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by abrogation of inflammation, apoptosis, oxidative DNA damage, and protein oxidation in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(2), e22030.
- 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.
- Bonnard, B., Martínez-Martínez, E., Fernández-Celis, A., Pieronne-Deperrois, M., Do, Q. T., Ramos, I., ... & Jaisser, F. (2021). Antifibrotic effect of novel neutrophil gelatinase-associated lipocalin inhibitors in cardiac and renal disease models. *Scientific reports*, 11(1), 1-11.
- Borba, M. A. C. (2016). Rosângela FF de Araújo, Danyelly Bruneska G. Martins and. A Master Regulator of Oxidative Stress The Transcription Factor Nrf2, 2185.
- Brown, D. I., & Griendling, K. K. (2015). Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circulation research*, 116(3), 531-549.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 25(3), 287-299.
- Caglayan, C., Kandemir, F. M., Yildirim, S., Kucukler, S., & Eser, G. (2019). Rutin protects mercuric chloride-induced nephrotoxicity via targeting of aquaporin 1 level, oxidative stress, apoptosis and inflammation in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54, 69-78.

- Cai, F., Luis, M. A. F., Lin, X., Wang, M., Cai, L., Cen, C., & Biskup, E. (2019). Anthracycline-induced cardiotoxicity in the chemotherapy treatment of breast cancer: Preventive strategies and treatment. *Molecular and clinical oncology*, 11(1), 15-23.
- Celik, H., Kucukler, S., Ozdemir, S., Comakli, S., Gur, C., Kandemir, F. M., & Yardim, A. (2020). Lycopene protects against central and peripheral neuropathy by inhibiting oxaliplatin-induced ATF-6 pathway, apoptosis, inflammation and oxidative stress in brains and sciatic tissues of rats. *Neurotoxicology*, 80, 29-40.
- 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: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 56, 198–206.
- Chu, X., Wang, H., Jiang, Y. M., Zhang, Y. Y., Bao, Y. F., Zhang, X., ... & Dong, Y. S. (2016). Ameliorative effects of tannic acid on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in vivo and in vitro. *Journal of pharmacological sciences*, 130(1), 15-23.
- Corrie, P. G. (2011). Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, 39(12), 717-722.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Cummings, J., Anderson, L., Willmott, N., & Smyth, J. F. (1991). The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 27(5), 532-535.
- Cunha-Oliveira, T., Cristina Rego, A., & R Oliveira, C. (2013). Oxidative stress and drugs of abuse: an update. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 10(4), 321-334.
- Deres, P., Halmosi, R., Toth, A., Kovacs, K., Palfi, A., Habon, T., ... & Toth, K. (2005). Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 45(1), 36-43.
- 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.
- Ding, G., Fang, J., Tong, S., Qu, L., Jiang, H., Ding, Q., & Liu, J. (2015). Over-expression of lipocalin 2 promotes cell migration and invasion through activating ERK signaling to increase SLUG expression in prostate cancer. *The Prostate*, 75(9), 957-968.
- Drevet, J. R. (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Molecular and cellular endocrinology*, 250(1-2), 70-79.
- Dupré-Crochet, S., Erard, M., & Nüße, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where?. *Journal of leukocyte biology*, 94(4), 657-670.
- Ďuračková, Z., & Gvozdjáková, A. (2008). Oxidants, antioxidants and oxidative stress. In *Mitochondrial medicine* (pp. 19-54). Springer, Dordrecht.
- El-Shenawy, N. S. (2010). Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. *Toxicology in vitro*, 24(4), 1148-1157.
- Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect molecular biology*, 14(1), 3-8.
- Erdelyi, K., Kiss, A., Bakondi, E., Bai, P., Szabo, C., Gergely, P., ... & Virag, L. (2005). Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549

- cells. *Molecular pharmacology*, 68(3), 895-904.
- Estanqueiro, M., Amaral, M. H., Conceição, J., & Lobo, J. M. S. (2015). Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 126, 631-648.
