



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



[Doktora Tezi]

**[KLOROKİN ve GAMA RADYASYONUNUN OLUŞTURDUĞU İNCE
BAĞIRSAK HASARINA KARŞI APOSİNİNİN ETKİLERİ]**

[Ayça SEZEN US]

[Biyoloji Anabilim Dalı]

[Genel Biyoloji Programı]

DANIŞMAN
[Prof. Dr. [Nihal Ömür BULAN]

[Haziran, 2022]

İSTANBUL

Bu çalışma, 10.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Ömür BULAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Kadir TURAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Tuncay ORTA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Özlem SAÇAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

[Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 32387 numaralı projesi ile desteklenmiştir.]

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--	--

ÖNSÖZ

Akademik hayatta, özellikle tez aşamasında ne yapacağımı, nasıl yapacağımı bilemediğim anlarda yolumu bulmamda pusulam olan, bilgi ve deneyimlerinin yanında sevgisi ve ilgisiyle her zaman yanımda olan kıymetli hocam Prof. Dr. Ömür BULAN'a gönülden teşekkür ederim.

Tez sürecimin her aşamasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen, tez komitemde olmalarından onur ve gurur duyduğum hocalarım Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT ve Prof. Dr. Kadir TURAN'a çok teşekkür ederim.

Tez projemin her aşamasında ilgisi ve desteği için Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ hocama çok teşekkür ederim. Tezimin deneysel süreçlerinde yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör.Dr. Eda DAĞSUYU, Dr.Öğr.Üyesi İsmet Burcu TÜRKYILMAZ ve Arş.Gör.Dr. İlknur BUGAN'a destekleri için teşekkür ederim. Deneysel süreçte birlikte çalıştığımız Arş.Gör. Melis ÇÖREMEN'e keyifli çalışma ortamımız için teşekkür ederim.

Akademik hayatımın her aşamasında birlikte olmaktan mutluluk duyduğum yol arkadaşım, eşim Hüseyin US'a, neşesi ve sevgisi ile tüm zorlukları aşma gücü veren canım kızım Ece Sezen US'a, her zaman bana örnek ve destek olan biricik kardeşim Aslı SEZEN BARRIE'ye, varlıkları ile ailemi güzelleştiren, gücüme güç katan Will Arda BARRIE ve Alex BARRIE'ye, yanımda olmasalar bu teşekkürleri yazamayacağım canım annem Aysel SEZEN ve canım babam Akgün SEZEN'e her zaman yanımda oldukları, beni koşulsuzca sevip, güvendikleri ve destekledikleri için çok teşekkür ederim.

Haziran 2022

Ayça SEZEN US

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
1.GİRİŞ.....	1
GENEL KISIMLAR	3
2.1. İNCE BAĞIRSAK	3
2.2. İYONİZAN RADYASYON	5
2.3. APOPTOZ	7
2.4. OTOFAJİ.....	9
2.4.1. Otofajinin Klinik Olarak Hedeflenmesi	13
2.5. KLOROKİN	15
2.6. PROLİFERASYON	18
2.7. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES.....	20
2.7.1. Oksidatif Stresin Lipitlere Etkileri	21
2.7.2. Oksidatif Stresin Proteinlere Etkileri.....	21
2.7.3. Oksidatif Stresin DNA üzerine Etkileri.....	22
2.8. ANTİOKSİDANLAR	22
2.8.1. Enzimatik Antioksidanlar	22
2.8.1.1 Katalaz (KAT).....	22
2.8.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	23
2.8.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)	23
2.8.2.Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	24
2.8.2.1 Glutasyon (GSH).....	24
2.8.2.2 Aposinin (APO).....	24
3. MALZEME VE YÖNTEM	28
3.1. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER	29

3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER	30
3.2.1. PCNA İmmünohistokimyası	30
3.2.2. p62 İmmünohistokimyası	31
3.3 BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER	32
3.3.1. LC3 II (MAP1LC3B) Seviyelerinin Belirlenmesi	32
3.3.2. LAMP 2 (Lizozom İlişkili Membran Proteini 2) Seviyelerinin Belirlenmesi.....	33
3.3.3. Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi	34
3.3.4. BCL-2 Seviyelerinin Belirlenmesi	34
3.3.5. MPO Seviyelerinin Belirlenmesi.....	35
3.3.6. NOX Seviyelerinin Belirlenmesi.....	36
3.3.7. MDA Seviyelerinin Belirlenmesi	36
3.3.8. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Seviyelerinin Belirlenmesi	37
3.3.9. Total Antioksidan Kapasite (TAK) Seviyelerinin Belirlenmesi	38
3.3.10. Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Belirlenmesi.....	38
3.3.11. Katalaz (KAT) Aktivitelerinin Belirlenmesi	39
3.3.12. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitelerinin Belirlenmesi	40
3.3.13. Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) Seviyelerinin Belirlenmesi	41
3.3.14. Total Protein Tayini.....	42
3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	43
4. BULGULAR	44
4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR	44
4.1.1. Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	44
4.1.2. Radyasyon Grubuna Ait Histolojik Bulgular	46
4.1.3. Klorokin Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	49
4.1.4. Aposinin Grubuna Ait Histolojik Bulgular	51
4.1.5. Radyasyon + Klorokin Grubuna Ait Histolojik Bulgular	53
4.1.6. Radyasyon + Aposinin Grubuna Ait Histolojik Bulgular	55
4.1.7. Radyasyon + Klorokin + Aposinin Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	57
4.1.8. Klorokin + Aposinin Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	59
4.1.9. Histolojik Hasar Skoru	61
4.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	63
4.2.1. PCNA İmmünohistokimyasına Ait Bulgular.....	63
4.2.2. p62 İmmünohistokimyasına Ait Bulgular	69
4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR	75

4.3.1. LC3 II (MAP1LC3B) Seviyelerine Ait Bulgular	75
4.3.2. LAMP 2 Seviyelerine Ait Bulgular	77
4.3.3. Kaspaz-3 Seviyelerine Ait Bulgular	79
4.3.4. BCL-2 Seviyelerine Ait Bulgular	81
4.3.5. MPO Seviyelerine Ait Bulgular	83
4.3.6. NOX Seviyelerine Ait Bulgular	85
4.3.7. MDA Seviyelerine Ait Bulgular	87
4.3.8. LPO Seviyelerine Ait Bulgular	89
4.3.9. TAK Seviyelerine Ait Bulgular	91
4.3.10. GSH Seviyelerine Ait Bulgular	93
4.3.11. KAT Aktivitelerine Ait Bulgular	95
4.3.12. SOD Aktivitelerine Ait Bulgular	97
4.3.13. TNF- α Seviyelerine Ait Bulgular	99
TARTIŞMA VE SONUÇ	102
KAYNAKLAR	125
ÖZGEÇMİŞ	152

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2. 1: İnce Bağırsağın Yapısı, a: İnce bağırsağın tabakaları, b: İnce bağırsak kesiti, c: İnce bağırsak villusu (Mescher, 2009).	3
Şekil 2. 2: Apoptotik Yolaklar (Güvenç ve Güvenç, 2017).	8
Şekil 2. 3: Otofaji Çeşitleri (Dash ve diğ., 2016).	10
Şekil 2. 4: Otofajinin Basamakları (D'Arcy, 2019).	11
Şekil 2. 5: Otofajiyi arttıran ve inhibe eden uygulamaların hedefleri (Towers ve Thorburn, 2016).	14
Şekil 2. 6: CQ'nun açık formülü.	16
Şekil 2. 7: a: APO aktivasyonu, dimer oluşumu. b: APO'nun NOX İnhibisyonu (Stefanska ve Pawliczak, 2008).	25
Şekil 4. 1: K grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, HE, Bar: 200 µm.	44
Şekil 4. 2: K grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, Masson, Bar: 100 µm.	45
Şekil 4. 3: K grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 µm.	45
Şekil 4. 4: RAD grubunun ince bağırsağında hiperemi (↪), vakuolizasyon (↩), ödem (⚡), HE, Bar: 100 µm.	46
Şekil 4. 5: RAD grubunun ince bağırsağında villus bütünlüğünde bozulma (➡), bez bütünlüğünde bozulma (★), hiperplazi (➡), koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre (➤), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➡➡➡), Masson, Bar: 100 µm.	47
Şekil 4. 6: RAD grubunun ince bağırsağında inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➡➡➡), villusda kısalma ve genişleme (◆), ödem (⚡), hiperplazi (➡), Masson, Bar: 200 µm.	47
Şekil 4. 7: RAD grubunun ince bağırsağında piknotik nukleus (▲), bez bütünlüğünde bozulma (★), ödem (⚡), Masson, Bar: 100 µm.	48
Şekil 4. 8: RAD grubunun ince bağırsağına ait goblet hücrelerinde (→) ve çizgili kenarında (►) PAS pozitif reaksiyon şiddetinde azalma, goblet hücre sayısında azalma ve villuslar arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda artma (★), Bar: 100 µm.	48

Şekil 4. 9: CQ grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, HE, Bar: 100 µm.....	49
Şekil 4. 10: CQ grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, Masson, Bar: 100 µm.	50
Şekil 4. 11: CQ grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 µm.....	50
Şekil 4. 12: APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, HE, Bar: 100 µm.....	51
Şekil 4. 13: APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, Masson, Bar: 100 µm.	52
Şekil 4. 14: APO grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 µm.....	52
Şekil 4. 15: RAD + CQ grubuna ait sıçanların ince bağırsağında a: hiperplazi (➡), b: inflamatuvar hücre infiltrasyonu (»»), villuslarda kısalma ve genişleme (◆), HE, Bar:200 µm.....	53
Şekil 4. 16: RAD + CQ grubunun ince bağırsağında ödem (✱), hiperemi (↘), koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre (▷), piknotik nukleus (▲), HE, Bar: 100 µm.....	54
Şekil 4. 17: RAD + CQ grubunun ince bağırsağında villus bütünlüğünde bozulma (➡), villuslarda kısalma ve genişleme (◆), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (»»), Masson, Bar: 200 µm.	54
Şekil 4. 18: RAD + CQ grubunun jejunumuna ait goblet hücrelerinde (→) ve çizgili kenarında (►) PAS pozitif reaksiyon şiddetinde azalma, goblet hücre sayısında azalma ve villuslar arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda artma (✱), Bar: 100 µm.....	55
Şekil 4. 19: RAD + APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, HE, Bar: 100 µm.	56
Şekil 4. 20: RAD + APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, Masson, Bar: 100 µm.	56
Şekil 4. 21: RAD + APO grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 µm.....	57
Şekil 4. 22: RAD + CQ + APO grubuna ait ince bağırsağında villuslarda kısalma ve genişleme (◆), HE, Bar: 100 µm.....	58
Şekil 4. 23: RAD + CQ + APO grubuna ait ince bağırsağında a: villus bütünlüğünde bozulma (➡), b: inflamatuvar hücre infiltrasyonu (»»), Masson, Bar: 100 µm.	58

Şekil 4. 24: RAD + CQ + APO grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 µm.....	59
Şekil 4. 25: CQ + APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kript, HE, Bar: 100 µm.	60
Şekil 4. 26: CQ + APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kript, Masson, Bar: 100 µm.	60
Şekil 4. 27: CQ + APO grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, villuslar arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma (✦) Bar: 100 µm.....	61
Şekil 4. 28: Histolojik hasar skoru.	63
Şekil 4. 29: İnce bağırsak kript epitel hücrelerinde immunohistokimya ile tespit edilen % PCNA pozitif hücre sayısı.....	65
Şekil 4. 30: K grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.....	65
Şekil 4. 31: RAD grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.....	66
Şekil 4. 32: CQ grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.....	66
Şekil 4. 33: APO grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.....	67
Şekil 4. 34: RAD + CQ grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.....	67
Şekil 4. 35: RAD + APO grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.....	68
Şekil 4. 36: RAD + CQ + APO grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡) (), Bar: 100 µm.	68
Şekil 4. 37: CQ + APO grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.....	69
Şekil 4. 38: İnce bağırsak dokusunda immunohistokimya ile tespit edilen % p62 pozitif hücre sayısı.	71
Şekil 4. 39: K grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.....	71
Şekil 4. 40: RAD grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.....	72
Şekil 4. 41: CQ grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.....	72

Şekil 4. 42: APO grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.	73
Şekil 4. 43: RAD+CQ grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.	73
Şekil 4. 44: RAD+APO grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.	74
Şekil 4. 45: RAD+CQ+APO grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.	74
Şekil 4. 46: CQ+APO grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.	75
Şekil 4. 47: İnce Bağırsak Dokusu LC3 II Seviyeleri (ng/ml), (ortalama ± standart sapma).....	77
Şekil 4. 48: İnce Bağırsak Dokusu LAMP 2 Seviyeleri (ng/L), (ortalama ± standart sapma).....	79
Şekil 4. 49: İnce Bağırsak Dokusu Kaspaz-3 Seviyeleri (ng/ml), (ortalama ± standart sapma).....	81
Şekil 4. 50: İnce Bağırsak Dokusu BCL-2 Seviyeleri (ng/ml), (ortalama ± standart sapma).....	83
Şekil 4. 51: İnce Bağırsak Dokusu MPO Seviyeleri (ng/ml), (ortalama ± standart sapma).....	85
Şekil 4. 52: İnce Bağırsak Dokusu NOX Seviyeleri (ng/ml), (ortalama ± standart sapma).....	87
Şekil 4. 53: İnce Bağırsak Dokusu MDA Seviyeleri (nmol/ml), (ortalama ± standart sapma).....	89
Şekil 4. 54: İnce Bağırsak Dokusu LPO Seviyeleri (nmolMDA/mg protein), (ortalama ± standart sapma).....	91
Şekil 4. 55: İnce Bağırsak Dokusu TAK Seviyeleri (µmol Trolox/g protein), (ortalama ± standart sapma).....	93
Şekil 4. 56: İnce Bağırsak Dokusu GSH Seviyeleri (nmol GSH/mg protein), (ortalama ± standart sapma).....	95
Şekil 4. 57: İnce Bağırsak Dokusu KAT Aktiviteleri (U/mg protein), (ortalama ± standart sapma).....	97
Şekil 4. 58: İnce Bağırsak Dokusu SOD Aktiviteleri (U/mg protein), (ortalama ± standart sapma).....	99

Şekil 4. 59: İnce Bağırsak Dokusu TNF- α Seviyeleri (pg/mg protein), (ortalama $\pm$ standart sapma).	101
---	-----



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4. 1: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak histolojik hasar skoru.	62
Tablo 4. 2: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak PCNA değerleri.	64
Tablo 4.3: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak p62 değerleri.	70
Tablo 4.4: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak LC3 II seviyeleri.	76
Tablo 4.5: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak LAMP 2 seviyeleri.	78
Tablo 4.6: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak Kaspaz-3 seviyeleri.	80
Tablo 4.7: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak BCL-2 seviyeleri.	82
Tablo 4.8: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak MPO seviyeleri.	84
Tablo 4.9: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak NOX seviyeleri.	86
Tablo 4.10: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak MDA seviyeleri.	88
Tablo 4.11: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak LPO değerleri.	90
Tablo 4.12: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak TAK değerleri.	92
Tablo 4.13: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak GSH değerleri.	94
Tablo 4.14: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak KAT aktivite değerleri.	96
Tablo 4.15: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak SOD aktivite değerleri.	98
Tablo 4.16: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak TNF- α değerleri.	100

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrat derece
Cu	: Bakır
Fe	: Demir
Gy	: Gray
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorikasit
IU	: Uluslararası ünite
kg	: Kilogram
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Mn	: Mangan
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyumklorür
NaOH	: Sodyumhidroksit
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
Zn	: Çinko
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µm	: Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklama
AEC	: 3-amino-9-etilkarbazol
Apaf-1	: Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1
APO	: Aposinin

ATG	: Otofaji ilişkili protein
ATP	: Adenozin trifosfat
BCL-2	: B-hücre lenfoma 2
BSA	: Sığır serum albumini
CQ	: Klorokin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELİSA	: Enzime bağlı immünosorban yöntem
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
HE	: Hematoksilen & eozin
i.p.	: İntraperitoneal
i.v.	: İntravenöz
IL	: İnterlökin
K	: Kontrol
Kaspaz-3	: Sistein aspartat spesifik proteaz 3
KAT	: Katalaz
LAMP 2	: Lizozom ilişkili membran proteini 2
LC3 II	: Mikrotübül ile ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3
LD50	: Letal doz 50
LPO	: Lipit hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Miyeloperoksidaz
m TOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
NOX	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz
p62	: Otofagozomun spesifik kargo proteini
PAS	: Periyodik asit schiff
PBS	: Fosfatla tamponlanmış tuz
PCNA	: Prolifere hücre nuklear antijeni
RAD	: Radyasyon grubu
RNA	: Ribonükleik asit

ROT	: Reaktif oksijen türleri
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAK	: Total antioksidan kapasite
TNF-α	: Tümör nekroz faktör - α
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı DNA kırık uç işaretleme



ÖZET

DOKTORA TEZİ

KLOROKİN ve GAMA RADYASYONUNUN OLUŞTURDUĞU İNCE BAĞIRSAK HASARINA KARŞI APOSİNİNİN ETKİLERİ

Ayça SEZEN US

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömür BULAN

Radyoterapi günümüzde en etkili kanser tedavi yöntemlerinden biri olarak önemini korumaktadır. Bazı kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelerde olduğu gibi besin ve oksijen yetersizliğinde hücrenin sağkalımı için otofajik bir süreç devreye girer. Radyoterapiye yanıt olarak gelişen otofaji bu tedavi yöntemini kısıtlar. Klorokin (CQ) anti malaryal bir ilaç olarak seksen yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Son yıllarda CQ bir otofaji inhibitörü olarak gösterilmiş ve yoğun ilgi görmeye başlamıştır. CQ uygulanan bazı tümör hücrelerinin otofaji yapmadığı ve enerjisini tüketerek öldüğü çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Radyoterapiye cevap olarak otofaji baskılandığında hücrelerin apoptoza gitme oranında ciddi bir artış ve sonuçta tümör boyutunda ciddi bir küçülme olduğu gösterilmiştir. İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz (NOX), reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretiminden sorumlu membrana bağlı enzimatik bir komplekstir. Yapılan çalışmalarda NOX kaynaklı ROT'un otofajiyi başlattığı tespit edilmiştir. Aposinin (APO) etkili bir NOX inhibitörü olarak bilinen antioksidan ve antiapoptotik özellikleri olan bir maddedir. Çalışmamızda kanser tedavisinde radyoterapiye destek olarak CQ kullanılmasının sağlıklı dokular üzerinde nasıl bir hücresel yanıt oluşturacağını belirlemek ve bu kombine tedavi yanıtında antioksidan rolü ile APO'nun koruyucu etkilerinin ilk kez ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada rastgele seçilen laboratuvar hayvanları her birinde 7'şer adet Wistar albino sıçan bulunan sekiz gruba ayrıldı. Birinci ve ikinci gruba fizyolojik tuzlu su, üçüncü ve beşinci gruba CQ, dördüncü ve altıncı gruba APO, yedinci ve sekizinci gruba CQ ve APO enjekte edildi. Tüm

enjeksiyonlar intraperitoneal (i.p.) yolla ve 5 gün boyunca 24 saatte bir olmak üzere beş kez yapıldı. Beşinci enjeksiyonlardan bir saat sonra ikinci, beşinci, altıncı ve yedinci gruplara 8 Gray (Gy) tüm vücut radyasyon ışınlaması yapıldı. Radyasyon verildikten bir gün sonra disekte edilen sıçanlardan ince bağırsak dokuları alındı. İnce bağırsak dokusunda meydana gelen histolojik değişimler hematoksil-eozin (HE), Masson'un üçlü boyası (Masson) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) reaksiyonu uygulanarak, otofaji inhibisyonu otofagozomun spesifik kargo proteini (p62) belirteci ile, hücre proliferasyonu prolifer hücre nuklear antijeni (PCNA) belirteci ile immünohistokimyasal olarak belirlendi. Biyokimyasal olarak otofaji için otofagozomal biyobelirteç olarak mikrotübül ile ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 (LC3) ve lizozomal inhibisyon için lizozomal membran ile ilişkili protein 2 (LAMP 2), apoptoz için sistein aspartat spesifik proteaz 3 (kaspaz-3) ve B-hücre lenfoma 2 (BCL-2), oksidatif stresin varlığı ve değişimi için NOX, miyeloperoksidaz (MPO) ve malondialdehit (MDA), inflamasyonun varlığı ve değişimi için Tümör nekroz faktör - α (TNF- α) belirteçleri ile enzim bağli immünosorban yöntem (ELISA) yöntemi kullanıldı. Ayrıca rutin biyokimyasal yöntemler ile oksidatif stresin varlığı ve değişimi için lipid hidroperoksit (LPO), antioksidan etkinin varlığı ve değişimi için total antioksidan kapasite (TAK), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon (GSH) belirteçleri kullanıldı.

Sonuç olarak çalışmamızda, radyasyonun sıçan ince bağırsağında önemli ölçüde histolojik hasar oluşturduğunu, oksidatif hasar parametrelerinde belirgin bir artışa, antioksidan sistemde zayıflamaya sebep olduğunu, antiproliferatif, inflamatuvar ve apoptotik etkilere sahip olduğunu aynı zamanda otofajiyi uyardığını belirledik. RAD ile verilen CQ'nun oksidatif stresi arttırdığını, antioksidan kapasiteyi zayıflattığını, antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğunu, apoptoz üzerinde ise tek başına önemli bir değişime sebep olmadığını tespit ettik. CQ'nun otofajinin lizozomal basamağındaki inhibisyon etkisinden dolayı bu grupta p62, LC3 II ve LAMP 2 seviyelerinde önemli artış gözlemledik APO'nun RAD ve CQ'nun meydana getirdiği bu değişimleri önemli ölçüde tersine çevirmesi ise koruyucu etkisini göstermektedir. Sonuçlarımızın klinik uygulamalara ışık tutabileceğini öngörmekteyiz.

Haziran 2022, 173 sayfa.

Anahtar kelimeler: [Gama radyasyon, klorokin, aposinin, ince bağırsak, otofaji]

SUMMARY

[Ph.D. THESIS]

**[THE EFFECTS of APOCYNIN AGAINST CHLOROQUINE and GAMMA
RADIATION INDUCED INTESTINAL INJURY]**

[Ayça SEZEN US]

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

[Department of Biology]

Supervisor: [Prof. Dr.] [Ömür BULAN]

Today, radiotherapy maintains its importance as one of the most effective cancer treatment methods. As in healthy cells, in some cancer cells, an autophagic process is activated for the survival of the cell in nutrient and oxygen deficiency. Autophagy, which develops in response to radiotherapy, limits this treatment modality. Chloroquine (CQ) has been used as an antimalarial drug for over eighty years. In recent years, chloroquine has been shown as an autophagy inhibitor and has begun to attract great attention. Various studies have shown that some tumor cells treated with CQ cannot autophagy and die by consuming their energy. It has been shown that when autophagy is suppressed in response to radiotherapy, there is a significant increase in the rate of apoptosis of cells, resulting in a significant reduction in tumor size. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) is a membrane-bound enzymatic complex responsible for the production of reactive oxygen species (ROT). Studies have shown that NOX-induced ROT initiates autophagy. Aposine (APO) is a substance with antioxidant and antiapoptotic properties, known as an effective NOX inhibitor. In our study, it was aimed to determine how the use of CQ as a support to radiotherapy in cancer treatment will create a cellular response on healthy tissues and to reveal the protective effects of APO with its antioxidant role in this combined treatment response for the first time.

In this study, randomly selected animals were divided into eight groups with 7 Wistar albino rats each. Physiological saline to the first and second groups, CQ to the third and fifth groups,

APO to the fourth and sixth groups, CQ and APO to the seventh and eighth groups, were injected. All injections were administered intraperitoneally (i.p.) five times, every 24 hours for 5 days. One hour after the fifth injection, 8 Gray (Gy) total body irradiation was applied to the second, fifth, sixth and seventh groups. Small intestine tissues were obtained from dissected rats one day after radiation administration. Histological changes in the small intestine tissue were applied by hematoxylin-eosin (HE), Masson's triple dye (Masson) and Periodic Acid Schiff (PAS) reaction, inhibition of autophagy with the specific cargo protein (p62) marker of autophagosome, cell proliferation, proliferation of cell nuclear antigen (PCNA) was determined by immunohistochemistry. Biochemically, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) as autophagosomal biomarker for autophagy and lysosome membrane-associated protein 2 (LAMP 2) for lysosomal inhibition, cysteine aspartate-specific protease 3 (caspase-3) and B-cell lymphoma 2 (BCL-2) for apoptosis, NOX, myeloperoxidase (MPO) and malondialdehyde (MDA) markers for the presence and change of oxidative stress, Tumor necrosis factor α (TNF- α) markers for the presence and change of inflammation were determined using enzyme-linked immunosorbent method (ELISA). In addition, lipid hydroperoxide (LPO) markers for the presence and change of oxidative stress, total antioxidant capacity (TAK), superoxide dismutase (SOD), catalase (KAT) and glutathione (GSH) markers for the presence and change of antioxidant effect were determined with routine biochemical methods.

As a result of our study, we determined that radiation caused significant histological damage in the rat small intestine, caused a significant increase in oxidative damage parameters, weakened the antioxidant system, had antiproliferative, inflammatory and apoptotic effects, and also stimulated autophagy. We found that CQ given together with RAD increased oxidative stress, weakened antioxidant capacity, had antiproliferative and anti-inflammatory effects, and did not cause a significant change on apoptosis by itself. Due to the inhibition effect of CQ on the lysosomal step of autophagy, we observed a significant increase in p62, LC3 II and LAMP 2 levels in this group. The fact that APO significantly reverses these changes caused by RAD and CQ shows its protective effect. We anticipate that our results may shed light on clinical applications.

June 2022, [173] pages.

Keywords: [Gamma radiation, chloroquine, apocynin, intestine, autophagy]

1.GİRİŞ

Radyoterapinin kanser hastalarının sağkalım ve iyileşme sürecinde olumlu etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Fakat tedavi sırasında ve sonrasında ışınlanan sağlıklı dokular üzerindeki yan etkilerini göz ardı etmemek gerekir (Özalpan, 2001; Monobe ve diğ., 2005; Karabulut-Bulan ve diğ., 2017). İyonize radyasyon, radyasyonun tipine, maruz kalma hızına ve dozuna bağlı olarak çeşitli hücresel olaylara sebep olabilir (Geleijns ve diğ., 2004; Park ve diğ., 2015). “Bergonie ve Tribondeau” yasasına göre, bölünme sıklığı fazla olan dokuların radyasyona duyarlılıkları bölünmeyen veya daha az bölünen dokularla kıyaslandığında, daha fazladır (Steven ve Elwin, 1999; Erbil ve diğ., 2005).

Radyoterapinin amacı kanser hücrelerini ortadan kaldırmaktır. İyonize radyasyonun çeşitli kanser türlerinde otofajiyi arttırdığını gösteren birçok araştırma yapılmıştır. Radyasyona bir yanıt olarak otofaji yolu ile hücrelerin sağ kalımının belirgin bir biçimde artması tedaviyi kısıtlayan, radyoterapinin etkinliğini azaltan bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (Yao ve diğ., 2003; Ye ve diğ., 2016). Yapılan çalışmalar otofaji inhibitörlerinin radyoterapiye ek olarak kullanılabilecek bir ilaç olabileceği görüşünü destekler niteliktedir (Chen ve diğ., 2015; Sehgal ve diğ., 2015). Bu inhibitörlerin tedavideki başarıyı arttırdığı gösterilse de bu ikili tedavinin sağlıklı dokular üzerinde nasıl etkileri olduğu henüz netlik kazanmış değildir. Tedaviyi başarılı kılan bu kombinasyonun olası yan etkilerinin araştırılması ve bu etkilerin en aza indirgenmesi amacıyla, Aposinin (APO)'nun bir antioksidan olarak nasıl rol oynayabileceğinin belirlenmesi bu araştırmanın merak konusudur.

Klorokin (CQ) uzun yıllardır sıtma tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Ayrıca antiinflamatuvar etkileri sebebiyle romatoid artrit ve lupus eritematozus tedavisinde de kullanılmaktadır. Otofajinin; meme, prostat ve kolon kanserlerindeki inhibisyonu, bu hücrelerin radyoterapiye ölüm yanıtını artırmaktadır (Mathew ve diğ., 2007). Otofajiyi inhibe ettiğinin keşfedilmesiyle CQ dikkatleri üzerine çekmiş ve başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisindeki rolü merak konusu olmuştur. CQ ile muamele edilen tümör hücrelerinin otofaji yapamadığında enerjisini tüketip öldüğü ortaya konmuştur (Solomon ve Lee, 2009; Sasaki ve diğ., 2010; Chen ve diğ., 2015; Pascolo, 2016). Yapılan bir çalışmada CQ'nun otofajiyi inhibe ederek glioblastoma tümör hücrelerinin enerjilerinin tüketilip ölmesini sağladığı ve hastaların sağ

kalım süresini arttırdığı gösterilmiştir (Koukourakis ve diğ., 2016). Bu sebeple otofaji inhibitörlerinden biri olan CQ'nun tedavide radyoterapinin etkisinin artırılması için kullanılabileceği düşünülmüştür (Sehgal ve diğ., 2015; Yuan ve diğ., 2015). CQ'nun uzun dönemde belirgin yan etkilerinin gözlenmemesi otofaji inhibitörleri arasında kullanımını ön plana çıkartmıştır (Lu ve diğ., 2008; Wei ve diğ., 2020). CQ'nun otofajiyi inhibe etmesinin yanında DNA tamirini azalttığı, hücre siklusunu durdurduğu ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Eng ve diğ., 2016; Ye ve diğ., 2016).

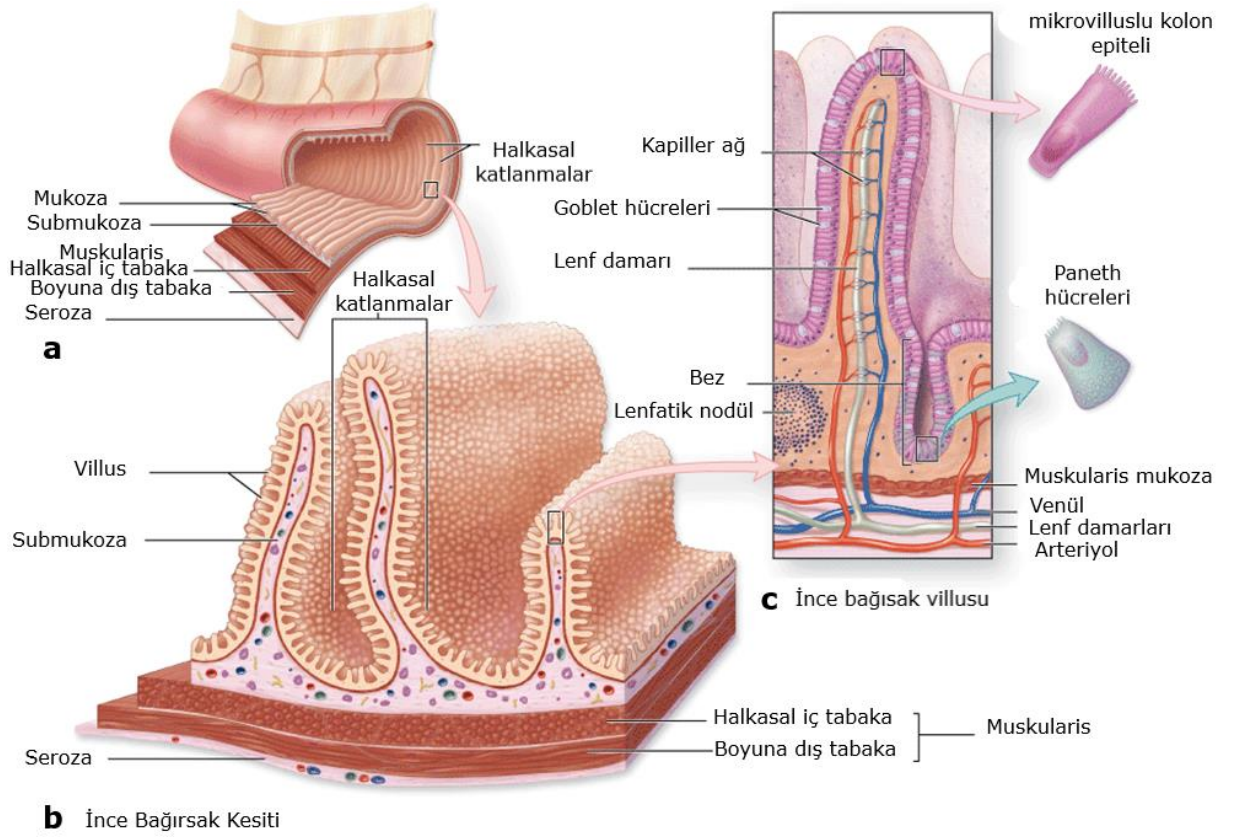
APO, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz (NOX) inhibitörü olan bir antioksidandır. NOX enzimi reaktif oksijen türleri (ROT)'ların üretimine sebep olur ve inhibisyonu ile aktive olmuş nötrofil ve makrofajlardan salınan süperoksit (O_2^-) oluşumunu inhibe eder (Stefanska ve Pawliczak, 2008). ROT seviyelerindeki artış radyasyon ile oluşan ince bağırsak hasarının temel sebebidir (Keskek ve diğ., 2006). ROT artışının oksidatif stres oluşturarak apoptotik hücre ölümünü uyardığı ve birçok rahatsızlıkla ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Moon ve diğ., 2008). Çeşitli deneysel çalışmalar APO'nun NOX'u inhibe ederek terapötik etkileri olabileceğini göstermiştir (Senejoux ve diğ., 2013; El-Sawalhi ve Ahmed, 2014; Miller ve diğ., 2014). Cagin ve diğerlerinin (2016) yaptıkları bir çalışmada APO'nun radyasyondan önce verilmesinin oksidatif stresi azaltarak antioksidan etkiler gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan bir çalışmada NOX aktivitesinin otofaji sırasında arttığı belirlenmiştir (Teng ve diğ., 2012). Bu sonuç APO'nun, NOX'u inhibe ederek, otofajiyi engelleyebileceğini düşündürmektedir.

Yaptığımız bu çalışmanın amacı kanser tedavisinde radyoterapinin etkilerini arttırdığı düşünülen sıtma, romatoid artrit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan CQ'nun sağlıklı sıçan ince bağırsak dokusu üzerinde tek başına ve radyasyon ile uygulanmasının ince bağırsak dokusunda oluşturabileceği hücresel yanıtı ilk kez belirlemek ve APO'nun bu yanıt üzerindeki muhtemel koruyucu etkilerini ortaya koymaktır.

GENEL KISIMLAR

2.1. İNCE BAĞIRSAK

İnce bağırsak sindirim kanalının en uzun bölümüdür. Duedonum, jejenum, ileum olmak üzere üç temel kısımdan oluşur. Sindirimin ve emilimin büyük ölçüde gerçekleştiği yapı olan ince bağırsağın ortasında değişen çaplarda bir lümen bulunur (Junquiera ve diğ., 1988). Bu lümenin etrafı dört tabaka ile çevrilidir: tunika mukoza (lamina epiteliyalis, lamina propria ve lamina muskularis), tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1: İnce bağırsağın genel görünümü. **a:** İnce bağırsağın tabakaları, **b:** İnce bağırsak kesiti, **c:** İnce bağırsak villusu (Mescher, 2009).

Tunika mukoza lümenine doğru uzanan ve yüzey alanını arttıran villuslarıyla maksimum absorpsiyonu sağlar. Kripta tabakası ise devamlı hücre yenilenmesi ve proliferasyonun gerçekleştiği bölgedir. Kriptadan villuslara göç eden hücreler farklılaşarak enterositler, goblet hücreleri, Paneth hücreleri ya da enteroendokrin hücreleri meydana getirirler (Collins ve diğ., 2020). Bağırsak mukozasının epitelinde enterositler, goblet hücreleri, paneth hücreleri,

enteroendokrin hücreler ve M hücreleri olmak üzere en az 5 tip hücre bulunmaktadır. Enterositler bağırsak lümenindeki sindirim ürünlerinin absorpsiyondan sorumlu hücrelerdir. Ayrıca suyun ve elektrolitlerin salgılanması için gerekli enzimleri üreten salgılayıcı hücrelerdir. Bazal nükleus içeren uzun prizmatik görünüme sahip enterositler içerdikleri mikrovilluslar sayesinde emilim yüzeyini 600 kat artırırlar. Goblet hücreleri ise tek hücreli müsin salgılayan bezlerdir. Sayıları duodenumdan ileumun sonuna doğru giderek artar. Apikalde granüllerin kümelenmesi ve bazale doğru daralan görünümü ile cam kadehe benzetilir. Hematoksin & Eozin preparatlarında içerdikleri müsinojen suda çözünüp kaybolduğu için bu kısımlar boş görünür. Paneth hücrelerinin temel fonksiyonu antimikrobial maddeler salgılayarak doğal mukozal bağışıklığı sürdürmektir. Salgıladıkları lizozim enzimi sayesinde bazı bakterilerin hücre duvarını sindirebilirler. Yapılarında bulunan α -defensinler sitotoksik CD8⁺T lenfositlerinde aracı fonksiyonu olan peptitlerin homologudur. Ayrıca arjinin bakımından zengin bir protein ve çinko içerirler. Enteroendokrin hücreler çeşitli parakrin ve endokrin hormonları üretirler. Endokrin fonksiyonlarını kolesistokinin, sekretin, gastrik inhibitör polipeptit ve motilin üreterek gerçekleştirirler. Kolesistokinin ve sekretin hormonları pankreatik aktiviteyi ve safra salgısını artırırken gastrik salgıları ve motiliteyi inhibe eder. Gastrik inhibitör polipeptit, pankreastan insülin salınımını uyarırken, motilin gastrik ve intestinal motiliteyi uyarır. Parakrin (lokal etkili) hormonlar olarak ise somatostatin ve histamin üretirler. M hücreleri, lamina propriadaki genişlemiş lenf nodülleri ve Peyer plaklarının üzerinde yer alan modifiye enterositlerdir. Apikallerinde mikrokantiller bulunur. Lümendeki mikroorganizmaları ve makromolekülleri endositozla hücre içine alan ve Peyer plaklarına ileten antijen taşıyıcı hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2010). M hücreleri bu sayede bağırsaklarda immun yanıtın başlatılmasını sağlarlar (Yörük, 2008). Lamina propria ve submukoza içerisinde bulunan Peyer plakları çok miktarda makrofaj, T ve B lenfositlerini içerir (Junquiera ve diğ., 1988). Tunika submukoza sıkı bağ dokusundan oluşur ve adipoz hücreler içerir. Duodenum submukozasında Brunner bezleri bulunur. Brunner bezleri hem mukus hem de zimojen salgılayan hücrelere sahiptir. Bu bezlerin salgıları yüksek düzeyde alkali olup asidik kimusu nötralize ederek ince bağırsağın proksimalini korurlar. Ayrıca bu alkali salgılar ince bağırsağın pH'ını pankreatik enzimlerin çalışması için uygun hale getirerek sindirime de yardımcı olurlar. Tunika muskularis içte sirküler (halkasal), dışta longitudinal (boyuna) uzanan iki kas tabakasından oluşmuştur. Bu iki kas tabakasının arasında miyenterik plexus (Auerbach plexusu) bulunur. Lokal ve peristaltik olmak üzere iki çeşit kas kasılması gözlenir. Lokal

kasılmalar kimusun sindirim suları ile karışımını, dolaşımını ve absorpsiyon için temasını sağlarken, peristaltik kasılmalar bağırsak içeriğinin distal yönde hareketini sağlar (Ross ve Pawlina, 2010). Tunika seroza ise ince, gevşek bir bağ dokusu ve mezotel hücreleriyle döşelidir (Junquiera ve ark. 1988) (Şekil 2.1).

2.2. İYONİZAN RADYASYON

Radyoaktif çekirdeklerin kararlı hale gelebilmek amacıyla yaydıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga şeklinde taşınan fazla enerjilere radyasyon (Çetin, 2011), bu enerjiyi yayan maddelere radyoaktif maddeler adı verilir. İyonize radyasyon, etki ettiği maddede iyonlaşmaya sebep olur. İyonlaşma, radyasyon ile etkileşime giren canlı veya cansız bir maddede meydana gelebilir (Şenlik, 2010).

Tüm canlılar yaşamları boyunca radyasyona maruz kalırlar. Radyasyonun canlı sistemlerde meydana getirdiği değişim uzun yıllardır çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. İyonizan radyasyon elektromanyetik (X ve gamma ışınları) ve partiküler (protonlar ve nötronlar) radyasyon olmak üzere iki ana başlık altında incelenir. İyonizan radyasyonun canlı sistemlerde meydana getirdiği iyonlaşma ve uyarılma sonucunda bir saniyeden kısa sürede meydana gelen erken (akut) etkiler veya günler, aylar, bazen yıllar sonra ortaya çıkan geç etkiler gözlenebilir (Özalpan, 2001).

Radyasyon dört temel özelliği sayesinde çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu özellikler radyasyonun izlenebilme özelliği, maddenin radyasyonu etkileme özelliği, radyasyonun maddeyi etkileme özelliği ve radyasyonun enerjiye sahip olma özelliğidir. İzlenebilme özelliği sayesinde radyasyon çeşitli biyokimyasal süreçlerin araştırılması, kayaların yaşının tespit edilmesi, nükleer tıp uygulamaları ve piston aşınması ölçümleri gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Tıpta radyolojik uygulamalar, bilgisayarlı tomografi ve endüstride kalınlık ölçümleri gibi alanlarda kullanılması radyasyonun maddeden etkilenme özelliği sayesinde. Radyasyonun maddeyi etkileme özelliği sayesinde kullanıldığı alanlara ise radyoterapi uygulamaları, yeni tohum çeşitlerinin elde edilmesi, tıbbi gereçlerin sterilizasyonu gibi uygulamalar örnek verilebilir. Bu alanların yanı sıra elektrik enerjisinin elde edilmesi, denizaltı ve uzay araçlarının hareketinin sağlanması gibi kullanım alanları radyasyonun sahip olduğu enerjiden kaynaklıdır (Özalpan, 2001).

Radyasyonun biyolojik sistemler üzerindeki etkileri direkt veya indirekt olabilir. Direkt etki, DNA veya enzim gibi biyolojik bir molekül tarafından radyasyon enerjisinin doğrudan absorplanması ile başlayan bir dizi değişimi ifade eder. İndirekt etki ise ortamdaki biyolojik olmayan diğer moleküllerin radyasyon enerjisini absorbe etmesi ve değişikliğe uğrayan ortam moleküllerinin biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek onlarda çeşitli değişimlere sebep olması ile ortaya çıkar. Yani etki ettiği ortamdaki biyolojik olmayan diğer aracı molekülleri içeren dolaylı bir süreçtir. Radyasyonun biyolojik sistemlerdeki etkileri 3 basamaklı bir süreçtir: fiziksel, kimyasal ve biyolojik kademe. Fiziksel kademe, radyasyon enerjisinin canlı dokulardaki atom ve moleküllere transfer edildiği ve iyonlaşmalara yol açtığı süreçleri kapsar. İyonlaşan moleküller son derece kararsızdır ve serbest radikallerin oluşumuna sebep olurlar. Bu serbest radikallerin nükleik asit, proteinler, hücre zarı gibi yapılarda bozulmalara sebep olduğu sekonder reaksiyonlar kimyasal kademe olarak adlandırılır. Biyolojik kademe ise DNA hasarının onarılması, onarılmayan DNA'ya sahip hücrelerin ölmesi ve karsinogenez gibi uzun dönemde ortaya çıkan sonuçları kapsar (Denham ve diğ., 2001; Özalpan, 2001).

İyonizan radyasyon hücrede bir dizi moleküler ve fizyolojik değişikliğe neden olur. Radyasyona maruz kaldığı anda sistemin patofizyolojisi değişmeye başlar (Stone ve diğ., 2003). “Bergonie ve Tribondeau” yasasına göre, her hücre tipinin radyasyona duyarlılığı farklıdır. Bir dokunun radyasyona duyarlılığı mitotik aktivitesi ile doğru, farklılaşma derecesi ile ters orantılıdır (Özalpan, 2001). Bölünen hücre sayısı ve bölünme sıklığı fazla olan deri, bağırsak, üreme ve kan hücreleri gibi az farklılaşmış hücrelerin radyasyona duyarlılıkları daha fazla iken, bölünmeyen veya daha az bölünen karaciğer, böbrek, kıkırdak, kas, sinir hücreleri gibi iyi farklılaşmış hücrelerin radyasyona duyarlılıkları daha azdır (Steven ve Elwin, 1999; Erbil ve diğ., 2005). İyonize radyasyon radyasyonun tipine, maruz kalma hızına ve doza bağlı olarak farklı hücresel reaksiyonları indükleyebilir (Geleijns ve diğ., 2004; Park ve diğ., 2015).

Radyasyon tedavisi çoğu kanser hastası için kaçınılmaz bir seçimdir. Abdominal tümör radyoterapilerinde görülen en yaygın yan etkilerden biri ince bağırsakta meydana gelen hasarlardır (Thames, 1983; Andrade ve diğ., 2004; Henni ve Ali, 2012; Roszak ve diğ., 2012). Radyasyona bağlı bağırsak hasarının tedavisi cerrahi müdahale, hiperbarik oksijen tedavisi ve beslenme destek yaklaşımlarına dayanmaktadır. Ancak bu yöntemler ideal terapötik etki göstermemektedir (Meineke ve Flidner, 2005). Bu nedenle, radyasyon hasarı üzerinde önleyici

etkisi olan ve radyasyona bağı bağırsak mukozal hasarının iyileşmesini teşvik edebilecek yeni yöntemler geliştirmek büyük önem taşımaktadır (Liu ve diğ., 2015).

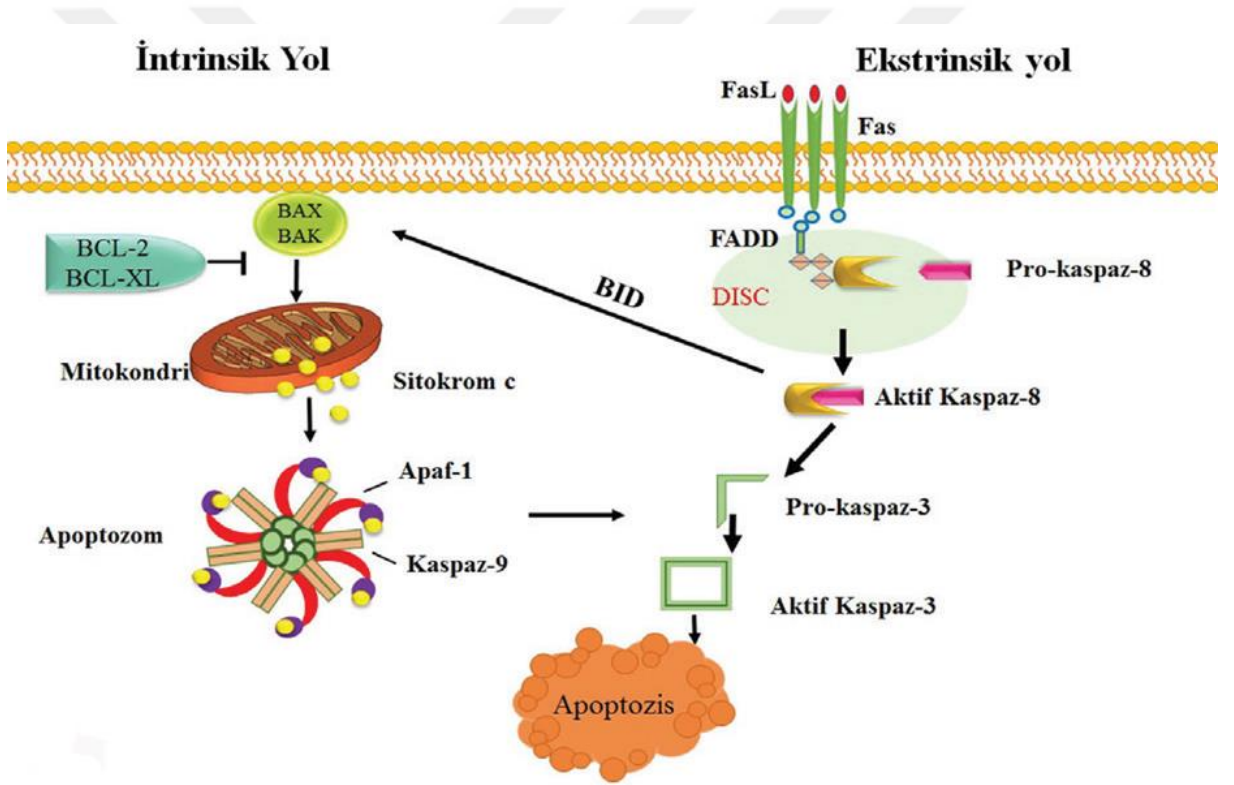
2.3. APOPTOZ

Apoptoz çeşitli fizyolojik veya patolojik sebeplerle uyarılabilen, enerjiye bağımlı, kendine özgü morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahip programlı hücre ölümü çeşitlerinden biridir (Celepli ve diğ., 2020). Radyasyon, orta şiddette oksidatif stres, hücre yaşlanması, bazı virüsler, tümör hücreleri, bazı ilaçlar, büyüme hormonu eksikliği, Fas ve TNFR-1 reseptör aktivasyonu gibi çeşitli nedenler apoptozu başlatabilir (D'arcy, 2019). Apoptoz kendine özgü morfolojik ve biyokimyasal değişimler sayesinde diğ hücre ölümü çeşitlerinden ayrılır. Hücre küçülür, komşu hücrelerden uzaklaşarak yuvarlaklaşır. Bu süreçte hücre membranı ve organellerin yapısı bozulmaz, hücre içeriği hücrenin dışına çıkmaz. Hücre, zarla çevrili tomurcuklar halinde koparak apoptotik cisimcikleri meydana getirir. Apoptotik cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler (Kerr ve diğ., 1972). ATP gerektirmesi, enflamasyonun görülmemesi, DNA'nın 180 baz çifti ve katları şeklinde (DNA merdiveni) parçalanması apoptozla özgü biyokimyasal değişimlerdir (Fink ve Cookson, 2005). Apoptoz 5 farklı yolakla gerçekleşebilir. Bu yollardan en yaygın olan ikisi intrinsik yolak ve ekstrinsik yollardır (Grilo ve Mantalaris, 2019).

Apoptozun intrinsik yolu radyasyon kaynaklı gen hasarları, mitokondriyal hasar, endoplazmik retikulum stresi, onkogenler ve büyüme faktörünün yokluğu gibi sebeplerle aktive olur (Singh ve diğ., 2019). BCL-2 proteinleri intrinsik yolun kontrolünde önemli rolü olan proapoptotik ve antiapoptotik özelliklere sahip merkezi düzenleyicilerdir (Du Toit, 2013). İçerdikleri BH gruplarına göre 3 çeşittirler: tüm BH alanlarını (BH1, BH2, BH3 ve BH4) içerenler, üç BH alanı (BH1, BH2 ve BH3) içerenler ve tek BH alanı (BH3) içerenler. İlk grup antiapoptotik etki gösterirken ikinci ve üçüncü grup proapoptotiktir. Tüm BH alanlarını içeren ilk grup mitokondri membranındaki BAX ve BAD proteinlerini bloke eder. Üç BH alanı içeren ikinci grup mitokondrinin dış zarındaki geçirgenliği artırarak proapoptotik faktörlerin sitozole salınmasını sağlar. Tek BH alanı içeren üçüncü grup proteinler ise doğrudan BAX ve/veya BAK ile etkileşerek yapıda değişikliğe neden olurlar (Kale ve diğ., 2018). BAX ve BAK mitokondri dış zarında gözenekler oluşturabilen Apaf-1 molekülüne bağı proapoptotik BCL-2 proteinleridir. İntrinsik yol uyarıldığında Apaf-1 serbest kalır ve mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP) artar. Mitokondrideki sitokrom C sitozole salınır. Sitozoldeki sitokrom

C, Apaf-1, kaspaz-9 ve ATP bir araya gelerek apoptozom adı verilen kompleksi meydana getirirler. Bu kompleks apoptotik hücre ölümünü geri dönüşümsüz yola sokan kaspaz kaskadını başlatır (Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018; Kalkavan ve Green, 2018).

Apoptozun ekstrinsik yolu aktive T hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler ve makrofajların FasL ve TNF- α reseptörlerine bağlanması ile başlatılır. Bu bağlanma sonucunda prokaspaz-8 aktive olur ve kaspaz kaskadı uyarılır. Bu yolakta ölüme neden olan kompleksi (DISC) oluşturmak için prokaspaz 8 ve 10 adaptör proteinlere bağlanarak aktive olurlar. Aktif kaspaz 8 ve 10 efektör kaspazları (kaspaz 3, 6 ve 7) aktive ederler. Ayrıca kaspaz 8 BID'i parçalayarak intrinsik yolu aktive eder (Choo ve diğ., 2019) (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2: Apoptotik Yolaklar (Güvenç ve Güvenç, 2017).

