



**T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

**DOKSORUBİSİNİN KARACİĞERDE MEYDANA GETİRDİĞİ
HASARIN VE BU HASARA KARŞI PROPOLİSİN OLASI
KORUYUCU ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
İNCELENMESİ**

NURŞEN ORAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ GÜLGÜN ÇAKMAK ARSLAN**

DÜZCE, 2022

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKSORUBİSİNİN KARACİĞERDE MEYDANA GETİRDİĞİ
HASARIN VE BU HASARA KARŞI PROPOLİSİN OLASI
KORUYUCU ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
İNCELENMESİ

Nurşen ORAK tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Gülgün ÇAKMAK ARSLAN
Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Gülgün ÇAKMAK ARSLAN
Düzce Üniversitesi

Doç. Dr. Serpil UĞRAŞ
Düzce Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK
Atatürk Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 28/06/2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

28 Haziran 2022

Nurşen ORAK



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Gülgün ÇAKMAK ARSLAN'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca benden maddi, manevi desteğini esirgemeyen AİLEME sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP-2019.05.01.936 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

28 Haziran 2022

Nurşen ORAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
KISALTMALAR.....	xi
SİMGELER	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. ANTRASİKLİNLER.....	1
1.1.1. Doksorubisin (DOX)	2
1.1.1.1. DOX'un Kimyasal Yapısı.....	3
1.1.1.2. DOX'un Farmakokinetiği ve Metabolizması.....	3
1.1.1.3. DOX'un Etki Mekanizması.....	4
1.1.1.4. DOX'un Yan Etkileri.....	6
1.1.1.5. DOX Hepatotoksitesitesi.....	6
1.2. SERBEST RADİKALLER.....	7
1.2.1. Serbest Radikal Kaynakları.....	7
1.2.2. Biyolojik Sistemlerde Sık Rastlanan Serbest Radikaller	8
1.2.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri	10
1.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ	11
1.3.1. Antioksidan Maddelerin Sınıflandırılması.....	13
1.4. PROPOLİS	14
1.4.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri.....	14
1.4.2. Propolisin Kimyasal İçeriği	15
1.4.3. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri.....	17
1.4.4. Propolisin Diğer Toksik Ajanlara Karşı Koruyucu Etkileri ve Toksik Etkisi	18
1.5. KARACİĞER	19
1.5.1. Karaciğerin Yapısı.....	19
1.5.2. Karaciğerin Görevleri	21
1.6. ELEKTROMANYETİK IŞIMA VE SPEKTROSKOPİ	22
1.6.1. Kızılötesi Spektroskopisi	23
1.6.2. Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	25
1.6.3. Azaltılmış Toplam Yansıma (ATR)-FTIR Spektroskopisi	27
1.7. ÇALIŞMANIN AMACI	28
2. MATERYAL VE YÖNTEM	32
2.1. SARF MALZEMELER.....	32
2.2. PROPOLİSİN İÇERİK ANALİZİ	32
2.2.1. Fitokimyasal Tarama	32
2.2.2. Toplam Fenolik Madde Analizi.....	32
2.2.3. Toplam Flavonoid Madde Analizi.....	33
2.2.4. Antioksidan Kapasite Analizi (CUPRAC).....	33

2.2.5. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini.....	34
2.2.6. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Tayini	34
2.3. HAYVAN DENEYLERİ	34
2.4. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER.....	35
2.4.1. Total Oksidan Seviyenin (TOS) Ölçülmesi.....	35
2.4.2. Total Antioksidan Seviyenin Ölçülmesi.....	35
2.4.3. Oksidatif Stres İndeksinin Saptanması	36
2.5. ATR-FTIR SPEKTROSKOPİSİ ÇALIŞMALARI	36
2.5.1. Spektral Verilerin Toplanması.....	36
2.5.2. Spektroskopisi Çalışmalarında Kullanılan Spektrum Analiz Yöntemleri.....	37
2.6. İSTATİSTİKSEL TEST.....	38
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
3.1. BULGULAR.....	39
3.1.1. Propolisin Fitokimyasal Analizi	39
3.1.2. Propolisin İçerik Analizi	39
3.1.3. Propolisin Toplam Madde Miktarı ve Antioksidan Kapasitesi.....	40
3.1.4. Biyokimyasal Analiz Sonuçları.....	41
3.1.5. ATR-FTIR Spektroskopisi Sonuçları	42
3.2. TARTIŞMA.....	70
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	83
5. KAYNAKLAR.....	86
ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Klinikte yaygın kullanılan bazı antrasiklinlerin yapıları [1].	2
Şekil 1.2. Doksorubisinin moleküler yapısı [1].	3
Şekil 1.3. DOX'unreaktif oksijen türlerini oluşturmaları [1].	5
Şekil 1.4. Doksorubisin- demir kompleksi [1].	5
Şekil 1.5. Serbest radikallerin hücresel hedefleri [47].	10
Şekil 1.6. Antioksidan moleküllerin hücredeki etkileri (SOD: Süperoksit dismutaz SER: Granülsüz endoplazmik retikulum, DNA: Deoksiribo nükleik asit, RER: Granüllü endoplazmik retikulum, GSH: Glutasyon, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz) [47].	12
Şekil 1.7. Antioksidan maddelerin gruplandırılması [47].	13
Şekil 1.8. PRPLS salgılayan arı.	14
Şekil 1.9. Ham PRPLS.	15
Şekil 1.10. Ham PRPLS bileşimi [63],[64].	16
Şekil 1.11. Karaciğerin yapısı.	19
Şekil 1.12. Karaciğerin lobüler yapısı	20
Şekil 1.13. Karaciğer hücreleri [85].	21
Şekil 1.14. Elektromanyetik ışıma çeşitleri [88].	22
Şekil 1.15. Enerji düzey diyagramı [89].	23
Şekil 1.16. İnfrared spektrumunda ortaya çıkan bağ titreşim hareketleri [95].	25
Şekil 1.17. FTIR spektroskopisinin çalışma prensibi [97].	26
Şekil 1.18. ATR-FTIR spektroskopisi çalışma prensibi [97].	27
Şekil 2.1. 4000-450 cm ⁻¹ bölgesinde elde edilmiş bir background spektrumu (Yeksenindeki "A.U" arbitrary unit (göreceli birim).	37
Şekil 3.1. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının TAS (A), TOS (B) ve OSI (C) değerlerindeki değişim (*p<0,05, **p<0.01).	41
Şekil 3.2. Kontrol sıçan karaciğerinin 4000-950 cm ⁻¹ bölgesindeki FTIR spektrumu	43
Şekil 3.3. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçan karaciğerine ait 3700-3025 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki ortalama ATR-FTIR spektrumları (Spektrumlar, CH ₂ antisimetrik bantına göre normalize edilmiştir.).	47
Şekil 3.4. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid A bantının alan değerlerindeki değişim (*p<0,05, **p<0.01).	48
Şekil 3.5. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçan karaciğerine ait 3025-2800 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki ortalama ATR-FTIR spektrumları (Spektrumlar, Amid A bantına göre normalize edilmiştir.).	48
Şekil 3.6. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH ₃ antisimetrik (A),CH ₂ antisimetrik (B) ve CH ₂ simetrik (C) bantların alan değerlerindeki değişim (*p<0.05).	49
Şekil 3.7. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH ₃ simetrik bantının alan değerlerindeki değişim (*p<0.05).	50
Şekil 3.8. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçan karaciğerine ait 1800-950 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki ortalama ATR-FTIR spektrumları (Spektrumlar, Amid A bantına göre normalize edilmiştir.).	50
Şekil 3.9. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının C=O bantının alan değerlerindeki değişim (*p<0.05, **p<0.01).	51

Şekil 3.10. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid I (A) ve Amid II (B) bantlarının alan değerlerindeki değişim (*p<0.05, **p<0.01).	52
Şekil 3.11. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS s gruplarının CH2 bükülme bantının alan değerlerindeki değişim (*p<0.05, **p<0.01).	52
Şekil 3.12. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının COO- simetrik gerilme bantının alan değerlerindeki değişim (*p<0.05).....	53
Şekil 3.13. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid III bantının alan değerlerindeki değişim (*p<0.05).	53
Şekil 3.14. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının PO2- antisimetrik gerilme bantının alan değerlerindeki değişim (*p<0.05, **p<0.01).	54
Şekil 3.15 Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının RNA bantının alan değerlerindeki değişim (*p<0.05).....	55
Şekil 3.16. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının C-O gerilme bantının alan değerlerindeki değişim (*p<0.05, **p<0.01).	55
Şekil 3.17. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının DNA bantının alan değerlerindeki değişim (**p<0.01).	56
Şekil 3.18. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Lipit/Protein oranındaki değişimler (**p<0,01).	59
Şekil 3.19. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının C-O/Protein ve C-O/Lipit oranlarındaki değişimler (**p<0,01).	59
Şekil 3.20. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH2 sim./CH2 sim. + CH2 antisim. ve CH2 antisim./CH2 sim oranlarındaki değişimler (*p<0.05, **p<0.01).	60
Şekil 3.21. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH2 antisim./CH3 antisim.(A), CH2 antisim./Lipit(B) oranlarındaki değişimler (*p<0.05, **p<0.01).	60
Şekil 3.22. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının C=O/lipit oranındaki değişimler (**p<0.01).	61
Şekil 3.23. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH3 antisim./lipit oranındaki değişimler (**p<0.01).	61
Şekil 3.24. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Olefinik=CH/lipit oranındaki değişimler (**p<0,01).	62
Şekil 3.25. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid I/Amid I + II oranındaki değişimler (**p<0.01).	62
Şekil 3.26. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid I/Amid II oranındaki değişimler (**p<0.01).	63
Şekil 3.27. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının C-O/PO2- sim. Bant alan oranındaki değişimler (**p<0.01).	64
Şekil 3.28. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının RNA/DNA bant alan oranındaki değişimler (**p<0.01).	64
Şekil 3.29. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının RNA/Lipit ve RNA/Protein oranındaki değişimler (**p<0.01).	65
Şekil 3.30. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının DNA/Lipit ve DNA/Protein oranındaki değişimler (**p<0.01).	65
Şekil 3.31. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH3 antisim. dalga sayısı (A), CH3 antisim. bant genişliği (B) değerleri (*p<0,05, **p<0,01).....	66
Şekil 3.32. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH2 antisimetrik dalga sayısı (A), CH2 antisimetrik bant genişliği (B), CH2 simetrik dalga sayısı (C), CH2 simetrik bant genişliği (D) değerleri (*p<0,05, **p<0,01). .	67

Şekil 3.33. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid I dalga sayısı (A), Amid I bant genişliği (B) değerleri, Amid II dalga sayısı (C), Amid II bant genişliği(D) değerleri (*p<0,05, **p<0,01).....	68
Şekil 3.34. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının PO2- antisim. Dalga sayısı(A), PO2- antisim. bant genişliği (B) değerleri (**p<0,01).....	69
Şekil 3.35. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının protein ikincil yapılarındaki değişimler. (*p<0,05, **p<0,01). Beta dönüş (Turn) (A), Alfa heliks (B), Tesadüfi kıvrılma (C), Beta-tabaka (D).....	70



ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1. PRPLS içeriğinde tanımlanmış gruplar ve bileşik sayısı.....	16
Çizelge 1.2. İnfrared spektral bölgeler [93].	24
Çizelge 2.1. Sıçan karaciğeri spektrumundaki bantların altında kalan alanların hesaplanması için kullanılan baseline noktaları ve spektral bölgeler.	37
Çizelge 3.1. Propolisin fitokimyasal analizi.	39
Çizelge 3.2. Propolisin İçerik analizi.	40
Çizelge 3.3. Propolisin fenolik ve flavonoid madde miktarı ve antioksidan kapasitesi.	40
Çizelge 3.4. Sıçan karaciğerinin ATR-FTIR spektrumundaki başlıca soğurma bantları [129], [130].	44
Çizelge 3.5. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçanların karaciğer dokularının kızılötesi bantlarının alan değerlerinde meydana gelen değişiklikler (Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi $*p<0,05$; $**p<0,01$ şeklinde gösterilmiştir.	46
Çizelge 3.6. Bazı spektral bantların alan oranları, oran hesaplamalarında kullanılan fonksiyonel gruplar ve hesaplanan oranın işlevi [129],[130],[134],[135]. ..	56
Çizelge 3.7. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçanların karaciğer dokularının kızılötesi bant alan oranları değerlerinde meydana gelen değişiklikler (Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi $*p<0,05$; $**p<0,01$ şeklinde gösterilmiştir).	57
Çizelge 3.7. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçanların karaciğer dokularının kızılötesi bant alan oranları değerlerinde meydana gelen değişiklikler (Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi $*p<0,05$; $**p<0,01$ şeklinde gösterilmiştir).	58
Çizelge 3.8. İkincil türev vektör normalizasyonu metodu ile elde edilen Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçan karaciğer dokusunun protein ikincil yapı değişimi (İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi $*p<0,05$, $**p<0,01$ şeklinde gösterilmiştir).	69

KISALTMALAR

ATR-	Azaltılmış Toplam Yansıma-Fourier
FTIR	Dönüşüm Kızılötesi
DNA	Deoksiribonukleik asit
DOX	Doksorubisin
FTIR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi
IR	İnfrared (Kızılötesi)
MDA	Malondialdehit
RER	Granüllü endoplazmik retikulum
RNA	Ribonükleik asit
SER	Granülsüz endoplazmik retikulum



SİMGELER

A.U	Arbitrary Unit (Göreceli birim)
Ca	Kalsiyum
Di	Elmas
e^-	Elektron
$\underline{\text{Fe}}$	Demir
Ge	Germanyum
H ₂ O	Su
Mg	Magnezyum
Na	Sodyum
$\text{O}_2^{\bullet -}$	Süperoksit radikali
$\text{OH}^{\bullet}$	Hidroksil radikali
Se	Selenyum
Si	Silika
ZnSe	Çinko-selenit

ÖZET

DOKSORUBİSİNİN KARACİĞERDE MEYDANA GETİRDİĞİ HASARIN VE BU HASARA KARŞI PROPOLİSİN OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Nurşen ORAK

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gülgün ÇAKMAK ARSLAN

Haziran 2022, 98 sayfa

Birçok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ajan olan doksorubisin (DOX), hedef dışı organlarda ciddi toksik etkilere sebep olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, DOX'un sıçan karaciğer ve kan dokularında meydana getirdiği zararlı etkileri ve bu hasar üzerinde güçlü antioksidan maddeler içeren bir arı ürünü olan propolis (PRPLS)'in olası koruyucu etkisini Azaltılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşüm Kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi ve biyokimyasal testler ile moleküler düzeyde ortaya çıkarmaktır. Bu amaç doğrultusunda, erkek *Sprague dawley* sıçanlar 4 farklı gruba ayrılmıştır; kontrol (n=7), DOX (2,5 mg/kg'lık 6 enjeksiyon, kümülatif doz: 15 mg/kg; n=7), PRPLS (200 mg/kg, günlük; n=6) ve DOX + PRPLS (15 mg/kg, kümülatif; 200 mg/kg, günlük, sırasıyla; n=7). Sıçanlara 20 gün boyunca her gün 200 mg/kg PRPLS oral gavaj yöntemi ile 2,5 mg/kg DOX 10., 12., 14., 16., 18. ve 20. günlerde intraperitonel olarak verilmiştir. Deneyin 21. günü hayvanlardan karaciğer ve kan örnekleri alınmış, karaciğer dokuları ATR-FTIR spektroskopisi ile incelenmiş, kan plazma örneklerinde total antioksidan seviyesi (TAS) ve total oksidan seviyesi (TOS) ölçülmüş ve oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanmıştır. Sonuçlar DOX'un karaciğerde glikojen ve nükleik asit miktarında azalmaya, lipid ve protein miktarında artışa ve bu moleküllerin metabolizmasında, yapısında ve konformasyonunda bazı önemli değişikliklere sebep olduğunu göstermiştir. DOX ayrıca lipid peroksidasyonuna, membran akışkanlığında bir artışa, membran düzeninde bir azalmaya ve protein denatürasyonuna neden olmuştur. TAS ve TOS deney sonuçları, DOX'un kan dokusunda oksidatif stres yarattığını göstermiştir. PRPLS tek başına verildiğinde karaciğerde herhangi bir toksik etkiye sebep olmamış ancak kanın TAS miktarını artırarak organizmaya fayda sağlamıştır. DOX'tan önce verilen PRPLS DOX'un kanda yarattığı oksidatif stresi önlemiş ancak karaciğer dokusundaki biyomoleküllerde yarattığı zararlı etkilere karşı yeterli koruyucu etki gösterememiştir. Bu çalışma, DOX'un karaciğer ve kan dokularında önemli derecede hasar oluşturduğunu ve PRPLS'nin burada uygulanan doz ve zamanda kandaki oksidatif stresi önlediğini fakat karaciğer dokusunda bu hasarı önlemede yetersiz olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: ATR-FTIR spektroskopisi, Doksorubisin, Karaciğer, Kemoterapi, Propolis.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF DOXORUBICIN-INDUCED DAMAGE ON LIVER AND THE POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT OF PROPOLIS AGAINST THIS DAMAGE AT MOLECULAR LEVEL

Nurşen ORAK

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

Master's Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gülgün ÇAKMAK ARSLAN

June 2019, 98 pages

Doxorubicin (DOX), a chemotherapeutic agent widely used in the treatment of many cancers, causes serious toxic effects in non-target organs. The aim of this study is to examine the harmful effects of DOX on the rat liver and blood tissues and the possible protective effect of propolis (PRPLS), a bee product containing strong antioxidant substances, on these damage at the molecular level with Attenuated Total Reflection-Fourier Transformation Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy and biochemical tests. For this purpose, male *Sprague Dawley* rats were divided into 4 groups; control (n=7), DOX (2.5 mg/kg in six injections; cumulative dose: 15 mg/kg; n=7), PRPLS (200 mg/kg, daily; n=6) and DOX + PRPLS (15 mg/kg, cumulatively; 200 mg/kg, daily; respectively; n=7). The rats were given 200 mg/kg PRPLS by oral gavage every day for 20 consecutive days and 2.5 mg/kg DOX intraperitoneally on the 10th, 12th, 14th, 16th, 18th and 20th day of the experiment. On the 21st day of the experiment liver and blood samples were collected, the liver tissues were examined by ATR-FTIR spectroscopy, total antioxidant level (TAS) and total oxidant level (TOS) were measured in blood plasma samples obtained from animals and oxidative stress index (OSI) was calculated. The results showed that DOX caused a decrease in the amount of glycogen and nucleic acid, an increase in the amount of lipid and protein and some important changes in the metabolism, structure and conformation of these molecules in the liver. It also induced lipid peroxidation, a decrease in membrane order and an increase in membrane dynamics. DOX also induced lipid peroxidation, an increase in membrane fluidity, a decrease in membrane alignment, and protein denaturation. The results of TAS and TOS experiments showed that DOX induces oxidative stress in the blood tissue. When PRPLS was given alone, it did not cause any toxic effects in the liver but it benefited the organism by increasing the amount of TAS in the blood. PRPLS administered before DOX, prevented the oxidative stress induced by DOX in the blood however, it was not able to show a protective effect against the harmful effects of DOX on biomolecules in the liver. This study revealed that DOX causes significant damage to liver and blood tissues, and PRPLS at the dose and time administered here prevents oxidative stress in the blood but is insufficient to prevent this damage in liver tissue.

Keywords: ATR-FTIR spectroscopy, Chemotherapy, Doxorubicin, Liver, Propolis.

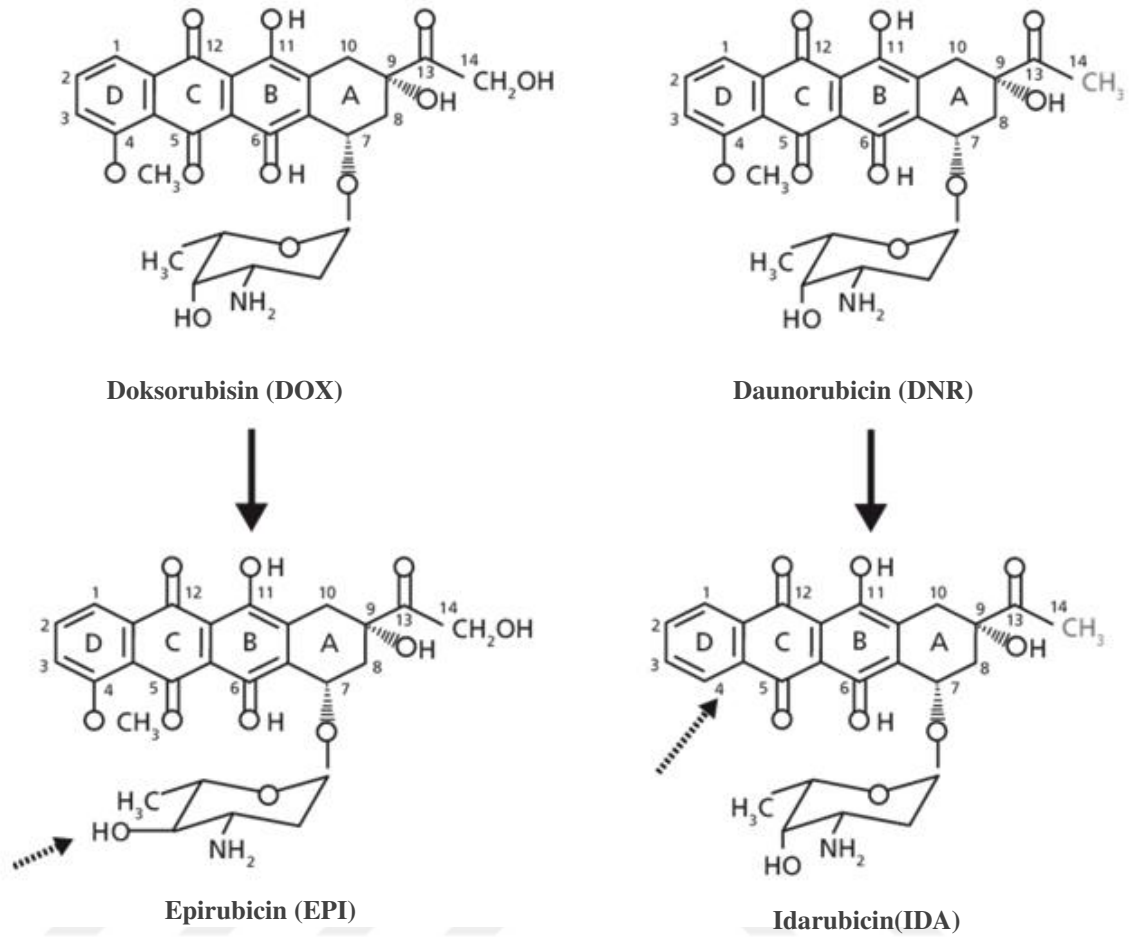
1. GİRİŞ

1.1. ANTRASİKLİNLER

Antrasiklinler, kanser hastalarının tedavisinde sıklıkla tercih edilen, tedavi gücü yüksek etkin bir kemoterapik ilaç grubudur. Çok çeşitli etki mekanizmalarına sahip olan bu ilaçlar, akut kan ve lenf kanserleri, yumuşak ve kemik doku kanserleri başta olmak üzere birçok farklı kanserin tedavisinde kullanılabilmektedir [1].

Antrasiklinler, ilk olarak 1960'lı yıllarda pigment üreten bir mantar türü olan *Streptomyces peucetius*'tan izole edilmiş ve ilk izole edilen iki türü doksorubisin (DOX) ve daunorubisin olarak adlandırılmıştır [1]. Grubun tedavide en yaygın kullanılan bu iki üyesinden başka zorubisin, epirubisin, idarubisin ve aklorubisin gibi türleri vardır. Antrasiklinlerin keşfinden beri önemli gelişmeler gerçekleştirilmiş ve bu ilaçların kanserli hücrelerin tedavisinde antitümör aktiviteleri nedeni ile sağkalım %30'dan %70'lere kadar yükseltilmiştir [2],[3]. Daha sonra birçok antitümör etkili ilaç bulunmuş olmasına rağmen antrasiklinler hala en etkili antikanser ilaçlardır.

Antrasiklin antibiyotikleri sıradışı bir karbonhidrat olan daunosamine bağlı tetrasiklik bir halka yapısına sahiptir. Antrasiklinlerdeki bu karbonhidrat grubu onların suda çözünmesini kolaylaştırdığı için önemlidir. Bu sınıftaki sitotoksik ajanlar, bitişik halkalar üzerinde, elektron kazanımı ve kaybına izin veren kinon ve hidrokinon yan moleküllerine sahiptir [4]. Daunorubisin ve doksorubisin'in klinik kullanımında belirgin farklılıklar olmasına rağmen, kimyasal yapıları yalnızca C14 üzerindeki tek bir hidroksil grubu ile farklılık gösterir [4]. Şekil 1.1, klinikte en yaygın kullanılan antrasiklinlerin yapısını göstermektedir.



Şekil 1.1. Klinikte yaygın kullanılan bazı antrasiklinlerin yapıları [1].

Bu tür ilaçlar pH=7,4'te (fizyolojik pH) (+) yüklüdür ve bundan dolayı bazların arasına girerek DNA'nın yapısında değişikliklere sebep olabilmektedir. Bunun yanısıra antrasiklinlerin düzlemsel yapısı da nükleik asitlerin ikili zinciri arasına girmeyi sağlamaktadır. Bu ilaçlar polimeraz enzimleriyle reaksiyona girerek DNA yapısını bozmakta, RNA, DNA ve protein sentezini inhibe etmekte ve hücre çoğalmasını S fazında durdurmaktadır [2].

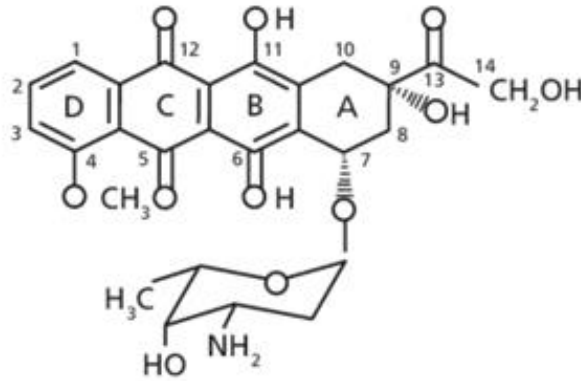
1.1.1. Dokсорubisin (DOX)

Adriamisin olarak ta bilinen Dokсорubisin (DOX) (14-hidroksidaunorubisin), 1969 yılında *Streptomyces peucetius* alttürü *caesius* ATCC 29050'den elde edilen mutant bir soy olan ATCC 27952'den elde edilmiştir [5]. Akciğer kanseri, Nonhodgkin Lenfoma, metastatik meme kanseri, akut lenfoblastik lösemi, Hodgkin Lenfoma over kanseri, yumuşak doku ve kemik sarkomları, hepatoblastom, nöroblastomların tedavisinde kullanılan etkili kemoterapötik bir ilaçtır [6],[7]. Son derece etkili ve geniş spektrumlu

bir ilaç olmasına rağmen yüksek toksisitesi önemli bir problem oluşturmaktadır [8].

1.1.1.1. DOX'un Kimyasal Yapısı

Yapısında kinon içeren bir antrasiklin antibiyotiği olan DOX'un molekül formülü $C_{27}H_{29}NO_{11}HCl$, molekül ağırlığı 579,98 g/mol'dür. DOX tetrasiklik bir halkadan ve daunosamin adı verilen bir amino şekerden oluşur [9]. Daunosamin tetrasiklik halkanın 7. karbonuna glikozidik bağ ile bağlanmıştır. İlaç, tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon gruplarına sahiptir [10]. 13. karbondan bir karbonil grubu ve 14. karbondan bir alkol bağlıdır. Orta derecede lipofilik özellik gösterir [11]. DOX'un moleküler yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 1.2. Doksorubisinin moleküler yapısı [1].

1.1.1.2. DOX'un Farmakokinetiği ve Metabolizması

DOX, sindirim sisteminde inaktif olduğu için genellikle damar içine verilmektedir. Yarılanma süresi 12-18,5 saattir. Uygulamadan sonra hızla parçalanır ve daha az aktif olan metabolitleri, doksorubisinol ve daunorubisinol meydana gelir [1].

DOX ve doksorubisinol (DOX'un ana metaboliti), büyük oranda (yaklaşık %75) plazma proteinleri ile etkileşime girer. Dokulara affinitesi yüksektir. Kan beyin bariyerini geçemez [7],[12]. Karaciğerde çabuk metabolize edilir ancak salınımı yavaştır. Bu nedenle diğer organlara dağılımı ve vücuttaki etkisi uzun sürmektedir. Vücuttan eliminasyonu büyük ölçüde karaciğerden safrayla olmakta bir kısmı da böbreklerden (% 3-10) ve dışkıyla (%40-50) atılmaktadır [13].

Çoğu ilaç gibi DOX'da pasif difüzyon ile hücreye nüfus etmekte ve hücre içinde konsantrasyonu 10-50 kat artmaktadır [14],[15]. Karaciğerin metabolizmadaki görevinden dolayı DOX en fazla bu organda birikmektedir [16]. DOX, lipofilik özelliğinden ve nükleik asit zincirlerinin arasına girebilme özelliğinden dolayı hücrelere hızla girme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle kandaki düzeyi hızla düşmektedir[17].

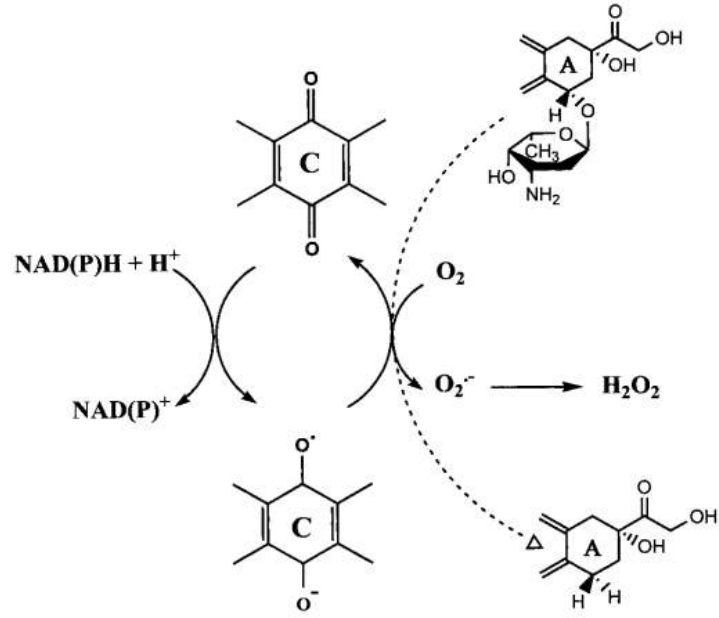
1.1.1.3. *DOX'un Etki Mekanizması*

DOX'un toksik etkilerinde, lipid peroksidasyonu, nükleik asit ve protein sentezi inhibisyonu gibi birçok faktör etkili olabilmektedir. Fakat bu toksik etkilere katkısı en yüksek olanlar oksidatif stres ve enerji metabolizmasında meydana gelen bozulmadır [18],[19]. DOX'un hücreyi apoptoza sürüklediği ve hücre çoğalmasını engellediği, mitokondride fonksiyonel ve yapısal değişikliklere neden olduğu bilinmektedir [20],[21]. DOX'un, DNA çift sarmalının arasına girdiği için transkripsiyonu ve replikasyonu inhibe ettiği bilinmektedir [9].

DOX hücrede hızlı ilerlediği için, DNA çift sarmalının arasına nüfuz ederek helikaz ve topoizomeraz II'yi etkisiz hale getirmektedir. DOX etkisini üç farklı kimyasal tepkimeyle göstermektedir. Bunlardan ikisi hücre transport zinciriyle etkileşimi ile diğeri kromofor yan zincirinin redüktaz enzimi tarafından karbonile indirgenmesi ile ilgilidir. Bu olayın gerçekleşmesi için NADPH gerekmektedir. Bunun sonucunda antineoplastik ve antiproliferatif etkiyi sağlayan doksurubisinol oluşmaktadır [1],[22],[23]. DOX'un yapısında bulunan bir elektronun kinon molekülüne girmesiyle tepkime başlamaktadır. Bu olay NADPH dehidrogenaz aracılığıyla gerçekleşmekte, flavin taşıyan dehidrogenazlar yüzünden semikinon ve serbest radikaller meydana gelmektedir (Şekil 2.3).

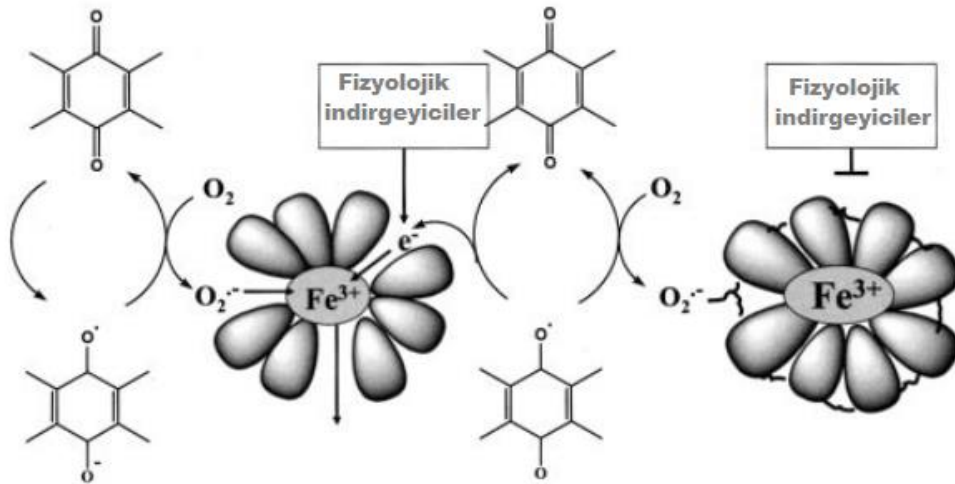
Bu yapı hücre içinde aşağıdaki durumları gerçekleştirebilir:

- 1) RNA ve DNA ve proteinlerine bağlanır.
- 2) İndirgenerek hidrokinon oluşturur.
- 3) Kararlı serbest radikallere dönüşür [1],[22],[23].



Şekil 1.3. DOX'unreaktif oksijen türlerini oluşturması [1].

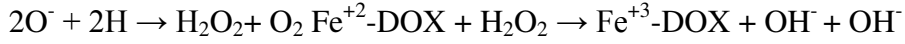
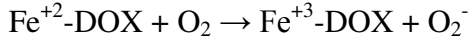
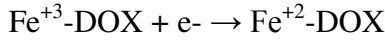
DOX'un toksisitesinde serbest radikallerin oluşması ve antioksidant enzimlerin azalması önemli rol oynar.[24]. DOX etkisi ile oluşan serbest radikaller çoğunlukla $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ ve H_2O_2 (hidrojen peroksit) radikalleridir. Serbest radikaller büyük oranda DOX-demir kompleksi aracılığı ile oluşur.



Şekil 1.4. Doksorubisin- demir kompleksi [1].

DOX bakır ve demiri kuvvetli bir şekilde bağlayabilmektedir. Ortamda oksijen varsa DOX-demir kompleksi meydana gelmekte, Fe^{+3} - DOX bir elektron alarak Fe^{+2} -DOX kompleksine dönüşmektedir. Bu olayın tersinde de serbest $O_2^{\cdot-}$ radikali oluşur. DOX

etkinliği ile serbest radikallerin meydana geliş şekilleri aşağıda verilmiştir [25].



$\text{Fe}^{+3}\text{-DOX}$ yapısı DNA ile bağlanarak üçlü kompleks oluşturup DNA'ya zarar verebilir. Bu kompleks ve OH^- radikalleri sarkoplazmik retikulum ve mitokondri zarlarının taşıma görevlerini engellemekte intrasellüler antioksidan sistemlerini inhibe etmekte ve organellerin peroksidasyona uğramasına sebep olmaktadır [1],[22],[25].

1.1.1.4. *DOX'un Yan Etkileri*

DOX, oldukça geniş spektrumlu ve güçlü etkiye sahip bir ajan olması nedeniyle tümör tedavisinde yaygın olarak kullanılır fakat yan etkileri nedeniyle terapötik kullanımı sınırlıdır [8]. DOX tedavisinde doza bağlı olarak kalp, böbrek ve karaciğerler başta olmak üzere birçok organda şiddetli yan etkiler meydana gelmektedir [26]. Bu ilacın başarısı bir şekilde DOX'un kullanımı, sağ dökülmesi, mide bulantısı, kusma, hematopietik baskılama, ekstremitasyon ve kardiyomiyopati gibi yan etkiler nedeniyle düşmektedir [1].

İlacın karaciğer, kalp ve böbrek gibi organlar üzerindeki toksik etkilerinin oluşmasında oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyonlarda bozulma, apoptoz, miyofibriler bozulma, hücre içi kalsiyum düzenlenmesinde bozukluk, nükleik asit ve protein sentezinin baskılanması gibi çeşitli mekanizmaların rol aldığı ileri sürülmüştür [27],[28],[29].

1.1.1.5. *DOX Hepatotoksisitesi*

İlaç kaynaklı hepatotoksisite sürekli olarak karaciğer hastalıklarının önemli bir sebebi olarak ortaya çıkmaktadır. Bugün ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde akut karaciğer yetmezliğinin önde gelen nedenlerinden biridir [13].

DOX tedavisi esnasında, karaciğer DOX'u alır, biriktirir ve yüksek konsantrasyonlarını metabolize eder. Bu nedenle karaciğerin DOX uygulanmasından en çok etkilenen organlardan biri olduğu düşünölmektedir. DOX uygulanmasından sonra hastaların %40'ında karaciğer hasarı gözlenmektedir [13]. Tek doz DOX uygulanması bile karaciğer dokularında; hepatositlerde dejenerasyon ve pleomorfizm, safra kanalında proliferasyon, stoplazmik eozinofili, parankimal nekroz, santral vende tıkanma ve tromboz ve portal alanda inflamasyon gibi histopatolojik değişikliklere neden

olabilmektedir [30]. Ayrıca DOX, karaciğer ve vücut ağırlığında azalmaya, serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST) düzeylerinde artışa, inflamatuvar hücre infiltrasyonuna ve hepatositlerde nekroza yol açar [31].

DOX'tan kaynaklanan hepatotoksisitenin mekanizması tam olarak açıklığa kavuşturulamamasına rağmen neden olduğu oksidatif hasar yoluyla olduğu düşünülmektedir [13]. Reaktif oksijen türlerinde (ROS) artma, antioksidan ve sülfhidril gruplarında azalma ile lipid peroksidasyonunda artış DOX hepatotoksisitesinin oluşumunda oksidatif stresin anahtar rol oynadığı görüşünü desteklemektedir [28].

1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, ortaklanmamış elektron taşıyan ve biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğiliminde olan atom veya moleküllerdir. Son derece kısa ömürlüdürler ancak orbitallerinde paylaşılmamış elektron bulundurdıkları için oldukça reaktiftirler. Bundan dolayı biyolojik moleküllerle kolayca reaksiyona girerek hücrede önemli hasarlara sebep olurlar [32]. Serbest radikallerin hücredeki bu etkileri sonucu pek çok hastalığın oluştuğu bilinmektedir.

