

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

LİNALOOL'ÜN RİFAMPİSİNİN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF
HASAR ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİSİNİN DALAK
DOKUSUNDA ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞEGÜL ACET

DANIŞMAN
PROF. DR. DENİZ TAŞTEMİR KORKMAZ

ADİYAMAN, 2025

ÖZET

LİNALOOL'ÜN RİFAMPİSİNİN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF HASAR ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİSİNİN DALAK DOKUSUNDA ARAŞTIRILMASI

Ayşegül ACET

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Adıyaman Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak/2025

Danışman: Prof. Dr. Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ

Dünya genelinde milyonlarca insanın tüberküloza yakalanması ve birçoğunun bu hastalıktan ölmesi küresel çapta önemli bir endişe kaynağı oluşturmaktadır. Rifampisin (RF), tüberküloz tedavisinde etkili bir ilaç olarak reçete edilmekle birlikte, uzun süreli ya da yüksek dozlarda kullanımı reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına yol açarak oksidatif stres (OS) ve toksik etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, RF kaynaklı dalak hasarında doğal bir antioksidan olan Linalool (LN)'un koruyucu etkiye sahip olup olmadığını araştırdık. LN, doğal olarak birçok bitkide bulunan ve antisedatif, antimikrobiyal, antioksidan, antitümöral ve antiinflamatuvar etkileriyle bilinen bir monoterpendir. Çalışma kapsamında, 30 sağlıklı erkek Sprague-Dawley sıçan beş gruba ayrıldı: kontrol grubu, çözücü kontrol grubu (Dimetilsülfoksit - DMSO), RF grubu, LN grubu ve RF+LN grubu. Bu çalışmada, biyokimyasal ve OS parametreleri (HO-1, MDA, GSH) ile histolojik analizler için dalak dokuları ve kan örnekleri alındı. Çalışmamızda RF'nin MDA, HO-1 ve demir seviyelerini anlamlı düzeyde artırdığı, GSH seviyesini ise azalttığı gözlemlendi. RF ve LN birlikte uygulandığında MDA, HO-1 ve demir seviyelerinde anlamlı düşüşler, GSH seviyesinde ise anlamlı artış ve histolojik olarak iyileşmeler tespit edildi. Bulgularımız, LN'nin RF kaynaklı dalak dokusu hasarını önleyerek koruyucu bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Sonuçlarımız, LN'nin antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri sayesinde dalakta RF kaynaklı OS'yi inhibe ederek doku hasarını iyileştirdiğini ve bu nedenle OS ile ilişkili hastalıkların tedavisinde destekleyici bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Rifampisin; Oksidatif stres; Dalak; Heme oksijenaz-1; Linalool

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF LINALOOL ON RIFAMPICIN-INDUCED OXIDATIVE DAMAGE IN SPLEEN TISSUE

Ayşegül ACET

Department of Medical Biology

Adıyaman University, Graduate Education Institute, January/2025

Supervisor: Prof. Dr. Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ

The fact that millions of people worldwide are affected by tuberculosis and many die from this disease constitutes a significant global concern. Rifampicin (RF) is prescribed as an effective drug in the treatment of tuberculosis; however, its long-term or high-dose use can lead to an increase in reactive oxygen species (ROS), causing oxidative stress (OS) and toxic effects. Therefore, in this study, we investigated whether Linalool (LN), a natural antioxidant, has a protective effect against RF-induced spleen damage. LN is a monoterpene naturally found in many plants and is known for its antisedative, antimicrobial, antioxidant, antitumoral, and anti-inflammatory effects. In the study, 30 healthy male Sprague-Dawley rats were divided into five groups: control group, solvent control group (Dimethyl sulfoxide - DMSO), RF group, LN group, and RF+LN group. For biochemical and OS parameters (HO-1, MDA, GSH) as well as histological analyses, spleen tissues and blood samples were collected. In our study, RF was observed to significantly increase MDA, HO-1, and iron levels while decreasing GSH levels. When RF and LN were administered together, significant reductions in MDA, HO-1, and iron levels, as well as significant increases in GSH levels and histological improvements, were detected. Our findings revealed that LN exhibits a protective effect by preventing RF-induced spleen tissue damage. Our results suggest that LN improves tissue damage by inhibiting RF-induced OS in the spleen through its antioxidant and anti-inflammatory properties and, therefore, may be used as a supportive agent in the treatment of OS-related diseases.

Keywords: Rifampicin; Oxidative Stress; Spleen; Heme Oksijenaz-1; Linalool

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmalarım sırasında bilgi, birikim ve tecrübelerinden faydalandığım, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ'a, deneysel çalışmalarda ve laboratuvar analizlerinde desteklerinden dolayı kıymetli hocalarım Dr. Öğretim Üyesi Sebile AZIRAK, Doç. Dr. Ebru ANNAÇ ve Doç. Dr. İbrahim BOZGEYİK'e, yüksek lisans eğitimim boyunca verdikleri derslerle tıbbi biyoloji alanında bana katkı sağlayan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Önder YUMRUTAŞ ve Doç. Dr. Yusuf ÖZAY'a teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca bu süreçte bana her türlü çalışma alanı sağlayan Üniversitemiz Lisansüstü Eğitim Enstitüsü yönetimi ve çalışanlarına da şükranlarımı sunuyorum.

Hayatım boyunca yanımda olan, sevgileri ve karşılıksız destekleriyle her koşulda bana güç veren sevgili aileme de en derin teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Adıyaman Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Ayşegül ACET

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Dalak	3
2.1.1. Tıp tarihinde dalak	7
2.2. Rifampisin	8
2.2.1. RF molekülü ve etki mekanizması.....	8
2.2.2. RF ile farmakokinetik etkileşimler	10
2.2.3. RF'nin yan etkileri	12
2.3. Oksidatif Stres	12
2.3.1. Hücre içi ROS dengesi	15
2.3.2. ROS'un sinyal molekülleri olarak rolü	16
2.3.2.1. Aktivatör protein-1.....	17
2.3.2.2. Nükleer faktör-kappa B	17
2.3.2.3. p53.....	18
2.3.2.4. Keap1-Nrf2-ARE	18
2.3.2.5. MAPK sinyal yolu.....	19
2.3.3. Oksidatif strese nitrik oksit rolü	19
2.4. Hücresel Antioksidan Sistemler	19
2.5. Heme ve HO Sistemi	23
2.5.1. Heme oksijenaz-1.....	24
2.5.1.1. HO-1'in moleküler düzenlenmesi.....	26

2.5.1.2. HO-1'in hücresel savunmadaki rolü	27
2.5.1.3. Düzenlenmiş hücre ölümü (RCD) programlarının modülatörü olarak HO-1.....	29
Apoptozis modülatörü olarak HO-1	29
HO-1 ve piroptozis arasındaki ilişki.....	30
HO-1 ve nekroptoz arasındaki ilişki	30
HO-1 ve ferroptoz arasındaki ilişki.....	31
Terapötik uygulamalar için hedef olarak makrofajlardaki heme-HO-1 sistemi.....	32
2.6. Bitki Etken Maddeleri: Terpenoidler	33
2.6.1. Linalool.....	35
2.6.1.1. LN'nin biyolojik özellikleri ve etki mekanizmaları.....	37
Genel özellikler ve doğal kaynakları	37
Sedatif aktivite.....	37
Antimikrobiyal aktivite ve etki mekanizması	38
Antienflamatuvar etki mekanizması	39
Antitümör aktivite	40
Antioksidan aktivite.....	41
3.GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Çalışmada Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasallar	42
3.1.1. Araç-gereçler	42
3.1.2. Kimyasallar.....	42
3.1.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	44
3.2. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	47
3.2.1. Deney hayvanları ve yaşam alanları.....	47
3.2.2. Deney gruplarının oluşturulması.....	47
3.2.3. Cerrahi işlemler	49
3.2.4. Doku homojenizasyonu.....	50
3.2.5. Yöntemler.....	50
3.2.5.1. Biyokimyasal testler	50
3.2.5.2. Dalak dokusunda redükte glutatyon (GSH) tayini.....	51
3.2.5.3. Dalak dokusunda malondialdehit (MDA) tayini	51
3.2.5.4. HO-1 ELISA yöntemi.....	51