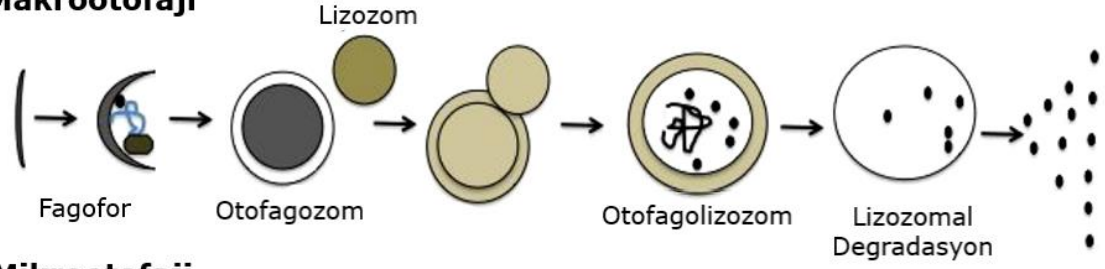
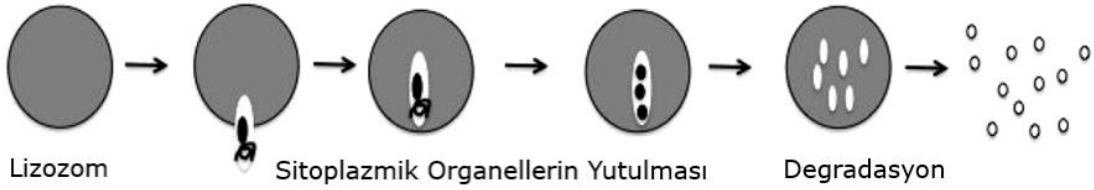
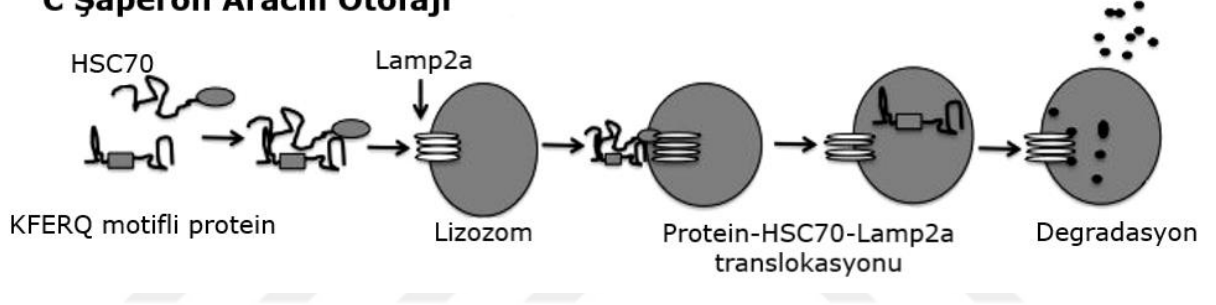
Apoptoz kaspaz ailesi enzimlerinin aktivasyonuna bağlıdır. Başlatıcı kaspazlar ve efektör kaspazlar olarak iki gruba ayrılırlar (Elmore, 2007). Hücre hasarı tespit edildikten sonra, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9 ve 10) aktive edilirler ve efektör kaspazları (kaspazlar 3, 6 ve 7) aktive ederler. Efektör kaspazlarının aktivasyonu endonükleazların aktivasyonu, DNA fragmentasyonu, nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin yok edilmesi, fagositik hücreler için

ligandların ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile sonuçlanan olaylar dizisini başlatır (Martinvalet ve diğ., 2005; Poon ve diğ., 2014).

2.4. OTOFAJİ

Otofaji besin yokluğu, hipoksi, enfeksiyon gibi hücrel stres durumlarında uzun ömürlü proteinlerin, hasarlı organellerin ve sitozolik parçaların geri dönüşümünü sağlayan önemli bir sağkalım mekanizmasıdır. Geri dönüşürülecek bu hücrel yapılar otofagozom adı verilen çift zarlı bir vezikülün içine alınır. Otofagozomlar lizozomlarla kaynaşarak otofagolizozomları oluşturur (Mehrpour ve diğ., 2010; Anding ve Baehrecke, 2015). Otofagolizozomun içindeki materyaller yapı taşlarına ayrılarak hücre içi yapılar için alternatif kaynak ve hücrenin yaşamını devam ettirmesi için enerji üretimine substrat sağlarlar (Galluzzi ve diğ., 2012). Memeli hücrelerinde üç farklı otofaji yanıtı tanımlanmıştır: makrotofaji, şaperon aracılı otofaji ve mikrotofaji (Mizushima ve diğ., 2008).

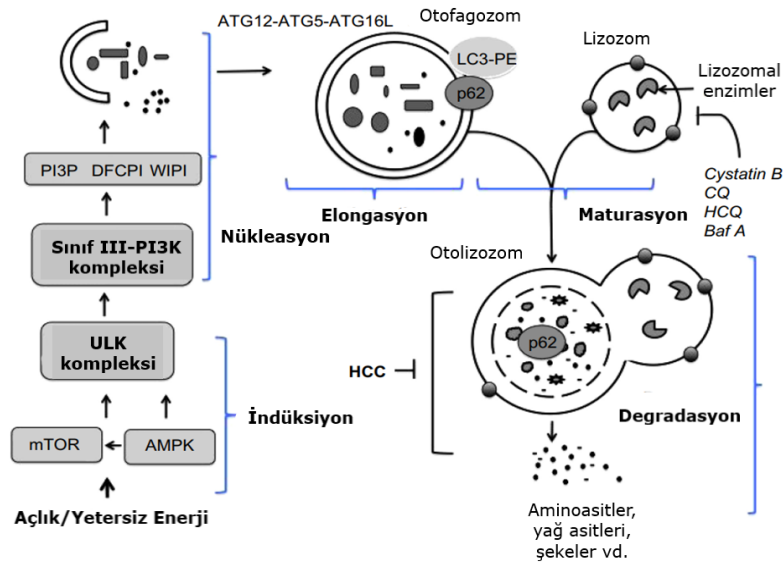
Makrotofajide, sitozolün bir kısmı otofagozom olarak adlandırılan, bir lizozom ile kaynaşan bir çift zar yapısı tarafından yutulur; otofagolizozom içeriği lizozomal enzimler (proteazlar, lipazlar, nükleazlar) tarafından 37 ATG proteini tarafından koordine edilen bir işlemde ayrıştırılır. Endoplazmik retikulum (ER), Golgi / trans-Golgi aparatı ve plazma zarı dahil olmak üzere birçok hücrel yapı otofagozom oluşumuna katılır. Şaperon aracılı otofaji, stres koşulları altında sitozolik proteinlerin bozulmasından sorumludur. Tüm şaperon aracılı otofaji substratları, bir sitozolik şaperon, örneğin HSC70 (Arias ve Cuervo, 2011) tarafından tanınan bir pentapeptid motifi (KFERQ) içerir, Lamp2a'ya bağlanır ve bu da katlanmamış protein substratının lizozomal membranlar arasına doğrudan translokasyonu ve sitozolik proteinlerin degradasyonu ile sonuçlanır. Mikrotofajide, sitozolik materyal lizozom tarafından doğrudan fagosite edilir. Son zamanlarda, mikrotofaji, parçaladığı yük temelinde mitofaji, peksofaji, retikülofaji ve ribofaji olarak yeniden adlandırılmıştır (Dash ve diğ., 2016) (Şekil 2.3).

A Makrotofaji**B Mikrotofaji****C Şaperon Aracılı Otofaji**

Şekil 2. 3: Otofaji Çeşitleri (Dash ve diğ., 2016).

Genel olarak otofaji, başlangıç (indüksiyon), çekirdeklenme (nükleasyon), uzama (elongasyon), olgunlaşma (maturasyon) ve bozulma (degradasyon) olarak bilinen beş farklı adımla koordine edilir. Amino asitler, lipidler ve şekerler gibi besin seviyelerinin yetersizliği mTOR1 düzeylerinin azalmasına sebep olurken bu azalma otofaji sinyalinin aktive eder. Bazal düzey otofaji sırasında, Unc-51 benzeri kinaz (ULK1 / 2), ATG13, FIP200 ve ATG101, mTOR1 ile aktif olmayan bir kompleks içinde bulunur. Başlatma sırasında, mTOR aktivitesindeki azalma, ULK kompleksinin (ULK1 – ATG13 – FIP200 – ATG101) fosforilasyonu ve sitoplazmadan ER'a translokasyonuna yol açar (Mizushima, 2010; Jewell ve diğ., 2013; Lamb ve diğ., 2013). ULK kompleksinin ER proteinleri ile etkileşimi başlamaya yol açar. İkinci adım olan çekirdeklenme, Beclin 1 – ATG14L – PI3KCIII– p150 – Ambra1 veya Beclin 1 – UVRAG – PI3KCIII–P150 – Bif1 'den biri ile sınıf III fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3KCIII) etkileşimleri ile ULK kompleksinde büyüme ile meydana gelir (Janku ve diğ., 2011). Ek ER proteinleri (DFCPI ve WIPI) kavisli bir çift zar yapısının çekirdeklenmesini ve oluşturulmasını kolaylaştırır. Beclin 1'in Rubicon veya antiapoptotik protein (BCL-2 olarak

adlandırılır) ile bir kompleks oluşturmada otofaji sürecinin inhibe edilebileceği gösterilmiştir (Matsunaga ve diğ., 2009). Uzama olarak adlandırılan üçüncü aşamaya öncelikle ubiquitin benzeri protein konjugasyon sistemleri aracılık eder. ATG12 – ATG5 kompleksi, otofagosomal membranda lokalize olan ATG12 – ATG5 – ATG16 (ATG16L) oluşturmak için ATG16 ile birleşir. ATG16L kompleksi daha sonra fosfatidiletanolamin (PE) ve membran yerleştirme yoluyla LC3 lipidini artırır. LC3 II (LC3-PE, fosfatidiletanolamin lipidine bağlı LC3 I), otofagosomun iç ve dış zarlarında lokalizedir. Uzama sırasında, otofagosom üzerinde LC3 proteini otofaji reseptör proteinleri (p62, NBR1 veya NIX) (Kirkin ve diğ., 2009; Puissant ve diğ., 2012) yoluyla yanlış katlanmış ve poliubikuitinlenmiş proteinler ile etkileşime girebilir. Otofaji yoluyla bozulan proteinler, lizozoma gönderilmek üzere hedef proteinleri modifiye eden ubiquitin benzeri protein LC3 ile etkileşime giren p62 ve NBR1 gibi otofaji reseptörleri tarafından tanınır. Dördüncü adım olan olgunlaşma otofagosomun tamamlanması ile ilgilidir. Otofagosom iki olgunlaşma aşamasından geçer. İlk olarak, otofagosom, bir amfizom oluşturmak için multiveziküler endozomlarla kaynaşır ve burada asitlenme için proton pompaları alınır. İkincisi, amfizomlar bir lizozomla kaynaşır ve otofagolizozom haline gelir. Son olarak, otofagolizozomun içinde bulunan hücre materyalleri, farklı lizozomal enzimlerin etkisiyle parçalanır (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4: Otofajinin Basamakları (D’Arcy, 2019).

Amino asitler, lipidler ve şekerler gibi bozunma ürünleri, örneğin yeni proteinlerin üretiminde yeniden kullanılmak üzere lizozomal akış taşıyıcıları yoluyla otolizozomdan salınır. Otofagolizozomdan besin maddelerinin salınması, otofaji sonlandırmasını ve yeni ortaya çıkan lizozomların oluşumunu tetikleyen mTOR'u yeniden etkinleştirir. Bu sürece otofajik lizozom reformasyonu denir. Yetersiz beslenme koşulları altında, döngü tekrarlanır. Bir amfizomun bir lizozom ile füzyonu, Lamp2a ve az miktarda GTPaz Rab gerektirir (Tanaka ve diğ., 2000; Jäger ve diğ., 2004). ATG proteinlerinin yeniden kazanılmasına ATG2, ATG9 ve ATG18 aracılık eder. ER, otofaji membran kaynağının başlatılması için çok önemlidir, ancak otofajinin başlatılması için Golgi aparatı, endozomlar, plazma zarı ve mitokondri de gereklidir. Artmış otofajik degradasyon, doku homeostazında önemli olabilecek hücre ölümüne yol açabilir. Düşük otofaji yanıtı ise kanser ve nörolojik hastalıkların gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Dash ve diğ., 2016).

Otofaji temel olarak besin kaynaklarının azalmasına yanıt olarak (Thumm ve diğ., 1994; Mizushima ve diğ., 1998) hücre adaptasyon için kullanılır ve genellikle koruyucu bir yanıt olarak kabul edilir. Bununla birlikte, bazı durumlarda hücre ölümüne de (Yuan ve Kroemer, 2010; Denton ve diğ., 2012) katılabilir ve bazen programlanmış hücre ölümünün (PHÖ) ayrı bir çeşidi olarak görülür. Otofajinin ilk adımlarından biri otofagozomların oluşumu (He ve Klionsky, 2009; Weidberg ve diğ., 2011) olduğundan, aktivitesi genellikle otofagozom birikimi temelinde değerlendirilir. Hücre içinde artmış otofajinin veya otofagozom oluşumundan sonraki bir basamakta otofajinin inhibisyonunun bir sonucu olarak otofagozom birikimi gözlenebilir (Klionsky ve diğ., 2012). Bu durum otofaji testlerinin yorumlanmasını zorlaştırmaktadır (Mizushima ve diğ., 2010).

Otofaji ve apoptoz genellikle aynı hücrede, çoğunlukla otofajinin apoptozdan önce geldiği bir sırayla meydana gelir (Maiuri ve diğ., 2007). Çünkü stres, özellikle stres seviyesi ölümcül değilse, otofajik bir yanıtı uyarır. Stres kritik bir süreyi veya yoğunluk eşiğini aştığında apoptotik ve apoptotik olmayan öldürücü programlar etkinleştirilir. Birçok durumda otofaji strese uyum sağlamak için meydana gelir (Kroemer ve diğ., 2010). Bununla birlikte, hücre apoptoza başlarsa, kısmen temel otofaji proteinlerinin kaspaz aracılı bölünmesi nedeniyle otofaji inaktive edilebilir. Özel durumlarda otofaji veya otofajik sürece dahil olan temel proteinler, hücrelerin vazgeçilmez kısımlarını katabolize ederek veya apoptotik veya nekrotik

programların aktivasyonunu kolaylaştırarak hücrel ölümü teşvik de edebilir (Galluzzi ve diğ., 2009).

Modülasyonlu otofaji, bazı kanser türleri için umut verici bir terapötik yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (Bhat ve diğ., 2018). Tümörün çeşidine ve gelişim evresine bağlı olarak otofajinin aktivasyonu veya inaktivasyonu tümörgeneze farklı katkıda bulunabilir. Azaltılmış otofaji, tümör ilerlemesine katkıda bulunabilirken, artan otofaji, hipoksik, metabolik veya terapötik stres koşulları altında tümör sağkalımı için bir mekanizma olabilir. Bu nedenle, otofaji sürecinin modülasyonu, antikanser tedavilerinin artırılması için umut verici fakat karmaşık bir terapötik stratejidir. Tümör modellerinde otofajinin daha iyi anlaşılması, kanser tedavisi için yeni ve etkili terapötik stratejilerin belirlenmesinde çok önemlidir (Marinković ve diğ., 2018).

2.4.1. Otofajinin Klinik Olarak Hedeflenmesi

Otofajinin çeşitli hastalıklarda rolü olduğu tespit edildiğinden beri otofaji aktivasyonu veya inhibisyonu yeni çalışmaların hedefi olmuştur. Buna rağmen hangi hastalıkların tedavisinde hangi ölçüde aktivasyonun veya inhibisyonun etkili olduğu henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Örneğin bazı kanser türlerinde radyoterapiye cevap olarak artmış otofaji aktivasyonunun tümör gelişimine katkıda bulunduğu belirlendikten sonra bu kanserlerde otofaji inhibisyonu fikri birçok araştırmaya konu olurken, bazı kanser tiplerinde tümör gelişiminde otofajinin önemli bir rolü olduğu düşünülmemektedir. Başka bir örnek nörodejeneratif hastalıkların bazılarında azalmış olan otofajinin artırılması için otofajiyi aktive eden ajanların kullanılmasıdır. Bu çalışmalar sırasında birçok otofajik yolağın aktivasyonu veya inhibisyonu hedeflenmiş ve bu ajanlardan bazıları denenmiştir. Örneğin, rapamisin (mTOR) kompleksinin memeli hedefi olan mTORC1 otofajiyi inhibe eder. Bu nedenle, mTOR inhibitörleri sıklıkla otofajiyi uyarmak için kullanılır (Arias ve diğ., 2015). Otofaji mTOR'dan bağımsız olarak da indüklenebilir. Örneğin, mTOR'dan bağımsız olarak çalışan doğal olarak oluşan disakkarit trehaloz (Sarkar ve diğ., 2007), glikoz taşıyıcılarını etkileyerek karaciğer hastalığına karşı koruma amacıyla otofajiyi indükler (DeBosch ve diğ., 2016). Başka bir örnek, mitokondride BCL-2 etkileşimlerini bloke ederek apoptozu indüklemek için tasarlanan Venetoclax gibi BH3 mimetikleri, otofajiyi indüklemek için Beclin-1 ve BCL-2 arasındaki etkileşimleri de bozar (Maiuri ve diğ., 2007). Bununla birlikte, bu mekanizma sorgulanmıştır ve BH3 mimetiklerinin sadece doğrudan hedeflerine ulaştıktan bir süre sonra meydana gelen dolaylı mekanizmalar yoluyla otofajiyi etkileyebileceği öne sürülmüştür (Reljic ve diğ., 2016). Otofajiyi modüle edebilen birçok ilaca

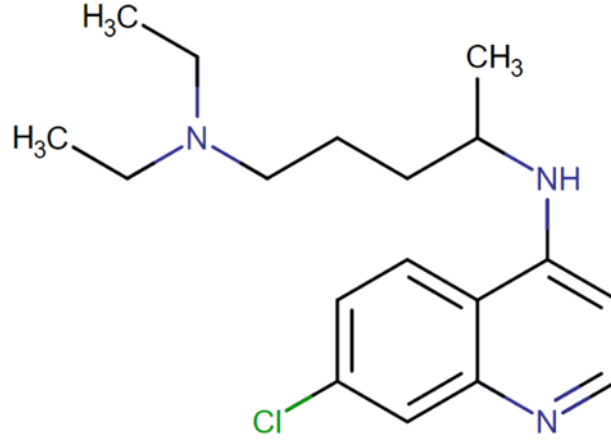
Kanser tedavisinde otofajiyi önlemeye çalışan birçok çalışma vardır. Mevcut klinik çalışmalarda CQ veya HCQ kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, lizozomu inhibe ederek otofajiyi bloke ederken, inhibitör aktivitesinin farmakodinamik belirteçleri olarak kullanılan otofagosomların

ve LC3'ün birikmesine neden olur. CQ ve HCQ, onlarca yıldır sıtma ve romatoid artriti tedavi etmek için kullanılan, ancak otofaji inhibitörleri olarak bazı uyarılara sahip olan ucuz ve FDA tarafından onaylanmış ilaçlardır. Otofajiyi inhibe ederek antitümör etkilere sahip olabilirler veya otofajiden bağımsız mekanizmalar ile bazı tümörleri kemoterapiye daha duyarlı hale getirebilirler (Maycotte ve diğ., 2012; Eng ve diğ., 2016).

Otofaji inhibisyonunun diğer antikanser ilaçlarını daha etkili hale getirebileceğine dair önemli kanıtlar olmasına rağmen, bu sadece otofajiye bağımlı olmaya başlayan tümör hücrelerinde uygulanabilir (Towers ve Thorburn, 2016). Otofajiye bağımlı olmayan kanser hücrelerinde aynı ilaç kombinasyonu sinerjistik olmaktan ziyade antagonistik olabileceği gibi (Levy ve diğ., 2014; Maycotte ve diğ., 2014); şu anda tüm kanser hücrelerinin otofajiye bağımlı olup olmayacağının tam olarak bilinmemesi kullanımını zorlaştırmaktadır (Thorburn ve diğ., 2014).

2.5. KLOROKİN

'Kına kına' kabuğunun faydalı özellikleri İnkalar tarafından keşfedilmiştir. Sıtma üzerindeki olası iyileştirici etkisinin ilk raporu ise 1600'lere dayanmaktadır (Wallace, 2001). 'Kına kına' kabuğunun tıbbi özelliklerine artan ilgi, İngilizlerin ve Hollandalıların bu ağaçların ekilmesi için yatırım yapmasına sebep olmuştur. Kinin kullanımı antimalaryal tedavinin temelini oluşturmuştur (Wallace, 1996). Hans Andersag 1934'te, kinakrinin akridin halkasını bir kinolin halkası ile değiştirmiş ve elde edilen bileşik daha sonra CQ olarak adlandırılmıştır (Krafts ve Hempelmann, 2012). Kinakrin ve CQ ile sıtma profilaksisinde askerlerde romatoid artrit ve deri döküntülerinde önemli bir iyileşme sağlandıktan sonra, II. Dünya Savaşı sırasında antimalaryal ilaçların “yeniden hedeflenmesi” ile farklı hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceği fikri ortaya atılmıştır (Ben-Zvi, 2012).



Şekil 2. 6: CQ'nun açık formülü.

CQ kapalı formülü $C_{18}H_{26}ClN_3$ olan kinolin halkasında bağlı bir amino grubu içerdiğinden aminokinolin olarak adlandırılan organik bir bileşiktir (DrugBank, 2016) (Şekil 2.6). Ağızdan alımını takiben hızla ve tamamen absorbe olur. Bir kısmı plazmadaki proteine bağlı olarak, bir kısmı karaciğerde sitokrom p450 enzimi tarafından metabolize edilir. Hepatik biyotransformasyon aracılığı ile N-dealkilasyon yolunda 2 metabolite sahiptir: desetilklorokin, bidesetilklorokin. İnsan karaciğer mikrozomlarında CQ'yu N-deasetilasyonu ile desetilklorokine çevirmekle sorumlu ana enzimler: CYP2C8 ve CYP3A4/5'tir (Kim ve diğ., 2003). Diğer aminokinolinler gibi CQ de böbrekler ve karaciğer tarafından uzaklaştırılır (Bernstein, 1991). Böbrek ve karaciğer disfonksiyonu sebebiyle atılımın azalması durumunda aşırı ilaç birikiminden kaynaklı retinopati gibi yan etkiler konusunda yüksek risk oluşturur (Mackenzie, 1983). Suda çözünür. Kan-beyin bariyerini geçebildiği için özellikle nörolojik hastalıklarda ilaç olarak kullanımı ilgi çekmektedir. Yarı ömrü yaklaşık 1-2 aydır. İdrarla, aynı zamanda kısmen feçesle de atılır. Özellikle uzun süreli kullanımında kandan daha çok beyin, kas, deri, kalp ve karaciğer de yüksek konsantrasyonlarda gözlenmesi dokuda birikmesinden kaynaklıdır (Mackenzie, 1983; Gustafsson ve diğ., 1987). Etkisi kandaki konsantrasyonundan daha çok dokuda birikimi ile korelasyon gösterir (Durcan ve diğ., 2015). Hamilelik sürecinde kullanımı genellikle güvenli kabul edilir (Ruiz-Irastorza ve diğ., 2010).

Aminokinolinler lizozomlarda ve diğer hücre içi asidik bölümlerde birikimleri ile bilinirler (Kaufmann ve Krise, 2007; Yoon ve diğ., 2010). Zayıf diprotik baz temellidirler ve ayrıca bu hücre içi kısımlarda pH'ı yükseltirler. Bu sebeple fagositoz ve T hücrelerine antijen sunumunu engellerler (Ziegler ve Unanue, 1982). Aynı zamanda bu ilaç T hücreleri üzerinde antiproliferatif etkilere sahiptir ve interferon γ (Van den Borne ve diğ., 1997), TNF- α (Van den

Borne ve diğ., 1997; Picot, 1991; Jang, 2006), IL1 (Picot, 1991; Jang, 2006), IL6 (Van den Borne ve diğ., 1997; Jang, 2006) ve IL2 (Landewe', 1995)'nin de içinde bulunduğu bazı pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltır. Bu sitokinlerin tamamı adaptif immün cevapta kritik rol oynarlar.

İlginç bir şekilde, CQ sadece antiparaziter değil, aynı zamanda antiviral (Borges ve diğ., 2013; Farias ve diğ., 2015), antibakteriyel (Kersh, 2013; Dey ve Bishayi, 2015) ve antifungal (Weber ve diğ., 2000) etkilere sahiptir.

Daha önce belirtildiği gibi, aminokinolinler lizozomların ve diğer hücre içi asidik bölmelerin alkalileşmesine yol açarlar. Bu mekanizmanın hücre içi patojenlerin büyümesini engellediği düşünülmektedir. Fakat bu lizozomal alkalizasyon proteinlerin transkripsiyon sonrası modifikasyonunu, enzimlerin salınmasını, reseptörlerin geri dönüşümünü, hücre sinyal yollarının aktivasyonunu ve hücre zarlarının onarımını da azaltabilir (Kaufmann ve Krise, 2007).

Ayrıca CQ'nun antitrombotik etkilere de sahiptir. Doza bağlı olarak trombosit agregasyonunu inhibe eder ve aktive trombositler yoluyla araşidonik asit salınımını azaltır (Cummins ve diğ., 1990; Jancinova' ve diğ., 1994).

CQ'nun diğer biyolojik etkilerinin yanı sıra antitümöral özellikleri olduğunun altı çizilmelidir (Plantone ve Koudriavtseva, 2018). CQ'nun sıtmayı önlemesinin yanı sıra Burkitt lenfomanın görülme sıklığını azalttığı gösterilmiştir (Geser ve diğ., 1989). CQ'nun antitümöral etkilerinin olası açıklaması güçlü antiproliferatif ve antimutajenik etkileri ile ilişkili olabilir. Bu etkiler CQ'yu birçok tümörün tedavisinde radyoterapi ve kemoterapi ile ilişkili olarak muhtemel bir seçenek yapar (Plantone ve Koudriavtseva, 2018).

CQ iyi tolere edilebilen bir ilaçtır ve hamilelik sırasında bile güvenli kabul edilir. Çoğunlukla tedavinin devam etmesini engellemeyen hafif yan etkileri olmakla beraber, bazı önemli yan etkileri tedavi tamamlanamadan önce ilacın kesilmesini gerektirebilir. Gastrointestinal ve kutanöz bulgular hafif yan etkilerine, retinal, nöromusküler ve kardiyak toksisiteler ise önemli yan etkilerine örnek verilebilir (Plantone ve Koudriavtseva, 2018).

CQ'nun yağ dokusunda yetersiz dağıldığına dikkat çekmek gerekir. Bu nedenle verilen doz hasta vücut ağırlığı dikkate alınarak hesaplanmalıdır. Bu yaklaşımın CQ'nun doz bağımlı toksisitesini azalttığı düşünülmektedir (Marmor ve diğ., 2011).

Ana gastrointestinal yan etkiler genellikle tedavinin başlamasından sonra görülür ve bulantı, kusma, mide ağrısı, ishal, iştahsızlık ve kilo kaybını içerir (DrugBank, 2016). Deri döküntüsü, kaşıntı ve saç dökülmesi ise derideki yan etkilerdir (DrugBank, 2016). Literatürde bildirilen diğer daha az kutanöz bulgular morbilliform döküntüler, eritrodermi, ekzfoliyatif dermatit, ürtiker, ekzematöz püskürmeler, ışığa duyarlılıktır (Khraishi ve Singh, 1996; Van Beek ve Piette, 2001; Kalia ve Dutz, 2007).

CQ en ciddi yan etkilerden biri olan geri dönüşümsüz toksik retinopatiye neden olabilir. Toksikite riski 5-7 yıl kullanımdan sonra %1'e doğru artar ve doza bağımlı gibi görünmektedir (Marmor ve diğ., 2011). CQ kullanan hastalar, retinopati gelişimini önlemek için periyodik bir taramaya ihtiyaç duyarlar. Tüm hastalara ilaca başlamadan önce göz muayenesi yapılır ve tedavinin beşinci yılından sonra yılda bir göz muayenesi yapılarak takip edilir. Ancak, hastanın başka risk faktörleri de varsa daha erken ve daha sık periyodik takip zorunludur (Marmor ve diğ., 2011, Michaelides ve diğ., 2011).

CQ kullanan hastalarda kardiyak toksisite nadirdir, ancak ortaya çıktığında yaşamı tehdit edebilir. Konjestif kalp yetmezliği, iletim bozuklukları ve kardiyomiyopati (hipertrofi ve sıklıkla kısıtlayıcı fizyoloji birlikte) bildirilmiştir (Tönnesmann ve diğ., 2013). İlacın askıya alınması bazen toksisiteyi düzeltmek için yetersizdir; bu nedenle, seçilmiş vakalarda kalp nakli en uygun seçenek olabilir (Naqvi ve diğ., 2005; Tönnesmann ve diğ., 2013).

2.6. PROLİFERASYON

Hücre döngüsü G1 (gelişim 1), S (sentez), G2 (gelişim 2) ve M (mitoz) olarak adlandırılan dört aşamadan meydana gelir (Cooper ve Hausman, 2003). Hücre G1 evresinde metabolizma açısından aktiftir ve hacimce büyür. S evresinde DNA eşlenir. G2 evresinde bölünme ile ilgili proteinler sentezlenir ve hücre giderek büyür. Döngünün tamamlandığı M evresinin sonunda hücre bölünerek iki hücre oluşturur. G0 evresinde ise metabolik aktivitelerin devam ettiği bölünmeyen hücrelerin durak noktasıdır (Terzioğlu ve diğ., 2013). Hücre bölünmesi sırasında çeşitli kontrol noktaları bulunur. S evresindeki DNA replikasyonundan önce G1 kontrol noktasında hücrenin bölünmesi için gerekli şartların oluşup oluşmadığı ve yeterli kaynağa sahip

olup olmadığı, G2 kontrol noktasında DNA replikasyonunun kontrolü gerçekleşir. M kontrol noktasında ise kromozomların iğ ipliklerine bağlanması kontrol edilir. Mitoz bölünme sürecinde siklin bağımlı kinaz (CDK)'lar ve onları aktive eden siklinler ve inhibe eden CDK inhibitörleri ile CDK etkileşimli protein/kinaz inhibitörü protein (CIP/KIP) ailesinden inhibitörler görev almaktadır (Dehay ve Kennedy, 2007).

Kanser hastalarında tümör çoğalma zamanı ve hızı proliferasyonu takip ederek belirlenebilir (Cho ve diğ., 1986). Kansere sebep olan mutasyonların bazıları hücre bölünmesini kontrol eden sinyal yollarından kaynaklıdır. Hücre döngüsünü baskılayan düzenleyici genlerin kaybı ve bölünmeyi artıran düzenleyici genlerin aktivasyonundaki aşırı artış, proliferasyon dengesinin bozularak kontrolsüz hücre çoğalmasına, sonuç olarak da kansere sebep olur (Longo, 2010).

Proliferasyon ölçüm testleri DNA sentez hızı, metabolik aktivite, proliferasyon işaretleyicileri ve ATP seviyelerinin ölçümüne dayalı testler olarak dört ana başlık altında sınıflandırılabilir (Marcussen ve Larsen, 1996; Rode, 2008). Yalnızca proliferen olan hücrelerde görülen bazı antijenler vardır. Bu antijenlerden biri olan PCNA hücre döngüsü sırasında en çok S fazında eksprese edilir (Muskhelishvili ve diğ., 2003).

PCNA proteini ilk olarak Miyachi ve diğ. (1978) tarafından sistemik lupus eritematozuslu hastalarda oto-antijen olarak ve bölünen hücrelerin çekirdeğinde görüldüğü için bu isim verilmiştir. PCNA sentezi bölünmeyen hücrelerde çok düşüktür ve proliferasyonun uyarılmasından sonra serumda artar (Almendral ve diğ., 1987), bu da ekspresyonunun transkripsiyonel seviyede düzenlendiğini gösterir. Bu proteinin değişken miktarları, normal çoğalan hücrelerde, ayrıca transforme edilmiş hücrelerde ve tümörlerde tespit edilmiştir. (Bravo ve Celis, 1980; Celis ve Celis, 1985). PCNA'nın ana işlevi DNA replikasyonundadır, ancak DNA eksizyon onarımı, hücre döngüsünün kontrolü ve RNA transkripsiyonunda da rol oynar (Juríková ve diğ., 2016).

Bugüne kadar, PCNA'nın en iyi karakterize edilmiş fonksiyonu, DNA'nın uzun zincirinin sentezlenmesi sırasında replikatif polimerazların bir DNA sliding clamp (sürgülü kelepçe) olarak verimliliğini arttırdığı DNA replikasyonundaki rolüdür. PCNA için gösterilen ilk işlevlerden biri, önde gelen ve geciken ipliklerin sentezini koordine etmedeki rolüdür (Prelich ve Stillman, 1988). PCNA yokluğunda, önde gelen ipin DNA sentezinin inhibe edildiği ve geri kalan ipliğin replikasyonunun anormal olduğu gösterilmiştir. Daha sonra Pol δ'in süreç faktörü

olarak rolü kabul edildi. Pol δ , kendi başına çok düşük bir işleme sahiptir, bu da çoğaltma faktörü C (RF-C) ve PCNA'nın varlığında dramatik bir şekilde artar (Downey ve diğ., 1990). DNA replikasyonunda ilk adım hem önde hem de geriden gelen zincirlerindeki DNA polimeraz α / primaz kompleksi tarafından kısa RNA primerlerinin sentezidir. Daha sonra, önde gelen iplik pol ϵ ile sentezlenir (Pursell ve diğ., 2007). Pol α / primaz kısa Okazaki fragmanları üreten geriden gelen kesintili/parçalı ipliğin sentezini devam ettirir. Ancak, Okazaki fragman sentezinin tamamlanması işlemsel pol δ (veya pol ϵ) holoenzimi gerektirir. Önde gelen ve geri kalan ipliğin replikasyonu için pol α 'den pol δ 'e veya pol ϵ 'a yer değiştirmesi gerekir (Burgers, 2009). Bu yer değişimi sadece PCNA varlığında replikasyon çatalında gerçekleşebilir. PCNA'nın DNA molekülü üzerine bağlanması ve serbestleşmesi, RF-C kelepçe(clamp) bağlayıcının aktivitesiyle ATP'ye bağlı olarak gerçekleşir. Başaltıcı RNA-DNA primerinin 3' ucuna PCNA'nın bağlanması DNA polimerazın tekrar bağlanmasını engeller ve düzelmek için kalıp zincirle ilişkili ve ilişkisiz olarak DNA polimeraz tarafından çok miktarda nükleotid ekleyen replikazlar için bir sinyal gibi davranır (Maga ve Hubscher, 2003).

2.7. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES

Serbest radikaller eşlenmemiş elektronu bulunan reaktif (reaksiyona girmeye istekli) bileşiklerdir. Sağlıklı bir hücrede gerçekleşen metabolik faaliyetler sonucunda oluşabilecekleri gibi hücresel strese sebep olan radyasyon ve çeşitli kimyasallara maruziyet gibi şartlara bir cevap olarak da üretilebilirler. Serbest radikal oluşumu endojen veya ekzojen kaynaklı olabilir. Endojen kaynaklara mitokondri, peroksizomlar, lipoksijenazlar, NOX, sitokrom p450 faaliyetleri, ekzojen kaynaklara ise ultraviyole ışınlar, iyonize radyasyon, çevresel toksinler örnek verilebilir (Aslankoç ve diğ., 2019). Serbest radikaller kovalent bağlı bir molekülün homolitik bölünmesi, molekülün elektron kaybına uğraması veya elektron eklenmesi olmak üzere üç temel yolla üretilebilirler (Kılınç ve Kılınç, 2002). O_2^- radikalleri, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($OH^\bullet$) iyi bilinen reaktif oksijen türleridir. Oksijenli solunum yapan hücrelerde oksijen (O_2) molekülünün bir elektron alması (indirgenmesi) veya indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucu oluşurlar (Valko ve diğ., 2005; Özcan ve diğ., 2015). O_2^- radikalleri çoğunlukla hücreye direkt olarak zarar vermek yerine geçiş metallerini indirger ve hidrojen peroksit oluşumuna kaynak oluşturur (Valko ve diğ., 2004). H_2O_2 bir serbest radikal olmamasına rağmen $OH^\bullet$ radikallerinin oluşumuna katıldığı için prooksidan özelliktedir ve bu sebeple ROT kapsamında değerlendirilir. H_2O_2 , Fe^{2+} gibi geçiş

metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu ile veya O_2^- radikali ile bulunduğunda Haber-Weiss reaksiyonu sonucu $OH^\bullet$ radikalini oluşturur (Moncada ve diğ., 1991; Jomova ve diğ., 2011). $OH^\bullet$ radikali kuvvetli reaktiftir ve bulundukları hücrede tiyoller ve yağ asitleri gibi moleküllerden proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına zemin hazırlarlar (Yin ve diğ., 2011; Ayala ve diğ., 2014).

Bu radikalleri tutan endojen veya eksojen kaynaklı antioksidanların varlığı hücreye/organizmaya zarar vermeden etkisiz hale getirilmeleri konusunda çok önemlidir. Sağlıklı hücrelerde serbest radikaller ile antioksidanlar arasında bir denge vardır. Olumsuz şartlarda serbest radikallerin miktarındaki aşırı artış oksidatif stres olarak tanımlanır. Serbest radikaller, hücre membranının lipit tabakasını bozma, nükleik asitlerin veya hücre içi proteinlerin moleküler yapısını değiştirme gibi yollarla hücrelere zarar verir (Özcan ve diğ., 2015).

2.7.1. Oksidatif Stresin Lipitlere Etkileri

Serbest radikallerin hücre membranındaki yağ asidi zincirlerinden hidrojen koparmaları sonucu bu zincir lipit radikali ($L^\bullet$) haline gelir. Sonrasında bu lipit radikalleri oksijenle reaksiyona girerek lipit peroksit radikallerinin ($LOO^\bullet$) oluşmasına neden olur. $LOO^\bullet$ diğer yağ asitlerinden de yeni lipit radikalleri oluştururken açığa çıkan hidrojenler lipit peroksit radikalleri ile reaksiyona girerek lipit peroksit ($LOOH$) oluştururlar. MDA gibi lipit peroksitlerin yıkımı ile ortaya çıkan reaktifler hücre içinde metabolize edilebilir veya hücrenin diğer kısımlarında da hasar oluşturabilirler (Young ve Woodside, 2001; Ayala ve diğ., 2014). Bu zincirleme reaksiyonlar ortama durdurucu bir antioksidan eklenene kadar devam eder. Lipit peroksidasyonu, membran akışkanlığında ve potansiyelinde bozulmaya yol açarak hücreye hasar verebilir veya hücre ölümüne sebep olabilir (Catalá, 2006).

2.7.2. Oksidatif Stresin Proteinlere Etkileri

Serbest radikaller hücre içindeki proteinleri oksidatif değişime uğratarak oksidatif hasara sebep olabilirler (Prokai ve diğ., 2007; Rao ve Møller, 2011). Prolin, lizin, arjinin ve treonin gibi amino asitleri içeren proteinlerin oksidasyonu sonucu yan zincirlerinde karbonil gruplar oluşur. Ayrıca sistein, lizin ve histidin kalıntılarının MDA gibi aldehitler, ketoaminler, ketoaldehitler, glikasyon, glikooksidasyon ile sekonder reaksiyonları sonucunda da karbonil gruplar oluşabilir (Dalle-Donne ve diğ., 2003). Proteinlerde meydana gelen bu oksidatif modifikasyonlar hücre

iskeleti yapısal proteinlerinde ve enzimlerde yapı ve fonksiyon değişimlerine neden olurlar (Prokai ve diğ., 2007; Rao ve Møller, 2011).

2.7.3. Oksidatif Stresin DNA üzerine Etkileri

OH• radikalleri DNA bazlarındaki çift bağlara hidrojen ekleyerek veya 2-deoksiribozun C-H bağlarından ve timin yapısındaki metil gruplarından hidrojeni kopararak DNA molekülü ile reaksiyona girerler. Sonuçta indirgenmiş timin peroksil radikallerinin (hidroksihidroperoksit, timin glikol gibi) oluşumuna neden olurlar (Breen ve Murphy, 1995). OH• radikalleri, guanin molekülünde 8. pozisyonunda etkileşerek oksidasyona yol açar. Bu oksidasyonun sonucunda DNA baz mutasyonları içerisinde en iyi bilinen 8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin) oluşur (Helbock ve diğ., 1999). Hücrelerde artan oksidatif stres, replikasyon ve transkripsiyona etki eder. Ayrıca DNA tamir mekanizmalarını da baskılar (Hu ve diğ., 1995).

2.8. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar oksidatif hasarın oluşmaması için serbest radikal oluşumunun önüne geçerek (oksijeni uzaklaştıma veya azaltma ve katalitik metal iyonlarını uzaklaştırma yoluyla), oluşan ROT'ları uzaklaştırarak veya zayıflatarak, hasara yol açan zincirleme reaksiyonları önleyerek veya hasarı onararak etkili olabilirler (Özcan ve diğ., 2015). Ekzojen veya endojen kaynaklı olabilirler. Ekzojen antioksidanlara karoten, A, E, C vitaminleri, APO ve bazı flavanoidler; endojen kaynaklı antioksidanlara ise albümin, transferrin, bilirubin, melatonin, KAT, glutatyon peroksidaz (GPx), SOD örnek olarak verilebilir. Bu antioksidanların bazıları enzimatik bazıları enzimatik olmayan şekilde etkilidirler (Gutteridge, 1995).

2.8.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.8.1.1 Katalaz (KAT)

KAT her bir alt birimi bir hem grubu ve NADPH molekülü içeren dört alt birimden oluşur (Young ve Woodside, 2001). Katalaz büyük miktarlarda peroksizomlarda bulunurken daha küçük miktarlarda mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur. Mitokondride oluşan O_2^- radikallerinin SOD ve GPx ile ortadan kaldırılmasına rağmen büyük miktarda H_2O_2 sitoplazmaya geçer (Radi ve diğ., 1991). H_2O_2 bir radikal değildir ve hücre içi moleküllerin çoğu ile direkt tepkimeye girmez. Fakat ortamda Fe ve Cu olduğunda Fenton reaksiyonu ile OH•

radikalinin oluşumunun öncülü olabilir (Cheung ve diğ., 2001). Peroksizomlarda sentezlenen KAT, H_2O_2 'yi yüksek konsantrasyonlarda suya ve oksijene parçalayarak antioksidan etki gösterir (Limon-Pacheco ve Gonsebatt, 2009).

2.8.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

GPx sitoplazmada bulunan selenyum içeren dört alt birimden oluşur (Sen ve Chakraborty, 2011). GPx, GSH'ı elektron kaynağı olarak kullanır. Bu enzimin selenyuma bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere iki temel çeşidi vardır. Selenyuma bağımlı GP_x, H_2O_2 'e ve organik hiperoksitlere etki eder. Selenyuma bağımlı olmayan GP_x ise organik hidroperoksitlere etki eder (Halliwell, 1999; Cnubben ve diğ., 2001). GSH her iki tepkime çeşidinde de hidrojen verici olduğundan bu indirgenme reaksiyonlarının sonucunda okside olur (Reiter ve diğ., 1995). Okside glutasyon (GSSG) glutasyon redüktaz enzimi vasıtasıyla GSH'a geri indirgenir. Bu reaksiyonda elektron vericisi olarak NADPH kullanılır (Sen ve Chakraborty, 2011). NADPH bu reaksiyondaki rolü sebebiyle serbest radikal hasarını engellemek için gereklidir (Özkan ve Fışkın, 2004; Sen ve diğ., 2010). GPx seviyelerinin düşmesi antioksidan sistemin bozulmasına neden olarak artan oksidatif hasarla birlikte kalıcı hasarların oluşmasına sebep olur (Chabory ve diğ., 2009).

2.8.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD enzimi O_2^- radikallerinden birini O_2 'ye yükseltirken, diğerini daha düşük reaktiviteye sahip H_2O_2 'ye indirgeyerek antioksidan etki gösterir (Aslankoç ve diğ., 2019). SOD enziminin seviyesinde azalma serbest radikal oluşumunu artırır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Sitozolde Cu/Zn SOD (bakır ve çinko içeren), mitokondride Mn SOD (mangan içeren) ve hücreler arası sıvılarda ve hücre yüzeyinde EC SOD (ekstrasellüler) olmak üzere 3 çeşidi vardır (Sen ve Chakraborty, 2011). Cu/Zn SOD ve Mn SOD aynı reaksiyonu katalizler (Halliwell ve Gutteridge, 1999). EC SOD hücreler arası alanda $O_2^{\cdot-}$ 'leri etkisiz hale getiren tek enzimatik antioksidandır (Gao ve diğ., 2008).

2.8.2.Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.8.2.1 Glutasyon (GSH)

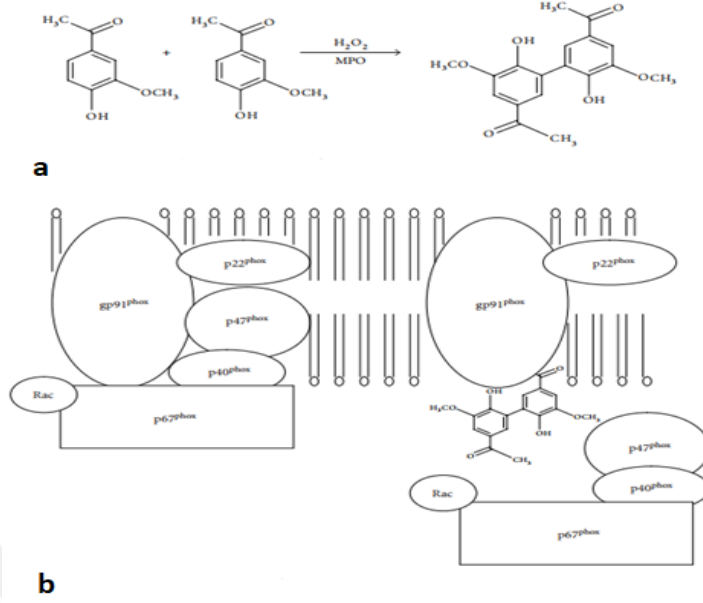
GSH hemen hemen tüm ökaryotlarda çoğunlukla sitoplazmada az miktarda nukleus, peroksizomlar, mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur (Green ve diğ., 2006). GP_x varlığında lipid peroksitleri ve H₂O₂'yi zehirsizleştirir. Ayrıca singlet oksijen ve OH• radikalini tutar (Sen ve Chakraborty, 2011). Antioksidan etkilerinin yanı sıra hücrenin redoks durumunu korumada, plazma membranından amino asit geçişlerinin düzenlenmesinde, vitamin E ve C gibi önemli antioksidanların yenilenmesinde, hücre sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde etkilidir (Townsend ve diğ., 2003; Sen ve Chakraborty, 2011).

2.8.2.2 Aposinin (APO)

Apocynum cannabinum (Kanada keneviri) bitkisinin köklerinden izole edilen, asetovanilon olarak da adlandırılan APO (4-hidroksi-3-metoksiasetofenon) ilk kez 1883 yılında Schmiedeberg tarafından tanımlanmıştır. Molekül ağırlığı 166,17 olan bir asetofenondur. Erime noktası 115°C olup hafif vanilya kokusuna sahiptir. Suyun üzerinde iğneler şeklinde kristalleşir (Hougee ve diğ., 2006; Luchtefeld ve diğ., 2008). APO yüksek oral biyoyararlanım, düşük toksisite gibi özelliklere sahip olması nedeniyle potansiyel bir tedavi seçeneği olarak görülmektedir (Yu ve diğ., 2008).

APO, NOX aktivitesini inhibe eden bir antioksidandır. Ayrıca antiapoptotik ve antienflamatuar etkileri vardır (Li ve Wang, 2015). APO, NOX'un membran kompleksi ile sitosolik birimlerinin birleşmesini engelleyen bir NOX inhibitörüdür (Sharma ve diğ., 2016).

NOX, moleküler oksijenin O₂⁻ radikallerine indirgenmesini kataliz eden bir enzimdir. Aktifleştiğinde hücre içi ve dışında ürettiği reaktif oksijen radikalleri inflamasyonun başlatılmasında ve devam ettirilmesinde rol oynar (Dang ve diğ., 2016). NOX'un yapısı oldukça komplekstir: iki membrana bağlı element (gp91phox ve p22phox), üç sitozolik bileşen (p67phox, p47phox, p40phox) ve bir düşük moleküler ağırlıklı G proteini (hem rac2 hem rac1) içerir (Hougee ve diğ., 2006) (Şekil 2.5).



Şekil 2. 7: a: APO aktivasyonu, dimer oluşumu. **b:** APO'nun NOX İnhibisyonu (Stefanska ve Pawliczak, 2008).

APO fagositik ve non-fagositik hücreleri de içeren birçok deneysel modelde NOX kompleksinin etkili bir inhibitörü olarak kullanılmıştır (Lafeber ve diğ., 1999; Zhang ve diğ., 2005). Bu inhibisyonu mekanizması tamamen bilinmemekle birlikte NOX kompleksinin p47phox sitozolik bileşeninin membran translokasyonunun bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Peters ve diğ., 2001; Barbieri ve diğ., 2004). Aktif APO'nun oluşması için APO dimerizasyonu gereklidir ve bu oluşum MPO'yu içeriyor gibi görünmektedir (Simons ve diğ., 1990). Yapılan bir çalışmada APO'nun MPO'dan yoksun hücrelerde NOX'u inhibe etmediği (Stolk ve diğ., 1994) ve başka bir çalışmada MPO salımını destekleyen ajanların APO etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (Van den Worm ve diğ., 2001). APO'nun, daha sonra NOX tiyollerini oksitleyen bir APO radikali oluşturmak üzere H₂O₂ ve MPO tarafından aktive edildiği varsayılmaktadır. Tiyoller p47phox un fonksiyonu için kritik öneme sahiptir ve tiyol oksitleyici ajanların NOX aktivasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir (Clark ve diğ., 1990; Johnson ve diğ., 2002). Bu konseptte uygun olarak, GSH veya sistein olarak sağlanan tiyol takviyesinin, APO'nun NOX üzerindeki inhibitör etkisini önlediği gözlenmiştir (Ximenes ve diğ., 2007).

APO'nun in vitro antiinflamatuvar etkilerine, nötrofil aracılı hücre hasarının azaltılması (Simons ve diğ., 1990), monositik hücre hattının adhezyonunda azalma (Hougee ve diğ., 2006), peroksinitritin inhibisyonu (Muijsers ve diğ., 2000), inflamasyon aracılı kıkırdak yıkımının

inhibisyonu (Lafeber ve diğ., 1999) örnek verilebilir. *İn vivo* olarak APO kinetiği hakkında çok fazla şey bilinmemekle birlikte, Daly ve diğ. (1960) tarafından yapılan bir çalışmada, sıçanlara APO verilmesinden 20 saat sonra %80'inin değişime uğramadan idrara katıldığı gösterilmiştir. APO'nun yan etkileri tam olarak bilinmemektedir. APO'nun farelere yapılan oral uygulamalarda çok düşük toksisiteye (LD50: 9 g / kg) sahip olduğu bildirilmiştir (Gajewska ve Grzybowski, 1981). APO'nun sitokrom P450 (Smit ve diğ., 2000) ve tromboksan sentazını (Engels ve diğ., 1992) inhibe ettiği gösterilmiştir.

Heumüller ve diğ.'nin (2008) yaptıkları bir çalışmada, APO'nun baskın bir antioksidan olduğu, fakat kültürdeki fagositik olmayan hücrelerde NOX inhibitörü olarak işlev görmediği ortaya konmuştur. Endotel hücrelerinde aşırı eksprese edildiğinde NOX1, NOX2 veya NOX4'ün O⁻ radikali üretimini engelleyemediği gözlenmiştir. Ayrıca vasküler hücrelerde, lökositlerde görüldüğü gibi benzer bir APO aktivasyonu gözlenmemiştir (Akard ve diğ., 1988; Chan ve diğ., 2007).

APO'nun bazı koşullar altında oksidatif stresi artırabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Alveolar epitel hücrelerinde APO tedavisine yanıt olarak GSH ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. APO ile tedavi edilen glial hücreler, oksitlenmiş glutatyondaki artışlar dahil olmak üzere oksidatif stres belirteçlerinde doza bağlı bir artış göstermiştir (Riganti ve diğ., 2006). APO'nun, hücre dışı deneysel bir sistemde oksidan bir etki göstererek reaktif oksijen türlerinin oluşumunu sağladığı bildirilmiştir. Bu, APO'nun kendiliğinden oksidatif stresi indükleyebileceğini, farklı hücre tiplerinde sitotoksik bir etki gösterebileceğini ve deneysel modellerde APO'nun bazı etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* dikkatle yorumlanması gerektiğini göstermektedir (Meyer ve Schmitt, 2000; Ximenes ve diğ., 2007). NOX maksimum düzeyde aktive edildiğinde, APO'nun oksidatif stresi baskıladığı düşünülebilir, ancak NOX'un uyarılmaması durumunda, APO'nun oksidatif etkisi baskın olabilir. APO, oksidatif stresin ardından hem pentoz fosfat yolunu hem de trikarboksilik asit döngüsünün aktivasyonunu indükler, çünkü ortamdaki GSH'nin APO ile varlığı, her iki metabolik yolun aktivasyonunu engeller (Dang ve diğ., 2016).

APO'nun NOX'u inhibe etme özelliğinin yanı sıra başka etkiler de gösterebileceği bildirilmiştir: örneğin, endotelial hücrelerde sitokrom P450 aktivitesini inhibe eder (Pietersma ve diğ., 1998), aktin polimerizasyonunu ve sitoskeletal yeniden düzenlenmeyi engeller (Müller

ve diğ., 1999) ve henüz açıklığa kavuşturulamamış bir mekanizma ile araşidonik asit metabolizmasını düzenler (Engels ve diğ., 1992; Riganti ve diğ., 2006). |



3. MALZEME VE YÖNTEM

İş Planı: Çalışmamıza “Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu” nun 20.09.2018 tarih ve 231 sayılı kararı ile etik kurul onayı verilmiş ve çalışma süresince Etik Kurul ilkelerine bağlı kalınmıştır. Çalışmamızda 2,5-3 aylık 56 adet *Wistar albino* cinsi erkek sıçan kullanılmıştır. Bu hayvanlar İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü’nden temin edilmiştir. Tüm deney süreci “Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi”nde tamamlanmıştır. Deney öncesinde sıçanlar, yeni ortam koşullarına alışabilmeleri için 1 hafta boyunca karantinede tutulmuşlardır. Sıçanlar hem alıştirma periyodu hem de deney süresince kontrollü laboratuvar şartlarında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyodu, 22 ± 2 °C sabit sıcaklık, %50-60 nem oranının olduğu laboratuvar ortamında şehir suyu ve standart pellet yem ile beslenmişlerdir. Deney süreci başlamadan önce bütün sıçanların ağırlıkları tartılmıştır.

Deney gruplarındaki hayvan sayıları güç analizi yapılarak ve elde edilen verilerin istatistiksel çalışmalarda kullanılabileceği en az denek sayısı göz önünde bulundurularak her bir grupta 7 birey olacak şekilde belirlenmiştir.

Deney Grupları:

- | | |
|----------------------|-------------------------|
| 1. Kontrol (K) Grubu | 5. RAD + CQ Grubu |
| 2. RAD Grubu | 6. RAD + APO Grubu |
| 3. CQ Grubu | 7. RAD + CQ + APO Grubu |
| 4. APO Grubu | 8. CQ + APO Grubu |

Farmakolojik Ajanların Hazırlanması ve Uygulanması:

CQ (Chloroquine Diphosphate Salt, C6628-25G) ve APO (Apocynin-CAS 498-02-2-Calbiochem, 178385-1GM), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)’dan temin edilmiştir. CQ %0,9 FTS (fizyolojik tuzlu su, %0,09) ile çözülmüştür. APO ise %2’lik etanolde çözüldükten sonra %0,9 FTS ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Rastgele seçilen hayvanlar sekiz gruba ayrılmıştır. Birinci grubu oluşturan K grubu sıçanlara ve ikinci grubu oluşturan radyasyon uygulanacak sıçanlara sadece FTS, üçüncü ve beşinci grup sıçanlara 50 mg/kg CQ, dördüncü ve altıncı gruba gruba 20 mg/kg APO, yedinci ve sekizinci gruba 50 mg/kg CQ ve 20 mg/kg APO, enjekte edilmiştir. Tüm enjeksiyonlar i.p. yolla ve 5 gün boyunca 24 saatte bir olmak üzere beş kez yapılmıştır. Son enjeksiyondan bir saat sonra ikinci, beşinci, altıncı ve yedinci gruplara İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kan Işınlama Merkezi'nde bulunan, aktivitesi 3,77 Gy/dk olan IBL-437 C (Sezyum-137) radyasyon kaynağında 8 Gray (Gy) (2,12 dakika) tüm vücut radyasyon ışınlaması yapılmıştır. Enjeksiyonlardan önce sıçanlar tartılarak, vücut ağırlıkları saptanmış ve her bir kimyasal madde, vücut ağırlığına göre vücut ağırlığı başına 1 ml/kg olacak şekilde hesaplanarak verilmiştir.