1.2.1. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller; kararsız, son derece kısa ömürlü düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerdir. Bu moleküller hücrede başlıca 3 ana mekanizma ile oluşmaktadır.

1. Bir molekülün elektronunu kaybetmesi yoluyla
2. Bir moleküle elektron eklenmesiyle
3. Kovalent bağların homolitik parçalanmasıyla [33].

Vücuttaki serbest radikallerin endojen ve ekzojen olmak üzere başlıca 2 ana kaynağı vardır:

Endojen Kaynaklar

- Yaşlanma
- Hidrokinonlar, katekolaminler, tioller, tetrahidroproteinler gibi bazı moleküllerin otooksidasyonu
- Prostaglandin sentetaz, lipooksijenaz, NADPH oksidaz, lipooksijenaz, içeren

membran enzimleri ve lipid oksidasyonu

- Mitokondrideki ets
- Antibiyotikler
- İntoksikasyon, travma, iskemi gibi durumlardan sonra oluşan oksidatif stres
- Peroksizomlardaki enzimler
- Adenozin deaminaz, ksantin oksidaz, hemoglobin, triptofan dioksijenaz, gibi proteinler ve enzimler
- Fagositik hücrelerin aktivasyonu [34],[35].

Ekzojen Kaynaklar

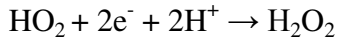
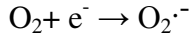
- Stres
- İyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon
- Güneş ışınları
- Metal iyonları
- Gıdalardaki katkı maddeleri
- Ksenobiyotikler, temizlik ürünleri, hiperoksi, pestisitler, hava kirliliği, anestezi maddeleri, nükleer atıklar, solventler, sigara dumanı, volkanik faaliyetler
- Bağımlılık yapan maddelerin kullanımı: Sigara, alkol, ve uyuşturucu maddeler
- Kimyasal maddeler: Bleomisin, Sisplatin, metotreksat, doksorubisin, siklosporin gibi kanser ilaçları ve doğum kontrol hapları [33],[36].

1.2.2. Biyolojik Sistemlerde Sık Rastlanan Serbest Radikaller

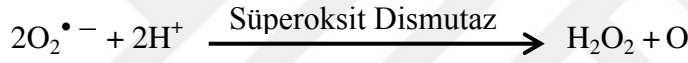
Biyolojik sistemlerde radikaller oksijen kaynaklı ve nitrojen kaynaklı olmak üzere iki çeşittir. Süperoksit ($\cdot O_2^-$), hidroksil ($\cdot OH$) ve peroksil ($ROO\cdot$) radikalleri gibi serbest oksijen radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit ($HOCl$) ve ozon gibi non-radikaller oksijenin metabolik yolağında oluşan reaktif oksijen türleridir (ROS). Reaktif nitrojen türleri (RNS) ise nitrojen kaynaklı radikaller ve non-radikallerdir. Bunlar nitrojen dioksit, nitrik oksit radikalleri ve peroksinitrittir. RNS'ler indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) aracılığıyla nitrik oksit ve süperoksitten türevlenirler [37],[38].

Serbest oksijen radikalleri, moleküler oksijenin indirgenmesi ile açığa çıkmaktadır [39]. Hidrojen peroksit ve süperoksit ilk oluşan ROS türleridir. Hidroksil radikalının oluşum reaksiyonunda demir, bakır ve manganez gibi metaller katalizör olarak kullanılmaktadır [40].

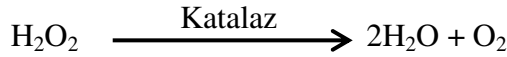
Oksijen atomunun bir elektron (e^-) alarak indirgenmesi sonucunda süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşmaktadır [41]. Oksijen molekülüne iki elektron eklenmesi ile oluşan non-radikal bir reaktif olan hidrojen peroksit ise zararlı oksijen radikallerine dönüşebilme yeteneğindedir [39],[42] (HO_2 : Perhidroksi radikal).



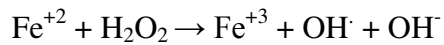
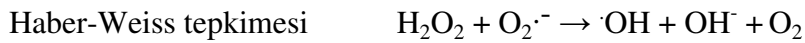
Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin esas üretimi süperoksit dismutasyonu ile gerçekleşmektedir ve bunun sonucunda moleküler oksijen meydana gelmektedir [43].



Oluşan hidrojen peroksit, “katalaz” enzimi sayesinde oksijen ve suya ayrışmaktadır [44].



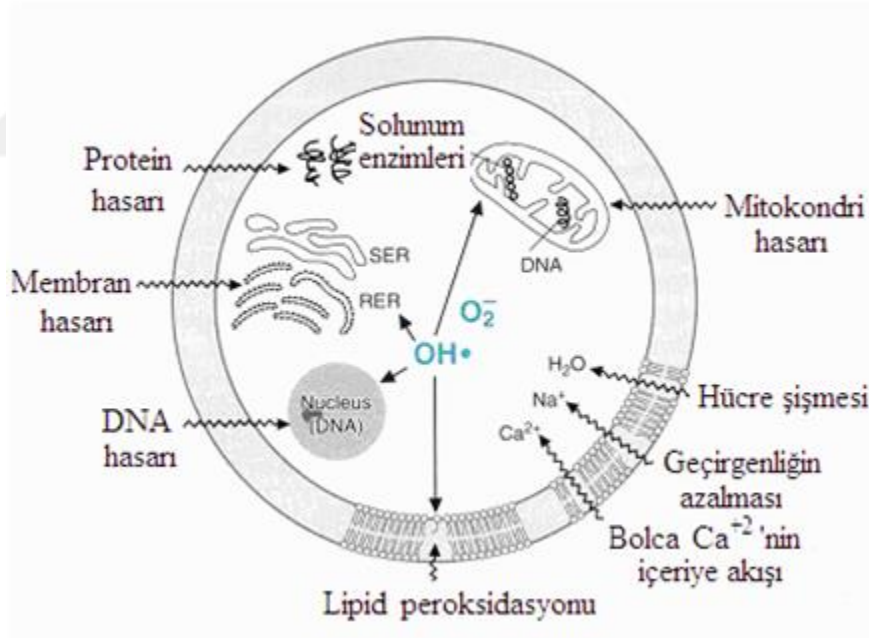
Hidrojen peroksit'in süperoksitle reaksiyonundan hücre için oldukça toksik olan hidroksil radikali oluşmaktadır (Haber-Weiss reaksiyonu) [32]. Hidroksil radikalının bir diğer oluşum mekanizması ise demir ile katalizlenen Fenton reaksiyonudur.



1.2.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Vücutta serbest radikallerin meydana geliş ve ortadan kaldırılış hızı arasında bir denge vardır. Serbest radikal miktarındaki artış, oksidatif stres başlatmaktadır. Oksidatif stres temel olarak ROS ile onları nötralize eden antioksidanların vücuttaki antioksidan mekanizma ve serbest radikal oluşumu arasındaki dengesizlik olarak ifade edilebilir [45]. Serbest radikaller aerobik metabolizma ile yüksek oranda ve sürekli olarak üretilirler. Antioksidan sistemlerin yetersizliği durumunda protein, nükleik asit, DNA ve lipid makromoleküllerinin oksidasyonuna neden olurlar [45],[46].

Şekil 1.5'te gösterildiği gibi serbest radikaller hücrede oksidan hasara duyarlı biyomolekülleri oksitler ve DNA'nın değişmesine, protein, karbonhidrat ve lipid yapısının bozulmasına, enzim aktivitesinin engellenmesine ve hücresel makromoleküllerin hasara uğramasına neden olur ve sonuçta oksidatif stres ortaya çıkar [47].



Şekil 1.5. Serbest radikallerin hücresel hedefleri [47].

Serbest radikaller tüm biyomoleküller üzerinde etki gösterse de lipitler bu durumdan en çok etkilenen hücresel moleküllerdir. Hücre zarındaki kolesterol ve doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle reaksiyonundan oksidasyon ürünleri açığa çıkmakta ve bunun sonucunda çoklu doymamış yağ asitleri suda çözünebilir ürünlere dönüşmekte ve membran bütünlüğü bozulmaktadır [39],[42]. Sonuç olarak, akışkanlıkta azalma ve

geçirgenlikte değişiklikler ortaya çıkar. Malondialdehit, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonundan üretilen major oksidasyon ürünüdür ve lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesidir [48].

Protein oksidasyonu, proteinlerin kovalent modifikasyonudur. ROS ile doğrudan veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucunda dolaylı olarak oluşabilir [49]. ROS'lar proteinlerde peptit bağı hidrolizine, dekarboksilasyona, disülfid bağı oluşumu ve çapraz bağ oluşumuna sebep olurlar [50],[51]. Protein karboniller, protein oksidasyonunda yaygın olarak ölçülen ürünlerdir. Oksidatif protein hasarını belirlemede protein karbonil düzeyleri ölçülebilir ancak belirli bir aminoasite özgü değildir [52].

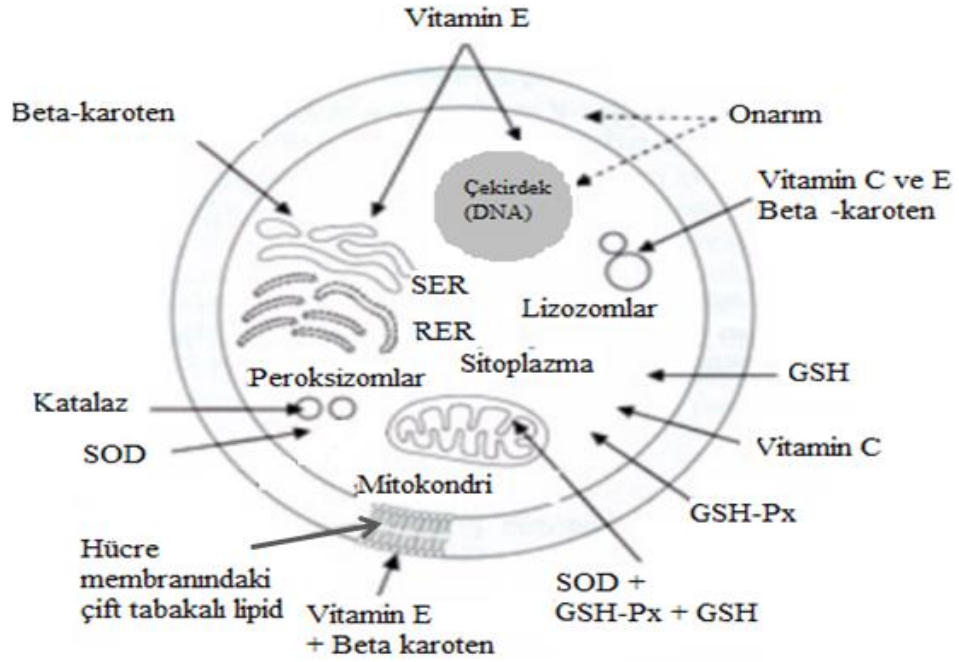
1.3. ANTiOKSiDAN SAVUNMA SiSTEMİ

Antioksidan savunma sistemi; serbest radikalleri yakalayarak, onların dokudaki miktarını azaltan veya yok eden zararlı etkilerini nötralize ederek meydana gelebilecek hasarları durdurmaya çalışan bileşiklerden oluşur [47].

Antioksidanlar; ROS'ların biyomoleküllerle reaksiyona girmesini, radikal zincir reaksiyonları oluşturmalarını ya da oksijenin oldukça reaktif ürünlere dönüşmesini engelleyerek serbest radikallerin oluşturacağı zararı minimuma indirerek koruyucu etki gösterirler [53]. Organizma bu maddeleri kendisi ürettiği gibi dışardan besinlerle de alır Oksidan/antioksidan madde oranı canlının önemli fonksiyonlarını normal bir şekilde yerine getirebileceği düzeyde olmalıdır.

Antioksidanlar elektronlarını oksidanlarla eşleştirirler ve böylece reaktivitelerini azaltarak onları hücre içi moleküllere dönüştürerek zararsız hale getirirler. Bu yolla kendileri radikal haline gelirler ve hücrel hasara neden olmazlar [54].

Antioksidanlar, Şekil 1.6.'da görüldüğü üzere hücrenin pek çok organellerinde ortaya çıkan oksidatif hasarı asgari düzeye indirebilmek için etki etmektedirler.



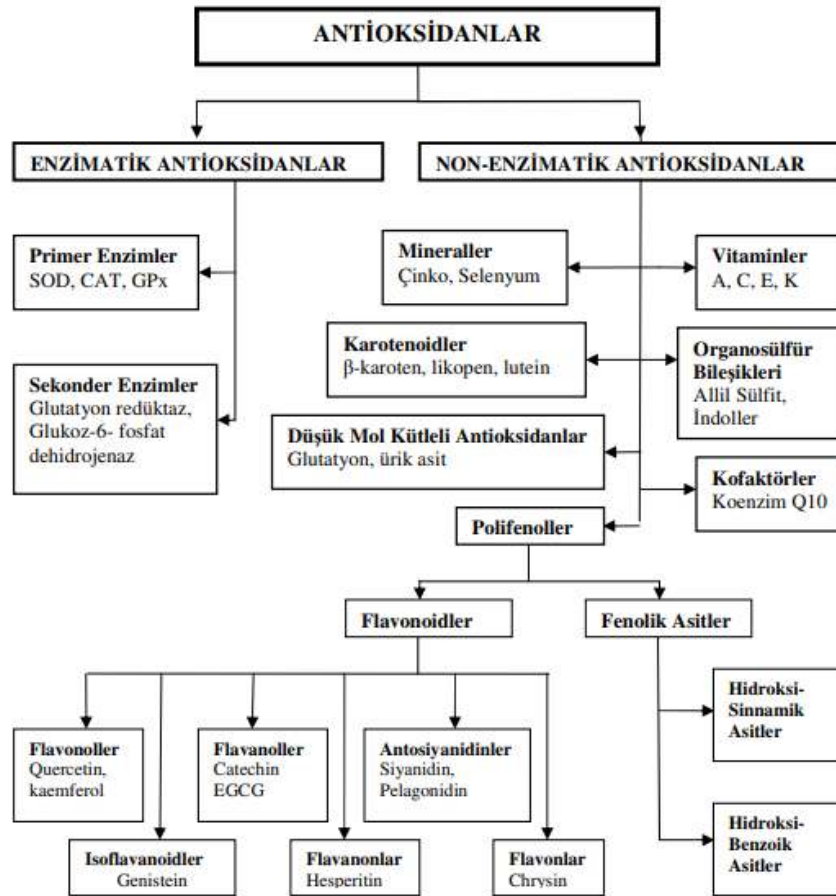
Şekil 1.6. Antioksidan moleküllerin hücredeki etkileri (SOD: Süperoksit dismutaz SER: Granülsüz endoplazmik retikulum, DNA: Deoksiribo nükleik asit, RER: Granüllü endoplazmik retikulum, GSH: Glutasyon, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz) [47].

Antioksidan savunma sistemi dört farklı yolla etkisini göstermektedir.

1. Toplayıcı etkisi: Antioksidan enzimler, ROS'ları yakalayarak ya da daha az aktif yeni moleküllere dönüştürerek toplayıcı görevi görürler.
2. Baskılayıcı etkisi: Vitaminler ve flavanoidler, ROS'larla reaksiyona girerek onlara 1 H verir ve bu yolla etkinliklerini azaltır ya da onları işlevsiz hale getirir.
3. Onarıcı etkisi: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın antioksidan savunma sisteminde onarılmasıdır.
4. Zincir kırıcı etkisi: E vitamini, seruloplazmin ve hemoglobin tarafından gerçekleştirilen bu etkide, ROS'lar bağlanarak zincirleri kırılır ve bu şekilde işlevleri yok edilir [47].

1.3.1. Antioksidan Maddelerin Sınıflandırılması

Antioksidan maddeler, doğal ve yapay olmak üzere başlıca 2 gruba ayrılır. Doğal antioksidan maddeler; temel olarak enzimatik antioksidanlar ve non-enzimatik antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 1.7) [47]. Enzimatik olanlar, oksidanları tutarak onları daha zayıf hale getirir. Organizmada bulunan en etkili antioksidan enzimler katalaz (CAT) , glutatyon peroksidaz (GP_x) ve süperoksit dismutaz (SOD)'dır [55]. Non-enzimatik olanlar ise besinlerle vücuda alınmaktadır. Besinlerle alınan antioksidan maddelerin başında polifenoller yer alır. Bunun yanı sıra karotenoidler, vitaminler, ve organosülfürlü bileşikler de diğer nonenzimatik antioksidan madde sınıflarını oluşturur. Ayrıca yapay olarak üretilen antioksidan maddeler de bulunmaktadır.



Şekil 1.7. Antioksidan maddelerin gruplandırılması [47].

1.4. PROPOLİS

İnsanoğlu tarafından binlerce yıldır kullanılan propolis (PRPLS), adını yunanca ön, giriş anlamındaki “pro” ve şehir anlamındaki “polis” kelimelerinden almıştır. Eski yunanca da şehir ya da topluluğun savunulması/korunması anlamına gelir. Arı bu maddeyi her tür tehlikeye karşı kovayı korumak için kullanmaktadır. Arı yapışkanı olarak da bilinen PRPLS arının kimyasal silahı olarak da ele alınmaktadır. İlk olarak Yunanlılar tarafından keşfedilmiş ve doğal bir antibiyotik olarak kullanılmaya başlanmıştır [56]. Halk arasında doğadaki en güçlü antibiyotik olarak bilinen PRPLS, bal arılarının (*Apis mellifera* L.) bitkilerin tomurcuklarından, filizlerinden, dallarından ve ağaç kabuklarından topladığı bitki salgılarını ve reçinemsı maddeleri, kendi salgıladıkları enzimler aracılığıyla biyokimyasal olarak değişikliklere uğratarak balmumu ile karıştırıp oluşturdukları, yapışkan organik bir maddedir (Şekil 1.8.) [56],[57].



Şekil 1.8. PRPLS salgılayan arı.

Arılar PRPLS’i, kovanın girişini küçültmek, peteklerin yapımı, kovan duvarlarında bulunan çatlakları onarmak için, dezenfeksiyon amacıyla ve kovana giren böcekleri, mikroorganizmaları ve zararlı maddeleri mumyalayarak etkisizleştirmek için kullanır. PRPLS mantarlar, bakteriler, ve virüsler ile mücadelede etkindir ve kovanda oluşabilecek enfeksiyonlara karşı koruyucudur [58]. Bunun yanı sıra arılar PRPLS’i kullanarak kovandaki büyük, yabancı canlıları mumyalar ve böylece enfeksiyon oluşturmalarını önlerler [59].

1.4.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

PRPLS’in, kendine özgü bir kokusu vardır ve kovandan ilk alındığında yapışkandır. Toplandığı yere ve kaynağa (bitki türü, yaşı, vb) göre sarı yeşilden koyu kahverengine kadar bir renk skalasına sahiptir (Şekil 1.9.). PRPLS 10 °C'den düşük sıcaklıklarda sert, 15-25 °C’de elastik, 30-40 °C’de yapışkan, bir yapıya sahiptir Dondurucuda hemen

katılır. İstendiğinde bir öğütücü ile toz haline getirilebilir. Genellikle aroması reçinemsi, kokusu ise aromatiktir [60].

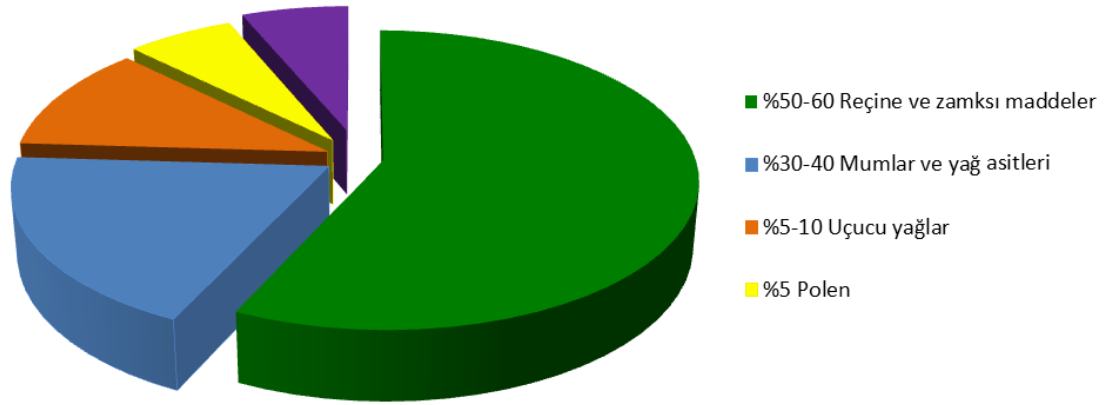


Şekil 1.9. Ham PRPLS.

PRPLS suda hiç veya çok az çözünürken eter, aseton, kloroform gibi organik çözücülerde kısmen, %95'lik alkolde büyük oranda çözünmektedir. Yani PRPLS'in çözünürlüğü alkollerde oldukça yüksektir. Son zamanlarda PRPLS'in biyoaktif özelliğinden daha iyi faydalanabilmek için özel ekstraksiyon yöntemleriyle sulu çözeltileri oluşturulabilmektedir. PRPLS, tıbbi alanda genellikle %70'lik alkolde çözülmüş çözelti olarak kullanılmaktadır [61],[62].

1.4.2. Propolisin Kimyasal İçeriği

PRPLS'in bileşimi arılar tarafından kullanılan bitkilerin türüne, çeşidine ve toplanan mevsime göre çeşitlilik göstermekle birlikte genellikle ham PRPLS içeriğinin yaklaşık % 50-60'ını reçine ve zamksı maddeler yani fenolik bileşikler denilen; flavonoidler ve fenolik asitler oluşturmaktadır. Fenolik bileşikler, PRPLS'in biyolojik aktivitesinden sorumludur ve PRPLS'e güçlü antioksidan özellik katmaktadır. PRPLS'in %30-40'nı mumlar ve çeşitli yağ asitleri oluştururken, %5'lik kısmı da polenden oluşmaktadır (Şekil 1.10) [63],[64]. Kestane, atkestanesi, ökaliptus ve kavak gibi ağaçlardan elde edilen PRPLS'ler en kaliteli propolislerdir [64]. Bunun dışında PRPLS'in içeriği toplanma tekniğine bağlı olduğu gibi toplandığı coğrafyanın bitki örtüsü de oldukça önemlidir [63].



Şekil 1.10. Ham PRPLS bileşimi [63],[64].

Mevcut literatür verilerine göre, PRPLS'te polifenoller ve onların esterleri, alkoller ve ketonlar, fenolik aldehytler, sekuiterpen kinonlar, steroidler, kumarinler, inorganik bileşikler ve amino asitler gibi güçlü anioksidan özelliğe sahip yapıları kapsayan 300'den fazla bileşik tanımlanmıştır [57],[63]. Bununla birlikte, bu kimyasal bileşiklerin floraya [65], coğrafi kökene [65], bal arısı alt türlerine [66], toplama mevsimine [67] ve PRPLS özütlemeye [68] göre değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Çizelge 1.1'de PRPLS'in içerdiği başlıca bileşikler göstermektedir.

Çizelge 1.1. PRPLS içeriğinde tanımlanmış gruplar ve bileşik sayısı.

Gruplar	Tanımlanan Bileşik Sayısı	Gruplar	Tanımlanan Bileşik Sayısı
Flavonoidler	38	Diğer asit ve türevleri	8
Hidroksiflavonlar	27	Alkoller, Ketonlar, Fenoller ve Heteroaromatik bileşikler	12
Hidroksiflavononlar	11	Terpen ve Sekuterpen alkol ve türevleri	7
Kalkonlar	2	Sekuterpen ve triterpen hidrokarbonlar	11
Benzoik asit ve türevleri	12	Alifatik hidrokarbonlar	6
Asitler	8	Mineraller	22
Esterler	4	Steroller ve steroid hidrokarbonlar	6
Bezaldehit türevleri	2	Şekerler	7
Sinamil alkol, Sinamik asit ve türevleri	14	Aminoasitler	24

PRPLS'in, balzam ve reçine içeren kısmı kafeik asit, polisakkaritler, terpenler, gibi

maddeler içermektedir. Balmumu içeren kısmı ise B, C ve E vitaminlerini ve yağ asitlerini içermektedir. Flavonoidler organik kısmın en önemli bölümünü oluşturmaktadır. Bunlar üzerinde en çok çalışma yapılmış maddelerdir ve PRPLS'in biyolojik aktivitesi büyük oranda bunlarla ilgilidir. Bu kısım kuersetin, pinostrobin, pinosembrin gibi maddeleri içermektedir [69].

PRPLS, karbonhidrat yönünden oldukça fakirdir. Karbonhidrat olarak %50-60 oranında bulunan reçine ve zamsı maddenin içeriğinde az miktarda şeker vardır ve reçinede bulunan şekerler glikoz ve fruktozdur [70]. PRPLS'in bileşiminde protein olarak reçine kısmında bulunan aminoasitler vardır. Bu amino asitler alanin, arginin, fenilalanin, asparagin, aspartik asit, glutamik asit, piroglutamik asit, prolin, sistin, sistein, triptofan, glisin, valin, histidin, sarkosin, izolösin, lösin, lisin, serin, metiyonin, treonin ve ornitindir [70].

PRPLS'in %60,2'sini lipitler oluşturmaktadır. Bu lipitlerin %50,91'ni hidrokarbonlar, steroller ve uzun zincirli alkoller gibi sabunlaşmayan maddeler ve % 49,09'unu yağ asitleri oluşturur. PRPLS'te bulunan yağ asitlerine örnek olarak palmitik asit ve steraik asit verilebilir. PRPLS'te bulunan doymamış yağ asitleri ise linolenik asit, linoleik asit, oleik asit, araşidonik asit gibi asitlerdir [57]

PRPLS çinko ve demir başta olmak üzere 14 iz mineral içermektedir. Bu mineraller arasında altın, gümüş, sezyum, kalsiyum, magnezyum, potasyum mangan, kobalt, bakır, silika, gibi mineraller de vardır [71].

1.4.3. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri

Bilim insanlarının yapmış oldukları çalışmalar sonucunda PRPLS'in birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda PRPLS'in antioksidan, antibakterial, antiviral, antifungal, antiinflamatuvar ve immunomodülator etkilere sahip olduğu gösterilmiştir ancak son zamanlarda PRPLS'in daha çok antioksidan etkilerine odaklanılmıştır [72],[73]. Arı ürünleri antioksidan etkiler bakımından karşılaştırıldığında, en yüksek etkinliği PRPLS'in sağladığı bulunmuştur [72].

PRPLS'in temel bileşenlerinin başında gelen flavonoidler ona antioksidan, antibakteriyel, antiviral ve antifungal özellikler kazandırmaktadır. PRPLS'in flavonoid içeriği elde edildiği bitkiye göre değişmektedir. PRPLS'in içeriğinde bulunan bütün bileşiklerden flavonoidlerin miktarı %25'in üzerindedir. Polifenolik bileşikler olan flavonoidler serbest radikal temizleme kabiliyetlerinden dolayı antioksidan özelliğe

sahiptir ve lipit oksidasyonunu önlerler. Metal şelat oluşturdıkları için de antioksidant özellik gösterdikleri bilinmektedir [69]. PRPLS'in farmakolojik yönden önemli bir bileşik olması, tıbbi amaçlar için değerli olması içindeki sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Bu metabolitler içerisinde; ketonlar, fenolik asitler (kafeik asit ve sinnamik asit) ve esterleri, fenolikaldehitler, flavonlar ve flavonoidler (pinosembrin, pinobanksin, krisin, akasetin, rutin, naringenin, galangin, kateşin, luteolin, mirisetin, kamferol, apigenin, kuarsetin), terpenoidler ve terpenler, aromatik asit ve esterleri, aldehitler, aminoasitler, alkoller, alifatik asit ve esterleri ve bazı hidrokarbonlar sayılabilir [57].

Daha önce yapılmış çalışmalarda PRPLS'in muhtemel biyolojik etki mekanizmasının;

- Elektron taşınımını hızlandırılması
- Ağır metal iyonlarına bağlanabilmesi,
- Biyolojik polimerlere bağlanabilmesi,
- Serbest radikalleri tutma kabiliyeti (temizleme) olmak üzere dört gruba ayrıldığı belirtilmiştir [69].

1.4.4. Propolisin Diğer Toksik Ajanlara Karşı Koruyucu Etkileri ve Toksik Etkisi

Literatürde PRPLS'in karaciğer hasarına neden olan farklı maddelere karşı koruyucu etkisi olduğunu gösteren bir çok çalışma mevcuttur. Örneğin, Türkez v.d. (2010) PRPLS uygulamasının sıçan karaciğerinde alüminyum klorür kaynaklı genetik ve karaciğer hasarlarını önlediğini rapor etmiştir [74]. PRPLS uygulamasının karbon tetraklorürün, karaciğer ve böbrek dokularında oluşturduğu toksisiteye karşı protektif etki gösterdiği, hepatik kolajen birikimini önemli ölçüde ortadan kaldırdığı, inflamatuvar sinyalleri ve oksidatif stresi ortadan kaldırarak karaciğer fibrozuna karşı terapötik etkisi olduğu rapor edilmiştir [75], [76]. Tanvir v.d. (2019) Bangladeş PRPLS'inde tanımlanan fenolik bileşiklerin, tetrasiklin kaynaklı hepatik ve renal toksisiteye karşı koruyucu etkisinin olduğunu ve PRPLS'in kronik karaciğer ve böbrek hasarının etkilerini azaltmada umut verici bir doğal ürün olabileceğini rapor etmiştir [77]. Seven v.d. (2020) sisplatin uygulamasından sonra verilen propolisin karaciğer ve böbrek hasarlarını önlediğini ve sisplatinin olumsuz etkilerini iyileştirme potansiyeline sahip olduğunu belirtmiştir [78].

PRPLS'in protektif etkisi bir çok deneysel çalışmada ortaya konmuş olmasına rağmen az sayıda da olsa literatürde uzun süreli kullanımının doku ve organlarda toksisiteye

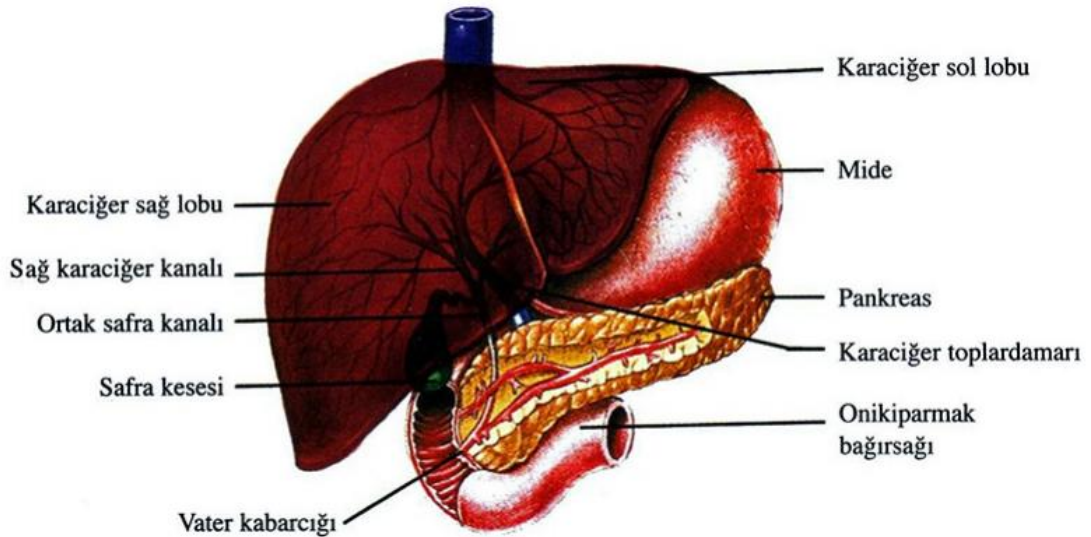
neden olabileceğine dair çalışmalar vardır. Önceki çalışmalarda PRPLS'in uzun süreli ve yüksek dozda kullanımı doku ve organ toksisitesine aynı zamanda alerjik reaksiyonlara neden olduğu rapor edilmiştir [79] . Örneğin, Samiee-Rad, v.d. (2019) 14 gün boyunca uygulanan yüksek propolis dozlarının (2000, 4000, 8000 mg/kg) karaciğerde farklı histopatolojik değişikliklere neden olduğunu rapor etmiştir [80]. Ayrıca Fikri, v.d. (2019) hamilelik döneminde yüksek dozda tüketilen propolis (1400 mg/kg) fetüsün gelişimini olumsuz etkilediğini ve fetüsün ağırlığını azalttığı fetal büyümeyi yavaşlattığını bildirmişlerdir[81] .

1.5. KARACİĞER

İnsan bedeninin en önemli organlarından biri olan karaciğer, birbirinden farklı pek çok fonksiyonun gerçekleştirildiği ve bu fonksiyonların birbiriyle bağlantısının da sağlandığı vücudumuzun en büyük iç organı ve bezidir. Erişkindeki ağırlığı yaklaşık olarak 1500 gr kadardır. Karın boşluğunun sağ üst bölümünde, mide ve bağırsakların üzerine, diyaframın altına yerleşmiş, periton adı verilen zarla çevrili koyu kırmızımsı-kahverengimsi renge sahip parankimal bir organdır [82].

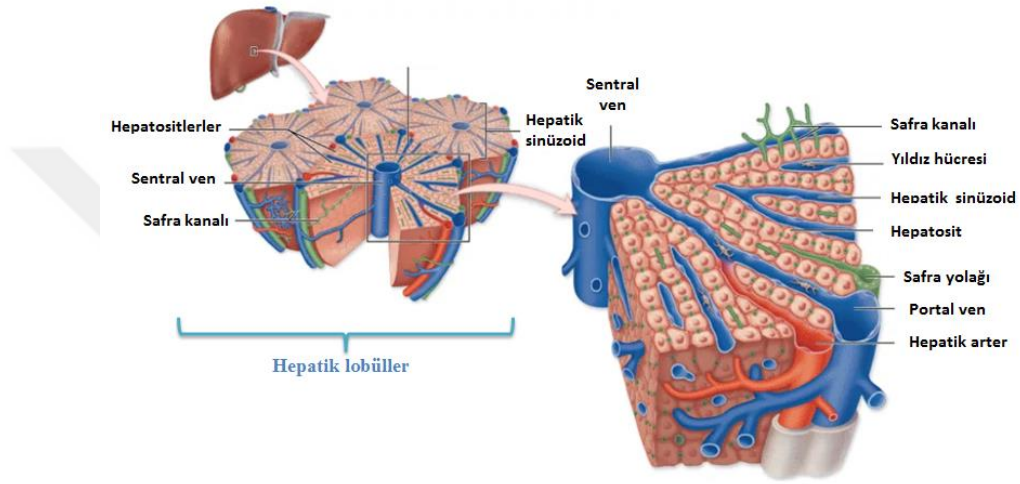
1.5.1. Karaciğerin Yapısı

İnsan karaciğeri sağ ve sol lob olarak adlandırılan iki ana loba bölünmüştür. Sağ lob sol lobdan çok daha büyüktür. Bu lobların her biri de ayrıca sağda ve solda dörder bölüm olmak üzere toplam sekiz segmente ayrılmıştır [83].



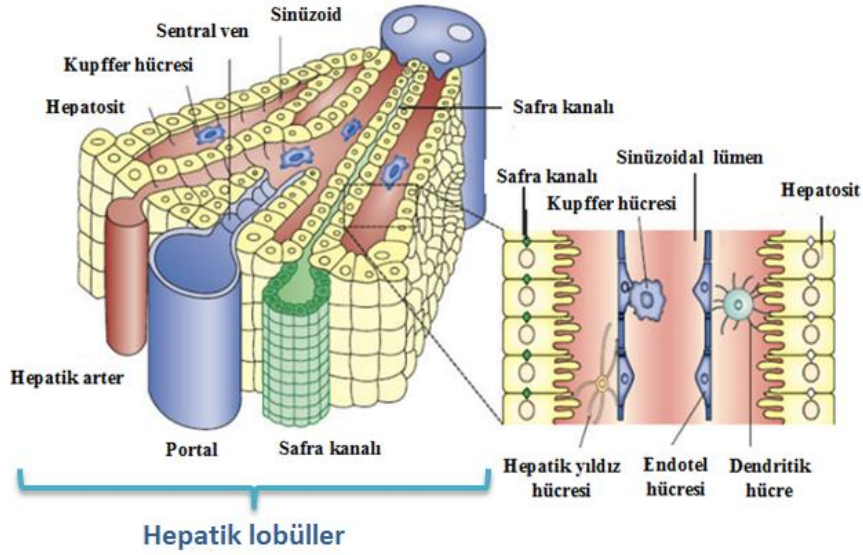
Şekil 1.11. Karaciğerin yapısı.

Karaciğerin iki farklı besleyici damarı bulunmaktadır; hepatik atardamar aorttan oksijen seviyesi yüksek kanı getirir, portal toplardamar bağırsaklardan, pankreas ve dalaktan toplanan besin değeri yüksek kanı karaciğere taşır. Karaciğere bu iki atardamardan dakikada 1450 mL kan gelmekteyken farklı organlardan salgılanan hormonlar da bu damar sayesinde karaciğere taşınmaktadır. Bu iki damar karaciğer içerisinde sinüzoid adı verilen küçük kapiller damarlara ayrılmaktadır ve lobul olarak adlandırılan fonksiyonel üniteleri oluşturmaktadır [83].



Şekil 1.12. Karaciğerin lobüler yapısı

Lobüller içerisinde hepatosit olarak adlandırılan karaciğer hücreleri bulunmaktadır. Karaciğerdeki hücrelerin yaklaşık %60-70'ini hepatositler, %15'ini Kupffer hücreleri, %15'ini ise fibroelastik bağ dokusu, kan damarları (damarlar ve arterler), kanallar ve sinirler oluşturmaktadır [83],[84].



Şekil 1.13. Karaciğer hücreleri [85].

Hepatositler karaciğerin kendine özgü işlevlerini yerine getiren hücrelerdir. Hepatositler, görevi gereği çok sayıda ribozom, mitokondri, golgi cisimcikleri ve endoplazmik retikulum özellikle granüllü endoplazmik retikulum organellerine sahiptir. Bu hücreler, karaciğere kanla taşınan ham besinleri, birtakım biyokimyasal süreçlerden geçirerek ve yapılarını değiştirerek vücudumuzun ihtiyaç duyduğu maddelere çevirir. Bu işlemler çoğunlukla granüllü endoplazmik retikulumda gerçekleşmektedir. Hepatositler çeşitli plazma proteinleri de (fibrinojen albumin, lipoproteinler, protrombin, vb.) üretir. Ayrıca detoksifikasyon, safra salgılanması, konjugasyon ve glukoneogenezde rol alırlar [86].