3.2.5.5. Histopatolojik inceleme.....	54
3.2.5.6. İstatistiksel analiz	56
4. BULGULAR	58
4.1. Biyokimyasal Bulgular	58
4.2. Oksidatif Stres Bulguları	61
4.3. Histopatolojik Bulgular	65
4.3.1. Histopatolojik değerlendirme	71
5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	72
5.1. Tartışma	72
5.2. Sonuç ve Öneriler	80
KAYNAKÇA	82
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2. 1. LN'nin özellikleri (Kaynak: Soulimani & Joshi, 2020)	36
Tablo 2. 2. LN'nin kaynakları, coğrafi kökenleri ve endüstriyel uygulamaları (Kaynak: Singh & Mishra, 2024)	37
Tablo 3. 1. Çalışma grupları ve yapılan uygulamalar	48
Tablo 3. 2. Dehidratasyon için kullanılan alkol serileri ve süreleri	54
Tablo 4. 1. Serum biyokimyasal biyobelirteçlerinin gruplar arasında karşılaştırılması ..	60
Tablo 4. 2. Dalak dokusu MDA ve GSH düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması..	62
Tablo 4. 3. HO-1 protein seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2. 1. Dalağın karın boşluğundaki anatomik yerleşimi.....	3
Şekil 2. 2. Dalak ve portal venöz sistemin anatomik ilişkisi.....	5
Şekil 2. 3. RF'nin kimyasal yapısı (Kaynak: van Ingen vd., 2011)	9
Şekil 2. 4. Ekstrasellüler ve intrasellüler ROS kaynakları ve hücrel etkileri (Kaynak:Hong vd., 2024).....	13
Şekil 2. 5. ROS ve antioksidanlar arasındaki denge (Kaynak: Halliwell, 2024)	14
Şekil 2. 6. ROS seviyelerinin hücrel sinyal olayları ve biyolojik sonuçlar üzerindeki etkisi (Kaynak: Hongvd.,2024)	16
Şekil 2. 7. Glutatyonun iki farklı formu	21
Şekil 2. 8. Heme'nin yapısı	23
Şekil 2. 9. HO-1 ve heme katabolizması (Kaynak: Campbell vd., 2021)	25
Şekil 2. 10. Heme metabolizmasının hücrel düzenlenmesi ve HO-1'in koruyucu etkileri (Kaynak: Duvigneau vd., 2019).....	28
Şekil 2. 11. LN'nin kimyasal yapısı	35
Şekil 3. 1. Sıçanlara gavaj yolu ile RF verilmesi	48
Şekil 3. 2. Sıçanlara LN'nin i.p. olarak verilmesi	49
Şekil 3. 3. Sıçanlardan portal ven yoluyla kan alınması	50
Şekil 3. 4. Stok standart çözeltisinin seyreltilmesi işlemi	52
Şekil 3. 5. Dokuların parafinle bloklanması.....	54
Şekil 3. 6. Bloklanan dokulardan mikrotomla kesit alınması.....	55

Şekil 4. 1. RF ve LN'nin total BR (A), indirek BR (B), demir (Fe ²⁺) (C) ve ferritin (D) seviyeleri üzerine olan etkileri. Her grup, altı sıçan için ortalama ± SS'yı temsil etmektedir. * p < 0,05	59
Şekil 4. 2. RF ve LN'nin dalak dokusunda MDA ve GSH düzeyleri üzerine olan etkileri. Her grup, altı sıçan için ortalama ± SS'yı temsil etmektedir. * p<0,05	61
Şekil 4. 3. RF ve LN'nin serum (A) ve dalakta (B) HO-1 protein seviyesine olan etkisi. Her grup, altı sıçan için ortalama ± SS'yı temsil etmektedir. *** p<0,001 ** p<0,01 * p<0,05.	63
Şekil 4. 4. Kontrol (A), DMSO (B), RF (C), LN (D) ve RF+LN (E) gruplarına ait histopatolojik görüntüler (Hematoksilen-Eozin Boyama). Kalın siyah ok, normal yapıya sahip lenf nodülü; İnce siyah ok, normal yapısı bozulmuş lenf nodülü; siyah ok başı, dilate olmuş sinuzoid; Yıldız, hiperemi. (X10).....	66
Şekil 4. 5. Kontrol (A), DMSO (B), RF (C), LN (D) ve RF+LN (E) gruplarına ait histopatolojik görüntüler (Hematoksilen-Eozin Boyama). Kalın siyah ok, normal yapıya sahip lenf nodülü; İnce siyah ok, normal yapısı bozulmuş lenf nodülü; Yıldız, kırmızı pulpa alanı (X20).....	67
Şekil 4. 6. Kontrol (A), DMSO (B), RF (C), LN (D) ve RF+LN (E) gruplarına ait histopatolojik görüntüler (Hematoksilen-Eozin Boyama). Kalın siyah ok, Çok çekirdekli dev hücreler (X40)	68
Şekil 4. 7. Kontrol (A), DMSO (B), RF (C), LN (D) ve RF+LN (E) gruplarına ait histopatolojik görüntüler (Masson Üçlü Boyama). Kalın siyah ok, bağ doku kapsülü (X20).....	69
Şekil 4. 8. Kontrol (A), DMSO (B), RF (C), LN (D) ve RF+LN (E) gruplarına ait histopatolojik görüntüler (Toluidin Mavisi Boyama). Kalın siyah ok, mast hücresi (X20)	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AP-1	: Aktivatör Protein-1
APC	: Antijen Sunan Hücreler
ATD	: Antitüberküler ilaç
BR	: Bilirubin
BV	: Biliverdin
CAT	: Katalaz
CO	: Karbon monoksit
CYP	: Sitokrom P450
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DTNB	: 5,5-Dithio-Bis-2-Nitrobenzoic Asit
Fe	: Demir
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HClO ₄	: Perklorik Asit
HIV	: İnsan Immün Yetmezlik Virusu
HMOX1	: Hem Oksijenaz 1 Geni

HO-1	: Heme Oksijenaz-1
i.p.	: İntraperitonel
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum Hidrojen Fosfat
Keap1	: Kelch Benzeri ECH İlişkili Protein 1
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
LN	: Linalool
MAPK	: Mitogenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MDA	: Malondialdehit
miR	: Mikro RNA
MZ	: Marjinal Bölge
NAC	: N-Asetilsistein
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF-κB	: Nükleer Faktör-Kappa B
Nrf2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 İle İlişkili Faktör-2
O ₂	: Oksijen (Süperoksit Anyonu)
OH	: Hidroksil
ONOOH	: Peroksinitrit Asit
OS	: Oksidatif Stres
p53	: Tümör Protein 53
PBS	: Fosfat Tamponu
PCD	: Programlanmış Hücre Ölümü

Prxs	: Peroksiredoksinler
RCD	: Düzenlenmiş Hücre Ölümü
RF	: Rifampisin
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RP	: Kırmızı Pulpa
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAC	: Toplam Antioksidan Kapasite
TB	: Tüberküloz
TBA	: Thiobarbiturik Asit
TCA	: Trikloroasetik Asit
TF	: Transkripsiyonel Faktörü
TLR	: Toll-benzeri reseptör-4
TMB	: Tetramethylbenzidin
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
UV	: Ultraviyole ışık
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WP	: Beyaz Pulpa

1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), binlerce yıldır insanlığı etkileyen en önemli bulaşıcı hastalıklardan biri olarak, 21. yüzyılda bile birçok popülasyonda yüksek bir ölüm oranına sahip olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından, 2022 yılında 10,6 milyon yeni TB vakası ve 1,3 milyon TB ölümünün olduğu rapor edilmiştir (WHO, 2023) Dünyanın her yerinde çoklu ilaca dirençli TB vakaları ile ilk kez TB olan veya TB'si nükseden vakalarda izoniazid (INH), rifampisin (RF) ve pirazinamidden oluşan üçlü kombinasyon şeklinde anti-TB ilaç (ATD) tedavisi uygulanmaktadır (Sharma & Sharma, 2017).

TB tedavisinde en etkili birinci basamak ilaçlardan biri RF olup (Adams vd., 2021), duyarlı suşların neden olduğu TB vakalarında %95 başarı oranına sahiptir. Ancak, RF'nin lipofilik yapısı, düşük biyoyararlanımı, sistem öncesi metabolizması ve potansiyel ilaç etkileşimleri nedeniyle hastalar sıklıkla yan etkiler yaşamaktadır. Bu durum, aynı zamanda RF dirençli TB gelişme riskini de artırmaktadır (Santos vd., 2022).

Bugüne kadar, birinci basamak ATD'ler ile ilişkili dalak toksisitesi üzerine yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Vücuttaki en büyük ikincil bağışıklık organı olan dalak, kanla taşınan antijenlere karşı bağışıklık yanıtlarını başlatmak ve kanı yabancı maddelerden ve hasarlı kırmızı kan hücrelerinden filtrelemek gibi önemli işlevlere sahiptir. Bu nedenle, dalak aynı zamanda kan hücreleri için bir "intihar bölgesi" olarak adlandırılmaktadır. Bu durum, ATD'lerin dalak üzerindeki etkilerini incelemeyi gerekli kılmaktadır (Sharma & Sharma, 2017).

Oksidatif stres (OS), vücuttaki antioksidanların yetersiz kalması sonucu hücrelere zarar verebilen serbest radikallerin artmasıyla oluşan dengesiz bir durumdur. Moleküler oksijenden üretilen yüksek reaktiviteye sahip kimyasal bileşikler, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinir. ROS kategorisi hem serbest radikal olmayan oksijen ara maddelerini [hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi] hem de serbest radikal oksijen ara maddelerini [süperoksit anyonu ($O_2^{\circ -}$) veya hidroksil radikali (OH) gibi] içerir (Bouyahya vd., 2024).

Anti-TB ilaç uygulaması ROS üretimini artırarak lipidlerin peroksidasyonuna (MDA) ve dolayısıyla OS'ye neden olmaktadır (Sharma & Sharma, 2017). Antioksidan moleküllerin [(Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon (GSH) ve Katalaz (CAT)] sentezinin artması ve ROS ile MDA düzeylerinin azalması, OS'yi azaltabileceğini göstermiştir (Bouyahya vd., 2024).

Günümüzde halk ilacı ve tıbbi bitkilere dayalı etkili ilaçlar keşfetmeye yönelik artan bir ilgi bulunmaktadır. Birçok modern ilacın bitki kökenli olduğu ve yerli halkın terapötik

uygulamalarının gözlemlenmesi yoluyla geliştirildiği bilinmektedir (Hosseini vd., 2021). Doğal ürünler, bitkiler veya hayvanlar tarafından sentezlenen kimyasal maddeleri veya doğada bulunan ve belirli farmakolojik etkileri olan kimyasal maddeleri içerir. Bitkilerin tıbbi değeri alkaloidler, tanenler, saponinler, flavonoidler, antrakinonlar, glikozitler, terpenler, uçucu yağlar ve reçineler gibi ikincil metabolitler tarafından sağlanmaktadır (Umaru, 2023). Tıbbi ve aromatik bitkiler, antidiyabet, antikanser, antihipertansiyon, antikardiyovasküler, antileproz vb. gibi farmakolojik özelliklere sahip terapötik biyoaktif sekonder metabolitleri sentezleme yetenekleri nedeniyle hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Özgöçmen & Azırak, 2023). Genel olarak OS'yi azaltacak tedavi stratejileri bulunmamakla birlikte bu tür bitkilerin sekonder metabolitlerinin bu konuda etkili olabileceği düşünülmektedir.