Deneyin Sonlandırılması / Diseksiyon:

Deney sonlandırılmadan bir gün önce, sıçanların oral beslenmesi kesilmiş ve sadece su içmelerine izin verilmiştir. 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı) ve 10 mg/kg Xylazine HCl (Alfazyne®, Hollanda) kas içine enjekte edilerek anestezi işlemi gerçekleştirilmiştir. Deney sıçanlar disekte edilerek sonlandırılmış ve ince bağırsak dokuları histokimyasal yöntemler için Bouin fiksatifine, immünohistokimyasal yöntemler için nötral formalin fiksatifine, biyokimyasal yöntemler için fosfatla tamponlanmış tuz (PBS) çözeltisine alınmıştır.

3.1. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER

Histolojik incelemeler için alınan ince bağırsak dokuları 22 saat boyunca Bouin fikstatifinde bekletilmiştir. Fikse edilen dokular fikstatifin giderilmesi için bir hafta boyunca günde üç defa %70 etil alkolden geçirilmiştir. Bir hafta sonunda dokular dehidrasyonu (%70, %80, %90, %96, %100'lük yükselen etil alkol serisi) takiben saydamlaştırma işlemi için ksilolde bekletilerek parafine gömülmüştür. 5 mikrometre (µm) kalınlığında alınan doku kesitleri, Hematoksilen & Eozin (HE), Masson'un üçlü boyası prosedürleri ve Periyodik Asit Schiff (PAS) reaksiyonu uygulanarak, histolojik hasarın mikroskopta incelenmesi için uygun hale getirilmiştir. Olympus CX 41 model ışık mikroskobu ile incelenen ve Olympus DP71 model kamera ile fotoğrafları çekilen preparatların yarı-kantitatif histopatolojik hasar dereceleri literatür doğrultusunda yapılmıştır.

İnce bağırsak dokusundaki histolojik hasar derecelendirmeleri Howarth ve diğ.'nin 1996'da yaptıkları bir çalışmada belirledikleri kriterlerde bazı değişimler yaparak saptanmıştır. Epitel hücrelerinde hiperplazi, epitel hücrelerinde vakuolizasyon, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısında artış, villusların lamina propriasında ödem, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, villuslarda kısalma ve genişleme, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, mukozada inflamatuvar (mononuklear) hücre infiltrasyonu, mukozada hiperemi, mukozada nekrotik alan, piknotik nükleus sayısında artış gibi ışık mikroskobu kriterleri göz önüne alınarak her bir bireye ait jejunum kesitleri değerlendirilmiştir. Her bir histolojik kriter 0 (hasarsız), 1 (az hasar), 2 (orta hasar), 3 (şiddetli hasar) veya 4 (çok şiddetli hasar) şeklinde derecelendirilmiştir.

3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER

Nötral formalin ile fikse edilip parafine gömülen ince bağırsak dokularından 4 µm kalınlığında alınan kesitler Poli-L-lizin kaplı lamlara yapıştırılmıştır. Bu kesitlerde, hücre proliferasyonunun derecesi PCNA (PC10) (Santa Cruz Biotechnology, SC-56) primer antikoru ve otofaji inhibisyonunun derecesi p62 (Nükleopporin p62/Sequestosome 1 (SQSTM1)) (Santa Cruz Biotechnology, SC-48402) primer antikoru kullanılarak 'streptavidin-biotin peroksidaz' yöntemi (Javois, 1999) ile immünohistokimyasal olarak belirlenmiştir.

3.2.1. PCNA İmmünohistokimyası

Kesitler deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponu (pH 6) ile mikrodalga fırında 700 Watt'ta 15 dakika inkübe edilmiştir. Oda ısısında 20 dakika tamponun içinde soğutulan kesitler, 3 kez 5'er dakika fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, pH 7.4) ile yıkanmıştır. Ardından membran permeabilizasyonu için distile su ile hazırlanan %0,3'lük Triton X-100 ile 10 dakika inkübe edilmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesini kaldırmak için kesitler 15 dakika %3'lük H₂O₂ çözeltisinde bekletilmiştir. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkamanın ardından UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU) (Thermo Scientific, TP-125-HL) kullanılarak kitin önerdiği şekilde işlemlere devam edilmiştir. PBS ve %3'lük Triton X-100 ile 1:50 oranında sulandırılarak hazırlanan PCNA primer antikoru ile kesitler + 4 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulanmıştır. İnkübasyonun ardından PBS tamponu ile 3 kez 5'er dakika yıkama işlemi yapılmıştır. Takiben 30 dakika biyotinlenmiş

sekonder antikor uygulanmış ve tekrar 3 kez 5'er dakika PBS tamponu ile yıkama yapılmıştır. Ardından 15 dakika streptavidin peroksidaz uygulanmıştır. Son yıkama işleminden sonra yaklaşık 20 dakika kromojen olarak AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) (Thermo Scientific, TA-125-HA) ile inkübe edilen kesitlerde renk oluşumu gözlemlendiğinde distile suya alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Zıt boyama amacıyla kesitlere Mayer Hematoksilen solüsyonu (Bio Optica, CAT No: 05-06002/L) 30 saniye uygulanmıştır. Kesitler kalıcı preparat haline getirilirken su bazlı kapatıcı Vision Mount (Thermo Scientific TA-125-UG) kullanılmıştır. Preparatlar inceleninceye kadar +4 °C'de saklanmıştır. PCNA boyanma şiddeti değerlendirilirken rastgele seçilen 500 hücrede PCNA pozitif reaksiyon veren hücreler sayılmıştır. PCNA pozitif hücre indeksi (%) aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{PCNA pozitif hücre indeksi (\%)} = \frac{\text{PCNA pozitif reaksiyon veren hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

3.2.2. p62 İmmünohistokimyası

Kesitler ksilol ile deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra distile suya alınarak, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponu (pH 6) ile mikrodalga fırında 700 Watt'ta 15 dakika inkübe edilmiştir. Oda ısısında 20 dakika tamponun içinde soğutulan kesitler, 3 kez 5'er dakika PBS tamponu ile yıkanmıştır. Ardından membran permeabilizasyonu için distile su ile hazırlanan %0,3'lük Triton X-100 ile 10 dakika inkübe edilmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesini kaldırmak için kesitler 15 dakika %3'lük H₂O₂ çözeltisinde bekletilmiştir. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkamanın ardından UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU) (Thermo Scientific, TP-125-HL) kullanılarak kitin önerdiği şekilde işlemlere devam edilmiştir. PBS ve %3'lük Triton X-100 ile 1:50 oranında sulandırılarak hazırlanan p62 primer antikoru ile kesitler + 4 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulanmıştır. İnkübasyonun ardından PBS tamponu ile 3 kez 5'er dakika yıkama işlemi yapılmıştır. Takiben 30 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor uygulanmış ve tekrar 3 kez 5'er dakika PBS tamponu ile yıkama yapılmıştır. Ardından 15 dakika streptavidin peroksidaz uygulanmıştır. Son yıkama işleminden sonra yaklaşık 20 dakika kromojen olarak AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) (Thermo Scientific, TA-125-HA) ile inkübe edilen kesitlerde renk oluşumu gözlemlendiğinde distile suya alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Zıt boyama amacıyla kesitlere Mayer Hematoksilen solüsyonu 30 saniye uygulanmıştır. Kesitler kalıcı preparat haline getirilirken su bazlı kapatıcı kullanılmıştır.

Kesitler inceleninceye kadar +4 °C’de saklanmıştır. p62 boyanma şiddeti değerlendirilirken rastgele seçilen 500 hücrede p62 ile boyanan (p62 pozitif) hücreler sayılmıştır. p62 pozitif hücre indeksi (%) aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{p62 pozitif hücre indeksi (\%)} = \frac{\text{p62 pozitif reaksiyon veren hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

3.3 BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Biyokimyasal incelemeler dokular -86°C’de muhafaza edilmiştir. Dokuların analizlerine başlamadan önce kademeli olarak çözümleri sağlanmıştır. 20 ml PBS içinde 1 gr doku olacak şekilde homojenize edilen dokular 5000 x g’de +4 °C’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Toplanan süpernatantlar metotlar uygulanana kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

İnce bağırsak dokusunda LC3 II, LAMP 2, Kaspaz-3, BCL-2, MDA, MPO, NOX ve TNF- α seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Yöntem, örnekte miktarı bilinmeyen bir enzim veya protein seviyelerinin antijen antikor özgüllüğünden faydalanılarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır. LPO, KAT, GSH, SOD, TAK ve total protein seviyeleri ise rutin biyokimyasal metotlar kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

3.3.1. LC3 II (MAP1LC3B) Seviyelerinin Belirlenmesi

Dokuda LC3 II (MAP1LC3B) seviyelerinin belirlenmesi Rat LC3 II (MAP1LC3B) Sandwich Elisa Kiti (Bioassay Technology Laboratory, E1821Ra) kullanılarak yapılmıştır.

Solüsyonların Hazırlanması: Konsantrasyonu 96 ng/ml olan 120 μ l standart solüsyonuna 120 μ l standart sulandırma tamponu eklenerek 48 ng/ml konsantrasyonda stok standart solüsyonu hazırlanmıştır. Seri olarak seyreltilmiş solüsyonlar hazırlanmadan önce karıştırılarak 15 dakika bekletilmiştir. Standart stok solüsyonları standart sulandırma tamponu ile 1:2 oranında seyreltilerek 24-12-6-3 ng/ml konsantrasyonlarında standartlar elde edilmiştir. Yıkama tamponu stok tamponun distile su içinde 1:30 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda ısısına getirilmiş ve bekletilmeden deneyde kullanılmıştır.

Deney Prosedürü: Kullanılan kite ait mikropleytin standart kuyucukları sıçan MAP1LC3B antijenine karşı üretilen biyotinlenmiş antikor ile kaplıdır. Bu sebeple standart kuyucuklarına

50 µl standart eklenirken, örnek kuyucuklarına 40 µl örnek ve 10 µl anti- MAP1LC3B antikoru eklenmiştir. Sonra kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin HRP eklenmiş ve mikropleyitin kapağı kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Ardından bütün kuyucuklar yıkama tamponuyla 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara önce 50 µl substrat A solüsyonu sonra 50 µl substrat B solüsyonu eklenmiştir. Takiben karanlık ortamda 37 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu koyulmuştur. Maviden sarıya renk değişimi gözlemlendikten sonra (en fazla 10 dakika) Elisa cihazında 450 nm dalga boyunda ölçümler yapılmış ve standart grafik oluşturulmuştur.

3.3.2. LAMP 2 (Lizozom İlişkili Membran Proteini 2) Seviyelerinin Belirlenmesi

Dokuda LAMP2 seviyelerinin belirlenmesi Rat LAMP2 Sandwich Elisa Kiti (Bioassay Technology Laboratory, E1820Ra) kullanılarak yapılmıştır.

Solüsyonların Hazırlanması: Konsantrasyonu 1280 ng/ml olan 120 µl standart solüsyonuna 120 µl standart sulandırma tamponu eklenerek 640 ng/ml konsantrasyonda stok standart solüsyonu hazırlanmıştır. Seri olarak seyreltilmiş solüsyonlar hazırlanmadan önce karıştırılarak 15 dakika bekletilmiştir. Standart stok solüsyonları standart sulandırma tamponu ile 1:2 oranında seyreltilerek 320-160-80-40 ng/ml konsantrasyonlarında standartlar elde edilmiştir. Yıkama tamponu stok tamponun distile su içinde 1:30 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda ısısına getirilmiş ve bekletilmeden deneyde kullanılmıştır.

Deney Prosedürü: Kullanılan kite ait mikropleyitin standart kuyucukları sıçan LAMP-2 antijenine karşı üretilen biyotinlenmiş antikor ile kaplıdır. Bu sebeple standart kuyucuklarına 50 µl standart eklenirken, örnek kuyucuklarına 40 µl örnek ve 10 µl anti-LAMP-2 antikoru eklenmiştir. Sonra kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin HRP eklenmiş ve mikropleyitin kapağı kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Ardından bütün kuyucuklar yıkama tamponuyla 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara önce 50 µl substrat A solüsyonu sonra 50 µl substrat B solüsyonu eklenmiştir. Takiben karanlık ortamda 37 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu koyulmuştur. Maviden sarıya renk değişimi gözlemlendikten sonra (en fazla 10 dakika) Elisa cihazında 450 nm dalga boyunda ölçümler yapılmış ve standart grafik oluşturulmuştur.

3.3.3. Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi

Dokuda kaspaz-3 seviyelerinin belirlenmesi Rat kaspaz-3 Sandwich Elisa Kiti (Bioassay Technology Laboratory, E1648Ra) kullanılarak yapılmıştır.

Solüsyonların Hazırlanması: Konsantrasyonu 12,8 ng/ml olan 120 µl standart solüsyonuna 120 µl standart sulandırma tamponu eklenerek 6,4 ng/ml konsantrasyonda stok standart solüsyonu hazırlanmıştır. Seri olarak seyreltilmiş solüsyonlar hazırlanmadan önce karıştırılarak 15 dakika bekletilmiştir. Standart stok solüsyonları standart sulandırma tamponu ile 1:2 oranında seyreltilerek 3,2-1,6-0,8-0,4 ng/ml konsantrasyonlarında standartlar elde edilmiştir. Yıkama tamponu stok tamponun distile su içinde 1:30 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda ısısına getirilmiş ve bekletilmeden deneyde kullanılmıştır.

Deney Prosedürü: Kullanılan kite ait mikroleptin standart kuyucukları sıçan kaspaz-3 antijenine karşı üretilen biyotinlenmiş antikor ile kaplıdır. Bu sebeple standart kuyucuklarına 50 µl standart eklenirken, örnek kuyucuklarına 40 µl örnek ve 10 µl anti-kaspaz-3 antikoru eklenmiştir. Sonra kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin HRP eklenmiş ve mikroleptin kapağı kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Ardından bütün kuyucuklar yıkama tamponuyla 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara önce 50 µl substrat A solüsyonu sonra 50 µl substrat B solüsyonu eklenmiştir. Takiben karanlık ortamda 37 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu koyulmuştur. Maviden sarıya renk değişimi gözlemlendikten sonra (en fazla 10 dakika) Elisa cihazında 450 nm dalga boyunda ölçümler yapılmış ve standart grafik oluşturulmuştur.

3.3.4. BCL-2 Seviyelerinin Belirlenmesi

Dokuda BCL-2 seviyelerinin belirlenmesi Rat BCL-2 Sandwich Elisa Kiti (Bioassay Technology Laboratory, E0037Ra) kullanılarak yapılmıştır.

Solüsyonların Hazırlanması: Konsantrasyonu 12,8 ng/ml olan 120 µl standart solüsyonuna 120 µl standart sulandırma tamponu eklenerek 6,4 ng/ml konsantrasyonda stok standart solüsyonu hazırlanmıştır. Seri olarak seyreltilmiş solüsyonlar hazırlanmadan önce karıştırılarak 15 dakika bekletilmiştir. Standart stok solüsyonları standart sulandırma tamponu ile 1:2 oranında seyreltilerek 3,2-1,6-0,8-0,4 ng/ml konsantrasyonlarında standartlar elde edilmiştir.

Yıkama tamponu stok tamponun distile su içinde 1:30 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda ısısına getirilmiş ve bekletilmeden deneyde kullanılmıştır.

Deney Prosedürü: Kullanılan kite ait mikropleytin standart kuyucukları sıçan BCL-2 antijenine karşı üretilen biyotinlenmiş antikor ile kaplıdır. Bu sebeple standart kuyucuklarına 50 µl standart eklenirken, örnek kuyucuklarına 40 µl örnek ve 10 µl anti-BCL-2 antikor eklenmiştir. Sonra kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin HRP eklenmiştir. Takiben mikropleytin kapağı kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Ardından bütün kuyucuklar yıkama tamponuyla 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara önce 50 µl substrat A solüsyonu sonra 50 µl substrat B solüsyonu eklenmiştir. Takiben karanlık ortamda 37 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu koyulmuştur. Maviden sarıya renk değişimi gözlemlendikten sonra (en fazla 10 dakika) Elisa cihazında 450 nm dalga boyunda ölçümler yapılmış ve standart grafik oluşturulmuştur.

3.3.5. MPO Seviyelerinin Belirlenmesi

Dokuda MPO seviyelerinin belirlenmesi Rat MPO Sandwich Elisa Kiti (Bioassay Technology Laboratory, E0574Ra) kullanılarak yapılmıştır.

Solüsyonların Hazırlanması: Konsantrasyonu 128 ng/ml olan 120 µl standart solüsyonuna 120 µl standart sulandırma tamponu eklenerek 64 ng/ml konsantrasyonda stok standart solüsyonu hazırlandı. Seri olarak seyreltilmiş solüsyonlar hazırlanmadan önce karıştırılarak 15 dakika bekletilmiştir. Standart stok solüsyonları standart sulandırma tamponu ile 1:2 oranında seyreltilerek 32-16-8-4 ng/ml konsantrasyonlarında standartlar elde edilmiştir. Yıkama tamponu stok tamponun distile su içinde 1:30 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda ısısına getirilmiş ve bekletilmeden deneyde kullanılmıştır.

Deney Prosedürü: Kullanılan kite ait mikropleytin standart kuyucukları sıçan MPO antijenine karşı üretilen biyotinlenmiş antikor ile kaplıdır. Bu sebeple standart kuyucuklarına 50 µl standart eklenirken, örnek kuyucuklarına 40 µl örnek ve 10 µl anti-MPO antikor eklenmiştir. Sonra kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin HRP eklenmişve mikropleytin kapağı kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Ardından bütün kuyucuklar yıkama tamponuyla 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara önce 50 µl substrat A solüsyonu sonra 50 µl substrat B solüsyonu eklenmiştir. Takiben karanlık ortamda 37 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübe

edilmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu koyulmuştur. Maviden sarıya renk değişimi gözlendikten sonra (en fazla 10 dakika) Elisa cihazında 450 nm dalga boyunda ölçümler yapılmış ve standart grafik oluşturulmuştur.

3.3.6. NOX Seviyelerinin Belirlenmesi

Dokuda NOX seviyelerinin belirlenmesi Rat NOX Sandwich Elisa Kiti (Bioassay Technology Laboratory, E1408Ra) kullanılarak yapılmıştır.

Solüsyonların Hazırlanması: Konsantrasyonu 72 ng/ml olan 120 µl standart solüsyonuna 120 µl standart sulandırma tamponu eklenerek 36 ng/ml konsantrasyonda stok standart solüsyonu hazırlanmıştır. Seri olarak seyreltimiş solüsyonlar hazırlanmadan önce karıştırılarak 15 dakika bekletilmiştir. Standart stok solüsyonları standart sulandırma tamponu ile 1:2 oranında seyreltilerek 18-9-4,5-2,25 ng/ml konsantrasyonlarında standartlar elde edilmiştir. Yıkama tamponu stok tamponun distile su içinde 1:30 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda ısısına getirilmiş ve bekletilmeden deneyde kullanılmıştır.

Deney Prosedürü: Kullanılan kite ait mikropleyitin standart kuyucukları sıçan NOX antijenine karşı üretilen biyotinlenmiş antikör ile kaplıdır. Bu sebeple standart kuyucuklarına 50 µl standart eklenirken, örnek kuyucuklarına 40 µl örnek ve 10 µl anti-NOX antikoru eklenmiştir. Sonra kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin HRP eklenmiştir. Mikropleyitin kapağı kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Ardından bütün kuyucuklar yıkama tamponuyla 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara önce 50 µl substrat A solüsyonu sonra 50 µl substrat B solüsyonu eklenmiştir. Takiben karanlık ortamda 37 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu koyulmuştur. Maviden sarıya renk değişimi gözlendikten sonra (en fazla 10 dakika) Elisa cihazında 450 nm dalga boyunda ölçümler yapılmış ve standart grafik oluşturulmuştur.

3.3.7. MDA Seviyelerinin Belirlenmesi

Dokuda MDA seviyelerinin belirlenmesi Rat MDA Sandwich Elisa Kiti (Bioassay Technology Laboratory, E0156Ra) kullanılarak yapılmıştır.

Solüsyonların Hazırlanması: Konsantrasyonu 12,8 nmol/ml olan 120 µl standart solüsyonuna 120 µl standart sulandırma tamponu eklenerek 6,4 nmol/ml konsantrasyonda stok standart

solüsyonu hazırlanmıştır. Seri olarak seyreltilmiş solüsyonlar hazırlanmadan önce karıştırılarak 15 dakika bekletilmiştir. Standart stok solüsyonları standart sulandırma tamponu ile 1:2 oranında seyreltilerek 3,2-1,6-0,8-0,4 nmol/ml konsantrasyonlarında standartlar elde edilmiştir. Yıkama tamponu stok tamponun distile su içinde 1:30 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda ısısına getirilmiş ve bekletilmeden deneyde kullanılmıştır.

Deney Prosedürü: Kullanılan kite ait mikroleptin standart kuyucukları sıçan MDA antijenine karşı üretilen biyotinlenmiş antikor ile kaplıdır. Bu sebeple standart kuyucuklarına 50 µl standart eklenirken, örnek kuyucuklarına 40 µl örnek ve 10 µl anti-MDA antikoru eklenmiştir. Sonra kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin HRP eklenmiş ve mikroleptin kapağı kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Ardından bütün kuyucuklar yıkama tamponuyla 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara önce 50 µl substrat A solüsyonu sonra 50 µl substrat B solüsyonu eklenmiştir. Takiben karanlık ortamda 37 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu koyulmuştur. Maviden sarıya renk değişimi gözlemlendikten sonra (en fazla 10 dakika) Elisa cihazında 450 nm dalga boyunda ölçümler yapılmış ve standart grafik oluşturulmuştur.

3.3.8. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Seviyelerinin Belirlenmesi

İnce bağırsak dokusunda LPO miktarı Ledwozyw metoduna göre spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir (Ledwozyw ve diğ., 1986). LPO ürünleri olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembe kırmızı rengin absorbansı spektrofotometrede 532 nm’de okunmuştur.

Deney İçin Hazırlanan Çözeltiler

Triklorasetik Asit Çözeltisi (1,22 M): 250 ml 0,6 M HCl içinde 49,83 g triklorasetik asit (TCA) çözülerek hazırlanmıştır.

NaOH (1 M): 100 ml distile suda, 4 g NaOH çözülerek hazırlanmıştır.

Tiyobarbitürik Asit Çözeltisi (0,047 M): 6 ml 1 M NaOH ve 69 ml distile suyun içinde 500 mg tiyobarbitürik asit (TBA) çözülerek hazırlanmıştır.

Standart Çözeltisi (4,4 nmol/mL 1,1,3,3-tetra etoksi propan): 100 ml distile suyun içinde 0,1 ml 1,1,3,3-tetra etoksi propan çözülerek hazırlanmıştır.

Deneyin Yapılışı: Numune tüpü için 0,5 ml doku homojenizatı ve üzerine 2,5 ml 1.22 M TCA eklenerek 15 dakika boyunca oda sıcaklığında beklenmiştir. Kör tüpü için 0,5 ml distile su ve 2,5 ml 1,22 M TCA çözeltisi, standart tüpü için 0,5 ml standart çözeltisi ve 2,5 ml 1,22 M TCA çözeltisi alınmıştır. Kör, numune ve standart tüplerinin hepsine 0,75 ml TBA çözeltisi eklenmiştir. Tüpler, 30 dakika kaynar suda bekletilmiştir. Ardından tüpler soğutularak, bütün tüplere 2'şer ml n-butanol ilave edilip vortekslenmiştir. Tüm tüpler, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Butanol fazı alınarak, numune ve standart tüplerinin absorbansları, kör tüpüne karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.3.9. Total Antioksidan Kapasite (TAK) Seviyelerinin Belirlenmesi

İnce bağırsak dokusunda TAK; Erel (2004) metoduna göre spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Dokulardaki antioksidanlar konsantrasyonlarıyla doğru orantılı olarak, lacivert yeşil renkli ABTS (2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asid) diamonyum tuzu) radikalini renksiz ABTS formuna indirger. 660 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değişikliği dokunun total antioksidan düzeyi ile ilişkilidir.

3.3.10. Glutatyon (GSH) Seviyelerinin Belirlenmesi

İnce bağırsak dokusunda GSH miktar tayini için Ellman metodu (Beutler, 1975) kullanılmıştır. Metotta Ellman ayırıcı olarak görev yapan DTNB (5,5'-dinitro-bis-(2-nitro) benzoik asit) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucunda oluşan sarı rengin absorbansı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur (Beutler, 1975).

Deney İçin Hazırlanan Çözeltiler:

Çöktürme Çözeltisi: 100 ml metal iyonları içermeyen distile suyun içinde 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA Na₂ ve 30 g NaCl çözülerek hazırlanmıştır.

Sodyum Sitrat Çözeltisi (%1): 100 ml distile suda, 1 g sodyum sitrat çözülerek hazırlanmıştır.

Belirtme Reaktifi (Ellman Ayırıcı) (%40 mg DTNB): 100 ml %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde 40 mg 5'-5'-ditiyo-bis-2-nitro benzoik asid (DTNB) çözülerek hazırlanmıştır.

Sekonder sodyum Fosfat Çözeltisi (0.3 M): 100 ml distile suyun içinde, 4,26 g Na_2HPO_4 çözülerek hazırlanmıştır.

Glutasyon Standart Çözeltisi: 100 ml distile suyun içinde 100 mg GSH çözülerek hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 2-4-6-8-10 mg GSH/100 ml olacak şekilde glutasyon standartları hazırlanmıştır. Standartardan elde edilen veriler ile glutasyon standart eğrisi çizilmiştir.

Deneyin Yapılışı: 0,5 ml homojenat ile 0,75 ml çöktürme çözeltisi vortekslelendikten sonra, 3000 rpm'de 5 dk santrifüje edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar toplanmıştır. Kör tüpü için 0,5 ml distile suyun içine 2 ml 0,3 M Na_2HPO_4 çözeltisi ve 0,25 ml belirtme reaktifi eklenerek karıştırıldıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Numune tüpü için 0,5 ml süpernatant, 2 ml 0,3 M Na_2HPO_4 çözeltisi ve 0,25 ml belirtme reaktifi karıştırıldıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Standart tüpü için ise, 0,5 ml standart çözelti alınarak, 2 ml 0,3 M Na_2HPO_4 çözeltisi ve 0,25 ml belirtme reaktifi ilave edilip karıştırıldıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Örnekler 412 nm dalga boyunda kör tüpüne karşı okunmuştur.

3.3.11. Katalaz (KAT) Aktivitelerinin Belirlenmesi

İnce bağırsak dokusunda katalaz (KAT) aktivitesi için Aebi metodu (Aebi, 1984) kullanılmıştır. Yöntemde H_2O_2 'nin katalaz enzimi vasıtasıyla H_2O 'ya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur.

Deney İçin Hazırlanan Çözeltiler:

Serum Fizyolojik (% 0,9 NaCl): 1 L'ye distile su içinde 9 g NaCl distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Sodyum-Potasyum Fosfat Tamponu (50 mM; pH 7.0): 100 ml distile suyun içinde 0,7098 g Na_2HPO_4 çözülmüştür. Ayrıca 100 ml distile suyun içinde 0,6804 g KH_2PO_4 çözülmüştür. pH 7.0'lik tampon 6 hacim Na_2HPO_4 ve 4 hacim KH_2PO_4 'ün karıştırılmasıyla elde edilmiştir.

H_2O_2 (30 mM): 100 ml pH 7.0 50 mM olan sodyum-potasyum fosfat tamponu, 258 μl 1.13 g/ml yoğunluğa sahip % 35'lik H_2O_2 ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Deneyin Yapılışı: Kör tüpü, 0,5 ml %0.9 NaCl üzerine 2 ml 30 mM H₂O₂ çözeltisi eklenmesi ile hazırlanmıştır. Numune tüpü ise 0,5 ml doku süpernatantına 30 mM H₂O₂ çözeltisi ilave edilmesi ile hazırlanmıştır. Tüplerin absorbansı 0. ve 1. dakikalarda 240 nm’de okunmuştur.

3.3.12. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitelerinin Belirlenmesi

İnce bağırsak dokusunda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesinde Mylroie ve diğ. tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır (Mylroie ve diğ., 1986). Bu yöntemde riboflavinin floresans ışığın etkisi ile oluşturduğu O₂⁻ radikali, ortamdaki SOD’un etkisi ile H₂O₂’ye dönüşür. Oluşan H₂O₂ ile o-dianisidinin reaksiyona girmesi ile meydana gelen renkli ürünün absorbansı 460 nm’de spektrofotometrede ölçülmüştür.

Deney İçin Hazırlanan Çözeltiler:

Sodyum-Potasyum Fosfat Tamponu (50 mM) (pH 7.8): 100 ml distile suyun içinde 0,708 g Na₂HPO₄ çözülerek hazırlanmıştır. Ayrıca 100 ml distile suyun içinde 0,680 g KH₂PO₄ çözülerek hazırlanmıştır. pH 7.8’lik tampon 9 hacim Na₂HPO₄ ve 1 hacim KH₂PO₄ karıştırılarak hazırlanmıştır.

Etilendiamintetraasetik Asid (EDTA) (0.1 mM): pH’ı 7.8 olan 50 mM sodyum-potasyum fosfat tamponunda 0,0037 g EDTA çözülerek hazırlanmıştır.

Sodyum-Potasyum Fosfat Tamponu (10 mM) (pH 7.8): 100 ml distile suyun içinde 0,142 g Na₂HPO₄ çözülerek hazırlanmıştır. Ayrıca 100 ml distile suyun içinde 0,136 g KH₂PO₄ çözülerek hazırlanmıştır. pH 7.8’lik tampon 9 hacim Na₂HPO₄ ve 1 hacim KH₂PO₄ karıştırılarak hazırlanmıştır.

Riboflavin Çözeltisi (0.2 mM): 10 mM pH 7.8 sodyum-potasyum fosfat tamponunda içinde 7,3 mg riboflavin çözülerek hazırlanmıştır.

o-Dianisidin Hidroklorür Çözeltisi: 10 ml distile suyun içinde 19 mg o-dianisidin çözülerek hazırlanmıştır.

SOD (120 IU /ml) Stok Standardı: Liyofilize SOD standardı 120 IU /ml olacak şekilde soğuk distile su ile çözülmüştür. Bu stok standartdan uygun hacimler alınarak deney ortamında 2-4-6-8-10 ünite SOD standartları hazırlanmıştır. Standartardan elde edilen veriler ile SOD standart eğrisi çizilmiştir.

Deneyin Yapılışı: Kör tüpü için 2,7 ml sodyum-potasyum fosfat çözeltisine, 0,1 ml o-dianisidin ve 0,2 ml riboflavin çözeltisi ilave edilmiştir. Numune tüpü için 2,6 ml sodyum-potasyum fosfat çözeltisine, 0,1 ml homojenat, 0,1 ml o-dianisidin ve 0,2 ml riboflavin çözeltisi eklenmiştir. Standart tüpü için 2,6 ml sodyum-potasyum fosfat çözeltisine, 0,1 ml standart çözeltisi, 0,1 mş o-dianisidin ve 0,2 ml riboflavin çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler vortekste karıştırılarak, 460 nm’de tüplerin ilk absorbans değerleri okunmuştur. Ardından tüm tüpler floresans ışıkta 8 dakika bekletildikten sonra 460 nm’de ikinci absorbans değerleri okunmuştur. Standart grafiği yardımıyla yapılan seyreltmelerde göz önüne alınarak SOD aktivitesi (U/g protein) cinsinden hesaplanmıştır.

3.3.13. Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) Seviyelerinin Belirlenmesi

Dokuda TNF- α seviyeleri TNF alpha Rat ELISA Kiti (Invitrogen TM, BMS622) kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem, örnekte miktarı bilinmeyen bir enzimin veya proteinin seviyelerinin antijen antikor özgüllüğünden faydalanılarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır.

Solüsyonların Hazırlanması: Konsantrasyonu 1280 ng/L olan 120 µl standart solüsyonuna 120 µl standart sulandırma tamponu eklenerek stok standart solüsyonu hazırlanmıştır. Seri olarak seyreltilmiş solüsyonlar hazırlanmadan önce karıştırılarak 15 dakika bekletilmiştir. Standart stok solüsyonlarını standart sulandırma tamponu ile 1:2 oranında seyreltilerek 320-160-80-40 ng/L konsantrasyonlarında standartlar elde edilmiştir. Yıkama tamponu stok tamponun distile su içinde 1:30 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda ısısına getirildi ve bekletilmeden deneyde kullanılmıştır.

Deney Prosedürü: Kullanılan kite ait mikropleytin standart kuyucukları sıçan TNF- α antijenine karşı üretilen biyotinlenmiş antikor ile kaplıdır. Bu sebeple standart kuyucuklarına 50 µl standart eklenirken, örnek kuyucuklarına 40 µl örnek ve 10 µl anti- TNF- α antikor eklenmiştir. Sonra kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin HRP eklenmiştir. Takiben mikropleytin kapağı kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Ardından bütün kuyucuklar yıkama tamponuyla 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara önce 50 µl substrat A solüsyonu sonra 50 µl substrat B solüsyonu eklenmiştir. Takiben karanlık ortamda 37 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu koyulmuştur. Maviden sarıya renk değişimi gözlemlendikten sonra (en fazla 10 dakika) Elisa cihazında 450 nm dalga boyunda ölçümler yapılmış ve standart grafik oluşturulmuştur.

3.3.14. Total Protein Tayini

Total protein tayini standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılarak Lowry yöntemine göre yapılmıştır (Lowry ve diğ., 1951). Proteinlerin yapısındaki aromatik halka içeren amino asitler, alkali ortamda ve bakır varlığında folin reaktifinde bulunan fosfomolibdotungustik asiti indirgeyerek mavi renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda ölçülen absorbans, doku homojenatının içeriğindeki protein konsantrasyonunu belirler.

Deney İçin Hazırlanan Çözeltiler:

A Reaktifi: 0,1 N NaOH içinde %2'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözülerek hazırlanmıştır.

B Reaktifi: % 1 potasyum tartarat içinde % 0,5 bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), çözülerek hazırlanmıştır.

C Reaktifi (Alkali bakır sülfat çözeltisi): 50 ml A reaktifi ile 1 ml B reaktifi karıştırılarak hazırlanmıştır.

E Reaktifi: Merck, HC807325 marka Folin reaktifi kullanılmıştır.

Standart Çözelti: % 100'lük sığır serum albumin (BSA)'den (Sigma, A7906), % 0,9 FTS ile stok çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerden seyreltmeler yapılarak % 5-10-15-20'lik standart çözeltileri hazırlanmıştır.

Doku Süpernatantı: % 0,9 FTS'nin 100 kat seyreltilmesiyle elde edilmiştir.

Deneyin Yapılışı: E reaktifi haricinde hazırlanan tüm çözeltiler vortekslenip, oda ısısında 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra bütün tüplere 0,25 ml E reaktifi konularak karıştırılmıştır. Bu şekilde oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda absorbanlar köre karşı okunmuştur. Standart çözeltilerin çalışılması sonucu her bir çalışma standardı için elde edilen yaklaşık 30 değerin aritmetik ortalamasının hesaplanmasıyla elde edilen grafik yardımı ile total protein tayini yapılmıştır. Grafikten elde edilen denklemden yararlanılarak % mg protein miktarı bulunmuştur. Bulunan değer seyreltme katsayısı (100) ile çarpılmıştır.

3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

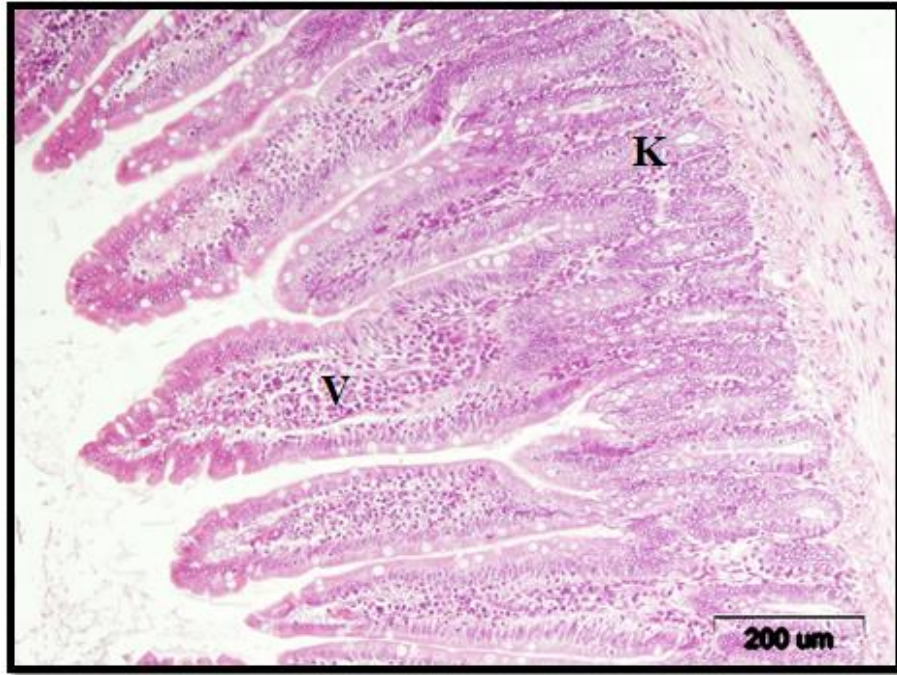
Çalışmalarımız sonucunda elde edilen veriler, SPSS (Statistical package for the social sciences, 22. 0) istatistik programı ile değerlendirilmiştir. Tüm parametreler için varyansların homojenliği testi uygulanmıştır. Non-parametrik veriler için Kruskal-Wallis testi uygulanarak tüm gruplar arasında anlamlılık olup olmadığı belirlenmiştir. Ardından ikili gruplar arasındaki anlamlı farklılıkların tayini için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Parametrik veriler için tek yönlü ANOVA testi ile uygulanarak tüm gruplar arasında anlamlılık olup olmadığı belirlenmiştir. Ardından, ikili gruplar arasındaki anlamlı farklılıkların tayini için bağımsız student-t testi kullanılmıştır. Rutin biyokimyasal yöntemlerden elde edilen sonuçların analizi için GraphPad Prism 6.0 programı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar One-Way ANOVA yönteminin ardından Tukey post hoc testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar 'ortalama $\pm$ standart sapma' olarak verilmiş ve $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,005$, $p<0,001$ ve $p<0,0001$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. |

4. BULGULAR

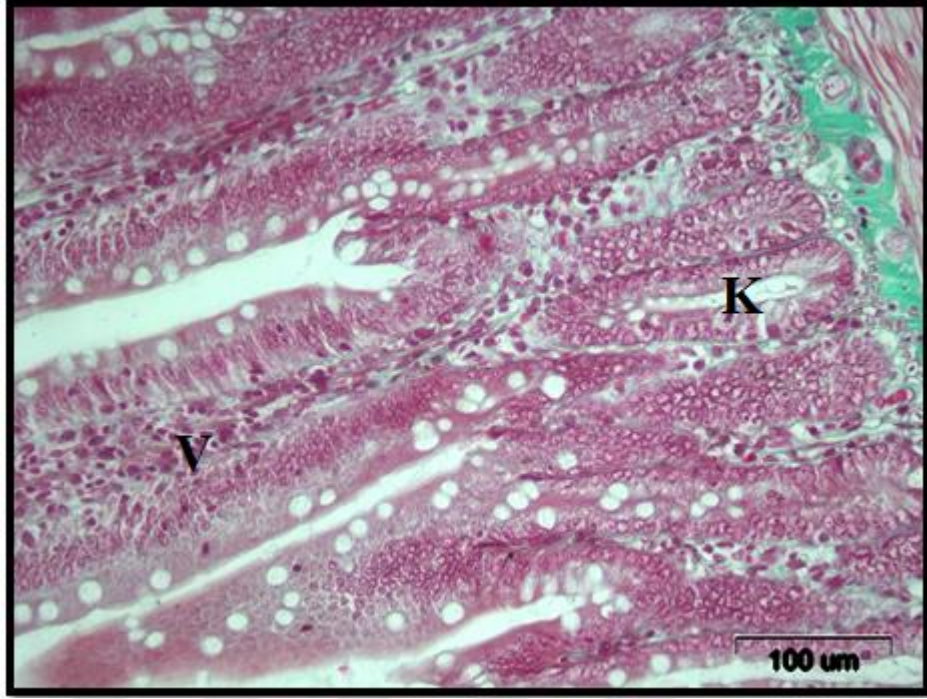
4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR

4.1.1. Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

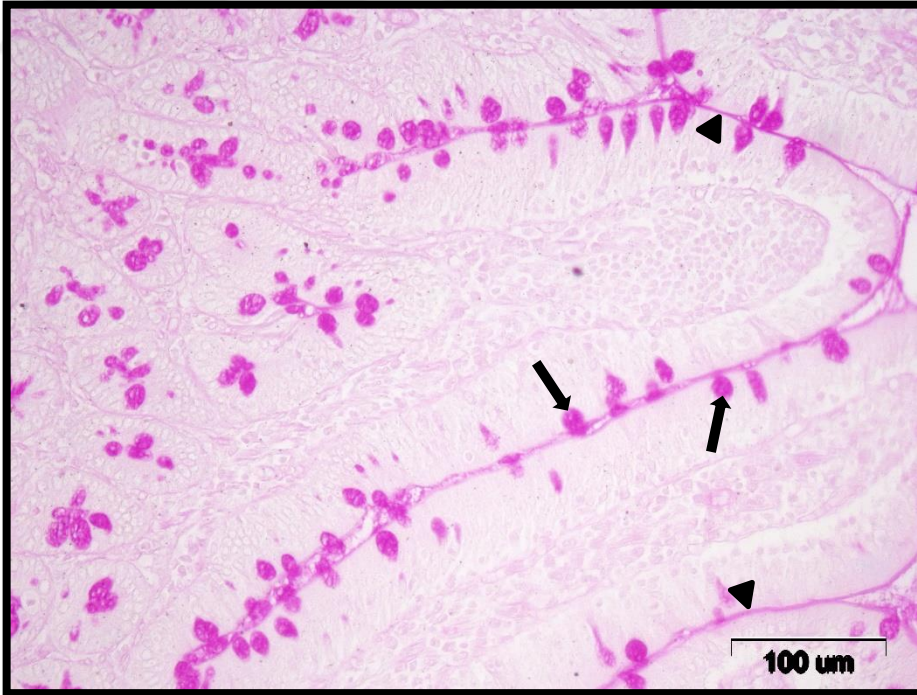
Kontrol grubuna ait kesitlerde ince bağırsak dokusunun normal histolojik görünümü hakimdi. Villus epiteli ve villuslar arasında yer alan Lieberkühn bezlerinin epiteli tek katlı silindirik epiteldir. Bu epitel mukus içeren ve salgılayan goblet hücrelerinden ve apikal yüzeylerinde çizgili kenarı içeren absorptif hücrelerden oluşmuştur (Şekil 4.1, 4.2). Goblet hücrelerin içeriğindeki mukus ve absorptif hücrelerin çizgili kenarları şiddetli PAS pozitif reaksiyon vermektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 1: K grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, HE, Bar: 200 μm.



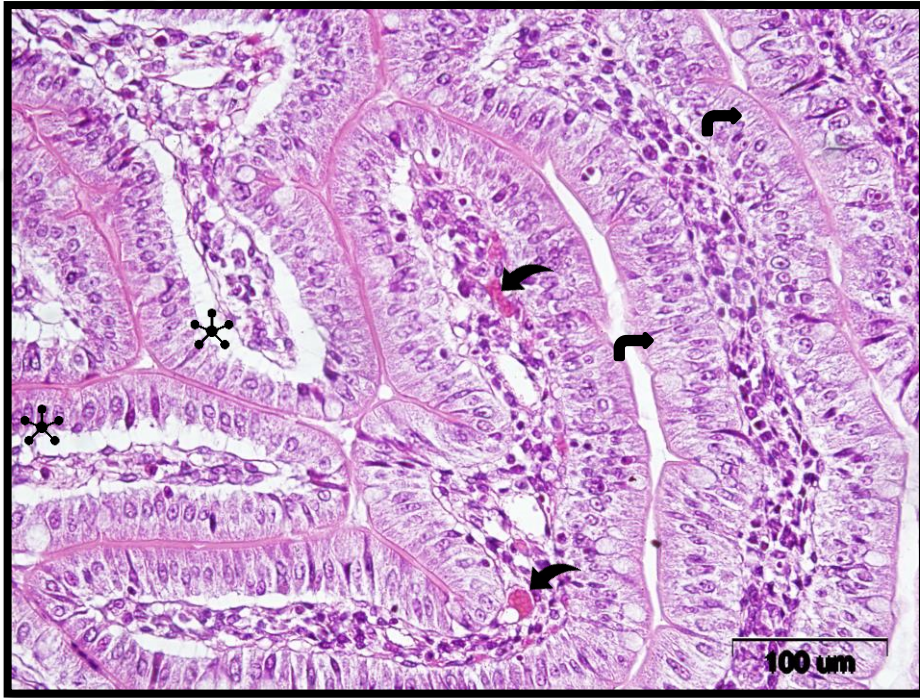
Şekil 4. 2: K grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kript, Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 μm.



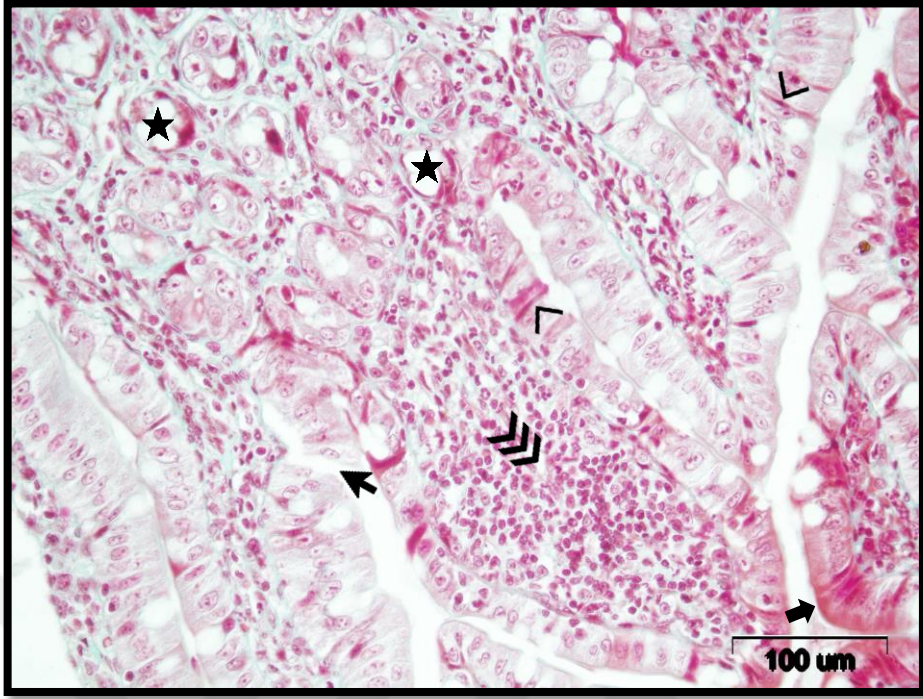
Şekil 4. 3: K grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (▶) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 μm.

4.1.2. Radyasyon Grubuna Ait Histolojik Bulgular

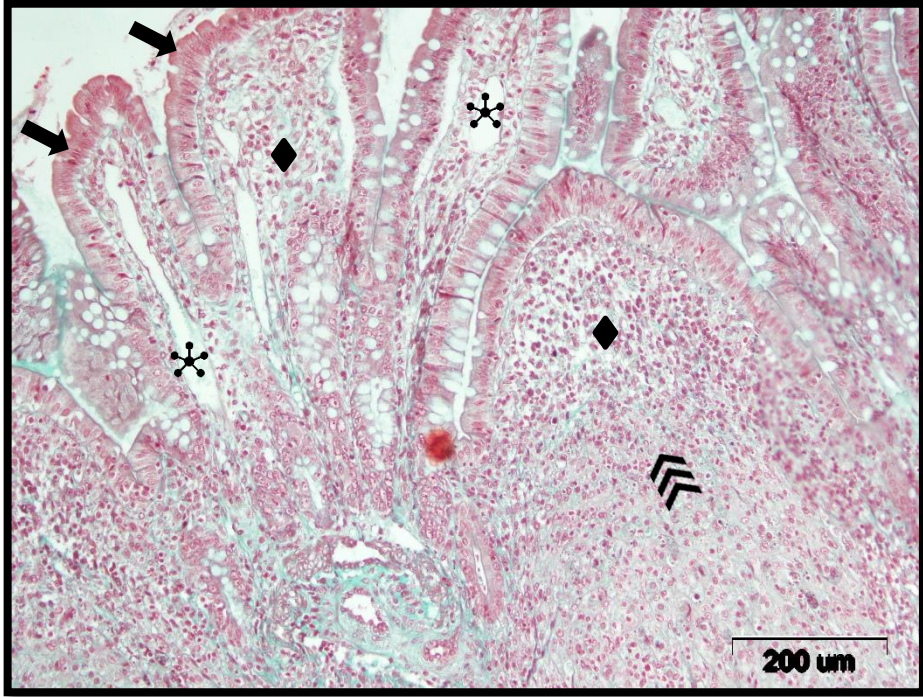
RAD grubuna ait bireylerin ince bağırsak dokusunun histolojik görünümünde K grubu bireylerle karşılaştırıldığında belirgin bir hasar göze çarpmaktadır. Villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, villuslarda kısalma ve genişleme, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hiperemi, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısında artış, villusların lamina propriyasında ödem, piknotik nükleus bu grupta belirgin olarak dikkati çekmiştir. Ayrıca bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, epitel hücrelerinde hiperplazi ve vakuolizasyon, mukozada nekrotik alanlar gözlenmiştir (Şekil 4.4-4.7). Absorptif hücrelerin çizgili kenarındaki PAS pozitif reaksiyon şiddetinde ve PAS pozitif reaksiyon veren goblet hücre sayısında K grubu ile karşılaştırıldığında belirgin bir azalma gözlenirken, çizgili kenarın hemen üzerinde ve villuslar arası alanda PAS pozitif reaksiyonda artış dikkati çekmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4. 4: RAD grubunun ince bağırsağında hiperemi (↘), vakuolizasyon (↪), ödem (*), HE, Bar: 100 μm.



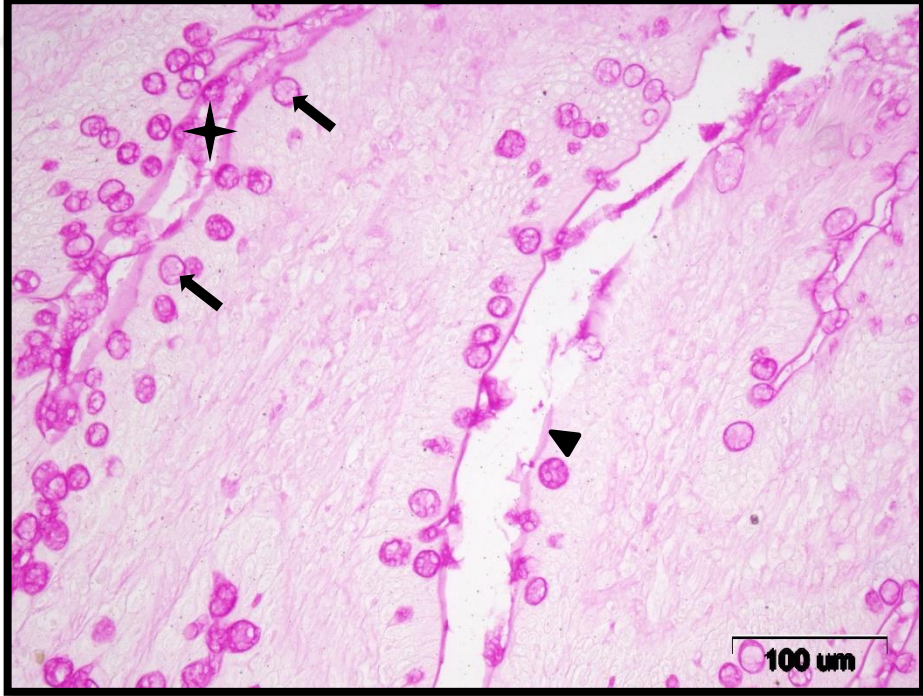
Şekil 4. 5: RAD grubunun ince bağırsağında villus bütünlüğünde bozulma (➔), bez bütünlüğünde bozulma (★), hiperplazi (▸), koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre (>), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (▹), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 μm.



Şekil 4. 6: RAD grubunun ince bağırsağında inflamatuvar hücre infiltrasyonu (▹), villusda kısalma ve genişleme (◆), ödem (✱), hiperplazi (➔), Masson'un üçlü boyası, Bar: 200 μm.



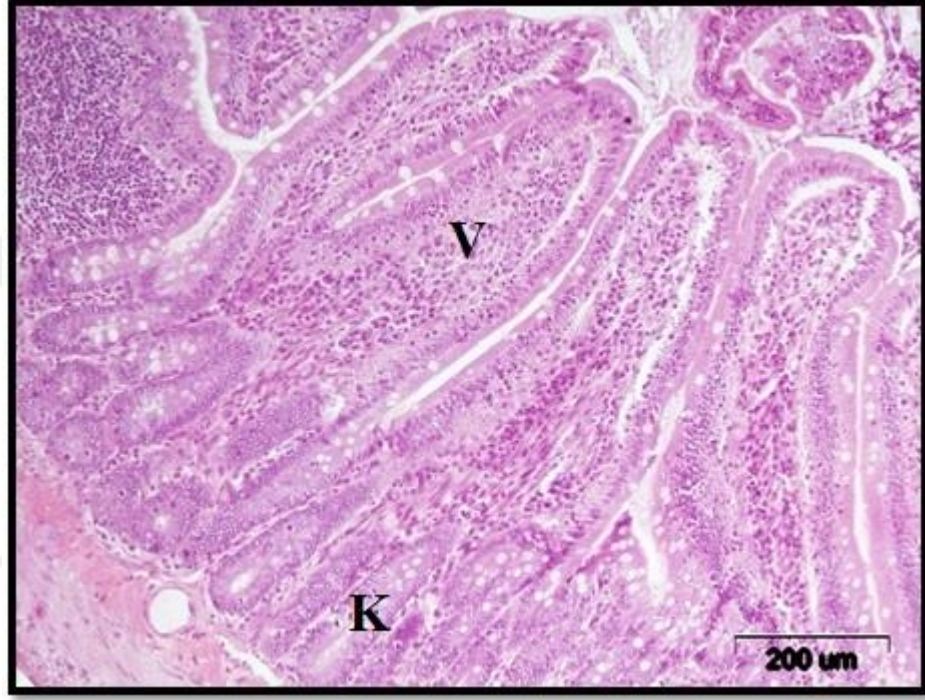
Şekil 4. 7: RAD grubunun ince bağırsağında piknotik nukleus (▲), bez bütünlüğünde bozulma (★), ödem (*), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 μm.