Karaciğerdeki işlevsel diğer hücre çeşidi olan kupffer hücreleri sinüzoidlerin içine yerleşmiş, hepatositlere komşu hücrelerdir. Bu hücrelerin sahip olduğu çok sayıdaki yalancı ayak şeklindeki uzantılar onlara yıldız görünümü vermektedir [85]. Bu yalancı ayaklar diğer kupffer hücrelerine ve sinüzoidin karşı tarafındaki hepatositlere doğru uzanırlar. Büyük ve merkezi yerleşime sahip çekirdekleri bulunmaktadır. Sitoplazmalarında lizozomlar ve çekirdeğe yakın olarak yerleşmiş golgi aparatı bulunmaktadır. Bu hücreler vücuda giren zararlı mikroorganizmaların ve çeşitli artıkların fagositoz yoluyla kandan temizlenmesini sağlar [84].

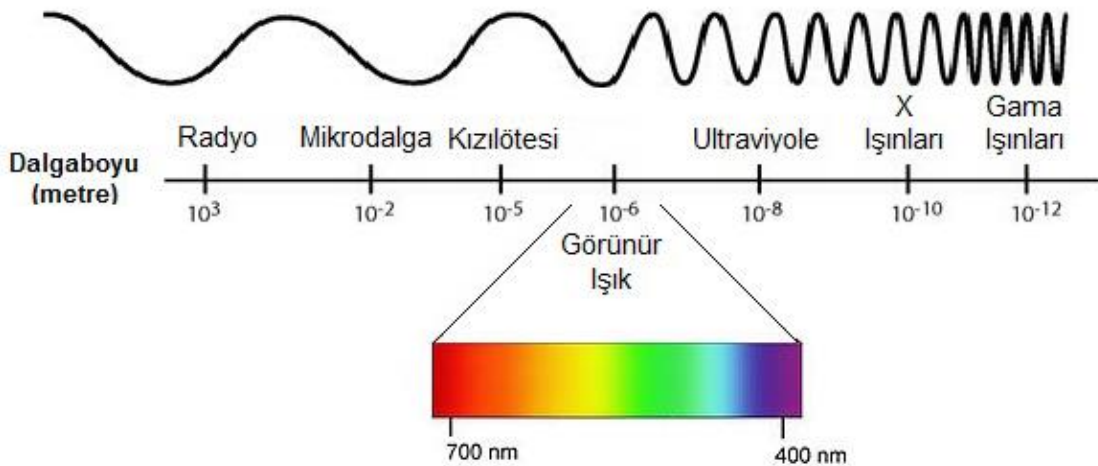
1.5.2. Karaciğerin Görevleri

Karaciğer vücut için oldukça önemli işlevlere sahiptir. Bu işlevlerden en önemlileri:

- Vücuda alınan besin maddelerinin, zehirli maddelerin ve ilaçların oluşturduğu zararlı maddelerin parçalanarak etkisiz hale getirilmesi.
- Kandaki glikozun glikojene çevrilip depolanması ve glukoneogenezle kana glikoz sağlanması.
- Plazma proteinlerinin sentezi.
- Bakteri ve yıpranmış kırmızı kan hücrelerinin fagositozla yok edilmesi.
- Safra sıvısının salgılanması ve yağların sindirimi.
- Karbonhidrat, protein ve yağların metabolizmasının düzenlenmesi.
- Karbonhidratların ve proteinlerin fazlasının lipide dönüştürülüp depolanması.
- Aminoasitlerin, yağ asidine ve üreye çevrilmesi.
- Vitamin üretimi ve depolanması [87].

1.6. ELEKTROMANYETİK IŞIMA VE SPEKTROSKOPİ

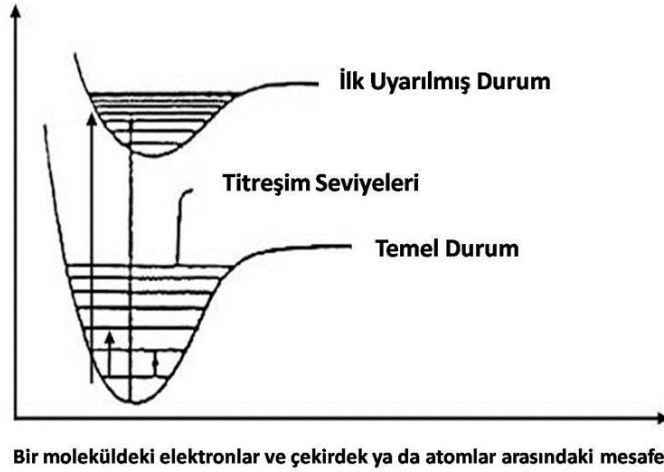
Gama ışınları, X ışınları, ultraviyole, görünür ışık, kızılötesi, mikrodalgalar, radyo dalgaları olmak üzere yedi gruba ayrılan elektromanyetik ışıma uzayda ışık hızıyla hareket eden bir enerji türüdür (Şekil 1.14) [88].



Şekil 1.14. Elektromanyetik ışıma çeşitleri [88].

Elektromanyetik ışıma herhangi bir maddeyle etkileştiğinde o maddenin elektron veya atomlarının enerji düzeyleri arasında bir takım geçişlere sebep olabilir. Bu geçişler sırasında elektronlar ihtiyaç duydukları enerjiyi kendileri ile etkileşen elektromanyetik ışımdan alırlar ve sonuçta temel durumdan uyarılmış duruma geçiş gerçekleştirirler [89].

Şekil 1.15'te karakteristik bir enerji düzey diyagramı verilmiştir.



Şekil 1.15. Enerji düzey diyagramı [89].

Spektroskopi bir maddeyi oluşturan atomların enerji düzeyleri arasındaki geçişleri sırasında absorbe edilen, yayılan veya saçılan elektromanyetik ışımının ölçülmesidir [90]. Kısaca madde ile elektromanyetik ışınma arasında meydana gelen etkileşimi inceler.

1.6.1. Kızılötesi Spektroskopisi

Günümüz bilim insanlarının bilimsel çalışmalarda kullandığı en önemli analitik tekniklerden birisi olan infrared (kızılötesi) spektroskopisi madde ile kızılötesi ışınlar arasındaki etkileşimi temel almaktadır. Bir molekülde bulunan atom veya elektronların temel durumdan ilk uyarılmış duruma geçmesi infrared bölgesindeki ışınların soğurulması ile gerçekleşmektedir. Moleküllerde bulunan özel fonksiyonel grupların kimyasal bağlarında gerçekleşen spesifik titreşimler sayesinde infrared spektrumu üretilmektedir. Her bileşiğin spektrumu kendisine özgüdür ve optik izomerler dışında hiçbir bileşik aynı spektruma sahip değildir. Her grup için belirgin olan titreşim dalga sayısı ile her bir fonksiyon grubunun teşhisi yapılmaktadır. Farklı fonksiyonel gruplara ait dalga sayıları, mevcut literatürde bulunan bilgilerden veya atlaslardan yararlanarak tanımlanabilir [88].

Infrared bölge, elektromanyetik spektrumun 14000 cm^{-1} ile 4000 cm^{-1} aralığındaysa yakın infrared bölge, 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} aralığındaysa orta infrared bölge ve 400 cm^{-1} ile 4 cm^{-1} aralığındaysa uzak infrared bölge olmak üzere 3 bölgeden oluşur

(Çizelge 1.2). Orta infrared bölgede ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) titreşimsel geçişler gerçekleşmektedir. Bu aralıkta gerçekleşen infrared soğurulma sonucu meydana gelen titreşim bantları moleküllerin nitel ya da nicel analizinde kullanılabildiği gibi içindeki kimyasal grupların tanınmasına da katkı sağlamaktadır [91],[92].

Çizelge 1.2. İnfrared spektral bölgeler [93].

Kızılötesi Bölgesi	Dalga boyu (μm)	Dalga Sayısı (cm^{-1})
Uzak IR	25 - 1000	400 - 4
Orta IR	2.5 - 25	4000 - 400
Yakın IR	0.8 - 2,5	14000 - 4000

İnfrared ışınının absorblanması sonucu moleküllerde titreşim ve dönme hareketleri meydana gelir [94]. Titreşim hareketleri 2 başlık altında toplanabilir:

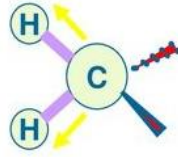
1. Gerilme titreşimleri: Moleküldeki bağların eksenleri boyunca meydana gelen uzama ve kısılma hareketleridir. İki çeşidi vardır:
 - Antisimetrik gerilme: Moleküldeki bağlardan bir veya birkaçı uzarken diğerlerinin kısılması hareketidir
 - Simetrik gerilme: Moleküldeki tüm bağların uzaması veya kısılması şeklinde ortaya çıkar.
2. Eğilme titreşimleri: Moleküldeki iki bağ arasındaki açının değişmesi sonucu oluşur. Bükülme, makaslama, sallanma ve salınma olmak üzere dört tipi vardır (Şekil 1.16).

Moleküller iki tür titreşim yapar

• **Gerilme** – Bağ hattı boyunca titreşim

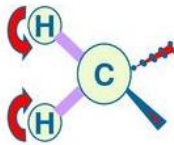


Simetrik

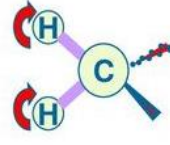


Asimetrik

• **Eğilme** – düzlem boyunca titreşim

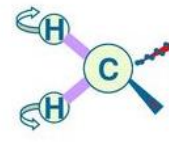


makaslama

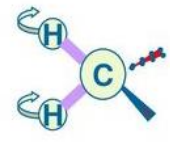


sallanma

Düzlem içi



burkulma



salınma

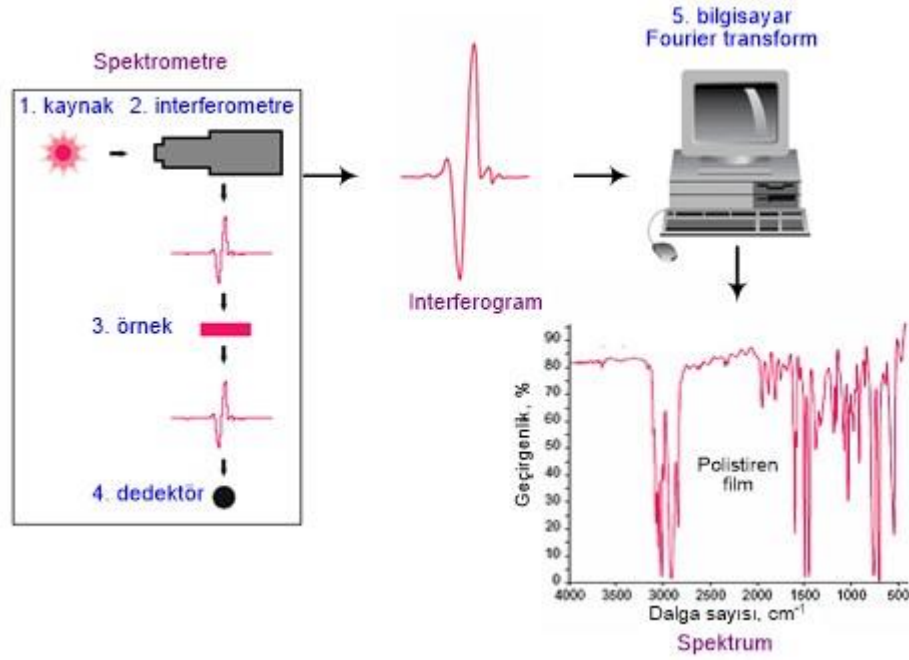
Düzlem dışı



Şekil 1.16. İnfrared spektrumunda ortaya çıkan bağ titreşim hareketleri [95].

1.6.2. Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

FTIR spektroskopisi, kızılötesi ışın uygulamasıyla molekülde oluşan titreşim hareketlerini ölçerek farklı titreşim gruplarını görüntüleyen ve bu sayede moleküllerin bulunduğu mikroçevre hakkında değerli bilgiler edinmemizi sağlayan analitik bir cihazdır. Matematiksel bir yöntem olan Fourier dönüşümü kullanarak veriyi zaman alanından frekans alanına aktarır. FTIR spektroskopisi, ilk önce Michelson interferometresi ile incelenecek örnekten gelen sinyalleri bir interferogramda toplar, sonra bu interferograma Fourier transformasyon işlemi uygulayarak bir spektrum elde eder. İnterferometreye gelen kızılötesi ışınlar bir ışın ayırıcı kullanarak iki optik ışına ayrılır. Bu ışınlardan birisi sabit alanda bulunan düz bir aynaya giderken diğeri ayırıcıdan ayrılarak düz bir aynaya gider. Bu iki ışın kendi aynasından geri yansır ve ışın ayırıcısında tekrar karşılaştıkları zaman birleşir. İnterferometredeki sinyal, bu iki ışının birleşmesi sonucu oluşur ve interferogram olarak isimlendirilir [96]. Şekil 1.17’de bir FTIR spektrometresinin çalışma prensibi gösterilmiştir.



Şekil 1.17. FTIR spektroskopisinin çalışma prensibi [97].

Bir interferogramda gözlenen sinyaller bütün kızılötesi frekansları hakkında bilgi vermektedir yani tüm frekanslarda ölçümler alınmaktadır ve spektral verilerin analizleri için bu frekanslar kullanılmaktadır. Fourier transformasyonu bilgisayar tarafından otomatik olarak gerçekleştirilir ve elde edilmiş olan interferogram absorbans-frekans spektrumuna çevrilir. Bu dönüşüm absorbansa karşı dalga boyu veya frekans (cm^{-1}) olarak grafiğe dökülür.

FTIR spektrumu, bir örneğin yapısında bulunan fonksiyonel gruplar, bağ türleri ve bunlara bağlı olarak o örnekteki molekülleri tespit etmemizi sağlar ve bunların miktarı, yapısı ve fonksiyonu hakkında değerli bilgiler verir.

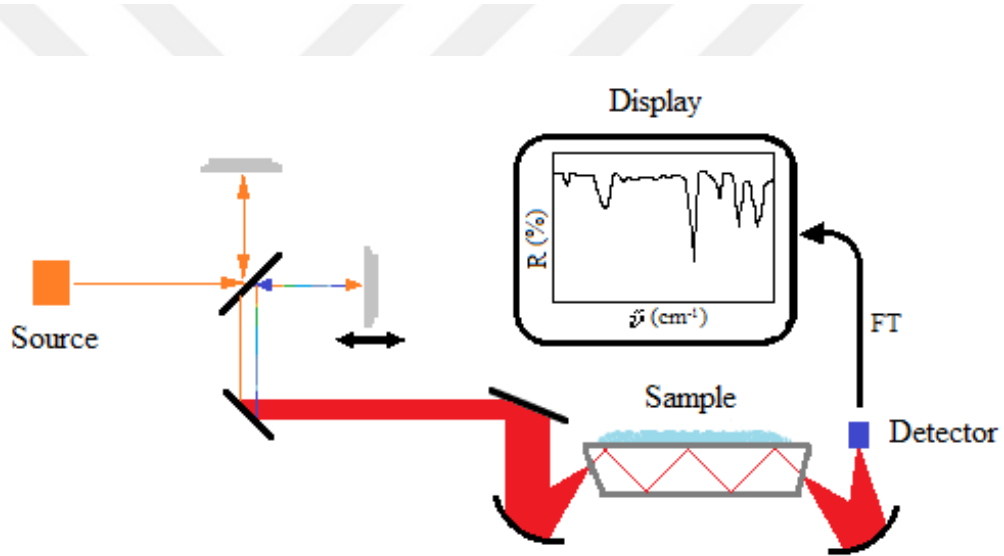
FTIR spektrometresi, kullanılan örnek zarar görmeden biyolojik sistemler ile ilgili önemli bilgiler vermektedir [98],[99]. Bu teknik sayesinde çok az miktardaki örnekler in vivo ve in vitro şartlarda çalışılabilen; DNA, lipid, protein, kolesterol, karbonhidrat gibi biyomoleküllerin fonksiyonel gruplarında gerçekleşen değişimler hassasiyetle ortaya çıkarılabilmektedir [98],[99],[101].

FTIR spektroskopisinde genelde bant sinyal şiddeti/bantın altında kalan alan, bant genişliği, frekans değeri (bant konumu) gibi değişkenler kullanılmaktadır. Bant konumu düzen/düzensizlik hakkında bilgi verirken, bant şiddeti ve alanı maddenin miktarı hakkında, bant genişliği ise membran dinamiği hakkında bilgi vermektedir [102],[103]. FTIR spektroskopisi çalışılan sisteme zarar vermeden onların moleküler

düzeyde incelenmesine imkan sağladığı için biyoloji çalışmalarında özellikle tercih edilmektedir [100],[101],[104-107].

1.6.3. Azaltılmış Toplam Yansıma (ATR)-FTIR Spektroskopisi

FTIR spektroskopisine azaltılmış toplam yansıma (attenuated total reflectance=ATR) aparatı takılarak elde edilen ATR-FTIR spektroskopisi son yıllarda popülaritesi gittikçe artan bir teknik haline gelmiştir. ATR ataçmanının temel çalışma prensibini kaynaktan gelen kızılötesi ışınının örnek ile temas etmesiyle meydana gelen, ışığın örnekteki toplam iç yansımasında oluşan değişimleri tespit etmek oluşturmaktadır (Şekil 1.18). Bu teknik örneklerin hazırlanması için gereken süreyi minimuma indirmekte ve böylece kısa sürede örneklerin kantitatif ve kalitatif analizlerini yapma imkanı sunmaktadır. Kısa sürede sonuç verdiği için çekim sayısı kolaylıkla arttırılabilmektedir.



Şekil 1.18. ATR-FTIR spektroskopisi çalışma prensibi [97].

ATR-FTIR spektroskopisi tekniğinde bir infrared ışını belirli bir açıda yüksek refraktif indeksiyle ATR ataçmanına yönlendirilmektedir. Eğer ATR kristali ile numune arasında bulunan ara yüzeydeki geliş açısı, iki yüzey arasındaki kırılma endeksi fonksiyonu olarak tanımlanan kritik bir açıdan daha büyük ise, toplam iç yansıma oluşur. ATR aparatı kullanımıyla sinyal elde edilebilmesi için örnek ile gelen kızılötesi ışının çok yakın bir temas kurması gerekmektedir. Bundan dolayı numuneye belli bir basınç uygulayarak numune ve kristal arasında yakın bir temas kurulması sağlanır. Örnek infrared spektrumunun bir bölgesinde enerji soğurulduğunda, kalan radyasyon zayıflatılmış olur. Zayıflatılmış bu radyasyon spektrofotometre ile ölçülür ve böylece numuneye ait infrared spektrumu elde edilir [100].

ATR aparatında elmas (Di), germanyum (Ge), çinko-selenit (ZnSe) ve silika (Si) gibi ham maddelerinden yapılmış kristaller kullanılabilir. Kristalin materyali kullanılacak numunenin özelliğine ve incelenecek kızılötesi bölgesine göre seçilir [101]. Bu çalışmada, orta-infrared bölgesine uygun, düşük maliyetli, suya dayanıklı, elmas/çinko-selenit (Di/ZnSe) kristali kullanılmıştır. Bu kristal, orta-IR bölgesinde kuru, ıslak veya sulu numuneleri analiz etmek için uygun bir kristaldir [100],[101].

ATR-FTIR Spektroskopisinin Avantajları;

- Sıvı, katı ve gaz formunda olan bütün numuneler kolayca incelenebilir.
- Numuneye bir ön işlem uygulamaya gerek duyulmaz. Doku doğrudan kristalin üzerine yerleştirilerek ölçümler gerçekleştirilebilir.
- Kantitatif ve kalitatif değerlendirmelerin yapılmasına imkan sağlar
- Kızılötesi ışını örneğe zarar vermez.
- Az miktarda numune analiz için yeterlidir.
- Fonksiyonel gruplarda meydana gelen bütün farklılıklar hemen tespit edilebilir ve veriler hızlıca oluşturulabilir [108], [110-113].

1.7. ÇALIŞMANIN AMACI

Dünya çapında çok yüksek mortalite ve morbidite oranına sahip olan kanser en sık rastlanan ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Kanser hastalarında kullanılan en yaygın tedavi yöntemi olan kemoterapi, hastaların hayatta kalma oranını önemli ölçüde artırmaktadır. Ancak tedavi sırasında kullanılan kemoterapötik ajanlar kanserli hücreleri yok ederken sağlıklı hücrelere de zarar verdikleri için hastalar üzerinde ciddi yan etkiler meydana getirmektedir.

Doksorubisin (DOX) bir çok solid ve hematolojik kanserin tedavisinde kullanılan antrasiklin türevi kemoterapötik bir antibiyotiktir. Bu ilacın geniş spektrumlu ve güçlü etkiye sahip olmasının sağladığı avantajın yanında, toksisitesinin yüksek oluşu önemli bir problem oluşturmaktadır. DOX tedavisinde doza bağlı olarak kalp, böbrek ve karaciğerler başta olmak üzere birçok organda şiddetli yan etkiler meydana gelmektedir. DOX'un terapötik olarak etkinliği ve klinikteki kullanışlılığı düşünüldüğünde bu ilacın hedef dışı dokulardaki toksik etkilerini önlemek ya da minimize etmek için yeni stratejiler geliştirmek pratik açıdan son derece önemlidir. Bu konuda son yıllarda

geleneksel tıpta kullanılan doğal ürünlerin bilimsel geçerliliğinin ortaya konması ve yeni yararlı özelliklerinin keşfi dikkat çeken bir araştırma alanı haline gelmiştir.

Önemli bir arı ürünü olan PRPLS bal arılarının bitki filiz, dal, tomurcuklarından ve ağaç kabuklarından, topladığı bitki salgılarını ve reçinemsı maddeleri, kendi salgıladıkları enzimler aracılığıyla biyokimyasal değişikliğe uğratarak bir miktar balmumu karıştırıp oluşturdıkları, yapışkan organik bir maddedir. Bal arılarının kovandaki istenmeyen açık alanların sızdırmazlığını sağlamak, iç duvarları pürüzsüzleştirmek ve girişi davetsiz misafirlerden korumak için kullandığı bu maddenin tıbbi açıdan değerli olduğu bilinmektedir. PRPLS'nin biyolojik aktivitelerinden içindeki fenolik bileşikler ve flavonoidler sorumludur. Bununla birlikte, bu kimyasal bileşiklerin floraya, coğrafi kökene, bal arısı alt türlerine, toplama mevsimine ve propolis özütleme yöntemine göre değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Daha önceki çalışmalarda, PRPLS'in antioksidan, antibakterial, antiviral, antifungal, antiinflamatuvar ve immunomodülator etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca önceki çalışmalarda, PRPLS'nin, çeşitli kimyasallara, radyasyona ve kansere karşı etkileri farklı test sistemleri ile çalışılmış ve koruyucu etkisi rapor edilmiştir. Bu çalışmalardan yola çıkarak PRPLS'nin kemoterapi ile birlikte kullanımı DOX'un sağlıklı dokular üzerinde meydana getirdiği toksisitenin azaltılmasında veya durdurulmasında etkili olabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Literatürde son derece az sayıda olmakla birlikte, bu konuda gerçekleştirilmiş deneysel çalışmalara rastlamak mümkündür. Bugüne kadar, farklı toksik maddelerin yarattığı toksisiteler üzerinde Türk propolisinin antioksidan ve protektif etkisini gösteren çok az çalışma gerçekleştirilmiştir. Ancak yapılan literatür taraması sırasında, Türk PRPLS'nin (Yığılca) DOX'un karaciğer dokusu üzerinde yarattığı toksisiteye karşı koruyucu etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Vücudun metabolik homeostazisinin sürdürülmesinde merkezi role sahip olan karaciğer; lipidlerin, proteinlerin ve karbonhidratların sentezi, metabolizması, depolanması ve yeniden dağıtılması, hormon, ilaç ve safra asitleri, bilirubin metabolizması ve kan koagülasyon faktörlerinin sentezi, mineral ve vitaminlerin depolanması, amonyağın üreye dönüşümü, bazı maddelerin kandan fagosite edilmesi, atıkların safra içinde atılımı gibi birçok önemli fonksiyonu yerine getirir. Ek olarak, birçok ilacın, kimyasal ve toksik maddenin detoksifikasyonundan sorumlu ana organdır. DOX, hepatositler üzerindeki en toksik antrasiklin olarak kabul edilir. Baskın bir şekilde karaciğerde

metabolize edilen DOX, en çok böbrekte birikir ama karaciğerde, kalpte ve ince bağırsakta da bulunmaktadır. Dokulara fazla bağlanıp yavaşça salıverildiği için vücutta kalış ve etki süresi uzundur. Karaciğer primer tümörü veya metastazı veya farklı bir sebeple, karaciğer fonksiyonu bozulursa eliminasyonu yavaşlar ve vücutta birikmeye başlar. Bu nedenle DOX'un karaciğerde meydana getirdiği toksisitenin mekanizmalarını anlamak ve bu toksik etkilerin elimine edilmesi, DOX'un diğer dokularda oluşturduğu zararlı etkilerin azaltılması ve etkinliğinin artırılması için çok önemlidir. Bu amaçla çeşitli antioksidan tedavilerinin geliştirilmesi için büyük çaba harcanmaktadır.

Bir dokunun görevini düzgün bir şekilde yapabilmesi dokunun yapısıyla ilgilidir. Doku yapısı ve işlevi, fizikokimyasal özelliklere ve lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerin bileşimlerine bağlıdır. Örneğin, hücre zarının madde taşınımını, sinyal iletimini ve zarla ilişkili enzimlerin aktivitesini kontrol etme kapasitesi, bileşenlerinin ve moleküller arası düzenlemelerinin bütünlüğüne bağlıdır. Günümüzde, proteinlerin sekonder yapısındaki, lipid düzenindeki ve membran lipidlerinin dinamikleri arasındaki farklılıkların, makromoleküllerin içeriğindeki değişikliklerle birlikte iyon kanallarının kinetiğini ve fonksiyonlarını bozduğu ve birçok hastalığa yol açtığı bilinmektedir. Karaciğer birçok ilacın, kimyasal ve toksik maddenin detoksifikasyonundan sorumlu ana organ olduğundan, bu dokuda DOX ve PRPLS tarafından indüklenen yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri moleküler düzeyde araştırmak son derece önemlidir.

Yukarıda da özetlendiği gibi DOX'un biyolojik dokularda meydana getirdiği zararlı etkilerin üzerinde PRPLS'nin koruyucu etkileri olduğu bilinmesine rağmen, bu çalışmalar genellikle biyokimyasal ya da ışık mikroskobu ile gerçekleştirilmiş histolojik düzeyde çalışmalardır. Literatürde, propolisin karaciğerdeki DOX toksisitesi üzerindeki koruyucu etkilerini moleküler düzeyde araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca literatürde mevcut olan çalışmaların hiç birisi PRPLS'nin dokudaki koruma mekanizmasını tam olarak açıklayamamaktadır. Bu çalışmada amacımız, Düzce'nin Yığılca yöresinden toplanan PRPLS ekstraktının sıçan karaciğerinde DOX tarafından oluşturulan toksisite üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığını, eğer varsa koruma etki mekanizmasını ATR-FTIR spektroskopisi ve biyokimyasal testler ile moleküler düzeyde belirlemektir.

ATR-FTIR spektroskopisi ve bazı biyokimyasal testler kullanarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, DOX'un biyolojik moleküller üzerinde ne tip değişimlere yol açtığı ve bu değişimler üzerinde PRPLS'nin koruyucu etkisinin olup olmadığı;

- doku hasarının en önemli nedenlerinden biri olduğu bilinen oksidatif stres ve lipit peroksidasyon düzeyinin incelenmesi,
- dokudaki lipitler, proteinler, hidrokarbonlar ve nükleik asitlerin konsantrasyonları ve dağılımlarının incelenmesi,
- değişik moleküllerin birbirlerine göre oranlarının (Lipit/protein, Olefinic=CH/lipit, CH₂/lipit, CH₃/lipit, C=O/lipit, doymuş lipit/doymamış lipit,vb.) incelenmesi,
- protein sekonder yapısındaki değişimlerin (özellikle Amide 1 bantındaki değişimlerin) incelenmesi,
- membran düzeni ve akışkanlığına ilişkin parametrelerin incelenmesi ile değerlendirilmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. SARF MALZEMELER

PRPLS numuneleri Düzce Üniversitesi, Arıcılık Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi'nden alınmıştır. Ham PRPLS örnekleri ekstraksiyon yapılncaya kadar -20 °C'da muhafaza edilmiştir. Biyokimyasal ölçümlerde kullanılan Rel Assay Total Oksidan ve Antioksidan Status Test Kitleri, Baran Medikal San. ve Tic. Ltd. Şti.'nden satın alınmıştır.

Etanol, PRPLS için iyi bir çözücüdür ve canlı için toksik değildir. Bu nedenle çalışmamızda hayvanlara uygulanmak üzere PRPLS'nin etanolik ekstraksiyonu tercih edilmiştir [114],[115]. PRPLS'nin etanolik ekstraktı (20 g PRPLS, 100 ml'yi %96 etanol ile tamamlayarak) hazırlandı, manyetik karıştırıcıda orta derecede çalkalama altında karanlıkta 5 gün bekletildi ve filtre kağıdı kullanılarak süzüldü. Elde edilen etanol ekstraktından alkol, basınç altında bir rotasyonlu evaporatör kullanılarak buharlaştırıldı. Daha sonra kalan PRPLS %70 etanolde çözülerek kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

2.2. PROPOLİSİN İÇERİK ANALİZİ

2.2.1. Fitokimyasal Tarama

PRPLS numuneleri, Evans (1996) tarafından tarif edilen metotlar kullanılarak fitokimyasal bileşenlerin varlığını veya yokluğunu test etmek için ön fitokimyasal taramaya tabi tutulmuştur [116],[117].

2.2.2. Toplam Fenolik Madde Analizi

Analiz, fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu çözeltisinde bulunan fosfotungustik ve fosfomolibdik asitlerin kompleks polimerik iyonlarıyla okside olması sonucunda oluşan mavi renkli molibden-tungsten kompleksinin konsantrasyonunun 765 nm'de ölçülmesine dayanır. Kalibrasyon için gallik asit standartının (0,5 mg/mL) değişen konsantrasyonları (0,25 - 0,13 - 0,06 - 0,03 - 0,02) kullanılarak çalışma eğrisi hazırlandı. Numuneye uygun seyreltme işlemi ekstraksiyon çözeltisi ile yapıldı ve analiz için

tüplere 200 µL seyreltik numuneden koyuldu. Kör için numune yerine 200 µL ekstraksiyon çözeltisi koyuldu. Çalışma eğrisi için de gallik asitin değişen konsantrasyonlarından 200'er µL tüplere koyuldu. Ardından tüplere, 1,5 mL 0,2 N folin çözeltisinden eklendi ve 5 dk bekletildi. Daha sonra 1,2 mL NaCO₃ (%7,5) çözeltisinden eklenerek tüpler vortekslendi. Karanlıkta oda sıcaklığında 90 dk inkübe edildi. Son olarak spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda köre karşı okuma yapıldı [117].

2.2.3. Toplam Flavonoid Madde Analizi

Analizde toplam flavonoid madde içeriği NaNO₂ (sodyum nitrit) ve AlCl₃ (alüminyum klorür) ve ayraçlarının alkali ortamda pembe renkli flavonoid-alüminyum kompleksini meydana getirmesiyle belirlendi. Kalibrasyon için kateşin standartının (1 mg/mL) değişen konsantrasyonları (0,1 - 0,08 - 0,05 - 0,02 - 0,01) kullanılarak çalışma eğrisi hazırlandı. Numuneye uygun seyreltme işlemi ekstraksiyon çözeltisi ile yapıldı ve analiz için tüplere 1 mL seyreltik numuneden koyuldu. Kör için numune yerine 1 mL ekstraksiyon çözeltisi koyuldu. Çalışma eğrisi için de gallik asitin değişen konsantrasyonlarından 1'er mL tüplere koyuldu. Kronometre ile süre başlatılıp sırasıyla 300 µL %5'lik NaNO₂ (t=0 anında), 300 µL%10'luk AlCl₃ (t=5 anında), 2 mL 1 M NaOH (t=6 anında) ve son olarak 2,4 mL saf su ilave edildi ve vorteks yapıldı. Hiç bekletmeden spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda köre karşı okuma yapıldı [118].

2.2.4. Antioksidan Kapasite Analizi (CUPRAC)

Bu analizde, neokuproin (Nc) (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)'in bakır (Cu(III)) ile oluşturduğu neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450nm'de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin[Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme özelliğinden yararlanılarak antioksidan kapasite hesaplanabilmektedir. Kalibrasyon için Troloks standartının (1mg/mL) değişen konsantrasyonları (0,5-0,25-0,13-0,06-0,03) kullanılarak çalışma eğrisi hazırlandı. Numuneye uygun seyreltme işlemi ekstraksiyon çözeltisi ile yapıldı ve analiz için tüplere 100 µL seyreltik numuneden koyuldu. Kör için numune yerine 100 µL ekstraksiyon çözeltisi koyuldu. Çalışma eğrisi için de troloksun değişen konsantrasyonlarından 100'er µL tüplere koyuldu. Ardından sırasıyla 1 mL CuCl₂, 1 mL neokuproin, 1 mL NH₄CH₃COO ve 1 mL saf su ilave edilip vortekslendi. Karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda köre karşı okuma yapıldı [119].

2.2.5. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)’nden 19,7 mg tartılıp etanolde çözüldü ve hacmi 25 mL’ye tamamlandı. Ardından bir tüpe 2,7 mL ekstrakt eklenip üzerine 300 µL DPPH çözeltisi eklendi. Kör için ekstrakt yerine etanol koyuldu. Karanlıkta oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Köre karşı absorbans 517 nm’de spektrofotometre ile ölçüldü [120].

2.2.6. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Tayini

100 µL ekstrakt üzerine 900 µL FRAP reaktifi (pH 3.6) eklendi. Karışım hızlı bir şekilde 20 sn vortekslendi ve 4 dk beklendi. Köre karşı absorbans 595 nm’de spektrofotometre ile ölçüldü [121].

2.3. HAYVAN DENEYLERİ

Çalışmamızın hayvan deneyleri Düzce Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkez’inde gerçekleştirilmiş ve deneysel prosedürler Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2019/1/9). Deneylerde kullanılan 10-12 haftalık (250-300 g) 27 adet *Sprague dawley* türü erkek sıçanlar 12L/12D foto periyodunda, standart pellet yemle ve çeşme suyu ad libitum ortamlarda yetiştirilmiştir. Hayvanlara 20 gün boyunca günlük 200 mg/kg PRPLS etanolik ekstraktı oral gavaj yoluyla ve 15 mg/kg DOX (Adrimisin, Saba Pharma, İstanbul) intraperitoneal olarak 6 bölünmüş doz şeklinde (2,5 mg/kg) uygulandı [61]. Çalışmada rastgele seçilen hayvanlardan 4 deney grubu oluşturulmuştur.

1. **Kontrol Grubu** (n=7): 20 gün boyunca PRPLS’nin çözücüsü 0.1 ml/100 gr hacminde oral gavaj yöntemi ile verilmiştir. Uygulamanın 10., 12., 14., 16., 18. ve 20. günlerinde ise DOX çözücüsü (serum fizyolojik) i.p. olarak verilmiştir.
2. **DOX Grubu** (n=7): 20 gün boyunca günlük olarak PRPLS’nin çözücüsü 0.1 ml /100 gr olacak şekilde oral gavaj yöntemi ile verilmiştir. Uygulamanın 10., 12., 14., 16., 18. ve 20. günlerinde 2,5 mg/kg dozunda [122],[123] DOX (i.p.) verilmiştir.
3. **PRPLS Grubu** (n=6): 20 gün boyunca günlük olarak PRPLS 200 mg/kg dozunda 0,1 ml/100 gr hacminde oral gavaj ile verilmiştir. Uygulamanın 10., 12., 14., 16., 18. ve 20. günlerinde ise DOX çözücüsü (serum fizyolojik) i.p. olarak verilmiştir.

4. **DOX + PRPLS Grubu** (n=7): 20 gün boyunca günlük olarak PRPLS 200 mg/kg dozunda 0,1 ml/100 gr hacminde oral gavaj ile verilmiştir. Uygulamanın 10., 12., 14., 16., 18. ve 20. günlerinde 2,5 mg/kg dozunda DOX (i.p.) verilmiştir.

Son uygulamalardan 24 saat sonra, hayvanlardan biyokimyasal analizler için kan örneği alınmış ve hayvanlara servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi işlemi uygulanarak karaciğer dokuları çıkartılmış ve bu karaciğer dokuları ATR-FTIR çalışmalarında kullanılıncaya kadar -80°C’de saklanmıştır.

2.4. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Biyokimyasal ölçümlerde kullanılmak üzere hayvanlardan alınan kan örneği 5 dakika süreyle 4000 rpm’de +4 °C’de santrifüj edilmiş, elde edilen plazma total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) ölçülene kadar -80 °C’de saklanmıştır.

2.4.1. Total Oksidan Seviyenin (TOS) Ölçülmesi

TOS ölçümleri için piyasada bulunan kitler (Relassay, Türkiye) kullanıldı. Ölçümler 660 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazı ile yapıldı. Numunede bulunan oksidanlar, demir iyonu-o-dianisidin kompleksini demir iyonuna oksitledi. Oksidasyon hızı, ortamda bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile arttırıldı. Asidik bir ortamda ferrik iyon, ksilenol ile turuncu renkli bir kompleks üretmektedir. Numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilişkili olan bu renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Kalibrasyon hidrojen peroksit ile yapıldı ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L (litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri) olarak ifade edildi [124].

2.4.2. Total Antioksidan Seviyenin Ölçülmesi

TAS ölçümleri için piyasada bulunan kitler (Relassay, Türkiye) kullanıldı. Ölçümler 660 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazı ile yapıldı. Bu teknik, daha kararlı bir ABTS (2,2’-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyonunun karakteristik renginin antioksidanlar tarafından ağartılmasına dayanmaktadır. Test, mükemmel hassasiyet değerlerine (%3’ten daha düşük) sahiptir. Sonuçlar mmol Troloks eşdeğeri/L olarak verildi [125].