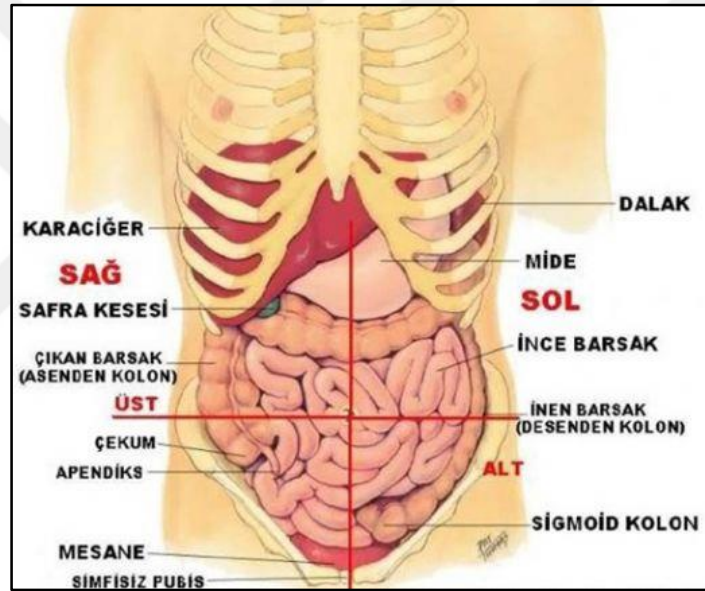
Linalool (2,6-dimetil-2,7-oktadien-6-ol) (LN), uçucu yağlarda yaygın olarak bulunan ve parfümlerde, kozmetiklerde, ev temizleyicilerinde ve gıda katkı maddelerinde yaygın olarak kullanılan aromatik bir monoterpen alkoldür. LN, OS yoluyla kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyebilir ve aynı zamanda normal hücreleri korur. Ayrıca, mikroorganizmalarda hücre zarlarının bozulması yoluyla antimikrobiyal etkiler gösterir. LN anti-inflamatuvar aktivitesi sayesinde karaciğer, böbrek ve akciğer vb. gibi organları toksik maddelere karşı koruyucu bir etkiye sahiptir. Koruyucu etkileri ve düşük toksisitesi nedeniyle, LN antikanser ilaçları veya antibiyotiklerin bir adjuvanı olarak kullanılabilir. Bu nedenle, LN doğal ve güvenli bir alternatif tedavi olarak uygulanmak için büyük bir potansiyele sahiptir (An vd., 2023).

Bu çalışmada RF'nin dalak üzerinde toksik etkiye sahip olup olmadığı ve antioksidan özelliği olan LN'nin koruyucu etkinliğinin biyokimyasal parametreler, antioksidan enzim seviyeleri ve histopatolojik analizler yoluyla araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dalak

Dalak, diyaframın sol kubbesinde bulunan intraperitonel (i.p.) bir organdır. Dokuzuncu, onuncu ve onbirinci kaburgalar arasında yer alır. Oval bir yapıya sahip olup, uzun eksenini soldaki onuncu kaburgaya karşılık gelir (Şekil 2.1). Organa arkadan ve üstten bakıldığında, ön ve alt yönlerine doğru eğik bir konumda olduğu gözlemlenir. Sağlıklı yetişkinlerde dalağın en geniş kısmı uzunlamasına boyutuyla ölçüldüğünde 7 ila 14 cm arasında değişir ve ortalama çevresi 11 cm uzunluğundadır. Kanın içeriğine bağlı olarak genellikle 150-200 gr ağırlığındadır (Varga vd., 2018).



Şekil 2. 1. Dalağın karın boşluğundaki anatomik yerleşimi

Dalak gelişimi, embriyonik gelişimin beşinci haftasında başlar. Organ intra-embriyonik splanknik mezoderminden kaynaklanır. Embriyonik bağ dokusu (mezenkim), tek veya birden fazla çıkıntı olarak gelişir ve daha sonra dorsal mezogastriumda birleşerek ileride büyük omentum haline gelir. Gelişimin altıncı ve yedinci haftaları arasında midenin dönmesi ve dorsal mezogastriumun gelişimi, dalağın orijinal orta düzlem konumundan karın boşluğunun sol tarafına kaymasına neden olur. Bu organ, dalak ile sol böbrek arasında uzanan mezenterik bileşke (ligamentum splenorenale) yoluyla dorsal mezogastrium ile bağlantılı kalmaktadır (Varga vd., 2019).

Dalağın eritropoez ve yaşlanmış kırmızı kan hücrelerinin geri dönüşümündeki ana aktör olduğu bilinmektedir (Short vd., 2019; Weinzirl vd., 2020). Dalak ilk olarak

embriyodaki hematopoezde rol almıştır, fakat yetişkin yaşamı boyunca hamilelik veya enfeksiyon gibi fizyolojik stres altında veya bir bağışıklık tepkisinde hematopoietik bir organın rolünü üstlendiği de bilinmektedir. Hastalık veya tedavi sonucu kemik iliği zarar gördüğünde, dalak hematopoietik bir organ gibi kemik iliğinin yerini alabilmektedir. Vücut fizyolojik strese maruz kaldığında (örneğin, enfeksiyon veya kan kaybı gibi durumlarda), kemik iliğinden hematopoietik kök hücreler (HSC'ler) dalağa yönlendirilir. Dalak bu hücreleri dışarıya, yani dolaşım sistemine salarak, vücudun kan hücreleri ihtiyacını hızlıca karşılamaya yardımcı olur (Short vd., 2019).

Dalak vücuttaki en büyük ikincil lenfoid organdır ve bu nedenle hematopoez ve kırmızı kan hücresi temizlenmesinin yanı sıra çok çeşitli immünolojik fonksiyonlarda da görev yapmaktadır (Lewis vd., 2019; Weinzirl vd., 2020; Lenti vd., 2022). Dalağın iki ana işlevi vardır: ömrünü tamamlamış eritrositleri ve diğer kan hücrelerini uzaklaştırmak için gerekli olan kan filtreleme işlevini yürütmek ve hem doğuştan gelen hem de sonradan kazanılan bağışıklık sistemi yoluyla patojenlere karşı bağışıklık yanıtını oluşturmaktır (Varga vd., 2019; Short vd., 2019; Lewis vd., 2019; Kashimura, 2020; Siu vd., 2022; Lenti vd., 2022). Bu işlevler dalağın iki farklı anatomik bölümünde meydana gelmektedir. Biri kanın sinüslerde ve kordonlarda sürekli olarak filtrelendiği sünger benzeri bir yapı olan kırmızı pulpa (RP), diğeri ise çeşitli bağışıklık hücrelerinin ve adaptif bağışıklık yanıtlarının olduğu beyaz pulpadır (WP) (Kashimura, 2020; Siu vd., 2022; Lenti vd., 2022).

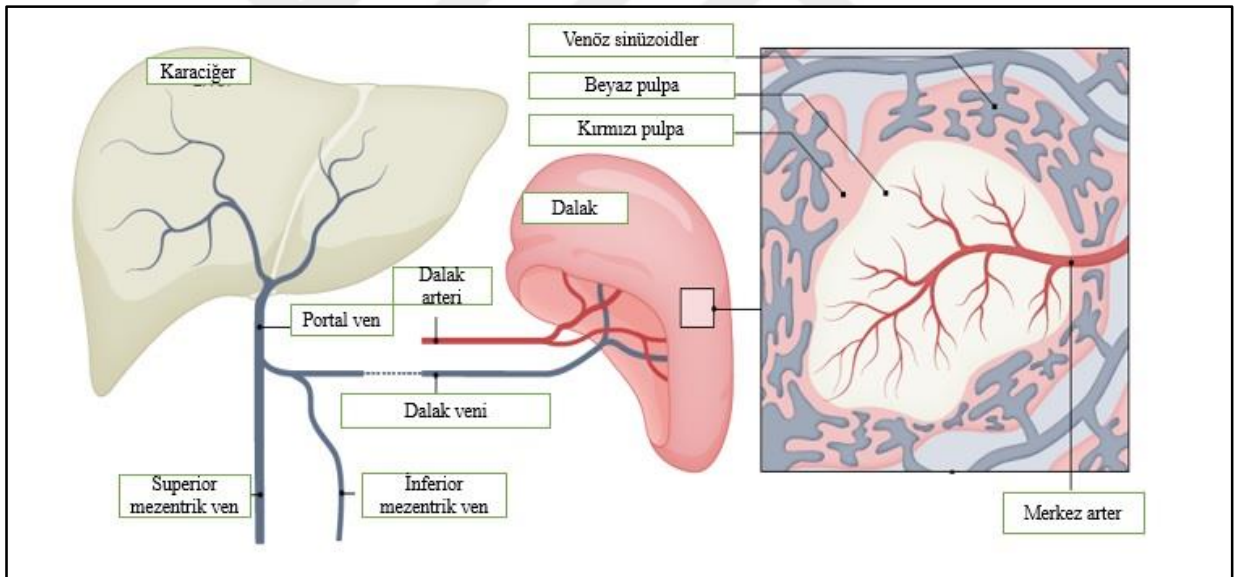
Dalak, yapısal organizasyonu sayesinde kanda bulunan patojenleri (hastalık yapıcı mikroorganizmalar) ve anormal hücreleri süzerek vücudu korumaya yardımcı olur. Bu organizasyon, bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan antijen sunan hücreler (APC'ler) ile lenfositler arasındaki nadir gerçekleşen karşılaşmaları kolaylaştırır. Diğer bir deyişle dalak, bağışıklık yanıtını başlatmak için bu iki hücre türünün birbirine yakın olmasını sağlar, böylece vücut enfeksiyon ve hastalıklara karşı daha hızlı tepki verebilir. Dalak, kandaki antijenlere karşı T ve B hücrelerinin bağışıklık tepkilerini düzenleyen özel APC'ler içerir (Lewis vd., 2019). Beyaz pulpanın marjinal bölgesinde yer alan heterojen bir İmmünoglobulin M (IgM) bellek B hücresi grubu, özellikle virüs ve bakterilere hızlı yanıt verir ve bu yanıtları T hücresinden bağımsız olarak, aşılama sonrasında bile sürdürür (Siu vd., 2022; Lenti vd., 2022). Sağlıklı bir insanda, dalak genellikle immünolojik olarak hareketsizdir ve kandan gelen antijenleri bu durumda pasif olarak alır (Siu vd., 2022).