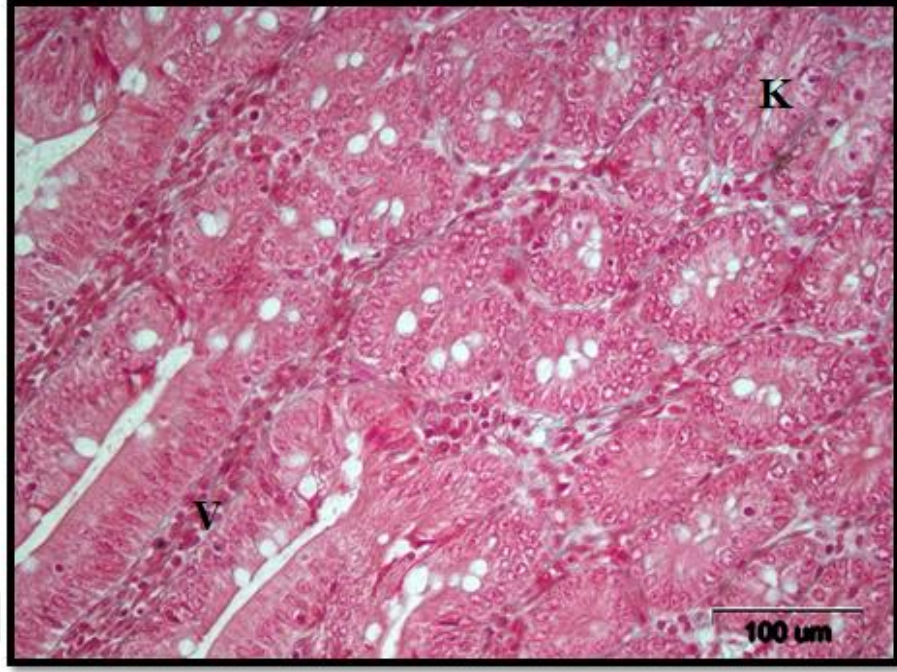
Şekil 4. 8: RAD grubunun ince bağırsağına ait goblet hücrelerinde (→) ve çizgili kenarında (►) PAS pozitif reaksiyon şiddetinde azalma, goblet hücre sayısında azalma ve villuslar arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda artma (★), Bar: 100 μm.

4.1.3. Klorokin Grubuna Ait Histolojik Bulgular

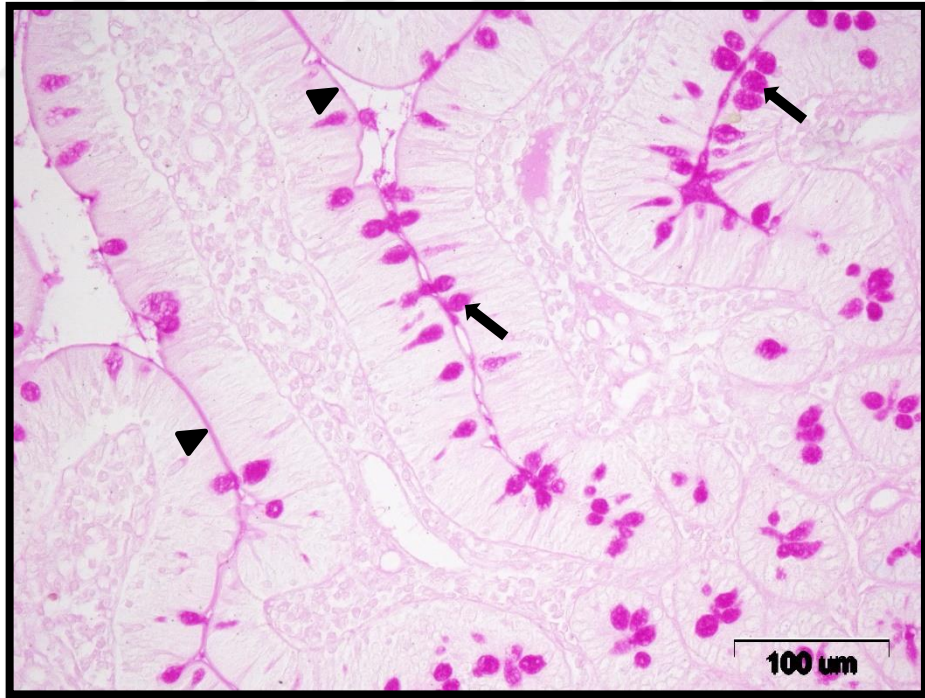
CQ grubuna ait histolojik kesitlerde K grubuna benzer olarak ince bağırsak dokusunun normal histolojik görünümü dikkati çekti (Şekil 4.9, 4.10). Absorptif hücrelerin çizgili kenarlarında ve goblet hücrelerinin içeriğinde gözlenen PAS pozitif reaksiyon K grubuna benzer görünüm ve şiddetteydi (Şekil 4.11).



Şekil 4. 9: CQ grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, HE, Bar: 100 µm.



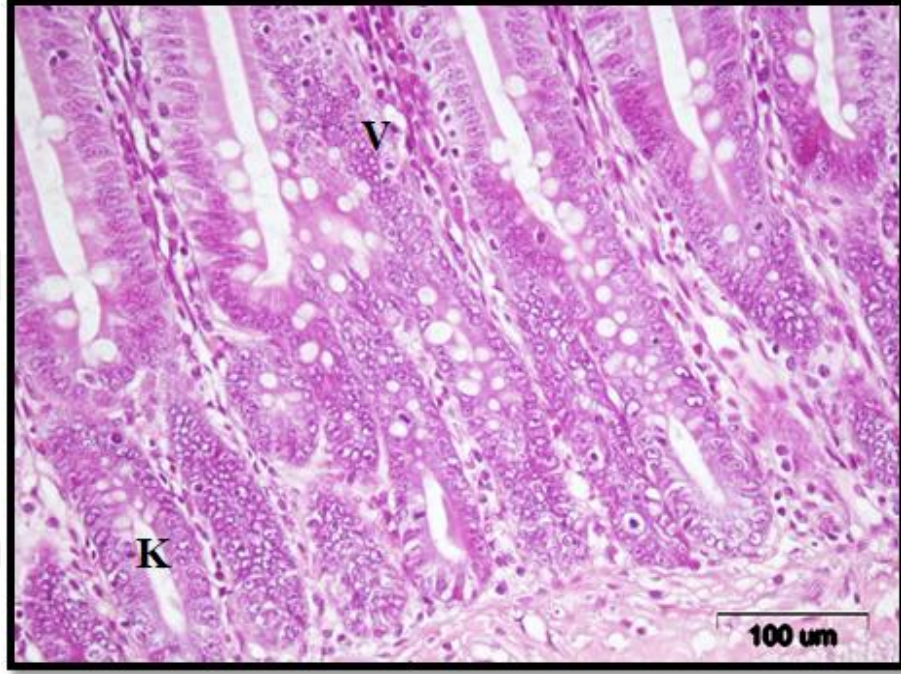
Şekil 4. 10: CQ grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kript, Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 μm.



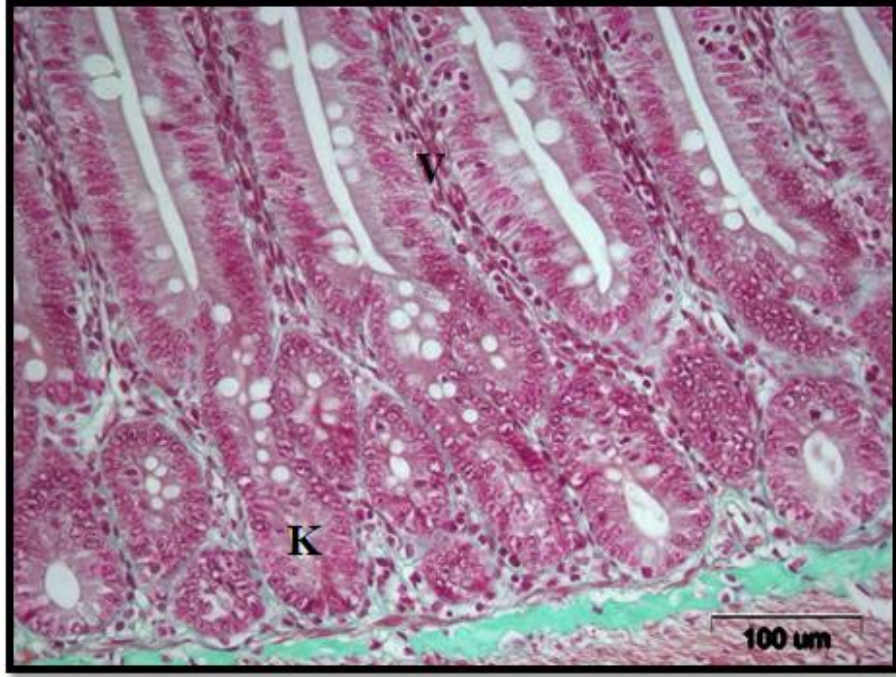
Şekil 4. 11: CQ grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 μm.

4.1.4. Aposinin Grubuna Ait Histolojik Bulgular

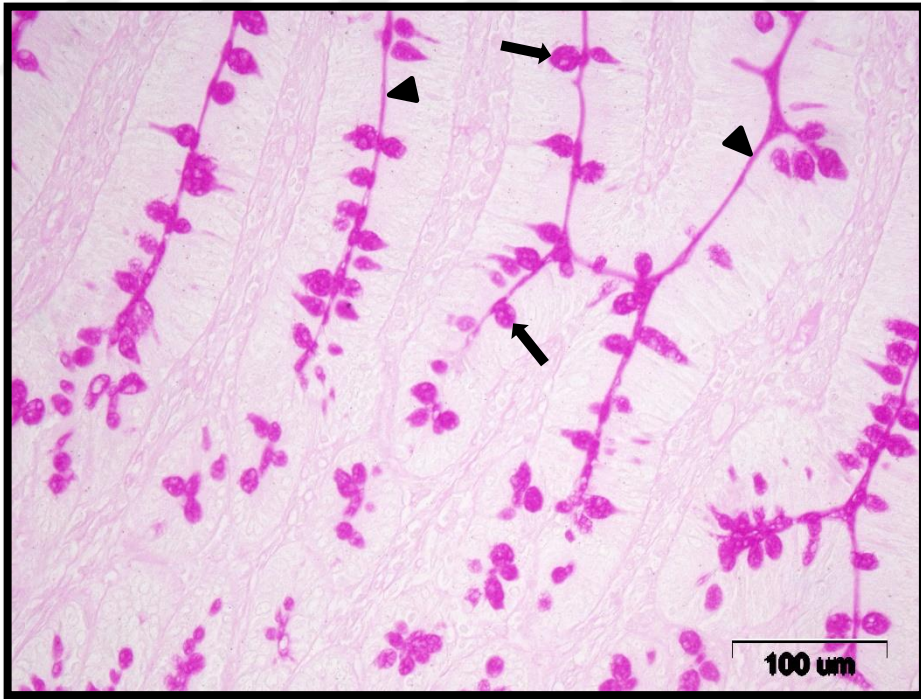
APO grubuna ait histolojik kesitlerde K grubuna benzer olarak sağlıklı ince bağırsak dokusunun histolojik görünümü hakimdi (Şekil 4.12, Şekil 4.13). PAS pozitif reaksiyon absorptif hücrelerin çizgili kenarlarında ve goblet hücrelerinin içeriğinde K grubuna benzer görünüm ve şiddetteydi (Şekil 4.14).



Şekil 4. 12: APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, HE, Bar: 100 µm.



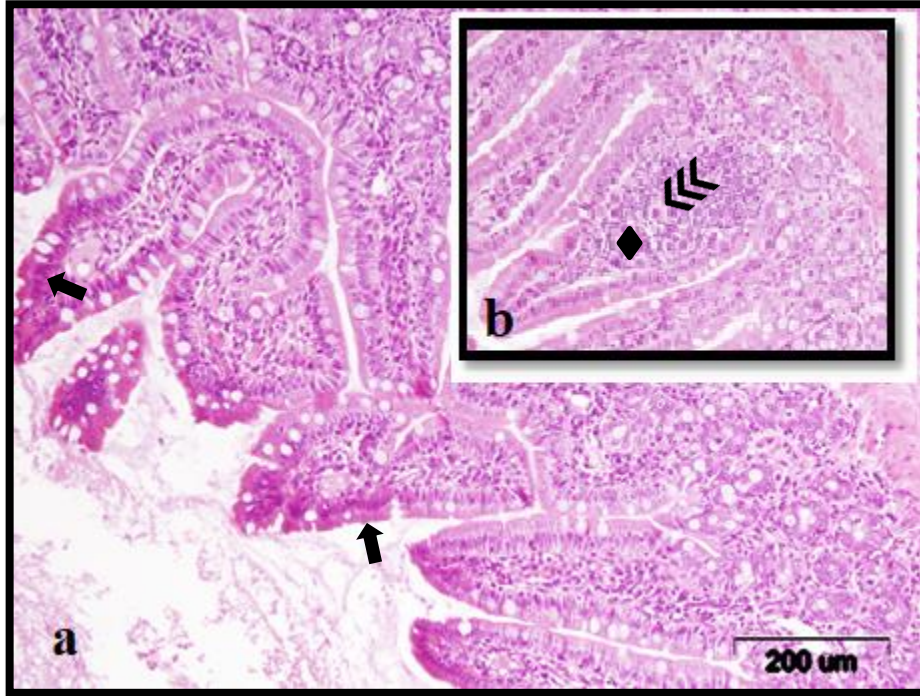
Şekil 4. 13: APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 µm.



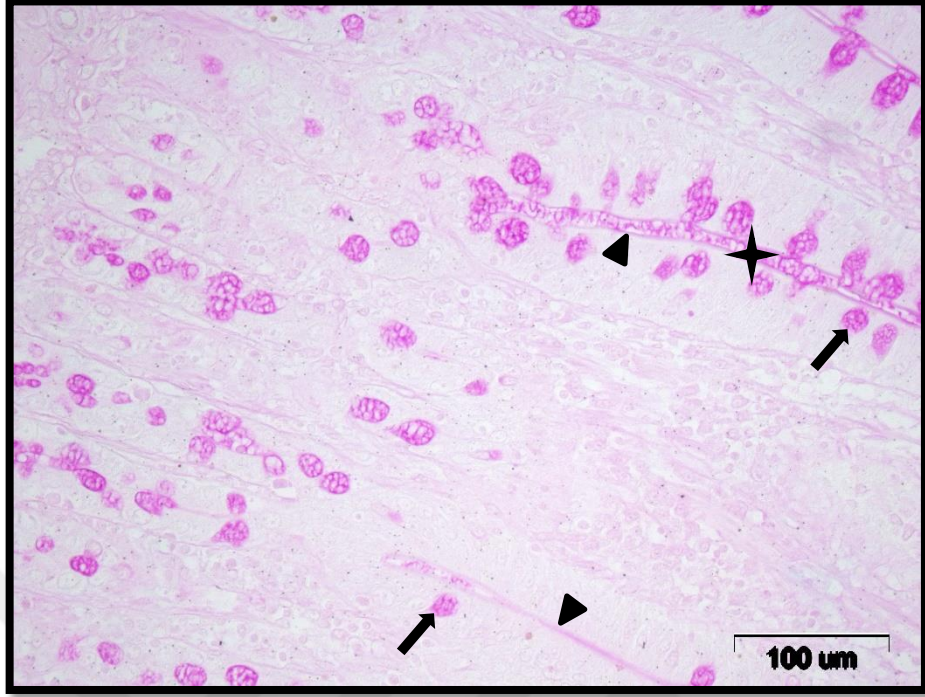
Şekil 4. 14: APO grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 µm.

4.1.5. Radyasyon + Klorokin Grubuna Ait Histolojik Bulgular

RAD + CQ grubuna ait histolojik kesitlerde K grubuna kıyasla belirgin bir hasar gözlenirse de bu hasar RAD grubuna kıyasla önemli ölçüde hafiftir ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. Bu grupta daha çok villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, villuslarda kısalma ve genişleme, villusların lamina propriyasında ödem gibi villusa ait hasarlar belirgin olmakla birlikte inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hiperemi, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısı, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, epitel hücrelerinde hiperplazi ve vakuolizasyon, mukozada nekrotik alanlar daha seyrek gözlenmiştir (Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17). Absorptif hücrelerin çizgili kenarlarındaki PAS pozitif reaksiyon şiddetinde ve PAS pozitif reaksiyon veren goblet hücre sayısında K grubuna göre belirgin bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca çizgili kenarların hemen üzerinde ve villuslar arası alanda PAS pozitif reaksiyon gözlenmiştir. PAS pozitif reaksiyonun şiddeti RAD grubuna benzer niteliktedir (Şekil 4.18).



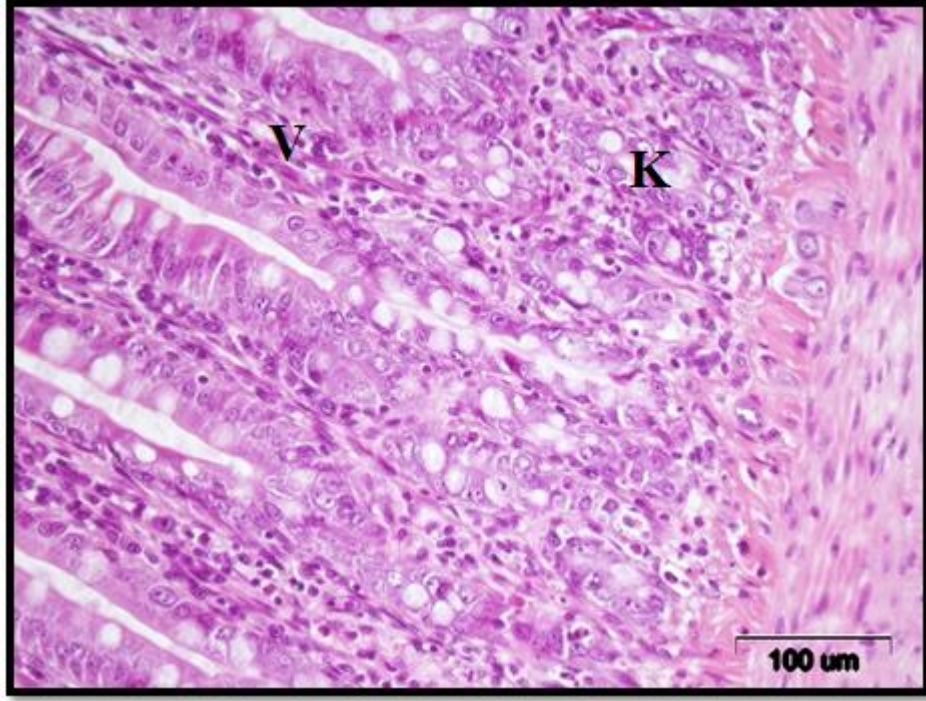
Şekil 4. 15: RAD + CQ grubuna ait sıçanların ince bağırsağında a: hiperplazi (➡), b: inflamatuvar hücre infiltrasyonu (>>>), villuslarda kısalma ve genişleme (◆), HE, Bar:200 µm.



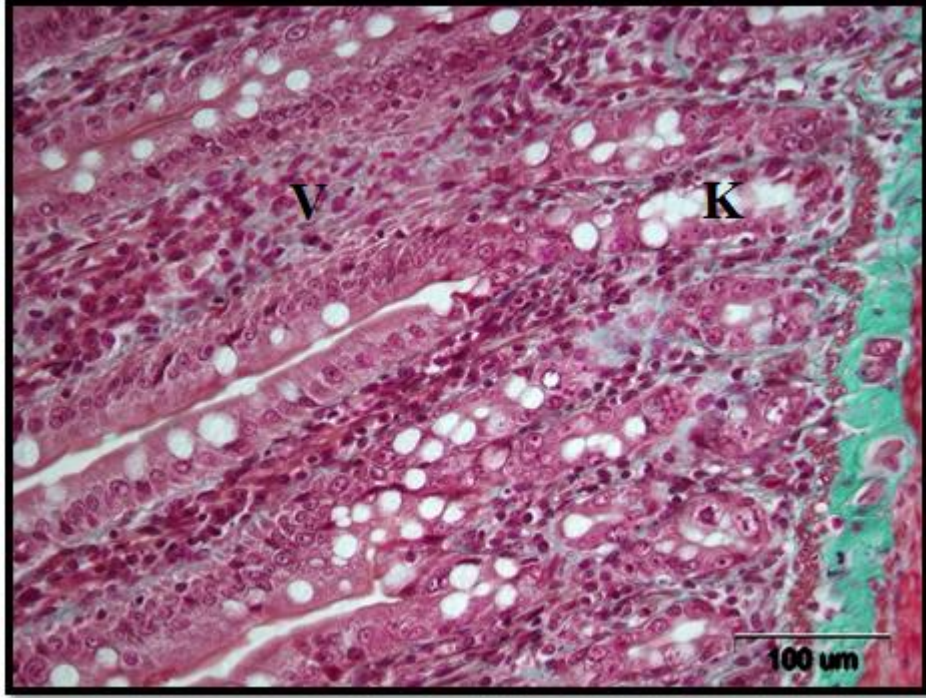
Şekil 4. 18: RAD + CQ grubunun jejunumuna ait goblet hücrelerinde (→) ve çizgili kenarında (►) PAS pozitif reaksiyon şiddetinde azalma, goblet hücre sayısında azalma ve villuslar arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda artma (◆), Bar: 100 μm.

4.1.6. Radyasyon + Aposinin Grubuna Ait Histolojik Bulgular

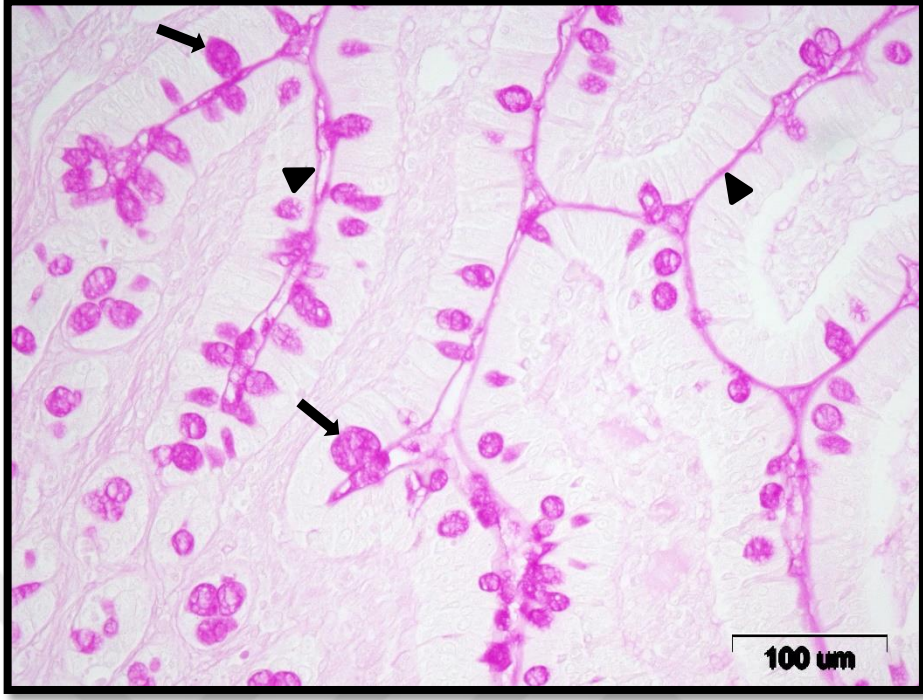
RAD + APO grubunun histolojik hasar derecesi K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış göstermiştir. RAD grubunda yoğun olarak gözlenen villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, villusların lamina propriyasında ödem, villuslarda kısalma ve genişleme, hiperplazi ve epitel hücrelerinde vakuolizasyon bulgularında anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.19, Şekil 4.20). Ayrıca, RAD grubunda gözlenen inflamatuvar hücre infiltrasyonu, villus epitel hücrelerinde gözlenen piknotik nükleus, hiperemi, nekrotik alan, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre gibi hasar bulguları bu grupta gözlenmemiştir. PAS pozitif reaksiyon veren goblet hücre sayısında ve absorptif hücrelerin çizgili kenarlarındaki PAS pozitif reaksiyon şiddetinde RAD grubuna göre belirgin artış gözlenirken, villuslar arasında ve çizgili kenarların hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda belirgin bir azalma dikkati çekmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4. 19: RAD + APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, HE, Bar: 100 µm.



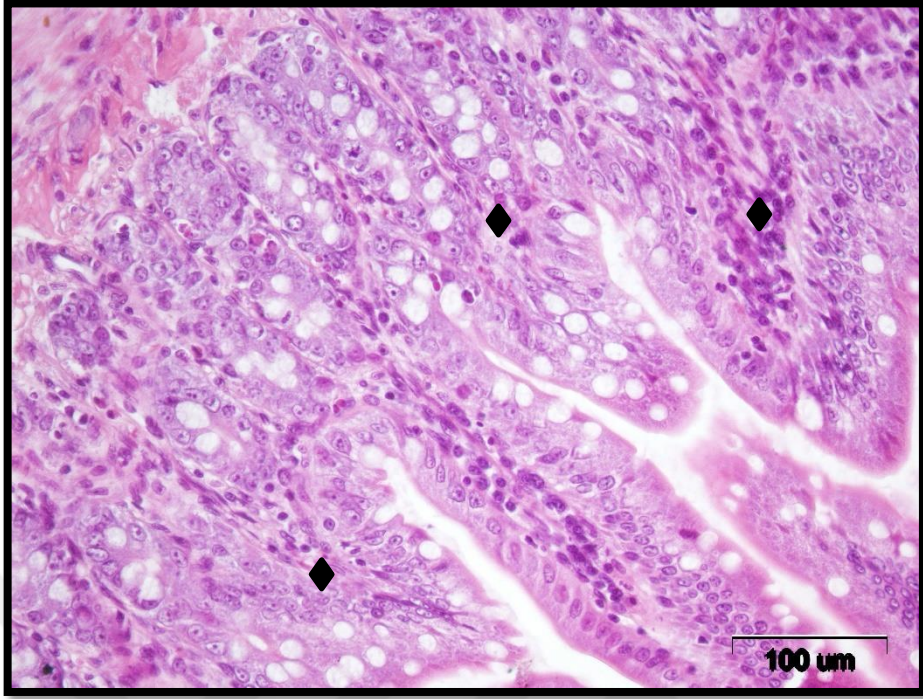
Şekil 4. 20: RAD + APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 µm.



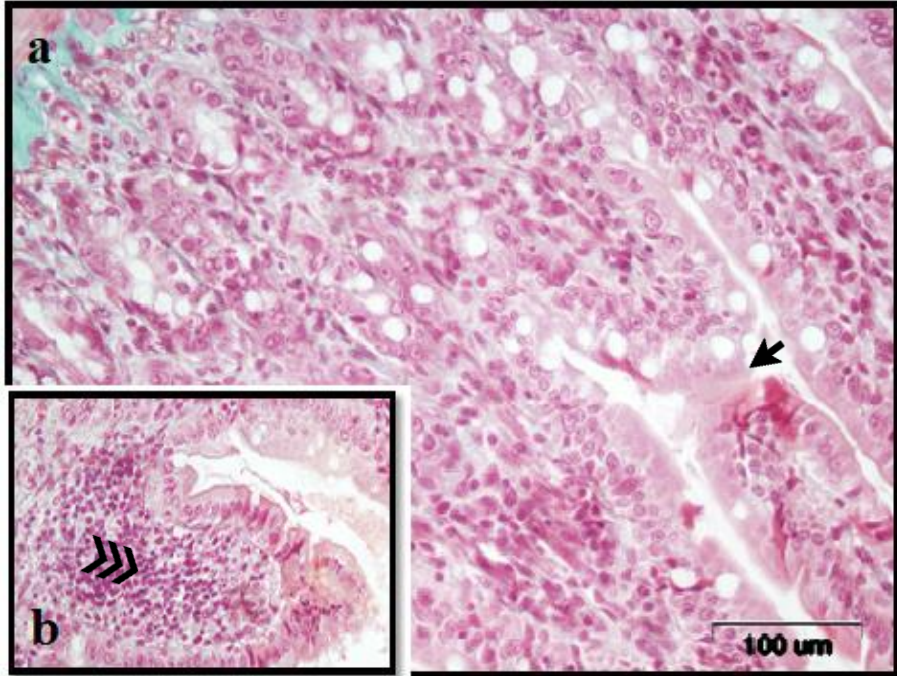
Şekil 4. 21: RAD + APO grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 µm.

4.1.7. Radyasyon + Klorokin + Aposinin Grubuna Ait Histolojik Bulgular

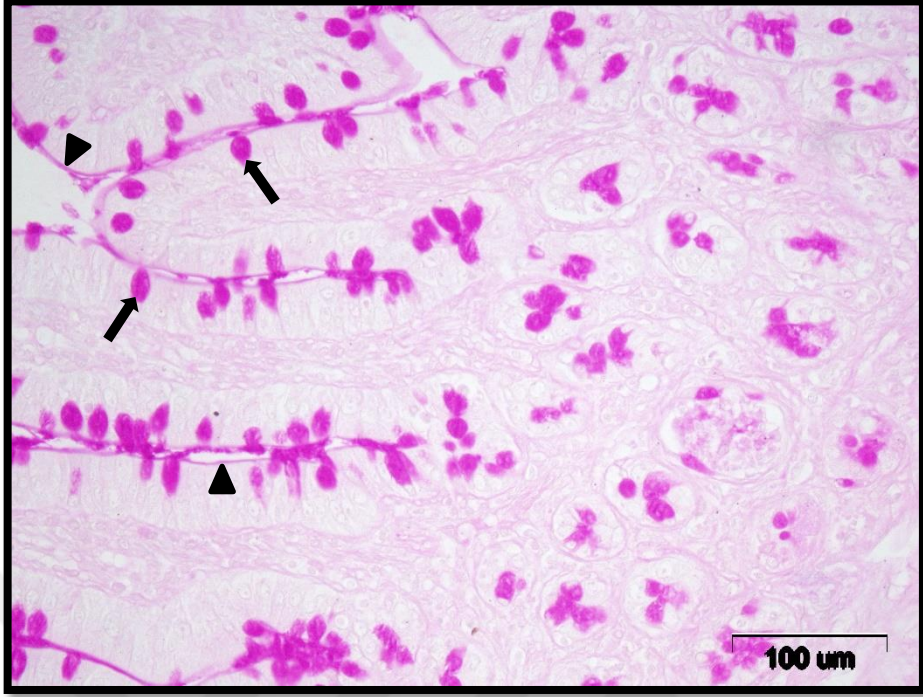
Bu grupta RAD + CQ gruplarında yoğun olarak gözlenen villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, villusların lamina propriyasında ödem, villuslarda kısılma ve genişleme, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve epitel hücrelerinde vakuolizasyon bulgularında anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.22, Şekil 4.23). Ayrıca RAD + CQ grubunda gözlenen villus epitel hücrelerinde hiperplazi, hiperemi, piknotik nükleus, nekrotik alan, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre gibi hasarlar bu grupta gözlenmemiştir. PAS pozitif reaksiyon veren goblet hücre sayısında ve absorptif hücrelerin çizgili kenarlarındaki PAS pozitif reaksiyon şiddetinde RAD grubuna göre belirgin artış gözlenirken, villuslar arasında ve çizgili kenarların hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda belirgin bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4. 22: RAD + CQ + APO grubuna ait ince bağırsağında Villuslarda kısalma ve genişleme (◆), HE, Bar: 100 µm.



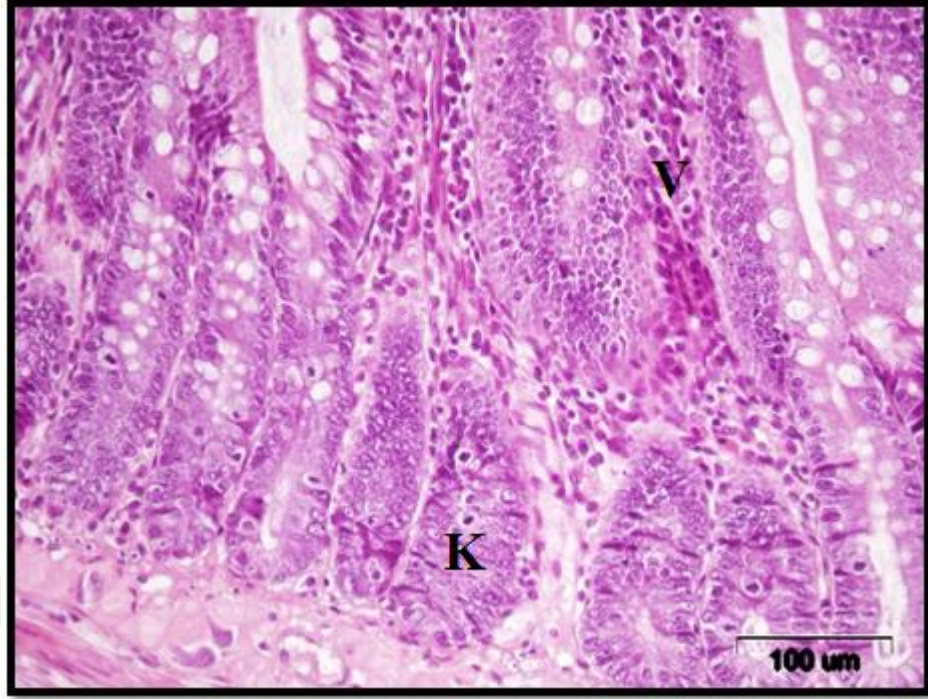
Şekil 4. 23: RAD + CQ + APO grubuna ait ince bağırsağında a: villus bütünlüğünde bozulma (➡), b: inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➤➤), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 µm.



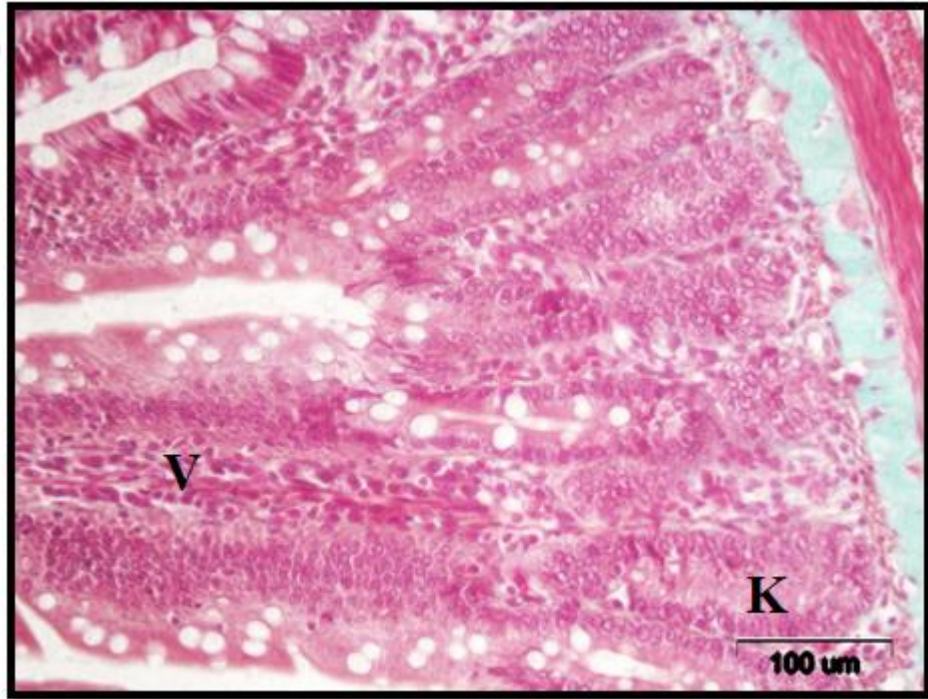
Şekil 4. 24: RAD + CQ + APO grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 μm.

4.1.8. Klorokin + Aposinin Grubuna Ait Histolojik Bulgular

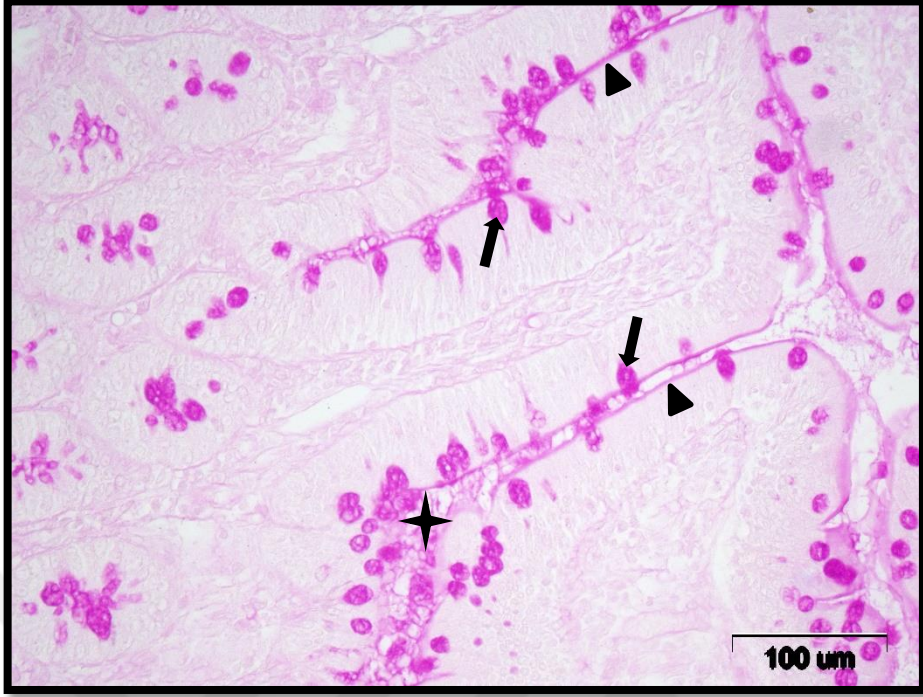
CQ + APO grubunun histolojik hasar derecesi CQ grubuna göre anlamlı olmayan bir azalma göstermiştir. CQ + APO grubunun ince bağırsağının histolojik görünümü K grubuna benzer niteliktedir (Şekil 4.25, Şekil 4.26). Absorptif hücrelerin çizgili kenarlarında ve goblet hücrelerinin içeriğinde gözlenen PAS pozitif reaksiyon K grubuna benzer görünüm ve şiddetteydi (Şekil 4.27).



Şekil 4. 25: CQ + APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, HE, Bar: 100 μm.



Şekil 4. 26: CQ + APO grubuna ait ince bağırsağın genel görünümü, V: villus, K: kripta, Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 μm.



Şekil 4. 27: CQ + APO grubuna ait ince bağırsağın çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, villuslar arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma (✱) Bar: 100 μm.

4.1.9. Histolojik Hasar Skoru

Elde edilen verilere göre, grupların ince bağırsak histolojik hasar skorları arasında istatistiksel anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir. (Tablo 4.1). K grubu ile karşılaştırıldığında RAD, CQ, RAD+CQ, RAD+APO grupları ve RAD+CQ+APO gruplarının ($p<0,005$) ve CQ+APO grubunun ($p<0,05$) histolojik hasar skorlarında anlamlı artışlar belirlenmiştir. APO grubu ise K'ya göre anlamsız artış göstermiştir. RAD+CQ ve RAD+APO gruplarının histolojik hasar skorlarında RAD grubuna göre anlamlı azalmalar tespit edilmiştir ($p<0,005$). RAD+CQ+APO grubunda ise RAD+CQ'ya göre anlamlı azalma ($p<0,05$) saptanmıştır. CQ+APO grubunda ise CQ'ya göre anlamsız bir azalış gözlenmiştir.

Tablo 4. 1: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak histolojik hasar skoru.

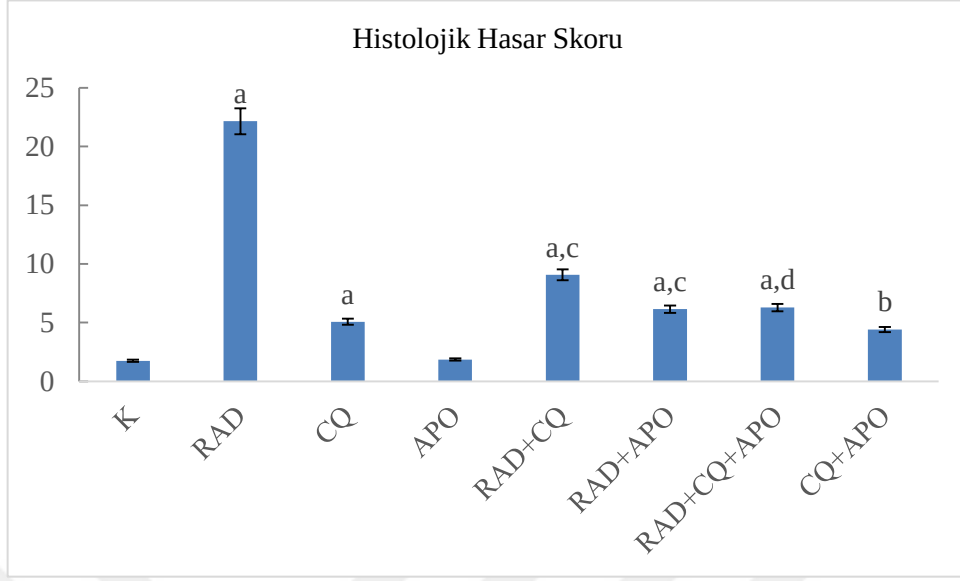
Gruplar	Histolojik Hasar Skoru*
K	1,75 ± 0,4
RAD	22,14 ± 5,14 ^a
CQ	5,07 ± 3,24 ^a
APO	1,85 ± 0,85
RAD+CQ	9,07 ± 3,5 ^{a,c}
RAD+APO	6,14 ± 1,77 ^{a,c}
RAD+CQ+APO	6,28 ± 1,11 ^{a,d}
CQ+APO	4,41 ± 2,68 ^b

^a K grubundan farklı (p<0,005).

^b K grubundan farklı (p<0,05).

^c RAD grubundan farklı (p<0,005).

^d RAD+CQ grubundan farklı (p<0,05).



Şekil 4. 28: Histolojik hasar skoru.

4.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

4.2.1. PCNA İmmunohistokimyasına Ait Bulgular

Yaptığımız incelemeler sonucunda elde ettiğimiz verilere göre grupların % PCNA pozitif hücre değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu bulunmuştur (Tablo 4.2). RAD, CQ, RAD+CQ, RAD+APO, RAD+CQ+APO gruplarında ($p<0,005$), APO grubunda ($p<0,05$) ve CQ+APO grubunda ($p<0,01$) K grubuna göre anlamlı azalma gözlenmiştir. RAD+CQ grubu RAD grubu ile karşılaştırıldığında anlamsız artış gözlenirken, RAD+APO grubunda RAD grubuna göre anlamlı artış ($p<0,005$) gözlenmiştir. RAD+CQ+APO grubunda ise RAD+CQ grubuna göre anlamlı artış ($p<0,005$) dikkati çekmiştir. CQ + APO grubunda ise CQ grubuna göre anlamsız azalış gözlenmiştir.

Tablo 4. 2: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak PCNA değerleri.

Gruplar	PCNA (%Pozitif hücre endeksi) *
K	68,6 ± 9,54
RAD	24,22 ± 3,02 ^a
CQ	51,34 ± 6,8 ^a
APO	59,17 ± 4,53 ^b
RAD+CQ	24,71 ± 4,61 ^a
RAD+APO	34,36 ± 4,06 ^{a,d}
RAD+CQ+APO	35,31 ± 4,11 ^{a,e}
CQ+APO	50,23 ± 6,07 ^c

* Ortalama ± Standart Sapma.

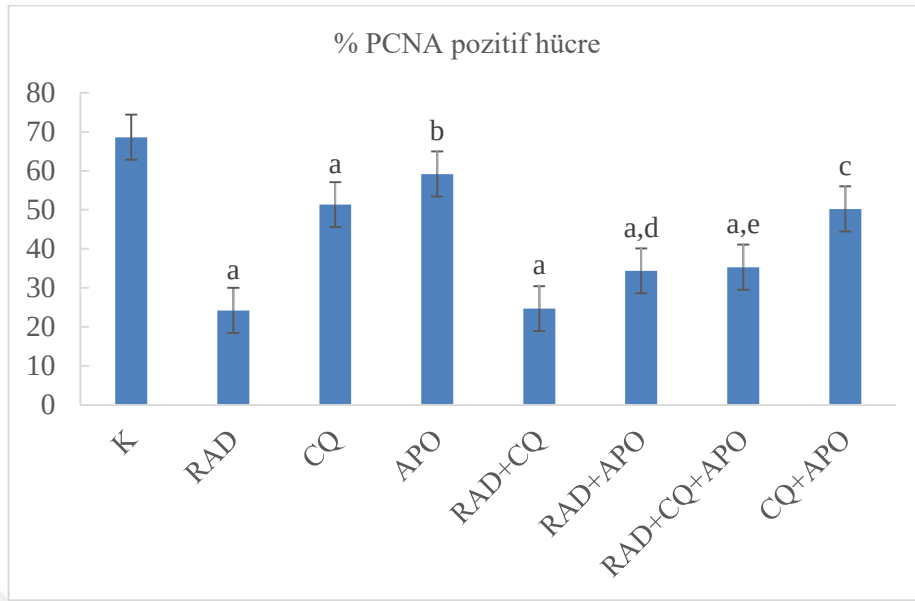
^a K grubundan farklı (p<0,005).

^b K grubundan farklı (p<0,05).

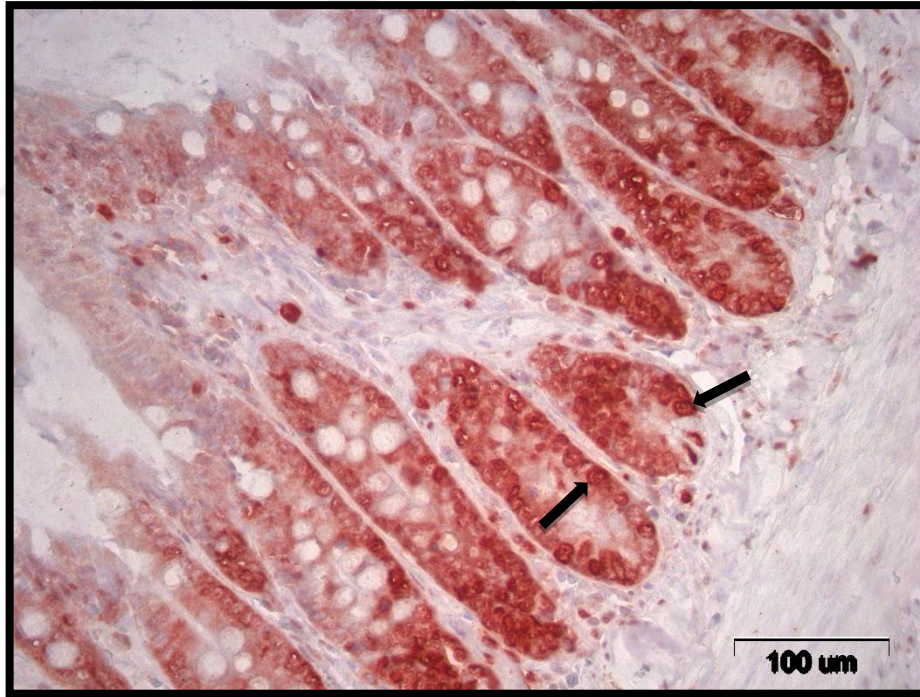
^c K grubundan farklı (p<0,01).

^d RAD grubundan farklı (p<0,005).

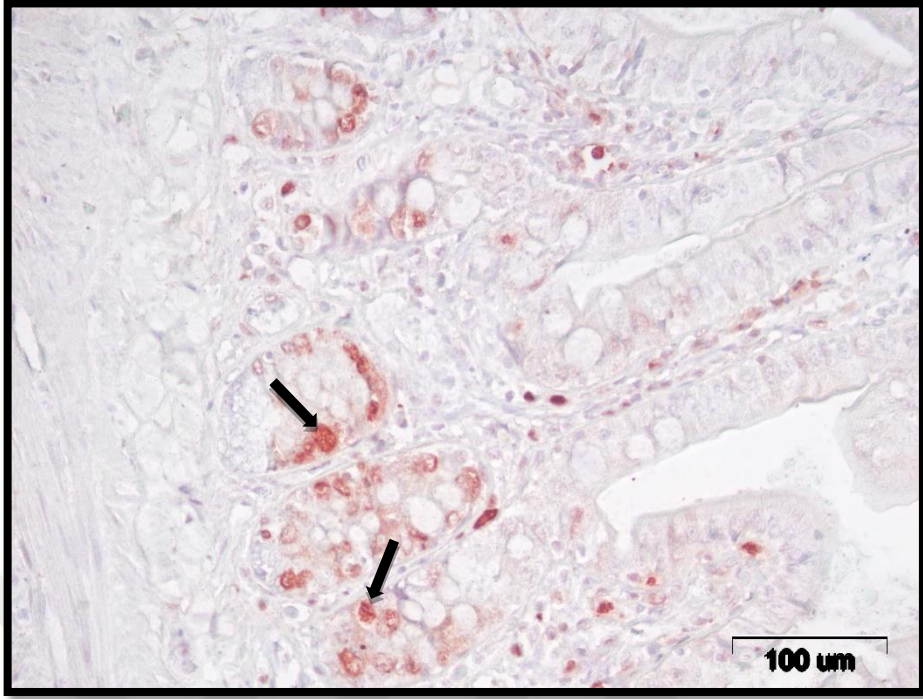
^e RAD+CQ grubundan farklı (p<0,005).



Şekil 4. 29: İnce bağırsak kript epitel hücrelerinde immunohistokimya ile tespit edilen % PCNA pozitif hücre sayısı.



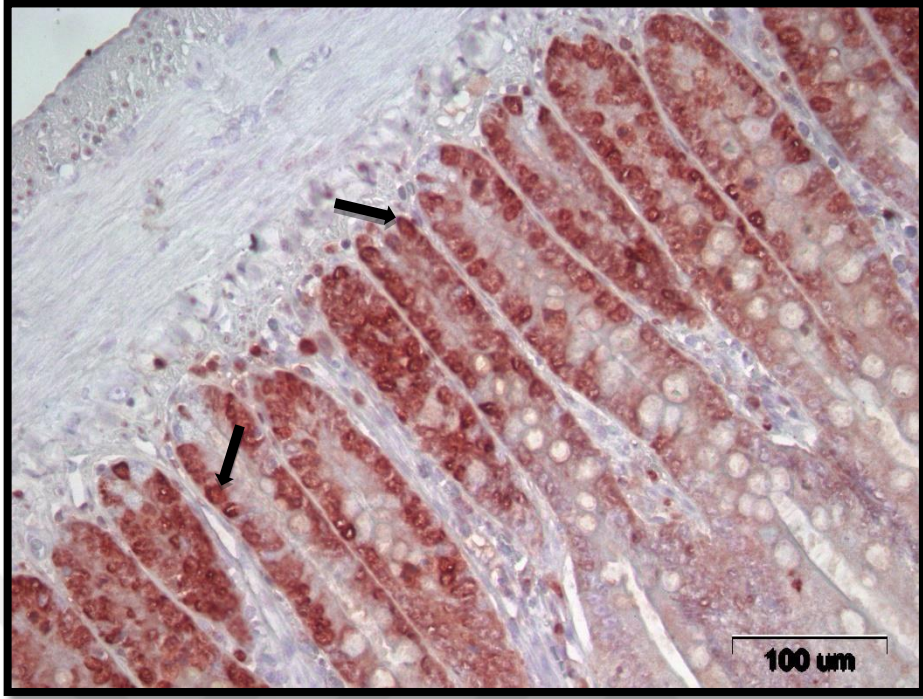
Şekil 4. 30: K grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.



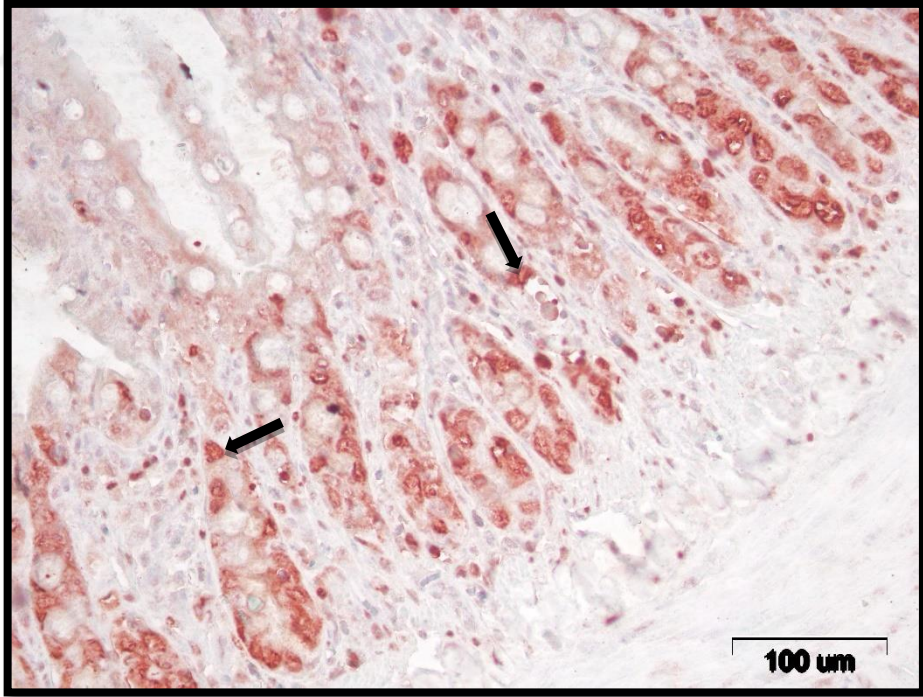
Şekil 4. 31: RAD grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.