- Farahmand, S. K., Samini, F., Samini, M., & Samarghandian, S. (2013). Safranal ameliorates antioxidant enzymes and suppresses lipid peroxidation and nitric oxide formation in aged male rat liver. *Biogerontology*, 14(1), 63-71.
- Farhan, M., Wang, H., Gaur, U., Little, P. J., Xu, J., & Zheng, W. (2017). FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer. *International journal of biological sciences*, 13(7), 815.
- Farhane, Z., Bonnier, F., Casey, A., & Byrne, H. J. (2015). Raman micro spectroscopy for in vitro drug screening: subcellular localisation and interactions of doxorubicin. *Analyst*, 140(12), 4212-4223.
- Fidanci, E. (2015). Ligamentum flavum hipertrofisi olan ve olmayan hastalarda COX-2, IL-15, IL-8, TNF-ALFA, IL-1 beta, IL-6, IL-1 alfa genlerinin ekspresyonları.
- 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.
- Frisard, M., & Ravussin, E. (2006). Energy metabolism and oxidative stress. *endocrine*, 29(1), 27-32.
- Galati and O'brien, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I. (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current medicinal chemistry*, 16(25), 3267-3285.
- Gallelli, C. A., Calcagnini, S., Romano, A., Koczwara, J. B., De Ceglia, M., Dante, D., ... & Gaetani, S. (2018). Modulation of the oxidative stress and lipid peroxidation by endocannabinoids and their lipid analogues. *Antioxidants*, 7(7), 93.
- 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.
- Ganong, W. F. (2002). *Tıbbi Fizyoloji*. 20. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D., & Singla, A. K. (2001). Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy research*, 15(8), 655-669.
- Goel, A., & Aggarwal, B. B. (2010). Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutrition and cancer*, 62(7), 919-930.
- Gómez-Valenzuela, F., Escobar, E., Pérez-Tomás, R., & Montecinos, V. P. (2021). The inflammatory profile of the tumor microenvironment, orchestrated by cyclooxygenase-2, promotes epithelial-mesenchymal transition. *Frontiers in Oncology*, 11.
- Goodman Gillman, A., & JG, L. L. H. (2001). *The pharmacological basis of therapeutics* 10 th edition. Published by international edition, 690, 573-574.
- 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.
- Guo, H., Golczer, G., Wittner, B. S., Langenbucher, A., Zachariah, M., Dubash, T. D., ... & Haber, D. A. (2021). NR4A1 regulates expression of immediate early genes, suppressing replication stress in cancer. *Molecular Cell*, 81(19), 4041-4058.

- Gur, C., Kandemir, F. M., Darendelioglu, E., Caglayan, C., Kucukler, S., Kandemir, O., & Ileriturk, M. (2021). Morin protects against acrylamide-induced neurotoxicity in rats: an investigation into different signal pathways. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(36), 49808-49819.
- Gustafson, D. L., & Page, R. L. (2013). Cancer chemotherapy. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*, 157-179.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hardman, J. G., & Limbird, L. E. (2001). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill. New York.
- Harris, I. S., & DeNicola, G. M. (2020). The complex interplay between antioxidants and ROS in cancer. *Trends in cell biology*, 30(6), 440-451.
- 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.
- Hsiao, W. W., & Liu, L. (2010). The role of traditional Chinese herbal medicines in cancer therapy—from TCM theory to mechanistic insights. *Planta medica*, 76(11), 1118-1131.
- Hu, L., Zhang, Y., Miao, W., & Cheng, T. (2019). Reactive oxygen species and Nrf2: functional and transcriptional regulators of hematopoiesis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- Hu, X., Wang, H., Lv, X., Chu, L., Liu, Z., Wei, X., ... & Cui, W. (2015). Cardioprotective effects of tannic acid on isoproterenol-induced myocardial injury in rats: further insight into 'French Paradox'. *Phytotherapy Research*, 29(9), 1295-1303.
- 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).