Dalak, lenfosit yapısı açısından organize ve karmaşık bir yapıya sahiptir; bu durum, immünolojik olarak bağırsakla bağlantılı olan dalağın özgün anatomik konumunu yansıtır.

Fare modelleri ve insan dokuları üzerinde gerçekleştirilen araştırmalar, B hücresi gelişiminde bağırsak ve dalak arasındaki ortak işlevlere dair deliller sunmaktadır (Tull vd., 2021).

Mide ile dalak arasında doğrudan bağlantı sağlayan damarların yeniden keşfi, yüzyıllardır süregelen tartışmalara yeni bir perspektif kazandırmaktadır. Splenogastrik arteriyoller ve gastrosplenik venüller, dalak ve mide arasındaki salgılama ve emme işlevleri için anatomik bir zemin sunmaktadır. Kısa ve orta zincirli yağ asitleri, alkol, nikotin, kafein ve bazı ilaçların mide mukozası tarafından emildiği kanıtlanmıştır. Bu nedenle, bu maddeler doğrudan dalağa iletilebilir (Weinzirl vd., 2020).

Dalak; pankreas, mide ve ince bağırsaktan kanı boşaltan üç ana damardan (dalak damarı, inferior mezenterik ven ve superior mezenterik ven) oluşan portal venöz sistem aracılığıyla gastrointestinal sisteme sıkı sıkıya bağlıdır (Varga vd., 2018; Lenti vd., 2022). Bu damarlar, kanı karaciğere taşıyan portal vende birleşir (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. Dalak ve portal venöz sistemin anatomik ilişkisi

Dalağın iç yapısı, kanın süzüldüğü kordon ve sinüslerden oluşan RP ile immün yanıtların oluşturulmasında uzmanlaşmış lenfoid yapılardan oluşan WP'den meydana gelir. WP'deki foliküller, germinal merkez (GC), marjinal bölge (MZ) ve manto bölgesinden (Mn; korona olarak da adlandırılır) oluşur. MZ çoğunlukla B lenfositleri içerir ve dalağın WP ve RP arasındaki arayüzü temsil eder. Santral arteriyol (CA), çoğunlukla T lenfositleri içeren bir periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) ile çevrilidir (Kashimura, 2020; Lenti vd., 2022). WP,

her iki türde de dalağın birincil immünolojik bölgesidir; ancak WP dalak dokusunun dörtte birinden az bir kısma sahiptir. RP dokunun çoğunluğunu oluşturur ve WP'den farklı bir bağışıklık fonksiyonuna sahiptir. Lenf düğümlerinden farklı olarak dalak, afferent lenfatik damarlardan yoksun olduğundan, tüm hücreler ve antijen kan yoluyla dalağa girer (Lewis vd., 2019).

Dalağın anatomik yapısının, fizyolojik işlevlerinin ve gelişim süreçlerinin derinlemesine incelenmesi, dalak hastalıkları ve konjenital varyasyonların patofizyolojik mekanizmalarını anlamak için gereklidir (Varga vd., 2018; Lenti vd., 2022). Bağırsaktan gelen kan, dalak damarının katkısıyla birlikte hepatik portal damar aracılığıyla karaciğere ulaşmaktadır (Tull vd., 2021; Lenti vd., 2022).

Dalak, insan vücudundaki en büyük lenfoid doku birikimini oluşturur; lenfoid kolonizasyonu gerçekleşene kadar sadece hematopoietik bir organ olarak işlev görmektedir (Varga vd., 2018; Lenti vd., 2022). Hematopoez, fetal yaşamın sekizinci ayında yavaş yavaş azalır. Doğumdan sonra dalakta eritroblastlar, miyelositler ve megakaryositlerin bulunması, yalnızca kan veya hematopoietik organların (örneğin, miyelofibrozu) belirli patolojik durumlarında ortaya çıkar (Varga vd., 2018).

Dalaktaki yapısal hasarın incelenmesi, etkilenen hücre alt grupları ve onarım potansiyelleri açısından önemlidir. Özellikle RP bölgesindeki sinüzoid kaybı, endotel hücrelerinin eklenmesiyle onarılabilir (Varga vd., 2018; Short vd., 2019). Dalak stromal hücreleri ve perisinüzoidal retiküler hücrelerin özel alt grupları, belirli mikroçevrelerin onarımında önemli bir potansiyele sahiptir. Bu hücrelerin kök hücre formları, doku yenileme ve onarıma yönelik hedeflenmiş tedavi stratejilerinde kullanılabilir (Short vd., 2019).

Dalağın lobüle olması veya aksesuar dalakların varlığı gibi konjenital anormallikler oldukça sık görülmektedir. Buna karşılık, gezici dalak ya da polispleni gibi diğer anormallikler ise daha nadir ortaya çıkmaktadır. Dalak konjenital anomalilerinin sınıflandırması, hem Latince hem de İngilizce olarak mevcut olan, “Terminologia Embryologica” olarak bilinen resmi ve uluslararası kabul görmüş embriyolojik terminolojiden türetilmiştir. Dalağın çeşitli nadir konjenital anormallikleri tanımlanmıştır. Örneğin, aspleni, dalak eksikliğini ifade eder ve bu durum aynı zamanda Ivemark sendromu olarak da bilinir (Varga vd., 2018).

Polispleni sendromu (PS), sağ veya sol üst kadranda birden fazla dalak nodülünün varlığıyla karakterize edilen konjenital bir durumdur. Bu sendrom, aynı zamanda iki taraflı

sol taraflılık ve sol izomerizm olarak da bilinir. PS, iki taraflı hiperarteriyel bronşlar, iki taraflı sol atriyum ve simetrik karaciğer ile belirlenir.

Aspleni sendromu ise dalakta nodül bulunmayan konjenital bir durumdur. Bu sendrom, bilateral sağ taraflılık ve sağ izomerizm olarak adlandırılır ve iki taraflı eparteriyel bronşlar, iki taraflı sağ atriyum ve simetrik karaciğer ile karakterizedir (Yoneyama vd., 2015; Lenti vd., 2022).

Hipospleni, genellikle orak hücreli anemi, çölyak hastalığı, *Plasmodium malariae* enfeksiyonu ve alkolik siroz gibi durumların neden olduğu edinilmiş bir hastalık olabileceği gibi doğuştan da ortaya çıkabilir. Fonksiyonel hiposplenizm olarak da adlandırılan edinilmiş hiposplenizm iyi bir şekilde belgelenmişken, bilimsel literatürde konjenital hiposplenizm hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Varga vd., 2018). Aspleniye benzer şekilde hem fonksiyonel hem de konjenital hiposplenizmler, periferik kan yaymasında eritrositlerin sitoplazmasındaki hücre çekirdeği kalıntıları olan Howell-Jolly cisimciklerinin varlığıyla teşhis edilebilir. Dalak sintigrafisi gibi nükleer görüntüleme yöntemleri de tanı koymak için kullanılabilir (Varga vd., 2018; Lenti vd., 2022).

Dalak, fizyolojik stres veya hastalık durumlarında tetiklenen ekstraspleni hematomatöz sürecine katılabilir. Yaşlanma ve çeşitli hastalıklar nedeniyle kemik iliğinin işlev kaybı, dalağın hematomatöz için alternatif bir doku bölgesi olarak önemini artırır. Kök hücre transplantasyonu sırasında dalak, rejeneratif yeteneği ve hücre engraftasyonu (kök hücre aşılması) sayesinde ektopik dalak dokusu oluşturma potansiyeli ile önemli bir rol oynamaktadır. Bu özellikler, gelecekteki tedavi yöntemleri için değerli fırsatlar sunmaktadır (Short vd., 2019).