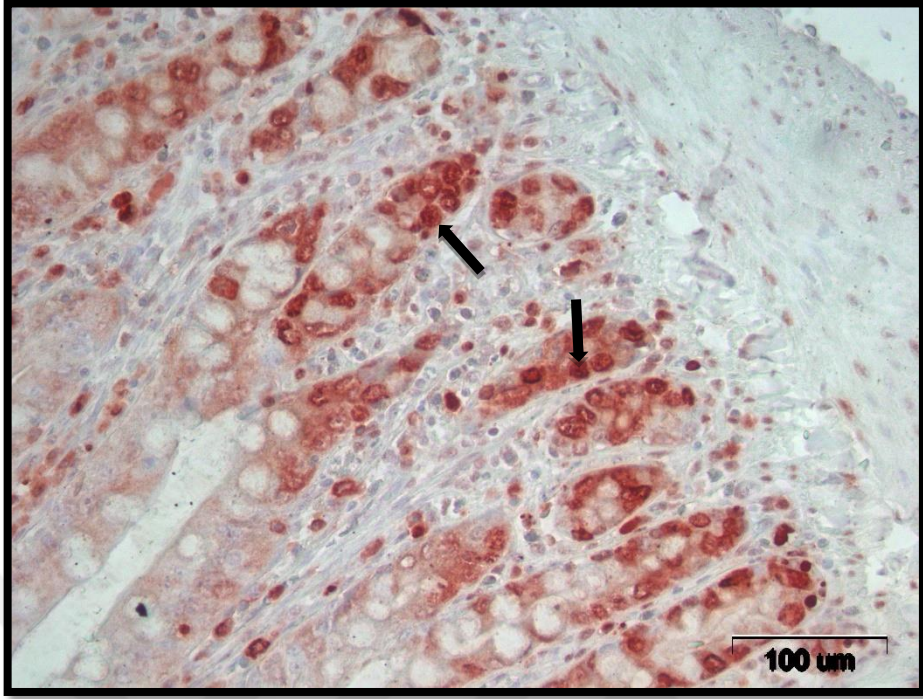
Şekil 4. 32: CQ grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.



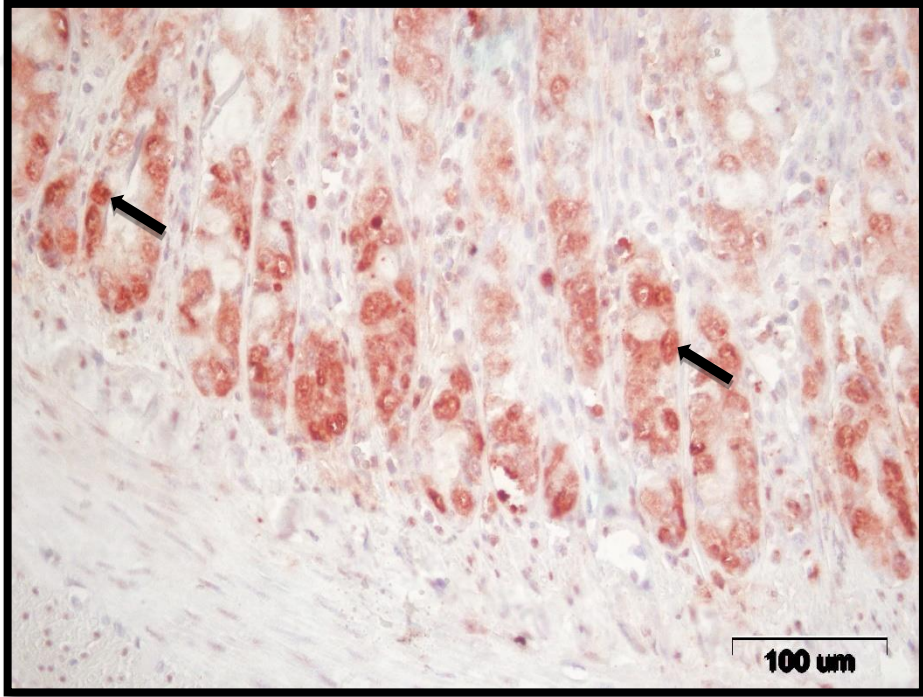
Şekil 4. 33: APO grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→), Bar: 100 µm.



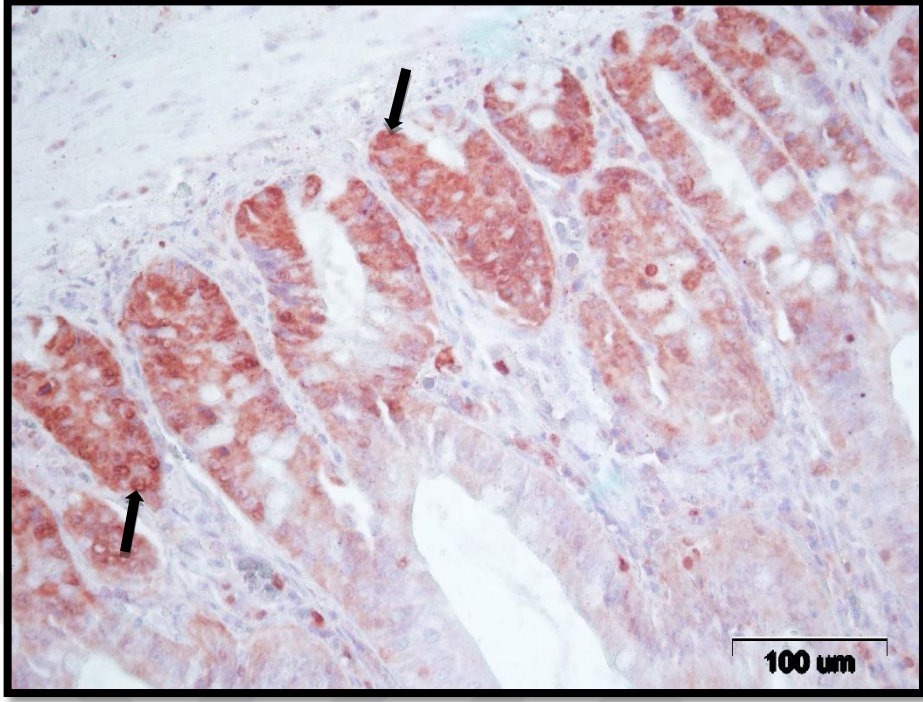
Şekil 4. 34: RAD + CQ grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→), Bar: 100 µm.



Şekil 4. 35: RAD + APO grubu kriptal epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (↔), Bar: 100 µm.



Şekil 4. 36: RAD + CQ + APO grubu kriptal epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (↔), Bar: 100 µm.



Şekil 4. 37: CQ + APO grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (➡), Bar: 100 μm.

4.2.2. p62 İmmunohistokimyasına Ait Bulgular

Yaptığımız incelemeler sonucunda elde ettiğimiz verilere göre, grupların ince bağırsak % p62 pozitif hücre değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlenmiştir (Tablo 4.3). RAD, RAD + CQ, RAD + APO, CQ + APO gruplarında ($p < 0.005$), CQ grubunda ($p < 0.05$) ve RAD+ CQ + APO grubunda ($p < 0.01$) K grubuna göre anlamlı artış gösterirken, APO grubu K grubu ile karşılaştırıldığında anlamsız artış göstermiştir. RAD + CQ grubu RAD grubu ile karşılaştırıldığında anlamsız artış gözlenirken, RAD + APO grubunda RAD grubuna göre anlamlı azalma ($p < 0.005$) gözlenmiştir. RAD + CQ + APO grubunda ise RAD +CQ grubuna göre anlamlı azalma ($p < 0.005$) gözlenmiştir. CQ + APO grubunda ($p < 0,05$) ise CQ grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir.

Tablo 4.3: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak p62 değerleri.

Gruplar	p62 (%Pozitif hücre endeksi) *
K	3,6 ± 1,23
RAD	69,25 ± 10,24 ^a
CQ	9,85 ± 6,81 ^b
APO	8,62 ± 6,74
RAD+ CQ	76,02 ± 13,52 ^a
RAD+ APO	14,65 ± 8,66 ^{a,d}
RAD+ CQ+APO	14,08 ± 6,7 ^{c,e}
CQ+APO	20,56 ± 3,38 ^{a,f}

* Ortalama ± Standart Sapma.

^a Kgrubundan farklı (p<0,005)

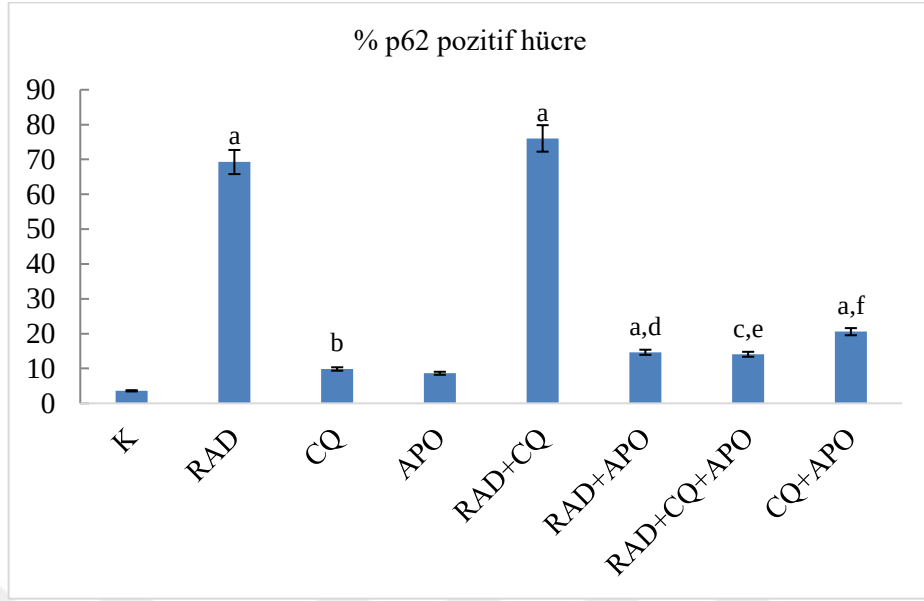
^b K grubundan farklı (p<0,05)

^c K grubundan farklı (p<0,01)

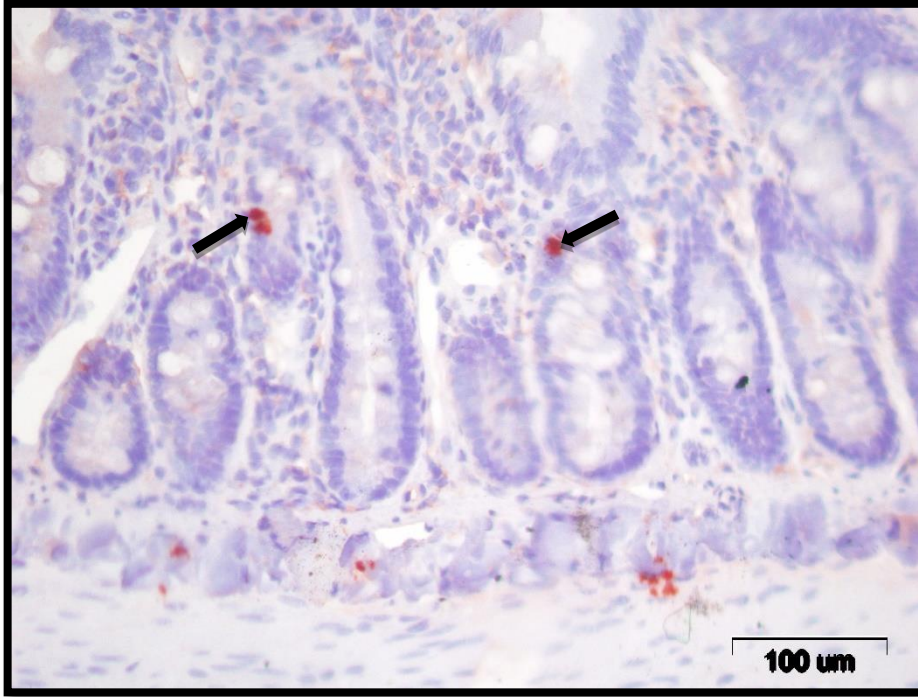
^d RAD grubundan farklı (p<0,005)

^e RAD+CQ grubundan farklı (p<0,005)

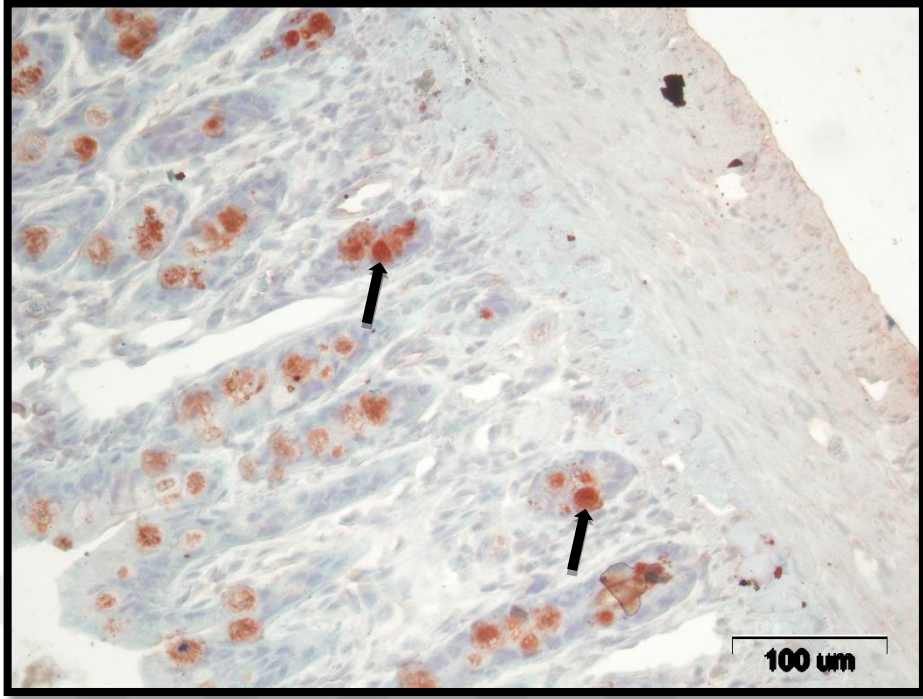
^f CQ grubundan farklı (p<0,05)



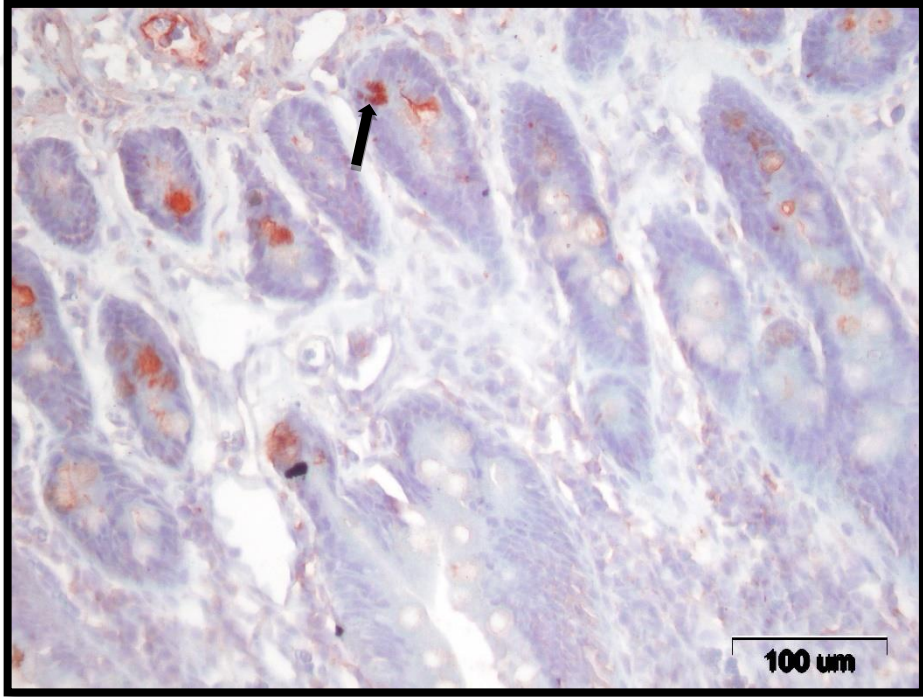
Şekil 4. 38: İnce bağırsak dokusunda immunohistokimya ile tespit edilen % p62 pozitif hücre sayısı.



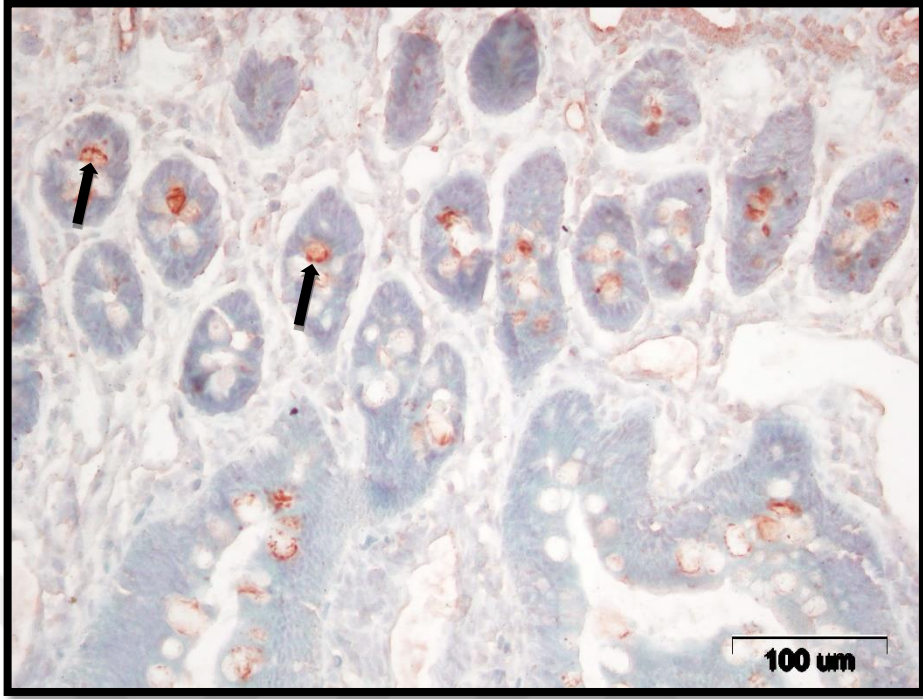
Şekil 4. 39: K grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (→), Bar: 100 µm.



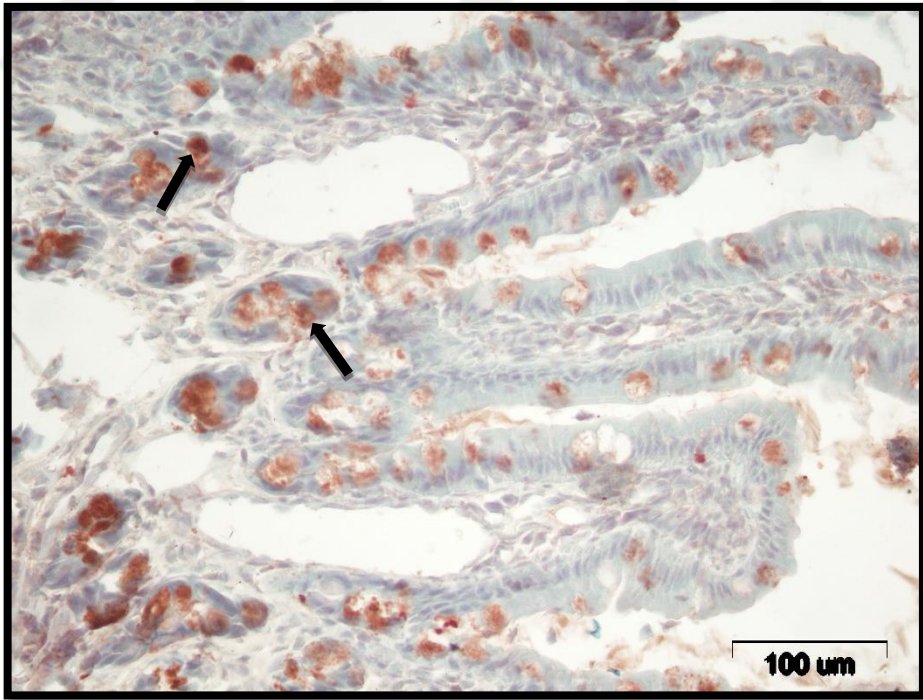
Şekil 4. 40: RAD grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.



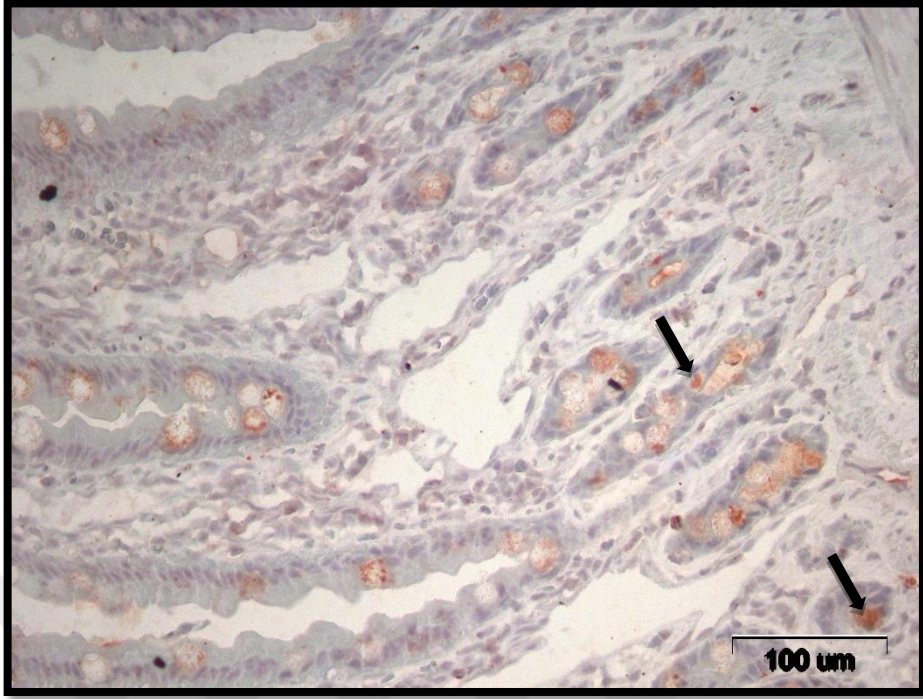
Şekil 4. 41: CQ grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.



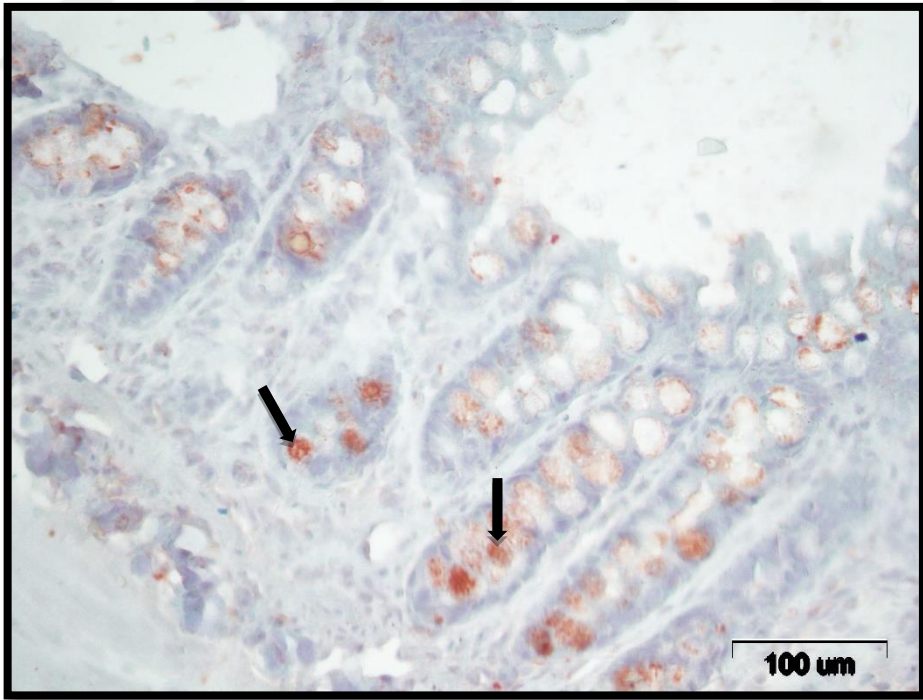
Şekil 4. 42: APO grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.



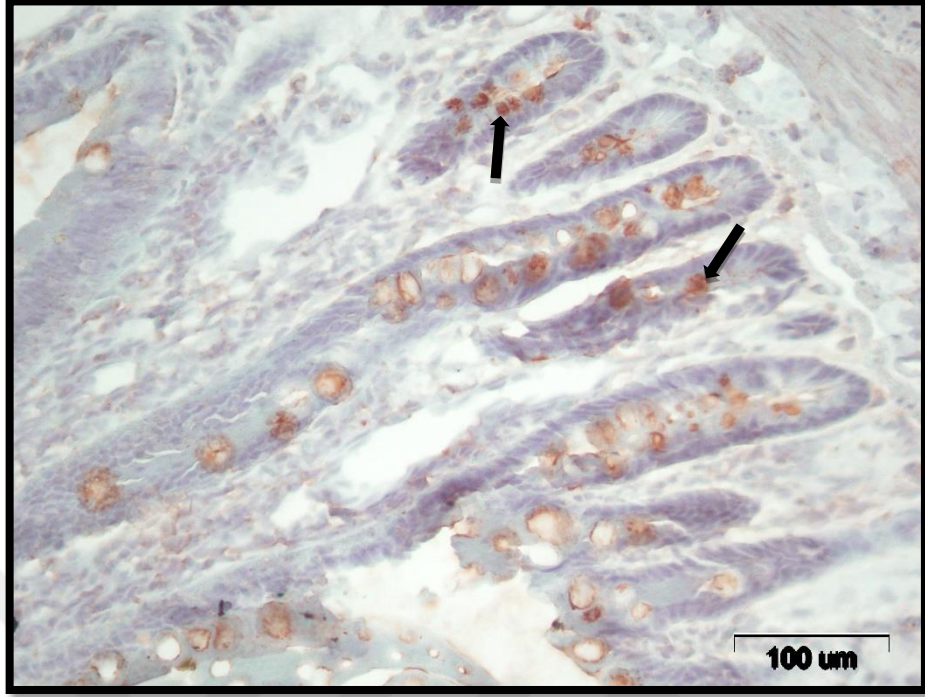
Şekil 4. 43: RAD+CQ grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.



Şekil 4. 44: RAD+APO grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.



Şekil 4. 45: RAD+CQ+APO grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 µm.



Şekil 4. 46: CQ+APO grubu ince bağırsağında p62 pozitif hücreler (➡), Bar: 100 μm.

4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.3.1. LC3 II (MAP1LC3B) Seviyelerine Ait Bulgular

Yaptığımız incelemeler sonucunda elde ettiğimiz verilere göre grupların ince bağırsak LC3 II değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (Tablo 4.4). RAD, RAD + CQ, CQ+APO gruplarında ($p<0,001$), RAD + APO grubunda ($p<0,05$), RAD + CQ + APO grubunda ($p<0,01$) K grubuna göre anlamlı artış gözlenirken CQ ve APO gruplarında K grubuna göre anlamlı olmayan artış gözlenmiştir. RAD + CQ grubunda ($p<0,05$) RAD grubuna göre anlamlı artış gözlenirken, RAD + APO grubunda RAD grubuna göre anlamlı olmayan azalış gözlenmiştir. RAD + CQ + APO grubunda ($p<0,05$) ise RAD + CQ grubuna göre anlamlı azalış gözlenmiştir. CQ + APO grubunda ($p<0,001$) ise CQ grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir.

Tablo 4.4: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak LC3 II seviyeleri

Gruplar	LC3 II seviyeleri (ng/ml) *
K	0,78±0,28
RAD	1,47±0,15 ^a
CQ	0,99±0,10
APO	0,87±0,17
RAD+ CQ	1,87±0,35 ^{a, d}
RAD+ APO	1,21±0,36 ^b
RAD+ CQ+APO	1,36±0,31 ^{c, e}
CQ+APO	2,06±0,13 ^{a, f}

* Ortalama ± Standart Sapma.

^a K grubundan farklı p<0,001.

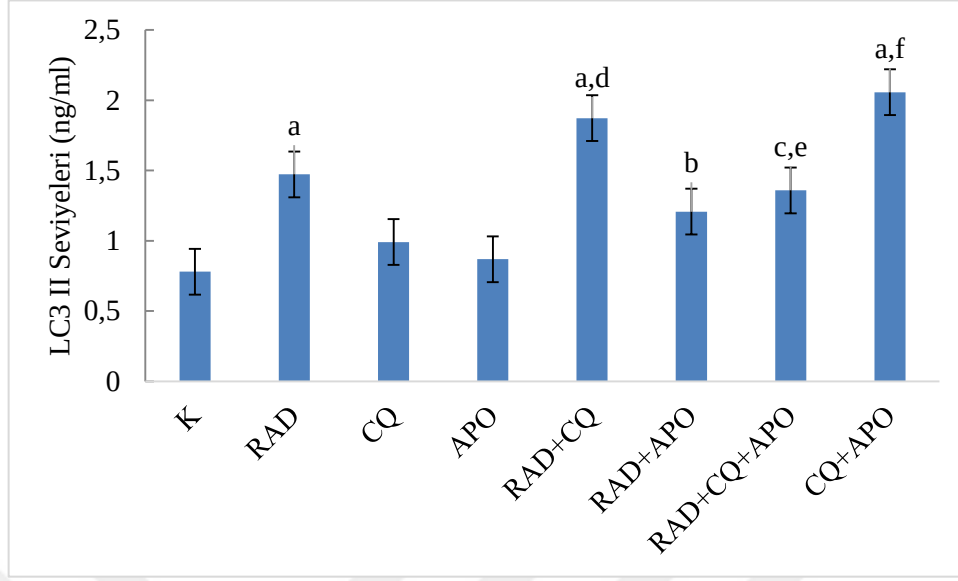
^b K grubundan farklı p<0,05.

^c K grubundan farklı p<0,01.

^d RAD grubundan farklı p<0,05.

^e RAD+CQ grubundan farklı p<0,05.

^f CQ grubundan farklı p<0,001.



Şekil 4. 47: İnce Bağırsak Dokusu LC3 II Seviyeleri (ng/ml), (ortalama $\pm$ standart sapma).

4.3.2. LAMP 2 Seviyelerine Ait Bulgular

Yaptığımız incelemeler sonucunda elde ettiğimiz verilere göre grupların ince bağırsak LAMP 2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlenmiştir (Tablo 4.5). RAD, RAD+CQ, CQ+APO gruplarında ($p < 0,001$) K grubuna göre anlamlı artış gözlenirken, APO, RAD+APO ve RAD+CQ+APO gruplarında K grubuna göre anlamsız artış gözlenmiştir. CQ grubunda ise K grubuna göre anlamsız azalma gözlenmiştir. RAD+CQ grubunda RAD grubuna göre anlamlı olmayan artış gözlenirken, RAD+APO grubunda ($p < 0,05$) RAD grubuna göre anlamlı azalış gözlenmiştir. RAD+CQ+APO grubunda ($p < 0,001$) RAD+CQ grubuna göre anlamlı azalış gözlenmiştir. CQ + APO grubunda ($p < 0,001$) ise CQ grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir.

Tablo 4.5: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak LAMP 2 seviyeleri.

Gruplar	LAMP 2 seviyeleri (ng/L)*
K	4,96±2,28
RAD	11,36±3,15 ^a
CQ	4,04±2,19
APO	9,11±4,53
RAD+ CQ	15,18±5,29 ^a
RAD+ APO	7,67±2,53 ^b
RAD+ CQ+APO	6,31±1,08 ^c
CQ+APO	13,8±2,48 ^{a, d}

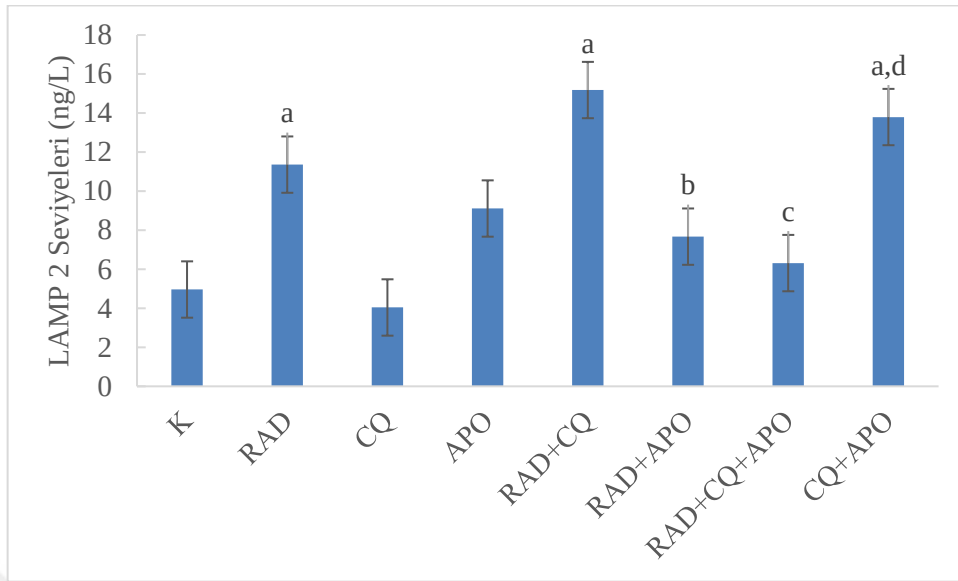
* Ortalama ± Standart Sapma.

^a K grubundan farklı $p<0,001$.

^b RAD grubundan farklı $p<0,05$.

^c RAD + CQ grubundan farklı $p<0,001$.

^d CQ grubundan farklı $p<0,001$.



Şekil 4. 48: İnce Bağırsak Dokusu LAMP 2 Seviyeleri (ng/L), (ortalama $\pm$ standart sapma).

4.3.3. Kaspaz-3 Seviyelerine Ait Bulgular

Yaptığımız incelemeler sonucunda elde ettiğimiz verilere göre grupların ince bağırsak Kaspaz-3 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (Tablo 4.6). RAD, RAD+APO ve RAD+CQ+APO gruplarında ($p < 0.01$), RAD+CQ grubunda ($p < 0.001$) ve CQ+APO grubunda ($p < 0.05$) K grubuna göre anlamlı artış gözlenirken, CQ grubunda K grubuna göre anlamsız artış gözlenmiştir. APO grubunda ise K grubuna benzer seviyeler gözlenmiştir. RAD + CQ grubunda ise RAD grubuna benzer seviyeler gözlenirken, RAD+APO grubunda RAD grubuna göre anlamsız azalış gözlenmiştir. RAD+CQ+APO grubunda RAD+CQ grubuna göre anlamsız bir azalma gözlenmiştir. CQ + APO grubunda ($p < 0,05$) ise CQ grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Tablo 4.6: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak Kaspaz-3 seviyeleri.

Gruplar	Kaspaz-3 seviyeleri (ng/ml) *
K	0,10±0,05
RAD	0,23±0,01 ^a
CQ	0,11±0,05
APO	0,10±0,03
RAD+CQ	0,23±0,06 ^b
RAD+APO	0,20±0,06 ^a
RAD+CQ+APO	0,20±0,06 ^a
CQ+APO	0,22±0,11 ^{c,d}

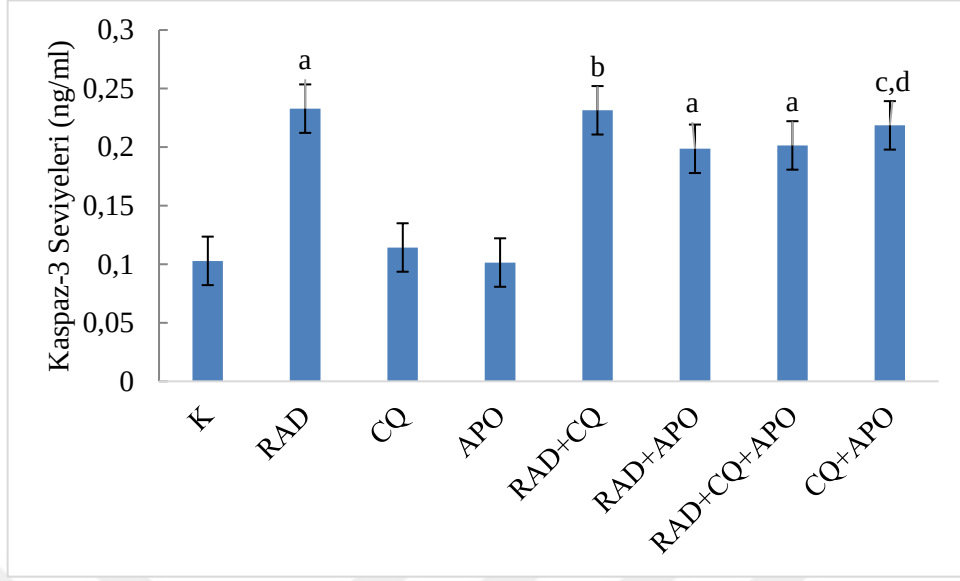
* Ortalama ± Standart Sapma.

^a K grubundan farklı p<0,01.

^b K grubundan farklı p<0,001.

^c K grubundan farklı p<0,05.

^d CQ grubundan farklı p<0,05.



Şekil 4. 49: İnce Bağırsak Dokusu Kaspaz-3 Seviyeleri (ng/ml), (ortalama $\pm$ standart sapma).

4.3.4. BCL-2 Seviyelerine Ait Bulgular

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler incelendiğinde grupların ince bağırsak BCL-2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlenmiştir (Tablo 4.7). RAD grubunda ($p < 0,05$) K grubuna göre anlamlı azalma gözlenirken, RAD+APO, RAD+CQ+APO ve CQ+APO gruplarında ($p < 0,05$), K grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir. CQ ve RAD+CQ gruplarında K grubuna göre anlamsız azalma gözlenirken APO grubunda K grubuna göre anlamsız artış gözlenmiştir. RAD+CQ grubunda RAD grubuna benzer seviyeler gözlenirken, RAD+APO grubunda ($p < 0,001$) RAD grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. RAD+CQ+APO grubunda ($p < 0,001$) RAD+CQ grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir. CQ + APO grubunda ($p < 0,01$) ise CQ grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir.

Tablo 4.7: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak BCL-2 seviyeleri.

Gruplar	BCL-2 seviyeleri (ng/ml) *
K	0,09±0,04
RAD	0,05±0,02 ^a
CQ	0,08±0,02
APO	0,11±0,09
RAD+ CQ	0,04±0,04
RAD+ APO	0,13±0,07 ^{a,b}
RAD+ CQ+APO	0,14±0,02 ^{a,c}
CQ+APO	0,16±0,06 ^{a,d}

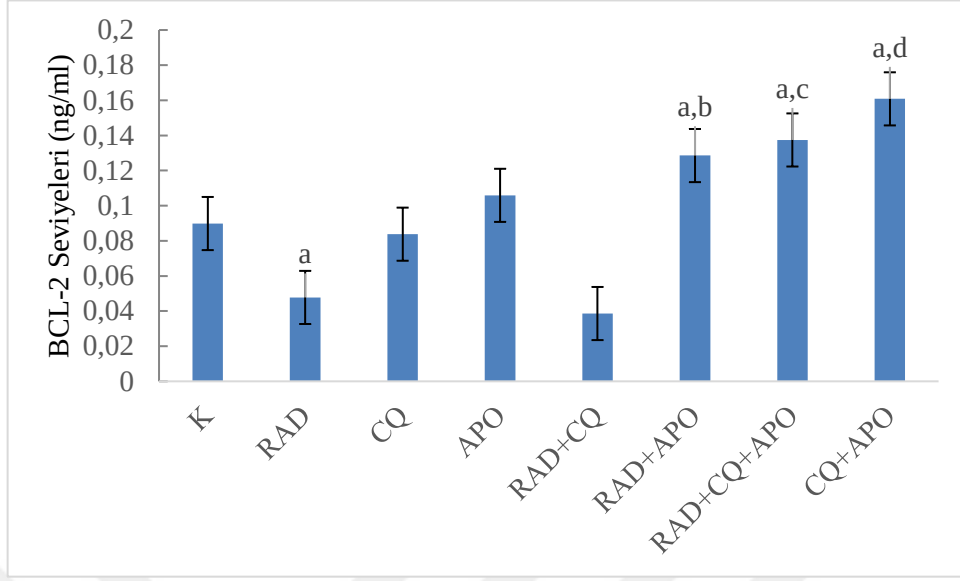
* Ortalama ± Standart Sapma.

^a K grubundan farklı p<0,05.

^b RAD grubundan farklı p<0,001.

^c RAD + CQ grubundan farklı p<0,001.

^d CQ grubundan farklı p<0,01.



Şekil 4. 50: İnce Bağırsak Dokusu BCL-2 Seviyeleri (ng/ml), (ortalama $\pm$ standart sapma).

4.3.5. MPO Seviyelerine Ait Bulgular

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler incelendiğinde grupların ince bağırsak MPO değerleri birbiri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (Tablo 4.8). RAD, RAD + CQ + APO, CQ + APO gruplarında ($p < 0,001$) ve RAD+CQ ve RAD+APO gruplarında ($p < 0,01$) K grubuna göre anlamlı artış gözlenirken, CQ ve APO gruplarında K grubuna göre anlamsız artış gözlenmiştir. RAD+CQ grubunda RAD grubuna göre anlamsız artış gözlenirken, RAD+APO grubunda RAD grubuna göre anlamsız azalma gözlenmiştir. RAD+CQ+APO grubunda RAD + CQ grubuna göre anlamsız azalma gözlenmiştir. CQ + APO grubunda ($p < 0,001$) ise CQ grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir.

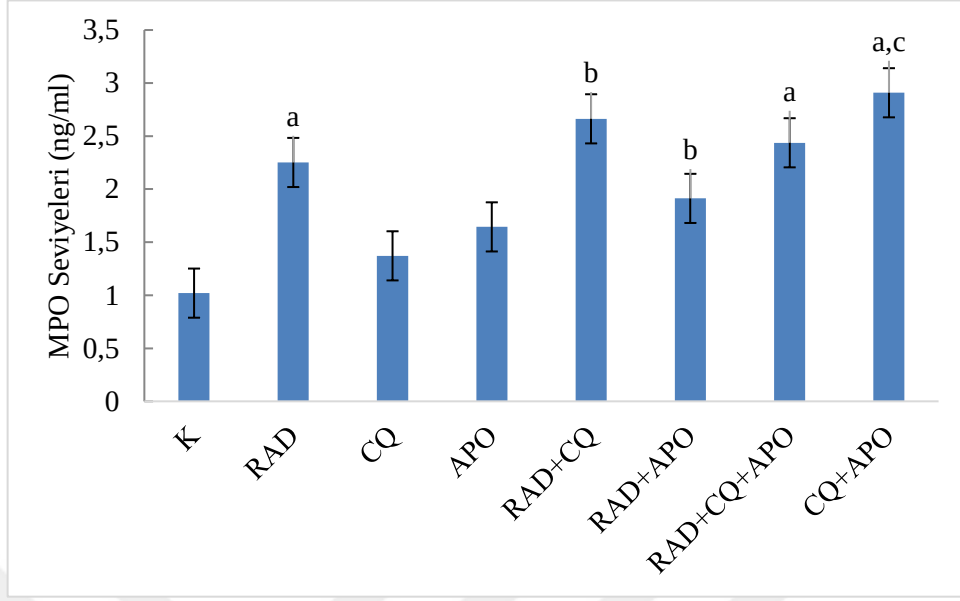
Tablo 4.8: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak MPO seviyeleri.

Gruplar	MPO seviyeleri (ng/ml) *
K	1,02±0,47
RAD	2,25±0,53 ^a
CQ	1,37±0,35
APO	1,64±0,78
RAD+CQ	2,66±1,26 ^b
RAD+APO	1,91±0,53 ^b
RAD+ CQ+APO	2,44±0,42 ^a
CQ+APO	2,91±0,75 ^{a,c}

^a K grubundan farklı p<0,001.

^b K grubundan farklı p<0,01.

^c CQ grubundan farklı p<0,001.



Şekil 4. 51: İnce Bağırsak Dokusu MPO Seviyeleri (ng/ml), (ortalama $\pm$ standart sapma).

4.3.6. NOX Seviyelerine Ait Bulgular

Yaptığımız çalışma sonucunda elde edilen verilere incelendiğinde grupların ince bağırsak NOX değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (Tablo 4.9). RAD, RAD+CQ, RAD+APO, RAD+CQ+APO, CQ+APO gruplarında ($p<0,001$) ve CQ grubunda ($p<0,05$) K grubuna göre anlamlı artış gözlenirken, APO grubunda K grubuna göre anlamsız artış gözlenmiştir. RAD+CQ grubunda RAD grubuna göre anlamsız artış gözlenirken, RAD+APO grubunda RAD grubuna göre anlamsız azalma gözlenmiştir. RAD+CQ+APO grubunda ($p<0,05$) RAD + CQ grubuna göre anlamlı azalış gözlenmiştir. CQ + APO grubunda ($p<0,001$) ise CQ grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir.

Tablo 4.9: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak NOX seviyeleri.

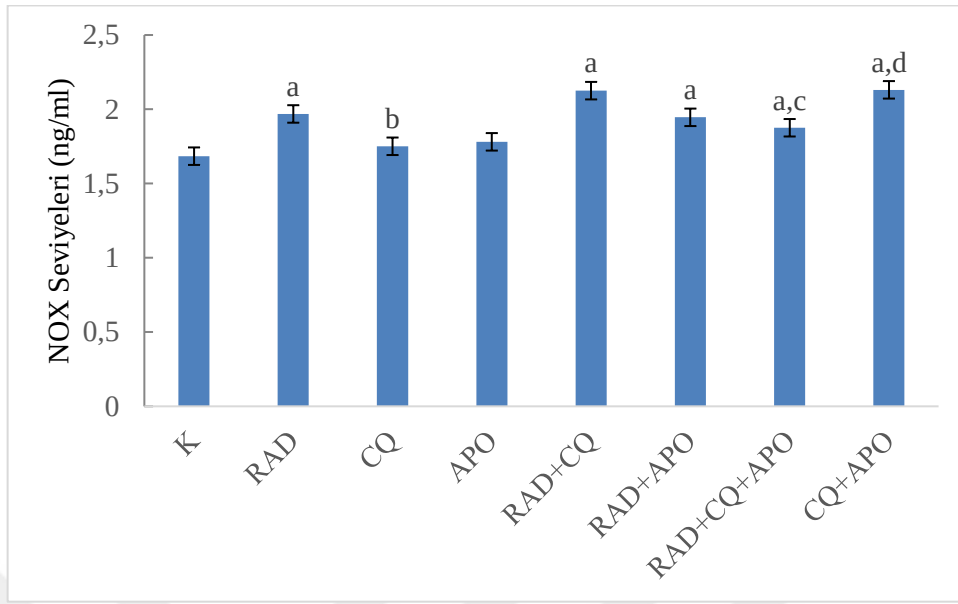
Gruplar	NOX seviyeleri (ng/ml) *
K	1,68±0,03
RAD	1,97±0,09 ^a
CQ	1,75±0,07 ^b
APO	1,78±0,13
RAD+CQ	2,13±0,22 ^a
RAD+APO	1,94±0,12 ^a
RAD+CQ+APO	1,88±0,10 ^{a,c}
CQ+APO	2,13±0,15 ^{a,d}

^a K grubundan farklı p<0,001.

^b K grubundan farklı p<0,05.

^c RAD + CQ grubundan farklı p<0,05.

^d CQ grubundan farklı p<0,001.



Şekil 4. 52: İnce Bağırsak Dokusu NOX Seviyeleri (ng/ml), (ortalama $\pm$ standart sapma).

4.3.7. MDA Seviyelerine Ait Bulgular

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler incelendiğinde grupların ince bağırsak MDA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (Tablo 4.10). RAD grubunda ($p < 0,001$), RAD+CQ, RAD+CQ+APO ve CQ+APO gruplarında ($p < 0,05$) K grubuna göre anlamlı artış gözlenirken, RAD+APO grubunda K grubuna göre anlamsız artış gözlenmiştir. APO grubunda K grubuna göre anlamsız azalma gözlenirken, CQ grubunda K grubuna benzer seviyeler gözlenmiştir. RAD+CQ grubunda RAD grubuna anlamsız azalma gözlenirken, RAD+APO grubunda ($p < 0,01$) RAD grubuna göre anlamlı azalma gözlenmiştir. RAD+CQ+APO grubunda RAD+CQ grubuna göre anlamsız azalış gözlenmiştir. CQ + APO grubunda ($p < 0,05$) ise CQ grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir.

Tablo 4.10: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak MDA seviyeleri.

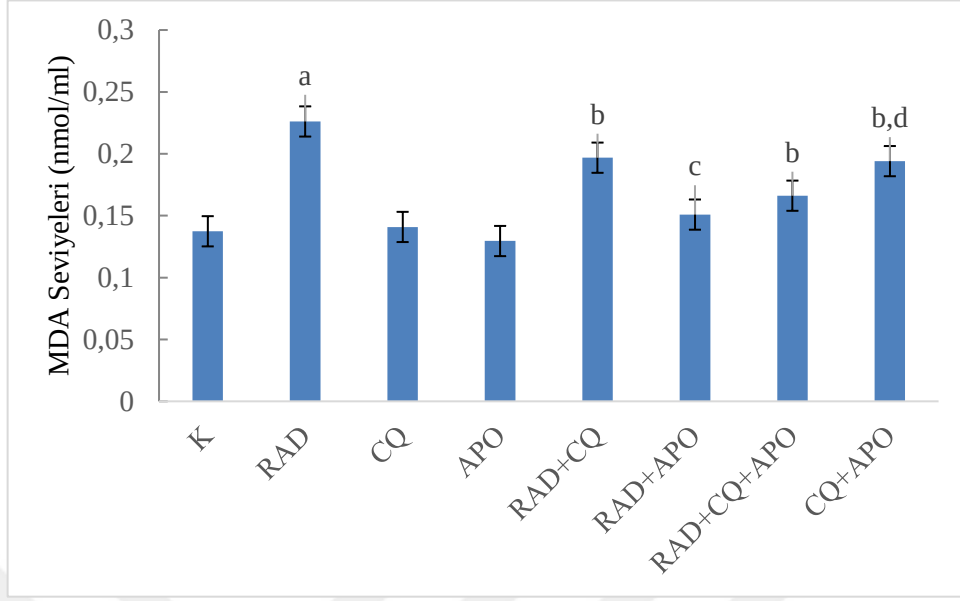
Gruplar	MDA seviyeleri (nmol/ml) *
K	0,14±0,02
RAD	0,23±0,03 ^a
CQ	0,14±0,03
APO	0,13±0,04
RAD+ CQ	0,20±0,07 ^b
RAD+ APO	0,15±0,04 ^c
RAD+ CQ+APO	0,16±0,02 ^b
CQ+APO	0,19±0,04 ^{b,d}

^a K grubundan farklı p<0,001.

^b K grubundan farklı p<0,05.

^c RAD grubundan farklı p<0,01.

^d CQ grubundan farklı p<0,05.



Şekil 4. 53: İnce Bağırsak Dokusu MDA Seviyeleri (nmol/ml), (ortalama $\pm$ standart sapma).

4.3.8. LPO Seviyelerine Ait Bulgular

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere göre grupların ince bağırsak LPO değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlenmiştir (Tablo 4.11). K grubu ve RAD, CQ, RAD+CQ ve RAD+CQ+APO gruplarına ait LPO değerleri birbiri ile karşılaştırıldığında, bu üç grubun LPO değerlerinin K grubuna göre anlamlı olarak arttığı saptanmıştır ($p < 0,0001$). K grubu ile APO, RAD+APO ve CQ+APO grupları ile karşılaştırıldığında ise APO verilen grupların LPO değerinde anlamsız bir artış olduğu görülmüştür. RAD grubu ile RAD+CQ ve RAD+APO gruplarının LPO değerleri karşılaştırıldığında RAD+CQ grubunda anlamsız bir azalma gözlenirken, RAD+APO grubunda ise anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır ($p < 0,0001$). RAD+CQ+APO grubunun LPO değeri ise RAD+CQ grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p < 0,0001$). CQ + APO grubunda ($p < 0,0001$) ise CQ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir.

Tablo 4.11: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak LPO değerleri.

Gruplar	LPO (nmol MDA/mg protein)*
K	2,71±0,65
RAD	15,71±3,53 ^a
CQ	11,19±1,76 ^a
APO	5,42±1,32
RAD+CQ	13,37±2,20 ^a
RAD+APO	5,71±1,12 ^b
RAD+CQ+APO	7,91±1,52 ^{a, c}
CQ+APO	5,30±1,25 ^d
P_{ANOVA}	0,0001

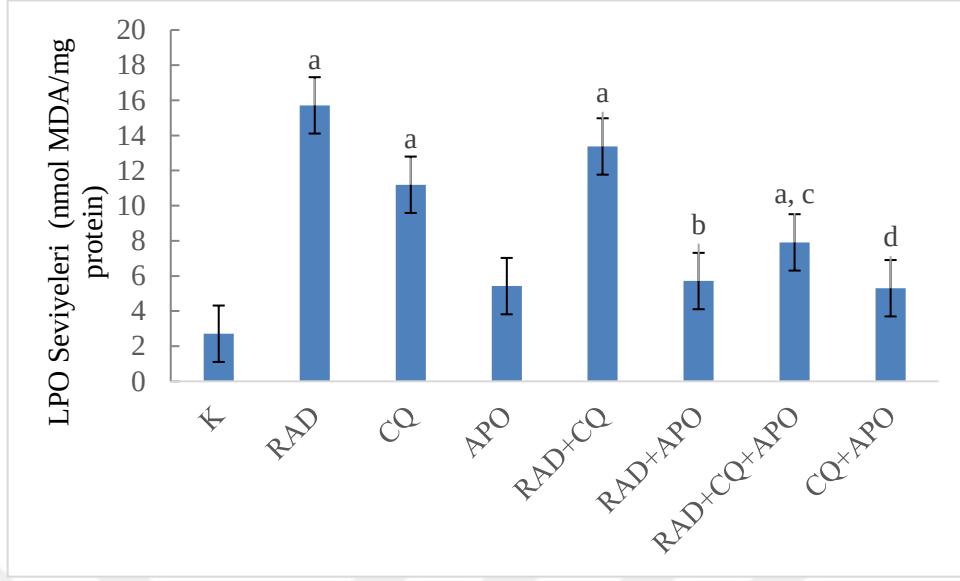
*Ortalama ± Standart Sapma.