2.4.3. Oksidatif Stres İndeksinin Saptanması

Ölçümlerden elde edilen TOS/TAS oranı oksidatif stres indeksini (OSI) vermektedir. Hesaplama yapabilmek için elde edilen TAS değeri $\mu\text{mol/L}$ 'ye dönüştürüldü ve OSI değeri aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı:

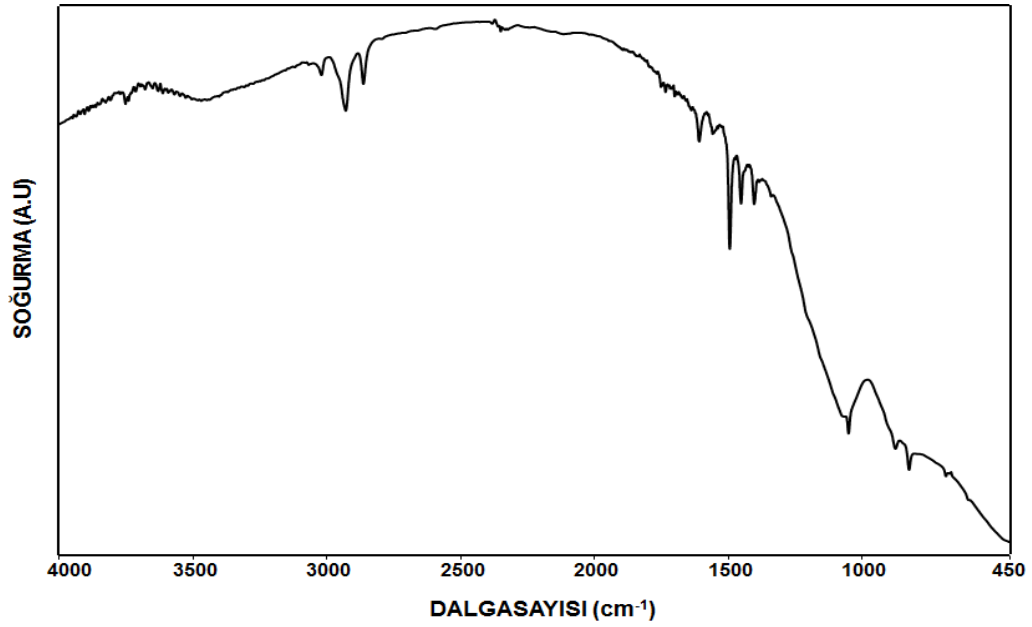
OSI (isteğe bağlı birim) = TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L) / TAS ($\mu\text{mol Trolox}$ equivalent/L) *100 [124],[126].

2.5. ATR-FTIR SPEKTROSKOPİSİ ÇALIŞMALARI

2.5.1. Spektral Verilerin Toplanması

Spektral ölçümler, ATR ataçmanı takılmış Spectrum Two FTIR spektroskopisi (Perkin-Elmer Ltd., UK) ile yapılmıştır. Sıçan karaciğerinin üç ayrı kısmından 0,5 X 0,5 X 0,1 cm büyüklüğünde olacak şekilde kesilen parçalar ATR ünitesinin elmas/çinko-selenit (Di/ZnSe) kristalinin üstüne konduktan sonra, dokudaki sudan kurtulmak için 5 dakika boyunca azot gazı ile muamele edilmiştir. Düzgün bir yüzey teması sağlayabilmek amacıyla 100 force gauge basınç uygulanarak doku sıkıştırılmıştır. Spektral çekimler 4 cm^{-1} çözünürlükte, 64 tarama sayısı ile $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Güvenirliği artırmak için her örnekten 3 kez çekim yapılmış ve elde edilen bu spektrumların ortalamaları alınarak analizler ve istatistiksel testler bunların üzerinde gerçekleştirilmiştir [127],[128].

Her örnek çekimi öncesi, atmosferdeki karbon dioksit ve sudan kaynaklanan kızıl ötesi bantlarının, numunenin bantlarını etkilememesi için, aynı koşullarda background (arka plan) spektrumu çekimi yapılmıştır. Bu background spektrumunun numune spektrumundan bilgisayar programı aracılığıyla çıkarılması sayesinde, meydana gelebilecek gürültüler büyük oranda ortadan kaldırılmaktadır. Sözü edilen hava spektrumu Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. 4000-450 cm^{-1} bölgesinde elde edilmiş bir background spektrumu
(Yeksenindeki “A.U” arbitrary unit (göreceli birim)).

2.5.2. Spektroskopisi Çalışmalarında Kullanılan Spektrum Analiz Yöntemleri

Spektral analizler Perkin Elmer Spektrum 100 yazılımı ve OPUSNT (Bruker Optics, Reinstetten, Germany) analiz programları kullanılarak yapılmıştır. ATR-FTIR spektroskopisi ile elde edilen spektrum bantlarının altında kalan alanlar, bu alanların oranlarındaki değişimler, bant dalga sayısı değerlerindeki kaymalar ve bant genişliklerindeki değişimler belirlenmiştir. Çizelge 2.1’de bantların altında kalan alanlar hesaplanırken kullanılan baseline noktaları ve spektral bölgeler verilmiştir.

Çizelge 2.1. Sıçan karaciğeri spektrumundaki bantların altında kalan alanların hesaplanması için kullanılan baseline noktaları ve spektral bölgeler.

Bant İsmi ve Dalga Sayısı	Baseline Noktaları	Spektral Bölge
Amid A (3283 cm^{-1})	$3790\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$	$3785\text{-}3025 \text{ cm}^{-1}$
Olefinik ($\text{HC}=\text{CH}$) (3012 cm^{-1})	$3024\text{-}2840 \text{ cm}^{-1}$	$3024\text{-}2998 \text{ cm}^{-1}$
CH_3 antisimetrik gerilim (2961 cm^{-1})	$2990\text{-}2840 \text{ cm}^{-1}$	$2990\text{-}2947 \text{ cm}^{-1}$
CH_2 antisimetrik gerilim (2927 cm^{-1})	$2990\text{-}2840 \text{ cm}^{-1}$	$2947\text{-}2880 \text{ cm}^{-1}$
CH_3 simetrik gerilim (2874 cm^{-1})	$2990\text{-}2840 \text{ cm}^{-1}$	$2880\text{-}2864 \text{ cm}^{-1}$
CH_2 simetrik gerilim (2854 cm^{-1})	$2990\text{-}2840 \text{ cm}^{-1}$	$2864\text{-}2840 \text{ cm}^{-1}$
Karbonil ($\text{C}=\text{O}$) gerilim (1743 cm^{-1})	$1800\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$	$1775\text{-}1720 \text{ cm}^{-1}$
Amid I (1640 cm^{-1})	$1800\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$	$1720\text{-}1584 \text{ cm}^{-1}$
Amid II (1545 cm^{-1})	$1800\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$	$1584\text{-}1481 \text{ cm}^{-1}$

Çizelge 2.1. (devam) Sıçan karaciğeri spektrumundaki bantların altında kalan alanların hesaplanması için kullanılan baseline noktaları ve spektral bölgeler.

CH ₂ bükülme (1453 cm ⁻¹)	1800-900 cm ⁻¹	1481-1430 cm ⁻¹
COO ⁻ simetrik gerilim (1398 cm ⁻¹)	1800-900 cm ⁻¹	1430-1363 cm ⁻¹
Amid III (1308 cm ⁻¹)	1800-900 cm ⁻¹	1330-1275 cm ⁻¹
PO ₂ antisimetrik gerilme (1237 cm ⁻¹)	1800-900 cm ⁻¹	1275-1183 cm ⁻¹
PO ₂ simetrik gerilme (1081 cm ⁻¹)	1800-900 cm ⁻¹	1137-1066 cm ⁻¹
C-O gerilme (1041 cm ⁻¹)	1800-900 cm ⁻¹	1066-979 cm ⁻¹
C-N ⁺ -C gerilme (972 cm ⁻¹)	1800-900 cm ⁻¹	979-952 cm ⁻¹

Detaylı analizler için ham spektrumların ortalamaları kullanılmıştır. Dalga sayısı ve bant genişliği değerleri, %75 yükseklikten okunmuştur. Görsel gösterim için ortalaması alınmış ham spektrumlara baseline düzeltilmesi ve normalize işlemi uygulanmıştır.

Protein ikincil yapı değişimlerini belirlemek için ayrılmamış alt bantlardan oluşan Amid I bantına (1700-1600 cm⁻¹) ikincil türev vektör normalizasyon yöntemi uygulanmıştır.

2.6. İSTATİSTİKSEL TEST

Elde edilen verilere öncelikle Kolmogorov-Smirnov normalite testi uygulandı. Veriler normal dağılım göstermediğinden istatistiksel analiz için non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi tercih edildi. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. İstatistiki anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiş, anlamlılık derecesi $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ olarak belirtilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. BULGULAR

3.1.1. Propolisin Fitokimyasal Analizi

PRPLS'nin fitokimyasal analiz sonuçları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Sonuçlar, PRPLS'nin etanolik ekstraktında alkaloidler, flavonoidler, fenoller, tanenler, terpenoidler, reçineler ve ksantoproteinlerin varlığını gösterirken, saponinler ve glikozidlerin olmadığını göstermiştir.

Çizelge 3.1. Propolisin fitokimyasal analizi.

Bileşenler	Var/Yok
Alkaloidler	+
Flavonoidler	+
Fenoller	+
Tanenler	+
Saponinler	-
Terpenoids	+
Reçineler	+
Glikozidleri	-
Ksantoproteinler	+

3.1.2. Propolisin İçerik Analizi

PRPLS'nin etanolik ekstraktında ölçülen maddelerin miktarı, Çizelge 3.2'de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi kullandığımız PRPLS'te 13 farklı maddenin miktarı ölçülmüştür. Gallik asit, kateşin hidrat, vanilik asit, protokatinik asit çok az miktarda tespit edilirken, pinosembrin ve CAPE en fazla miktarda elde edilmiştir.

Çizelge 3.2. Propolisin İçerik analizi.

No	İçerik	Birim	Sonuç
1	Gallik Asit	mg/g	0,07 ± 0,003
2	Kateşin Hidrat	mg/g	0,081 ± 0,003
3	Vanilik Asit	mg/g	0,014 ± 0,002
4	Kafeik Asit	mg/g	1,919 ± 0,001
5	p-Kumarik Asit	mg/g	0,578 ± 0,004
6	Trans-Ferulik Asit	mg/g	1,551 ± 0,003
7	Protokatinik Asit	mg/g	0,001 ± 0,00
8	Trans-Sinamik Asit	mg/g	1,347 ± 0,023
9	Narenferin	mg/g	2,531 ± 0,011
10	Apigenin	mg/g	1,762 ± 0,044
11	Pinosembirin	mg/g	14,209 ± 0,032
12	CAPE	mg/g	10,728 ± 0,028
13	Galanjin	mg/g	3,758 ± 0,066

3.1.3. Propolisin Toplam Madde Miktarı ve Antioksidan Kapasitesi

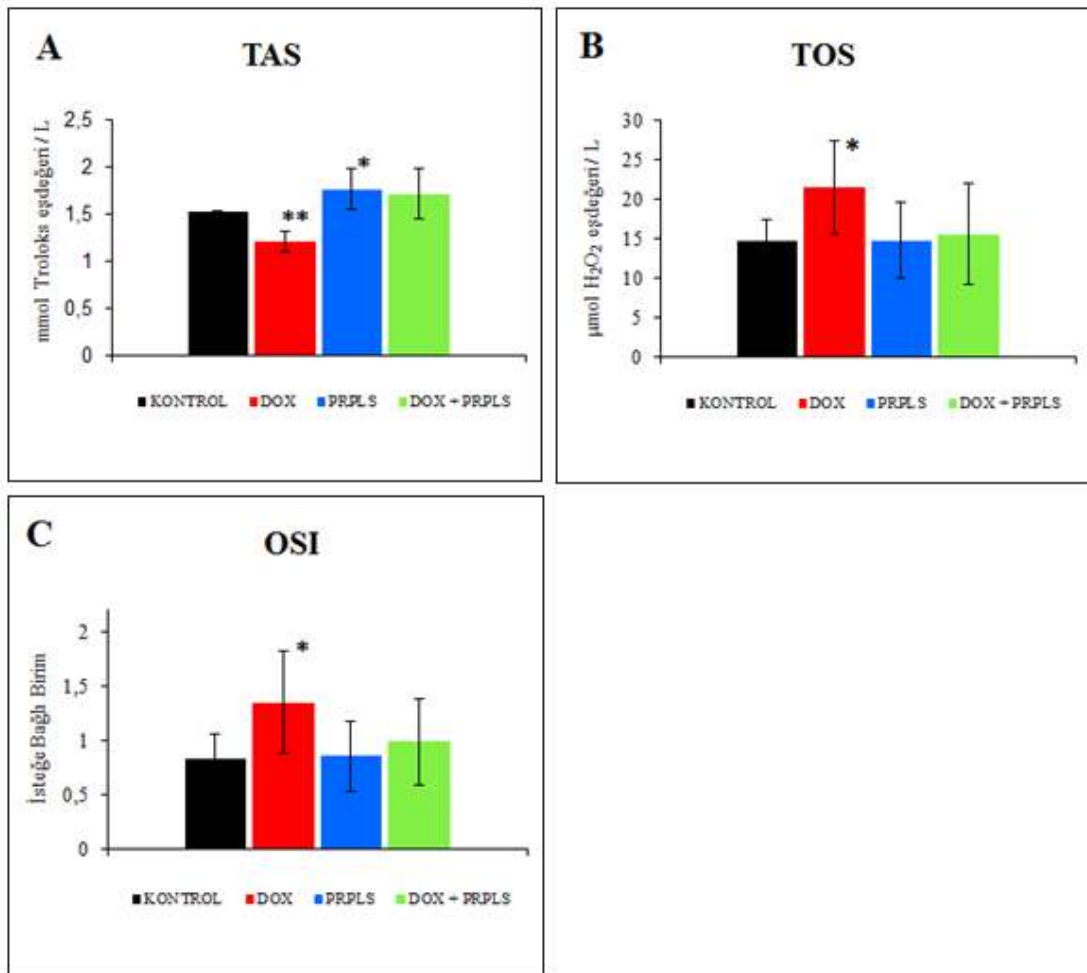
PRPLS'nin fenolik ve flavonoid madde miktarı ile antioksidan kapasite analizleri Çizelge 3.3'te verilmiştir. PRPLS'nin alkollü ekstraktında toplam fenolik madde miktarı $81,8 \pm 2,79$ mg gae/g, toplam flavonoid madde miktarı ise $46,1 \pm 1,13$ mg ke/g olarak ölçüldü. CUPRAC analizine göre PRPLS'nin alkollü ekstraktının antioksidan kapasitesi $217,2 \pm 2,12$ mg te/g, DPPH analizine göre $77,9 \pm 2,91$ mg te/g, FRAP analizine göre $41,3 \pm 1,06$ mg te/g ölçüldü.

Çizelge 3.3. Propolisin fenolik ve flavonoid madde miktarı ve antioksidan kapasitesi.

Analiz	Sonuç
Toplam Fenolik Madde (mg gae/g)	$81,8 \pm 2,79$
Toplam Flavonoid Madde (mg ke/g)	$46,1 \pm 1,13$
Antioksidan Kapasite (CUPRAC) (mg te/g)	$217,2 \pm 2,12$
Antioksidan Kapasite (DPPH) (mg te/g)	$77,9 \pm 2,91$
Antioksidan Kapasite (FRAP)(mg te/g)	$41,3 \pm 1,06$

3.1.4. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Çalışmamızda, DOX ve PRPLS uygulamasından sonra meydana gelen oksidatif stresi belirlemek için kan plazmasında TAS, TOS ve OSI değerleri ölçüldü. Şekil 4.1A, B ve C’de plazmadaki TAS, TOS ve OSI değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekil 4.1A’dan görüldüğü üzere TAS, DOX grubunda anlamlı derecede azalmış ($p<0.01$), PRPLS grubunda anlamlı derecede artmış ($p<0.05$), DOX + PRPLS grubunda ise herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir. TOS değerlerine bakıldığında, sadece DOX grubunda anlamlı bir artış olduğu görülmektedir ($p<0.05$) (Şekil 1B). Benzer şekilde, TAS değerinin TOS değerine oranlanması ile elde edilen OSI değeri de DOX grubunda anlamlı derecede artmış ($p<0.05$), diğer gruplarda herhangi anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 3.1).

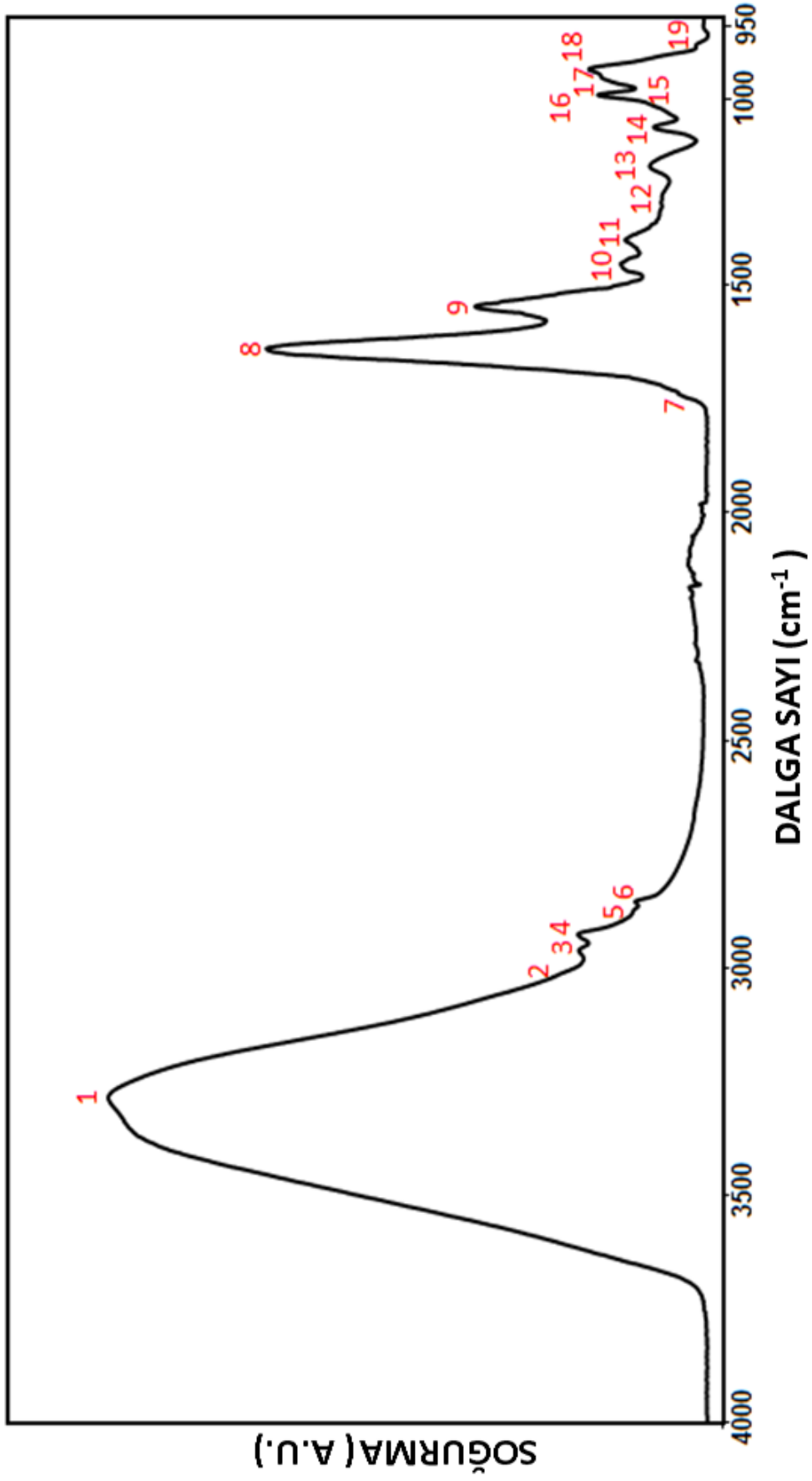


Şekil 3.1. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının TAS (A), TOS (B) ve OSI (C) değerlerindeki değişim (* $p<0,05$, ** $p<0.01$).

3.1.5. ATR-FTIR Spektroskopisi Sonuçları

ATR-FTIR spektroskopisi biyolojik dokular üzerine değişik dalga boylarında kızılötesi ışınlar göndererek, biyomoleküllerin içindeki fonksiyonel gruplara ait soğurma bantlarını görüntüleme imkânı sağlayan biyofiziksel bir tekniktir. Bu teknik ile dokudaki moleküllerin yapıları, fonksiyonları ve dinamik özellikleri hakkında önemli bilgiler elde edilebilir. Çalışmamızda, DOX'un karaciğer dokusunda meydana getirdiği etkileri ve bu etkilere karşı PRPLS'nin koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla ATR-FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. Şekil 4.2. kontrol sıçan karaciğeri spektrumunu göstermektedir. Şekilde başlıca bantlar numaralandırılmış ve bu bantların her birinin literatüre göre tanımları Çizelge 3.4'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi karaciğere ait bir FTIR spektrumu, nükleik asitler, karbonhidratlar, lipitler ve proteinlerdeki fonksiyonel gruplardan kaynaklanan birçok soğurma bantı içeren oldukça kompleks bir spektrumdur.





Şekil 3.2. Kontrol sıçan karaciğerinin 4000-950 cm⁻¹ bölgesindeki FTIR spektrumu.

Çizelge 3.4. Sıçan karaciğerinin ATR-FTIR spektrumundaki başlıca soğurma bantları
[129], [130].

BA NT NO	DALGA SAYISI (cm ⁻¹)	TANIM
1	3313	Amid A: Çoğunlukla proteinlerin N-H gerilmesi, polisakkaritlerin O-H gerilmesi ve moleküller arası H bağlanması
2	3012	Olefinik=CH titreşim gerilme: Doymamış lipitler
3	2965	CH₃ antisimetrik gerilme: Lipitler, protein yan zincirleri, karbonhidratlar ve nükleik asitler
4	2929	CH₂ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
5	2874	CH₃ simetrik gerilme: Çoğunlukla proteinler, az miktarda lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
6	2856	CH₂ simetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler, az miktarda proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler
7	1743	Karbonil ester (C=O) gerilme: Çoğunlukla trigliseritler ve kolesterol esterlerde ester fonksiyonel gruplar
8	1640	Amid I: Proteinlerin C=O gerilmesi (80 %)
9	1547	Amid II: Proteinler (60% N-H bending, 40% C-N stretching)
10	1456	CH₂ bükülme: Çoğunlukla lipitler, az miktar proteinler
11	1400	COO⁻ simetrik gerilme: Yağ asitleri ve amino asit yan grupları
12	1308	Amid III: Proteinler
13	1238	PO₂⁻ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla nükleik asitler ve az miktar fosfolipitler
14	1153	CO-O-C antisimetrik gerilme: Lipitler, nükleik asitler
15	1120	Riboz halkası titreşimleri: RNA
16	1082	PO₂⁻ simetrik gerilme: Nükleik asitler ve fosfolipitler C—O gerilme: Polisakkaritler, glikolipitler
17	1033	C—O gerilme: Polisakkaritler, glikolipitler
18	1025	DNA: Nükleik asitler
19	972	C-N⁺-C gerilme: Nükleik asitler, RNA'nın riboz-fosfat ana zincir titreşimleri

Amid A bantı olarak isimlendirilen, 3313 cm⁻¹ dalga sayısında ortaya çıkan bant (Bant No: 1), proteinlerin N-H titreşimlerinden, polisakkaritler ve suyun O-H titreşimlerinden ve moleküllerin arasındaki H bağlanmalarından kaynaklanmaktadır [106],[107]. C-H

gerilme bölgesi olarak adlandırılan 3025-2800 cm⁻¹ dalga sayısı aralığındaki bölgede bulunan bantlar ağırlıklı olarak dokudaki lipidler hakkında bilgi vermektedir. 3012 cm⁻¹ dalga sayısındaki olefinik=CH bantı, (Bant No: 2) olefinik=CH gruplarının C-H gerilme titreşimlerinden sinyaller alır ve doymamış lipidler ile ilgili bilgiler verir [131]. 2965 cm⁻¹ (Bant No: 3) ve 2929 cm⁻¹ (Bant No: 4) dalga sayılarında ortaya çıkan bantlar CH₃ ve CH₂ gruplarının antisimetrik gerilme titreşimlerinden, 2874 cm⁻¹ (Bant No: 5) ve 2856 cm⁻¹ (Bant No: 6) dalga sayılarındaki bantlar ise CH₃ ve CH₂ gruplarının simetrik gerilme titreşimlerinden sinyaller almaktadır [129]. CH₃ antisimetrik, CH₂ antisimetrik ve CH₂ simetrik bantları doymuş lipidler hakkında bilgi verirken, CH₃ simetrik bantı ağırlıklı olarak proteinler hakkında bilgi vermektedir [109],[112].

Parmak izi bölgesi olarak adlandırılan, 1800-950 cm⁻¹ dalga sayısı aralığındaki bölge proteinler, nükleik asitler, kolesterol esterleri, trigliseritler vb. moleküllerden kaynaklanan farklı spektral bantlar içerir. Bu bölgede 1743 cm⁻¹ dalga sayısında ortaya çıkan C=O (karbonil ester) gerilme bantı (Bant No: 7), sistemdeki trigliserit ve kolesterol esterleri hakkında bilgi vermektedir [132]. 1640, 1547 ve 1308 cm⁻¹ dalga sayısında gözlenen amid I (Bant No: 8), amid II (Bant No: 9) ve amid III (Bant No: 12) bantları proteinler hakkında bilgi verir. CH₂ bükülme bantı (Bant No: 10) olarak isimlendirilen 1456 cm⁻¹ dalga sayısında ortaya çıkan bant ağırlıklı olarak lipid ve az miktarda proteinlerdeki CH₂ gruplarından kaynaklanmaktadır [133]. 1400 cm⁻¹'de görülen COO⁻ simetrik gerilme bantı (Bant No: 11) yağ asitleri ve aminoasitlerden kaynaklanır ve sistemdeki lipid ve proteinlerle ilgili bilgi verir [129]. 1308-900 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ortaya çıkan bantlar ise ağırlıklı olarak fosfolipit, nükleik asit ve karbonhidratlardan sinyaller almaktadır. 1238 ve 1082 cm⁻¹'de ortaya çıkan PO₂⁻ antisimetrik (Bant No: 13) ve PO₂⁻ simetrik gerilme bantları (Bant No: 16), nükleik asitlerden ve fosfolipitlerden kaynaklanmaktadır [130]. PO₂⁻ simetrik gerilme titreşim bantı (Bant No: 16), glikojen içindeki C-O gerilme titreşimlerinden de sinyaller almaktadır. 1033 cm⁻¹'deki C-O gerilme bantı (Bant No: 17) ise esas olarak glikojenden sinyal almaktadır ve ana glikojen bantı olarak bilinmektedir [108]. 1153 cm⁻¹'de ortaya çıkan CO-O-C antisimetrik gerilme bantı (Bant No: 14), lipidler ve nükleik asitlerdeki C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [132]. 1120 cm⁻¹ dalga sayısında ortaya çıkan bant (Bant No: 15), RNA'daki riboz halkalarından sinyal almaktadır [130]. 1025 cm⁻¹ dalga sayısında ortaya çıkan bant ise (Bant No: 18), DNA hakkında bilgi vermektedir [130]. Bunlara ilave olarak, 972 cm⁻¹'deki C-N⁺-C gerilme

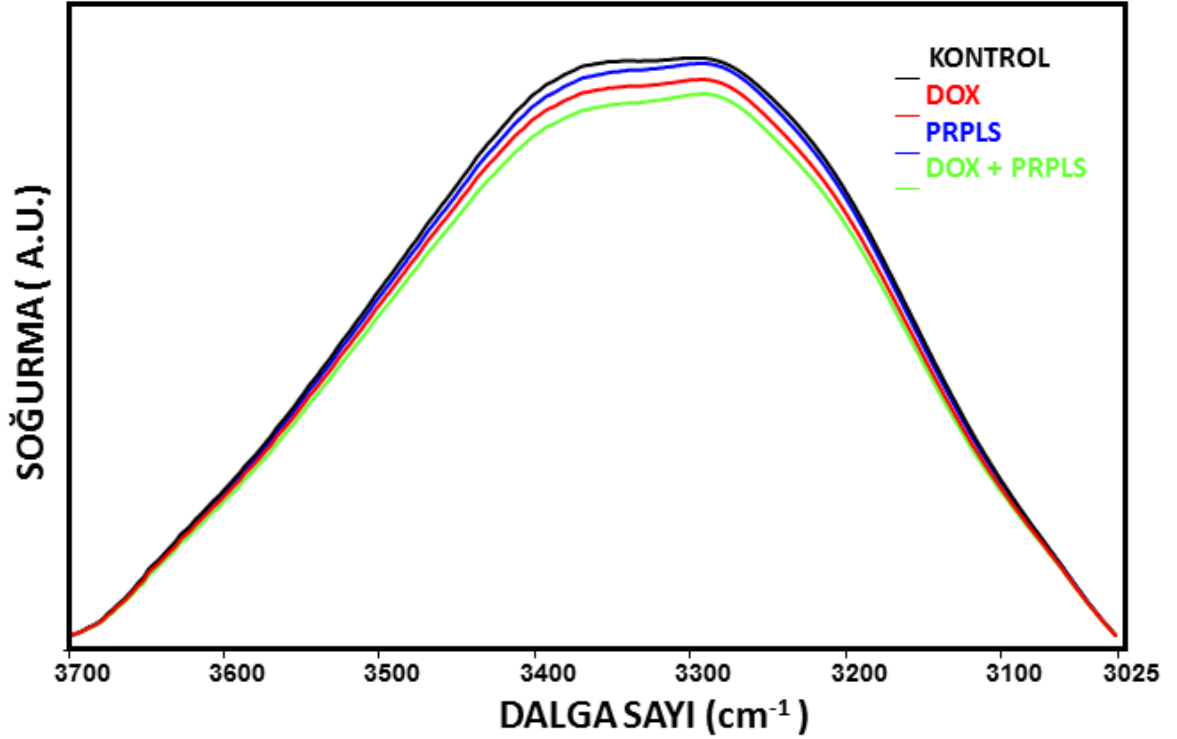
bantı da (Bant No: 19) nükleik asitler hakkında bilgi veren bir banttır.

FTIR spektrumlarında ortaya çıkan bantların dalga sayısı değerleri, altında kalan alan değerleri, genişlikleri ve alanların birbirine göre oranları analiz edilerek dokudaki moleküller hakkında önemli bilgiler elde edilebilir. Örneğin, kızılötesi bantların sinyal şiddetleri ve altında kalan alanlar o fonksiyonel gruba ait molekülün dokudaki konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir [108]. Çizelge 3.5'te kontrol, doksorubusin (DOX), Propolis (PRPLS) ve doksorubusin + Propolis (DOX + PRPLS) uygulanmış sıçanların karaciğer dokularının kızılötesi bantlarının alan değerlerinde meydana gelen değişiklikler verilmiştir.

Çizelge 3.5. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçanların karaciğer dokularının kızılötesi bantlarının alan değerlerinde meydana gelen değişiklikler (Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık derecesi * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ şeklinde gösterilmiştir.

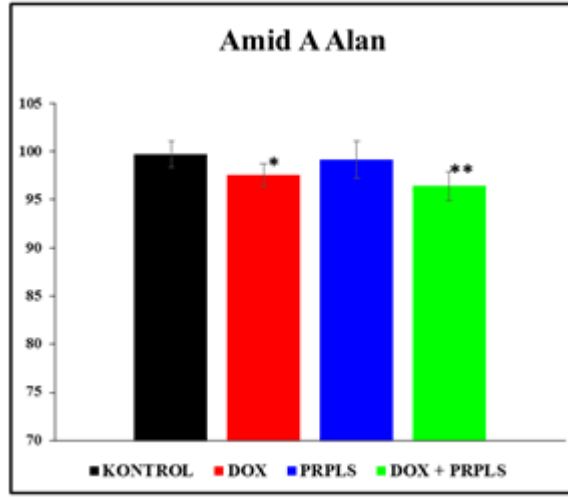
Ba nt No	Dalga Sayısı (cm^{-1})	KONTROL	DOX	PRPLS	DOX + PRPLS
1	3313 cm^{-1}	99,679 $\pm$ 1,29	97,536 $\pm$ 1,101*	99,123 $\pm$ 1,882	96,367 $\pm$ 1,443**
2	3012 cm^{-1}	0,019 $\pm$ 0,004	0,023 $\pm$ 0,005	0,018 $\pm$ 0,004	0,019 $\pm$ 0,004
3	2965 cm^{-1}	0,126 $\pm$ 0,025	0,163 $\pm$ 0,015*	0,148 $\pm$ 0,028	0,174 $\pm$ 0,029*
4	2929 cm^{-1}	0,304 $\pm$ 0,042	0,366 $\pm$ 0,025*	0,325 $\pm$ 0,044	0,377 $\pm$ 0,046*
5	2874 cm^{-1}	0,025 $\pm$ 0,005	0,033 $\pm$ 0,004*	0,027 $\pm$ 0,002	0,036 $\pm$ 0,005*
6	2856 cm^{-1}	0,063 $\pm$ 0,008	0,077 $\pm$ 0,005**	0,062 $\pm$ 0,007	0,074 $\pm$ 0,006*
7	1743 cm^{-1}	0,536 $\pm$ 0,023	0,573 $\pm$ 0,013**	0,540 $\pm$ 0,024	0,567 $\pm$ 0,026*
8	1640 cm^{-1}	14,19 $\pm$ 0,533	15,414 $\pm$ 0,440**	15,268 $\pm$ 1,641	15,916 $\pm$ 1,375*
9	1547 cm^{-1}	6,024 $\pm$ 0,457	7,107 $\pm$ 0,440**	6,935 $\pm$ 1,174	7,593 $\pm$ 1,02**
10	1456 cm^{-1}	1,571 $\pm$ 0,144	1,844 $\pm$ 0,123**	1,812 $\pm$ 0,235	1,979 $\pm$ 0,978*
11	1400 cm^{-1}	1,839 $\pm$ 0,189	2,096 $\pm$ 0,146*	2,112 $\pm$ 0,28	2,271 $\pm$ 0,292*
12	1308 cm^{-1}	0,951 $\pm$ 0,130	1,183 $\pm$ 0,110*	1,152 $\pm$ 0,197	1,274 $\pm$ 0,232*
13	1238 cm^{-1}	1,216 $\pm$ 0,260	1,811 $\pm$ 0,200**	1,580 $\pm$ 0,376	1,967 $\pm$ 0,347*
14	1153 cm^{-1}	0,473 $\pm$ 0,071	0,420 $\pm$ 0,037	0,480 $\pm$ 0,084	0,451 $\pm$ 0,090
15	1120 cm^{-1}	0,331 $\pm$ 0,015	0,307 $\pm$ 0,018*	0,330 $\pm$ 0,028	0,301 $\pm$ 0,021*
16	1082 cm^{-1}	1,334 $\pm$ 0,318	1,283 $\pm$ 0,116	1,393 $\pm$ 0,342	1,393 $\pm$ 0,305
17	1033 cm^{-1}	1,911 $\pm$ 0,363	0,854 $\pm$ 0,369**	1,665 $\pm$ 0,375	0,957 $\pm$ 0,270**
18	1025 cm^{-1}	0,910 $\pm$ 0,087	0,32 $\pm$ 0,089**	0,740 $\pm$ 0,073	0,357 $\pm$ 0,084**
19	972 cm^{-1}	0,047 $\pm$ 0,007	0,063 $\pm$ 0,007	0,058 $\pm$ 0,009	0,076 $\pm$ 0,010

Sıçan karaciğer spektrumu birçok soğurma bantından oluşan karmaşık bir spektrum olduğundan, çalışmamızdaki spektral analizler üç farklı dalga sayısı aralığında gerçekleştirilmiştir (3700-3025 cm^{-1} , 3025-2800 cm^{-1} ve 1800-950 cm^{-1}). Şekil 3.3 kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplardaki sıçan karaciğerinin 3700-3025 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki ortalama ATR-FTIR spektrumlarını göstermektedir.



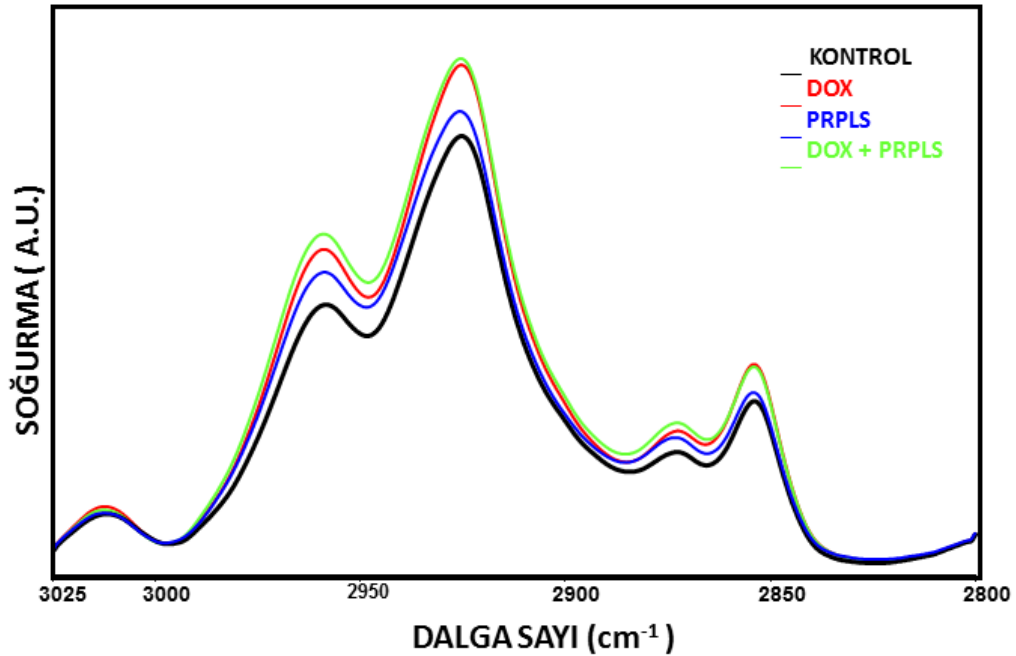
Şekil 3.3. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçan karaciğerine ait 3700-3025 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki ortalama ATR-FTIR spektrumları (Spektrumlar, CH₂ antisimetrik bantına göre normalize edilmiştir.).

Şekil 3.4.'te, Amid A bandının alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak gösterilmiştir. Şekil 3.2. ve 3.3.'ten görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan DOX ve DOX + PRPLS gruplarında anlamlı derecede azalmış ($p < 0.05$, $p < 0.01$) ancak PRPLS grubunda herhangi anlamlı bir değişiklik ortaya çıkmamıştır.