- Huber, P. C., Almeida, W. P., & Fátima, Â. D. (2008). Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. *Química Nova*, 31(5), 1170-1179.
- Ichikawa, Y., Ghanefar, M., Bayeva, M., Wu, R., Khechaduri, A., Prasad, S. V. N., ... & Ardehali, H. (2014). Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *The Journal of clinical investigation*, 124(2), 617-630.
- Imai, H., & Nakagawa, Y. (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 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.
- Jang, S. C., Kim, O. Y., Yoon, C. M., Choi, D. S., Roh, T. Y., Park, J., ... & Gho, Y. S. (2013). Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics

- to malignant tumors. *ACS nano*, 7(9), 7698-7710.
- Jayakaran, T. G. (2014). The effect of drugs in the oral cavity-A review. *Journal of pharmaceutical sciences and research*, 6(2), 89.
- Jeansson, M., Björck, K., Tenstad, O., & Haraldsson, B. (2009). Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(1), 114-122.
- Jendrossek, V., & Handrick, R. (2003). Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 3(5), 343-353.
- Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., Bork, P., & von Mering, C. (2009). STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), D412–D416.
- Jeong, MH, Park, YS, Jeong, DH, Lee, CG, Kim, JS, Oh, SJ, ... & Jo, WS (2014). Cordyceps militaris'in potansiyel bir radyoprotektif ajan olarak in vitro değerlendirilmesi. *Uluslararası Moleküler Tıp Dergisi*, 34 (5), 1349-1357.)
- Jiang, L., Lawsky, H., Coloso, R. M., Dudley, M. A., & Ferraris, R. P. (2001). Intestinal perfusion induces rapid activation of immediate-early genes in weaning rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(4), R1274-R1282.
- Kalaiselvi, P., Pragasa, V., Chinnikrishnan, S., Veena, C. K., Sundarapandian, R., & Varalakshmi, P. (2005). Counteracting adriamycin-induced oxidative stress by administration of N-acetyl cysteine and vitamin E. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 43(8), 834-840.
- Kalyanaraman, B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology*, 1(1), 244-257.
- Kamaraj, S., Anandakumar, P., Jagan, S., Ramakrishnan, G., & Devaki, T. (2011). Hesperidin attenuates mitochondrial dysfunction during benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*, 25(1), 91-98.
- Kamaraj, S., Ramakrishnan, G., Anandakumar, P., Jagan, S., & Devaki, T. (2009). Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo (a) pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Investigational New Drugs*, 27(3), 214-222.
- Kandemir, F. M., Caglayan, C., Aksu, E. H., Yildirim, S., Kucukler, S., Gur, C., & Eser, G. (2020). Protective effect of rutin on mercuric chloride-induced reproductive damage in male rats. *Andrologia*, 52(3), e13524.
- Kann M. G. (2007). Protein interactions and disease: computational approaches to uncover the etiology of diseases. *Briefings in bioinformatics*, 8(5), 333–346.
- Karlsen, J. R., Borregaard, N., & Cowland, J. B. (2010). Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin expression by co-stimulation with interleukin-17 and tumor necrosis factor- α is controlled by I κ B- ζ but neither by C/EBP- β nor C/EBP- δ . *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14088-14100.
- Katiyar, S. K., & Mukhtar, H. (1997). Tea antioxidants in cancer chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry*, 67(S27), 59-67.
- 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., Ahmad, A., & Hadi, S. M. (2000). Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chemico-Biological Interactions*, 125(3), 177-189.
- Khasraw, M., Bell, R., & Dang, C. (2012). Epirubicin: is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 21(2), 142–149.
- 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.
- Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in biochemical sciences*, 32(1), 44-50.
- Kocahan, S., Dogan, Z., Erdemli, E., & Taskin, E. (2017). Protective effect of quercetin against oxidative stress-induced toxicity associated with doxorubicin and cyclophosphamide in rat kidney and liver tissue. *Iranian journal of kidney diseases*, 11(2), 124.