^a K grubundan farklı p<0,0001.

^b RAD grubundan farklı p<0,0001.

^c RAD + CQ grubundan farklı p<0,0001.

^d CQ grubundan farklı p<0,0001.



Şekil 4. 54: İnce Bağırsak Dokusu LPO Seviyeleri (nmolMDA/mg protein), (ortalama $\pm$ standart sapma).

4.3.9. TAK Seviyelerine Ait Bulgular

Yaptığımız incelemeler sonucunda elde ettiğimiz verilere göre grupların ince bağırsak TAK değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (Tablo 4.12). K grubuna ait TAK değerleri, RAD grubu ($p < 0,05$) ve RAD+CQ grubu ($p < 0,01$) ile karşılaştırıldığında TAK değerlerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. K grubu CQ grubuna ait TAK değerleri ile karşılaştırıldığında TAK değerinin anlamsız olarak azaldığı, oysa K grubu ile APO TAK değerleri karşılaştırıldığında benzer seviyeler gözlemlendiği, RAD+APO ve CQ+APO gruplarına ait TAK değerleri karşılaştırıldığında ise anlamsız olarak arttığı ve RAD+CQ+APO grubuna ait TAK değerleri karşılaştırıldığında ise anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. RAD ve RAD+CQ gruplarına ait TAK değerleri karşılaştırıldığında RAD+CQ grubunun TAK değerlerinin anlamsız olarak azaldığı gözlenirken, RAD ve RAD+APO gruplarına ait TAK değerleri karşılaştırıldığında RAD+APO grubunun TAK değerlerinin anlamlı olarak arttığı saptanmıştır ($p < 0,05$). RAD+CQ grubu ve RAD+CQ+APO grubunun TAK değerleri birbiri ile karşılaştırıldığında RAD+CQ+APO grubunun TAK değerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p < 0,0001$). CQ + APO grubunda ise CQ grubuna kıyasla anlamsız bir artış gözlenmiştir.

Tablo 4.12: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak TAK değerleri.

Gruplar	TAK ($\mu\text{mol Trolox/g protein}$)*
K	128,90 $\pm$ 21,87
RAD	75,33 $\pm$ 8,66 ^a
CQ	119,40 $\pm$ 28,37
APO	128,30 $\pm$ 31,43
RAD+CQ	67,03 $\pm$ 24,34 ^b
RAD+APO	130,60 $\pm$ 23,37 ^c
RAD+CQ+APO	186,60 $\pm$ 54,30 ^{b, d}
CQ+APO	130,70 $\pm$ 28,08
P_{ANOVA}	0,0001

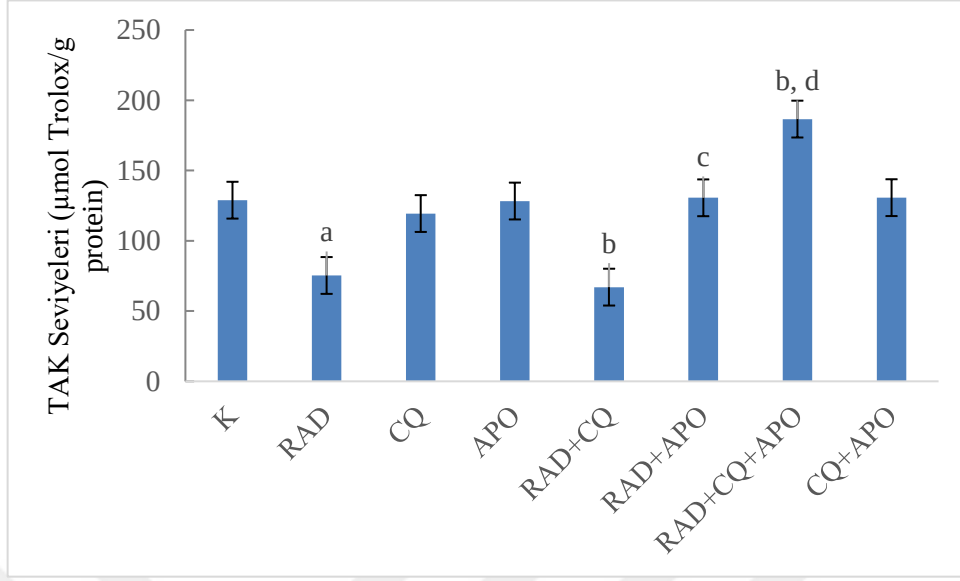
* Ortalama $\pm$ Standart Sapma.

^a K grubundan farklı $p < 0,05$.

^b K grubundan farklı $p < 0,01$.

^c RAD grubundan farklı $p < 0,05$.

^d RAD + CQ grubundan farklı $p < 0,0001$.



Şekil 4. 55: İnce Bağırsak Dokusu TAK Seviyeleri (μmol Trolox/g protein), (ortalama ± standart sapma).

4.3.10. GSH Seviyelerine Ait Bulgular

Yaptığımız incelemeler sonucunda elde ettiğimiz verilere göre grupların ince bağırsak GSH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu bulunmuştur (Tablo 4.13). K grubu ile kıyaslandığında RAD grubuna ait GSH değerlerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p < 0,05$). K grubu ile CQ, APO, RAD+CQ ve CQ+APO gruplarına ait GSH değerleri karşılaştırıldığında ise bu grupların GSH değerlerinin anlamsız olarak azaldığı gözlenirken, RAD+APO grubu K grubu ile kıyaslandığında GSH değerlerinin anlamsız olarak arttığı saptanmıştır. K grubu ile kıyaslandığında RAD+CQ+APO grubuna ait GSH değerlerinin anlamlı olarak arttığı saptanmıştır ($p < 0,0001$). RAD grubu ile kıyaslandığında RAD+CQ ($p < 0,05$) ve RAD+APO ($p < 0,0001$) gruplarına ait GSH değerlerinin anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. RAD+CQ+APO grubuna ait GSH değeri ile RAD+CQ grubu karşılaştırıldığında GSH değerinde anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($p < 0,0001$). CQ + APO grubunda ise CQ'ya göre anlamsız artış gözlenmiştir.

Tablo 4.13: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak GSH değerleri.

Gruplar	GSH (nmol GSH/mg protein)*
K	7,57±1,26
RAD	4,60±0,98 ^a
CQ	6,88±1,88
APO	6,87±1,67
RAD+CQ	7,17±1,62 ^b
RAD+APO	9,12±1,64 ^c
RAD+CQ+APO	12,66±2,06 ^{d, e}
CQ+APO	6,94±0,48
P_{ANOVA}	0,0001

*Ortalama ± Standart Sapma.

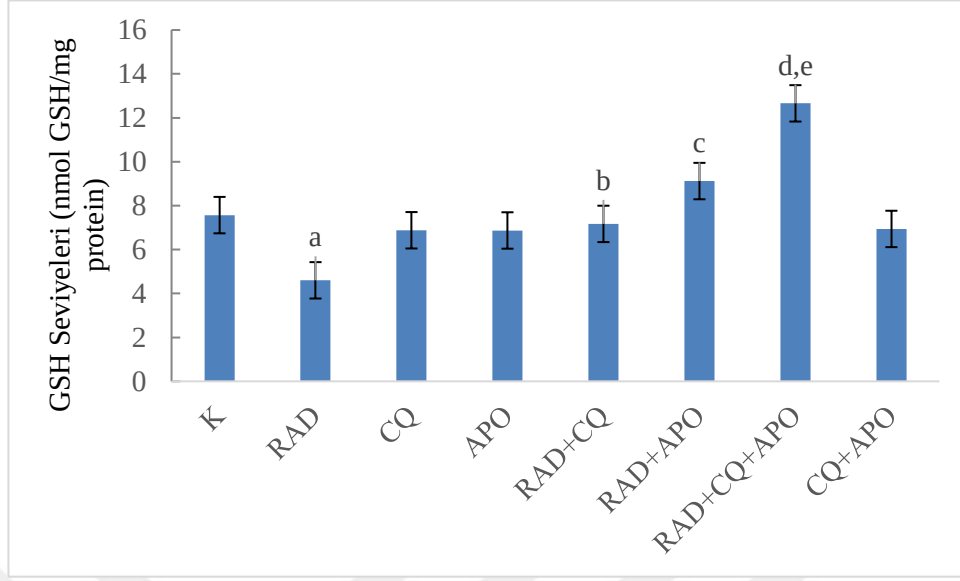
^a K grubundan farklı p<0,05.

^b RAD grubundan farklı p<0,05.

^c RAD grubundan farklı p<0,0001.

^d K grubundan farklı p<0,0001.

^e RAD + CQ grubundan farklı p<0,0001.



Şekil 4. 56: İnce Bağırsak Dokusu GSH Seviyeleri (nmol GSH/mg protein), (ortalama $\pm$ standart sapma).

4.3.11. KAT Aktivitelerine Ait Bulgular

Yaptığımız incelemeler sonucunda elde ettiğimiz verilere göre grupların ince bağırsak KAT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (Tablo 4.14). K grubu ile RAD grubunun KAT aktivite değerleri birbiri ile karşılaştırıldığında RAD grubunda K grubuna göre KAT aktivite değerinde anlamlı olarak bir azalma olduğu görülmüştür ($p < 0,001$). CQ ve APO gruplarının KAT aktivitelerinin K grubuna göre anlamsız olarak azaldığı gözlenirken, RAD+CQ, RAD+APO ve CQ+APO gruplarının KAT aktivitelerinin K grubuna göre anlamsız olarak arttığı ve RAD+CQ+APO grubunun ($p < 0,05$) anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. RAD grubu ile RAD+CQ ve RAD+APO gruplarının KAT aktiviteleri karşılaştırıldığında bu grupların KAT aktivitelerinde RAD grubuna göre anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır ($p < 0,0001$). RAD+CQ+APO grubunun KAT aktivitesi ise RAD+CQ grubuna göre anlamsız olarak arttığı bulunmuştur. CQ + APO grubunda ($p < 0,05$) ise CQ'ya göre anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Tablo 4.14: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak KAT aktivite değerleri.

Gruplar	KAT (U/mg protein)*
K	3,28±0,13
RAD	1,37±0,01 ^a
CQ	2,96±0,23
APO	2,75±0,61
RAD+CQ	3,73±0,67 ^b
RAD+APO	3,76±0,61 ^b
RAD+CQ+APO	4,71±0,40 ^c
CQ+APO	3,68±0,45 ^d
PANOVA	0,0001

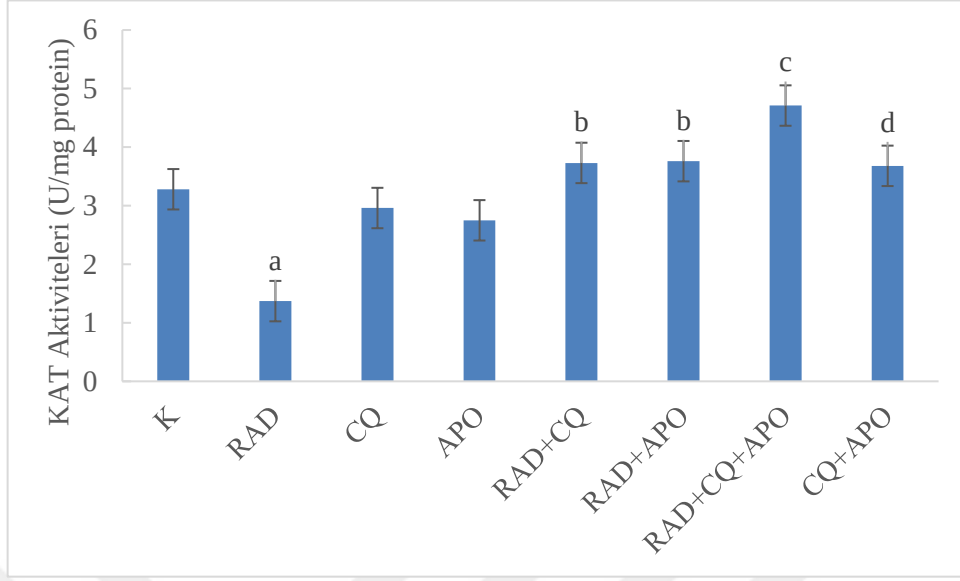
* Ortalama ± Standart Sapma.

^a K grubundan farklı p<0,001.

^b RAD grubundan farklı p<0,0001.

^c K grubundan farklı p<0,05.

^d CQ grubundan farklı p<0,05.



Şekil 4. 57: İnce Bağırsak Dokusu KAT Aktiviteleri (U/mg protein), (ortalama $\pm$ standart sapma).

4.3.12. SOD Aktivitelerine Ait Bulgular

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere göre grupların ince bağırsak SOD değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (Tablo 4.15). K grubu ile kıyaslandıklarında RAD ve APO gruplarına ait SOD aktivitelerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p < 0,001$). K grubu ile karşılaştırıldığında CQ, RAD+CQ, RAD+APO ve CQ+APO gruplarına ait SOD aktivitelerinin anlamsız olarak azaldığı, RAD+CQ+APO grubuna ait SOD aktivitesinin ise anlamsız olarak arttığı görülmüştür. RAD grubu ile RAD+CQ ($p < 0,001$) ve RAD+APO ($p < 0,0001$) gruplarının SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında bu iki grubun SOD aktivitelerinde RAD grubuna göre anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. RAD+CQ+APO grubuna ait SOD aktivitesi ile RAD+CQ grubu birbiri ile karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde anlamsız bir artış olduğu saptanmıştır. CQ + APO grubunda ise CQ'ya anlamsız bir azalış gözlenmiştir.

Tablo 4.15: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak SOD aktivite değerleri.

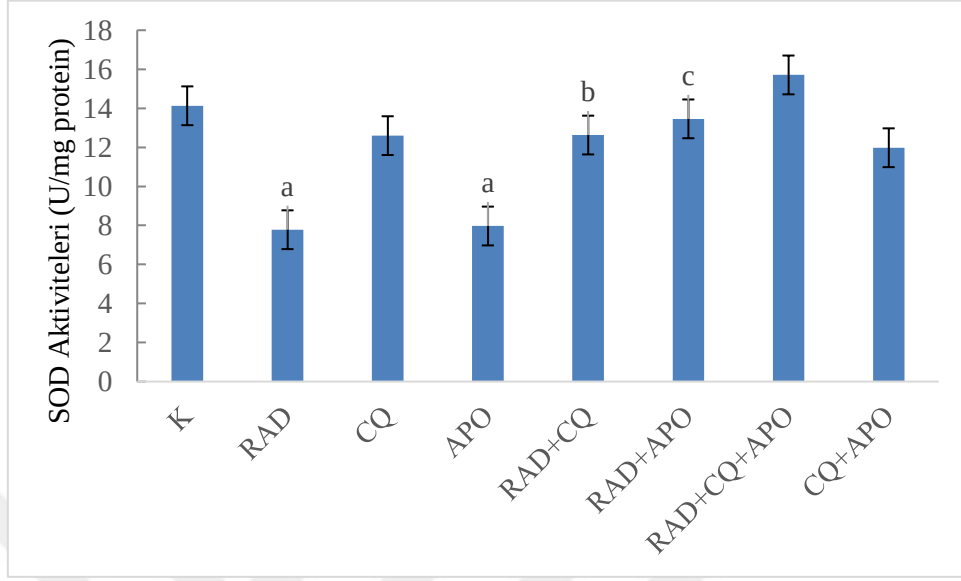
Gruplar	SOD (U/mg protein)*
K	14,13±1,96
RAD	7,78±1,42 ^a
CQ	12,60±1,87
APO	7,97±1,80 ^a
RAD+CQ	12,63±1,68 ^b
RAD+APO	13,46±3,27 ^c
RAD+CQ+APO	15,71±3,73
CQ+APO	11,98±1,87
P_{ANOVA}	0,0001

*Ortalama ± Standart Sapma.

^a K grubundan farklı p<0,001.

^b RAD grubundan farklı p<0,001.

^c RAD grubundan farklı p<0,0001.



Şekil 4. 58: İnce Bağırsak Dokusu SOD Aktiviteleri (U/mg protein), (ortalama $\pm$ standart sapma)

4.3.13. TNF- α Seviyelerine Ait Bulgular

İnce bağırsak dokularında yapılan biyokimyasal incelemeler sonucunda elde edilen istatistiksel verilere göre grupların ince bağırsak TNF- α değerleri birbiri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu bulunmuştur (Tablo 4.16). K grubu ile kıyaslandığında RAD ($p < 0,0001$) ve RAD+CQ ($p < 0,05$) gruplarına ait TNF- α değerlerinin anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. CQ, APO, RAD+APO ve CQ+APO gruplarına ait TNF- α değerlerinin K grubuna göre anlamsız olarak arttığı ve RAD+CQ+APO grubunun ($p < 0,05$) TNF- α değerinin ise K grubuna göre anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. RAD ile kıyaslandıklarında RAD+CQ ($p < 0,01$) ve RAD+APO ($p < 0,0001$) gruplarına ait TNF- α değerlerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. RAD+CQ grubu ve RAD+CQ+APO grubunun TNF- α değerleri birbiri ile karşılaştırıldığında, RAD+CQ+APO grubunun TNF- α değerinin anlamsız olarak azaldığı görülmüştür. CQ + APO grubunda ise CQ'ya göre anlamsız bir artış gözlenmiştir.

Tablo 4.16: Kontrol ve deney grubu sıçanların ince bağırsak TNF- α değerleri.

Gruplar	TNF- α (pg/mg protein)*
K	57,99 $\pm$ 3,30
RAD	166,50 $\pm$ 24,88 ^a
CQ	73,93 $\pm$ 23,01
APO	65,11 $\pm$ 14,26
RAD+CQ	106,10 $\pm$ 18,21 ^{b, c}
RAD+APO	63,65 $\pm$ 19,90 ^d
RAD+CQ+APO	65,55 $\pm$ 3,20 ^e
CQ+APO	76,14 $\pm$ 24,19
P_{ANOVA}	0,0001

* Ortalama $\pm$ Standart Sapma.

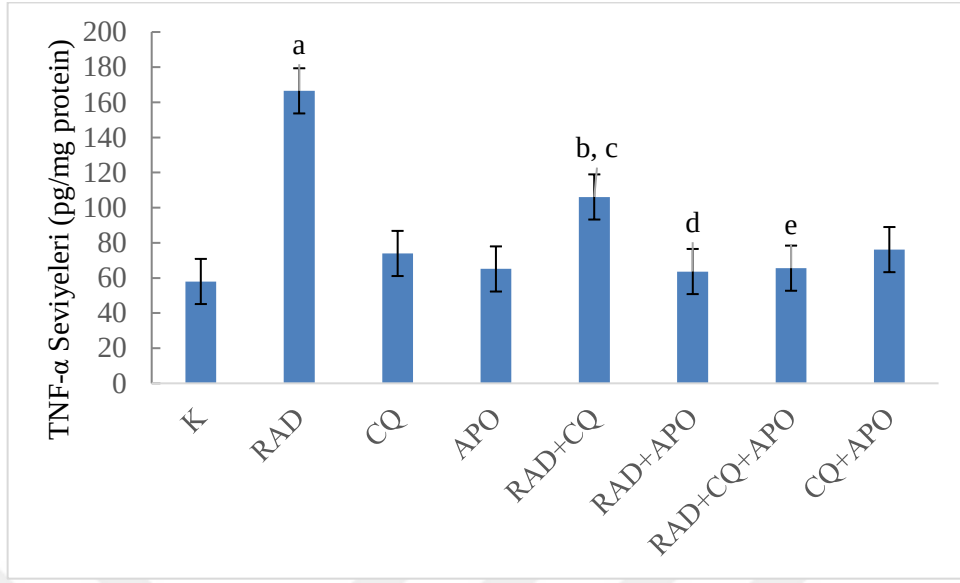
^a K grubundan farklı p<0,0001.

^b K grubundan farklı p<0,05.

^c RAD grubundan farklı p<0,01.

^d RAD grubundan farklı p<0,0001.

^e K grubundan farklı p<0,05.



Şekil 4. 59: İnce Bağırsak Dokusu TNF- α Seviyeleri (pg/mg protein), (ortalama $\pm$ standart sapma).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüm canlılar yaşamları boyunca radyasyona maruz kalırlar. Canlı sistemlerde bir dizi hasara sebep olan radyasyondan çok çeşitli alanlarda faydalanılır. Yaygın olarak tıpta tanı ve tedavi amacıyla kullanılmasının yanı sıra kayaların yaşının tespit edilmesi, endüstride kalınlık ölçümleri, yeni tohum çeşitlerinin elde edilmesi, sterilizasyon, elektrik enerjisinin elde edilmesi, denizaltı ve uzay araçlarının hareketinin sağlanması gibi çok çeşitli kullanım alanlarına sahiptir (Özalpan, 2001). Bu noktada önemli olan radyasyonu doğru doz, süre ve amaç için güvenli şekilde kullanmaktır.

Radyasyonun çeşidine göre biyolojik sistemlerdeki etkileri de farklıdır. İyonize radyasyonu iyonize olmayan radyasyondan ayıran temel özellik çarptığı maddede yüklü parçacıklar (iyonlar) oluşturabilmesidir. İyonizan radyasyonun canlı sistemlerde meydana getirdiği iyonlaşma ve uyarılma sonucunda bir saniyeden kısa sürede meydana gelen erken etkiler veya günler, aylar, bazen yıllar sonra ortaya çıkan geç etkiler gözlenebilir. İyonize radyasyonun canlı organizmalar üzerindeki biyolojik etkileri doku tipine, ışınlama şekline, doza ve süreye bağlı olarak değişir (Şenlik, 2010). İyonize radyasyon direkt ve indirekt etkiler oluşturabilir. Direkt etki, biyolojik sistemlerdeki atomların üzerine doğrudan etki ederek o molekülün yapısını bozarak aktivasyon kaybına ya da fonksiyon değişikliğine sebep olur. İndirekt etki ise organizmanın yapısında bulunan suyun iyonizasyonu sonucu oluşan serbest radikallerin aracılık etmesiyle oluşur (Tahamtan ve diğ. 2015). Sağlıklı organizmalarda serbest radikaller ile antioksidanlar birbirini dengeler. Serbest radikallerin artması sonucu bu dengenin bozulması oksidatif strese sebep olur. ROT oluşumu radyasyon maruziyetinden kaynaklı hücre hasarının gelişmesinde önemli rol oynar. Başta DNA olmak üzere, lipidler ve proteinler iyonize radyasyon etkisi ile oluşmuş serbest radikaller tarafından zarar görür (Şener ve diğ., 2006).

Kanser tedavisinde radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler 120 yıldır başarı ile uygulanan en yaygın yöntemlerdir (Theis ve diğ., 2010). Pelvik radyoterapi alan hastaların yaklaşık %50'sinin yaşamları gastrointestinal yan etkiler yüzünden olumsuz etkilenmektedir (Stacey ve Green, 2014). Gastrointestinal sistem hızlı mitotik aktivitesi sebebiyle vücutta kemik iliğinden sonra radyasyonun etkilerine karşı en hassas olan bölümdür (Bismar ve Sinicrope, 2002; Odabaşı ve diğ., 2014). Radyoterapinin yol açtığı gastrointestinal patolojilerin oluşumundan

korunmak veya bu etkileri azaltmak için birçok metot önerilmiştir. Bu yaklaşımlardan biri antioksidanların kullanımıdır (Stacey ve Green, 2014).

APO, NOX'un en çok kullanılan inhibitörüdür (Petrônio ve diğ., 2013). NOX inhibisyonu yolu ile ROT oluşumunu dolayısıyla oksidatif hasarı azaltarak antioksidan etki gösterir (Tanriverdi ve diğ., 2017; Gimenes ve diğ., 2018). Fagositozu etkilemediğinden polimorfnükleer nötrofillerin diğer savunma mekanizmalarını engellemez (Stolk ve diğ., 1994). Bu nedenle APO, NOX fonksiyonunun düzenlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Önemli bir antioksidan olmasının yanı sıra APO'nun anti inflamatuvar etkilerini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Hwang ve diğ., 2019; Yang ve diğ., 2020). APO'nun radyasyonun sebep olduğu hasarı hafiflettiği çeşitli organlar üzerinde yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Sun ve diğ., 2013; Şener ve diğ., 2015).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, radyasyonun hücre bölünmesini duraklatma veya apoptotik hücre ölümüne sebep olmanın yanı sıra hücre sağ kalımını devam ettiren bir mekanizma olan otofajiyi uyarabildiğini de göstermiştir. Bu durum sağlıklı dokular için bir avantaj olsa da özellikle kanser tedavisinde radyasyonun etkinliğini ciddi anlamda azaltmaktadır. Radyoterapinin amacı kanser hücrelerini ortadan kaldırmaktır. İyonize radyasyonun otofajiyi arttırdığını gösteren birçok araştırma yapılmıştır. Radyasyona yanıt olarak hücrelerin otofaji ile sağ kalımının belirgin bir biçimde artması tedaviyi kısıtlayan, radyoterapinin etkinliğini azaltan bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (Yao ve diğ., 2003; Ye ve diğ., 2016). Yapılan çalışmalarda otofajinin genetik veya farmakolojik inhibisyonunun kanserli ve normal dokularda radyasyonun etkilerini arttırdığı gösterilmiştir (Wilson ve diğ., 2011; Wang ve diğ., 2018; Aga ve diğ., 2019; Compter ve diğ., 2021). Bu sebeple giderek artan çalışmalar otofaji inhibitörlerinin radyoterapiye ek olarak kullanılabilecek bir ilaç olabileceği görüşünü destekler niteliktedir (Chen ve diğ., 2015; Sehgal ve diğ., 2015). Araştırmalar bu inhibitörlerin tedavideki başarıyı artırdığını gösterse de bu ikili tedavinin sağlıklı dokular üzerinde nasıl etkileri olduğu henüz netlik kazanmış değildir.

CQ uzun yıllardır sıtma tedavisinde kullanılan bir ilaç olmasının yanı sıra anti inflamatuvar etkisi sebebiyle romatoid artrit ve lupus eritematozus tedavisinde de kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde halen en etkili tedavi yöntemlerinden biri olan radyoterapinin etkinliğinin azalmasında otofajinin bir sağkalım mekanizması olarak rolü olduğu belirlenmiştir. Otofajinin; meme, prostat ve kolon kanserlerindeki inhibisyonunun bu hücrelerin radyoterapiye ölüm

yanıtını arttırdığı gösterilmiştir (Mathew ve diğ., 2007). Otofajiyi inhibe ettiğinin keşfedilmesiyle CQ dikkatleri üzerine çekmiş, başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisindeki rolü çalışılmış ve CQ'nun tedavide radyoterapinin etkisinin arttırılması için kullanılabileceği düşünülmüştür (Kim ve diğ., 2011; Yuan ve diğ., 2015). Sıtma tedavisinde kullanılması, uzun dönemde belirgin yan etkilerin gözlenmemesi otofaji inhibitörleri arasında CQ'yu ön plana çıkartmıştır (Degtyarev ve diğ., 2008; Lu ve diğ., 2008). CQ ile muamele edilen tümör hücrelerinin otofaji yapamadığında enerjisini tüketip öldüğü ortaya konmuştur (Solomon ve Lee, 2009; Sehgal ve diğ., 2015; Pascolo, 2016; Plantone ve Koudriavtseva, 2018). Yapılan bir çalışmada CQ'nun otofajiyi inhibe ederek glioblastoma tümör hücrelerinin ölmesini sağladığı gösterilmiştir. Sonuç olarak CQ, tümör hücrelerinin sağ kalım mekanizmasını inhibe ederek hastanın sağ kalım süresini arttırmıştır (Koukourakis ve diğ., 2016). CQ'nun, otofajiyi inhibe etmesinin yanı sıra DNA tamir kapasitesini zayıflattığı, hücre siklusunu durdurduğu ve apoptozu tetiklediği de gösterilmiştir (Eng ve diğ., 2016; Grimaldi ve diğ., 2015; Ye ve diğ., 2016).

Son yıllarda otofaji inhibitörü olarak çokça çalışılan CQ'nun en iyi bilinen etkisi antiparaziter özelliği olmakla beraber aynı zamanda antiviral (Borges ve diğ., 2013; Farias ve diğ., 2015), antibakteriyel (Kersh, 2013; Dey ve Bishayi, 2015) ve antifungal (Weber ve diğ., 2000) etkilere de sahip olduğu gösterilmiştir. Antiviral ve antienflamatuvar özellikleri sebebiyle Covid-19'un semptomik tedavisinde kullanılmıştır (Cortegiani ve diğ., 2020). Bu durum CQ'nun sağlıklı dokular üzerindeki etkilerinin anlaşılmasını daha da önemli bir hale getirmiştir.

Kanser hücrelerinin radyoterapiye direnç göstermelerinin bir yolu olarak kabul edilen otofajinin CQ ile inhibe edilmesi, tedaviyi başarılı kılan bu kombinasyonun olası yan etkilerinin araştırılması ve bu yan etkilerin en aza indirgenmesi için APO'nun bir antioksidan olarak nasıl rol oynayabileceği bu araştırmanın merak konusudur.

Radyasyonun ince bağırsak üzerindeki toksik etkilerinin araştırıldığı birçok çalışmada çeşitli histolojik hasarlar gözlenmiştir. Çağın ve diğ. (2016), tek doz 8 Gy radyasyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanların ince bağırsağında yaptıkları incelemeler sonucunda radyasyon grubunda lamina propreda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, mukoza epitelinde hafif dökülmeler ve bazı alanlarda kripta hücre kayıpları gözlemiştir. Ayrıca bu çalışmada PAS pozitif goblet hücre sayısında azalma ve PAS negatif goblet hücreleri tespit edilmiştir. Radyasyonun ince bağırsak üzerindeki etkilerini araştıran başka bir çalışmada tek doz 8 Gy

Radyasyon verilmiş Wistar albino sıçanların ince bağırsağındaki histolojik bulgular, çalışmamızda olduğu gibi, Howart ve arkadaşlarının (1996) histolojik hasar kriterleri uyarlanarak değerlendirilmiş, radyasyon grubu sıçanlarda histolojik hasar derecelerinin artış gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada gözlenen en belirgin hasar lamina propreada inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kısalmış ve kalınlaşmış villuslar, apoptotik cisimciklerdir (Khayyal ve diğ., 2019). Başka bir araştırmada ise tek doz 10 Gy radyasyon verilmiş Wistar albino sıçanlarda yine Howart ve arkadaşlarının (1996) kriterlerine göre histolojik hasar değerlendirilmiş, radyasyon grubu sıçanların ince bağırsak dokusunda villusların füzyonu, villus kaybı, lamina propreada şiddetli eozinofil ve nötrofil reaksiyonu, belirgin nükleer değişimler izlenmiş ve vaskular duvarlarda fibrinoid değişimlerin şiddetinin K grubuna göre arttığı gösterilmiştir (Pişkin ve diğ., 2018). Kim ve diğ.'nin (2018) yaptıkları bir çalışmada sıçan ince bağırsağının epitel hücre kültürüne (IEC-6) ve farelere uygulanan 12 Gy radyasyonun kripta sayısında azalmaya ve villusların boylarında kısaltmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Başka bir araştırmada 5 gün boyunca günde 7,5 Gy radyasyon verilen sıçanların ince bağırsağında kripta yapısında belirgin kayıplar, villuslarda sıklıkla epiteliyal atrofi, villus dejenerasyonu ve kısalması, lamina propreada inflamatuvar hücre infiltrasyonu gösterilmiştir (Fernández-Gil ve diğ., 2017). Eltahawy ve diğ.'nin (2016) yaptığı çalışmada ise 4 hafta süreyle haftada bir 2 Gy olmak üzere toplam 8 Gy radyasyon verilen Wistar albino sıçanların ince bağırsağında yapılan histolojik incelemelerde radyasyon grubunda dejenere kripta bölgeleri, kripta bezlerinin azalması, farklılaşmamış (salgı granülü içermeyen) kolon epitel hücreleri ve villus atrofisi gözlenmiştir. Bir diğer araştırmada 5 Gy radyasyon verilen Wistar albino sıçanların ince bağırsağında villus sayısında ve yüksekliğinde azalma, kripta hücrelerinin sayısında azalma, epiteliyal ve goblet hücrelerinde hasar gözlenmiştir (Akpolat diğ., 2009).

Çeşitli araştırmalar sıçanlara yalnızca APO uygulamasının ince bağırsak histolojisinde belirgin bir değişime sebep olmadığını histolojik görünümünün K grubuna benzer olduğunu göstermiştir. 8 Gy tek doz radyasyona maruz bırakılan sıçanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, mukoza epitelinde hafif dökülmeler, bazı alanlarda kripta kaybı gibi histolojik hasarlar tespit edilmiş, radyasyon verilmeden önce APO uygulanan kombine grupta, APO'nun radyasyonun oluşturduğu hasara karşı histolojik hasar derecelerini azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada APO ile kombine grubun PAS pozitif goblet hücre sayısında radyasyon verilen gruba göre bir artış tespit edilmiştir (Çağın ve diğ., 2016). Deng ve diğ.'nin (2016) yaptığı bir çalışmada akut pankreatitis ile ilişkili ince bağırsak mukozal bariyer hasarında,

hasardan 30 dakika önce femoral venden verilen 50 mg/kg APO'nun etkileri araştırılmış, hasarlı grupta gözlenen ödem, nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi histolojik bulguların, APO ile kombine edilen grupta belirgin bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (Deng ve diğ., 2016). Başka bir çalışmada deneysel inflamatuvar bağırsak hastalığı (ülseratif kolit, Chron hastalığı) oluşturulan sıçanlarda kısalmış villuslar, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, epiteliyal kayıplar, nekroz gibi histolojik hasarlar gözlenmiş, 50 mg/kg/gün APO uygulanan kombine gruplarda bu histolojik hasarların derecelerinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada hasar grubu sıçanların ince bağırsağının villus ve kriptalarında PAS pozitif goblet hücre sayısında azalma, APO ile kombine edilen grupta artış tespit edilmiştir (Xie ve diğ., 2014). Abdelrahman ve diğ. (2005), iç kanamaya bağlı şok sonucu gelişen organ hasarlarında APO'nun histolojik olarak etkilerini incelemişler ve 3mg/kg APO'yu intraperitoneal olarak uyguladıkları gruplarda akciğer, karaciğer ve ince bağırsaktaki histolojik hasarın düzeldiğini göstermişlerdir.

Wang ve diğ.'nin (2019) yaptığı bir çalışmada inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulan farelerde ortaya çıkan histolojik hasar derecelerinin, 1-6. günler arasında 60 mg/kg/gün CQ uygulanan kombine grupta azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada CQ grubu sıçanların ince bağırsak histolojisinin K grubuna benzer olduğu ortaya konmuştur (Wang ve diğ., 2019). Başka bir çalışmada deoksinivalenol diyeti yaptırılan domuzlarda meydana gelen ince bağırsak hasarını CQ'nun önemli ölçüde önlediği ortaya konmuştur. Bu çalışmada ileum ve jejunumda villus boyu, kriptada derinliği, duvar kalınlığı, goblet hücresi ve lenfosit sayısındaki değişimler histolojik olarak değerlendirilmiştir (Liao ve diğ., 2020).

Yaptığımız çalışmada histolojik hasar skoru belirlenirken önceki çalışmalara benzer hasar parametreleri kullanılmıştır. Çalışmamızda RAD grubuna ait bireylerin ince bağırsak dokusunun histolojik hasar görünümü, K grubu bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı bir artış belirlenmiştir. APO, CQ ve CQ+APO gruplarında K grubuna benzer olarak sağlıklı ince bağırsak dokusunun histolojik görünümü gözlenmiştir. RAD+CQ grubunda gözlenen hasar RAD grubuna kıyasla önemli ölçüde hafiftir ve gruplar karşılaştırıldığında anlamlı farklılık belirlenmiştir. RAD+APO grubunun histolojik hasar derecesi RAD grubuna göre, RAD+CQ+APO grubunun histolojik hasar derecesi ise RAD+CQ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Histolojik incelemelerimizin sonucunda, RAD'dan önce verilen CQ ve APO'nun, tek başlarına ve birlikte ince bağırsak dokusunda RAD kaynaklı oluşan histolojik hasarı önemli ölçüde azalttığı ortaya konmuştur. RAD, CQ ve APO'nun tek

başlarına ve ikili gruplar olarak etkileri literatürdeki çalışmalara benzerdir. RAD, CQ ve APO'nun üçlü kombinasyonu ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamış ve ilk kez çalışılmıştır.

PAS reaksiyonu dokuda karbonhidratların yeri ve miktarının belirlenmesinde kullanılan histolojik bir yöntemdir (Bancroft ve Stevens, 1982). Sağlıklı sıçanların ince bağırsağındaki absorptif hücreler apikal yüzeylerinde çizgili kenarı içerirler. Bu hücrelerin arasında yer alan goblet hücreleri ise, mukus salgılayan hücrelerdir. Goblet hücreleri ve çizgili kenar içeren hücreler histokimyasal olarak PAS reaksiyonu ile net bir şekilde gözlemlenir. İyonizan radyasyon ince bağırsaktaki glikokaliks yapısının bozulmasına sebep olur (McArdle ve diğ., 1986). Yapılan bir araştırmada radyasyona maruz bırakılan sıçanlara ait ince bağırsak dokularında goblet hücre sayısında dramatik bir düşüş gözlemlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada çizgili kenarın tamamen yok olduğunu gösterilmiştir (Kanter ve diğ., 2008).

Bizim çalışmamızda da literatürlerle uyumlu olarak RAD ve RAD+CQ gruplarında absorptif hücrelerin çizgili kenardaki PAS pozitif reaksiyon şiddetinde ve PAS pozitif reaksiyon veren goblet hücre sayısında K grubuna göre belirgin bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca bu gruplarda çizgili kenarların hemen üzerinde ve villuslar arası alanda şiddetli PAS pozitif reaksiyon gözlenmiştir. RAD+APO ve RAD+CQ+APO gruplarında PAS ile boyanan goblet hücrelerindeki artışın yanı sıra absorptif hücrelerin çizgili kenarlarındaki boyanma şiddetlerinde de RAD ve RAD+CQ gruplarına kıyasla önemli ölçüde artış belirlenmiştir. Ayrıca bu gruplarda villusların arasında ve çizgili kenarların üst kısmında gözlenen boyanma şiddetinde de önemli ölçüde azalmalar tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, APO'nun antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri sayesinde tüm histolojik hasar parametrelerinde koruyucu etkileri olduğunu söyleyebiliriz.

PCNA, DNA replikasyonunda rol oynayan bir proteindir (Tsurimoto, 1999). Uzun yıllardır PCNA ekspresyonunun belirlenmesinde monoklonal PCNA antikorları yaygın olarak kullanılmaktadır. Radyasyonun proliferasyonu azalttığı uzun yıllardır yapılan çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada sıçanlara verilen 14 Gy radyasyonun ince bağırsakta ve uygulanan 10 Gy radyasyonun sıçan ince bağırsağının epitel hücre kültüründe (IEC-6) PCNA pozitif hücre sayısını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Luo ve diğ., 2020). Başka bir çalışmada sıçan ince bağırsağının epitel hücre kültürüne (IEC-6) ve farelere uygulanan 12 Gy radyasyonun proliferasyonu azalttığı çeşitli yöntemler (BrDU-ihc, Ki67-immünfloresans) ile ortaya konmuştur (Kim ve diğ., 2018). Stansborough ve diğ. (2017),

yaptıkları bir çalışmada her hafta $3 \times 2,5$ Gy olacak şekilde 6 hafta boyunca radyasyona maruz bırakılmış siyah Agouti sıçanların ince bağırsağında proliferasyonun kontrol grubu sıçanlara göre önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Başka bir araştırmada 5 gün boyunca günde 7,5 Gy radyasyon verilen sıçanların ince bağırsağında proliferasyonun belirgin biçimde azaldığı gösterilmiştir (Fernández-Gil ve diğ., 2017). Caz ve diğ.'nin (2015) yaptıkları bir çalışmada 3. ve 4. günlerde 6 Gy radyasyona maruz bırakılan sıçanların ince bağırsak PCNA seviyelerinde önemli ölçüde azalma gözlenmiştir. Ayrıca kolonik adenokarsinoma ve hepatoma grubu sıçanlara uygulanan radyasyonun da proliferasyonu azalttığı ortaya konmuştur (Caz ve diğ., 2015). Bir diğer çalışmada sıçanlar tek doz 20 Gy ve 27 Gy radyasyona maruz bırakılmış, ince bağırsaklarında proliferasyonun K grubuna göre önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Lacavé-Lapalun ve diğ., 2014). Wang ve diğ., (2019), 12 Gy radyasyon uyguladıkları farelerin ince bağırsağında proliferasyonun önemli ölçüde azaldığı göstermişlerdir.

Köroğlu ve diğ.'nin (2019) yaptıkları bir çalışmada, sisplatinin sıçan testisi üzerine olan toksik etkilerine karşı APO'nun etkileri incelenmiş, 5 gün boyunca oral yolla 25 mg/kg APO uygulanan sıçanların testisinde sisplatin ile azalan PCNA pozitif hücre sayısının anlamlı biçimde arttığı gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada sıçanlarda yüksek yağlı diyet ile oluşturulan obezitenin PCNA pozitif hücre sayısında azalmaya sebep olduğu, orogastrik gavaj ile 25 mg/kg APO'nun uygulanması sonucu proliferatif hücre sayısında K grubuna benzer bir artış olduğu gözlenmiştir (Hersek, 2019). Yapılan bu çalışmalarda, APO'nun çeşitli hasarlar sonucu azalan proliferasyonu arttırarak sağlıklı dokulara benzer düzeyde proliferasyonun dengesini koruduğu belirlenmiştir.

CQ'nun antiproliferatif etkiler gösterdiğine dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Eng ve diğ.'nin (2016) yaptıkları bir çalışmada, CQ'nun sıçanda deneysel olarak oluşturulan sarkoma üzerinde proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir. Long ve diğ.'nin (2013) yaptığı bir çalışmada sıçanlarda pulmoner arter hipertansiyonunun proliferasyonu artırdığı, 21 gün boyunca 50 mg/kg CQ ile kombine edilen grupta ise artan proliferasyonun önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. İnsan glioblastoma hücre kültüründe (U87) CQ'nun radyoterapinin etkinliği üzerindeki etkileri araştırılmış ve CQ hücre sağkalımının azalmasına, G1/G0 hücre siklusu duraksamasına ve hasarlı DNA'nın tamirinin zayıflamasına neden olmuştur. Radyasyon ve CQ'nun glioblastoma tümör hücrelerinin sayı ve çapında azalmaya sinerjistik olarak etki ettiği ortaya konmuştur (Ye ve diğ., 2016).

Literatürdeki çalışmalara benzer olarak yaptığımız çalışmada tek doz 8 Gy radyasyona maruz bırakılan tüm grupların sıçan ince bağırsağında PCNA pozitif hücre sayısının K grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak azaldığını gözlemledik. RAD grubuyla kıyasladığımızda, RAD+CQ grubunda anlamlı olmayan, RAD+APO grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemledik. RAD+CQ+APO grubunda ise RAD+CQ grubuna göre anlamlı bir artış saptadık. Sonuç olarak RAD'ın antiproliferatif etkileri olduğunu APO'nun ise RAD ve RAD+CQ ile verildiğinde proliferasyonu arttırdığını gözlemledik. RAD ile birlikte verilen CQ'nin ise anlamsız da olsa proliferasyonun derecesini azalttığını tespit ettik.

LC3 II miktarının hücredeki artışı, otofagozomların oluşumuna işaret eder ve bu sebeple otofajinin belirteci olarak kullanılır. LC3 II otofajinin otofagozom lizozom birleşmesi veya lizozomal degradasyon basamağı gibi geç evrelerinin inhibisyonu sonucunda hücrede birikebilir. Otofagozomun spesifik kargo proteini p62 (SQSTM1) hücrede transfer öncesi birikir ve lizozomal degradasyon tamamlandığında miktarı azalır. Fakat lizozomal degradasyon gerçekleşmezse p62 hücrede birikir (Klionsky ve diğ., 2016). Yapılan bir araştırmada 30 Gy radyasyon uygulanan sıçanların bukkal mukozasında ve 20 Gy radyasyon uygulanan in vitro insan keratinosit ve HaCaT kültüründe LC3 II, p62 ve Beclin-1 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2020). Ayrıca başka bir çalışmada fare ince bağırsağı ve sıçan derisinde 12 ve 20 Gy radyasyonun otofajiye sebep olduğu ve bu otofajik yolağın p62 proteininin yönlendirmesini içerdiği gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2019). Sprague Dawley sıçanlarda 50 ve 100 mg/kg intravenöz (i.v.) verilen graphen oksit sonucu akciğerde meydana gelen otofajik değişimleri incelemek için yapılan bir çalışmada LC3 I /LC3 II oranı ve p62 seviyelerinin CQ ile kombine grupta anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (Zhang ve diğ., 2021). Yapılan bir başka çalışmada insan deri hücre kültüründe UV radyasyonun etkileri incelenmiş LC3 II, p62 ve LAMP1 seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu artışın otofaji inhibisyonu ile ilişkili değişimler olduğu ifade edilmiştir (Lamore ve Wondrak, 2012). Endo ve diğ.'nin (2019) yaptıkları bir çalışmada sağlıklı insan dermal fibroblast kültüründe, UV radyasyonun etkileri araştırılmış, radyasyon uygulanan hücrelerde LC3 II, p62 ve LAMP1 seviyelerinde artış gözlenmiştir. Aynı çalışmada HCQ'nun etkileri araştırılmış; tek başına ve UV radyasyon ile kombinasyonunda CQ'nun LC3 II, p62 ve LAMP1 seviyelerinde artışa sebep olduğu ortaya konmuştur.

Leptinin sıçan kardiyomiyositlerin kasılma fonksiyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada leptin verilen grupta LC3 II ve Beclin 1 anlamlı bir biçimde azaldığı leptin perfüzyonundan 30 dakika önce verilen 100 μ M APO'nun ise LC3 II ve Beclin 1 seviyelerinde anlamlı bir artışa sebep olduğu ortaya konmuştur (Luo ve diğ., 2016). Lu ve diğ.'nin yaptığı bir çalışmada (2015) neonatal sıçan beyinde iskemiye bağlı artan LC3II / LC3I oranını iskemi öncesinde verilen APO'nun etkili bir şekilde azalttığı ortaya konmuştur. Kolon kanseri (HCT116) hücre kültüründe fotodinamik terapinin araştırıldığı bir çalışmada 20 μ M CQ uygulamasının LC3 II, Atg7 ve Beclin1 seviyelerini arttırdığı BCL-2 ve p62 seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada kolon kanseri hücrelerinde CQ'nun otofajiyi inhibe ederek apoptozu arttırdığı sonucuna varılmıştır (Ouyang ve diğ., 2018). *In vitro* (U2OS ve Hela hücreleri) ve *in vivo* (fare ince bağırsak ve böbrek dokusu) olarak yürütülen bir çalışmada, otofajinin geç basamak inhibitörlerinden CQ ve bafilomisin A1'in otofajik süreci incelenmiş; CQ verilen hücrelerde K grubuna göre LC3 II, p62 ve LAMP2 seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada pH'ı arttırarak, lizozomal degradasyonu inhibe ettiği düşünülen CQ ve bafilomisin A1'in rolleri araştırılmış, bafilomisin beklediği gibi lizozomal degradasyonu inhibe ettiği, CQ'nun ise otofajiyi, otofagozom ve lizozom kaynaşması basamağında inhibe ettiği, degradasyonda herhangi bir rolü olmadığı yapılan çift floresan incelemeler ile ortaya konmuştur (Mauthe ve diğ., 2018). İnsan glioblastoma hücre kültüründe (U87) CQ'nun radyoterapinin başarısı üzerindeki etkileri araştırılmış, kombinasyonlar, RAD grubuna göre LC3 II seviyelerinde artışa neden olmuştur (Ye ve diğ., 2016).

Yaptığımız çalışmanın sonucunda elde ettiğimiz istatistiksel verilere göre K grubu ile kıyaslandıklarında RAD verilen grupların ince bağırsak dokularında p62 seviyelerinde anlamlı bir artış belirledik. RAD grubu ile karşılaştırdığımızda, RAD+CQ grubunda anlamsız bir artış, RAD+APO grubunda anlamlı bir azalış gözlemledik. RAD+CQ+APO grubunda ise RAD+CQ grubuna göre anlamlı bir azalma saptadık. LC3 II seviyelerinde ise K grubu ile kıyaslandıklarında RAD verilen gruplarda anlamlı bir artış belirledik. RAD+CQ grubunda RAD grubuna göre anlamlı bir artış gözlenirken, RAD+APO grubunda anlamsız bir azalış gözlemledik. RAD+CQ+APO grubunda ise RAD+CQ grubuna göre anlamlı bir azalış saptadık. LAMP 2 seviyelerinde ise K grubu ile kıyaslandıklarında RAD ve RAD+CQ gruplarında anlamlı, RAD+APO ve RAD+CQ+APO gruplarında anlamsız bir artış belirledik. RAD+CQ grubunda RAD grubuna göre anlamsız bir artış gözlenirken, RAD+APO grubunda RAD grubuna göre anlamlı bir azalış gözlemledik. RAD+CQ+APO grubunda ise RAD+CQ grubuna

göre anlamlı bir azalış saptadık. Bu sonuçlardan yola çıkarak RAD'ın p62 ve LAMP 2 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep olduğunu, APO'nun ise bu seviyeleri anlamlı bir biçimde azalttığını söyleyebiliriz. RAD ile CQ verildiğinde ise anlamsız da olsa p62 ve LAMP 2 seviyelerinde artış gözlemledik. LC3 II seviyelerine bakıldığında ise RAD ve CQ'nun istatistiksel olarak anlamlı artışa sebep olduğunu, RAD ile verilen APO'nun ise istatistiksel olarak anlamsız da olsa bir azalış gösterdiğini tespit ettik. Yapılan önceki çalışmalara dayanılarak RAD grubundaki bu artışların sebebinin hücrel stresine bir yanıt olarak otofajinin aktive olması ile ilişkili olabileceğini söyleyebiliriz. APO ise hücrel stresi düşürerek otofajinin seviyelerinde azalmaya sebep olmuş olabilir. CQ ile kombine gruplarda gözlenen artış ise otofajinin geç basamağının inhibisyonu ile ilişkili lizozomal inhibisyon sebebiyle ara basamakta otofagozom ve lizozomların birikiminden kaynaklanıyor olabilir.

Radyasyona maruz kalma BCL-2 konsantrasyonlarını düşürerek mitokondriyal komplekslerin aktivitesinin azalmasına yol açar. Antiapoptotik BCL-2 proteininin düşük seviyeleri, sitokrom c gibi apoptojenik proteinlerin mitokondriden sitozole salınmasını kolaylaştırır ve böylelikle apoptotik kaskadı başlatır. Apoptotik yolların aktivasyonu kaspaz ailesi enzimlerini içeren bir süreçtir. Hem iç hem de dış yolağın geri dönüşsüz basamağı kaspaz-3 enziminin aktivasyonunu içerdiğinden, kaspaz-3 enzimi apoptozun varlığını göstermek için en sık kullanılan belirteçlerden biridir (Ortiz ve diğ., 2015). Yapılan bir araştırmada 5 gün boyunca 7,5 Gy radyasyon verilen sıçanların ince bağırsağında BCL-2 seviyelerinin anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Fernández-Gil ve diğ., 2017). Başka bir araştırmada, Wistar albino cinsi sıçanlara tek doz 8 Gy radyasyon verilmiş ve BCL-2 seviyelerinin anlamlı biçimde azaldığı gözlenmiştir (Khayyal ve diğ., 2019). Kim ve diğ.'nin (2018) yaptığı bir çalışmada sıçan ince bağırsığının epitel hücre kültürüne (IEC-6) ve farelere 12 Gy radyasyon uygulaması sonucunda, ince bağırsakta TUNEL pozitif hücre sayısının anlamlı biçimde arttığı gözlenmiştir. Erbil ve diğ. (2005), Wistar albino cinsi sıçanlara tek doz 10 Gy radyasyon uygulanması sonucunda, ince bağırsakta kaspaz-3 seviyelerinin anlamlı biçimde arttığını göstermişlerdir. Stansborough ve diğ. (2017) yaptıkları bir çalışmada her hafta $3 \times 2,5$ Gy olacak şekilde 6 hafta boyunca radyasyona maruz bırakılmış siyah Agouti sıçanların ince bağırsağında kaspaz-3 pozitif hücre sayısının kontrol grubu sıçanlara göre önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir.

8 Gy radyasyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanların ince bağırsağında immünohistokimyasal olarak belirlenen % kaspaz-3 pozitif hücre indekisinde bir artış

gözlenirken, radyasyondan önce APO uygulanan kombine grupta % kaspaz-3 pozitif hücre indeksinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. APO grubunun % kaspaz-3 pozitif hücre indeksinde ise K grubuna göre anlamlı azalma tespit edilmiştir (Çağın ve diğ., 2016). Yapılan başka bir araştırmada inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulan sıçanlarda ROT ve NOX artışına bağlı olarak apoptozun arttığı gözlenmiş, 12 hafta 50 mg/kg/gün APO uygulanan kombine grupta apoptozun azaldığı gösterilmiştir (Xie ve diğ., 2014). Antineoplastik potansiyeli yüksek olan sisplatinin Wistar albino dişi sıçan karaciğerinde, immünohistokimyasal olarak belirlenen % kaspaz-3 pozitif hücre indeksinde K grubuna göre azalmaya, APO uygulanan kombine grupta ise artışa neden olduğu gözlenmiştir. (Çağın ve diğ., 2015). Kanseri ve birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan metotreksatin Wistar albino sıçan testisinde arttırdığı apoptozu 4 hafta boyunca her gün i.p. yolla verilen 50 mg/kg APO'nun azalttığı gösterilmiştir (Kavram, 2016). Sisplatinin sıçan testisi üzerine olan toksik etkilerine karşı APO'nun olası koruyucu rolünün araştırıldığı bir çalışmada sisplatin verilen grubun TUNEL pozitif hücre sayısının arttığı, hasar sonrası 5 gün boyunca her gün oral yolla verilen 25 mg/kg APO'nun ise TUNEL pozitif hücre sayısını azalttığı belirlenmiştir (Köroğlu ve diğ., 2019). Kolon kanseri (HCT116) hücre kültüründe, fotodinamik terapinin araştırıldığı bir çalışmada, 20µM CQ uygulamasının kaspaz-3, Bax ve PARP seviyelerini arttırdığı BCL-2 seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Xiong ve diğ., 2017). İnsan glioblastoma hücre kültüründe (U87) CQ'nun radyoterapinin etkinliği üzerindeki sonuçları araştırılmış, bu araştırma sonucunda CQ'nun kaspaz-3 seviyelerini artırdığı, BCL-2 seviyelerini ise azalttığı belirlenmiştir (Ye ve diğ., 2016). Helmy ve diğ. (2018), karaciğer kanser modeli oluşturdukları Sprague Dawley sıçanlarda CQ'nun TRAIL/TRAILR2 apoptotik yolağı üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve kanserli sıçanlarda azalan kaspaz-3, 8, 9 mRNA ekspresyonlarının CQ uygulaması sonucu önemli ölçüde arttığını, artan BCL-2 seviyelerinin ise anlamlı şekilde azaldığını göstermişlerdir. Chen ve diğ.'nin (2006) yaptıkları çalışmada Sprague Dawley sıçanlarda total hepatik iskemi reperfüzyonu sonucu ince bağırsağındaki apoptotik indeks belirlenmiş ve iskemi grubunda artan apoptozun CQ verilen grupta anlamlı bir biçimde azaldığı belirlenmiştir. Wistar albino sıçanların kalplerinde oluşturulan iskemi reperfüzyonun 1 saat öncesinde verilen 10 mg/kg CQ'nun, kaspaz-3 seviyeleri üzerindeki etkileri incelendiğinde hasar grubuna göre anlamsız bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir (Xiao ve diğ., 2018).