Şekil 3.4. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid A bantının alan değerlerindeki değişim (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

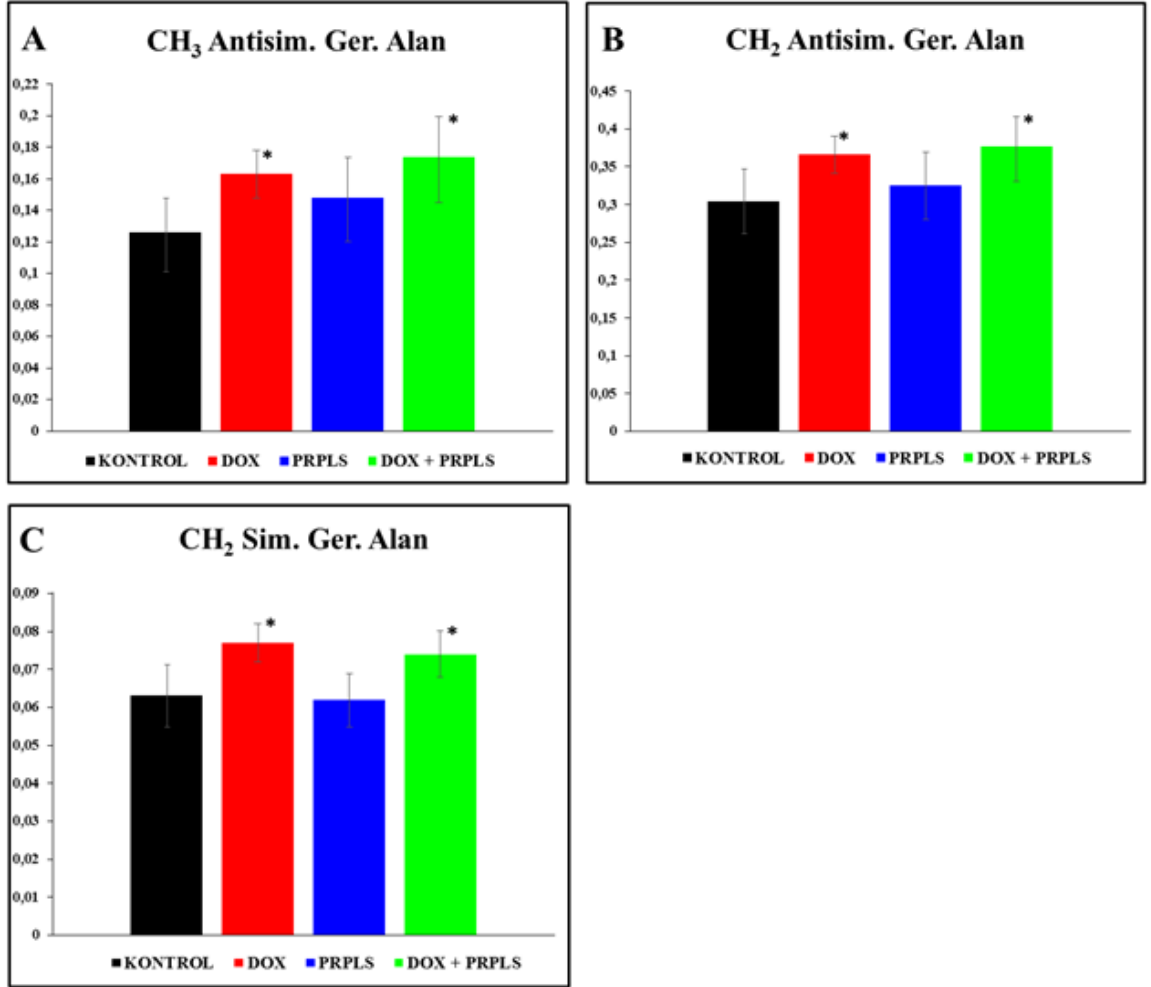
Şekil 3.5'te kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçan karaciğeri dokularının ortalama ATR-FTIR spektrumlarının lipid bölgesini ($3025-2800 \text{ cm}^{-1}$) göstermektedir.



Şekil 3.5. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçan karaciğerine ait $3025-2800 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığındaki ortalama ATR-FTIR spektrumları (Spektrumlar, Amid A bantına göre normalize edilmiştir).

CH₃ antisimetrik, CH₂ antisimetrik ve CH₂ simetrik gerilme bantları doymuş lipidlerden kaynaklanan bantlardır. Bu bantların altında kalan alan değerlerindeki

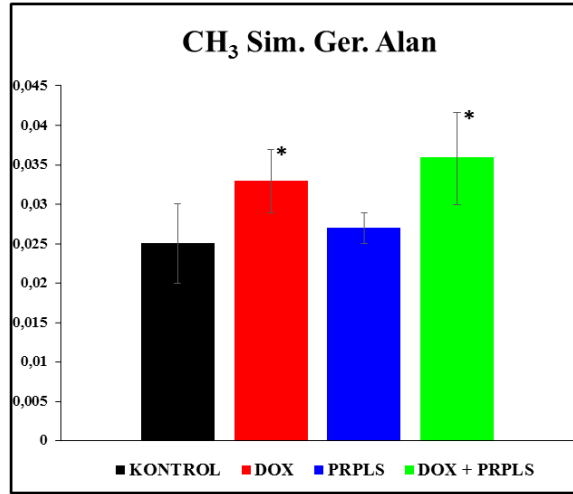
değişimler Şekil 3.6’da bar diyagramı olarak verilmiştir. Bu şekillerden ve şekil 3.5’ten görüldüğü üzere bu bantların altında kalan alan değerleri DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmış ($p<0.05$) fakat PRPLS uygulanan grupta herhangi bir anlamlı değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 3.6. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH₃ antisimetrik (A), CH₂ antisimetrik (B) ve CH₂ simetrik (C) bantların alan değerlerindeki değişim (* $p<0.05$).

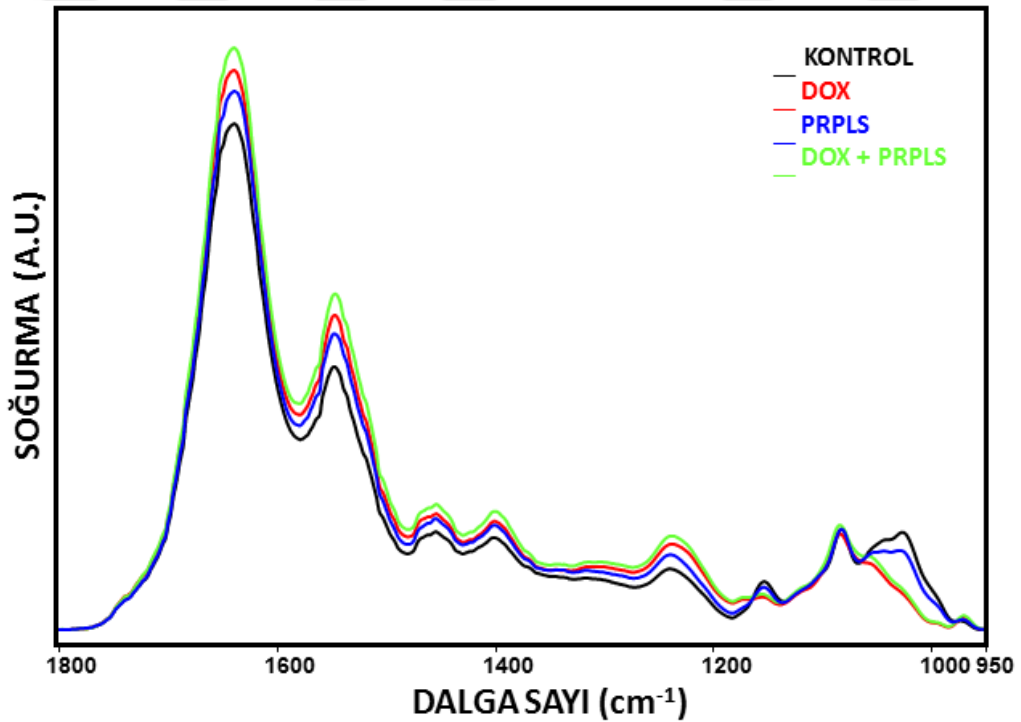
C-H gerilme bölgesindeki CH₃ simetrik gerilme bantı çoğunlukla proteinlerde meydana gelen değişimler hakkında bilgi edinmek için kullanılmaktadır [101],[112]. Bu bantın altında kalan alan değerindeki değişimler bar diyagramı olarak Şekil 3.7’de verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda bu bantın altında kalan alan anlamlı derecede artmış ($p<0.05$) fakat PRPLS uygulanmış grupta bu bantın alan değerinde herhangi bir anlamlı değişiklik meydana gelmemiştir. Bu sonuç, DOX’un dokudaki proteinlerin miktarında bir artışa sebep olduğunu ve DOX

uygulamasından önce verilen PRPLS'nin bu artışı önleyemediğini göstermektedir (* $p < 0.05$).



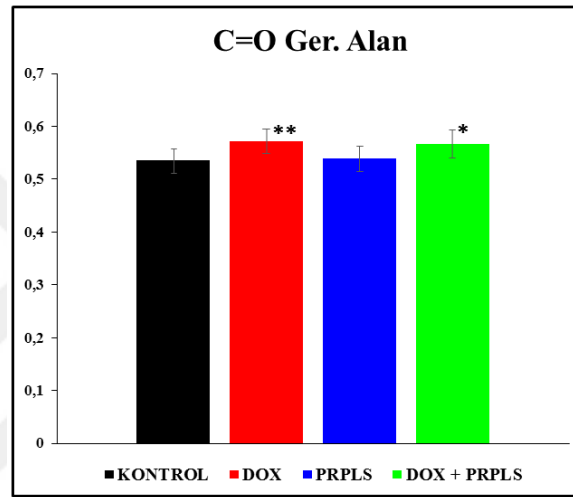
Şekil 3.7. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH3 simetrik bantının alan değerlerindeki değişim (* $p < 0.05$).

Şekil 3.8'de kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçan karaciğeri dokularının ortalama ATR-FTIR spektrumlarının parmak izi bölgesini (1800-950 cm^{-1}) göstermektedir.



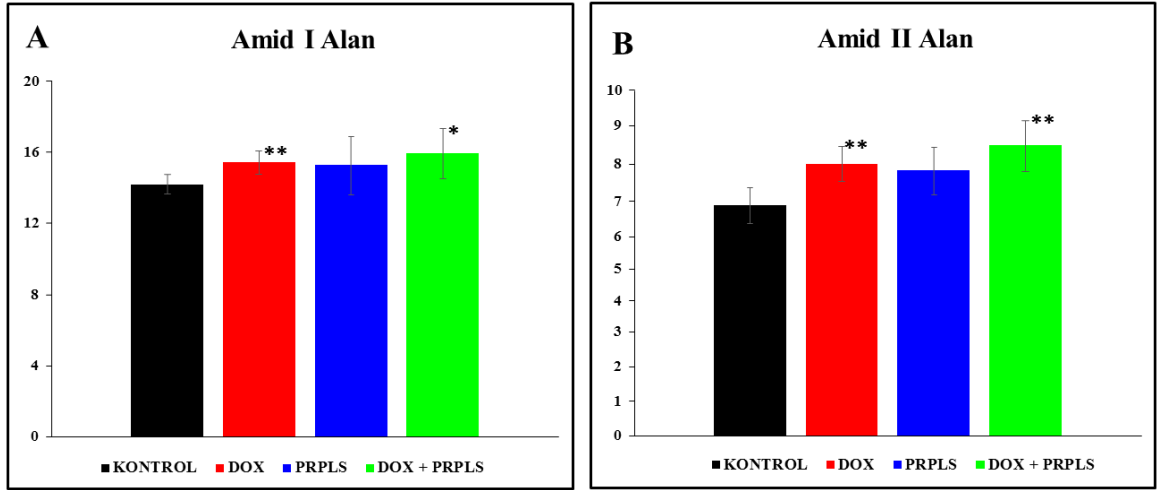
Şekil 3.8. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçan karaciğerine ait 1800-950 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki ortalama ATR-FTIR spektrumları (Spektrumlar, Amid A bantına göre normalize edilmiştir).

Parmak izi bölgesinde, 1743 cm⁻¹ dalga sayısında gözlenen C=O gerilme bantında meydana gelen değişimler çoğunlukla trigliseritler, kolesterol esterlerindeki değişimler hakkında bilgi elde etmek için kullanılmaktadır [133],[134]. Şekil 3.9’da bu bantın altında kalan alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu bantların altında kalan alan değerleri, DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış grupta anlamlı derecede artmış ($p<0.05$, $p<0.01$) ancak PRPLS uygulanan grupta herhangi bir anlamlı değişiklik meydana gelmemiştir. Bu sonuç, DOX’un sıçan karaciğer dokusundaki lipitlerin miktarında bir artışa sebep olduğu sonucunu desteklemektedir.



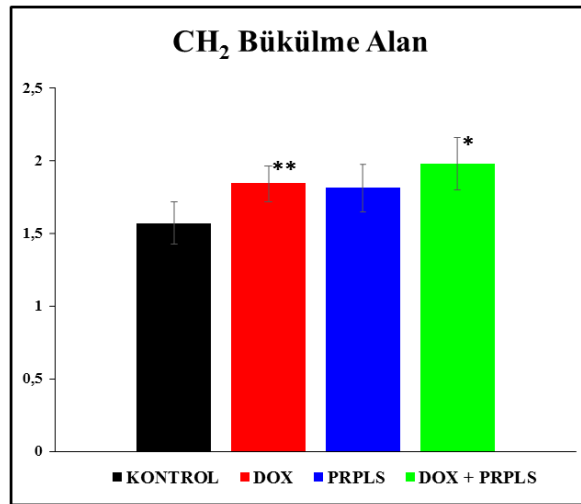
Şekil 3.9. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının C=O bantının alan değerlerindeki değişim (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

Sistemdeki protein içeriği hakkında bilgi edinmek için parmak izi bölgesindeki, 1640 ve 1547 cm⁻¹ dalga sayısında gözlenen Amid I ve Amid II bantları kullanılır [100],[108]. Bu iki bantın altında kalan alan değerlerindeki değişimler Şekil 3.10’da bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu bantların altında kalan alan değerleri, DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış grupta anlamlı derecede artmış ($p<0.05$, $p<0.01$) ancak PRPLS uygulanan grupta herhangi bir anlamlı değişiklik meydana gelmemiştir.



Şekil 3.10. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid I (A) ve Amid II (B) bantlarının alan değerlerindeki değişim (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

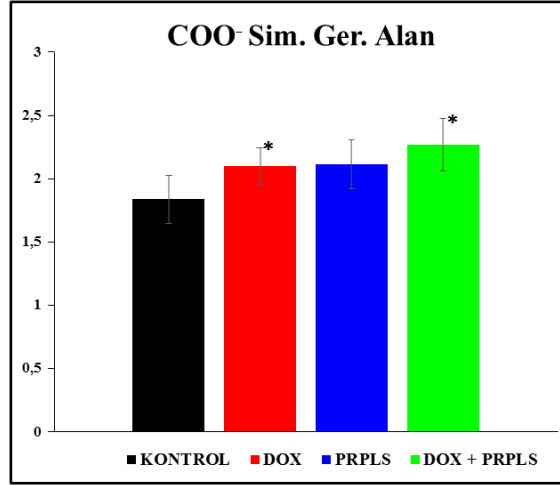
1456 cm^{-1} dalga sayısında ortaya çıkan CH_2 bükülme bantı lipid ve proteinlerdeki CH_2 gruplarından sinyaller almaktadır. Bu bantın altında kalan alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak Şekil 3.11’de verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmış ($p < 0.05$, $p < 0.01$) ancak sadece PRPLS uygulanmış grupta herhangi bir anlamlı değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 3.11. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS s gruplarının CH_2 bükülme bantının alan değerlerindeki değişim (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

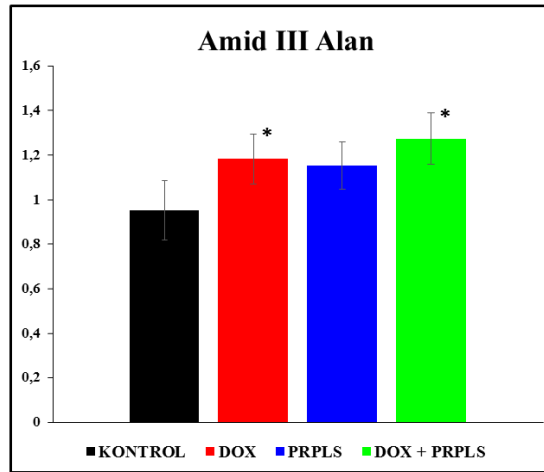
1400 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen COO^- simetrik gerilme bantı, yağ asitleri ve amino asitlerde meydana gelen değişimler hakkında bilgi edinmek için kullanılmaktadır [129]. Bu banta ait alan değerlerindeki değişimler Şekil 3.12’de bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan, DOX ve DOX +

PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmış ($p<0.05$) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi bir anlamlı değişiklik göstermemiştir.



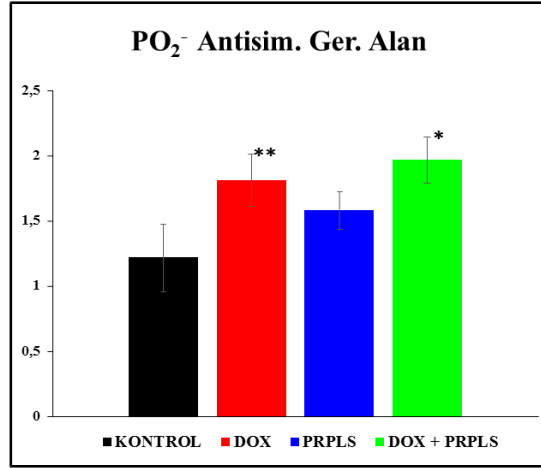
Şekil 3.12. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının COO- simetrik gerilme bantının alan değerlerindeki değişim (* $p<0.05$).

1308 cm^{-1} dalga sayısında ortaya çıkan Amid III bantı parmak izi bölgesinde yer alan protein kaynaklı bir banttir. Bu bantın alan değerlerindeki değişimlerin bar diyagramı Şekil 3.13’de verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmış ($p<0.05$) ancak PRPLS uygulanan grupta herhangi anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Bu sonuç, Amid I ve II ve CH3 simetrik bantlarının alan analizlerinden elde ettiğimiz DOX’un sıçan karaciğer dokusundaki protein miktarında bir artışa sebep olduğu sonucunu desteklemektedir.



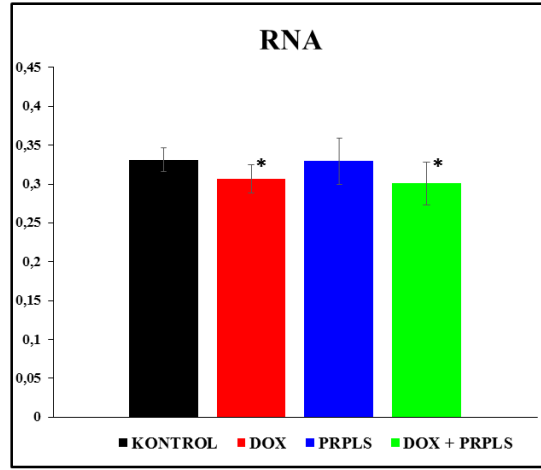
Şekil 3.13. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid III bantının alan değerlerindeki değişim (* $p<0.05$).

1238 cm^{-1} 'de gözlenen PO_2^- antisimetrik gerilme bantı sistemdeki fosfat içeren (nükleik asitler ve fosfolipitler) bileşikler hakkında bilgi verir [106]. Bu bantın alan değerindeki değişimler Şekil 3.14.'te bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere PO_2^- antisimetrik gerilme bantının altında kalan alan DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmış ($p<0.05$, $p<0.01$). ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik göstermemiştir.



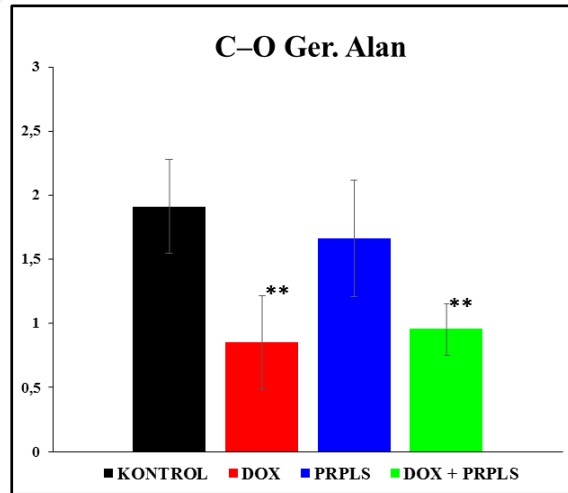
Şekil 3.14. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının PO_2^- antisimetrik gerilme bantının alan değerlerindeki değişim (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

Riboz halkası titreşimlerinden sinyaller alan 1120 cm^{-1} 'deki bant, sistemdeki RNA molekülleri ile ilgili bir veren özel bir banttır. Şekil 3.15'te bu bantın alan değerindeki değişimleri bar diyagramı olarak göstermektedir. Şekilden görüldüğü gibi bu bantın alan değeri DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azalmıştır (* $p<0.05$). Bu gruplarda gözlenen azalma sistemdeki RNA miktarının azaldığını göstermektedir.



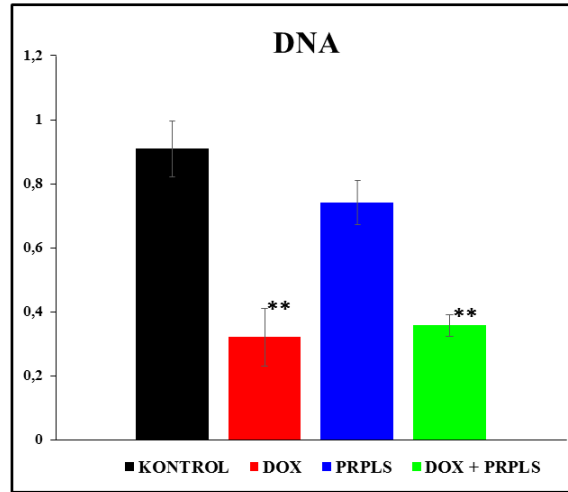
Şekil 3.15 Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının RNA bantının alan değerlerindeki değişim (* $p < 0.05$).

1033 cm^{-1} 'de gözlenen C-O gerilme bantının alan değerlerindeki değişimler, bar diyagramı olarak Şekil 3.16'da verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azalmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Bu bant sistemdeki glikojen miktarı hakkında bilgi veren başlıca bant olduğundan, bu azalma DOX'un glikojen miktarında azalmaya sebep olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.16. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının C-O gerilme bantının alan değerlerindeki değişim (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

1025 cm^{-1} 'de ortaya çıkan bant DNA'dan sinyaller almaktadır. Bu bantın alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak Şekil 3.17'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu bantın altında kalan alan DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış bütün uygulama gruplarında anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0.01$).



Şekil 3.17. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının DNA bantının alan değerlerindeki değişim (**p<0.01).

Son yıllarda FITR spektrum analizlerinde, bant alanı analizlerinin yanısıra sistemdeki moleküllerin birbirlerine göre değişimlerini test etmek için bazı spesifik kıvılcı bantların alan oranları da kullanılmaktadır [101]. Alan oranlarının analizi, deney koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanabilen hataları ortadan kaldıracıdığı için büyük önem taşır. Çalışmamızda kullandığımız bant alanı oranları, bu oranların hesaplanmasında kullandığımız fonksiyonel gruplar ve hesaplanan oranın işlevi Çizelge 3.6’da verilmiştir. Bant alan oranı değerlerinde meydana gelen değişiklikler ise Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Bazı spektral bantların alan oranları, oran hesaplamalarında kullanılan fonksiyonel gruplar ve hesaplanan oranın işlevi [129],[130],[134],[135].

Bant Alan Oran	Fonksiyonel Gruplar	İşlevi
Lipit/Protein	CH ₃ antisim. ger. (# 3) + CH ₂ antisim ger. (# 4) + CH ₂ sim ger. (# 6)/Amid II (# 9)	Sistemdeki lipid ve/veya protein konsantrasyonu
C-O/Protein	C-O gerilme (# 15)/Amid II (# 9)	Sistemdeki glikojen konsantrasyonu
C-O/Lipit	C-O gerilme (# 15)/CH ₃ antisim ger. (# 3) + CH ₂ antisim ger. (# 4) + CH ₂ sim ger. (# 6)	
CH ₂ sim./CH ₂ sim.+ antisim.	CH ₂ sim ger. (# 6)/CH ₂ sim ger. (# 6) + CH ₂ antisim ger. (# 4)	Sistemdeki doymuş lipid konsantrasyonu
CH ₂ antisim./CH ₂ sim.	CH ₂ antisim. ger. (# 4)/CH ₂ sim. ger. (# 6)	

Çizelge 3.6. (devam) Bazı spektral bantların alan oranları, oran hesaplamalarında kullanılan fonksiyonel gruplar ve hesaplanan oranın işlevi [129],[130],[134],[135].

CH ₂ antisim./CH ₃ antisim.	CH ₂ antisim. ger. (# 4)/CH ₃ antisim. ger. (# 3)	Lipitlerin zincir uzunluğu
CH ₂ antisim./Lipit	CH ₂ antisim. ger. (# 4)/CH ₃ antisim. ger. (# 3) + CH ₂ antisim. ger. (# 4) + CH ₂ sim. ger. (# 6)	
CH ₃ antisim./Lipit	CH ₃ antisim. ger. (# 3)/CH ₃ antisim. ger. (# 3) + CH ₂ antisim. ger. (# 4) + CH ₂ sim. ger. (# 6)	Sistemdeki metil konsantrasyonu
C=O/Lipit	Karbonil ester gerilme (# 7)/CH ₃ antisim. ger. (# 3) + CH ₂ antisim. ger. (# 4) + CH ₂ sim. ger. (# 6)	Sistemdeki karbonil konsantrasyonu
Olefinik=CH/Lipit	Olefinik=CH titreşim ger. (# 2)/CH ₃ antisim. ger. (# 3) + CH ₂ antisim. ger. (# 4) + CH ₂ sim. ger. (# 6)	Sistemin doymamış lipit seviyesi
Amid I/Amid I + II	Amid I (# 8)/Amid I (# 8) + Amid II (# 9)	Sistemdeki protein konsantrasyonu
Amid I/Amid II	Amid I (# 8)/Amid II (# 9)	Protein yapısındaki değişiklikler
C-O/PO ₂ ⁻ sim.	C-O gerilme (#8)/PO ₂ ⁻ sim. ger. (#16)	Sistemin metabolik aktivitesi
RNA/DNA	Riboz halkası titreşimleri (#15)/DNA(#18)	Hücrelerin transkripsiyon durumu
RNA/Lipit	Riboz halkası titreşimleri (#15)/ CH ₃ antisim. ger. (# 3) + CH ₂ antisim. ger. (# 4) + CH ₂ sim. ger. (# 6)	Hücredeki protein sentez hızı
RNA/Protein	Riboz halkası titreşimleri (#15)//Amid II (# 9)	RNA miktarı hakkında
DNA/Lipit	DNA(#18)/ CH ₃ antisim. ger. (# 3) + CH ₂ antisim. ger. (# 4) + CH ₂ sim. ger. (# 6)	DNA miktarı hakkında
DNA/Protein	DNA(#18)/ Amid II (# 9)	DNA miktarı hakkında

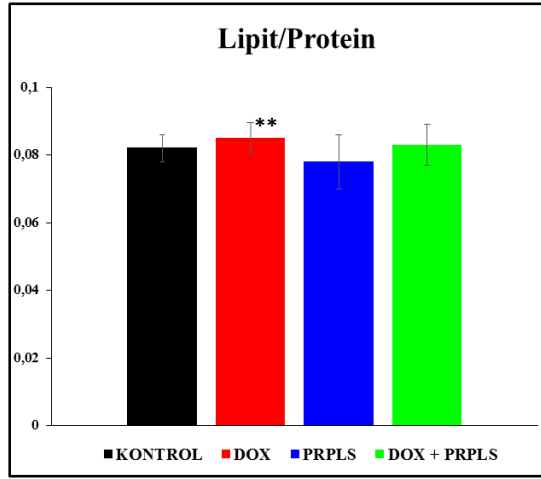
Çizelge 3.7. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçanların karaciğer dokularının kızılötesi bant alan oranları değerlerinde meydana gelen değişiklikler (Değerler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi *p<0,05; **p<0,01 şeklinde gösterilmiştir).

Bant alan oranı	KONTROL	DOX	PRPLS	DOX + PRPLS
Lipit/Protein	0,082±0,002	0,085±0,001*	0,078±0,008	0,083±0,006
C-O/Protein	0,315±0,035	0,122±0,021**	0,267±0,051	0,126±0,018**

Çizelge 3.7. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçanların karaciğer dokularının kızılötesi bant alan oranları değerlerinde meydana gelen değişiklikler (Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi * $p<0,05$; ** $p<0,01$ şeklinde gösterilmiştir).

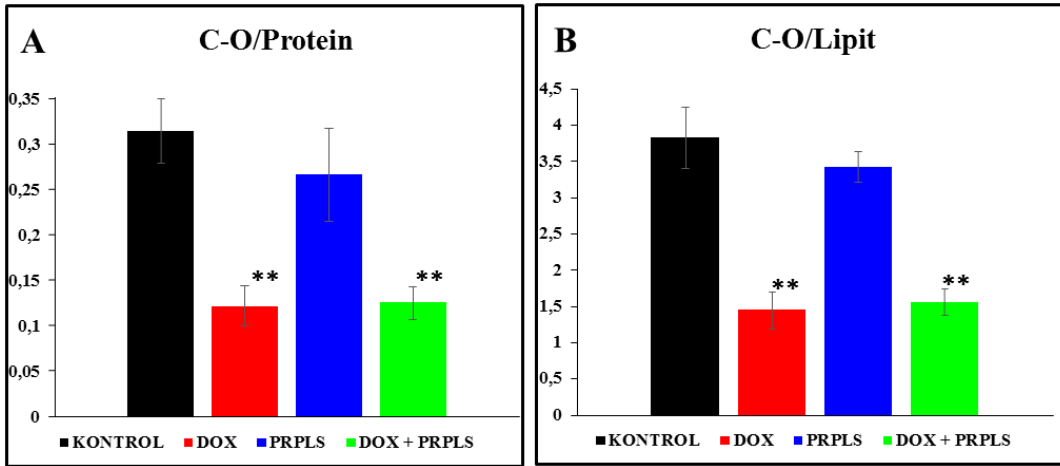
C-O/Lipit	3,823 $\pm$ 0,419	1,449 $\pm$ 0,252**	3,422 $\pm$ 0,209	1,556 $\pm$ 0,174**
CH ₂ sim/CH ₂ sim + CH ₂ antisim.	1,306 $\pm$ 0,022	1,366 $\pm$ 0,025**	1,325 $\pm$ 0,044	1,377 $\pm$ 0,046*
CH ₂ antisim./CH ₂ sim	4,463 $\pm$ 0,298	4,785 $\pm$ 0,139*	4,576 $\pm$ 0,303	4,822 $\pm$ 0,186*
CH ₂ antisim./CH ₃ antisim	2,512 $\pm$ 0,170	2,251 $\pm$ 0,097*	2,407 $\pm$ 0,278	2,258 $\pm$ 0,202*
CH ₂ antisim./Lipit	0,646 $\pm$ 0,023	0,604 $\pm$ 0,008**	0,627 $\pm$ 0,026	0,603 $\pm$ 0,016*
CH ₃ antisim./Lipit	0,223 $\pm$ 0,015	0,269 $\pm$ 0,009**	0,237 $\pm$ 0,015	0,278 $\pm$ 0,020**
C=O/Lipit	1,154 $\pm$ 0,055	0,950 $\pm$ 0,079**	1,078 $\pm$ 0,085	0,941 $\pm$ 0,068**
Olefinik=CH/Lipit	0,042 $\pm$ 0,004	0,034 $\pm$ 0,004*	0,040 $\pm$ 0,004	0,032 $\pm$ 0,004*
Amid I/Amid I + II	7,024 $\pm$ 0,457	8,107 $\pm$ 0,440**	7,485 $\pm$ 0,746	8,250 $\pm$ 0,798*
Amid I/Amid II	2,361 $\pm$ 0,086	2,173 $\pm$ 0,078**	2,239 $\pm$ 0,212	2,118 $\pm$ 0,161*
C-O/ PO ₂ ⁻ sim.	1,409 $\pm$ 0,170	0,657 $\pm$ 0,090**	1,262 $\pm$ 0,159	0,705 $\pm$ 0,080**
RNA/DNA	0,375 $\pm$ 0,024	1,235 $\pm$ 0,088**	0,447 $\pm$ 0,075	1,063 $\pm$ 0,100**
RNA/Lipit	0,669 $\pm$ 0,067	0,509 $\pm$ 0,039**	0,612 $\pm$ 0,077	0,532 $\pm$ 0,059*
RNA/Protein	0,055 $\pm$ 0,008	0,043 $\pm$ 0,007**	0,047 $\pm$ 0,006	0,043 $\pm$ 0,003*
DNA/Protein	0,152 $\pm$ 0,016	0,046 $\pm$ 0,009**	0,122 $\pm$ 0,02	0,049 $\pm$ 0,005**
DNA/ Lipid	1,715 $\pm$ 0,145	0,542 $\pm$ 0,066**	1,459 $\pm$ 0,238	0,630 $\pm$ 0,087**

Çalışılan sistemdeki lipidlerin ve proteinlerin miktarlarını karşılaştırmak amacıyla lipid/protein oranı kullanılabilir [136]. Bu oran değerlerinde meydana gelen değişimler Şekil 3.18’de bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu oran DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmış ($p<0.01$) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.



Şekil 3.18. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Lipit/Protein oranındaki değişimler (**p<0,01).

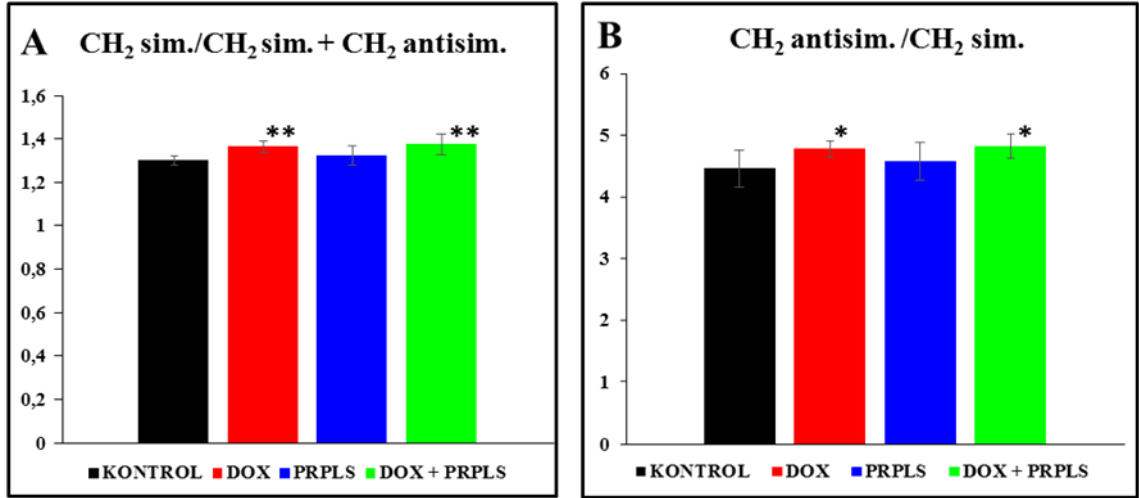
Sistemdeki glikojen miktarındaki değişiklikleri analiz etmek için C-O/Protein ve C-O/Lipit oranları kullanılmıştır [129]. Bu oran değerlerinde meydana gelen değişimler Şekil 3.19’da verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere, C-O/Protein ve C-O/Lipit oranları DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azalmış (p<0.01) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Bu sonuç, DOX’un sıçan karaciğer dokusundaki glikojen konsantrasyonunda bir azalmaya sebep olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.19. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının C-O/Protein ve C-O/Lipit oranlarındaki değişimler (**p<0,01).

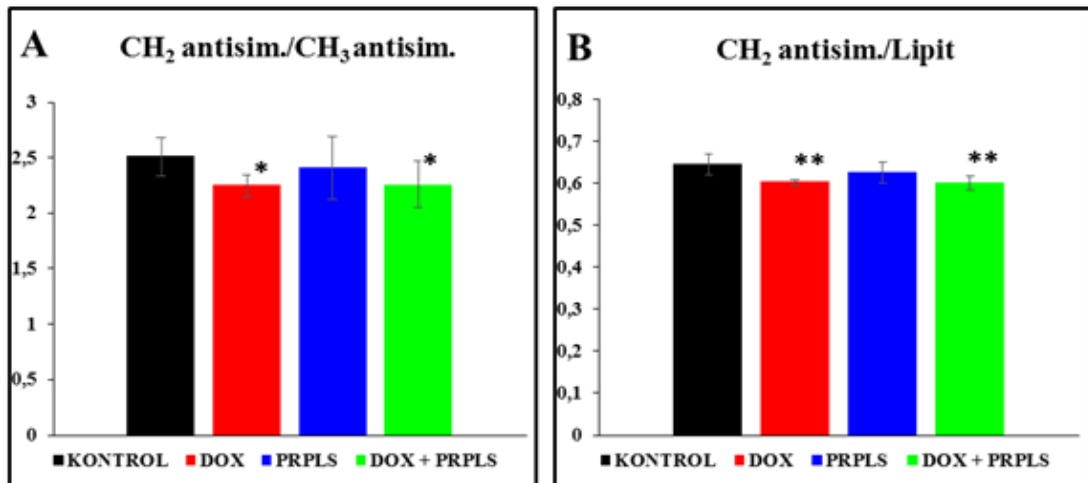
CH2 sim./CH2 sim. + antisim. ve CH2 antisim./CH2 sim. bant alan oranlarındaki değişimler sistemdeki doymuş lipid konsantrasyonundaki değişiklikler hakkında bilgi verir [137]. Şekil 3.20’de bu oranlardaki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir.

Şekilden görüldüğü üzere, bu oranlar DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmış ($p<0.05$, $p<0.01$) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Bu sonuç, DOX'un sıçan karaciğer dokusundaki doymuş lipit içeriğinde bir artışa sebep olduğunu göstermektedir.



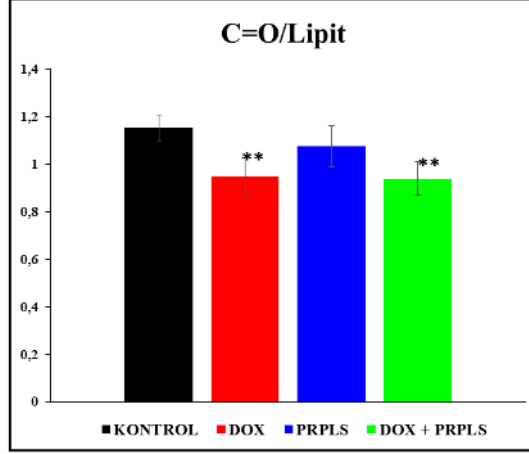
Şekil 3.20. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH₂ sim./CH₂ sim. + CH₂ antisim. ve CH₂ antisim./CH₂ sim oranlarındaki değişimler (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

Membran fosfolipitlerinin zincir uzunluğu hakkında bilgi edinmek için CH₂ antisim./CH₃ antisim. ve CH₂ antisim./lipit oranlarındaki değişimler analiz edilir [133]. Bu oranlardaki değişimler Şekil 3.21'de bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu oran değerleri DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azalmış ($p<0.05$, $p<0.01$) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.



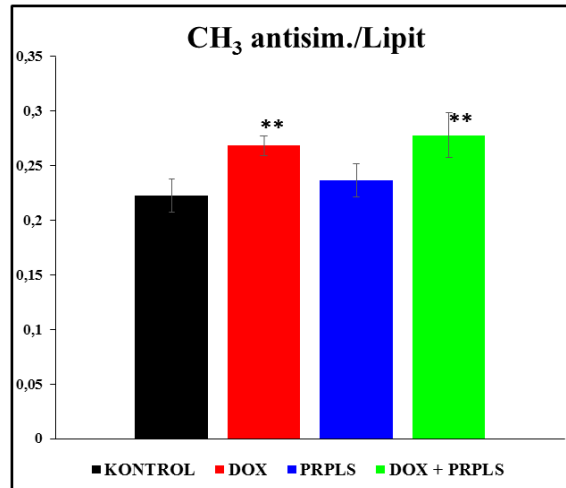
Şekil 3.21. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH₂ antisim./CH₃ antisim.(A), CH₂ antisim./Lipit(B) oranlarındaki değişimler (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

Sistemin karbonil durumunu belirlemek için hesaplanan C=O/Lipit oranındaki değişimler Şekil 3.22’de bar diyagramı olarak verilmiştir [133]. Şekilden görüldüğü üzere bu oran değeri DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azalmış ($p<0.01$) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.