2.1.1. Tıp tarihinde dalak

Batı kültürüne göre Aristoteles, öğretmeni Platon'un (MÖ 427-347) gösterdiği yolda ve Corpus Hippocraticum'dan öğrendiklerine dayanarak dalağın belirli bir sindirim fonksiyonu olduğunu tanımlamıştır (MÖ 384-322). Mideye "geniş bir ağ" ile bağlanan dalak, "midede mevcut olan aşırı nemi uzaklaştırır." Bergamalı Galen, mide ile dalak arasındaki bu ağ benzeri bağlantıyı hem nemi emen hem de tonlayıcı ve sıkılaştırıcı bir "succus melancholicus" salgılayan kısa bir damar (vas brevis) olarak tanımlamıştır (Riva vd., 2019; Weinzirl vd., 2020). Oribasius'un 4. yüzyıla ait tıbbi çalışmalarında, dalak "karaciğer tarafından salgılanan melankolik, kalın ve siltli sıvıları alan temizleyici bir organ" olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, dalağın bu sıvıyı küçük bir damar aracılığıyla mideye ilettiği

belirtilmiştir (Weinzirl vd., 2020). Meletius'un 8. yüzyıldaki yazılarında, "dalak; vücudu karaciğerden atılan cerahatli ve bulanık sıvılar ile yiyecek atıklarından temizler" ifadesi yer almaktadır (Riva vd., 2019; Weinzirl vd., 2020). Hildegard von Bingen, çiğ gıdaların midede kolay sindirilemeyeceğini savunur; çünkü bu gıdalar ısıtılmamıştır. Bu durum, yiyeceklerin kötü salgılarının dalağa ulaşmasını ve orada ağırlı bir şişmeye neden olabileceğini belirtir (Weinzirl vd., 2020).

2.2. Rifampisin

Rifamisinler, 1957'de keşfedilen ve genellikle TB tedavisinde kullanılan bir antibiyotik grubudur (Adams vd., 2021). 1965 yılında ağız yoluyla kullanılabilen bir RF türevi keşfedilmiş ve bu türevin, 1971'de U.S. FDA (ABD Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından akciğer TB'nin tedavisinde ağızdan verilmek üzere kullanılması onaylanmıştır. 1971'den itibaren, izoniazid ve pirazinamid ile birlikte, 10 mg/kg/gün dozunda birinci basamak tedavi şeklinde pulmoner ve ekstrapulmoner TB'nin tedavisinde önemli bir rol oynamıştır (Khadka vd., 2023). Belirlenen bu doz, doza bağlı toksisite riskini en az indirmek ve ilacın klinik kullanıma ilk sunulduğunda sahip olduğu yüksek maliyetini dikkate almak amacıyla belirlenmiştir. Ancak, daha sonraki araştırmalar yüksek oral RF dozlarının insanlar tarafından iyi bir şekilde tolere edildiğini ve kanda daha yüksek ilaç konsantrasyonları elde edildiğini ortaya koymuştur. Bu geleneksel 10 mg/kg/gün (maksimum 600 mg/gün) dozlarından daha etkili olabileceğini göstermektedir (van Ingen vd., 2011; Velásquez vd., 2018; Abulfathi vd., 2019).

2.2.1. RF molekülü ve etki mekanizması

RF'ler, naftalin aromatik grubunu içeren poliketidlerden oluşur ve doğal ürünler arasında ansamisin sınıfına aittir. Bu moleküller, naftalin aromatik grubunun uçlarının çeşitli kimyasal gruplarla süslenmiş bir poliketid zinciri ile köprülendiği ve bir halka oluşturduğu sepet benzeri yapılarıyla karakterize edilir (van Ingen vd., 2011; Adams vd., 2021) (Şekil 2.3). RF (rifampin olarak da bilinmektedir), mikobakterilerin DNA'ya bağımlı RNA sentezini inhibe ederek bakterisit etkisini göstermekte olan, RF-B'nin yarı sentetik türevidir (Forrest vd., 2010; Khadka vd., 2023).

mutasyonlar, bakterilerin RF'ye direnç geliştirmesine neden olur. Kristal yapı verilerine göre, RF'lerin yeni oluşan bir transkriptte ikinci veya üçüncü fosfodiester bağının oluşumundan sonra transkripsiyonu bloke edebileceğini göstermiştir (Adams vd., 2021).

2.2.2. RF ile farmakokinetik etkileşimler

RF, birçok ilaç metabolize edici enzimin güçlü bir indükleyicisidir. Hem karaciğerde hem de bağırsakta sitokrom P450 (CYP) 3A4'ün ekspresyonunu belirgin şekilde artırır, bu da çeşitli CYP3A4 substratlarının plazma konsantrasyonlarını ve etkilerini önemli ölçüde azaltır. Bir çalışmada, RF kullanan bireylerde hepatik CYP3A4 protein içeriği, RF kullanmayan organ donörlerine kıyasla yaklaşık 2,4 ila 4,7 kat daha yüksek bulunmuştur (Niemi vd., 2012).

Araştırmalar, insan plasentasındaki ve lenfoid dokudaki RNAP'ın RF'ye karşı duyarsız olduğunu ortaya koymuştur. Ancak RF'in CYP enzimleri ve P-glikoprotein taşıma sistemini indükleyerek önemli ilaç etkileşimlerine yol açabileceği ve vücut sıvılarının rengini değiştirebileceği, ayrıca daha az yaygın hastalıklara neden olabileceği de bildirilmiştir (Adams vd., 2021).

RF, TB lezyonlarını sterilize etme ve yeniden oluşumunu engelleme yeteneği ile uzun süreli kullanım deneyimi ve iyi belgelenmiş oral farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri sayesinde inhalasyon yoluyla tedavide en umut verici anti-TB ilacı olarak değerlendirilmektedir (Boeree vd., 2015; Abdulfathi vd., 2019).

Yetersiz beslenme, HIV enfeksiyonu, diyabet, doz büyüklüğü, farmakogenetik varyasyonlar, hepatik siroz ve standart dışı tıbbi ürünler, RF maruziyetini ve etkinliğini etkileyebilir. Ancak RF'nin 600 mg dozunda uygulandığında, böbrek yetmezliği olan hastalarda ilacın farmakokinetik özellikleri değişmemektedir (Abdulfathi vd., 2019).

TB tedavisinde yüksek dozda oral RF kullanımı, sistemik toksisite riskinin artması nedeniyle sınırlı olabilir. Ayrıca, tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanımında bilinmeyen farmakodinamik özellikler gibi zorluklar bulunmaktadır. Bu nedenlerle, araştırmalar RF'in daha etkili bir şekilde uygulamanın alternatif yöntemlerine odaklanmaktadır (Khadka vd., 2023).

RF'in inhalasyon yoluyla uygulanması, akciğerlerde yüksek ilaç konsantrasyonları elde edilmesine olanak tanır. Bu yöntem, ilacın doğrudan akciğer dokularına ulaşması ve geniş bir yüzey alanı üzerinde hızlı bir şekilde emilmesi sayesinde, sistemik dolaşımdaki

konsantrasyonları artırır. Böylece, oral yolla alınan dozdan çok daha düşük bir miktarla benzer ya da daha yüksek kan düzeylerine ulaşmak mümkündür (Khadka vd, 2021).

Çok az sayıda çalışmada inhalasyon için RF kristal parçacıkları kullanılmıştır. 2011 ve 2012 yıllarında Son ve McConville, RF'nin polimorfik formu olan RF dihidratını inhalasyon yoluyla uyguladıklarını rapor etmişlerdir (Son & McConville, 2011; Son & McConville, 2012).

En yaygın olarak araştırılan RF'nin biyosentetik yollarından biri RF B'nin biyosentetik yoludur. RF B üretimi ile ilişkili gen kümesi, RIF B'nin sentezinden sorumlu enzimleri ve sentezinin düzenlenmesinde yer alan gen ürünlerini içeren 50'den fazla açık okuma çerçevesi içerir. RF B'nin biyosentezi, RF B'deki son naftalin aromatik kısmının bir parçası olan poliketid başlangıç ünitesi olan 3-amino-5-hidroksibenzoik asidin (AHBA) sentezi ile başlar (Adams vd., 2021).

RF'nin, kendi yapısının farklı kristal yapıda paketlenmesine izin verecek şekilde hidrojen bağlanmasına, konformasyonel değişimlere ve iyonizasyona katılabilen karmaşık yapısından dolayı polimorfizm sergilediği bilinmektedir. RF'nin bilinen iki ana polimorfik formu olan form I ve form II'nin yanı sıra, literatürde birçok hidrat, solvat ve solvat hidrat formu da tanımlanmıştır. Solvat hidratlar, kristal yapılarında hem solvent hem de su moleküllerini içeren RF polimorflarıdır (Henwood vd., 2001; Khadka vd., 2020).

RF polimorfları, oral doz formları için farklı çözünürlük, stabilite ve biyoyararlanıma sahiptirler (Khadka vd., 2020). Günümüzde RF'ler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Başlangıçta RF'nin, izoniazid ve pirazinamid ile kombine edildiğinde TB tedavisinin süresini on sekiz aydan altı aya kadar önemli ölçüde kısalttığı bulunmuştur ve bugün hala birinci basamak TB tedavilerinin bir üyesi olarak görülmektedir (Abdulfathi vd., 2019; Adams vd., 2021).

RF'ler, TB'nin ön saf tedavisinde önemli bir rol oynayan ilaçlardır ve ayrıca stafilokokal biyofilmlere karşı etkili olmaları nedeniyle stafilokokal protez eklem enfeksiyonlarının tedavisinde de önerilirler (Adams vd., 2021).

Bunun yanı sıra, RF cüzzam (lepra), pnömokokal menenjit, stafilokok ve *Legionella* spp.'lerinden kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde de kullanılır. RF'nin bu geniş etki spektrumu onu birçok enfeksiyon hastalıklarının yönetiminde değerli bir tedavi seçeneği haline getirmektedir (Forrest vd., 2010; Adams vd., 2021).