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz istatistiksel verilere göre K grubu ile kıyaslandıklarında RAD, RAD+CQ, RAD+APO, RAD+CQ+APO ve CQ+APO gruplarının ince bağırsak

dokularında kaspaz-3 seviyelerinde anlamlı, CQ grubunda ise anlamsız bir artış belirledik. RAD+CQ grubunda RAD grubu ile benzer seviyeler gözlemlerken, RAD+APO grubunda RAD grubuna göre anlamsız bir azalış gözlemledik. RAD+CQ+APO grubunda ise RAD+CQ grubuna göre anlamsız bir azalma saptadık. BCL-2 seviyelerinde K grubu ile kıyaslandıklarında RAD grubunda anlamlı, CQ ve RAD+CQ gruplarındaki anlamsız bir azalma belirledik. RAD+APO, RAD+CQ+APO ve CQ+APO grupları K grubu ile kıyaslandıklarında ise BCL-2 seviyelerinde anlamlı, APO grubunda ise anlamsız bir artış belirledik. RAD+CQ grubunda RAD grubu ile benzer seviyeler gözlemlerken, RAD+APO grubunda RAD grubuna göre anlamlı bir artış gözlemledik. RAD+CQ+APO grubunda ise RAD+CQ grubuna göre anlamlı bir artış saptadık. Bu sonuçlardan yola çıkarak literatürle uyumlu olarak RAD'ın kaspaz-3 seviyelerini arttırdığını BCL-2 seviyelerini azalttığını, RAD ile verilen CQ'nun ise bu seviyeler üzerinde önemli bir değişime sebep olmadığını söyleyebiliriz. APO'nun ise RAD'ın sebep olduğu kaspaz-3 seviyelerindeki artışı ve BCL-2 seviyelerindeki azalmayı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde geri döndürerek koruyucu etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

MPO, nitrik oksit metabolizmasında, nitrit ve nitrat peroksidasyonunda önemli rol oynar. Oksidatif stres seviyelerinin ve antioksidan kapasitenin azalmasının belirlenmesinde kullanılan bir enzimdir. Yapılan bir çalışmada Wistar albino cinsi sıçanlara uygulanan RAD'ın ince bağırsak MPO seviyelerini anlamlı biçimde arttırdığı gözlenmiştir (Erbil ve diğ., 2005; Khayyal ve diğ., 2019). Başka bir çalışmada, ince bağırsak hücre kültüründe (IEC-6) 10 Gy RAD'a maruz bırakılan hücrelerin MPO seviyelerinde anlamlı ölçüde artış belirlenmiştir (Zhang ve diğ., 2021).

Metotreksatın sıçan testisinde arttırdığı MPO seviyelerini 4 hafta boyunca her gün i.p. yolla verilen 50 mg/kg APO'nun azalttığı gösterilmiştir (Kavram, 2016). Başka bir çalışmada sıçanlarda yüksek yağlı diyet ile oluşturulan obezitenin MPO aktivitesinde artışa sebep olduğu, 25 mg/kg APO'nun 4 hafta boyunca haftada 5 gün uygulanması sonucu MPO aktivitesinde önemli ölçüde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Hersek, 2019). Wang ve diğ.'nin yaptığı bir çalışmada (2019) inflamatuvar bağırsak hastalığı (ülseratif kolit, Crohn hastalığı) oluşturulan farelerde artan MPO aktivite ve seviyelerinin 1-6. günler 60 mg/kg/gün CQ uygulanan kombine grupta azaldığı gösterilmiştir. Zhang ve diğ.'nin (2021) yaptığı bir çalışmada farelerin iskemi reperfüzyon ile oluşturulan beyin hasarından önce 3 hafta boyunca uygulanan CQ'nun MPO aktivitesini azalttığı gösterilmiştir.

İnce bağırsak dokularında yaptığımız biyokimyasal incelemeler sonucunda K grubuna göre RAD, RAD+CQ, RAD+APO, RAD+CQ+APO, CQ+APO gruplarındaki MPO seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemledik. İstatistiksel olarak anlamsız da olsa, RAD grubuna göre RAD+CQ grubunun MPO seviyelerinde artış, RAD+APO grubunda ise azalma belirledik. RAD+CQ+APO grubunda RAD + CQ grubuna göre MPO seviyelerinde azalma saptadık. Bu sonuçlardan yola çıkarak literatürdeki bilgilere benzer şekilde RAD'ın MPO seviyelerini anlamlı olarak arttırdığını ve CQ'nun ise MPO seviyelerini anlamsız arttırdığını, APO'nun ise MPO seviyelerindeki artışı anlamsız da olsa azalttığını söyleyebiliriz.

İyonlaştırıcı radyasyon tarafından üretilen serbest radikaller NOX'lar, lipoksijenazlar (LOX), nitrik oksit sentaz (NOS) ve siklooksijenazlar (COX) dahil olmak üzere çeşitli enzimlerin üretimini arttırabilir. Bu enzimler hücrelerde, dokularda ve organlarda belirli şekillerde ifade edilir (Wei ve diğ., 2019). NOX membrana bağlı bir oksidoredüktazdır ve elektronları NADPH'den oksijen moleküllerine aktarabilir (Drummond ve diğ., 2011). Bu enzim, elektronları plazma zarı boyunca transfer etme, O_2^- gibi ROT'ları oluşturma yeteneğine sahiptir. Ancak NOX ailesinin bireysel üyelerinin doku dağılımı ve aktivasyon mekanizmaları farklılıklar gösterebilir (Bedard ve Krause, 2007). NOX enzimleri, doğrudan ısılanmış hücreler ve çevre hücrelerde, akut ve kronik oksidatif stresde anahtar rol oynar (Mortezaee ve diğ., 2019). NADPH oksidaz 1'in (NOX1) gastrointestinal kanalda yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiş olmasına rağmen, bu enzimin fizyolojik ve patofizyolojik rolleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Yasuda ve diğ., 2012). NOX başlangıçta fagositlerde önemli bir ROT kaynağı olarak tanımlanmış ve son zamanlarda hücrelerel sinyallemede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Cakir ve Ballinger, 2005). NOX'un, sırasıyla enzimin fagositik ve fagositik olmayan formları olan NOX1 ve NOX2 gibi çok sayıda homologu tanımlanmıştır (Quinn ve diğ., 2006). NOX1'in yakın zamanda hipertansiyon (Matsuno ve diğ., 2005), inflamatuvar ağrı (Ibi ve diğ., 2008) ve karaciğer fibrozunun (Daniele ve diğ., 2001; Rokutan ve diğ., 2006) patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca NOX1'in, gastrointestinal sistemde yüksek oranda eksprese edildiği ve inflamatuvar yanıtlarda rol oynadığı öne sürülmüştür (Rokutan ve diğ., 2006; Kamizato ve diğ., 2009). Yapılan bir araştırmada NOX1'e özgü inhibitörün, radyasyona bağlı kollajen birikimini ve endotel hücrelerinde fibroblastik değişiklikleri sınırlayabildiğini ve böylece radyasyonun neden olduğu pulmoner fibrozu hafiflettiğini, ayrıca NOX1 inhibisyonundan sonra ROT üretiminin önemli ölçüde azaldığını bildirilmiştir (Zhang ve diğ., 2021). Datta ve diğ. (2012) yaptıkları bir çalışmada mitokondriyal disfonksiyonun ve

NOX1 ile NOX2 aktivitesini içeren artmış NADPH oksidazın bağırsak epitel hücrelerinde radyasyona bağlı sürekli oksidatif stres için ana faktörler olduğunu doğrulamışlardır. Yapılan çalışmalarda radyasyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanlarda NOX aktivitesinde artış gözlemlenmiştir (Aryafar ve diğ., 2020).

Yapılan bir çalışmada sıçanlarda yüksek yağlı diyet ile oluşturulan obezitenin NOX-2 pozitif hücrelerde artışa, 25 mg/kg APO'nun 4 hafta boyunca haftada 5 gün uygulanmasının ise azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Hersek ve diğ., 2019). Sisplatinin sıçan testisi üzerine olan toksik etkilerine karşı APO'nun rolünün araştırıldığı bir çalışmada sisplatinin NOX2 pozitif hücre sayısını artırdığı, hasar sonrası 5 gün boyunca verilen 25 mg/kg APO'nun ise azalttığı belirlenmiştir (Köroğlu ve diğ., 2019). Deneysel olarak oluşturulmuş akut pankreatitis ile ilişkili ince bağırsak mukozal bariyer hasarının incelendiği bir araştırmada NOX2 seviyelerinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiş, hasardan önce verilen APO'nun ise NOX2 seviyelerini anlamlı biçimde azalttığı gösterilmiştir (Deng ve diğ., 2016). Yapılan bir çalışmada deneysel olarak oluşturulmuş sistemik lupus eritramatözlü farelerde artan NOX ekspresyonunu kronik olarak 5 hafta boyunca 10 mg/kg/gün HCQ uygulamasının azalttığı gösterilmiştir. (Gómez-Guzmán ve diğ., 2014). Teng ve diğ.'nin (2012) yaptıkları bir çalışmada intrauterin pulmoner hipertansiyonlu pulmoner arter endotel hücre kültüründe meydana gelen NOX artışının, CQ ile kombine grupta önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Artan NOX aktivitesinin otofaji artışı ile ilişkili olduğu, CQ'nun da bu sebeple NOX artışının önüne geçebildiği öne sürülmüştür.

İnce bağırsak dokularında yaptığımız biyokimyasal incelemeler sonucunda elde ettiğimiz istatistiksel verilerde APO grubu hariç tüm grupların NOX seviyelerinde K grubuyla kıyaslandıklarında anlamlı artış tespit ettik. APO grubunda ise K grubu ile kıyaslandığında anlamsız bir artış saptadık. RAD+CQ grubunun NOX seviyelerinde RAD grubuna göre anlamsız artış gözlerken, RAD+APO grubunun NOX seviyelerinde RAD grubuna göre anlamsız azalma belirledik. RAD+CQ+APO grubunda RAD+CQ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemledik. Bu sonuçlardan yola çıkarak literatürlerle uygun olarak RAD'ın anlamlı bir biçimde NOX seviyelerini arttırdığını, RAD ile verilen CQ ve RAD ile verilen APO'nun ise istatistiksel olarak anlamsız da olsa NOX seviyelerini azalttığını söyleyebiliriz. RAD ile CQ birlikte verildiğinde ise APO'nun antioksidan etkiler göstererek istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artan NOX seviyelerini azalttığını ortaya koyduk.

Serbest radikal seviyelerinin doğrudan belirlenmesi güçtür. Lipid peroksidasyonunun membrandaki fosfolipitleri hedef alması, serbest radikallerin sebep olduğu hasarın tespit edilmesinde sık kullanılan bir belirteç olmasını sağlamıştır (Altınar ve diğ., 2018). İyonlaştırıcı radyasyon, hücrelerde reaktif oksijen radikallerinin üretimini arttırarak membran yapısında bulunan lipitlerin peroksidasyonuna sebep olur (Maharwal ve diğ., 2005; Sharma ve Sharma, 2005). Lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA'dır. MDA antioksidan enzimleri inhibe eden sitotoksik bir bileşiktir (Tahamtan ve diğ., 2015). Yapılan bir çalışmada, Wistar albino cinsi sıçanlara tek doz 10 Gy radyasyon verilmiş, MDA seviyelerinin ileum, kolon ve serumdaki seviyelerinin anlamlı biçimde arttığı gözlenmiştir (Pişkin ve diğ., 2018). Radwan ve Karam (2020), Wistar albino sıçanlarda 5 Gy radyasyonun ince bağırsak dokusunda MDA seviyelerini arttırdığını gözlemiştir. Musa ve diğ.'nin yaptıkları çalışmada (2019), Wistar albino sıçanlara 8 Gy radyasyon verilmiş ve ince bağırsak dokularında MDA seviyelerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Erbil ve diğ. (2005), Wistar albino sıçanlara uygulanan tek doz 10 Gy radyasyonun ince bağırsakta MDA seviyelerini anlamlı biçimde arttırdığını ortaya koymuşlardır. Başka bir araştırmada 5 gün boyunca günde 7,5 Gy radyasyon verilen sıçanların ince bağırsağında LPO seviyelerinin anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir (Fernández-Gil ve diğ., 2017).

8 Gy tek doz radyasyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanların ince bağırsağında MDA seviyelerinde K grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir artış tespit edilmiş, radyasyondan önce 5 gün boyunca uygulanan 20 mg/kg/gün APO'nun ise MDA seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı gözlenmiştir (Çağın ve diğ., 2016). Deneysel olarak oluşturulmuş akut pankreatitis ile ilişkili ince bağırsak mukozal bariyer hasarının incelendiği bir araştırmada, MDA seviyelerinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiş, hasardan 30 dakika önce verilen 50 mg/kg APO'nun ise MDA seviyelerini anlamlı biçimde azalttığı gösterilmiştir (Deng ve diğ., 2016). Sisplatinin Wistar albino dişi sıçan karaciğeri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, dokuda MDA düzeylerinin önemli ölçüde arttığı, APO verildiğinde ise anlamlı biçimde azaldığı gösterilmiştir. (Çağın ve diğ., 2015). Yapılan bir çalışmada iskemi oluşturulan sıçanlara anesteziden 30 dakika önce uygulanan 20 mg/kg APO'nun kas dokusu ve plazmada iskemi kaynaklı artan MDA seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Albayrak, 2019). Başka bir çalışmada sıçanlarda üreter tıkanıklığının sebep olduğu MDA seviyelerindeki artışın, APO uygulanmasıyla önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Yoldaş, 2017). Metotreksatin sıçan testisinde arttırdığı MDA seviyelerini 4 hafta boyunca her gün i.p. yolla verilen 50 mg/kg

APO'nun azalttığı gösterilmiştir (Kavram, 2016). Başka bir çalışmada sıçanlarda yüksek yağlı diyet ile oluşturulan obezitenin MDA seviyelerinde artışa sebep olduğu, 25 mg/kg APO'nun 4 hafta boyunca haftada 5 gün uygulanması sonucu MDA seviyelerinde önemli ölçüde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Hersek, 2019). Yapılan bir araştırmada Wistar albino sıçanlara tek doz 10 Gy skrotal radyasyon uygulanmış, radyasyon öncesi 5 gün boyunca günde tek doz i.p. yol ile 20 mg/kg APO uygulamasının radyasyon grubunun testis dokularında artan MDA değerlerini anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Tatlı, 2018).

Chen ve diğ.'nin (2006) yaptıkları çalışmada Sprague Dawley sıçanlarda total hepatik iskemi reperfüzyonu sonucu ince bağırsak mukozasında MDA seviyelerinin anlamlı olarak arttığı, 10 mg/kg CQ verilen grupta ise anlamlı bir biçimde azaldığı gözlenmiştir. Zhang ve diğ.'nin (2021) yaptıkları çalışmada Sprague Dawley sıçanlarda 50 ve 100 mg/kg i.v. verilen grafen oksit sonucu akciğerde MDA seviyelerinin anlamlı olarak arttığı, 20 mg/kg CQ'nun 7 gün boyunca kombine verildiği grupta ise anlamlı bir biçimde azaldığı gözlenmiştir. Wistar albino sıçanların kalplerinde oluşturulan iskemi reperfüzyonun 1 saat öncesinde verilen 10 mg/kg CQ'nun MDA seviyelerinde hasar grubuna göre anlamsız bir azalma meydana getirdiği gözlenmiştir (Xiao ve diğ., 2018). Helmy ve diğ. (2018), karaciğer kanser modeli oluşturdukları Sprague Dawley sıçanlarda artan MDA seviyelerinin CQ grubunda anlamlı biçimde azaldığını belirlemişlerdir.

İnce bağırsak dokularında yaptığımız incelemeler sonucunda elde ettiğimiz verilere göre K grubuna göre RAD, RAD+CQ, RAD+CQ+APO ve CQ+APO gruplarındaki MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir. RAD+APO grubunda K'ya göre anlamsız artış tespit edilmiştir. RAD+CQ'nun MDA seviyelerinde RAD grubuna göre anlamsız biçimde azalma gözlenirken RAD+APO grubunda RAD grubuna göre anlamlı olan bir azalma dikkati çekmiştir. RAD+CQ+APO grubunun MDA seviyelerinde ise RAD+CQ grubuna göre anlamsız da olsa bir azalma gözlenmiştir. İnce bağırsak dokularında LPO seviyeleri incelenerek elde edilen verilere göre RAD, CQ, RAD+CQ ve RAD+CQ+APO gruplarına ait LPO değerlerinin K grubuna göre anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. K grubu ile APO, RAD+APO ve CQ+APO grupları karşılaştırıldığında ise APO verilen grupların LPO değerinde anlamsız bir artış olduğu gözlenmiştir. LPO seviyeleri kıyaslandığında RAD'a göre RAD+CQ grubunda anlamsız ve RAD+APO grubunda anlamlı bir şekilde azalma olduğu saptanmıştır. RAD+CQ+APO grubunun LPO değerinin ise RAD+CQ grubuna göre istatistiksel

olarak anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak literatürle uyumlu olarak RAD'ın tüm gruplarında MDA ve LPO seviyelerini anlamlı arttırdığını, APO'nun bu artışı anlamlı bir şekilde azalttığını söyleyebiliriz. CQ'nun ise RAD'la birlikte verildiğinde MDA ve LPO seviyelerinde anlamsız da olsa bir azalmaya sebep olmuştur.

Yapılan bir çalışmada, Wistar albino cinsi sıçanlara tek doz 10 Gy radyasyon verilmiş, TAK seviyelerinin ileum, kolon ve serumdaki seviyelerinin anlamlı biçimde azaldığı tespit edilmiştir (Pişkin ve diğ., 2018). Demir ve diğ.'nin yaptıkları bir çalışmada (2020) 5 Gy tek doz radyasyona maruz bırakılan sıçanların beyinlerinde meydana gelen TAK seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Başka bir araştırmada 2 haftalık süreçte toplamda 8 Gy radyasyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanların karaciğerlerinde TAK seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Saif-Elnasr ve diğ., 2019).

8 Gy tek doz radyasyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanların ince bağırsağında TAK seviyelerinde K grubuna göre azalma gözlenmiş radyasyondan önce APO uygulanan grupta ise TAK seviyelerinde artış gözlenmiştir (Çağın ve diğ., 2016). Sisplatinin Wistar albino dişi sıçan karaciğeri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, dokuda TAK düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı, APO verildiğinde ise arttığı gösterilmiştir (Çağın ve diğ., 2015).

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre K grubuna kıyasla RAD ve RAD+CQ gruplarının TAK seviyelerinin anlamlı, CQ ve APO gruplarının anlamsız olarak azaldığını, RAD+CQ+APO grubunun anlamlı, RAD+APO ve CQ+APO gruplarının ise TAK seviyelerinin anlamsız arttığını saptadık. RAD ile karşılaştırıldığında, TAK seviyelerinin anlamsız olarak RAD+CQ grubunda azaldığını, RAD+APO grubunda ise anlamlı bir şekilde arttığını belirledik. RAD+CQ ve RAD+CQ+APO grubu karşılaştırıldığında ise RAD+CQ+APO grubunun TAK değerinin anlamlı olarak artırdığını gözlemledik. Sonuç olarak önceki çalışmalara paralel olarak RAD'ın TAK seviyelerini anlamlı bir biçimde azalttığını, APO'nun ise TAK seviyelerini anlamlı olarak artırarak antioksidan etki gösterdiğini söyleyebiliriz. RAD ile verilen CQ'nun ise TAK seviyelerini anlamsız da olsa arttırdığını tespit ettik.

Yapılan bir araştırmada, Wistar albino cinsi sıçanlara tek doz 8 Gy radyasyon verilmiş, ince bağırsaktaki GSH seviyelerinin anlamlı biçimde azaldığı gözlenmiştir (Khayyal ve diğ., 2019). Radwan ve Karam (2020) yaptıkları araştırmada Wistar albino sıçanlara verilen 5 Gy radyasyonun GSH seviyesini azalttığını gözlemlemişlerdir. Başka bir araştırmada 5 gün

boyunca günde 7,5 Gy radyasyon verilen sıçanların ince bağırsağında GSH seviyelerinin anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Fernández-Gil ve diğ., 2017). Yapılan bir araştırmada 8 Gy radyasyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanların karaciğerlerinde GSH seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Saif-Elnasr ve diğ., 2019). Saada ve diğ.'nin (2010) yaptıkları çalışmada, 6 Gy radyasyonun albino sıçanların ince bağırsak dokularında GSH seviyelerinde anlamlı biçimde azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir.

8 Gy tek doz radyasyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanların ince bağırsağında belirlenen GSH seviyelerinde gözlenen anlamlı azalmanın, radyasyondan önce 5 gün boyunca 20 mg/kg/gün APO uygulaması sonucunda GSH seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir (Çağın ve diğ., 2016). Sisplatinin Wistar albino dişi sıçan karaciğeri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, dokuda GSH düzeylerinin azaldığı, APO ile verildiğinde ise anlamlı biçimde arttığı gösterilmiştir (Çağın ve diğ., 2015). Başka bir çalışmada alt ekstremitelerde kasında iskemi oluşturulan sıçanlara 20 mg/kg APO'nun i.p. olarak uygulanmasının kas dokusu ve plazmada iskemi kaynaklı azalan GSH düzeylerini arttırdığı ortaya konmuştur (Albayrak, 2019). Metotreksatin sıçan testisinde azalttığı GSH seviyelerini 4 hafta boyunca her gün i.p. yolla verilen 50 mg/kg APO'nun arttırdığı gösterilmiştir (Kavram, 2016). Başka bir çalışmada sıçanlarda yüksek yağlı diyet ile oluşturulan obezitenin GSH düzeylerinde azalmaya sebep olduğu, 25 mg/kg APO'nun 4 hafta boyunca haftada 5 gün uygulanmasının GSH düzeylerini arttırdığı gözlenmiştir (Hersek, 2019).

Helmy ve diğ. (2018), karaciğer kanser modeli oluşturdukları Sprague Dawley sıçanlarda CQ'nun etkilerini araştırmış, kanserli sıçanlarda azalan GSH seviyelerini CQ'nun arttırdığını belirlemişlerdir. Deneysel diyabet oluşturulmuş farelerde azalan GSH seviyelerinin, 3 gün boyunca 50 mg/kg/gün olarak CQ verilen grupta arttığı gözlenmiştir (Tuohetaerbaik ve diğ., 2020).

Yapılan incelemeler sonucunda elde edilen verilere göre K grubu ile kıyaslandığında GSH seviyelerinin RAD ve RAD+CQ+APO gruplarında anlamlı olarak azaldığını, CQ, APO, RAD+CQ ve CQ+APO gruplarında anlamsız azaldığını, RAD+APO ve RAD+CQ+APO gruplarında ise anlamsız arttığını saptadık. RAD grubu ile kıyaslandığında RAD+CQ ve RAD+APO gruplarında GSH seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığını gözlemledik. RAD+CQ+APO grubuna ait GSH seviyeleri ile RAD+CQ grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde artış olduğunu belirledik. Sonuç olarak daha önce

yapılmış araştırmalara benzer olarak RAD uygulamasının tüm gruplarda GSH seviyelerini anlamlı biçimde azalttığını, APO ve CQ'nun ise GSH seviyelerini anlamlı arttırarak bu etkiyi tersine çevirdiğini söyleyebiliriz.

Musa ve diğ.'nin yaptıkları çalışmada (2019) Wistar albino sıçanlara 8 Gy radyasyon verildiğinde ince bağırsak dokularında KAT aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Radwan ve Karam (2020) yaptıkları araştırmada Wistar albino sıçanlarda 5 Gy radyasyonun ince bağırsak dokusunda KAT aktivitesini azalttığını gözlemişlerdir. 25 Gy tek doz radyasyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanların beyinlerinde KAT aktivitesinin anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Motallebzadeh ve diğ., 2020). Saada ve diğ.'nin (2010) yaptıkları çalışmada 6 Gy radyasyonun albino sıçanların ince bağırsak dokularında KAT aktivitelerinde anlamlı biçimde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.

Sisplatinin Wistar albino dişi sıçan karaciğeri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada dokuda KAT aktivitelerinin azaldığı, APO verildiğinde ise anlamlı biçimde arttığı gösterilmiştir. (Çağın ve diğ., 2015). Yapılan bir çalışmada sıçanlarda APO uygulanmasının, kas dokusu ve plazmada iskemi kaynaklı azalan KAT aktivitelerini arttırdığı ortaya konmuştur (Albayrak, 2019). Başka bir çalışmada sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan tek taraflı üreter tıkanıklığının sebep olduğu KAT aktivitelerindeki azalışı APO'nun önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (Yoldaş, 2017). Sıçanlarda D-galaktoz ile deneysel olarak oluşturulmuş yaşa bağlı osteoporoz modelinde azalan KAT aktivitesinin, 4 hafta boyunca uygulanan 10 mg/kg/gün CQ'nun anlamlı bir biçimde arttırdığı gözlenmiştir (Mahmoud ve diğ., 2021).

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz verilere göre K grubu ile karşılaştırıldığında RAD grubunun anlamlı, CQ ve APO gruplarının KAT aktivite değerlerinde anlamsız azalma olduğunu belirledik. RAD+CQ+APO grubunda anlamlı, RAD+CQ, RAD+APO, ve CQ+APO gruplarının KAT aktivitelerinin ise K grubuna göre anlamsız olarak arttığını saptadık. RAD grubu ile RAD+CQ ve RAD+APO grupları karşılaştırıldığında bu grupların KAT aktivitelerinde RAD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu gözlemledik. RAD+CQ+APO grubunun KAT aktivitesinin ise RAD+CQ grubuna göre anlamsız da olsa arttığını saptadık. Sonuçta literatürle uyumlu bir şekilde RAD'ın KAT aktivitelerinde anlamlı azalmaya sebep olduğunu, APO ve CQ'nun ise RAD gruplarında KAT aktivitelerini anlamlı arttırdığını belirledik.

Saada ve diğ.'nin (2010) yaptıkları çalışmada 6 Gy radyasyonun albino sıçanların ince bağırsak dokularında SOD aktivitelerinde anlamlı biçimde azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada Wistar albino sıçanlara tek doz 10 Gy skrotal radyasyon uygulanması öncesi 5 gün boyunca günde tek doz 20 mg/kg APO uygulamasının, testis dokularında radyasyon etkisiyle azalan SOD aktivitelerini anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir (Tatlı, 2018). 8 Gy tek doz radyasyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanların ince bağırsağında SOD aktivitelerinde K grubuna göre azalma gözlenmiş, radyasyondan önce APO uygulanan kombine grupta ise SOD aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Çağın ve diğ., 2016).

Akut pankreatitis ile ilişkili ince bağırsak mukozal bariyer hasarında dokuda SOD aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı, APO'nun ise SOD aktivitelerini anlamlı biçimde artırdığı gösterilmiştir. (Deng ve diğ., 2016). Sisplatinin Wistar albino dişi sıçan karaciğeri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada dokuda SOD aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı, APO verildiğinde ise anlamlı biçimde arttığı gösterilmiştir (Çağın ve diğ., 2015). Başka bir çalışmada sıçanlarda iskemi kaynaklı azalan SOD aktivitelerinin APO uygulanması sonucunda arttığı ortaya konmuştur (Albayrak, 2019). Diğer bir çalışmada sıçanlarda oluşturulan tek taraflı üreter tıkanıklığının sebep olduğu SOD aktivitelerindeki azalışı, 14 gün boyunca her gün uygulanan 25 mg/kg APO'nun önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Yoldaş, 2017). Hersek (2019), sıçanlarda yüksek yağlı diyet ile oluşturulan obezitenin SOD aktivitelerinde azalmaya sebep olduğunu, 25 mg/kg APO'nun 4 hafta boyunca haftada 5 gün uygulanmasının SOD aktivitelerini artırdığını göstermiştir. Wistar albino sıçanların kalplerinde oluşturulan iskemi reperfüzyon üzerinde timokinonun etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, reperfüzyonun 1 saat öncesinde verilen CQ'nun SOD aktiviteleri üzerindeki etkileri incelendiğinde hasar grubuna göre anlamsız bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir (Xiao ve diğ., 2018). Yapılan bir araştırmada sıçanlarda D-galaktoz ile deneysel olarak oluşturulmuş yaşa bağlı osteoporoz modelinde azalan SOD aktivitesini, 4 hafta boyunca 10 mg/kg/gün CQ uygulamasının K grubuna benzer biçimde artırdığı belirlenmiştir (Mahmoud ve diğ., 2021).

Yaptığımız çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz verilere göre K grubu ile kıyaslandıklarında APO ve RAD gruplarının anlamlı, CQ, RAD+CQ, RAD+APO ve CQ+APO gruplarına ait SOD aktivitelerinin anlamsız azaldığını, RAD+CQ+APO grubuna ait SOD aktivitesinin ise anlamsız arttığını gözlemledik. RAD grubu ile RAD+CQ ve RAD+APO gruplarının SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında bu gruplarda RAD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar saptadık.

RAD+CQ+APO grubuna ait SOD aktivitesi ile RAD+CQ grubu birbiri ile karşılaştırıldığında ise SOD aktivitesinde anlamsız da olsa artış belirledik. Sonuçta önceki çalışmalara benzer olarak RAD'ın SOD aktivitelerinde anlamlı bir azalmaya sebep olduğunu, RAD ile uygulanan APO ve CQ'nun ise SOD aktivitelerini anlamlı şekilde arttırdığını söyleyebiliriz.

Yapılan bir araştırmada, Wistar albino cinsi sıçanlara tek doz 8 Gy radyasyon verilmiş, TNF- α seviyelerinin ince bağırsaktaki seviyelerinin anlamlı biçimde arttığı gözlenmiştir (Khayyal ve diğ., 2019). Ong ve diğ.'nin yaptığı bir çalışmada (2010), sıçanlara haftada 3 kez 6 hafta boyunca 2,5 Gy radyasyon verilmiş, TNF- α seviyelerinin ince bağırsaktaki seviyelerinin anlamlı biçimde arttığı gözlenmiştir. Başka bir araştırmada 5 gün boyunca günde 7,5 Gy radyasyon verilen sıçanların ince bağırsağında TNF- α seviyelerinin anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir (Fernández-Gil ve diğ., 2017). Radwan ve Karam (2020) yaptıkları araştırmada Wistar albino sıçanlara uyguladıkları 5 Gy radyasyon etkisiyle ince bağırsak dokusunda TNF- α seviyelerinin arttığını, gözlemişlerdir. Başka bir çalışmada 8 Gy tek doz radyasyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanların böbreklerinde TNF- α seviyelerinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (Abdel-Magied ve Elkady, 2019).

Yapılan bir çalışmada akut pankreatitis ile ilişkili ince bağırsak mukozal bariyer hasarında serum TNF- α seviyelerinin önemli ölçüde arttığı, hasar öncesinde APO verilen grupta ise anlamlı biçimde azaldığı ortaya konmuştur (Deng ve diğ., 2016). CQ'nun en iyi bilinen özelliklerinden biri anti inflamatuvar etkileridir. Wang ve diğ.'nin (2019) yaptığı bir çalışmada inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulan farelerde artan TNF- α seviyelerinin, 1-6. günler arasında 60 mg/kg/gün CQ uygulanan grupta azaldığı gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2019). Zhang ve diğ.'nin (2021) yaptıkları çalışmada, Sprague Dawley sıçanlarda, 50 ve 100 mg/kg uygulanan grafen oksit etkisiyle akciğerde TNF- α seviyelerinde meydana gelen artışı, CQ anlamlı bir biçimde azaltmıştır. Diğ. bir çalışmada romatoid artrit oluşturulan sıçanlara verilen CQ'nun TNF- α seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Bhalekar ve diğ., 2016).

İnce bağırsak dokularında yaptığımız incelemelerden elde ettiğimiz istatistiksel verilere göre K grubu ile kıyaslandığında RAD, RAD+CQ ve RAD+CQ+APO gruplarına ait TNF- α değerlerinin anlamlı arttığını, diğer gruplarında anlamsız da olsa artış gösterdiğini belirledik. RAD ile kıyaslandıklarında RAD+CQ ve RAD+APO gruplarına ait TNF- α değerlerinin RAD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığını saptadık. RAD+CQ grubuna göre RAD+CQ+APO grubunun TNF- α değerlerinin anlamsız da olsa azaldığını gözlemledik. TNF-

α seviyelerinde RAD grubunda anlamlı artış, RAD ile CQ ve APO verilen gruplarda ise anlamlı şekilde azalış belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak, literatürdeki çalışmalara benzer olarak, RAD'ın sebep olduğu TNF- α düzeylerindeki artışı, CQ ve APO'nun azalttığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları kısaca özetleyecek olursak;

- Histolojik incelemelerimizin sonucunda, radyasyondan önce verilen CQ ve APO'nun, tek başlarına ve birlikte ince bağırsak dokusunda radyasyon kaynaklı oluşan histolojik hasarı önemli ölçüde azalttığını belirledik.
- Radyasyon ve CQ'nun antiproliferatif etkileri olduğunu, APO'nun ise proliferasyonu arttırdığını gözlemledik.
- Radyasyon, CQ ve kombinasyonlarının p62, LC3 II ve LAMP 2 seviyelerinde bir artışa sebep olduğunu, APO'nun ise bu seviyeleri azalttığını ortaya koyduk.
- RAD ve RAD + CQ gruplarının kaspaz-3 seviyelerinde anlamlı bir artış, BCL-2 seviyelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemledik. CQ'nun tek başına kaspaz-3 ve BCL-2 seviyeleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime sebep olmadığını, APO'nun ise radyasyonun sebep olduğu kaspaz-3 seviyelerindeki artışı anlamlı bir biçimde azalttığını belirledik.
- MPO ve NOX seviyelerinin radyasyon ve CQ verilen gruplarda arttığını, APO'nun bu etkiyi azalttığını saptadık.
- Radyasyon uygulamasının tüm gruplarda MDA ve LPO seviyelerini arttırdığını, APO ve CQ'nun radyasyona bağlı bu etkiyi azalttığını gösterdik.
- Radyasyon, CQ ve kombinasyonlarının sebep olduğu TAK seviyelerindeki azalmayı, APO'nun kuvvetli bir biçimde arttırdığını belirledik.
- Radyasyonun GSH, KAT ve SOD seviyelerinde azalmaya sebep olduğunu, APO ve CQ'nun ise GSH, KAT ve SOD seviyelerini arttırdığını özellikle birlikte verildiklerinde daha kuvvetli bir etkiye sahip olduklarını saptadık.
- Radyasyonun sebep olduğu TNF- α seviyelerindeki artışı, CQ ve APO'nun azalttığını gösterdik.
- Radyasyon, CQ ve APO kombinasyonu ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmadık. Bu üçlü kombinasyonda histolojik hasar, PCNA, kaspaz-3, BCL-2, LC3

II, p62, LAMP 2, NOX, MDA, LPO, MPO, GSH, KAT, SOD, TAS ve TNF- α seviyelerindeki değişimleri ilk kez belirledik.

- İncelediğimiz tüm parametreler sonucunda, radyasyonun sıçan ince bağırsağında önemli ölçüde histolojik hasar oluşturduğunu, oksidatif hasar parametrelerinde belirgin bir artışa, antioksidan sistemde zayıflamaya sebep olduğunu, antiproliferatif, inflamatuvar ve apoptotik etkilere sahip olduğunu aynı zamanda otofajiyi uyardığını belirledik. Radyasyon ile verilen CQ'nun oksidatif stresi arttırdığını, antioksidan kapasiteyi zayıflattığını, antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğunu, apoptoz üzerinde ise tek başına önemli bir değişime sebep olmadığını tespit ettik. Ayrıca radyasyon ile verilen CQ'nun p62, LC3 II ve LAMP 2 seviyelerinde önemli bir artışa sebep olmasını otofajinin lizozomal basamağındaki inhibisyon etkisine bağladık. APO'nun ise radyasyon ve CQ'nun meydana getirdiği bu değişimleri önemli ölçüde tersine çevirdiğini ve koruyucu etkilere sahip olduğunu ortaya koyduk. |

KAYNAKLAR

- [Abdel-Magied, N., Elkady, A.A., 2019, Possible curative role of curcumin and silymarin against nephrotoxicity induced by gamma-rays in rats, *Experimental and Molecular Pathology*, 111, 104299.
- Abdelrahman, M., Mazzon, E., Bauer, M., Bauer, I., Delbosc, S., Cristol, J.P., Patel, N.S., Cuzzocrea, S., Thiernemann, C., 2005, Inhibitors of NADPH oxidase reduce the organ injury in hemorrhagic shock, *Shock (Augusta, Ga.)*, 23 (2), 107–114.
- Aebi, H., 1984, Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 105,121-126.
- Aga, T., Endo, K., Tsuji, A., Aga, M., Moriyama-Kita, M., Ueno, T., Nakanishi, Y., Hatano, M., Kondo, S., Sugimoto, H., Wakisaka, N., Yoshizaki, T., 2019, Inhibition of autophagy by chloroquine makes chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma more efficient, *Auris, Nasus, Larynx*, 46 (3), 443–450.
- Akard L.P., English D., Gabig T.G., 1988, Rapid deactivation of NADPH oxidase in neutrophils: continuous replacement by newly activated enzyme sustains the respiratory burst, *Blood*, 72 (1), 322–327.
- Akin, D., Wang, S.K., Habibzadegah-Tari, P., Law, B., Ostrov, D., Li, M., Yin, X.M., Kim, J.S., Horenstein, N., Dunn, W.A., 2014, A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors, *Autophagy*, 10 (11), 2021–2035.
- Akpolat, M., Kanter, M., Uzal, M.C., 2009, Protective effects of curcumin against gamma radiation-induced ileal mucosal damage, *Archives of Toxicology*, 83 (6), 609–617.
- Albayrak S., 2019, *Ratlarda Deneyisel Olarak Oluşturulan Alt Ekstremité İskemi-Reperfüzyon Hasarında Aposinin'in Koruyucu Etkisinin Araştırılması*, T.C. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Almendral, J. M., Huebsch, D., Blundell, P. A., Macdonald-Bravo, H., & Bravo, R., 1987, Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84 (6), 1575–1579.
- Altınar, A., Atalay, H., Bilal, T., 2018, Serbest radikaller ve stres ile ilişkisi, *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7 (1), 51-55.
- Anding, A.L., Baehrecke, E.H., 2015, Autophagy in Cell Life and Cell Death, *Current topics in developmental biology*, 114, 67–91.
- Andrade, R., Voynov, G., Lalonde, R., Lin, C.J., Kalnicki, S., Gerszten, K., Heron D.E., 2004, Acute gastrointestinal and genitourinary toxicity in women with gynecologic malignancies treated with intensity-modulated radiotherapy, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 60 (1), 255-233.

- Arias, E., Cuervo, A.M., 2011, Chaperone-mediated autophagy in protein quality control, *Current Opinion in Cell Biology*, 23 (2), 184–189.
- Arias, E., Koga, H., Diaz, A., Mocholi, E., Patel, B., Cuervo, A. M., 2015, Lysosomal mTORC2/PHLPP1/Akt Regulate Chaperone-Mediated Autophagy, *Molecular Cell*, 59 (2), 270–284.
- Aryafar, T., Amini, P., Rezapoor, S., Shabeeb, D., Eleojo Musa, A., Najafi, M., Shirazi, A., 2020, Modulation of Radiation-Induced NADPH Oxidases in Rat's Heart Tissues by Melatonin, *Journal of Biomedical Physics and Engineering*.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E.Ş., Yılmaz, B., 2019, Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx), *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 26 (3), 362-369.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S., 2014, Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 360438.
- Bancroft, J.D., Stevens, A., 1982, *Theory and practice of histological techniques*, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Barbieri, S. S., Cavalca, V., Eligini, S., Brambilla, M., Caiani, A., Tremoli, E., & Colli, S., 2004, Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms, *Free Radical Biology & Medicine*, 37 (2), 156–165.
- Bedard, K., Krause, K.H., 2007, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiological Reviews*, 87 (1), 245–313.
- Ben-Zvi, I., Kivity, S., Langevitz, P., Shoenfeld, Y., 2012, Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 42 (2), 145–153.
- Bernstein, H.N., 1991, Ocular safety of hydroxychloroquine., *Annals of Ophthalmology*, 23 (8), 292–296.
- Beutler, E., 1975, *Reduced Glutathione (GSH)*, In: Bergmeyer, H.V., Ed., *Red Blood Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, 2nd Edition, Grune and Stratton, New York.
- Bhalekar, M.R., Upadhaya, P.G., Madgulkar, A.R., 2016, Fabrication and efficacy evaluation of chloroquine nanoparticles in CFA-induced arthritic rats using TNF- α ELISA. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 84, 1–8.
- Bhat, P., Kriel, J., Shubha Priya, B., Basappa, Shivananju, N. S., Loos, B., 2018, Modulating autophagy in cancer therapy: Advancements and challenges for cancer cell death sensitization, *Biochemical Pharmacology*, 147, 170–182.

- Bismar, M.M., Sinicrope, F.A., 2002, Radiation enteritis, *Current Gastroenterology Reports*, 4 (5), 361–365.
- Borges, M.C., Castro, L.A., Fonseca, B.A., 2013, Chloroquine use improves dengue-related symptoms, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108 (5), 596–599.
- Bravo, R., Celis, J. E., 1980, A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells, *The Journal of Cell Biology*, 84 (3), 795–802.
- Breen, A.P., Murphy, J.A., 1995, Reactions of oxyl radicals with DNA, *Free Radical Biology & Medicine*, 18 (6), 1033–1077.
- Burgers P. M., 2009, Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (7), 4041–4045.
- Cagin, Y.F., Erdogan, M.A., Sahin, N., Parlakpınar, H., Atayan, Y., Polat, A., Vardi, N., Yildiz, A., Tanbek, K., 2015, Protective Effects of Apocynin on Cisplatin-induced Hepatotoxicity in Rats, *Archives of Medical Research*, 46 (7), 517–526.
- Cagin, Y.F., Parlakpınar, H., Polat, A., Vardi, N., Atayan, Y., Erdogan, M.A., Ekici, K., Yildiz, A., Sarihan, M.E., Aladag, H., 2016, The protective effects of apocynin on ionizing radiation-induced intestinal damage in rats, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42 (2), 317–324.
- Cakir, Y., Ballinger, S.W., 2005, Reactive species-mediated regulation of cell signaling and the cell cycle: the role of MAPK, *Antioxidants & Redox Signaling*, 7 (5-6), 726–740.
- Catalá A., 2006, An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38 (9), 1482–1495.
- Caz, V., Elvira, M., Tabernero, M., Grande, A.G., Lopez-Plaza, B., de Miguel, E., Largo, C., Santamaria, M., 2015, Growth Hormone Protects the Intestine Preserving Radiotherapy Efficacy on Tumors: A Short-Term Study. *PloS one*, 10 (12), e0144537.
- Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., Karagin, P.H., 2020, Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi, *Güncel Gastroenteroloji*, 24 (3), 103-111.
- Celis, J.E., Celis, A., 1985, Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), 3262–3266.
- Chaachouay, H., Ohneseit, P., Toulany, M., Kehlbach, R., Multhoff, G., Rodemann, H.P., 2011, Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation, *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 99 (3), 287–292.
- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Garrel, C., Saez, F., Cadet, R., Henry-Berger, J., Schoor, M., Gottwald, U., Habenicht, U., Drevet, J.R.,

- Vernet, P., 2009, Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice, *The Journal of Clinical Investigation*, 119 (7), 2074–2085.
- Chan, E.C., Datla, S.R., Dilley, R., Hickey, H., Drummond, G.R., Dusting, G.J., 2007, Adventitial application of the NADPH oxidase inhibitor apocynin in vivo reduces neointima formation and endothelial dysfunction in rabbits, *Cardiovascular Research*, 75 (4), 710–718.
- Chen, P., Hu, T., Liang, Y., Jiang, Y., Pan, Y., Li, C., Zhang, P., Wei, D., Li, P., Jeong, L. S., Chu, Y., Qi, H., Yang, M., Hoffman, R.M., Dong, Z., Jia, L., 2015, Synergistic inhibition of autophagy and neddylation pathways as a novel therapeutic approach for targeting liver cancer, *Oncotarget*, 6 (11), 9002–9017.
- Chen, T.Y., Syu, J.S., Lin, T.C., Cheng, H.L., Lu, F.L., Wang, C.Y., 2015, Chloroquine alleviates etoposide-induced centrosome amplification by inhibiting CDK2 in adrenocortical tumor cells, *Oncogenesis*, 4 (12), e180.
- Chen, Y.P., Cao, D.Q., Chang, Y.T., Li, Y.G., 2006, Zhong nan da xue xue bao [Effect of chloroquine on the apoptosis of intestinal mucosa epithelial cells and enterogenous bacteria-endotoxin translocation after total hepatic ischemia-reperfusion in rats], *Yi xue ban = Journal of Central South University Medical Sciences*, 31 (2), 245–248.
- Cheung, C.C., Zheng, G.J., Li, A.M., Richardson, B.J., Lam, P.K., 2001, Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*, *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 52 (3-4), 189–203.
- Chloroquine—FDA prescribing information, side effects and uses. <http://www.drugs.com/pro/chloroquine.html>. Accessed 14 Apr 2018.
- Cho, K. G., Hoshino, T., Nagashima, T., Murovic, J.A., Wilson, C.B., 1986, Prediction of tumor doubling time in recurrent meningiomas. Cell kinetics studies with bromodeoxyuridine labeling, *Journal of Neurosurgery*, 65 (6), 790–794.
- Choi, S.H., Kim, M., Lee, H.J., Kim, E.H., Kim, C.H., Lee, Y.J., 2016, Effects of NOX1 on fibroblastic changes of endothelial cells in radiation-induced pulmonary fibrosis, *Molecular Medicine Reports*, 13 (5), 4135–4142.
- Choo, Z., Loh, A., Chen, Z.X., 2019, Destined to Die: Apoptosis and Pediatric Cancers, *Cancers*, 11 (11), 1623.
- Clark, R.A., Volpp, B.D., Leidal, K.G., Nauseef, W.M., 1990, Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation, *The Journal of Clinical Investigation*, 85 (3), 714–721.
- Cnubben, N.H., Rietjens, I.M., Wortelboer, H., van Zanden, J., van Bladeren, P.J., 2001, The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10 (4), 141–152.

- Collins, J.T., Nguyen, A., Badireddy, M., 2020, *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine*, In StatPearls, StatPearls Publishing.
- Compter, I., Eekers, D., Hoeben, A., Rouschop, K., Reymen, B., Ackermans, L., Beckervordersantforth, J., Bauer, N., Anten, M. M., Wesseling, P., Postma, A. A., De Ruyscher, D., Lambin, P., 2021, Chloroquine combined with concurrent radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a phase IB trial, *Autophagy*, 17 (9), 2604–2612.
- Cooper, G.M., Hausman, R.E., 2003, *The cell: a molecular approach*, 3rd edition, Washington: SinauerAssociates, 591-625.
- Cortegiani, A., Ingoglia, G., Ippolito, M., Giarratano, A., Einav, S., 2020, A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. *Journal of Critical Care*, 57, 279–283.
- Cummins, D., Faint, R., Yardumian, D.A., Dawling, S., Mackie, I., Machin, S.J., 1990, The in-vitro and ex-vivo effects of chloroquine sulphate on platelet function: implications for malaria prophylaxis in patients with impaired haemostasis, *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93 (2), 112–115.
- Çetin, H., 2011, *Tıbbi amaçlı X ışını uygulamalarında radyasyondan korunmak amacıyla kullanılan kurşunlu önlük malzemelerine alternatif olarak üretilen kurşunsuz örneklerin soğurma özelliklerinin incelenmesi*, Dokuz Eylül Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 329 (1-2), 23–38.
- Daly, J.W., Axelrod, J., Witko, B., 1960, Dynamic aspects of enzymatic O-methylation and -demethylation of catechols in vitro and in vivo, *The Journal of Biological Chemistry*, 235, 1155–1159.
- Dang, D.K., Shin, E.J., Nam, Y., Ryoo, S., Jeong, J.H., Jang, C.G., Nabeshima, T., Hong, J.S., Kim, H.C., 2016, Apocynin prevents mitochondrial burdens, microglial activation, and pro-apoptosis induced by a toxic dose of methamphetamine in the striatum of mice via inhibition of p47phox activation by ERK, *Journal of Neuroinflammation*, 13 (1), 12.
- Daniele, B., Secondulfo, M., De Vivo, R., Pignata, S., De Magistris, L., Delrio, P., Palaia, R., Barletta, E., Tambaro, R., Carratù, R., 2001, Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 32 (3), 228–230.
- D'Arcy M.S., 2019, Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy, *Cell Biology International*, 43 (6), 582–592.
- Dash, S., Chava, S., Chandra, P.K., Aydin, Y., Balart, L.A., Wu, T., 2016, Autophagy in hepatocellular carcinomas: from pathophysiology to therapeutic response, *Hepatic Medicine: Evidence and Research*, 8, 9–20.

- Datta, K., Suman, S., Kallakury, B.V., Fornace, A.J., Jr., 2012, Exposure to heavy ion radiation induces persistent oxidative stress in mouse intestine, *PloS one*, 7 (8), e42224.
- DeBosch, B.J., Heitmeier, M.R., Mayer, A.L., Higgins, C.B., Crowley, J.R., Kraft, T.E., Chi, M., Newberry, E.P., Chen, Z., Finck, B.N., Davidson, N.O., Yarasheski, K.E., Hruz, P. W., Moley, K.H., 2016, Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis, *Science Signaling*, 9 (416), ra21.
- Degtyarev, M., De Mazière, A., Orr, C., Lin, J., Lee, B.B., Tien, J.Y., Prior, W.W., van Dijk, S., Wu, H., Gray, D.C., Davis, D.P., Stern, H.M., Murray, L.J., Hoeflich, K.P., Klumperman, J., Friedman, L.S., Lin, K., 2008, Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents, *The Journal of Cell Biology*, 183 (1), 101–116.
- Dehay, C., & Kennedy, H., 2007, Cell-cycle control and cortical development, *Nature Reviews Neuroscience*, 8 (6), 438–450.
- Demir, E., Taysi, S., Ulusal, H., Kaplan, D.S., Cinar, K., Tarakcioglu, M., 2020, Nigella sativa oil and thymoquinone reduce oxidative stress in the brain tissue of rats exposed to total head irradiation, *International Journal of Radiation Biology*, 96 (2), 228–235.
- Deng, W., Abliz, A., Xu, S., Sun, R., Guo, W., Shi, Q., Yu, J., Wang, W., 2016, Severity of pancreatitis-associated intestinal mucosal barrier injury is reduced following treatment with the NADPH oxidase inhibitor apocynin, *Molecular Medicine Reports*, 14 (4), 3525–3534.
- Denham, J.W., Hauer-Jensen, M., & Peters, L.J., 2001, Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury?, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 50 (5), 1105–1106.
- Denton, D., Nicolson, S., Kumar, S., 2012, Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts, *Cell Death and Differentiation*, 19 (1), 87–95.
- Dey, S., Bishayi, B., 2015, Killing of *Staphylococcus aureus* in murine macrophages by chloroquine used alone and in combination with ciprofloxacin or azithromycin, *Journal of Inflammation Research*, 8, 29–47.
- Downey, K.M., Tan, C.K., So, A.G., 1990, DNA polymerase delta: a second eukaryotic DNA replicase, *Bio Essays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 12 (5), 231–236.
- DrugBank, Chloroquine, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00608>, Accessed 4 Mar 2016.
- Drummond, G.R., Selemidis, S., Griendling, K.K., Sobey, C.G., 2011, Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets, *Nature Reviews Drug Discovery*, 10 (6), 453–471.
- Du Toit A., 2013, Cell death: balance through a bivalent regulator, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14 (9), 546.