- Koul, A., & Gupta, P. (2013). Phytomodulatory potential of lycopene from *Lycopersicum esculentum* against doxorubicin induced nephrotoxicity.
- 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.
- Kucukler, S., Benzer, F., Yildirim, S., Gur, C., Kandemir, F. M., Bengu, A. S., ... & Dortbudak, M. B. (2021). Protective effects of chrysin against oxidative stress and inflammation induced by lead acetate in rat kidneys: a biochemical and histopathological approach. *Biological Trace Element Research*, 199(4), 1501-1514.
- Kumar, S., Sharma, U. K., Sharma, A. K., & Pandey, A. K. (2012). Protective efficacy of *Solanum xanthocarpum* root extracts against free radical damage: phytochemical analysis and antioxidant effect. *Cellular and Molecular Biology*, 58(1), 174-181.
- 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.
- KÜÇÜKLER, S., ÖZDEMİR, S., ÇOMAKLI, S., & KANDEMİR, F. (2020). Ratlarda izoniazid kaynaklı akciğer hasarına karşı krisinin etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*, 13(2), 161-171.
- Lee, S. J., & Lee, K. W. (2007). Protective effect of (–)-epigallocatechin gallate against advanced glycation endproducts-induced injury in neuronal cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(8), 1369-1373.
- Lee, V. W., & Harris, D. C. (2011). Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology*, 16(1), 30-38.
- Leong, H., Mathur, P. S., & Greene, G. L. (2008). Inhibition of mammary tumorigenesis in the C3 (1)/SV40 mouse model by green tea. *Breast cancer research and treatment*, 107(3), 359-369.
- Lichtman, S. M., Wildiers, H., Launay-Vacher, V., Steer, C., Chatelut, E., & Aapro, M. (2007). International Society of Geriatric Oncology (SIOG) recommendations for the adjustment of dosing in elderly cancer patients with renal insufficiency. *European journal of cancer*, 43(1), 14-34.

- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757–772.
- Lin, C. W., Lu, K. Y., Wang, S. Y., Sung, H. W., & Mi, F. L. (2016). CD44-specific nanoparticles for redox-triggered reactive oxygen species production and doxorubicin release. *Acta biomaterialia*, 35, 280–292.
- 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.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lu, P. (2005, July). Monitoring cardiac function in patients receiving doxorubicin. In *Seminars in nuclear medicine* (Vol. 35, No. 3, pp. 197-201). WB Saunders.
- Lu, J., Wang, Z., Cao, J., Chen, Y., & Dong, Y. (2018). A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 1-18.
- Maciejowski, J., & de Lange, T. (2017). Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(3), 175–186.
- Mates, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 83-104.
- McEvoy, G. K., & Snow, E. K. (Eds.). (2019). *AHFS drug information (2019)*. American Society of Health-System Pharmacists.
- 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.
- Meredith, A. M., & Dass, C. R. (2016). Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(6), 729-741.
- 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.
- Mohan, P., & Rapoport, N. (2010). Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. *Molecular pharmaceutics*, 7(6), 1959-1973.
- Nathan, C., & Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 349-361.
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). SnapShot: reactive oxygen intermediates (ROI). *Cell*, 140(6), 951-951.
- 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.
- Noda, N., & Wakasugi, H. (2001). Cancer and oxidative stress. *Japan Medical Association*

- Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Olson, B., Zhu, X., Norgard, M. A., Diba, P., Levasseur, P. R., Buenafe, A. C., ... & Marks, D. L. (2021). Chronic cerebral lipocalin 2 exposure elicits hippocampal neuronal dysfunction and cognitive impairment. *Brain, behavior, and immunity*, 97, 102-118.
- 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.
- Özdemir, S., Kucukler, S., Çomaklı, S., & Kandemir, F. M. (2020). The protective effect of Morin against ifosfamide-induced acute liver injury in rats associated with the inhibition of DNA damage and apoptosis. *Drug and chemical toxicology*, 1-10.