2.2.3. RF'nin yan etkileri

TB tedavisinde, genellikle yüksek dozlarda antibiyotikler oral yolla tek başına ya da kombine şekilde uygulanmaktadır. Ancak, bu tür yüksek dozlar, sistemik olarak birikim yaparak çeşitli yan etkilere sebep olabilir (Son & McConville, 2011).

RF monoterapisinde en sık görülen yan etkiler arasında karın ağrısı, kusma, baş ağrısı ve kaşıntı bulunur. RF'nin izoniazid, pirazinamid ve etambutol ile birlikte kullanıldığı kombinasyon tedavisinde ise en yaygın yan etkiler kusma, baş ağrısı, hiperürisemi, ekstremitelerde ağrı ve kaşıntıdır. Bu olumsuz etkiler, tüm hasta gruplarında görülmekte olup, belirli bir doz aralığına bağlı değildir (Boeree vd., 2015).

Ancak, RF'in lipofilik özellikleri, düşük biyoyararlanımı, sistem öncesi metabolizması ve potansiyel ilaç etkileşimleri, hastaların sıkça yan etkiler yaşamasına ve RF'ye dirençli TB gelişimine yol açabilir (Santos vd., 2022).

Anti-TB ilaçlarının karaciğer, kan, kemik, dalak ve üreme organları üzerindeki toksik etkileriyle ilgili literatürde çeşitli araştırmalar mevcuttur (Bedir vd., 2021). TB tedavisinde kullanılan ilaçların akciğerlere doğrudan uygulanması (örneğin inhalasyon yoluyla), oral yolla alınan ilaçların neden olduğu sistemik yan etkilerden kaçınma avantajı sağlar. Ayrıca bu yöntemle daha düşük bir ilaç dozu kullanılarak akciğerlerde yüksek ilaç konsantrasyonları elde edilebilir, bu da TB'nin etkili bir şekilde tedavi edilmesine olanak tanır. Bu şekilde ilaçları doğrudan akciğerlere ulaştırmak hem yan etkileri azaltabilir hem de tedavi etkinliğini artırabilir (Khadka vd., 2020).

RF tedavisinin en dikkat çekici yan etkileri arasında vücut sıvılarının kırmızıya dönmesi ve özofajit gibi sorunlar yer almaktadır. Genel olarak yan etki profili nispeten hafif olsa da bazı ciddi reaksiyonlar da bildirilmiştir. Bunlar arasında hepatotoksisite, nefrotoksisite, açıklanamayan ateşler, sitopeniler ve nörolojik rahatsızlıklar bulunmaktadır. Ayrıca, hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu taşıyan hastalarda RF kullanımı hepatotoksisite riskini artırabilir (Forrest vd., 2010).

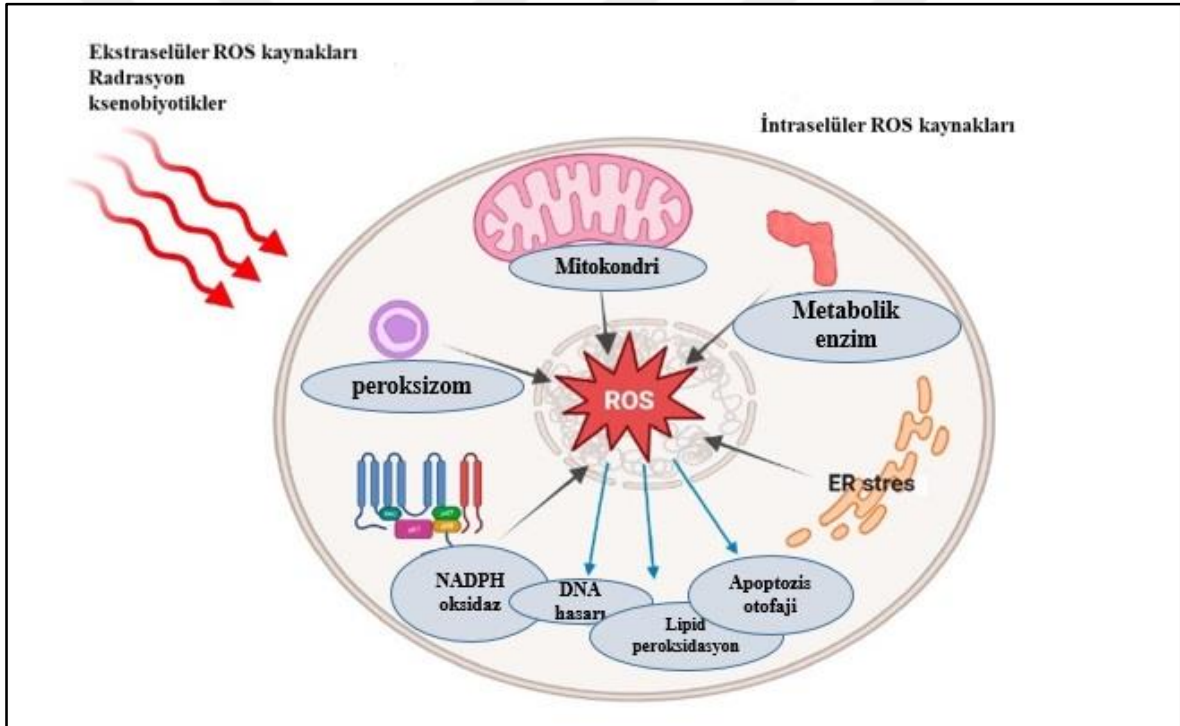
Hepatotoksisite, bu ilaçların en iyi bilinen yan etkisidir, ancak dalak gibi organlar ve kan üzerindeki etkilerinin hala araştırılması gerekmektedir (Sharma & Sharma, 2017).

2.3. Oksidatif Stres

OS, hücrelerde ve dokularda ROS'un aşırı üretimi ve birikimi ile bu reaktif bileşenleri detoksifiye etme kapasitesindeki dengesizlikten kaynaklanan bir durumdur. Bu dengesizlik,

biyolojik sistemlerin ROS'u etkili bir şekilde nötralize edememesi sonucunda ortaya çıkar (Pizzino vd., 2017; Hong vd., 2024).

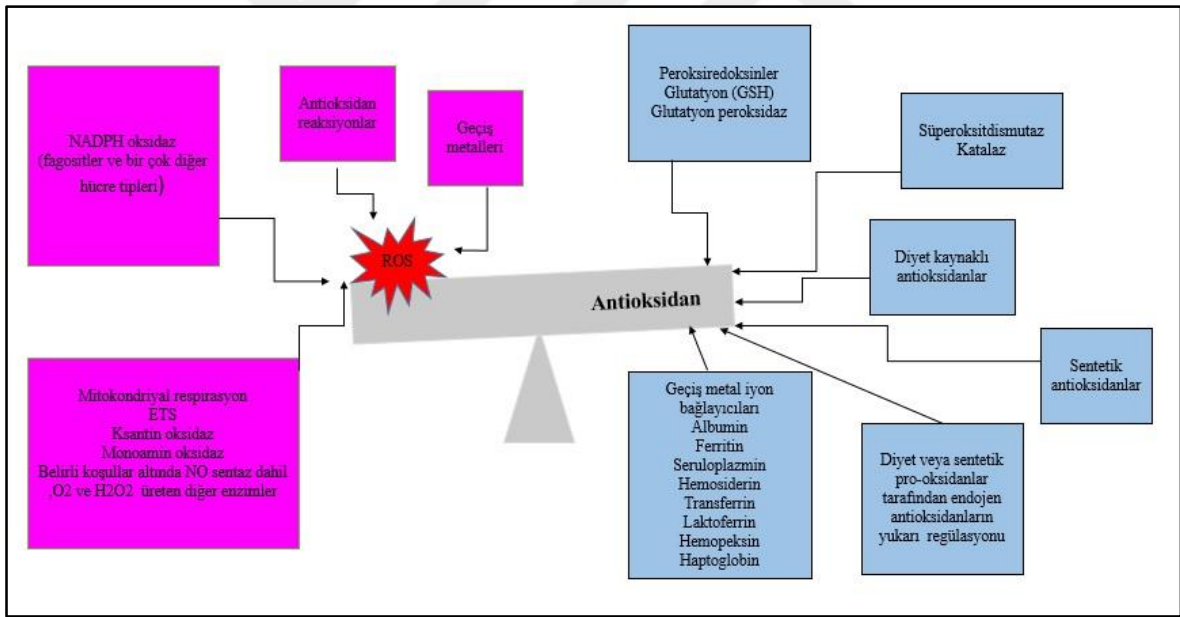
ROS, hücre içindeki diğer moleküllerle kolayca reaksiyona giren, kararsız ve yüksek reaktiviteye sahip oksijen (O_2) içerikli moleküllerdir (Kishi vd., 2023; Bouyahya vd., 2024; Halliwell, 2024). ROS, fizyolojik olaylarda rol oynayarak, hücre sinyalizasyonunda ve normalde O_2 metabolizmasının yan ürünleri olarak üretilirler. Ancak, çevresel stres faktörleri (UV, iyonlaştırıcı radyasyonlar, kirleticiler ve ağır metaller) ve ksenobiyotikler (antiblastik ilaçlar gibi) ROS üretimini büyük ölçüde artırır ve bu nedenle hücre ve doku hasarına yol açan dengesizliğe neden olmaktadır (Pizzino vd., 2017; Bouyahya vd., 2024; Halliwell, 2024) (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4. Ekstrasellüler ve intrasellüler ROS kaynakları ve hücresel etkileri
(Kaynak: Hong vd., 2024)