- Durcan, L., Clarke, W.A., Magder, L.S., Petri, M., 2015, Hydroxychloroquine Blood Levels in Systemic Lupus Erythematosus: Clarifying Dosing Controversies and Improving Adherence, *The Journal of Rheumatology*, 42 (11), 2092–2097.
- Egan, D.F., Chun, M.G., Vamos, M., Zou, H., Rong, J., Miller, C.J., Lou, H.J., Raveendra-Panickar, D., Yang, C.C., Sheffler, D.J., Teriete, P., Asara, J.M., Turk, B.E., Cosford, N.D., Shaw, R.J., 2015, Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates, *Molecular Cell*, 59 (2), 285–297.
- Elmore S, 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic Pathology*, 35 (4), 495–516.
- El-Sawalhi, M.M., Ahmed, L.A., 2014, Exploring the protective role of apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, in cisplatin-induced cardiotoxicity in rats, *Chemico-Biological Interactions*, 207, 58–66.
- Eltahawy N.A., Sarhan O.M., Hammad A.S., Abu-nour S., 2016, Effects of combined exposure to aluminum chloride and γ -radiation on histological and ultrastructure of intestinal Paneth cells, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9 (4), 400–408.
- Endo, K., Katsuyama, Y., Taira, N., Yoshioka, M., Okano, Y., Masaki, H., 2020, Impairment of the autophagy system in repetitively UVA-irradiated fibroblasts, *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 36 (2), 111–117.
- Eng, C.H., Wang, Z., Tkach, D., Toral-Barza, L., Ugwonali, S., Liu, S., Fitzgerald, S.L., George, E., Frias, E., Cochran, N., De Jesus, R., McAllister, G., Hoffman, G.R., Bray, K., Lemon, L., Lucas, J., Fantin, V.R., Abraham, R.T., Murphy, L.O., Nyfeler, B., 2016, Macroautophagy is dispensable for growth of KRAS mutant tumors and chloroquine efficacy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (1), 182–187.
- Engels, F., Renirie, B.F., Hart, B.A., Labadie, R.P., Nijkamp, F.P., 1992, Effects of apocynin, a drug isolated from the roots of *Picrorhiza kurroa*, on arachidonic acid metabolism, *FEBS Letters*, 305 (3), 254–256.
- Erbil, Y., Oztezcan, S., Giriş, M., Barbaros, U., Olgaç, V., Bilge, H., Küçüçük, H., Toker, G., 2005, The effect of glutamine on radiation-induced organ damage, *Life Sciences*, 78 (4), 376–382.
- Erel O., 2004, A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clinical Biochemistry*, 37 (4), 277–285.
- Farias, K. J., Machado, P. R., Muniz, J. A., Imbeloni, A.A., da Fonseca, B.A., 2015, Antiviral activity of chloroquine against dengue virus type 2 replication in *Aotus* monkeys, *Viral Immunology*, 28 (3), 161–169.
- Fernández-Gil, B., Moneim, A.E., Ortiz, F., Shen, Y.Q., Soto-Mercado, V., Mendivil-Perez, M., Guerra-Librero, A., Acuña-Castroviejo, D., Molina-Navarro, M.M., García-Verdugo, J.M., Sayed, R.K., Florido, J., Luna, J.D., López, L.C., Escames, G., 2017, Melatonin

- protects rats from radiotherapy-induced small intestine toxicity, *PloS one*, 12 (4), e0174474.
- Fink, S.L., Cookson, B.T., 2005, Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells, *Infection and Immunity*, 73 (4), 1907–1916.
- Gajewska Z.G., Grzybowski J., 1981, Analysis of an industrial smoke preparation, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 14, 3–4.
- Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., Dynlacht, B.D., ... Kroemer, G., 2009, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes, *Cell Death and Differentiation*, 16 (8), 1093–1107.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., 2012, Molecular Definitions Of Cell Death Subroutines: Recommendations Of The Nomenclature Committee On Cell Death, *Cell Death and Differentiation*, 19 (1), 107–120.
- Gao, F., Kinnula, V.L., Myllärniemi, M., Oury, T.D., 2008, Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis, *Antioxidants & Redox Signaling*, 10 (2), 343–354.
- Geleijns, J., Broerse, J.J., Brugmans, M.J.P., 2004, Health effects of radiation exposure in diagnostic radiology, *European Radiology Supplements*, 14, 19–27.
- Geser, A., Brubaker, G., Draper, C.C., 1989, Effect of a malaria suppression program on the incidence of African Burkitt's lymphoma, *American Journal of Epidemiology*, 129 (4), 740–752.
- Gimenes, R., Gimenes, C., Rosa, C.M., Xavier, N.P., Campos, D., Fernandes, A., Cezar, M., Guirado, G.N., Pagan, L.U., Chaer, I.D., Fernandes, D.C., Laurindo, F.R., Cicogna, A.C., Okoshi, M.P., Okoshi, K., 2018, Influence of apocynin on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Cardiovascular Diabetology*, 17 (1), 15.
- Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Romero, M., Sánchez, M., Zarzuelo, M.J., Gómez-Morales, M., O'Valle, F., López-Farré, A.J., Algieri, F., Gálvez, J., Pérez-Vizcaino, F., Sabio, J.M., Duarte, J., 2014, Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus, *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 64(2), 330–337.
- Green, R.M., Graham, M., O'Donovan, M.R., Chipman, J.K., Hodges, N.J., 2006, Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity, *Mutagenesis*, 21 (6), 383–390.
- Grilo, A.L., Mantalaris, A., 2019, Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective, *Biotechnology Advances*, 37 (3), 459–475.

- Grimaldi, A., Santini, D., Zappavigna, S., Lombardi, A., Misso, G., Boccellino, M., Desiderio, V., Vitiello, P.P., Di Lorenzo, G., Zoccoli, A., Pantano, F., Caraglia, M., 2015, Antagonistic effects of chloroquine on autophagy occurrence potentiate the anticancer effects of everolimus on renal cancer cells, *Cancer Biology & Therapy*, 16 (4), 567–579.
- Gustafsson, L.L., Lindström, B., Grahnén, A., Alván, G., 1987, Chloroquine excretion following malaria prophylaxis, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 24 (2), 221–224.
- Gutteridge J.M., 1995, Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clinical Chemistry*, 41 (12 Pt 2), 1819–1828.
- Güvenç D., Güvenç T., 2017, Apoptotik hücre ölümü ve toksikolojik yanıtta önemi, *Animal Health Production and Hygiene*, 6 (2), 499 – 504.
- Halliwell, B., 1999, Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning), *Free Radical Research*, 31 (4), 261–272.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, USA, 3rd edition, 10-121.
- He, C., Bassik, M.C., Moresi, V., Sun, K., Wei, Y., Zou, Z., An, Z., Loh, J., Fisher, J., Sun, Q., Korsmeyer, S., Packer, M., May, H.I., Hill, J.A., Virgin, H.W., Gilpin, C., Xiao, G., Bassel-Duby, R., Scherer, P.E., Levine, B., 2012, Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis, *Nature*, 481 (7382), 511–515.
- He, C., Klionsky, D.J., 2009, Regulation mechanisms and signaling pathways of autophag, *Annual Review of Genetics*, 43, 67–93.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B. Ames, B. N., 1999, 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage, *Methods in Enzymology*, 300, 156–166.
- Helmy, S.A., El-Mesery, M., El-Karef, A., Eissa, L.A., El Gayar, A.M., 2018, Chloroquine upregulates TRAIL/TRAILR2 expression and potentiates doxorubicin anti-tumor activity in thioacetamide-induced hepatocellular carcinoma model, *Chemico-Biological Interactions*, 279, 84–94.
- Henni, M., Ali, D., 2012, Effets indésirables de la radiothérapie [Radiation induced side effects], *La Revue du praticien*, 62 (4), 461–466.
- Hersek İ., 2019, *Yüksek Yağlı Diyetle İndüklenmiş Obez Sıçanlarda Aposininin Testis Üzerine Etkisi: Histolojik ve Biyokimyasal Değerlendirme*, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Heumüller, S., Wind, S., Barbosa-Sicard, E., Schmidt, H.H., Busse, R., Schröder, K., Brandes, R.P., 2008, Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant, *Hypertension (Dallas, Texas: 1979)*, 51 (2), 211–217.

- Hougee, S., Hartog, A., Sanders, A., Graus, Y.M., Hoijer, M.A., Garssen, J., van den Berg, W.B., van Beuningen, H.M., Smit, H.F., 2006, Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice, *European Journal of Pharmacology*, 531 (1-3), 264–269.
- Howarth, G.S., Francis, G.L., Cool, J.C., Xu, X., Byard, R.W., Read, L.C., 1996, Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats, *The Journal of Nutrition*, 126 (10), 2519–2530.
- Hu, J.J., Dubin, N., Kurland, D., Ma, B.L., Roush, G.C., 1995, The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities, *Mutation Research*, 336 (2), 193–201.
- Hwang, Y.J., Nam, S.J., Chun, W., Kim, S.I., Park, S.C., Kang, C.D., Lee, S. J., 2019, Anti-inflammatory effects of apocynin on dextran sulfate sodium-induced mouse colitis model. *PloS one*, 14 (5), e0217642.
- Ibi, M., Matsuno, K., Shiba, D., Katsuyama, M., Iwata, K., Kakehi, T., Nakagawa, T., Sango, K., Shirai, Y., Yokoyama, T., Kaneko, S., Saito, N., Yabe-Nishimura, C., 2008, Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain, *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28 (38), 9486–9494.
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A., 2018, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*, 54 (4), 287–293.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Mizushima, N., 2012, The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes, *Cell*, 151 (6), 1256–1269.
- Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., Eskelinen, E.L., 2004, Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles, *Journal of Cell Science*, 117 (20), 4837–4848.
- Jancinová, V., Nosál, R., Petříková, M., 1994, On the inhibitory effect of chloroquine on blood platelet aggregation, *Thrombosis Research*, 74 (5), 495–504.
- Jang, C.H., Choi, J.H., Byun, M.S., Jue, D.M., 2006, Chloroquine inhibits production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes, *Rheumatology (Oxford, England)*, 45 (6), 703–710.
- Janku, F., McConkey, D.J., Hong, D.S., Kurzrock, R., 2011, Autophagy as a target for anticancer therapy, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8 (9), 528–539.
- Javois, L.C., 1999, *Immunocytochemical Methods and Protocols*, Humana Press, New Jersey, ISBN: 0-89603-570-0.

- Jewell, J.L., Russell, R.C., Guan, K.L., 2013, Amino acid signalling upstream of mTOR, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14 (3), 133–139.
- Jiang, P.D., Zhao, Y.L., Deng, X.Q., Mao, Y.Q., Shi, W., Tang, Q.Q., Li, Z.G., Zheng, Y.Z., Yang, S.Y., Wei, Y.Q., 2010, Antitumor and antimetastatic activities of chloroquine diphosphate in a murine model of breast cancer, *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 64 (9), 609–614.
- Johnson, D.K., Schillinger, K.J., Kwait, D.M., Hughes, C.V., McNamara, E.J., Ishmael, F., O'Donnell, R.W., Chang, M.M., Hogg, M.G., Dordick, J.S., Santhanam, L., Ziegler, L.M., Holland, J.A., 2002, Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols, *Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research*, 9 (3), 191–203.
- Jomova, K., Valko, M., 2011, Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology*, 283 (2-3), 65–87.
- Junquiera, L.C., Carneiro, J., Robert, O., Kelley, R., 1988, *Basic Histology*, 8. Baskı. New York.
- Juríková, M., Danihel, L., Polák, Š., Varga, I., 2016, Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer, *Acta Histochemica*, 118 (5), 544–552.
- Kale, J., Osterlund, E.J., Andrews, D.W., 2018, BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death, *Cell Death and Differentiation*, 25 (1), 65–80.
- Kalia, S., Dutz, J.P., 2007, New concepts in antimalarial use and mode of action in dermatology, *Dermatologic Therapy*, 20 (4), 160–174.
- Kalkavan, H., Green, D.R., 2018, MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business, *Cell Death and Differentiation*, 25 (1), 46–55.
- Kamizato, M., Nishida, K., Masuda, K., Takeo, K., Yamamoto, Y., Kawai, T., Teshima-Kondo, S., Tanahashi, T., Rokutan, K., 2009, Interleukin 10 inhibits interferon gamma- and tumor necrosis factor alpha-stimulated activation of NADPH oxidase 1 in human colonic epithelial cells and the mouse colon, *Journal of Gastroenterology*, 44 (12), 1172–1184.
- Kanter, M., Tarladaçalışır, Y.T., Akpolat M., Mercantepe T., 2008, Gamma radyasyona bağlı oluşan jejunum mukoza hasarına karşı curcumin ve amifostinin koruyucu etkilerinin incelenmesi, *Tip Araştırmaları Dergisi*, 6 (3), 128-135.
- Karabulut-Bulan, O., Us, H., Bayrak, B.B., Sezen-Us A., Yanardağ, R., 2017, The role of melatonin and carnosine in prevention of oxidative intestinal injury induced by gamma irradiation in rats, *Biologia*, 72 (8), 935—945.
- Kaufmann, A.M., Krise, J.P., 2007, Lysosomal sequestration of amine-containing drugs: analysis and therapeutic implications, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96 (4), 729–746.

- Kavram K., 2016, *Metotreksat Uygulanan Sıçanlarda Aposinin'in Testisler Üzerindeki Etkilerinin Biyokimyasal ve Histolojik Olarak İncelenmesi*, T.C. Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Programı, Bilim Uzmanlığı Tezi.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer*, 26 (4), 239–257.
- Kersh G. J., 2013, Antimicrobial therapies for Q fever, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11 (11), 1207–1214.
- Keskek, M., Gocmen, E., Kilic, M., Gencturk, S., Can, B., Cengiz, M., Okten, R.M., Koc, M., 2006, Increased expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in radiation-induced small bowel injury in rats, *The Journal of Surgical Research*, 135 (1), 76–84.
- Khayyal, M.T., Abdel-Naby, D.H., El-Ghazaly, M.A., 2019, Propolis extract protects against radiation-induced intestinal mucositis through anti-apoptotic mechanisms, *Environmental Science and Pollution Research International*, 26 (24), 24672–24682.
- Khraishi, M.M., Singh, G., 1996, The role of anti-malarials in rheumatoid arthritis--the American experience, *Lupus*, 5 (1), 41–44.
- Kılınç K., Kılınç A., 2002, Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33, 110-118.
- Kim, B.H., Jung, H.W., Seo, S.H., Shin, H., Kwon, J., Suh, J.M., 2018, Synergistic actions of FGF2 and bone marrow transplantation mitigate radiation-induced intestinal injury, *Cell Death & Disease*, (3), 383.
- Kim, H., Bernard, M.E., Flickinger, J., Epperly, M.W., Wang, H., Dixon, T.M., Shields, D., Houghton, F., Zhang, X., Greenberger, J.S., 2011, The autophagy-inducing drug carbamazepine is a radiation protector and mitigator, *International Journal of Radiation Biology*, 87 (10), 1052–1060.
- Kim, H.J., Kang, S.U., Lee, Y.S., Jang, J.Y., Kang, H., Kim, C.H., 2020, Protective Effects of N-Acetylcysteine against Radiation-Induced Oral Mucositis In Vitro and In Vivo, *Cancer Research and Treatment*, 52 (4), 1019–1030.
- Kim, K.A., Park, J.Y., Lee, J.S., Lim, S., 2003, Cytochrome P450 2C8 and CYP3A4/5 are involved in chloroquine metabolism in human liver microsomes, *Archives of Pharmacal Research*, 26 (8), 631–637.
- Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., Dikic, I., 2009, A role for ubiquitin in selective autophagy, *Molecular Cell*, 34 (3), 259–269.
- Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., Ahn, H.J., Ait-Mohamed, O., Ait-Si-Ali, S., Akematsu, T., Akira, S., Al-Younes, H.M., Al-Zeer, M.A., Albert, M. L., Albin, R.L., Alegre-Abarategui, J., ... Zuckerbraun, B., 2012, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, *Autophagy*, 8 (4), 445–544.

- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., Adhihetty, P.J., Adler, S.G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M.K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P.V., Aguirre-Ghiso, J., Airolidi, E.M., Ait-Si-Ali, S., Akematsu, T., Akporiaye, E.T., AL-Rubeai, M., Albaiceta, G.M., Albanese, C., Albani, D., Albert, M.L., Aldudo, J., Algül, H., Alirezaei, M., Alloza, I., Almasan, A., Almonte-Beceril, M., Alnemri, E.S., Alonso, C., Altan-Bonnet, N., Altieri, D.C., Alvarez, S., Alvarez-Erviti, L., Alves, S., Amadoro, G., Amano, A., Amantini, C., Ambrosio, S., Amelio, I., Amer, A.O., Amessou, M., Amon, A., An, Z., Anania, F.A., Andersen, S.U., Andley, U.P., Andreadi, C.K., Andrieu-Abadie, N., Anel, A., Ann, D.K., Anoopkumar-Dukie, S., Antonioli, M., Aoki, H., Apostolova, N., Aquila, S., Aquilano, K., Araki, K., Arama, E., Aranda, A., Araya, J., Arcaro, A., Arias, E., Arimoto, H., Ariosia, A.R., Armstrong, J.L., Arnould, T., Arsov, I., Asanuma, K., Askanas, V., Asselin, E., Atarashi, R., Atherton, S.S., Atkin, J.D., Attardi, L.D., Auburger, P., Auburger, G., Aurelian, L., Autelli, R., Avagliano, L., Avantiaggiati, M.L., Avrahami, L., Awale, S., Azad, N., Bachetti, T., Backer, J.M., Bae, D.-H., Bae, J.-S., Bae, O.-N., Bae, S.H., Baehrecke, E.H., Baek, S.-H., Baghdiguian, S., Bagniewska-Zadworna, A., et al., 2016, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition), *Autophagy*, 12, 1–222.
- Koukourakis, M.I., Mitrakas, A.G., Giatromanolaki, A., 2016, Therapeutic interactions of autophagy with radiation and temozolomide in glioblastoma: evidence and issues to resolve, *British Journal of Cancer*, 114 (5), 485–496.
- Köroğlu, K.M., Çevik, Ö., Şener, G., Ercan, F., 2019, Apocynin alleviates cisplatin-induced testicular cytotoxicity by regulating oxidative stress and apoptosis in rats, *Andrologia*, 51 (4), e13227.
- Krafts, K., Hempelmann, E., Skórska-Stania, A., 2012, From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy, *Parasitology Research*, 111 (1), 1–6.
- Kroemer, G., Mariño, G., Levine, B., 2010, Autophagy and the integrated stress response, *Molecular Cell*, 40 (2), 280–293.
- Lacave-Lapalun, J. V., Benderitter, M., Linard, C., 2014, Flagellin and LPS each restores rat lymphocyte populations after colorectal irradiation, *Journal of Leukocyte Biology*, 95 (6), 931–940.
- Lafeber, F.P., Beukelman, C.J., van den Worm, E., van Roy, J.L., Vianen, M.E., van Roon, J.A., van Dijk, H., Bijlsma, J.W., 1999, Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis, *Rheumatology (Oxford, England)*, 38 (11), 1088–1093.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., Tooze, S.A., 2013, The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14 (12), 759–774.
- Lamore, S.D., Wondrak, G.T., 2012, Autophagic-lysosomal dysregulation downstream of cathepsin B inactivation in human skin fibroblasts exposed to UVA, *Photochemical &*

photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 11 (1), 163–172.

- Landewé, R.B., Miltenburg, A.M., Verdonk, M.J., Verweij, C.L., Breedveld, F.C., Daha, M.R., Dijkmans, B.A., 1995, Chloroquine inhibits T cell proliferation by interfering with IL-2 production and responsiveness, *Clinical and Experimental Immunology*, 102 (1), 144–151.
- Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepień, A., Kadziolka, A., 1986, The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis, *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 155 (3), 275–283.
- Levine, B., Packer, M., Codogno, P., 2015, Development of autophagy inducers in clinical medicine, *The Journal of Clinical Investigation*, 125 (1), 14–24.
- Levy, J.M., Thompson, J.C., Griesinger, A.M., Amani, V., Donson, A.M., Birks, D.K., Morgan, M.J., Mirsky, D.M., Handler, M.H., Foreman, N.K., Thorburn, A., 2014, Autophagy inhibition improves chemosensitivity in BRAF(V600E) brain tumors, *Cancer Discovery*, 4 (7), 773–780.
- Li, Z., Wang, Y., 2015, Effect of NADPH oxidase inhibitor-apocynin on the expression of Src homology-2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) exposed renal ischemia/reperfusion injury in rats, *Toxicology Reports*, 2, 1111–1116.
- Liao, S., Tang, S., Tan, B., Li, J., Qi, M., Cui, Z., Zha, A., Wang, Y., Yin, Y., Sun, P., Tang, Y., 2020, Chloroquine Improves Deoxynivalenol-Induced Inflammatory Response and Intestinal Mucosal Damage in Piglets, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9834813.
- Limón-Pacheco, J., Gonsébat, M.E., 2009, The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress, *Mutation Research*, 674 (1-2), 137–147.
- Liu, L. N., Shi, L., Li, S. C., Zhang, W.J., Zhang, Y., Zhang, Z.P., 2015, Protective Role of Rheum Tanguticum Polysaccharide 1 in Radiation- induced Intestinal Mucosal Injury, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 14 (3), 833–841.
- Long, L., Yang, X., Southwood, M., Lu, J., Marciniak, S.J., Dunmore, B.J., Morrell, N.W., 2013, Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation, *Circulation Research*, 112 (8), 1159–1170.
- Longo, D., 2010, *Harrison's Hematology and Oncology*, 1th ed. 2. Hong Kong: McGrawHill Professional, 294-317.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.

- Lu, Q., Harris, V.A., Kumar, S., Mansour, H.M., Black, S.M., 2015, Autophagy in neonatal hypoxia ischemic brain is associated with oxidative stress, *Redox Biology*, 6, 516–523.
- Lu, Z., Luo, R.Z., Lu, Y., Zhang, X., Yu, Q., Khare, S., Kondo, S., Kondo, Y., Yu, Y., Mills, G.B., Liao, W.S., Bast, R.C., Jr, 2008, The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells, *The Journal of Clinical Investigation*, 118 (12), 3917–3929.
- Luchtefeld, R., Luo, R., Stine, K., Alt, M.L., Chernovitz, P.A., Smith, R.E., 2008, Dose formulation and analysis of diapocynin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2), 301–306.
- Luo, L.J., Liu, Y.P., Yuan, X., Zhang, G.P., Hou, N., Wu, X.Q., Luo, J.D., Zhang, G.S., 2016, Leptin attenuates the contractile function of adult rat cardiomyocytes involved in oxidative stress and autophagy, *Acta Cardiologica Sinica*, 32 (6), 723–730.
- Luo, Y., Wang, B., Liu, J., Ma, F., Luo, D., Zheng, Z., Lu, Q., Zhou, W., Zheng, Y., Zhang, C., Wang, Q., Sha, W., Chen, H., 2020, Ginsenoside RG1 enhances the paracrine effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on radiation induced intestinal injury, *Aging*, 13 (1), 1132–1152.
- Mackenzie A.H., 1983, Dose refinements in long-term therapy of rheumatoid arthritis with antimalarials, *The American Journal of Medicine*, 75 (1A), 40–45.
- Maga, G., Hubscher, U., 2003, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners, *Journal of Cell Science*, 116 (Pt 15), 3051–3060.
- Maharwal, J., Samarth, R.M., Saini, M.R., 2005, Antioxidative effect of Rajgira leaf extract in liver of Swiss albino mice after exposure to different doses of gamma radiation, *Phytotherapy Research: PTR*, 19 (8), 717–720.
- Mahmoud, M., Saleh, D.O., Safar, M.M., Agha, A.M., Khattab, M.M., 2021, Chloroquine ameliorates bone loss induced by d-galactose in male rats via inhibition of ERK associated osteoclastogenesis and antioxidant effect, *Toxicology Reports*, 8, 366–375.
- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J.A., Geneste, O., Kroemer, G., 2007, Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1, *The EMBO Journal*, 26 (10), 2527–2539.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., Kroemer, G., 2007, Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8 (9), 741–752.
- Marcussen, M., Larsen, P.J., 1996, Cell cycle-dependent regulation of cellular ATP concentration, and depolymerization of the interphase microtubular network induced by elevated cellular ATP concentration in whole fibroblasts, *Cell Motility and The Cytoskeleton*, 35 (2), 94–99.

- Marinković, M., Šprung, M., Buljubašić, M., Novak, I., 2018, Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 8023821.
- Marmor, M.F., Kellner, U., Lai, T.Y., Lyons, J.S., Mieler, W.F., American Academy of Ophthalmology, 2011, Revised recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy, *Ophthalmology*, 118 (2), 415–422.
- Martinvalet, D., Zhu, P., Lieberman, J., 2005, Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis, *Immunity*, 22 (3), 355–370.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., White, E., 2007, Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability, *Genes & Development*, 21 (11), 1367–1381.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., Akira, S., Noda, T., Yoshimori, T., 2009, Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages, *Nature Cell Biology*, 11 (4), 385–396.
- Matsuno, K., Yamada, H., Iwata, K., Jin, D., Katsuyama, M., Matsuki, M., Takai, S., Yamanishi, K., Miyazaki, M., Matsubara, H., Yabe-Nishimura, C., 2005, Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice, *Circulation*, 112 (17), 2677–2685.
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.J., Coppes, R.P., Engedal, N., Mari, M., Reggiori, F., 2018, Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion, *Autophagy*, 14 (8), 1435–1455.
- Maycotte, P., Aryal, S., Cummings, C.T., Thorburn, J., Morgan, M.J., Thorburn, A., 2012, Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy, *Autophagy*, 8 (2), 200–212.
- Maycotte, P., Gearheart, C.M., Barnard, R., Aryal, S., Mulcahy Levy, J.M., Fosmire, S.P., Hansen, R.J., Morgan, M.J., Porter, C.C., Gustafson, D.L., Thorburn, A., 2014, STAT3-mediated autophagy dependence identifies subtypes of breast cancer where autophagy inhibition can be efficacious, *Cancer Research*, 74 (9), 2579–2590.
- McArdle, A.H., Reid, E.C., Laplante, M.P., Freeman, C.R., 1986, Prophylaxis against radiation injury. The use of elemental diet prior to and during radiotherapy for invasive bladder cancer and in early postoperative feeding following radical cystectomy and ileal conduit, *Archives of Surgery (Chicago, Ill.: 1960)*, 121 (8), 879–885.
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., Codogno, P., 2010, Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells, *Cell Research*, 20 (7), 748–762.
- Meineke, V., Fliedner, T.M., 2005, Radiation-induced multi-organ involvement and failure: challenges for irradiation accident medical management and future research, *The British Journal of Radiology*, 27 (1), 196–200.

- Mescher, A.L., 2009, *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, 12th Edition: Text and Atlas, McGraw-Hill Medical, ISBN: 978-0-07-160431-4.
- Meyer, J.W., Schmitt, M.E., 2000, A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis, *FEBS Letters*, 472 (1), 1–4.
- Michaelides, M., Stover, N.B., Francis, P.J., Weleber, R.G., 2011, Retinal toxicity associated with hydroxychloroquine and chloroquine: risk factors, screening, and progression despite cessation of therapy, *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, 129 (1), 30–39.
- Miller, D.K., Oelrichs, C.E., Sun, G.Y., Simonyi, A., 2014, Subchronic apocynin treatment attenuates methamphetamine-induced dopamine release and hyperactivity in rats, *Life Sciences*, 98 (1), 6–11.
- Miyachi, K., Fritzler, M.J., Tan, E.M., 1978, Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 121 (6), 2228–2234.
- Mizushima, N., 2010, The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation, *Current Opinion in Cell Biology*, 22 (2), 132–139.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J., 2008, Autophagy fights disease through cellular self-digestion, *Nature*, 451 (7182), 1069–1075.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., Ohsumi, Y., 1998, A protein conjugation system essential for autophagy, *Nature*, 395 (6700), 395–398.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1991, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacological Reviews*, 43 (2), 109–142.
- Monobe, M., Hino, M., Sumi, M., Uzawa, A., Hirayama, R., Ando, K., 2005, Protective effect of melatonin on γ -ray induced intestinal damage, *International Journal of Radiational Biology*, 81 (11), 855–60.
- Moon, C., Kim, S.H., Kim, J.C., Hyun, J.W., Lee, N.H., Park, J.W., Shin, T., 2008, Protective effect of phlorotannin components phloroglucinol and eckol on radiation-induced intestinal injury in mice, *Phytotherapy research: PTR*, 22 (2), 238–242.
- Mortezaee, K., Goradel, N.H., Amini, P., Shabeeb, D., Musa, A.E., Najafi, M., Farhood, B., 2019, NADPH Oxidase as a Target for Modulation of Radiation Response; Implications to Carcinogenesis and Radiotherapy, *Current Molecular Pharmacology*, 12 (1), 50–60.
- Motallebzadeh, E., Tameh, A.A., Zavareh, S., Farhood, B., Aliasgharzadeh, A., Mohseni, M., 2020, Neuroprotective effect of melatonin on radiation-induced oxidative stress and apoptosis in the brainstem of rats, *Journal of Cellular Physiology*, 235 (11), 8791–8798.
- Muijsers, R.B., van Den Worm, E., Folkerts, G., Beukelman, C.J., Koster, A.S., Postma, D.S., Nijkamp, F.P., 2000, Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages, *British Journal of Pharmacology*, 130 (4), 932–936.

- Musa, A.E., Shabeeb, D., Alhilfi, H., 2019, Protective Effect of Melatonin Against Radiotherapy-Induced Small Intestinal Oxidative Stress: Biochemical Evaluation, *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55 (6), 308.
- Muskhelishvili, L., Latendresse, J.R., Kodell, R.L., Henderson, E.B., 2003, Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 51 (12), 1681–1688.
- Müller, A.A., Reiter, S.A., Heider, K.G., Wagner, H., 1999, Plant-derived acetophenones with antiasthmatic and anti-inflammatory properties: inhibitory effects on chemotaxis, right angle light scatter and actin polymerization of polymorphonuclear granulocytes, *Planta Medica*, 65 (7), 590–594.
- Myloie, A.A., Collins, H., Umbles, C., Kyle, J., 1986, Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82 (3), 512–520.
- Naqvi, T.Z., Luthringer, D., Marchevsky, A., Saouf, R., Gul, K., Buchbinder, N. A., 2005, Chloroquine-induced cardiomyopathy-echocardiographic features, *Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography*, 18 (4), 383–387.
- Odabasi, M., Gokdemir, S., Muftuoglu, T., Aktekin, A., Saglam, A., Aker, F., 2014, Prophylactic and therapeutic effects of oral budesonide for acute radiation-induced enteritis and colitis in rats, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7 (4), 940–946.
- Ong, Z.Y., Gibson, R.J., Bowen, J.M., Stringer, A.M., Darby, J.M., Logan, R.M., Yeoh, A.S., Keefe, D.M., 2010, Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis, *Radiation oncology (London, England)*, 5, 22.
- Ortiz, F., Acuña-Castroviejo, D., Doerrier, C., Dayoub, J.C., López, L.C., Venegas, C., García, J.A., López, A., Volt, H., Luna-Sánchez, M., Escames, G., 2015, Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis, *Journal of Pineal Research*, 58 (1), 34–49.
- Ouyang, G., Xiong, L., Liu, Z., Lam, B., Bui, B., Ma, L., Chen, X., Zhou, P., Wang, K., Zhang, Z., Huang, H., Miao, X., Chen, W., Wen, Y., 2018, Inhibition of autophagy potentiates the apoptosis-inducing effects of photodynamic therapy on human colon cancer cells, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 21, 396–403.
- Özalpan, A., 2001, *Temel Radyobioloji*, 1. Basım, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul, ISBN:975-8574-00-0.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z., 2015, Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6 (3): 331-336.

- Özkan, A., Fışkın, K., 2004, Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler, *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14: 52-60.
- Park, H.S., You, G.E., Yang, K.H., Kim, J.Y., An, S., Song, J.Y., Lee, S.J., Lim, Y.K., Nam, S.Y., 2015, Role of AKT and ERK pathways in controlling sensitivity to ionizing radiation and adaptive response induced by low-dose radiation in human immune cells, *European Journal of Cell Biology*, 94 (12), 653–660.
- Pascolo, S., 2016, Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies, *European Journal Of Pharmacology*, 771, 139–144.
- Peña-Blanco, A., García-Sáez, A.J., 2018, Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis, *The FEBS Journal*, 285 (3), 416–431.
- Peters, E.A., Hiltermann, J.T., Stolk, J., 2001, Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics, *Free Radical Biology & Medicine*, 31 (11), 1442–1447.
- Petherick, K.J., Conway, O.J., Mpamhanga, C., Osborne, S.A., Kamal, A., Saxty, B., Ganley, I.G., 2015, Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy, *The Journal of Biological Chemistry*, 290 (18), 11376–11383.
- Petrônio, M.S., Zeraik, M.L., Fonseca, L.M., Ximenes, V.F., 2013, Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18 (3), 2821–2839.
- Picot, S., Peyron, F., Vuillez, J.P., Polack, B., Ambroise-Thomas, P., 1991, Chloroquine inhibits tumor necrosis factor production by human macrophages in vitro, *The Journal of Infectious Diseases*, 164 (4), 830.
- Pietersma, A., de Jong, N., de Wit, L.E., Kraak-Slee, R.G., Koster, J.F., Sluiter, W., 1998, Evidence against the involvement of multiple radical generating sites in the expression of the vascular cell adhesion molecule-1, *Free Radical Research*, 28 (2), 137–150.
- Pişkin, Ö., Aydın, B.G., Baş, Y., Karakaya, K., Can, M., Elmas, Ö., Büyükuysal, M.Ç., 2018, Protective Effects of Quercetin on Intestinal Damage Caused by Ionizing Radiation, *The Medical Bulletin of Haseki*, 56, 14-21.
- Plantone, D., Koudriavtseva, T., 2018, Current and Future Use of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Infectious, Immune, Neoplastic, and Neurological Diseases: A Mini-Review, *Clinical Drug Investigation*, 38 (8), 653–671.
- Poon, I.K., Lucas, C.D., Rossi, A.G., Ravichandran, K.S., 2014, Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential, *Nature Reviews Immunology*, 14 (3), 166–180.
- Prelich, G., Stillman, B., 1988, Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA, *Cell*, 53 (1), 117–126.

- Prokai, L., Yan, L.J., Vera-Serrano, J.L., Stevens, S.M., Jr, Forster, M.J., 2007, Mass spectrometry-based survey of age-associated protein carbonylation in rat brain mitochondria, *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 42 (12), 1583–1589.
- Puissant, A., Fenouille, N., Auberger, P., 2012, When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1, *American Journal of Cancer Research*, 2 (4), 397–413.
- Pursell, Z.F., Isoz, I., Lundström, E.B., Johansson, E., Kunkel, T.A., 2007, Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication, *Science (New York, N.Y.)*, 317 (5834), 127–130.
- Quinn, M.T., Ammons, M.C., Deleo, F.R., 2006, The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction, *Clinical Science (London, England: 1979)*, 111 (1), 1–20.
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A., 1991, Detection of catalase in rat heart mitochondria, *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (32), 22028–22034.
- Radwan, R.R., Karam, H.M., 2020, Resveratrol attenuates intestinal injury in irradiated rats via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, *Environmental Toxicology*, 35 (2), 223–230.
- Rao, R.S., Møller, I.M., 2011, Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins, *Proteomics*, 11 (21), 4166–4173.
- Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G., Acuña-Castroviejo, D., 1995, A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant, *Journal of Pineal Research*, 18 (1), 1–11.
- Reljic, B., Conos, S., Lee, E.F., Garnier, J.M., Dong, L., Lessene, G., Fairlie, W.D., Vaux, D.L., Lindqvist, L.M., 2016, BAX-BAK1-independent LC3B lipidation by BH3 mimetics is unrelated to BH3 mimetic activity and has only minimal effects on autophagic flux, *Autophagy*, 12 (7), 1083–1093.
- Riganti, C., Costamagna, C., Bosia, A., Ghigo, D., 2006, The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212 (3), 179–187.
- Rode, H.J., 2008, *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation*, 4th edition, Mannheim: Roche Diagnostics GmbH.
- Rokutan, K., Kawahara, T., Kuwano, Y., Tominaga, K., Sekiyama, A., Teshima-Kondo, S., 2006, NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis, *Antioxidants & Redox Signaling*, 8 (9-10), 1573–1582.
- Ronan, B., Flamand, O., Vescovi, L., Dureuil, C., Durand, L., Fassy, F., Bachelot, M.F., Lambert, A., Mathieu, M., Bertrand, T., Marquette, J.P., El-Ahmad, Y., Filoche-Romme, B., Schio, L., Garcia-Echeverria, C., Goulaouic, H., Pasquier, B., 2014, A highly

- potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy, *Nature Chemical Biology*, 10 (12), 1013–1019.
- Ross, M.H., Pawlina, W., 2010, *Histology: A Text and Atlas*, 6. edition, Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer Health, Inc., Philadelphia, USA.
- Roszak, A., Wareńczak-Florczak, Z., Bratos, K., Milecki, P., 2012, Incidence of radiation toxicity in cervical cancer and endometrial cancer patients treated with radiotherapy alone versus adjuvant radiotherapy, *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy: Journal of Great Poland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology*, 17(6), 332–338.
- Ruiz-Irastorza, G., Ramos-Casals, M., Brito-Zeron, P., Khamashta, M.A., 2010, Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69 (1), 20–28.
- Saada, H.N., Rezk, R.G., Eltahawy, N.A., 2010, Lycopene protects the structure of the small intestine against gamma-radiation-induced oxidative stress, *Phytotherapy Research: PTR*, 24 (2), 204–208.
- Saif-Elnasr, M., Abdel Fattah, S.M., Swailam, H.M., 2019, Treatment of hepatotoxicity induced by γ -radiation using platelet-rich plasma and/or low molecular weight chitosan in experimental rats, *International Journal of Radiation Biology*, 95 (11), 1517–1528.
- Sarkar, S., Davies, J.E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., Rubinsztein, D.C., 2007, Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein, *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (8), 5641–5652.
- Sasaki, K., Tsuno, N. H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., Nishikawa, T., Shuno, Y., Hongo, K., Hiyoshi, M., Kaneko, M., Kitayama, J., Takahashi, K., Nagawa, H., 2010, Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells, *BMC Cancer*, 10, 370.
- Sehgal, A.R., Konig, H., Johnson, D.E., Tang, D., Amaravadi, R.K., Boyiadzis, M., Lotze, M.T., 2015, You eat what you are: autophagy inhibition as a therapeutic strategy in leukemia, *Leukemia*, 29 (3), 517–525
- Sen, S., Chakraborty, R., 2011, *The Role of Antioxidants in Human Health*, American Chemical Society Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy, Chapter 1: 1–37.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., De, B., 2010, Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3 (1): 91–100.
- Senejoux, F., Girard-Thernier, C., Berthelot, A., Bévalot, F., Demougeot, C., 2013, New insights into the mechanisms of the vasorelaxant effects of apocynin in rat thoracic aorta, *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 27 (3), 262–270.
- Sharma, M., Kaur, T., Singla, S.K., 2016, Role of mitochondria and NADPH oxidase derived reactive oxygen species in hyperoxaluria induced nephrolithiasis: therapeutic intervention

- with combinatorial therapy of N-acetyl cysteine and Apocynin, *Mitochondrion*, 27, 15–24.
- Sharma, R., Sharma, J., 2005, Modification of gamma ray induced changes in the mouse hepatocytes by *Centella asiatica* extract: in vivo studies, *Phytotherapy Research: PTR*, 19 (7), 605–611.
- Simons, J.M., Hart, B.A., Ip Vai Ching, T.R., Van Dijk, H., Labadie, R.P., 1990, Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils, *Free Radical Biology & Medicine*, 8 (3), 251–258.
- Singh, R., Letai, A., Sarosiek, K., 2019, Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20 (3), 175–193.
- Smit, H.F., Kroes, B.H., van den Berg, A.J., van der Wal, D., van den Worm, E., Beukelman, C.J., van Dijk, H., Labadie, R.P., 2000, Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of *Picrorhiza scrophulariiflora*, *Journal of Ethnopharmacology*, 73 (1-2), 101–109.
- Solomon, V.R., Lee, H., 2009, Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies, *European Journal of Pharmacology*, 625 (1-3), 220–233.
- Stacey, R., Green, J.T., 2014, Radiation-induced small bowel disease: latest developments and clinical guidance, *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 5 (1), 15–29.
- Stansborough, R.L., Bateman, E.H., Al-Dasooqi, N., Bowen, J.M., Keefe, D., Yeoh, A., Logan, R.M., Yeoh, E., Stringer, A.M., Gibson, R.J., 2017, Fractionated abdominal irradiation induces intestinal microvascular changes in an in vivo model of radiotherapy-induced gut toxicity, *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 25 (6), 1973–1983.
- Stefanska, J., Pawliczak, R., 2008, Apocynin: molecular aptitudes, *Mediators of Inflammation*, 2008, 106507.
- Steven, B., Elwin, R., 1999, *Tilson Ed. Practical Radiation Protection and Applied Radiobiology*, 2e 2nd Edition, Saunders.
- Stolk, J., Hiltermann, T.J., Dijkman, J.H., Verhoeven, A.J., 1994, Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 11 (1), 95–102.
- Stolk, J., Rossie, W., Dijkman, J.H., 1994, Apocynin improves the efficacy of secretory leukocyte protease inhibitor in experimental emphysema, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 150 (6 Pt 1), 1628–1631.
- Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., McBride, W.H., 2003, Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms, *The Lancet Oncology*, 4 (9), 529–536.

- Sun, C., Wang, Z., Liu, Y., Liu, Y., Li, H., Di, C., Wu, Z., Gan, L., Zhang, H., 2014, Carbon ion beams induce hepatoma cell death by NADPH oxidase-mediated mitochondrial damage, *Journal of Cellular Physiology*, 229 (1), 100–107.
- Şener, G., Kabasakal, L., Atasoy, B.M., Erzik, C., Velioğlu-Oğünç, A., Cetinel, S., Contuk, G., Gedik, N., Yeğen, B.C., 2006, Propylthiouracil-induced hypothyroidism protects ionizing radiation-induced multiple organ damage in rats, *The Journal of Endocrinology*, 189 (2), 257–269.
- Şener, T.E., Yüksel, M., Özyılmaz-Yay, N., Ercan, F., Akbal, C., Şimşek, F., Şener, G., 2015, Apocynin attenuates testicular ischemia-reperfusion injury in rats, *Journal of Pediatric Surgery*, 50 (8), 1382–1387.
- Şenlik, Z.B., 2010, *Ankara’da bir üniversite hastanesinde iyonlaştırıcı radyasyon kaynakları ile çalışan sağlık çalışanlarında iyonlaştırıcı radyasyonun olası sağlık etkilerinin belirlenmesi*, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 15-45.
- Tahamtan, R., Shabestani Monfared, A., Tahamtani, Y., Tavassoli, A., Akmali, M., Mosleh-Shirazi, M.A., Naghizadeh, M.M., Ghasemi, D., Keshavarz, M., Haddadi, G.H., 2015, Radioprotective effect of melatonin on radiation-induced lung injury and lipid peroxidation in rats, *Cell Journal*, 17 (1), 111–120.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, P.M., Blanz, J., von Figura, K., Saftig, P., 2000, Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice, *Nature*, 406 (6798), 902–906.
- Tanriverdi, L.H., Parlakpınar, H., Ozhan, O., Ermis, N., Polat, A., Vardi, N., Tanbek, K., Yildiz, A., Acet, A., 2017, Inhibition of NADPH oxidase by apocynin promotes myocardial antioxidant response and prevents isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in rats, *Free Radical Research*, 51 (9-10), 772–786.
- Tatlı, M., 2018, *Radyasyonun Neden Olduğu Testis Hasarında Apocynin’in Etkilerinin Histolojik Olarak İncelenmesi*, T.C Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Tezi.
- Teng, R.J., Du, J., Welak, S., Guan, T., Eis, A., Shi, Y., Konduri, G.G., 2012, Cross talk between NADPH oxidase and autophagy in pulmonary artery endothelial cells with intrauterine persistent pulmonary hypertension, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302 (7), 651–663.
- Terzioğlu, G., Keskin, A.Ü., Yanıkkaya-Demirel, G., 2013, Hücre proliferasyonu ölçüm yöntemleri ve çeşitli ticari proliferasyon kitlerinin karşılaştırılması, *Turkish Journal of Immunology*, 1 (3):74-89.
- Thames, H. D., Jr., 1983, Early and late gastrointestinal complications following radiotherapy for carcinoma of the cervix, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 9 (10), 1583–1584.
- Theis, V., Sripadam, R., Ramani, V., Lal, S., 2010, Chronic radiation enteritis, *Clinical Oncology*, 22, 70-83.

- Thorburn, A., Thamm, D.H., Gustafson, D.L., 2014, Autophagy and cancer therapy, *Molecular Pharmacology*, 85 (6), 830–838.
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., Wolf, D.H., 1994, Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters*, 349 (2), 275–280.
- Towers, C.G., Thorburn, A., 2016, Therapeutic Targeting of Autophagy, *EBioMedicine*, 14, 15–23.
- Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H., 2003, The importance of glutathione in human disease, *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 57 (3-4), 145–155.
- Tönnemann, E., Kandolf, R., Lewalter, T., 2013, Chloroquine cardiomyopathy - a review of the literature, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 35 (3), 434–442.
- Tsurimoto T., 1999, PCNA binding proteins, *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 4, 849–858.
- Tuohetaerbaik, B., Zhang, Y., Tian, Y., Zhang, N.N., Kang, J., Mao, X., Zhang, Y., Li, X., 2020, Pancreas protective effects of Urolithin A on type 2 diabetic mice induced by high fat and streptozotocin via regulating autophagy and AKT/mTOR signaling pathway, *Journal of Ethnopharmacology*, 250, 112479.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266 (1-2), 37–56.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T., 2005, Metals, toxicity and oxidative stress, *Current Medicinal Chemistry*, 12 (10), 1161–1208.
- Van Beek, M.J., Piette, W.W., 2001, Antimalarials, *Dermatologic Clinics*, 19 (1), 147–60.
- Van den Borne, B.E., Dijkmans, B.A., de Rooij, H.H., le Cessie, S., Verweij, C.L., 1997, Chloroquine and hydroxychloroquine equally affect tumor necrosis factor-alpha, interleukin 6, and interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells, *The Journal of Rheumatology*, 24 (1), 55–60.
- Van den Worm, E., Beukelman, C.J., Van den Berg, A.J., Kroes, B.H., Labadie, R.P., Van Dijk, H., 2001, Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils, *European Journal of Pharmacology*, 433 (2-3), 225–230.
- Wallace, D.J., 1996, The history of antimalarials, *Lupus*, 5 (1), 2–3.
- Wallace, D.J., 2001, Antimalarials—the “real” advance in lupus, *Lupus*, 10 (6), 385–387.
- Wang, F., Tang, J., Li, P., Si, S., Yu, H., Yang, X., Tao, J., Lv, Q., Gu, M., Yang, H., Wang, Z., 2018, Chloroquine Enhances the Radiosensitivity of Bladder Cancer Cells by

Inhibiting Autophagy and Activating Apoptosis, *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 45 (1), 54–66.

- Wang, S.L., Shao, B.Z., Zhao, S.B., Chang, X., Wang, P., Miao, C.Y., Li, Z.S., Bai, Y., 2019, Intestinal autophagy links psychosocial stress with gut microbiota to promote inflammatory bowel disease, *Cell Death & Disease*, 10 (6), 391.
- Wang, Z., Chen, Z., Jiang, Z., Luo, P., Liu, L., Huang, Y., Wang, H., Wang, Y., Long, L., Tan, X., Liu, D., Jin, T., Wang, Y., Wang, Y., Liao, F., Zhang, C., Chen, L., Gan, Y., Liu, Y., Yang, F., ... Shi, C., 2019, Cordycepin prevents radiation ulcer by inhibiting cell senescence via NRF2 and AMPK in rodents, *Nature Communications*, 10 (1), 2538.
- Weber, S.M., Levitz, S.M., Harrison, T.S., 2000, Chloroquine and the fungal phagosome, *Current Opinion in Microbiology*, 3 (4), 349–353.
- Wei, J., Wang, B., Wang, H., Meng, L., Zhao, Q., Li, X., Xin, Y., Jiang, X., 2019, Radiation-Induced Normal Tissue Damage: Oxidative Stress and Epigenetic Mechanisms, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 3010342.
- Weidberg, H., Shvets, E., Elazar, Z., 2011, Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes, *Annual Review of Biochemistry*, 80, 125–156.
- Wilson, E.N., Bristol, M.L., Di, X., Maltese, W.A., Koterba, K., Beckman, M.J., Gewirtz, D.A., 2011, A switch between cytoprotective and cytotoxic autophagy in the radiosensitization of breast tumor cells by chloroquine and vitamin D, *Hormones & Cancer*, 2 (5), 272–285.
- Xiao, J., Ke, Z.P., Shi, Y., Zeng, Q., Cao, Z., 2018, The cardioprotective effect of thymoquinone on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart via regulation of apoptosis and autophagy, *Journal of Cellular Biochemistry*, 119 (9), 7212–7217.
- Xie, F., Sun, S., Xu, A., Zheng, S., Xue, M., Wu, P., Zeng, J.H., Bai, L., 2014, Advanced oxidation protein products induce intestine epithelial cell death through a redox-dependent, c-jun N-terminal kinase and poly (ADP-ribose) polymerase-1-mediated pathway, *Cell Death & Disease*, 5 (1), e1006.
- Ximenes, V.F., Kanegae, M.P., Rissato, S.R., Galhiane, M.S., 2007, The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 457 (2), 134–141.
- Xiong, L., Liu, Z., Ouyang, G., Lin, L., Huang, H., Kang, H., Chen, W., Miao, X., Wen, Y., 2017, Autophagy inhibition enhances photocytotoxicity of Photosan-II in human colorectal cancer cells, *Oncotarget*, 8 (4), 6419–6432.
- Yang, X., Zhao, K., Deng, W., Zhao, L., Jin, H., Mei, F., Zhou, Y., Li, M., Wang, W., 2020, Apocynin Attenuates Acute Kidney Injury and Inflammation in Rats with Acute Hypertriglyceridemic Pancreatitis, *Digestive Diseases and Sciences*, 65 (6), 1735–1747.
- Yao, K.C., Komata, T., Kondo, Y., Kanzawa, T., Kondo, S., Germano, I.M., 2003, Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest,

modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy, *Journal Of Neurosurgery*, 98 (2), 378–384.

- Yasuda, M., Kato, S., Yamanaka, N., Iimori, M., Utsumi, D., Kitahara, Y., Iwata, K., Matsuno, K., Amagase, K., Yabe-Nishimura, C., Takeuchi, K., 2012, Potential role of the NADPH oxidase NOX1 in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice, *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302 (10), 1133–1142.
- Ye, H., Chen, M., Cao, F., Huang, H., Zhan, R., Zheng, X., 2016, Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis, *BMC Neurology*, 16 (1), 178.
- Yin, H., Xu, L., Porter, N.A., 2011, Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis, *Chemical Reviews*, 111 (10), 5944–5972.
- Yoldaş, Z.R., 2017, *Tek Taraflı Üreter Tıkanıklığı Oluşturulmuş Sıçanlarda Aposinin Uygulamasının Böbrek Oksidatif Hasarına Etkileri*, T.C. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Yoon, Y.H., Cho, K.S., Hwang, J.J., Lee, S.J., Choi, J.A., Koh, J.Y., 2010, Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51 (11), 6030–6037.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001, Antioxidants in health and disease, *Journal of Clinical Pathology*, 54 (3), 176–186.
- Yörük, M., 2008, Sindirim Sistemi II: Sindirim Kanalı. Veteriner Özel Histoloji. Ed: A. Özer, 1. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım A.Ş., Ankara.
- Yu, J., Weiwer, M., Linhardt, R.J., Dordick, J.S., 2008, The role of the methoxyphenol apocynin, a vascular NADPH oxidase inhibitor, as a chemopreventative agent in the potential treatment of cardiovascular diseases, *Current Vascular Pharmacology*, 6 (3), 204–217.
- Yuan, J., Kroemer, G., 2010, Alternative cell death mechanisms in development and beyond, *Genes & Development*, 24 (23), 2592–2602.
- Yuan, X., Du, J., Hua, S., Zhang, H., Gu, C., Wang, J., Yang, L., Huang, J., Yu, J., Liu, F., 2015, Suppression of autophagy augments the radiosensitizing effects of STAT3 inhibition on human glioma cells, *Experimental Cell Research*, 330 (2), 267–276.
- Zhang, L., Ouyang, S., Zhang, H., Qiu, M., Dai, Y., Wang, S., Wang, Y., Ou, J., 2021, Graphene oxide induces dose-dependent lung injury in rats by regulating autophagy, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(5), 462.
- Zhang, Y., Chan, M.M., Andrews, M.C., Mori, T.A., Croft, K.D., McKenzie, K.U., Schyvens, C.G., Whitworth, J.A., 2005, Apocynin but not allopurinol prevents and reverses adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat, *American Journal of Hypertension*, 18 (7), 910–916.

Ziegler, H.K., Unanue, E.R., 1982, Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79 (1), 175–178. |



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler		
Adı Soyadı	Ayça SEZEN US	
Doğum Yeri	İstanbul	
Doğum Tarihi		
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:	
Telefon		
E-Posta Adresi		
Web Adresi		

Eğitim Bilgileri		
Lisans		
Üniversite	İstanbul Üniversitesi	
Fakülte	Fen Fakültesi	
Bölümü	Biyoloji Bölümü	
Mezuniyet Yılı	07.07.2008	

Yüksek Lisans		
Üniversite	İstanbul Üniversitesi	
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü	
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı	
Programı	Zooloji Programı	

Doktora		
Üniversite	İstanbul Üniversitesi	
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü	
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı	
Programı	Genel Biyoloji Programı	

Makale ve Bildiriler	
Coremen, M., Turkyilmaz, İ.B., Us, H., Sezen-Us, A., Celik, S., Ozel, A.E., Karabulut-Bulan, Yanardag, R., 2022, Lupeol inhibits pesticides induced hepatotoxicity via reducing oxidative stress and inflammatory markers in rats, <i>Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association</i>, 164, 113068. Karabulut-Bulan, O., Us, H., Bayrak, B.B., Sezen-Us, A., Yanardag, R., 2017, The role of melatonin and carnosine in prevention of oxidative intestinal injury induced by gamma irradiation in rats, <i>Biologia</i>, 72, 935-945.	

- Sancar-Bas, S., Kaptan, E., Sengezer-Inceli, M., **Sezen, A.**, Us, H., 2009, Glycoconjugate Histochemistry in the Fundic Stomach and Small Intestine of the Frog (*Rana ridibunda*), *IUFS Journal of Biology*, 68(2): 93-104.
- Türkyılmaz, İ.B., Us, H., **Sezen-Us, A.**, Bulan, N.Ö., Yanardağ, R., November 24-26 2021, Melatonin and Carnosine Prevents Ionizing Radiation-Induced Oxidative Testis Damage in Rats, *4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2021)*, pp.1117.
- Türkyılmaz, İ.B., Us, H., **Sezen-Us, A.**, Bulan, N.Ö., Yanardağ, R., 2021, "Melatonin and carnosine ameliorate ionizing radiation-induced oxidative brain damage in rats, 3. *EBAT Congress*, TÜRKİYE, pp.29.
- Çöremen, M., Türkyılmaz, İ.B., Us, H., **Sezen-Us, A.**, Bulan, N.Ö., Yanardağ, R., 2021, "The role of lupeol against pesticides induced oxidative damage.", *MC 2021 Digital Microscopy Conference*, AVUSTURYA, pp.369.
- Bulan, N.Ö., Us, H., Bayrak, B.B., **Sezen, A.**, Yanardağ, R., 18-21 Kasım 2015, "Melatonin and carnosin ameliorate ionizing radiation-induced oxidative small intestinal damage in rats", *XXVIII World Congress of the World Association of Societies of Pathology & Laboratory Medicine (WASPALM): On the Forefront of Personalized Medicine*, Cancún, MEKSIKA, pp.1064-1064.
- Türkyılmaz, İ.B., Us, H., Bulan, N.Ö., **Sezen, A.**, Yanardağ, R., 18-21 Kasım 2015, "Protective Effects of Carnosine and Melatonin Against Nephrotoxicity Caused by Gamma Radiation in Rats", *XXVIII World Congress World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine*, Cancun, MEKSIKA, pp.12-12.
- Bulan, N.Ö., Bayrak, B.B., Us, H., **Sezen, A.**, Yanardağ, R., 22-24 Haziran 2015, "Antioxidant effects of carnosine and melatonin against gamma radiation-induced small intestine injury", *15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, redox homeostasis and antioxidants*, Paris, FRANSA, pp.93-93.