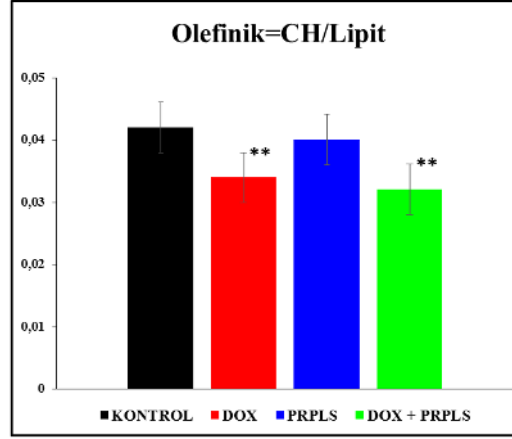
Şekil 3.22. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının C=O/lipit oranındaki değişimler (** $p<0.01$).

Sistemin metil konsantrasyonundaki değişiklikleri değerlendirmek için CH_3 antisim./lipit oranı hesaplanmıştır [133]. CH_3 antisim./Lipit oranındaki değişimler Şekil 3.23’te bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu oran değerleri DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmış ($p<0.01$) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.



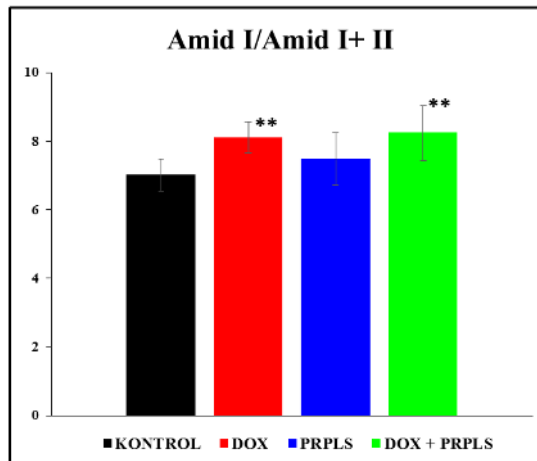
Şekil 3.23. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH_3 antisim./lipit oranındaki değişimler (** $p<0.01$).

Sistemin doymamış lipit seviyesinde meydana gelen değişiklikleri belirlemek için, olefinik=CH bantının alanı lipit bantlarının alanlarının toplamına bölünmüştür [133]. Şekil 3.24'ten görüldüğü üzere bu oran DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azalmış ($p<0.01$) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.



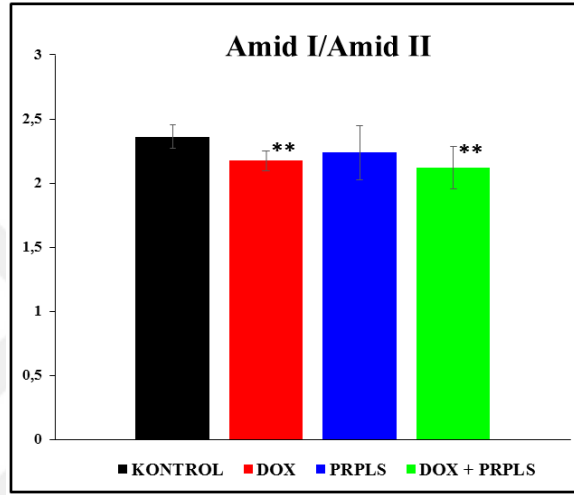
Şekil 3.24. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Olefinik=CH/lipit oranındaki değişimler (** $p<0.01$).

Sistemin protein miktarında meydana gelen değişiklikleri belirlemek için ayrıca Amid I/Amid I + II oranı hesaplanmıştır [137]. Bu oran değerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 3.25'te bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda bu oran anlamlı derecede artmış ($p<0.01$) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Bu sonuç, DOX'un sıçan karaciğer dokusundaki protein miktarında bir artışa sebep olduğu sonucunu desteklemektedir.



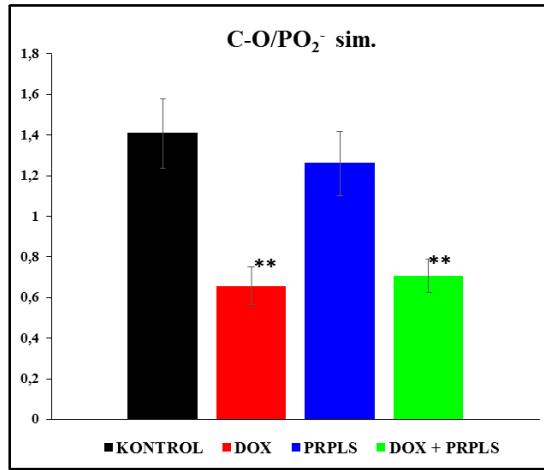
Şekil 3.25. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid I/Amid I + II oranındaki değişimler (** $p<0.01$).

Amid I bantının, Amid II bantının alanına bölünmesi ile elde edilen Amid I/Amid II oranındaki değişimler proteinlerdeki yapısal değişiklikler hakkında bilgi edinmek için kullanılmaktadır [133]. Şekil 3.26’da bu oran değerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda Amid I/Amid II oranı anlamlı derecede azalmış ($p<0.01$), PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Bu sonuç, DOX’un sıçan karaciğer dokusundaki proteinlerin yapılarında bir takım değişikliklere sebep olduğunu göstermektedir.



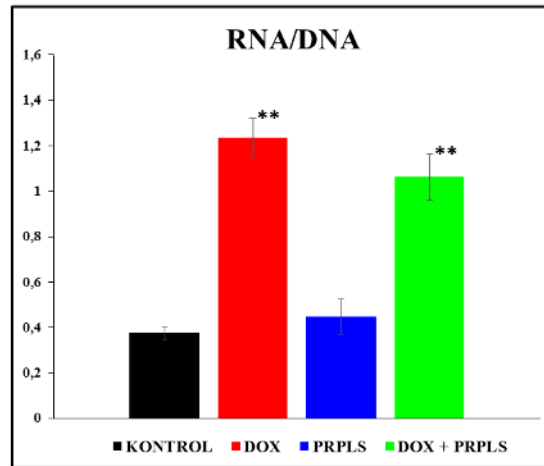
Şekil 3.26. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid I/Amid II oranındaki değişimler (** $p<0.01$).

Sistemin metabolik aktivitesi hakkında bilgi edinmek için C-O/ PO_2^- (glikojen/fosfat) oranı kullanılır. Bu orandaki bir artış daha düşük metabolik aktivite anlamına gelir [130]. Şekil 3.27’de bu oran değerlerinde meydana gelen değişimler bar diyagramı olarak gösterilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere bu oran DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azalmış ($p<0.01$) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.



Şekil 3.27. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının C-O/PO₂⁻ sim. Bant alan oranındaki değişimler (**p<0.01).

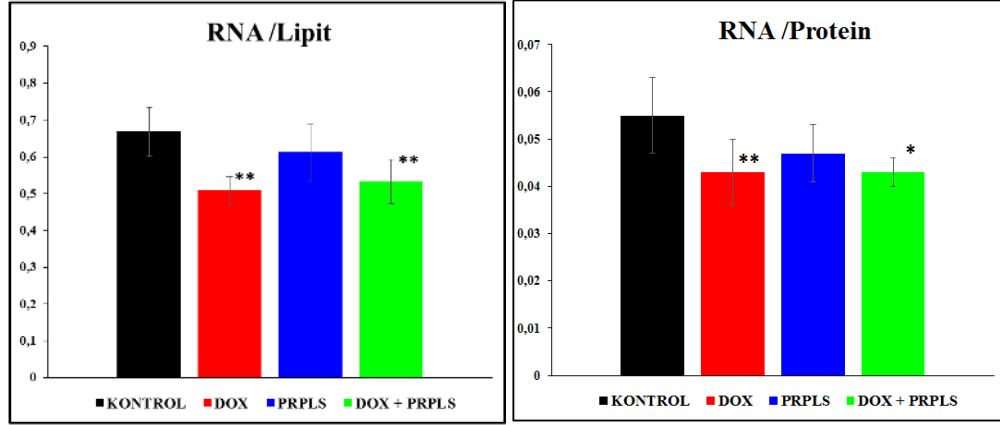
1120 cm⁻¹ dalga sayısında gözlenen riboz halkası titreşim bantının, 1025 cm⁻¹ dalga sayısında gözlenen DNA bant alanına bölünmesi ile elde edilen RNA/DNA oranındaki değişimler hücrelerin transkripsiyon durumu hakkında bilgi edinmek için kullanılmaktadır [130]. Şekil 3.28’de bu oran değerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere RNA/DNA oranını DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmış (p<0.01) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.



Şekil 3.28. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının RNA/DNA bant alan oranındaki değişimler (**p<0.01).

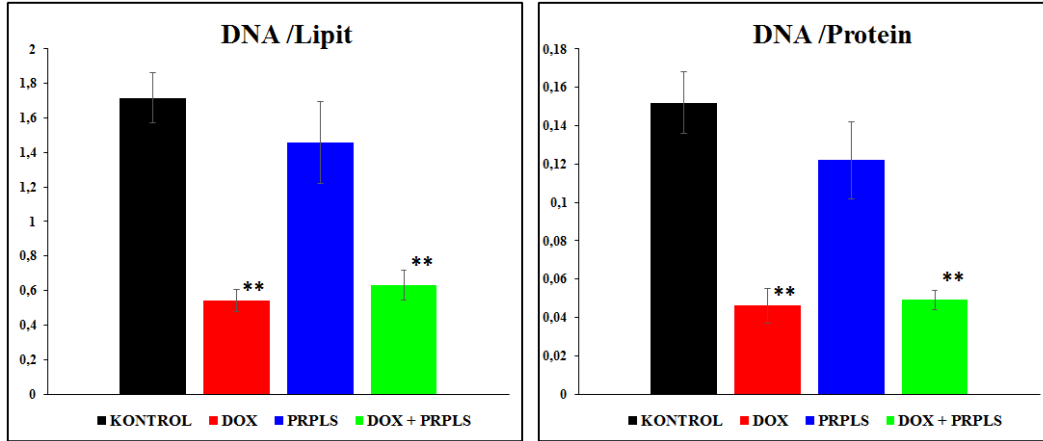
RNA/Lipit ve RNA/Protein oranındaki değişimler ise hücredeki RNA miktarındaki değişiklikler dolayısıyla hücrelerdeki protein sentez hızı ile ilgili bilgi edinmek için kullanılmaktadır [138]. Şekil 3.29’da bu oran değerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere RNA/Lipit ve RNA/Protein oranı DOX ve

DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azalmış ($p<0.01$) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.



Şekil 3.29. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının RNA/Lipit ve RNA/Protein oranındaki değişimler (** $p<0.01$).

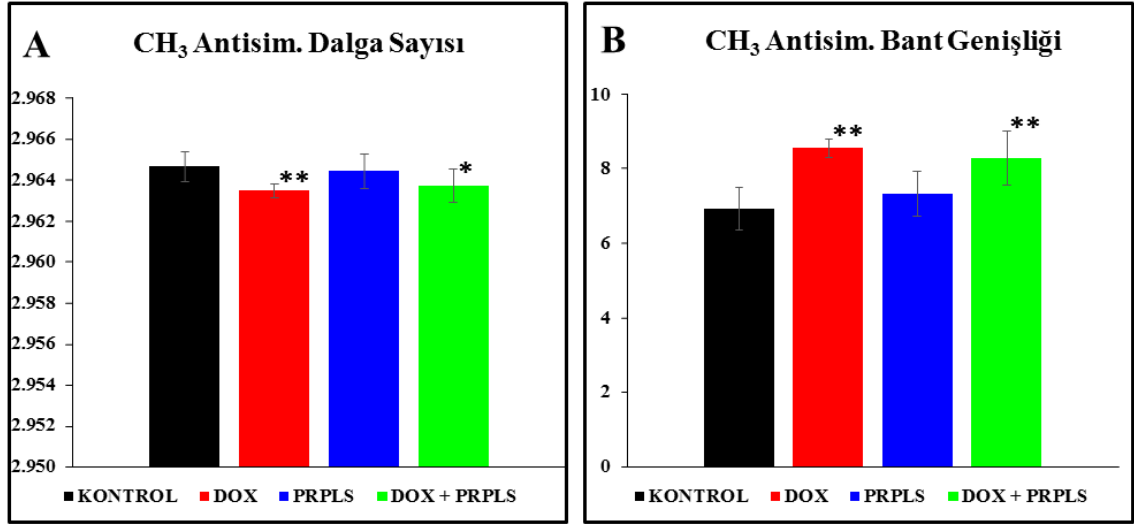
DNA/Lipit ve DNA/Protein oranındaki değişimler ise hücredeki DNA miktarındaki değişiklikler ile ilgili bilgi edinmek için kullanılmaktadır [139]. Şekil 3.30’da bu oran değerindeki değişimler bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere DNA/Lipit ve DNA/Protein oranı DOX ve DOX + PRPLS uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azalmış ($p<0.01$) ancak PRPLS uygulanmış grupta herhangi anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.



Şekil 3.30. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının DNA/Lipit ve DNA/Protein oranındaki değişimler (** $p<0.01$).

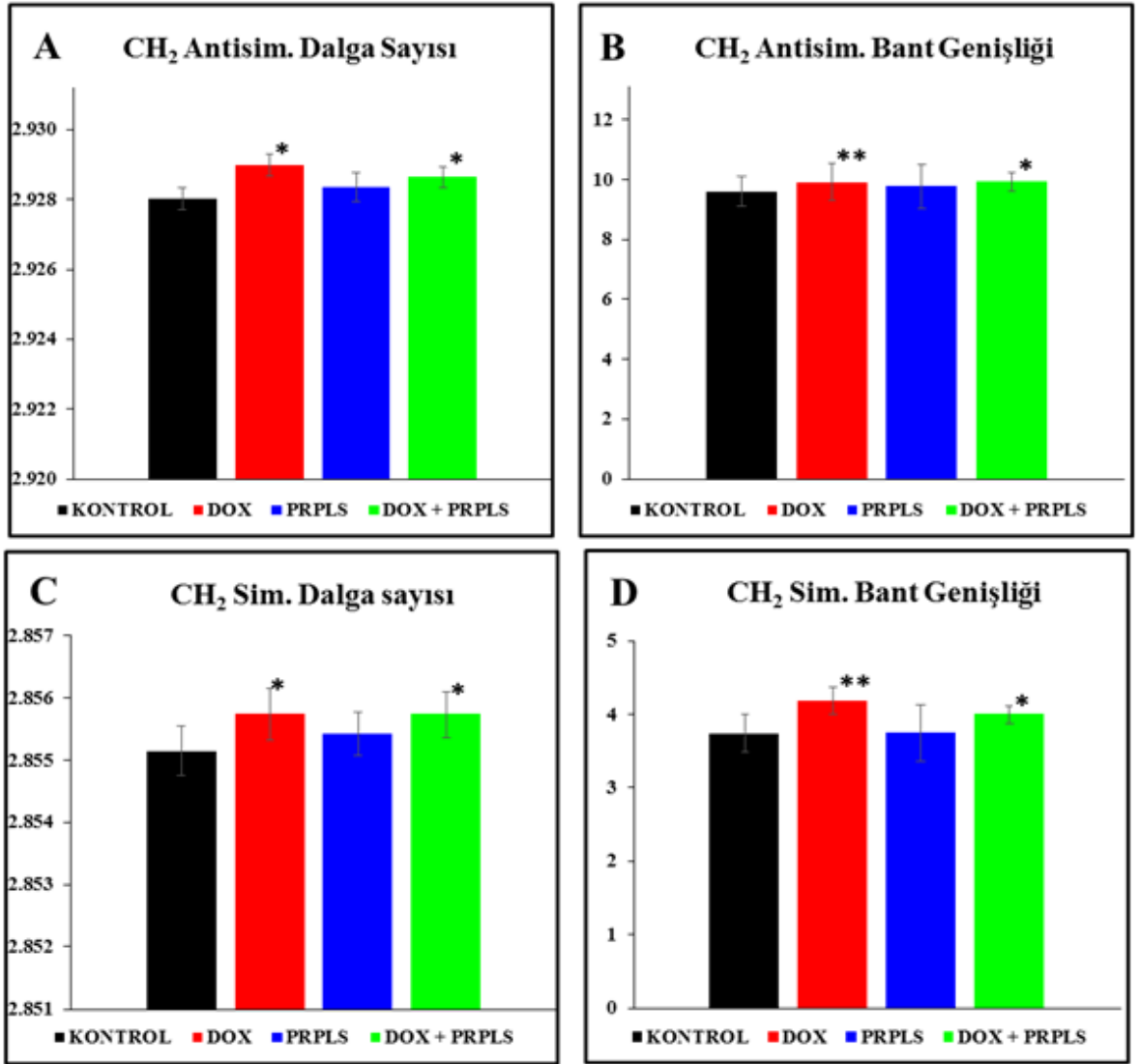
Çalışmamızda ayrıca bazı bantların dalga sayısı ve bant genişliği değerleri analiz edilmiştir. CH₃ antisimetrik bantlarının dalga sayısı ve bant genişliğinde meydana gelen değişiklikler Şekil 3.30’da bar diyagramı olarak verilmiştir. Şekillerden görüldüğü üzere

DOX ve DOX + PRPLS uygulanan gruplarda anlamlı artışlar ($p<0,05$, $p<0,01$) meydana gelmiştir.



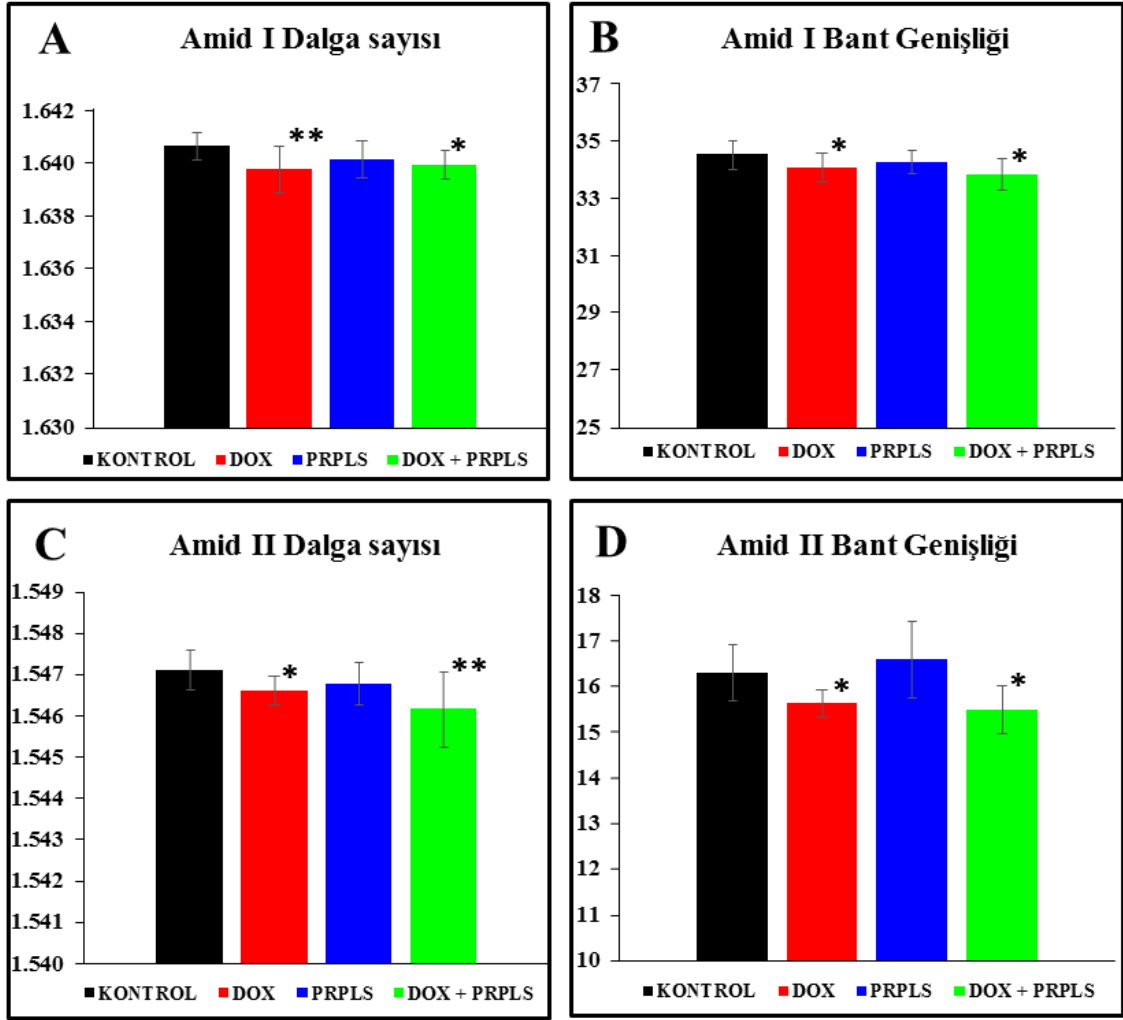
Şekil 3.31. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH3 antisim. dalga sayısı (A), CH3 antisim. bant genişliği (B) değerleri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

CH2 antisimetrik ve simetrik bantlarının dalga sayısı ve bant genişliğindeki değişimler lipidlerin konformasyonel düzensizlikleri yani lipid açıl zincirlerinin esnekliği ve sistemin dinamiğiyle ilgili bilgi vermektedir [104],[140]. CH2 antisimetrik ve simetrik bantlarının dalga sayısı ve bant genişliğinde meydana gelen değişikliklerin bar diyagramı Şekil 3.31’de verilmiştir. Şekillerden görüldüğü üzere DOX ve DOX + PRPLS uygulanan gruplarda anlamlı artışlar ($p<0,05$, $p<0,01$) meydana gelmiştir.



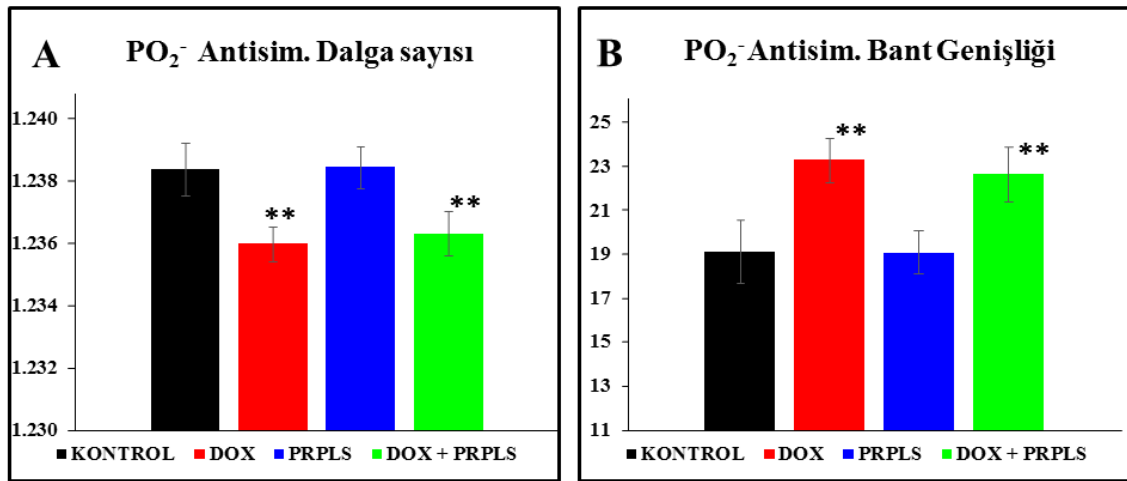
Şekil 3.32. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının CH₂ antisimetrik dalga sayısı (A), CH₂ antisimetrik bant genişliği (B), CH₂ simetrik dalga sayısı (C), CH₂ simetrik bant genişliği (D) değerleri (*p<0,05, **p<0,01).

Amid I ve Amid II bantının dalga sayısı ve bant genişliğindeki değişimler protein yapısındaki konformasyonel değişiklikler hakkında bilgi vermektedir [136],[138]. Bu bantların dalga sayısı ve bant genişliğinde meydana gelen değişikliklerin bar diyagramları Şekil 3.32’de verilmiştir. Şekillerden görüldüğü üzere, bu bantların dalga sayısı ve bant genişliği değerleri DOX ve DOX + PRPLS gruplarında anlamlı derecede azalmıştır.



Şekil 3.33. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının Amid I dalga sayısı (A), Amid I bant genişliği (B) değerleri, Amid II dalga sayısı (C), Amid II bant genişliği(D) değerleri (*p<0,05, **p<0,01).

PO2- antisimetrik gerilme bantının dalga sayısı ve bant genişliği değerindeki kaymalar nükleik asitlerde ve fosfolipitlerde konformasyonel değişimlerin ve membran lipidlerinin paketlenmesinde değişiklik olduğunu göstermektedir [130]. Bu bantın dalga sayısı ve bant genişliğinde meydana gelen değişikliklerin bar diyagramı Şekil 4.33'te verilmiştir. Şekil 3.33 A'da görüldüğü üzere bu bantın dalga sayısı değeri DOX ve DOX + PRPLS uygulanan gruplarda anlamlı derecede azalmıştır. Şekil 4.33 B'den de bu bantın bant genişliğinin DOX ve DOX + PRPLS uygulanan gruplarda anlamlı derecede arttığı görülmektedir.

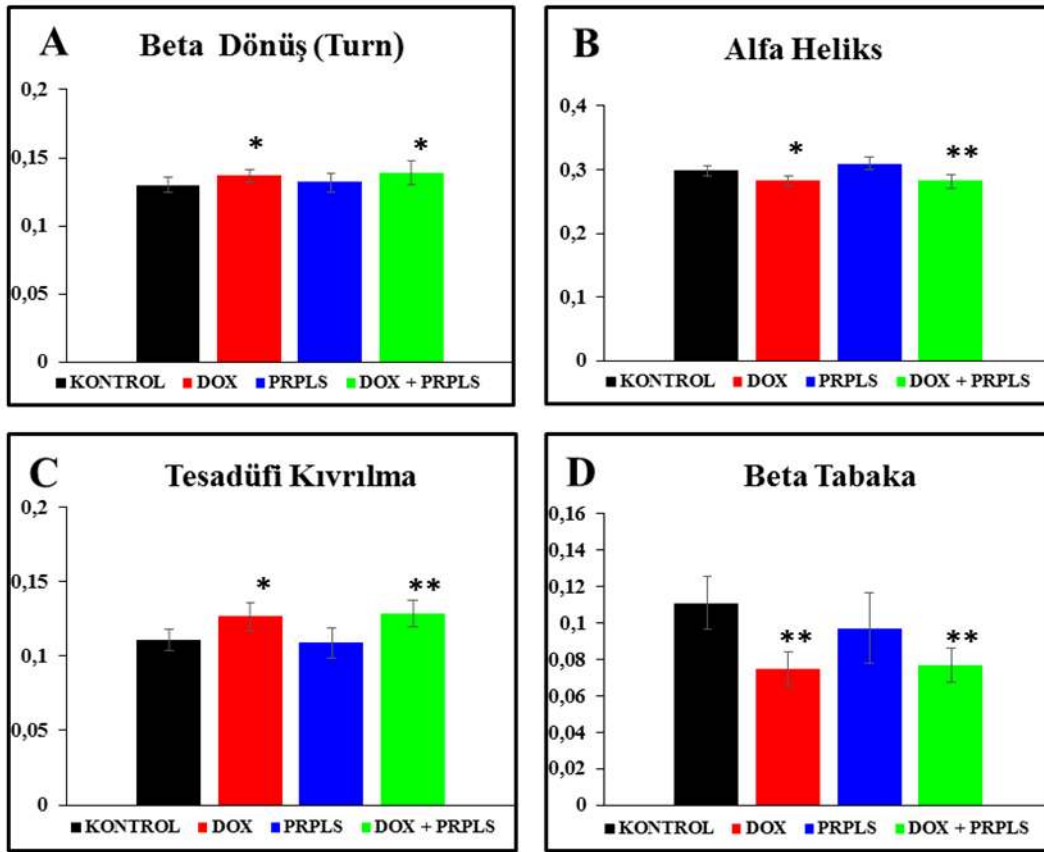


Şekil 3.34. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının PO₂⁻ antisim. Dalgası (A), PO₂⁻ antisim. bant genişliği (B) değerleri (**p<0,01).

Çalışmamızda DOX'un ve PRPLS'nin sıçan karaciğer dokusundaki proteinlerin ikincil yapılarında meydana getirdiği değişimleri saptamak amacıyla ATR-FTIR spektrumunda sadece proteinlerden kaynaklanan ve 1700-1600 cm⁻¹ aralığında yer alan Amid I bantına, ikincil türev-vektör normalizasyon metodu uygulanmıştır. İkincil türev spektrumunda proteinlerin ikincil yapısından kaynaklanan beta dönüş yapıları 1684 cm⁻¹, alfa heliks yapıları 1651 cm⁻¹, tesadüfi kıvrılma 1640 cm⁻¹ ve beta tabaka 1633 cm⁻¹ de ortaya çıkmaktadır. Protein ikincil yapılarındaki değişimler Çizelge 3.8 ve Şekil 3.34'te verilmiştir. Çizelgeden ve şekillerden görüldüğü üzere; DOX ve DOX + PRPLS uygulanan gruplarda beta dönüş ve tesadüfi kıvrılma yapılarında anlamlı artışlar (p<0,05, p<0,01) alfa heliks ve beta tabaka yapılarında anlamlı azalışlar (p<0,05, p<0,01) meydana gelmiştir. Bu sonuç bize, DOX uygulamasından sonra sıçan karaciğer dokusundaki proteinlerde bir miktar denatürasyonun meydana geldiğini göstermektedir.

Çizelge 3.8. İkincil türev vektör normalizasyonu metodu ile elde edilen Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS uygulanmış sıçan karaciğer dokusunun protein ikincil yapı değişimi (İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi *p<0,05, **p<0,01 şeklinde gösterilmiştir).

Fonksiyonel Grup	KONTROL	DOX	PRPLS	DOX + PRPLS
Beta dönüş(Turn)	0,130 ± 0,005	0,137 ± 0,005*	0,132 ± 0,007	0,139 ± 0,008*
Alfa-heliks	0,298 ± 0,007	0,283 ± 0,008*	0,309 ± 0,009	0,283 ± 0,011*
Tesadüfi kıvrılma (Random coil)	0,111 ± 0,007	0,127 ± 0,009*	0,109 ± 0,010	0,129 ± 0,009*
Beta-tabaka	0,111 ± 0,014	0,075 ± 0,009**	0,097 ± 0,019	0,077 ± 0,009**



Şekil 3.35. Kontrol, DOX, PRPLS ve DOX + PRPLS gruplarının protein ikincil yapılarındaki değişimler. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Beta dönüş (Turn) (A), Alfa heliks (B), Tesadüfi kıvrılma (C), Beta-tabaka (D).

3.2. TARTIŞMA

Dokudaki bozulmalar sonucu hücrelerde meydana gelen işlev kayıpları birçok metabolik hasarın habercisidir [141]. FTIR spektroskopisi ile elde edilen spektralbantların alan değerleri, alan değerlerinin birbirine göre oranları, bant genişlikleri, bant dalga sayılarındaki değişimlerin belirlenmesi; biyomoleküllerin birbirleri ile olan etkileşimleri, lipid peroksidasyonu ve proteinlerin ikincil yapılarının belirlenmesine ve patolojik durumlarda doku ve membran düzeyinde meydana gelen değişimleri saptamamıza yardımcı olur [109]. Dolayısıyla, çalışmamızda ATR-FTIR spektroskopisi ile karaciğerdeki moleküllerin yapıları, fonksiyonları ve dinamik özelliklerindeki değişiklikler hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir.

3313 cm^{-1} dalga sayısında ortaya çıkan Amid A bantı ağırlıklı olarak proteinlerdeki N-H gerilme titreşimlerinden ve polisakkaritler ve sudaki O-H titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [106],[107]. DOX uygulamasından sonra bu bantın altında kalan

alan anlamlı derecede azalmıştır. Çalışmamızın örnek hazırlama aşamasında, ortamdaki su tamamen uzaklaştırıldığı için, suyun bu banta olan katkısı ihmal edilebilir ve bu bantın sadece polisakkaritlerden ve proteinlerden sinyaller aldığı kabul edilebilir [106]. Dolayısıyla bu bantın alan değerinde gözlenen azalma, glikojen molekülünde bulunan O-H titreşimlerinden gelen sinyallerin azalmasından kaynaklanmış olabilir ve bu da DOX uygulamasının karaciğerdeki glikojen miktarının azalmasına sebep olduğunu gösterir. Bu sonuç, 1033 cm^{-1} 'de ortaya çıkan ve ana glikojen bantı olarak adlandırılan C-O gerilme bantının alan analizinden elde ettiğimiz sonuçla desteklenmektedir. DOX uygulamasından sonra C-O gerilme bantının alanı anlamlı derecede azalmıştır. Ayrıca sistemdeki glikojen konsantrasyonundaki değişimleri daha iyi analiz edebilmek için C-O/Protein ve C-O/Lipit oran analizleri yapılmıştır. DOX uygulamasından sonra hem C-O/Protein hem C-O/Lipit oranlarında gözlediğimiz azalmalar. DOX'un sıçan karaciğer dokusundaki glikojen konsantrasyonunda bir azalmaya neden olduğu sonucunu doğrulamaktadır [142]. Önceki bir çalışmada, Bobenko v.d. (2015), DOX'un hepatositlerde insülin kaynaklı glukoz alımını ve glikojen sentezini azalttığını rapor etmişlerdir [143]. Bizim sonuçlarımızla uyumlu bir şekilde önceki bir diğer çalışmada ratların kalp dokusunda DOX uygulamasından sonra glikojen depolarında bir azalma meydana geldiği rapor edilmiştir [144]. Ayrıca, histopatolojik ve epidemiyolojik çalışmalarda DOX'un karaciğer yağlanmasına sebep olduğu belirlenmiştir [145]. Hepatositlerde yağ damlacıkları birikimi olarak bilinen karaciğer yağlanmasının aynı zamanda dokudaki glikojen konsantrasyonunun azalmasına sebep olduğu bilinmektedir [146]. Peng ve Chiappini (2015), karaciğer yağlanması sırasında lipit miktarındaki artış ile birlikte dokuda glikojen miktarında bir azalma olduğunu FTIR spektroskopisi kullanarak göstermiştir. Sonuç olarak, glikojen miktarında gözlediğimiz azalma, DOX'un dokudaki glukoz ve lipit metabolizmasında meydana getirdiği önemli değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir [147].

Doymuş lipidlerin miktarı hakkında bilgi veren; CH_3 antisimetrik, CH_2 antisimetrik ve CH_2 simetrik bantlarının altında kalan alanlar ve CH_2 sim./ CH_2 sim.+antisim. ve CH_2 antisim./ CH_2 sim. oranları DOX uygulamasından sonra anlamlı derecede artmıştır. Alan ve oran değerlerinde meydana gelen bu artışlar DOX'un sıçan karaciğer dokusundaki doymuş lipit miktarında bir artış meydana getirdiğini göstermektedir [101],[137]. Ayrıca, doymuş lipidlerden sinyal alan bir diğre bant olan 1456 cm^{-1} 'deki CH_2 bükülme bantının altında kalan alanda DOX uygulamasından sonra anlamlı derecede artmıştır.

Yukarıda da bahsedildiği gibi, önceki çalışmalarda DOX'un karaciğer yağlanması sebep olduğu gösterilmiştir [144]. Bu çalışmalara ek olarak, DOX'un hücre içinde lipid birikimine (steatoz) neden olduğu bir çok deneysel çalışmada gösterilmiştir [137],[143]. Ayrıca önceki bir çalışmada DOX'un karaciğerdeki sfingolipit metabolizmasında bir bozukluk meydana getirdiğinin göstergesi olan seramitlerin, dihidro-seramitlerin, sfingozin ve dihidrosfingozin üretimini artırdığı rapor edilmiştir [137]. Literatürdeki çalışmalar ile uyumlu bir şekilde, sonuçlarımız, DOX uygulamasının karaciğer dokusundaki doymuş lipid konsantrasyonunda bir artışa ve bununla birlikte glikojen miktarında bir azalmaya sebep olduğunu göstermiştir. Karaciğerin ana enerji depo maddesi olan lipid ve glikojen miktarındaki değişimler sistemin enerji metabolizmasını etkiler. Karaciğerdeki karbonhidrat ve proteinlerin fazlası lipitlere dönüştürülüp depolandığı için, sonuçlarımız DOX uygulanmış gruplarda karaciğerin enerji metabolizmasını önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. DOX'un dokuda oluşturduğu toksik etkilere katkısı en yüksek olanlardan birisinin enerji metabolizmasında meydana getirdiği bozulmalar olduğu bilinmektedir [19]. uygulamasından sonra sistemin metabolik aktivitesindeki değişiklikler hakkında bilgi edinmemizi sağlayan glikojen/fosfat ($C-O/PO_2^-$) oranında gözlediğimiz azalma da DOX'un karaciğer dokusunun metabolik aktivitesinde önemli değişikliklere sebep olduğu sonucunu doğrulamaktadır [130].

Doymamış lipitlerden kaynaklanan bir bant olan olefinik=CH bantının doymuş lipid bantlarına oranlanması ile elde edilen olefinik=CH/lipit oranı lipid peroksidasyon indeksi olarak kullanılmaktadır [133]. Bu oran DOX uygulamasından sonra anlamlı derecede azalmıştır. Bu azalma DOX'un dokuda lipid peroksidasyonu meydana getirdiğini göstermektedir. DOX uygulamasından sonra dokularda meydana gelen toksisitenin patogenezinde en çok kabul gören görüş reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun membran lipid peroksidasyonunun artırmasına ve antioksidan savunma enzimlerinin azalmasına neden olduğu görüşüdür [13],[27],[148]. DOX uygulamasından sonra karaciğerde oluşan semikinon elektron parçalarının oksijeni indirgeyerek reaktif oksijenler oluşturduğu bilinmektedir [28].