- Özkocaman, V. (2007). Ekstramedüller toksisite: Değerlendirme, derecelendirme, prognostik faktörler. *THD* 2007, 22.
- Park, E. J., Kwon, H. K., Choi, Y. M., Shin, H. J., & Choi, S. (2012). Doxorubicin induces cytotoxicity through upregulation of perk–dependent ATF3.
- Pawłowska, J., Tarasiuk, J., Wolf, C. R., Paine, M. J., & Borowski, E. (2003). Differential ability of cytostatics from anthraquinone group to generate free radicals in three enzymatic systems: NADH dehydrogenase, NADPH cytochrome P450 reductase, and xanthine oxidase. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 13(5), 245-252., 13(5):245-252.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical biochemistry*, 16(2), 359-364.
- Ponugoti, B., Dong, G., & Graves, D. T. (2012). Role of forkhead transcription factors in diabetes-induced oxidative stress. *Experimental diabetes research*, 2012.
- Pugazhendhi, A., Edison, T. N. J. I., Velmurugan, B. K., Jacob, J. A., & Karuppusamy, I. (2018). Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life sciences*, 200, 26-30.
- Qi, W., Boliang, W., Xiaoxi, T., Guoqiang, F., Jianbo, X., & Gang, W. (2020). Cardamonin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by restraining oxidative stress and inflammation associated with Nrf2 signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 122, 109547.
- Qin, S. Y., Zhang, A. Q., Cheng, S. X., Rong, L., & Zhang, X. Z. (2017). Drug self-delivery systems for cancer therapy. *Biomaterials*, 112, 234-247.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014.
- Rains, J. L., & Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 567-575.
- Raj, S., Franco, V. I., & Lipshultz, S. E. (2014). Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review

- of pathophysiology, diagnosis, and treatment. Current treatment options in cardiovascular medicine, 16(6), 1-14.
- 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.
- Rehman, M. U., Khan, R., Lateef, M. A., & Ali, F. (2012). Amelioration of 1, 2 Dimethylhydrazine (DMH) Induced Colon Oxidative Stress, Inflammation and Tumor Promotion. *Asian Pac. J. Cancer Prev*, 13, 4393.
- 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.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology and medicine*, 49(11), 1603-1616.
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(4), 853.
- 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), 17–31.
- 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.
- Salazar-Mendiguchía, J., González-Costello, J., Roca, J., Ariza-Solé, A., Manito, N., & Cequier, Á. (2014). Anthracycline-mediated cardiomyopathy: basic molecular knowledge for the cardiologist. *Archivos de cardiología de México*, 84(3), 218-223.
- Sallustio, B. C., & Boddy, A. V. (2021). Is there scope for better individualisation of anthracycline cancer chemotherapy?. *British journal of clinical pharmacology*, 87(2), 295–305.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2013). Crosstalk between oxidative stress and SIRT1: impact on the aging process. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 3834-3859.
- 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.
- Santos, M. L. C., de Brito, B. B., da Silva, F. A. F., dos Santos Botelho, A. C., & de Melo, F. F. (2020). Nephrotoxicity in cancer treatment: An overview. *World journal of clinical oncology*, 11(4), 190.
- Sastre, J., Pallardó, F. V., & Viña, J. (2003). The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(1), 1-8.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24(10), R453-R462.

- 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.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75(2), 163-189.
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A. M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular nutrition & food research*, 53(S2), S310-S329.
- 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.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical journal*, 360(1), 1-16.
- Shin, M., Matsunaga, H., & Fujiwara, K. (2010). Differences in accumulation of anthracyclines daunorubicin, doxorubicin and epirubicin in rat tissues revealed by immunocytochemistry. *Histochemistry and cell biology*, 133(6), 677-682.
- Singal, P. K., Iliskovic, N., Li, T., & Kumar, D. (1997). Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *The FASEB Journal*, 11(12), 931-936.
- Siswanto, S., Arozal, W., Juniantito, V., Grace, A., & 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.