Oksidatif hasar, ROS'un biyomoleküllere verdiği hasarı tanımlamak için kullanılan bir terimdir ve ROS'un aşırı artışı özellikle kanser, kardiyovasküler, göz ve nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynar. Birçok ROS [hikdroksil radikali ($OH\bullet$), O_2 , hipoloröz asit ($HOCl$), peroksinitroz ($ONOOH$) ve bazı peroksil radikalleri] DNA'ya saldırarak mutajenik baz oksidasyon ürünleri oluşturarak RNA'ya, proteinlere, karbonhidratlara ve lipitlere saldırabilir. O_2 'nin neden olduğu oksidatif

hasar, oksijen metabolizmasındaki bozukluklarla ilişkili birçok hastalıkta, özellikle “heme” sentezindeki kusurlardan kaynaklanan porfiriler gibi birçok hastalıkta rol oynar (Bouyahya vd., 2024; Halliwell, 2024). ROS, hem serbest radikal olmayan oksijen ara maddelerini (H_2O_2 gibi) hem de serbest radikal oksijen ara maddelerini [süperoksit anyonu (O_2^- veya $OH^\bullet$)] içerir (Hong vd., 2024; Bouyahya vd., 2024; Manoharan vd., 2024). Bunlar endojen olarak (örn. Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) oksidazlar, mitokondri) ve ekzojen faktörlerden (örn. iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma, hava kirliliği, enfeksiyonlar) üretilirler. Bu moleküllerin hücrede birikimini önlemek ve redoks homeostazını [hücredeki oksidasyon (elektron kaybı) ve indirgenme (elektron kazanımı) dengesi anlamına gelir] sağlamak, hücrelerin normal işlevlerini sürdürebilmesi için hayati bir öneme sahiptir. Bu denge CAT, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi hücresel antioksidan sistemler sayesinde korunur (Bouyahya vd., 2024; Pisoschi vd., 2021) (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5. ROS ve antioksidanlar arasındaki denge (**Kaynak:** Halliwell, 2024)

OS diğer bir deyişle, serbest radikal oluşumu ile hücrelerin bunları temizleme yeteneği arasında bir dengesizlik olduğunda ortaya çıkar. Örneğin, $OH^\bullet$ ve $ONOOH$ fazlası lipid peroksidasyonuna neden olabilir ve böylece hücre zarlarına ve lipoproteinlere zarar verebilir (Halliwell, 2024; Pisoschi vd., 2021). Bu da sitotoksik ve mutajenik olduğu bilinen malondialdehit (MDA) ve konjuge diene bileşiğinin oluşumuna yol açmaktadır.

Radikal bir zincir reaksiyonu olan lipid peroksidasyonu, çok miktarda lipidik molekülü etkileyerek çok hızlı yayılır. Proteinler OS nedeniyle hasar görebilir, enzimatik aktivitelerinde kayba veya bozulmaya neden olabilecek konformasyonel değişikliklere uğrayabilir (Pizzino vd., 2017; Pisoschi vd., 2021).

ROS kaynaklı hasarın üç ana hedefi nükleik asitler, lipitler ve proteinlerdir. Bu hasarın en yaygın türü, DNA'nın baz yapısında meydana gelen değişikliklerdir. Bu değişiklikler, tek zincirli kırıklara (SSB) ya da daha ciddi olan çift zincirli kırıklara (DSB) yol açabilir. ROS kaynaklı hasarın onarımı, hücre içerisindeki çeşitli DNA tamir mekanizmaları ile gerçekleşir (Keane vd., 2024; Hong vd., 2024).

2.3.1. Hücre içi ROS dengesi

ROS'un yüksek toksisitesi ve kanserojen etkileri, hücresel fizyolojide ROS seviyelerinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesini hayati kılar. Sağlıklı hücresel bir ortam için ROS seviyelerinin belirlenmiş sınırlar içinde tutulması büyük önem taşır çünkü bu denge sağlık ve hastalık süreçlerini derinden etkiler. Hücre içi ROS homeostazını düzenleyen bir dizi redoks tabanlı mekanizma mevcuttur ve bu süreçlerin en çok çalışılanları arasında; ROS aracılığıyla sistein kalıntılarının oksidasyonu yer alır (Hong vd., 2024). Hücreyi koruma stratejilerinin bir parçası olarak doğrudan antioksidanlar önemli bir rol oynar. Örneğin, antioksidan vitaminler, glutatyon ve N-asetilsistein, ROS ile doğrudan reaksiyona girerek bu zararlı molekülleri etkisiz hale getirme kapasitesine sahiptir (Kishi vd., 2023). Bu mekanizmalar, hücresel dengeyi sağlamak ve ROS'un neden olduğu hasarları önlemek için kritik öneme sahiptir.

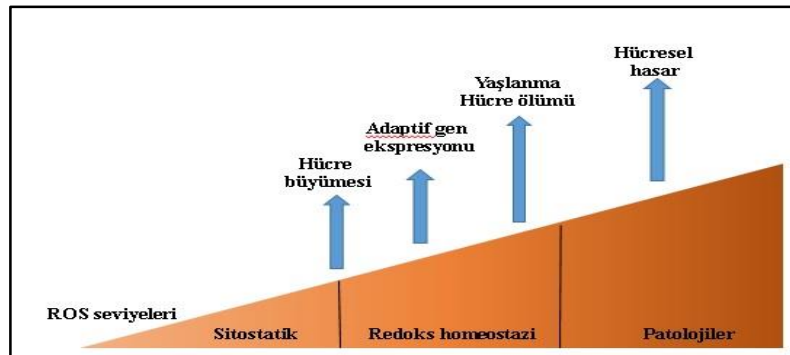
Sistein kalıntıları, ROS için spesifik hedefler olarak hizmet eder ve tiyol peroksidazlar gibi birçok ROS temizleyici proteinin katalitik merkezlerini oluşturur. Örneğin, peroksiredoksinler (Prxs), H₂O₂ tarafından oksidasyona duyarlı olan katalitik bölgelerinde korunmuş sistein kalıntıları içerir. H₂O₂'ye maruz kaldığında, Prxs'nin peroksidatik sistein kalıntısı bir sülfenik asit ara maddesi oluşturmak üzere oksidasyona uğrar (Kishi vd., 2023; Hong vd., 2024).

Metiyonin kalıntılarının oksidatif modifikasyonu önemli bir hücresel süreçtir. ROS'a maruz kaldığında, metiyonin kalıntıları genellikle metiyonin sülfoksitlere oksitlenir. Bu dönüşüm proteinlerin yapısal ve işlevsel modifikasyonlarına neden olabilir (Hong vd., 2024). Metiyonin sülfoksit redüktaz enzimi, metiyonin sülfoksitleri yeniden metiyonine

indirger ve böylece proteinlerin yapısal bütünlüğünü ve stabilitesini koruyarak oksidatif hasarın etkilerini sınırlar (Manoharan vd., 2024).

2.3.2. ROS'un sinyal molekülleri olarak rolü

ROS, geleneksel olarak zararlı etkileriyle tanınsa da son araştırmalar onların hücrel sinyal molekülleri olarak önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Zhang vd., 2016). Fizyolojik düzeylerde ROS, hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, apoptoz, bağışıklık tepkisi ve stres adaptasyonu gibi birçok biyolojik süreci düzenler (Hamanaka vd., 2010). Ancak, ROS seviyeleri normal fizyolojik aralığı aştığında hücrel hasara ve patogeneze yol açabilir. Özellikle H_2O_2 , yüksek stabilitesi, seçici reaktivitesi ve yayılabilirliği nedeniyle sinyal molekülü olarak en önemli ROS türlerinden biri olarak kabul edilir (D'Autréaux & Toledano, 2007). Hücre içi H_2O_2 konsantrasyonları genellikle korunmuş bir fizyolojik aralıkta bulunur, ancak $0,5 \times 10^{-4}$ M'nin üzerindeki seviyelerde toksik hale gelerek apoptozu indükler (Giorgio vd., 2007) (Şekil 2.6). ROS, enzimler, transkripsiyon faktörleri ve sinyal kaskadlarının aktivitesini modüle ederek ikincil haberciler olarak işlev görür (Zhang vd., 2016). Bu nedenle, ROS'un hem zararlı hem de düzenleyici moleküller olarak ikili doğasının anlaşılması, hücrel metabolizma, OS ve biyolojik süreçlerin düzenlenmesi arasındaki karmaşık etkileşimlere ışık tutar. ROS seviyelerinin "güvenli" sınırlar içinde tutulması, düzenleyici mekanizmalarla sağlanırken, aynı zamanda sinyalleşme işlevselliği de mümkün kılınır. ROS'a yanıt veren sinyalleşme yolları, redoks durumundan doğrudan etkilenen "sensör" bileşenler ve gen ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörleri aracılığıyla çalışır (Hong vd., 2024). Bu yollar, ROS'un gen ifadesindeki değişikliklerle nasıl bağlantı kurduğunu anlamak için kritik öneme sahiptir.



Şekil 2. 6. ROS seviyelerinin hücrel sinyal olayları ve biyolojik sonuçlar üzerindeki etkisi (**Kaynak:** Hong vd., 2024)

2.3.2.1. Aktivatör protein-1

Aktivator Protein-1 (AP-1) ailesi, hücrel yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan ve ROS gibi hücre dışı uyarılara yanıt veren temel lösin fermuarı (bZIP) transkripsiyon faktörlerinden oluşur. AP-1, Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2), Maf (c-Maf, MafA, MafB, MafG/F/K, Nrl) ve ATF (ATF2, ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) protein alt ailelerinin üyeleri tarafından oluşturulan homo- ve heterodimerlerden meydana gelir. Bu proteinler, gen promotörlerindeki AP-1 bölgelerine (çekirdek konsensüs dizisi “TGACTCA”) bağlanarak gen ifadesini düzenler. AP-1 dimerlerinin bileşimi farklı DNA dizilerine ve etkileşimli partnerlere olan benzersiz afiniteleri sayesinde işlevsel çeşitlilik sağlar.