Çalışmamızda DOX'un oksidatif stres indükleyip indüklediğini araştırmak amacıyla, ayrıca serumda TAS, TOS ve OSI değerleri ölçülmüştür. Analiz sonuçlarımıza göre, dokudaki toplam antioksidan madde miktarını gösteren TAS değeri, DOX uygulamasından sonra azalmıştır (Şekil 1A). Bu sonuç, DOX'un kanda toplam

antioksidan madde miktarını azalttığını ortaya çıkarmıştır. DOX ayrıca, serum TOS ve OSI değerlerinin de anlamlı derecede artmasına neden olmuştur (Şekil 1B, C). TOS, o dokudaki tüm oksidanların toplam miktarını gösteren bir parametredir. OSI değeri ise TAS değerinin TOS değerine oranlanması ile elde edilir ve oksidatif stres durumu hakkında bilgi verir. TOS ve OSI değerlerindeki bu artışlar, DOX'un kanda toplam oksidan madde miktarının artmasına ve toplam antioksidan madde miktarının azalmasına neden olarak oksidatif stres meydana getirdiğini açıkça ortaya koymaktadır. Bizim sonuçlarımızla uyumlu bir şekilde önceki bir çalışmada sıçanlarda DOX'un serum toplam antioksidant aktivitesinde azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir [149],[150]. DOX uygulamasından sonra oluşan süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünlerinin karaciğer, kalp ve böbrek gibi organlarda hasara neden olabileceğini bildirmişlerdir [150]. Benzer şekilde Chen ve ark. DOX'a bağlı oluşan organ toksisitelerinin temel sebebinin oksidatif strese bağlı olduğunu ileri sürmüştür [148],[151],[152]. Özdoğan ve ark DOX'un normal oksijen metabolizmasındaki dengeyi sağlayan antioksidan savunma mekanizmasını azaltarak veya ROS oluşumunu artırarak oksidatif stresi uyardığını bildirmiştir [153]. Doymamış yağ asitlerindeki çift bağların serbest radikallerin yol açtığı zararlı etkilere karşı son derece duyarlı oldukları bilinmektedir. Lipidlerdeki doymamış yağ asitlerine serbest radikaller tarafından saldırılırsa, bir lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu başlar ve bu zararlı reaksiyonlar lipidlerin parçalanmasına ve sonuçta doymamış yağ asidi konsantrasyonunda yani olefinik bağlarında bir azalmaya sebep olur [154-156]. Dolayısıyla, çalışmamızda gözlediğimiz, olefinik=CH/lipit oranındaki azalma DOX'un sıçan karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonuna neden olduğunu göstermektedir. DOX serbest radikallerin artışına ve antioksidan enzimlerin azalmasına neden olarak, karaciğerde lipid peroksidasyonu meydana gelmesine sebep olmuştur [24].

Lipitlerin bileşimi ve yapısındaki değişimleri değerlendirmek amacıyla bazı spesifik lipid bantlarının altında kalan alanlar lipid bantlarının altında kalan toplam alana oranlanmıştır. CH₂ antisim./CH₃ antisim. ve CH₂ antisim./lipit oranı fosfolipitlerin zincir uzunluğundaki değişiklikleri belirlemek için, C=O/Lipit oranı sistemin karbonil durumunu belirlemek için, CH₃/lipit oranı ise dokudaki metil konsantrasyonundaki değişiklikleri belirlemek için kullanılmıştır [133]. Bu oran analiz sonuçları DOX uygulamasından sonra CH₂ antisim./CH₃ antisim. ve CH₂ antisim./lipit ve C=O/lipit oranında azalma (Şekil 1.1, Şekil 1.20), CH₃ antisim./lipit oranında ise artma olduğunu

göstermiştir. CH2 antisim./CH3 antisim. ve CH2 antisim./lipit oranlarındaki azalma, sistemdeki lipit zincir uzunluğunun azaldığını yani lipitlerin parçalandığını göstermektedir [131]. C=O/lipit oranındaki azalma ise sistemdeki karbonil miktarının azaldığını göstermektedir [133]. CH3 antisim./lipit oranında meydana gelen anlamlı artış ise DOX uygulamasının sistemdeki metil konsantrasyonunu artırdığını göstermektedir [133]. Sonuç olarak, bu oranlarda gözlenen değişiklikler, DOX'un, karaciğer dokusundaki lipitlerin yapılarında önemli bozulmalara neden olduğunu göstermiştir [101]. Tüm bu bozulmaların sebebi, DOX tarafından sistemde oluşturulan ROS'ların meydana getirdiği lipit peroksidasyonu olabilir. DOX'un karaciğerde ve diğer dokularda lipit peroksidasyonuna sebep olduğu önceki birçok çalışmada gösterilmiştir. Örneğin, Afsar v.d. (2019), DOX uygulamasından sonra karaciğerde ROS'ların üretimi sonucu oluşan hepatotoksinlerin, çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girdiği için lipit profilini bozarak lipit peroksidasyonuna yol açtığını göstermiştir [157]. Özdoğan v.d. (2011) DOX uygulamasından sonra yüksek derecede ROS üretiminin membran lipit peroksidasyonu yoluyla kardiyak miyosit zarlarında oluşan kardiyak hasarla doğrudan ilişkili olduğunu rapor etmiştir [153]. Ayla v.d. (2009) DOX uygulamasından sonra sıçan karaciğer dokularının CAT, GST, GSH enzim miktarlarında azalma olduğunu tespit etmiştir [158]. Karaciğer dokularında değişen Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon (GSH) aktiviteleri, DOX'un hepatotoksik etkilere sahip olduğunu gösterir [158]. Ayrıca, Singla v.d. (2014), DOX'un oksidatif stresi indükleyerek ve endojen antioksidan enzim aktivitelerinin (SOD, GSH ve CAT) seviyesinde değişikliklere neden olduğunu ve malondialdehit (MDA) gibi lipit peroksidasyon son ürünlerinin oluşumunda etkisi olduğunu bildirmiştir [62],[159]. Karapehlivan vd., (2007) DOX uygulamasının tavşanların plazmalarının MDA düzeylerinde artışa neden olduğunu göstermiştir [160]. Benzer şekilde, Bilgiç vd., (2019) DOX kaynaklı karaciğer hasarının oksidatif stres, ROS üretimi ve lipit peroksidasyonunun bir sonucu olduğunu rapor etmiştir [144].

DOX'un sistemdeki proteinlerin miktarı üzerindeki etkilerini analiz etmek için parmak izi bölgesindeki; Amid I, II ve III bantlarının alan analizleri yapılmıştır [108],[109]. Bu bantların alan değerleri DOX uygulamasından sonra anlamlı derecede artmıştır. Sistemin protein miktarındaki değişiklikler hakkında bilgi veren bir diğer parametre olan Amid I/AmidII+II oranı da DOX uygulanmış gruplarda anlamlı derecede artmıştır [137]. Bu alan değerleri ve bu orandaki artış DOX uygulamasından sonra karaciğer

dokusundaki protein miktarında artış meydana geldiğini göstermektedir. Literatürde DOX uygulamasından sonra aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve glutamil transpeptidaz (GGT) gibi karaciğer enzimlerinde artış gözleendiğini rapor eden çalışmalar vardır [148],[161],[162]. Ayrıca Kwiecien v.d. (2006) DOX uygulamasından sonra karaciğerde tiyol yapıda bir amino asit olan sistein miktarının arttığını rapor etmişlerdir [163]. Dolayısıyla karaciğerdeki protein miktarında gözlediğimiz bu artış DOX uygulamasından sonra bazı karaciğer enzimleri ve bazı aminoasitlerin miktarında meydana gelen artıştan kaynaklanmış olabilir. Bu bantlara ek olarak, çoğunlukla proteinlerden güçlü sinyaller alan ve proteinlerde meydana gelen değişimler hakkında bilgi edinmemizi sağlayan CH₃ simetrik gerilme bantının alanında gözlenen artışta, protein miktarında bir artış olduğu sonucunu doğrulamaktadır. Ayrıca sistemdeki yağ asitleri ve amino asitlerde meydana gelen değişimler hakkında bilgi veren COO⁻ simetrik gerilme bantının alanında DOX uygulamasından sonra meydana gelen artış proteinlerle ve lipitlerle ilgili analizlerimizden elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

Çalışmamızda, protein yapısındaki konformasyonel değişiklikler hakkında bilgi sahibi olabilmek için Amid I ve Amid II bantlarına ait spektrumların dalga sayısı ve bant genişliğindeki değişimler analiz edilmiştir [136],[138] Bunlara ek olarak proteinlerdeki yapısal değişiklikleri analiz etmek için Amid I/Amid II oranı hesaplanmıştır [29],[107],[109],[138]. Amid I ve Amid II bantlarının dalga sayısı ve bant genişliğinde DOX uygulamasından sonra gözlediğimiz azalma protein konformasyonunda bir değişiklik olduğunu göstermektedir [137]. Bu sonuç, DOX uygulamasından sonra Amid I/Amid II oranında meydana gelen azalma ile de desteklenmiştir. Bazı patolojik durumlarda proteinlerde gerçekleşen yapısal değişimleri belirlemek proteinlerin fonksiyonlarını anlayabilmemiz açısından önemlidir. Önceki FTIR çalışmalarında dokuda meydana gelen herhangi bir patolojik durumun, Amid I/Amid II oranında azalmaya ve dolayısıyla protein yapısında çeşitli değişikliklere sebep olduğu belirlenmiştir [29].

Proteinlerin ikincil yapısındaki değişiklikleri daha detaylı bir şekilde değerlendirebilmek için vektör normalizasyonu yapılmış ikincil türev spektrumlarında Amid I bantı analiz edilmiştir. Analiz sonuçları, DOX uygulamasından sonra beta dönüş ve tesadüfi kıvrılma yapılarında artma, alfa heliks ve beta tabaka yapılarında azalma olduğunu ortaya çıkarmıştır. Tesadüfi kıvrılma yapısında meydana gelen bu

artış DOX'un protein denaturasyonuna sebep olduğunu göstermektedir [115]. Karaciğerde gözlenen protein denaturasyonu sistemdeki serbest radikallerin miktarındaki artıştan kaynaklanmış olabilir [4]. Proteinlerin işlevlerini düzgün bir şekilde yerine getirebilmeleri üç boyutlu yapılarına bağlıdır. Protein katlanması sırasında oluşabilecek hatalar protein ikincil yapısında farklılıklara dolayısıyla fonksiyonel hasarlara yol açabilir. DOX'un indüklediği serbest radikal oluşumundaki artış hücrenin redoks potansiyelini değiştirerek protein ikincil yapısında değişikliklere sebep olmuş olabilir [164]. Serbest radikallerin proteinlerde dejenerasyona ve agregasyona sebep olarak protein hasarına yol açtığı bilinmektedir [4]. DOX uygulamasından sonra ortamda oluşan serbest radikallerin protein yapısında bozulmalara sebep olduğu önceki bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, Öz v.d., (2006), DOX uygulamasından sonra kalp hücrelerindeki miyofibril proteinlerinin daha düzensiz bir yapı kazandığını gözlemiştir [144]. Fraga ve Tappel (1988), sıçan karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu ile protein sentezinde meydana gelen hasar arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir [165]. Dokudaki proteinlerin oksidasyona uğraması hücre için önemli olan protein yapıdaki moleküllerin (örneğin enzimlerin) yapılarında ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere sebep olmaktadır. Sonuçlarımız, DOX uygulamasından sonra protein ikincil yapısında önemli bozulmalar olduğunu açıkça ortaya koymuştur. DOX uygulanmış gruplarda gözlenmiş olan protein yapısında ve fonksiyonundaki değişiklikler, gen ekspresyon seviyesi ya da protein sentezindeki değişikliklerin sonucu da ortaya çıkmış olabilir.

PO_2^- antisimetrik gerilme bantı sistemdeki nükleik asit ve fosfolipit gibi fosfat içeren bileşikler hakkında önemli bilgiler verir [106]. DOX uygulamasından sonra bu bantın alanında gözlenen artış sistemdeki fosfolipid ve/veya nükleik asit miktarında artış olduğunu göstermektedir [106]. Bu bulgu, spesifik lipid bantlarının analizinden elde ettiğimiz DOX uygulamasından sonra sistemdeki lipid miktarının arttığı bulgusu ile uyum içindedir. Ancak, nükleik asitler ilgili daha spesifik bilgi veren DNA (1025 cm^{-1}) ve RNA (1120 cm^{-1}) bantlarından elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu değildir. DNA ve RNA bantlarının alan değerlerinde anlamlı azalmalar gözlediğimiz için fosfat antisimetrik bantının alan değerinde gözlediğimiz bu artışın dokudaki lipid miktarındaki artıştan kaynaklandığı söylenebilir. Bu bantın dalga sayısında düşük değerlere doğru gözlenen kayma nükleik asitlerin ve fosfolipitlerin hidrojen bağlama kapasitesinde bir azalma olduğunu ve bu bileşiklerin konformasyonlarında ve paketlenmesinde

değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir [130],[134]. Ayrıca bu bantın bant genişliğinde bir artma gözlenmiştir. Bu artış, membranın kafa kısımlarındaki fosfat gruplarının daha az rijit olduğunu yani akışkanlığının daha fazla olduğunu göstermektedir. DOX bir amino şeker ve bir antrasiklin halka içerir. İlaç molekülünün aglikon kısmının DNA ve RNA'nın arasına girdiği, iyonik şeker yapısının interşelasyonu stabilize etmek için bu moleküllere iyonik olarak bağlandığı ve sonuç olarak DNA ve RNA'nın sentez sırasında şeklinin bozulduğu bilinmektedir [62]. Dolayısıyla PO_2^- antisimetrik bantının dalga sayısında gözlediğimiz kayma, DOX etkisi ile DNA ve RNA'da meydana gelen şekil bozukluğunun bir sonucu olabilir. DOX lipifilik bir ilaç olduğundan hem hücre ve çekirdek zarına hem de DNA'ya bağlanma kapasitesi yüksektir. Bu nedenle karaciğer hücrelerinin çekirdeklerinde birikir ve DNA zararına sebep olur [166]. DOX'un etki mekanizmalarından birisinin komşu baz çiftleri arasına yerleşerek DNA ve RNA sentezini bloke etmek olduğu bilinmektedir [167]. DNA ve RNA bantlarının analizinden elde ettiğimiz, dokudaki nükleik asit miktarının azalması DOX'un bu moleküllerin sentezini durdurmasının sonucu olabilir. Ayrıca, DOX uygulamasından sonra karaciğerde oluşan ROS'ların DNA'yı okside ettiği ve yapısında bozulmalara sebep olduğu bilinmektedir [28]. Hücrelerin çoğalma durumundaki ya da büyüme kapasitesindeki değişiklikleri analiz etmek için ayrıca RNA/lipit oranı hesaplanmıştır [130],[138]. Bu oran, DOX uygulamasından sonra anlamlı derecede azalmıştır. Bu sonuç, hücrelerin çoğalma hızının azaldığı sonucunu doğrulamaktadır. Nükleik asitlerle ilgili olarak ayrıca RNA/DNA oranı hesaplanmış ve bu oranda DOX uygulamasından sonra bir artış gözlenmiştir. Biz çalışmamızda hem RNA hem de DNA miktarında azalma gözlediğimizden bu orandaki artış, DOX uygulamasından sonra RNA miktarında DNA miktarına göre bir artış olduğunu yani bazı genlerin transkripsiyon hızının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu göstermektedir [130]. DOX uygulamasından sonra bazı proteinlerin sentezinden sorumlu genlerin transkripsiyon seviyesinin yani mRNA miktarlarının arttığı bilinmektedir. Örneğin, önceki çalışmalarda DOX tarafından indüklenen hepatik zararın oksidatif stres yanıtı, DNA hasarı, DNA onarımı, ilaç taşınımı, hücre döngüsünün ilerlemesi ve mitokondriyal bozukluklar ve apoptozisten sorumlu genlerin ekspresyonu ile başladığı rapor edilmiştir [166].

DOX'un karaciğerdeki protein ve lipit metabolizmasında oluşturduğu etkiyi değerlendirmek için lipit/protein oranı hesaplanmıştır. Bu oran aynı zamanda hücrenin

fonksiyonları için önemli bir gösterge olan lipit ve protein asimetrisinde gerçekleşen değişimleri analiz etmemizi sağlar [136]. Bunun yanı sıra bu orandaki en ufak bir değişim membranın yapısını, düzenini ve akışkanlığını etkilemektedir [130]. DOX uygulamasından sonra lipit/protein oranında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Çalışmamızda, DOX uygulamasından sonra hem lipit hem de protein içeriğinde bir artış gözlediğimizden, bu orandaki artış lipit miktarındaki artışın daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu durum DOX'un karaciğerdeki lipit metabolizmasını protein metabolizmasından daha fazla etkilediğini göstermektedir [130]. Bu artış aynı zamanda DOX'un karaciğer hücrelerinin membranlarında lipit ve protein asimetrisinde değişiklikler meydana getirdiğini göstermektedir ve lipit ve protein metabolizmasında değişikliklere sebep olduğu sonucunu desteklemektedir [133]. Lipit ve protein asimetrisinde meydana gelen değişiklikler hücre içi ve dışındaki iyonların konsantrasyonlarında değişikliklere sebep olarak membran fonksiyonunu önemli derecede etkilediği bilinmektedir [127].

Lipitler hücre zarının ana bileşenleri olduğu için lipitlerin düzeni ve akışkanlığı ile ilgili parametrelerde ortaya çıkan değişiklikler hücre zarının normal işleyişini etkiler. Bu nedenle sistemdeki lipitlerin konformasyonel düzensizlikleri yani lipit açıl zincirlerinin esnekliği ve sistemin dinamiğiyle ilgili bilgi edinmek ve membranların düzeni ve akışkanlığındaki değişiklikleri yorumlamak için CH_2 antisimetrik ve simetrik bantlarının ve CH_3 antisimetrik bantının dalga sayısı ve bant genişliğindeki değişimler analiz edilmiştir [104],[136],[140]. DOX uygulamasından sonra CH_2 antisimetrik ve simetrik bantlarının dalga sayısında yüksek değerlere doğru bir kayma gözlenmiştir. Bu kayma membran düzeninin azaldığını ve zardaki lipitlerin açıl zincir esnekliğinin arttığını göstermektedir [12],[168],[169]. Benzer şekilde, DOX uygulamasından sonra bu bantların genişliklerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Bant genişliklerindeki bu artış, DOX'un membran akışkanlığında bir artışa sebep olduğunu göstermektedir. Zar lipitlerinin iç kısımlarının düzeni ve dinamiği hakkında bilgi veren CH_3 antisimetrik bantının dalga sayısı düşük değerlere doğru kaymış, bant genişliği artmıştır. Bu bantın dalga sayısında gözlenen bu kayma membranın derin iç kısımlarının DOX etkisiyle daha düzenli hale geldiğini göstermektedir [100]. Bant genişliğindeki artış ise CH_2 antisimetrik ve simetrik bantlarının genişlik analizlerinden elde ettiğimiz, membran dinamiğinde bir artış olduğu sonucunu desteklemektedir [100]. Sonuç olarak, DOX uygulaması karaciğer dokusunda membranın fosfolipit zincirlerinin düzenini azaltırken,

membranın derin iç kısımlarının düzenini artırmış, membranın bütün kısımlarında akışkanlığı artırmıştır. Bu sonuçlar DOX'un membran fosfolipitleri ile interaksyonunun çok güçlü olduğunu, iç kısımlarındaki CH₃ grupları ile bile interaksyona girdiğini göstermektedir. Bu değişikliklerin sebebi, DOX'un meydana getirdiği oksidatif stres ve bu oksidatif stresin indüklediği farklı lipit türlerinin birbirine göre oranlarındaki ve lipit/protein oranındaki farklılıklar da olabilir. Ayrıca, DOX uygulamasından sonra gözlediğimiz lipit peroksidasyonu da membran fonksiyonlarında, yapısının bütünlüğünün kaybolmasında, bir çok membran bağlı enzim ve protein reseptörün inaktivasyonunda etkili olmuş olabilir [114],[115],[159]. Megli ve Sabatini, (2004) karaciğerde gerçekleşen oksidatif hasarın membran düzeninde bir azalmaya neden olduğunu elektron paramanyetik spektroskopisini kullanarak göstermiştir [170]. Biyolojik membranlar sinyal iletimi, madde transferi ve membrandaki enzimlerin aktivitesi gibi bir takım önemli fonksiyonları kontrol etmektedir. Ayrıca membran düzeni ve dinamiğinde, membranlarda bulunan proteinlerin ikincil yapılarında ve moleküler içerikte meydana gelen değişikliklerin iyon kanallarının bütünlüğüne ve işlevine zarar vererek birçok hastalığa yol açtığı bilinmektedir [133]. Lipid peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür ama antioksidan reaksiyonlar ile sonlandırılabilir [158]. Bundan dolayı, membran düzeni ve akışkanlığı en uygun seviyede tutulmalıdır. DOX lipofilik özelliğe sahip olduğu için lipid yapıdaki membranlardan kolaylıkla geçer [163]. Bundan dolayı hücre membranlarındaki değişikliklerden etkilenmektedir [11]. Sonuçta, membranının düzeni ve akışkanlığı, DOX'a olan geçirgenlik derecesi için çok önemlidir. Literatürle uyumlu olarak sonuçlarımız DOX'un membranın düzen ve akışkanlığını değiştirerek hücre membranının normal fonksiyonunu bozduğunu göstermiştir. Hücre membranında gözlediğimiz bu zararlı etkiler DOX'un toksik etkilerinden birisi olabilir.

Çalışmamızda; PRPLS'nin karaciğer dokusundaki moleküller üzerinde meydana getirdiği etkiler hakkında bilgi sahibi olabilmek için bir grup hayvana sadece PRPLS verilmiştir. Çizelge 4.5, 4.6, 4.8 ve şekil 4.3 - 4.34'ten görüldüğü gibi sadece PRPLS uygulaması, karaciğerde herhangi bir anlamlı değişiklik meydana getirmemiştir. Bu bulgu, PRPLS'nin karaciğerdeki moleküllerle herhangi bir etkileşime girmediğini ve karaciğer dokusu için toksik olmadığını göstermektedir. Ayrıca, oksidatif stres ile ilgili analizlerden elde ettiğimiz sadece PRPLS uygulanmış grubun TAS değerindeki artış (Şekil 4.1.A), PRPLS'nin kanda total antioksidan madde miktarını artırdığını

göstermiştir. Kandaki TAS artışı ve karaciğerde herhangi bir zararlı etki gözlenmemesi PRPLS'nin halk arasında çeşitli amaçlar için kullanımını desteklemektedir.

DOX uygulamasından önce PRPLS verilmiş grubun sonuçları incelendiğinde (Çizelge 4.5, 4.6, 4.8 ve şekil 4.3 - 4.34) DOX'un karaciğer dokusundaki moleküllerin yapısı, kompozisyonu ve dinamiği ile ilgili parametrelerde meydana getirdiği değişimlerle paralel ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişimler ortaya çıktığı görülmüştür. Bu sonuç, PRPLS'nin, DOX'un karaciğer dokusunda yarattığı zararlı etkileri engellemede başarılı olamadığını göstermektedir. Yani PRPLS DOX'un yarattığı zararlı etkilere karşı karaciğerdeki nükleik asitler, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler üzerinde onarıcı ve/veya iyileştirici bir etki göstermemiştir. Ancak serumda gerçekleştirdiğimiz oksidatif stres ile ilgili analiz sonuçlarımız, DOX + PRPLS grubunun TOS ve OSI değerlerinin kontrol grubuna oldukça yakın olduğu ve bu grubun değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark meydana gelmediğini göstermiştir (Şekil 4.1B ve C). Bu sonuç, PRPLS'nin, DOX'un kanda yarattığı oksidatif stresin oluşmasını engellediğini göstermiştir. Özetle, kullandığımız PRPLS kan dokusunda DOX'un yarattığı zararlı etkiyi iyileştirmede başarılı olmuş ancak karaciğerde başarılı olamamıştır. Literatürde farklı coğrafik bölgelerden toplanmış olan PRPLS'lerin, DOX'un karaciğerde meydana getirdiği toksisiteye karşı etkilerini farklı yöntemlerle gösteren iki çalışmaya rastlanmıştır. Bunlardan birincisinde, Wided vd. (2014) Cezayir PRPLS'nin, DOX'a maruz bırakılmış sıçan karaciğerinden izole edilen mitokondriler ve karaciğer enzimleri üzerinde koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir [115]. Bu çalışmada 10 mg/kg DOX, sıçanlara tek doz olarak uygulanmış ve PRPLS, DOX uygulamasından 30 gün önce verilemeye başlanarak günlük 100 mg/kg olarak uygulanmıştır. Bu konuda gerçekleştirilmiş ikinci çalışmada, Singla vd (2014), DOX uygulamasından önce, 12 gün boyunca günlük 250 mg/kg Hint PRPLS'i verilmiş sıçanlara 25 mg/kg DOX'u üç doza bölerek 12., 13. ve 14. günlerde vermiş ve karaciğer homojenatları ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında PRPLS'in sadece bazı parametreler üzerinde kısmi koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir [62]. Bizim çalışmamızda, PRPLS uygulamasına DOX uygulamasından 10 gün önce başlanmış ve DOX 15 mg/kg toplam doz olacak şekilde 6 doza bölünerek (10. günden itibaren gün aşırı) uygulanmıştır. Ayrıca literatürde DOX'un toksik etkilerine karşı Cezayir PRPLS'nin inin kalp [114] ve böbrek [172] dokuları üzerindeki, Mısır PRPLS'nin testisler [61]. üzerindeki koruyucu etkilerini gösteren çalışmalar vardır. Ancak bu çalışmalarda

genellikle tek doz akut DOX uygulaması gerçekleştirildiği ve kullanılan PRPLS dozları ve uygulama sürelerinin genel olarak bizimkinden farklı olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, çalışmamızda bulduğumuz DOX'un karaciğer dokusundaki moleküller üzerinde yarattığı toksik etkiye karşı PRPLS'in herhangi bir koruyucu etki gösterememesinin sebeplerinden birisi, bizim çalışmamızın DOX ve PRPLS dozlarının ve uygulama sürelerinin literatürdeki PRPLS'in DOX toksisitesine karşı koruyucu etkisini gösteren çalışmalardan farklı olması olabilir.

Kullandığımız PRPLS'in flavanoidler, fenoller, terpenoidler gibi antioksidant özelliği iyi bilinen fitokimyasal maddeler içerdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.) [173]. Türkiye'nin 54 ayrı noktasından toplanan PRPLS'lerin karışımından oluşan Türk PRPLS'nin içerik analizini gerçekleştirmiş ve bizim çalışmamızda kullandığımız PRPLS'in içerik analizinden elde ettiğimiz değerlere (Çizelge 4.2.) yakın değerler rapor etmiştir. Kullandığımız PRPLS'in toplam fenolik ve flavanoid maddelerin kantitatif analiz sonuçları bu kalitatif sonuçları doğrulamıştır. Toplam fenolik madde miktarı; $81,8 \pm 2,79$ mg gae/g, flavanoid madde miktarı $46,1 \pm 1,13$ mg ke/g olarak tespit edilmiştir. Silici (2008), farklı botanik orjine sahip PRPLS örnekleriyle yaptığı içerik analizi çalışmasında toplam fenolik madde miktarının 87,62-127,39 mg gae/g arasında değiştiğini; Keskin ve Kolaylı (2018) ise 16,13-178,34 mg gae/g arasında değiştiğini rapor etmiştir. Keskin ve Kolaylı (2018) toplam flavanoid madde miktarını ise 1,24-51,23 mg ke/g olarak tespit etmiştir [173]. 54 farklı Türk PRPLS'inin karışımından oluşan PRPLS ile ilgili yaptıkları çalışmada toplam fenolik madde miktarını $314,36 \pm 3,65$ mg gae/g, flavanoid madde miktarını $522,71 \pm 11,45$ mg ke/g olarak tespit etmiştir. Literatürdeki bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, bizim kullandığımız PRPLS'in değerlerinin Keskin ve Kolaylı (2018) ve Silici (2008)'in tespit ettiği değerlere yakın olduğu ancak Özdal vd., (2018)'in rapor ettiği değerlerin çok altında kaldığı görülmektedir. Ayrıca, çalışmamızda kullandığımız PRPLS'in antioksidan kapasitesini test etmek için 3 farklı antioksidan kapasite analizi (CUPRAC, DPPH ve FRAP) gerçekleştirilmiştir [173]. Kullandığımız PRPLS'in antioksidan kapasitesi CUPRAC metoduna göre $217,2 \pm 2,12$ mg te/g; DPPH metoduna göre $77,9 \pm 2,91$ mg te/g; FRAP metoduna göre $41,3 \pm 1,06$ mg te/g bulunmuştur. Özdal vd., (2018)'in 54 farklı bölgeden toplanmış PRPLS'lerin karışımı olan Türk PRPLS'inde antioksidan kapasitesini CUPRAC metoduna göre $1184,94 \pm 63,27$ mg te/g; DPPH metoduna göre $391,73 \pm 12,55$ mg te/g; FRAP metoduna göre $156,59 \pm 2,56$ mg te/g bulmuştur [173].

Kullandığımız PRPLS'in in vitro antioksidan kapasitesi ile ilgili bulgularımız, Özdal v.d., (2018) bulduğu değerlerden oldukça düşüktür [173]. Kullandığımız PRPLS'in, DOX'un karaciğer üzerinde yarattığı toksik etkilerin önlenmesinde başarılı olamamasının sebeplerinden bir diğeri antioksidan kapasitesinin DOX'un karaciğerde yarattığı oksidatif stresi elimine etmeye yetecek kadar yüksek olmaması olabilir.



4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

DOX'un karaciğer üzerinde birçok toksik etkisinin olduğu bilinmesine rağmen bu konudaki çalışmalar genellikle klinik ya da biyokimyasal düzeydedir. Mevcut deneysel çalışmaların sunduğu bilgilerde karaciğer dokusunda patolojiye sebep olmuş olabilecek yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel değişimler hakkında yeterince bilgi vermemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada, DOX'un karaciğer hücrelerindeki makromoleküllerin yani proteinler, nükleik asitler, lipidler ve karbonhidratların miktarlarındaki değişimler, bunların birbirleri ile oranlarındaki ve yapılarındaki değişimlerin neler olduğu ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak ortaya çıkartılmaya çalışılmıştır. Ayrıca çalışmamızda, lipid peroksidasyon oranı, protein ikincil yapısındaki değişimler, membran düzeni ve membran akışkanlığındaki değişimler analiz edilmiş ve bütün analiz edilen parametreler üzerinde Türk PRPLS'inin koruyucu etkisinin olup olmadığı açığa çıkartılmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızın sonuçları, DOX uygulamasının sıçan karaciğerindeki karbonhidratlar, lipidler, proteinler ve nükleik asitlerin içerik, yapı, kompozisyon ve fonksiyonlarında önemli zararlı etkiler meydana getirdiğini göstermiştir. DOX uygulaması karaciğerdeki glikojen ve nükleik asit miktarında anlamlı bir azalmaya, lipidlerin ve proteinlerin miktarında anlamlı bir artışa sebep olmuştur. DOX uygulamasından sonra gözlenen olefinik=CH/lipit oranındaki azalma karaciğerde oksidatif stresin arttığını ve bunun sonucunda lipid peroksidasyonu meydana geldiğini göstermektedir. Ayrıca, DOX uygulamasından sonra ortaya çıkan CH₂ antisim./CH₃ antisim., CH₂ antisim./lipit ve C=O/lipit oranlarındaki azalma ve CH₃ antisim./lipit oranındaki artma, dokuda meydana gelen oksidatif stres kaynaklı lipid peroksidasyonunun bir sonucu olarak lipidlerin parçalandığını ve ortamda kısa zincirli lipidlerin miktarının arttığını göstermektedir. Kan dokusunda gerçekleştirdiğimiz, TAS, TOS ve OSI sonuçlarımız da, DOX'un sıçan dokularında oksidatif stres yarattığını doğrulamıştır. Proteinlerin yapı ve konformasyonları ile ilgili gerçekleştirdiğimiz analizlerin sonuçları, DOX uygulamasından sonra proteinlerde meydana gelen konformasyonel değişikliklerin yanında, alfa heliks ve beta tabaka yapılarında azalma, beta dönüş ve tesadüfi kıvrılma yapılarında artma olduğunu göstermiştir. Tesadüfi kıvrılma yapılarındaki artış dokuda

DOX etkisiyle protein denaturasyonu meydana geldiğini göstermektedir. DOX uygulamasından sonra ortaya çıkan glikojen/fosfat ($C-O/PO_4^{2-}$) oranındaki azalma ve lipid/protein oranındaki artış DOX'un karaciğer dokusundaki karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında önemli değişikliklere sebep olduğunu göstermektedir. Ayrıca, DOX uygulaması karaciğer hücre membranlarının fosfolipit zincirlerinin düzenini azaltmış, membranın derin iç kısımlarının düzenini ve membran akışkanlığını artırmıştır. DOX'un hücredeki toksik etki oluşturma mekanizmalarından birinin, hücre membranına tutunarak hücresel fonksiyonlara zarar vermek olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, hücre membranı ile ilgili elde ettiğimiz bu bulgu, DOX'un bir diğer toksik etki mekanizmasının membran düzeni ve akışkanlığını değiştirerek hücreye zarar verdiğini gösterdiği için çok önemlidir ve bu çalışma ile ilk kez ortaya çıkarılmıştır.

PRPLS tek başına verildiğinde serumdaki toplam antioksidant madde miktarını artırmış, karaciğerde ise hiçbir anlamlı değişikliğe sebep olmamıştır. Bu sonuç PRPLS'in karaciğerdeki lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitlerin yapıları ve fonksiyonları üzerinde hiçbir zararlı etkisinin olmadığını ve kanın antioksidan madde miktarını artırarak canlıya fayda sağladığını göstermiştir. Bu bulgu PRPLS'in vücut için toksik olmadığını ve tıpta çeşitli amaçlar için kullanılabileceğini göstermiştir.

DOX uygulamasından önce verilen PRPLS, DOX'un kanda yarattığı oksidatif stresin oluşmasını önlemiş ancak karaciğer dokusundaki biyomoleküllerde meydana getirdiği zararlı etkilere karşı onarıcı bir etki göstermemiştir. Baskın bir şekilde karaciğerde metabolize edilen DOX'un en çok biriktiği organlardan birisinin karaciğer olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, hayvanlara verilen DOX, uyguladığımız dozda ve sürede karaciğerdeki moleküller üzerinde çok ciddi oranda zararlı etkilere sebep olmuştur. Fakat PRPLS, kullandığımız doz ve uygulama süresinde bu toksik etkileri elimine etmede yeterli olamamıştır.

Çalışmamız tıpta kullanılan en yaygın kemoterapötik ajanlardan birisi olan DOX'un karaciğer dokusunda meydana getirdiği yapısal ve buna bağlı fonksiyonel etkileri moleküler düzeyde, ATR-FTIR spektroskopisi tekniği ile ortaya çıkaran ilk çalışmadır. DOX'un vücuda alınan ilaçların ve toksik maddelerin detoksifikasyonundan sorumlu ana organ olan karaciğerde meydana getirdiği toksisitenin mekanizmalarını anlamak, bu ilacın kanser hücrelerindeki etkinliğinin artırılması ve sağlıklı dokulardaki toksik etkilerinin azaltılması için son derece önemlidir. Çalışmamız bu anlamda literatüre ve evrensel bilime katkı sağlayacaktır. PRPLS'in tek başına verildiğinde karaciğer

dokusunda herhangi bir değişikliğe sebep olmaması ve DOX'tan önce verildiğinde kandaki oksidatif stresi azaltması ile ilgili bulgularımız ise bu kıymetli arı ürününün tıpa özellikle farmakolojiye entegre edilebilmesi aşamasında kullanılabilir. Ayrıca çalışmamız, toksik bir maddenin biyolojik bir dokuda meydana getirdiğı zararlı etkilerin görüntülenmesi için ATR-FTIR spektroskopisinin mükemmel bir teknik olduğunu göstermiştir.

PRPLS'in tıbbi bir ürün olarak nitelendirilebilmesi, marka ve tescil alınabilmesi ile ilgili olarak girişimlerde bulunulabilmesi için farklı alanlarda birçok bilimsel çalışma yapılması gerekmektedir. PRPLS'in koruyucu etkisini ortaya çıkaracak çalışmalar ülkemizin ekonomisinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Anlamlı olmayan sonuçların da bilimsel çalışmalar için önemli bir yapı taşı olduğuna inandığımızdan, bu çalışmada kullanılan doz ve uygulama sürelerinde PRPLS'nin koruyucu etkisinin bulunmadığına dair bulgumuzun bu önemli arı ürünü ile ilgili ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağını düşünüyoruz. Bundan sonraki süreçte, kullandığımız DOX ve PRPLS dozları ve uygulama süreleri değiştirilerek karaciğer dokusunda ve kalp, böbrek gibi farklı dokularda çalışmalar yapılması planlanmaktadır. Ayrıca ileride gerçekleştirilecek olan çalışmalara PRPLS'in etanolik ekstraktının yanında sulu ekstraktının uygulandığı bir hayvan grubu eklenebilir veya PRPLS'in içindeki CAPE, kafeik asit gibi antioksidan özelliğe sahip bileşikler ekstrakt edilerek saf olarak uygulanabilir. Bu çalışma modelinin ışığında ve planlanan yeni çalışma modelleriyle ileride ürün geliştirme amaçlı yeni projeler üretilebilir ve bu sayede ülkemizdeki arıcılar PRPLS üretimi yapmaları konusunda teşvik edilerek şu anda atıl durumda olan PRPLS'in ten ekonomik kazanç sağlanabilir.

5. KAYNAKLAR

- [1] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, ve L. Gianni, “Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity,” *Pharmacological Reviews*, c. 56, s. 2, ss. 185–229, 2004.
- [2] W. A. Bleyer, “The impact of childhood cancer on the United States and the world,” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, c. 40, s. 6, ss. 355–367, 1990.
- [3] G. Gatta, R. Capocaccia, M. P. Coleman, L. A. Gloeckler Ries, ve F. Berrino, “Childhood cancer survival in Europe and the United States,” *Cancer*, c. 95, s. 8, ss. 1767-1772, 2002.
- [4] J. E. Arcamone, “The pharmacological basis of therapeutics,” *Occupational and Environmental Medicine*, c. 64, s. 8, ss. 1101–1110, 2007.
- [5] A. G. F. Arcamone, G. Cassinelli, G. Fantini, “Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceletius* var. *caesius*,” *Biotechnology and bioengineering*, c. XI, s. 6, ss. 1101–1969, 1969.
- [6] F. M. Muggia ve M. D. Green, “New anthracycline antitumor antibiotics,” *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, c. 11, s. 1, ss. 43–64, 1991.
- [7] K. Hideg ve T. Kálai, “Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity,” *Cardiovascular Toxicology*, c. 7, s. 2, ss. 160–164, 2007.
- [8] B. A. O’Brien, B. Halliwell, D. P. Cameron, ve D. J. Allan, “Nicotinamide prevents the development of diabetes in the cyclophosphamide-induced NOD mouse model by reducing beta-cell apoptosis,” *Journal of Pathology*, c. 191, s. 1, ss. 86–92, 2000.
- [9] N.H. Sarah, Hilmer, C.C. Victoria, M. Michael ve Centre, “Abstract :The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin,” *General and Comparative Endocrinology*, c. 32, s. 8, ss. 794–799, 2004.
- [10] G. Aubel-Sadron ve D. Londos-Gagliardi, “Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review,” *Biochimie*, c. 66, s. 5, ss. 333–352, 1984.
- [11] M. Minami, S. Matsumoto, ve H. Horiuchi, “Cardiovascular side-effects of modern cancer therapy,” *Circulation Journal*, c. 74, s. 9, ss. 1779–1786, 2010.
- [12] D. Montaudon, P. Vrignaud, D. Londos-Gagliardi, ve J. Robert, “Fluorescence anisotropy of cell membranes of doxorubicin-sensitive and -resistant rodent tumoral cells,” *Cancer Research*, c. 46, s. 11, ss. 5602–5605, 1986.
- [13] N. Kocaman, T. Kuloğlu, S. İlhan, ve S. Aydın, “Doksorubisin uygulamasının karaciğer, böbrek ve kalp dokularındaki ghrelin ekspresyonuna etkisi,” *The Effects of Doxorubicin on The Expression of Ghrelin in The Liver, Kidneys and Cardiac Tissues*, c. 19, s. 4, ss. 164–168, 2014.