- Siswanto, S., Arozal, W., Juniantito, V., Grace, A., & 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.
- So, T. H., Chan, S. K., Lee, V. F., Chen, B. Z., Kong, F. M., & Lao, L. X. (2019). Chinese medicine in cancer treatment—how is it practised in the East and the West?. *Clinical Oncology*, 31(8), 578-588.
- Soetaert, F., Korangath, P., Serantes, D., Fiering, S., & Ivkov, R. (2020). Cancer therapy with iron oxide nanoparticles: Agents of thermal and immune therapies. *Advanced drug delivery reviews*, 163, 65-83.
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M. E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*, 12(1), 376-390.
- 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
- Su, Z., Ye, J., Qin, Z., & Ding, X. (2015). Protective effects of madecassoside against Doxorubicin induced nephrotoxicity in vivo and in vitro. *Scientific reports*, 5(1), 1-14.
- Sun, Y. I., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497-500.
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J., & Sevanian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1-2), 269-285.
- 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.
- Taskin, E., & Dursun, N. (2012). The protection of selenium on adriamycin-induced mitochondrial damage in rat. *Biological trace element research*, 147(1), 165-171.
- Temel, Y., Kucukler, S., Yıldırım, S., Caglayan, C., & Kandemir, F. M. (2020). Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 393(3), 325-337.
- Tia, N., Singh, A. K., Pandey, P., Azad, C. S., Chaudhary, P., & Gambhir, I. S. (2018). Role of Forkhead Box O (FOXO) transcription factor in aging and diseases. *Gene*, 648, 97-105.
- Tiwari, S. K., Shaik, A. S., Shaik, A. P., Alyousef, A. A., Bardia, A., Habeeb, M. A., & Khan, A. A. (2019). Gene expression patterns of COX-1, COX-2 and iNOS in H. Pylori infected histopathological conditions. *Microbial pathogenesis*, 135, 103634.
- 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.
- Tocchetti, C. G., Cadeddu, C., Di Lisi, D., Femminò, S., Madonna, R., Mele, D., ... & Mercurio, G. (2018). Comprehensive Invited Review From molecular mechanisms to clinical management of antineoplastic drug-induced cardiovascular toxicity: A translational overview.
- Top, S. M., Preston, C. M., Dukes, J. S., & Tharayil, N. (2017). Climate influences the content and chemical composition of foliar tannins in green and senesced tissues of *Quercus rubra*. *Frontiers in plant science*, 8, 423.
- Toroz, D., & Gould, I. R. (2019). A computational study of Anthracyclines interacting with lipid bilayers: Correlation of membrane insertion rates, orientation effects and localisation with cytotoxicity. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Torres, V. M., & Simic, V. D. (2012). Doxorubicin-induced oxidative injury of cardiomyocytes—do we have right strategies for prevention. *Cardiotoxicity of oncologic treatments*, 89-130.
- 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.
- Trachtenberg, B. H., Landy, D. C., Franco, V. I., Henkel, J. M., Pearson, E. J., Miller, T. L., & Lipshultz, S. E. (2011). Anthracycline-associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Pediatric cardiology*, 32(3), 342-353.
- Troxell, M. L., Higgins, J. P., & Kambham, N. (2016). Antineoplastic treatment and renal injury: an update on renal pathology due to cytotoxic and targeted therapies. *Advances in Anatomic Pathology*, 23(5), 310-329.
- 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.
- Tung, M. C., Hsieh, S. C., Yang, S. F., Cheng, C. W., Tsai, R. T., Wang, S. C., ... & Hsieh, Y. H. (2013). Knockdown of lipocalin-2 suppresses the growth and invasion of prostate cancer cells. *The Prostate*, 73(12), 1281-1290.
- 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. *The Journal of physiology*, 552(2), 335-344.
- Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., & Capella, G. (2010). Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current pharmaceutical design*, 16(1), 3-10.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Van Raamsdonk, J. M., & Hekimi, S. (2012). Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(15), 5785-5790.
- Varricchi, G., Ameri, P., Cadeddu, C., Ghigo, A., Madonna, R., Marone, G., . . . Tocchetti, C. G. Antineoplastic drug-induced cardiotoxicity: A redox perspective. *Front Physiol*. 2018; 9: 167.
- 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.
- Vernon, S. T., Hansen, T., Kott, K. A., Yang, J. Y., O'Sullivan, J. F., & Figtree, G. A. (2019). Utilizing state-of-the-art “omics” technology and bioinformatics to identify new biological mechanisms and biomarkers for coronary artery disease. *Microcirculation*, 26(2), e12488.
- Volkova, M., & Russell, R. (2011). Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Current cardiology reviews*, 7(4), 214-220.
- Vurusaner, B., Poli, G., & Basaga, H. (2012). Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 7-18.
- Wang J, Lei K, Han F: Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018, 22(12):3855-3864.
- Wang, Y., Wei, X., Zhang, C., Zhang, F., & Liang, W. (2010). Nanoparticle delivery strategies to target doxorubicin to tumor cells and reduce side effects. *Therapeutic delivery*, 1(2), 273-287.
- Wilmsen, P. K., Spada, D. S., & Salvador, M. (2005). Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(12), 4757-4761.
- Wojtacki, J., Lewicka-Nowak, E., & Lesniewski-Kmak, K. (2000). Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention-review of the literature. *Medical Science Monitor*, 6(2), 411-420.
- 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.
- World Health Organization. Noncommunicable diseases country profiles 2018. Geneva: World Health Organization. 2018. <https://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2018/en/>. Last accessed 29 March 2021.
- 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, G., Ahn, J., Chang, S., Eguchi, M., Ogier, A., Han, S., ... & Sweeney, G. (2012). Lipocalin-2 induces cardiomyocyte apoptosis by increasing intracellular iron accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4808-4817.
- Yang, C. M., Yang, C. C., Hsiao, L. D., Yu, C. Y., Tseng, H. C., Hsu, C. K., & Situmorang, J. H. (2021). Upregulation of COX-2 and PGE2 Induced by TNF- α Mediated Through TNFR1/MitoROS/PKC α /P38 MAPK, JNK1/2/FoxO1 Cascade in Human Cardiac Fibroblasts. *Journal of inflammation research*, 14, 2807–2824.
- Yang, J., Bielenberg, D. R., Rodig, S. J., Doiron, R., Clifton, M. C., Kung, A. L., ... & Moses, M. A. (2009). Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 3913-3918.
- Zhang, J., Duan, D., Song, Z. L., Liu, T., Hou, Y., & Fang, J. (2021). Small molecules regulating reactive oxygen species homeostasis for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 342-394.
- Zhang, Q. Y., Wang, F. X., Jia, K. K., & Kong, L. D. (2018). Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. *Frontiers in pharmacology*, 1253.
- Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L. S., Lyu, Y. L., Liu, L. F., & Yeh, E. T. (2012). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature medicine*, 18(11), 1639–1642.
- Zheng, W., Wen, W. Q., Gustafson, D. R., Gross, M., Cerhan, J. R., & Folsom, A. R. (2002). GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast cancer research and treatment*, 74(1), 9-16.
- Zhou, H., Kato, A., Miyaji, T., Yasuda, H., Fujigaki, Y., Yamamoto, T., ... & Hislide, A. (2006). Uric acid marker for oxidative stress in kidneys in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Nephrology Analysis Transplantation*, 21(3), 616-623.
- Zhu, H., Sarkar, S., Scott, L., Danelisen, I., Trush, M. A., Jia, Z., & Li, Y. R. (2016). Doxorubicin Redox Biology: Redox Cycling, Topoisomerase Inhibition, and Oxidative Stress. *Reactive oxygen species (Apex, N.C.)*, 1(3), 189–198.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Esra Nur YEŞİLKENT
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Anadolu İmam Hatip 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	
-	