- [14] Y. Wang, Yi Ping Wang, Y. C. Tay, ve D. C. H. Harris, "Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events," *Kidney International*, c. 58, s. 4, ss. 1797–1804, 2000.
- [15] M. Rook, A. T. Lely, A. B. Kramer, H. van Goor, ve G. Navis, "Individual differences in renal ACE activity in healthy rats predict susceptibility to adriamycin-induced renal damage," *Nephrology Dialysis Transplantation*, c. 20, s. 1, ss. 59–64, 2005.
- [16] M. Yagmurca, H. Erdogan, M. Iraz, A. Songur, M. Ucar, ve E. Fadillioglu, "Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats," *Clinica Chimica Acta*, c. 348, s. 1–2, ss. 27–34, 2004.
- [17] Z. Zheng, P. Pavlidis, S. Chua, V. D. D'Agati, ve A. G. Gharavi, "An ancestral haplotype defines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the laboratory mouse," *Journal of the American Society of Nephrology*, c. 17, s. 7, ss. 1796–1800, 2006.
- [18] Y. Yao, X. Xu, G. Zhang, Y. Zhang, W. Qian, ve T. Rui, "Role of HMGB1 in doxorubicin-induced myocardial apoptosis and its regulation pathway," *Basic Research in Cardiology*, c. 107, s. 3, ss. 107–267, 2012.
- [19] K. Sturgeon, G. Muthukumaran, D. Ding, A. Bajulaiye, V. Ferrari, ve J. R. Libonati, "Moderate-intensity treadmill exercise training decreases murine cardiomyocyte cross-sectional area," *Physiological Reports*, c. 3, s. 5, ss. 1–10, 2015.
- [20] H. Q. Ta, K. S. Thomas, R. S. Schrecengost, ve A. H. Bouton, "A novel association between p130Cas and resistance to the chemotherapeutic drug adriamycin in human breast cancer cells," *Cancer Reports*, c. 68, s. 21, ss. 8796–8804, 2008.
- [21] I. S. Arif, C. L. Hooper, F. Greco, A. C. Williams, ve S. Y. Boateng, "Increasing doxorubicin activity against breast cancer cells using PPAR γ -ligands and by exploiting circadian rhythms," *British Journal of Pharmacology*, c. 169, s. 5, ss. 1178–1188, 2013.
- [22] K. B. Wallace, "Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy," *Pharmacology and Toxicology*, c. 93, s. 3, ss. 105–115, 2003.
- [23] S. M. Cutts, A. Nudelman, A. Rephaeli, ve D. R. Phillips, "The power and potential of doxorubicin-DNA adducts," *IUBMB Life*, c. 57, s. 2, ss. 73–81, 2005.
- [24] J. Wojtacki, E. Lewicka-Nowak, ve K. Lesniewski-Kmak, "Anthracycline-induced cardiotoxicity: Clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention - Review of the literature," *Medical Science Monitor*, c. 6, s. 2, ss. 411–420, 2000.
- [25] D. Iarussi, P. Indolfi, F. Casale, P. Coppolino, M. Adolfo Tedesco, ve M. Teresa Di Tullio, "Recent Advances in the Prevention of Anthracycline Cardiotoxicity in Childhood," *Current Medicinal Chemistry*, c. 8, s. 13, ss. 1649–1660, 2012.
- [26] S. M. Deatley, M. Y. Aksenov, M. V. Aksenova, B. Jordan, J. M. Carney, ve D. A. Butterfield, "Adriamycin-induced changes of creatine kinase activity in vivo and in cardiomyocyte culture," *Toxicology*, c. 134, s. 1, ss. 51–62, 1999.
- [27] J. P. Hale ve I. J. Lewis, "Anthracyclines: Cardiotoxicity ve its prevention," *Archives of Disease in Childhood*, c. 71, s. 5, ss. 457–462, 1994.

- [28] P. Shivakumar, M. Usha Rani, A. Gopala Reddy, ve Y. Anjaneyulu, "A study on the toxic effects of doxorubicin on the histology of certain organs," *Toxicology International*, c. 19, s. 3, ss. 241–244, 2012.
- [29] H. Demir ve Y. O. Birdane, "Hepatotoksik Antibiyotikler," *Kocatepe Veteriner Dergisi*, c. 8, s. 1, ss. 65–73, 2015.
- [30] R. Mete, M. Oran, B. Topcu, M. Oznur, E.S. Seber, ve A. Gedikbası, "Protective effects of onion (*Allium cepa*) extract against doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats, " *Toxicology and industrial health*, c. 32, s. 3, ss. 551–557, 2016.
- [31] X. Zhao, J. Zhang, N. Tong, Y. Chen, ve Y. Luo, "Protective effects of berberine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in mice, " *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, c.35, s. 5, ss.796-800, 2012.
- [32] B. Halliwell, M. A. Murcia, S. Chirico, ve O. I. Aruoma, "Free Radicals and Antioxidants in Food and In Vivo: What They Do and How They Work," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, c. 35, s. 1–2, ss. 7–20, 1995.
- [33] PH. D. Defeng Wu, PH.D., ve Arthur I. Cederbaum , "Free Radical Damage," *Anthracycline Antibiotics in Cancer Therapy*, c. 27, s. 4, ss. 97–102, 2003.
- [34] P. Ježek ve L. Hlavatá, "Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, c. 37, s. 12, ss. 2478–2503, 2005.
- [35] R. Olinski, A. Siomek, R. Rozalski, D. Gackowski, M. Foksinski, J. Guz, T. Dziaman, A. Szpila, ve B. Tudek, Barbara, "Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases," *Acta Biochimica Polonica*, c. 54, s. 1, ss. 11–26, 2007.
- [36] M. L. Urso ve P. M. Clarkson, "Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation," *Toxicology*, c. 189, s. 1–2, ss. 41–54, 2003.
- [37] J. M. McCord, "The evolution of free radicals and oxidative stress," *American Journal of Medicine*, c. 108, s. 8, ss. 652–659, 2000.
- [38] K. Apel ve H. Hirt, "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction," *Annual Review of Plant Biology*, c. 55, s. 1, ss. 373–399, 2004.
- [39] B. P. Yu, "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species," *Physiological Reviews*, c. 74, s. 1, ss. 139–162, 1994.
- [40] S. V. Shah ve P. D. Walker, "Reactive oxygen metabolites in toxic acute renal failure," *Renal Failure*, c. 14, s. 3, ss. 363–370, 1992.
- [41] J. M. McCord, B. B. Keele, ve I. Fridovich, "An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, c. 68, s. 5, ss. 1024–1027, 1971.
- [42] M. J. Thomas, "The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working?," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, c. 35, s. 1–2, ss. 21–39, 1995.

- [43] I. Szelenyi ve K. Brune, "Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats," *Digestive Diseases and Sciences*, c. 33, s. 7, ss. 865–871, 1988.
- [44] G. G. Duthie, K. W. J. Wahle ve W. P.T. James, "Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease," *Vascular Medicine Review*, c. 6, s. 1, ss. 1–6, 1995.
- [45] S. Hippeli ve E. F. Elstner, "OH-Radical-Type Reactive Oxygen Species: A Short Review on the Mechanisms of OH-Radical- and Peroxynitrite Toxicity," *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, c. 52, s. 9–10, ss. 555–563, 1997.
- [46] E. R. Stadtman, "Protein oxidation and aging. Free Radical Research," *Science*, c. 257, s. 5074, ss. 1220–1224, 1992.
- [47] İ. Akkuş, "Serbest Radikaller," *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, 1. baskı. Konya, Türkiye: Mimoza Yayınları, 1995, böl. 5, ss. 139- 155.
- [48] Y. Kalender, M. Yel, ve S. Kalender, "Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats: The effects of vitamin E and catechin," *Toxicology*, c. 209, s. 1, ss. 39–45, 2005.
- [49] E. Shacter, "Quantification and significance of protein oxidation in biological samples," *Drug Metabolism Reviews*, c. 32, s. 3–4, ss. 307–326, 2000.
- [50] B. Halliwell ve S. Chirico, "Lipid peroxidation: significance and its mechanism.," *The American journal of clinical nutrition*, c. 57, s. 2, ss. 715–725, 1993.
- [51] F. Demir, F. Narin, H. Akgün, K. Üzümlü, R. Saraymen, A. Baykan, ve E.Köklü, "Doksorubisin ile oluşturulmuş deneysel kardiyotoksosite üzerine melatoninin etkisi," *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, c. 47, s. 4, ss. 260–268, 2004.
- [52] B. Halliwell, S.Fu, R. Stocker, M J. Davies, D. Garland, C N.Oliver, A. Amici, I. Climent, A G. Lenz, B W. Ahn, E R. Stadtman, J A. Williams, E R. Stadtman, E. Schacter, R L. Levine, L. Tsai, N C. Halmes, J A . Hinson, N R. Pumford, ve L. Packer, "[17] Measurement of Protein Carbonyls in Human Brain Tissue," *Methods In Enzymology*, c. 300, s. 145, ss. 0076–0687, 1999.
- [53] Y. O. Birdane, "Antioksidanlar," *Kocatepe Veteriner Dergisi*, c. 7, s. 2, ss. 41-52, 2014.
- [54] J. Lykkesfeldt ve O. Svendsen, "Oxidants and antioxidants in disease : Oxidative stress in farm animals," *The Veterinary Journal*, c. 173, ss. 502–511, 2006.
- [55] P. Della Torre, A R. Imondi, C. Bernardi, A. Podestà, D. Moneta, M. Riflettuto, ve G. Mazué, "Cardioprotection by dexrazoxane in rats treated with doxorubicin and paclitaxel," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, c. 44, s. 2, ss. 138–142, 1999.
- [56] S. Castaldo ve F. Capasso, "Propolis, an old remedy used in modern medicine," *Fitoterapia*, c. 73, s. 1, ss. 1–6, 2002.
- [57] J. B. Daleprane ve D. S. Abdalla, "Emerging roles of propolis: Antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions," *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, c. 2013, s. 8, ss.1-8, 2013.
- [58] A. Akçasu, N. Banoğlu, Ş. Berkarda, ve N. Doğan, *Farmakoloji. İlaç Uygulamalarından Temel Kavramlar*, 1. baskı. İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp

Kitapevi, 1992, böl. 5, ss. 539- 545.

- [59] S. T. Carpes, R. Begnini, S. M. de Alencar, ve M. L. Masson, “Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity,” *Ciência e Agrotecnologia*, c. 31, s. 6, ss. 1818–1825, 2007.
- [60] S. Kutluca, F. Genç, ve A. Korkmaz, “Propolisin Yapısı ve Özellikleri,” *Propolis*, 1. baskı. Samsun, Türkiye: Çiftçi Eğitimi ve Yayın Şube Müdürlüğü, 2008, böl. 3, ss. 8- 10.
- [61] S. M. Rizk, H. F. Zaki, ve M. A. M. Mina, “Propolis attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats,” *Food and Chemical Toxicology*, c. 67, ss. 176–186, 2014.
- [62] S. Singla, N. Kumar, ve J. Kaur, “In vivo studies on the protective effect of propolis on doxorubicin-induced toxicity in liver of male rats,” *Toxicology International*, c. 21, s. 2, ss. 191–195, 2014.
- [63] Y. Nakajima, M. Shimazawa, S. Mishima, ve H. Hara, “Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions,” *Life Sciences*, c. 80, s. 4, ss. 370–377, 2007.
- [64] S. Albayrak ve S. Albayrak, “Propolis: Doğal antimikrobiyal madde,” *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, c. 37, s. 3, ss. 201–215, 2008.
- [65] V. Bankova, M. Popova, ve B. Trusheva, “Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review,” *Chemistry Central Journal*, c. 8, s. 1, ss. 1–8, 2014.
- [66] S. Silici ve S. Kutluca, “Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region,” *Journal of Ethnopharmacology*, c. 99, s. 1, ss. 69–73, 2005.
- [67] B. Bueno-Silva, A. Marsola, M. Ikegaki, S. M. Alencar, ve P. L. Rosalen, “The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity,” *Natural Product Research*, c. 31, s. 11, ss. 1318–1324, 2017.
- [68] B. Trusheva, D. Trunkova, ve V. Bankova, “Different extraction methods of biologically active components from propolis; a preliminary study,” *Chemistry Central Journal*, c. 1, s. 1, ss. 1–4, 2007.
- [69] Z. Bakkaloğlu ve M. Arıcı, “Farklı çözücülerle propolis ekstraksiyonunun toplam fenolik içeriği, antioksidan kapasite ve antimikrobiyal aktivite üzerine etkileri,” *Akademik Gıda*, c. 17, ss. 538–545, 2019.
- [70] M. C. Marcucci, “Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity,” *Apidologie*, c. 26, s. 2, ss. 83–99, 1995.
- [71] A. Sorucu, “Arı ürünleri ve apiterapi,” *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, c. 10, s. 1, ss. 1–15, 2019.
- [72] J. M. Sforcin ve V. Bankova, “Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?,” *Journal of Ethnopharmacology*, c. 133, s. 2, ss. 253–260, 2011.
- [73] J. M. Sforcin, “Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis,” *Phytotherapy Research*, c. 30, s. 6, ss. 894–905, 2016.

- [74] H. Türkez, M. I. Yousef, ve F. Geyikoglu, "Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver," *Food and Chemical Toxicology*, c. 48, s. 10, ss. 2741–2746, 2010.
- [75] H. W. Gamal Badra, Eman Abdo Sayeda, K. A.-H. Hassana, ve Z. S. Mohamed H. Mahmoud, "The Therapeutic Mechanisms of Propolis Against CCl₄ - Mediated Liver Injury by Mediating Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells and Improving the Hepatic Architecture through PI3K / AKT / mTOR , TGF- β / Smad2 , Bcl2 / BAX / P53 and iNOS Signaling P," *Cellular Physiology and Biochemistry*, c. 53, s.7, ss. 301–322, 2019.
- [76] R. El-haskoury, ve N. Al-waili, "Antioxidant activity and protective effect of propolis against carbon tetrachloride-induced liver and kidney injury by modulation of oxidative parameters," *Veterinary World*, c. 14, s.1, ss. 3076–3083, 2021.
- [77] E. M. Tanvir, A. Hasan, S. Islam, N.Tamanna, R. Perveen, S. Rahman, T. Ahmed, S. Hossen, R. Afroz, R. Afroz, M. Alamgir, ve Z. Chowdhury, "Ameliorative effects of ethanolic constituents of Bangladeshi propolis against tetracycline - induced hepatic and renal toxicity in rats," *Journal of Food Biochemistry*, c. 43, s. 1, ss. 1–11, 2019.
- [78] P. T. Seven, I. Seven, S. Karakus, ve S. I. Mutlu, "Turkish Propolis and Its Nano Form Can Ameliorate the Side Effects of Cisplatin , Which Is a Widely Used Drug in the Treatment of Cancer." c. 9, s. 1075, ss. 2-22, 2022.
- [79] I. C. G. Mendonça, Michelle L.B.B. Medeiros, Roberta A.P.M. Penteado, A. Parolia, ve Isabel C. C.M. Porto, "An overview of the toxic effects and allergic reactions caused by propolis," *pharmacology online*, c. 2, s.10, ss. 96-105, 2013.
- [80] F. Samiee-rad, S. Bagherkhani, ve N. Gheibi, "Histopathological Examination of the Effects of Oral Consumption of Various Doses of Propolis in Mice Liver," *Journal of Food and Nutrition Research*, c. 7, s. 11, ss. 785–793, 2019.
- [81] M A. Fikri, A. Sulaeman, E. Handharyani, ve S. Anna, "The effect of propolis administration on fetal development," *Heliyon*, c. 5, sayı 10, ss. e02672, 2019.
- [82] T.Ç. Samancı "Doxorubisin uygulanmış sıçanlarda mezenkimal kök hücrelerin sıçan karaciğerine etkisi," Doktora tezi, Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, Türkiye, 2020.
- [83] M.H. Ross, W. Pawlina, "Karaciğer anatomisi," *Histoloji konu anlatımı ve atlas*, 6. baskı. Ankara, Türkiye: Palme Yayıncılık, 2014, ss. 628-662.
- [84] Snell, R. 2012. "Clinical Anatomy By Regions, Liipincott Williams and Wilkins. " *Guyton And Hall Textbook Of Medical Physiology*, 9. baskı, Philadelphia, United States: W. B. Saunders Company, 2016, ss. 874
- 85] J. P. Iredale, "Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ," *Journal of Clinical Investigation*, c. 117, sayı 3, ss. 539–548, 2007.
- [86] J. E Hall, *Guyton And Hall Textbook Of Medical Physiology*, 13. baskı, Philadelphia, United States: W. B. Saunders Company, 2016, ss. 874
- [87] N. YAYLA, "Ratlarda parasetamolle indüklenen akut karaciğer toksisitesi üzerine *Nigella sativa* L. Etanol Ekstresinin Etkilerinin Araştırılması" Yüksek

lisans tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye, 2014.

- [88] B. H. Stuart ve D. J. Ando, *Biological applications of infrared spectroscopy*, 1. baskı, London, England: John Wiley & Sons, 1997, ss. 81.
- [89] D. Freifelder, *Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, 2. baskı, San Francisco, United States: W. H. Freeman, 1982, ss. 469-517.
- [90] E. Pekin, *Enstrümental Analiz*, 1. baskı, Çanakkale, Türkiye: Paradigma Akademi Yayınları, 2013, ss. 68-75.
- [91] A. Yazıcı, "Yakın kızılötesi spektroskopisi ile çileğin (fragaria) pestisit kalıntılarının belirlenmesi," Yüksek lisans tezi, Gıda Mühendisliği, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye, 2019.
- [92] A. Rohman, "The employment of Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometrics techniques for traceability and authentication of meat and meat products," *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, c. 6, sayı 1, ss. 9-17, 2019.
- [93] G. C. Smith ve S. P. Jackson, "The DNA-dependent protein kinase," *Genes & Development*, c. 13, sayı 8, ss. 916-934, 1999.
- [94] S. Nielsen, *Food Analysis*, 5. baskı, Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG, 2017, ss. 352-379.
- [95] A. Marcelli, A. Cricenti, W. M. Kwiatak, ve C. Petibois, "Biological applications of synchrotron radiation infrared spectromicroscopy," *Biotechnology Advances*, c. 30, s. 6, ss. 1390-1404, 2012.
- [96] K. Gerwert ve C. Kötting, "Fourier transform infrared spectroscopy," *Encyclopedia of Soils in the Environment*, c. 4, sayı 9, ss. 80-85, 2004.
- [97] T. D. Wang, G. Triadafilopoulos, J. M. Crawford, L. R. Dixon, T. Bhandari, P. Sahbaie, S. Friedland, R. Soetikno, ve C. H. Contag, "Detection of endogenous biomolecules in Barrett's esophagus by Fourier transform infrared spectroscopy," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, c. 104, s. 40, ss. 15864-15869, 2007.
- [98] F. Severcan, I. Sahin, ve N. Kazanci, "Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes--evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry," *Biochimica et Biophysica Acta*, c. 1668, s. 2, ss. 215-222, 2005.
- [99] S. Garip ve F. Severcan, "Determination of simvastatin-induced changes in bone composition and structure by Fourier transform infrared spectroscopy in rat animal model," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, c. 52, s. 4, ss. 580-588, 2010.
- [100] F. Severcan, N. Toyran, N. Kaptan, ve B. Turan, "Fourier transform infrared study of the effect of diabetes on rat liver and heart tissues in the CH region," *Talanta*, c. 53, s. 1, ss. 55-59, 2000.
- [101] G. Cakmak, F. Zorlu, M. Severcan, ve F. Severcan, "Screening of protective effect of amifostine on radiation-induced structural and functional variations in rat liver microsomal membranes by FT-IR spectroscopy," *Analytical Chemistry*, c. 83, s. 7, ss. 2438-2444, 2011.

- [102] D. G. Cameron ve G. M. Charette, "Automation of Fourier Transform Infrared Studies of Temperature-induced Phenomena," *Applied Spectroscopy*, c. 35, s. 2, ss. 224-225, 1981.
- [103] N. Toyran ve F. Severcan, "Competitive effect of vitamin D₂ and Ca²⁺ on phospholipid model membranes: an FTIR study," *Chemistry and Physics of Lipids*, c. 123, s. 2, ss. 165-176, 2003.
- [104] H. Boyar ve F. Severcan, "Oestrogen-phospholipid membrane interactions: an FTIR study," *Journal of Molecular Structure*, c. 408, ss. 269-272, 1997.
- [105] A. M. Melin, A. Perromat ve G. Dél  ris, "Sensitivity of Deinococcus radiodurans to γ -irradiation: A novel approach by Fourier transform infrared spectroscopy," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, c. 394, s. 2, ss. 265-274, 2001.
- [106] G. Cakmak, I. Togan, ve F. Severcan, "17 β -Estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol," *Aquatic Toxicology*, c. 77, s. 1, ss. 53-63, 2006.
- [107] O. Bozkurt, M. Severcan, ve F. Severcan, "Diabetes induces compositional, structural and functional alterations on rat skeletal soleus muscle revealed by FTIR spectroscopy: A comparative study with EDL muscle," *Analyst*, c. 135, s. 12, ss. 3110-3119, 2010.
- [108] G.   akmak, İ. Togan, C. U  uz ve F. Severcan "FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol," *Applied Spectroscopy*, c. 57, sayı 7, ss. 835-841, 2003.
- [109] P. I. Haris ve F. Severcan, "FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, c. 7, sayı 1-4, ss. 207-221, 1999.
- [110] M. R ve H. H. Mantsch, "Progress in Protein-Lipid Interactions," in *Fourier transform infrared studies of lipid-protein interaction*, c. 2, Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1986, ss. 103-147.
- [111] A. M. Melin, A. Perromat ve G. Dél  ris, "Pharmacologic application of Fourier transform IR spectroscopy: in vivo toxicity of carbon tetrachloride on rat liver," *Biopolymers*, c. 57, s. 3, ss. 160-168, 2000.
- [112] J. Kneipp, P. Lasch, E. Baldauf, M. Beekes ve D. Naumann, "Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy," *Biochimica et Biophysica Acta*, c. 1501, s. 2-3, ss. 189-199, 2000.
- [113] O. Bozkurt, M. D. Bilgin, ve F. Severcan, "The effect of diabetes mellitus on rat skeletal extensor digitorum longus muscle tissue: An FTIR study," *Spectroscopy*, c. 21, s. 3, ss. 151-160, 2007.
- [114] M. Alyane, L. Benguedouar, W. Kebsa, H. N. Boussenane, H. Rouibah, ve M. Lahouel, "Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity," *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, c. 21, s. 3, ss. 201-209, 2008.
- [115] K. Wided, R. Hassiba, ve L. Mesbah, "Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced oxidative stress in liver cells and

- mitochondria,” *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, c. 27, s. 6, ss. 1891–1897, 2014.
- [116] G. Ajayi, J. Olagunju, O. Ademuyiwa, ve O. Martins, “Gas chromatography-mass spectrometry analysis and phytochemical screening of ethanolic root extract of *Plumbago zeylanica*,” *Journal of Medicinal Plants Research*, c. 5, s. 9, ss. 1756-1761, 2011.
- [117] A. Meda, C.E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, ve O.G. Nacoulma, “Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity,” *Food Chem*, c. 91, s.3, ss. 571-577, 2005.
- [118] V. Dewanto, X. Wu, K.K. Adom, ve R.H. Liu, “Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity,” *Journal Of Agric Food Chemistry*, c. 50, s. 10, ss. 3010-3014, 2002.
- [119] R. Apak, K. Guclu, M. Özyurek, ve S.E. Karademir, “Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method,” *J. Agric. Food Chem*, c. 52, s. 26, ss. 7970-7981, 2004.
- [120] N. Turkmen, F. Sarı, E.S. Poyrazoglu, ve Y.S. Velioğlu, “Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey,” *Food Chem*, c. 95, s.4, ss. 653-657, 2011.
- [121] I.F. Benzie, ve J.J. Strain, “Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration,” *Methods Enzymol*, c. 299, s. 1, ss. 15-27, 1999.
- [122] M.H. Arafa, S.M. Nanies, H.A. Hebatallah, ve R. A. Hesham, “Protective effect of resveratrol against doxorubicin-induced cardiac toxicity and fibrosis in male experimental rats,” *J Physiol Biochem*, c. 70, s. 3, ss. 701-11, 2014.
- [123] A. I. Abushouk, A. Ismail, A. M. A. Salem, A. M. Afifi, ve M. M. Abdel-Daim, “Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity,” *Biomed. Pharmacother*, c. 90, ss. 935–946, 2017.
- [124] M. Kosecik, O. Erel, E. Sevinc, ve S. Selek, “Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking,” *international Journal of Cardiology* c. 100, s. 1, ss. 61-64, 2005.
- [125] O. Erel, “A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation,” *Clinica Biochem*, c. 37, s. 4. ss. 277-285, 2004.
- [126] M. Yumru, H.A. Savas, A. Kalenderoglu, M. Bulut, H. Celik, ve O. Erel, “Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: a comparative study,” *Progress in Neuro-Psychopharmacology Biological Psychiatry*, c. 33, s. 6, ss. 1070-1074, 2009.
- [127] D. Yonar, L. Ocek, B. I. Tiftikcioglu, Y. Zorlu, ve F. Severcan, “Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis diagnosis from cerebrospinal fluids via Fourier transform infrared spectroscopy coupled with multivariate analysis,” *Scientific Reports*, c. 8, s. 1, ss. 1–13, 2018.
- [128] M. Kardaş, A. G. Gozen, ve F. Severcan, “FTIR spectroscopy offers hints

- towards widespread molecular changes in cobalt-acclimated freshwater bacteria,” *Aquatic Toxicology*, c. 155, sayı 6, ss. 15–23, 2014.
- [129] G. Cakmak-Arslan, H. Haksoy, P. Goc-Rasgele, ve M. Kekecoglu, “Determination of the dose-dependent toxic effects of mad honey on mouse liver using ATR-FTIR spectroscopy,” *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, c. 228, s. 10, ss. 117719, 2020.
- [130] N. Simsek Ozek, S. Tuna, A. Elif Erson-Bensan, ve F. Severcan, “Characterization of microRNA-125b expression in MCF7 breast cancer cells by ATR-FTIR spectroscopy,” *Analyst*, c. 135, s. 12, ss. 3094-102, 2010.
- [131] S. Turker, M. Severcan, G. Ilbay, ve F. Severcan, “Epileptic seizures induce structural and functional alterations on brain tissue membranes,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, c. 1838, s. 12, ss. 3088–3096, 2014.
- [132] G. Cakmak, L. M. Miller, F. Zorlu, ve F. Severcan, “Amifostine, a radioprotectant agent, protects rat brain tissue lipids against ionizing radiation induced damage: An FTIR microspectroscopic imaging study,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, c. 520, s. 2, ss. 67–73, 2012.
- [133] G. Cakmak, M. Severcan, F. Zorlu, ve F. Severcan, “Structural and functional damages of whole body ionizing radiation on rat brain homogenate membranes and protective effect of amifostine,” *International Journal of Radiation Biology*, c. 92, s. 12, ss. 837–848, 2016.
- [134] B. Elibol-Can, E. Jakubowska-Dogru, M. Severcan, ve F. Severcan, “The effects of short-term chronic ethanol intoxication and ethanol withdrawal on the molecular composition of the rat hippocampus by FT-IR spectroscopy,” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, c. 35, s. 11, ss. 2050–2062, 2011.
- [135] C. Ceylan, T. Tanrikul, ve H. Özgencer, “Biophysical evaluation of physiological effects of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) farming using FTIR spectroscopy,” *Food Chemistry*, c. 145, ss. 1055–1060, 2014.
- [136] S. B. Akkas, M. Severcan, O. Yilmaz, ve F. Severcan, “Effects of lipoic acid supplementation on rat brain tissue: An FTIR spectroscopic and neural network study,” *Food Chemistry*, c. 105, s. 3, ss. 1281–1288, 2007.
- [137] R. Gurbanov, M. Bilgin, ve F. Severcan, “Restoring effect of selenium on the molecular content, structure and fluidity of diabetic rat kidney brush border cell membrane,” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, c. 1858, s. 4, ss. 845–854, 2016.
- [138] A. Salman, J. Ramesh, V. Erukhimovitch, M. Talyshinsky, S. Mordechai, ve M. Huleihel, “FTIR microspectroscopy of malignant fibroblasts transformed by mouse sarcoma virus,” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, c. 55, s. 2, ss. 141–153, 2003.
- [139] N. Simsek Ozek, S. Tuna, A. E. Erson-Bensan, ve F. Severcan, “Characterization of microRNA-125b expression in MCF7 breast cancer cells by ATR-FTIR spectroscopy,” *Analyst*, c. 135, s. 12, ss. 3094–3102, 2010.
- [140] H. L. Casal ve H. H. Mantsch, “Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy,” *BBA - Reviews on Biomembranes*, c. 779, s. 4, ss. 381–401, 1984.

- [141] C. Rask-Madsen ve G. L. King, "Mechanisms of disease: Endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes," *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, c. 3, s. 1, ss. 46–56, 2007.
- [142] O. Bozkurt, S. Haman Bayari, M. Severcan, C. Krafft, J. Popp, ve F. Severcan, "Structural alterations in rat liver proteins due to streptozotocin-induced diabetes and the recovery effect of selenium: Fourier transform infrared microspectroscopy and neural network study," *International Journal of Radiation Biology*, c. 17, s. 7, ss. 837-848, 2012.
- [143] N. A. Babenko ve V. S. Kharchenko, "Modulation of Insulin Sensitivity of Hepatocytes by the Pharmacological Downregulation of Phospholipase D," *International Journal of Endocrinology*, c. 2015, s. 15, ss. 1-15, 2015.
- [144] E. Öz, D. Erba, H. Selçuk Sürücü, ve E. Düzgün, "Prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity by melatonin," *Molecular and Cellular Biochemistry*, c. 282, s. 3, ss. 31–37, 2006.
- [145] S. Bilgic ve M. Ozgocmen, "The protective effect of misoprostol against doxorubicin induced liver injury," *Biotechnic Histochemistry*, ss. 1–9, 2019.
- [146] J. Gu, Y. Zhang, D. Xu, Z. Zhao, Y. Zhang, Y. Pan, P.Cao, ve Y. Chen, "Ethanol-induced hepatic steatosis is modulated by glycogen level in the liver," *Journal Lipid Research*, c. 56, s. 7, ss. 1329–1339, 2015.
- [147] F. Chiappini, A. Coilly, H. Kadar, P. Gual, A. Tran, C. Desterke, D. Samuel, J.C. Duclos-Vallée, D. Touboul, J. Bertrand-Michel, A. Brunelle, C. Guettier, ve F. Le Naour, "Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients," *Scientific Reports*, c. 7, s. 11, 2016, ss. 1–17, 2017.
- [148] E. Mansouri, A. Jangaran, ve A. Ashtari, "Protective effect of pravastatin on doxorubicin-induced hepatotoxicity," *Experimental Study*, c. 118, s. 5, ss. 296–301, 2015.
- [149] S.E. Al-Harhi, O.M. Alarabi, W.S. Ramadan, M.N. Alaama, H.M. Al-Kreathy, Z.A. Damanhuri, L.M. Khan, ve A.M. Osman, "Amelioration of doxorubicin-induced cardiotoxicity by resveratrol," *Molecular Medicine Reports*, c. 10, s. 3, ss. 1455–1460, 2014.
- [150] S. Karim, U. Bhandari, H. Kumar, A. Salam, M. A. A. Siddiqui, ve K. K. Pillai, "Doxorubicin induced cardiotoxicity and its modulation by drugs," *Indian Journal of Pharmacology*, c. 33, s. 3, ss. 203–207, 2001.
- [151] Y. Chen, P. Jungsuwadee, M. Vore, D. A. Butterfield, ve D. K. St. Clair, "Collateral damage in cancer chemotherapy: Oxidative stress in nontargeted tissues," *Molecular Interventions*, c. 7, s. 3, ss. 147–156, 2007.
- [152] M. A. Abd El-Aziz, A. I. Othman, M. Amer, ve M. A. El-Missiry, "Potential protective role of angiotensin-converting enzyme inhibitors captopril and enalapril against adriamycin-induced acute cardiac and hepatic toxicity in rats," *Journal of Applied Toxicology*, c. 21, s. 6, ss. 469–473, 2001.
- [153] K. Özdoğan, E. Taşkin, ve N. Dursun, "Protective effect of carnosine on adriamycin-induced oxidative heart damage in rats," *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, c. 11, s. 1, ss. 3–10, 2011.
- [154] L.L. Zwart, J.H.N. Meerman, J.N.M. Commandeur, ve N.P.E. Vermeulen

- “Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans,” *Free Radical Biology Medicine*, c. 26, s. 1/2, ss. 202–226, 1999.
- [155] R.H. Sills, D.J. Moore, ve R. Mendelsohn, “Erythrocyte peroxidation: Quantitation by fourier transform infrared spectroscopy,” *Analytical Biochemistry*, 218: 118-123, 1994.
- [156] A. Dogan, G. Siyakus, ve F. Severcan, “Food Chemistry FTIR spectroscopic characterization of irradiated hazelnut (*Corylus avellana* L.),” *Food Chemistry* c. 100, ss. 1106–1114, 2007.
- [157] T. Afsar, S. Razak, ve A. Almajwal, “Effect of Acacia hydasypica R. Parker extract on lipid peroxidation, antioxidant status, liver function test and histopathology in doxorubicin treated rats,” *Lipids in Health and Disease*, c. 18, s. 1, ss. 1–12, 2019.
- [158] K. Etkisi, Ş. Ayla, H. Oktar, G. Tanriverdi, M. Cengiz, A. Ç. Özkiliç, G. Can, B. Özücer, M. Eser, S. Demirci, ve Ş. Batur, “Doksoerubisin nedenli sıçan hepatotoksitesine nikotinaidin (koruyucu) etkisi,” *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, c. 10, s. 1, ss. 229–238, 2009.
- [159] E.G. Mimnaugh, M.A. Trush, M. Bhatnagar, ve E. Theodore, “Enhancement of reactive oxygen - dependent mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin,” *Biochemical Pharmacology* c. 34, s. 6, ss. 847–856, 1985.
- [160] M. Karapehlivan, E. Uzlu, O. Atakişi, H. M. Erdoğan, M. Uzun, ve M. Çitil, “Effect of L-Carnitine on plasma sialic acid, mda and blood gsh levels in doxorubicine administered rabbits,” *Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi*, c. 13, s. 2, ss. 155–160, 2007.
- [161] K. Nagai, S. Fukuno, A. Oda, and H. Konishi, “Protective effects of taurine on doxorubicin-induced acute hepatotoxicity through suppression of oxidative stress and apoptotic responses,” *Anti Cancer Drugs*, c. 27, s. 1, ss.17-23, 2016.
- [162] K.T. Gotama, V. Soetikno, M. Louisa, ve W. Arozal, “Hepatoprotective effects of l-citrulline against doxorubicin-induced liver damage in rats: an analysis of serum biomarkers,” *International journal of applied pharmaceuticals*, c. 11, s. 1, ss. 230-233, 2019.
- [163] I. Kwiecien, M. Michalska, ve L. Wlodek. “The selective effect of cystathionine on doxorubicin hepatotoxicity in tumor-bearing mice,” *European Journal of Pharmacology*, c. 550, s. 7, ss. 39–46, 2006.
- [164] I.M. Olivares-Corichi, G. Ceballos, R. Medina-Santillan R. Medina-Navarro, A.M. Guzman-Grenfell, ve J.J. Hicks, “Oxidation by reactive oxygen species (ROS) alters the structure of human insulin and decreases the insulin-dependent D-glucose-C14 utilization by human adipose tissue,” *Front Biosci*, c. 10, s. 11, ss. 3127-3131, 2005.
- [165] C. G. Fraga ve A. L. Tappel, “Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices,” *Biochemical Journal*, c. 252, s. 3, ss. 893–896, 1988.
- [166] D.J. Betteridge, “What is oxidative stress?,” *Metabolism-Clinical and Experimental*, c. 49, s. 2, ss. 3–8, 2000.

- [167] P. Lu, "Monitoring cardiac function in patients receiving doxorubicin," *Seminars in Nuclear Medicine*, c. 35, s. 3, ss. 197–201, 2005.
- [168] D. Oth, M. Bégin, P. Bischoff, J. Y. Leroux, G. Mercier, ve C. Bruneau, "Induction, by adriamycin and mitomycin C, of modifications in lipid composition, size distribution, membrane fluidity and permeability of cultured RDM4 lymphoma cells," *BBA - Biomembranes*, c. 900, s. 2, ss. 198–208, 1987.
- [169] M. Jedrzejczak, A. Koceva-Chyla, K. Gwozdziński, ve Z. Józwiak, "Changes in plasma membrane fluidity of immortal rodent cells induced by anticancer drugs doxorubicin, aclarubicin and mitoxantrone," *Cell Biology International*, c. 23, s. 7, ss. 497–506, 1999.
- [170] F. M. Megli ve K. Sabatini, "Mitochondrial phospholipid bilayer structure is ruined after liver oxidative injury in vivo," *FEBS Letters*, c. 573, s. 1–3, ss. 68–72, 2004.
- [171] E. Cullu, Ö. İlhan, Ç. Nil, A. Bülent, D. Emel ve Ö.Ş. Öner, "Doxorubicin-induced chemomyectomy effects in rat skeletal muscle," *Acta Orthop Traumatol Turc*, c. 37, s. 4, ss. 323-9, 2003.
- [172] K. Boutabet, W. Kessa, M. Alyane, ve M. Lahouel, "Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin," *Indian Journal of Nephrology*, c. 21, s. 2, ss. 101–106, 2011.
- [173] T. Ozdal, G. Sari-kaplan, E. Mutlu-altundag, ve D. Boyacioglu, "Evaluation of Turkish propolis for its chemical composition , antioxidant capacity , anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative effect on fibroblasts and mouse mesenchymal stem cell line," *Journal of Apicultural Research*, c. 57, s. 5, ss. 627–638, 2018.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : NURŞEN ORAK

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyoloji	Düzce Üniversitesi	2022
Lisans	Biyoloji	Düzce Üniversitesi	2018

YAYINLAR

[1] Orak N., Cakmak Arslan G., and Kaya S. T. , “An evaluation of damages caused by doxorubicin in liver tissue and potential protective effect of propolis on these damages,” *Konuralp Medical Journal*, c. 14, s. 1, ss. 104–114, 2022.