AP-1, hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi temel hücrel süreçlerde kritik bir role sahiptir. Çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, nörotransmitterler, hormonlar, toksinler ve ultraviyole ışık (UV) gibi çevresel stres faktörleri tarafından aktive edilir. AP-1'in aktivasyonu, ROS'a bağlı bir mekanizma ile düzenlenir ve bu özellik, mayadan memelilere kadar oldukça korunmuştur. Örneğin, ekzojen ROS maruziyeti, c-Fos ve c-Jun'un gen ifadesini ve protein seviyelerini artırarak epitel hücrelerinde daha güçlü bir DNA bağlama aktivitesine neden olur. Antioksidanlar ve ROS temizleyiciler, UVB veya kimyasal kaynaklı AP-1 aktivasyonunu etkili bir şekilde inhibe edebilir.

AP-1'in DNA bağlama aktivitesi, c-Fos ve c-Jun'daki korunmuş sistein kalıntılarının redoks durumu tarafından belirlenir. Ayrıca, AP-1, ROS'a duyarlı mitogenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) kaskadları tarafından fosforilasyon yoluyla dolaylı olarak da düzenlenir ve bu durum transkripsiyonel aktivasyonu artırır. AP-1'in redoks kontrolü hücrel homeostazın korunması için kritik öneme sahiptir. AP-1 fonksiyonunun düzensizliği, kanser, inflamasyon ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojik durumda rol oynar (Hong vd., 2024).

2.3.2.2. Nükleer faktör-kappa B

Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B), hücre sağkalımı, çoğalması, inflamasyon ve bağışıklık sistemi fonksiyonunda yer alan birçok genin ifadesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörleri ailesidir (NF- κ B1, NF- κ B2, p65/RelA, c-Rel ve RelB). NF- κ B proteinleri, homo- veya heterodimerizasyon ve DNA bağlanması için gerekli olan bir Rel-homoloji (RHD) alanı içerir. Kanonik NF- κ B yolu, genellikle Tümör nekroz faktör (TNF)

reseptör süper ailesi gibi proinflamatuvar reseptörlerin uyarılmasıyla aktive olur ve NF- κ B dimerlerinin çekirdeğe taşınarak hedef genlere bağlanmasını sağlar (Morgan & Liu, 2010).

NF- κ B, hücreleri OS'ye karşı korumak için antioksidan ve pro-oksidan genlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Perkins, 2007). Orta düzeyde ROS, NF- κ B aktivasyonuna yol açan sinyal iletim süreçlerinde ikincil haberciler olarak görev yaparken yüksek ROS seviyeleri bu düzenlemeyi bozarak sürekli NF- κ B aktivasyonuna neden olabilir (Raza vd., 2008; Hong vd., 2024). ROS, NF- κ B inhibitör proteini I κ B'yi fosforile eden I κ B kinaz (IKK) kompleksini doğrudan değiştirerek NF- κ B'nin serbest kalmasını ve çekirdeğe taşınmasını sağlar (Gloire vd., 2006). Ancak aşırı ROS, negatif geri bildirim mekanizmalarını bozarak NF- κ B'nin kalıcı aktivasyonuna yol açabilir ve bu durum inflamasyon ve genotoksik stresle ilişkilidir. Ayrıca, ROS kaynaklı DNA hasarı, ATM ve ATR kinazları gibi DNA hasarı sensörleri aracılığıyla NF- κ B aktivasyonunu dolaylı olarak tetikleyebilir (Hong vd., 2024).

2.3.2.3. p53

p53, sıklıkla "genomun koruyucusu" olarak adlandırılır ve genomik bütünlüğün korunması ve strese karşı hücrel yanıtın düzenlenmesi için kritik öneme sahiptir (Hong vd., 2024). ROS, p53'ün aktivitesini düzenleyerek bu yolda hem aktifleyici hem de düzenleyici olarak görev yapar. ROS, DNA hasarına yanıt olarak p53 aktivasyonunu başlatmak için sinyal molekülleri olarak hareket edebilir. ROS, p53'ü stabilize eder ve aktive eder, DNA onarımını ve antioksidan yanıtları teşvik eder, hasarlı hücrelerin yayılmasını önler ve ROS'u toksik olmayan seviyelerde tutar (Hong vd., 2024; Halliwell vd., 2024).

2.3.2.4. Keap1-Nrf2-ARE

Keap1-Nrf2-ARE sinyal yolu, hücrel redoks homeostazını korumada ve hücreleri hem iç hem de dış stres faktörlerine karşı korumada kritik bir düzenleyici sistemdir. Bu mekanizmada ROS, Nrf2 (Nükleer Faktör Eritroid 2 İle İlişkili Faktör-2) aktivasyonu ve Keap1 tarafından inhibisyonu arasında dinamik bir denge sağlayarak merkezi bir rol oynar (Hong vd., 2024).

OS, Keap1 proteinindeki belirli bir sistein kalıntısını değiştirerek yapısal bir değişikliğe neden olur ve bu durum, Nrf2'nin bozunmadan kurtulmasını sağlar. Serbest kalan Nrf2, çekirdeğe girerek antioksidan genlerin promotör bölgelerindeki küçük muskulo-aponevrotik fibrosarkom (MAF) homologlarına ve antioksidan tepkili elemanlara (ARE)

bağlanır. Bu bağlanma, glutatyon sentaz ve HO-1 gibi antioksidan proteinlerin ekspresyonunu indükler. Bu proteinler, hücrelerin ve organların OS'ye karşı korunmasında hayati bir rol oynar (Kishi vd., 2023).

2.3.2.5. MAPK sinyal yolu

MAPK sinyalleme kaskadı ROS ve AP1 transkripsiyonel düzenleyicileri arasında önemli bir bağlantıyı temsil eder. Bununla birlikte, MAPK sinyalleme kaskadı hücrede OS'ye karşı çoklu transkripsiyonel ve transkripsiyonel olmayan yanıtları koordine etmek için daha genel bir rol oynar. MAPK'ler, çoğalma, farklılaşma, stres adaptasyonu ve apoptoz gibi çeşitli temel hücresel işlevleri yönetmede kritik bir rol oynayan çeşitli bir serin/treonin kinaz ailesini oluşturur (Pisoschi vd., 2021; Hong vd., 2024).

2.3.3. Oksidatif strese nitrik oksit rolü

Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS), eşleşmiş bir formda bulunduğunda bol miktarda nitrik oksit (NO) ve az miktarda ROS üretir. Bu durumda, eNOS dimerik bir yapı oluşturur ve optimum işlevini sürdürür. Eşleşmiş form, enzimatik aktivitenin düzgün çalıştığını ve hücresel homeostazın korunmasında önemli bir rol oynadığını gösterir (Kishi vd., 2023). NOS, normal amino asit metabolizmasında NO üretir. Reaktif azot türleri (RNS) ayrıca süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) ile NO arasındaki reaksiyonlar sonucu peroksinitrit ($ONOO^-$) üretebilir. Bunun yanı sıra, endoplazmik retikulum (ER) da aşırı protein sentezine bağlı olarak yanlış katlanmış proteinlerin ve ER stresinin oluşumuna yol açarak ROS üretiminden sorumludur (Keane vd., 2024).

2.4. Hücresel Antioksidan Sistemler

Hücreler, ROS seviyelerini düzenlemek ve OS'yi önlemek için çok yönlü bir antioksidan savunma sistemi kullanır (Hong vd., 2024). Antioksidan enzimler ve enzim dışı sistemler olmak üzere iki tip ROS temizleme sistemi vardır (Kishi vd., 2023).

Enzimatik antioksidanlar esas olarak SOD, CAT ve GPx enzimler tarafından temsil edilir. SOD, antioksidan savunma sisteminin ilk hattını oluşturur. Bu enzim, $O_2^{\bullet}$ dismutasyonunu katalize ederek H_2O_2 ve O_2 üretir. Böylece SOD, ROS seviyesini kontrol altında tutarak hücreleri OS'ye karşı korumada kritik bir rol oynar (Hong vd., 2024;

Bouyahya vd., 2024). SOD'un sitoplazmik (SOD1), mitokondriyal (SOD2) ve hücre dışı matriks/plazma membran dış yüzeyi (SOD3) olmak üzere üç farklı tipi vardır.

Peroksizomlar hücrel ROS'un detoksifikasyonunda kritik bir rol oynar. Bu organeller, SOD, GPx ve CAT gibi enzimlerin etkinliği ile peroksizomal ve hücre içi ROS'u etkisiz hale getirir. CAT peroksizomlarda yer alan bir enzimdir ve $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ reaksiyonunu katalize eder (Kishi vd., 2023; Keane vd., 2024). Ayrıca GPx, glutatyon varlığında H_2O_2 'yi H_2O 'e parçalayarak ROS seviyelerini azaltır (Kishi vd., 2023; Hong vd., 2024). H_2O_2 'nin detoksifikasyonu sürecinde CAT, GPx ve Prxs gibi enzimler iş birliği yaparak hücreleri OS'nin zararlı etkilerinden korur (Hong vd., 2024; Manoharan vd., 2024).

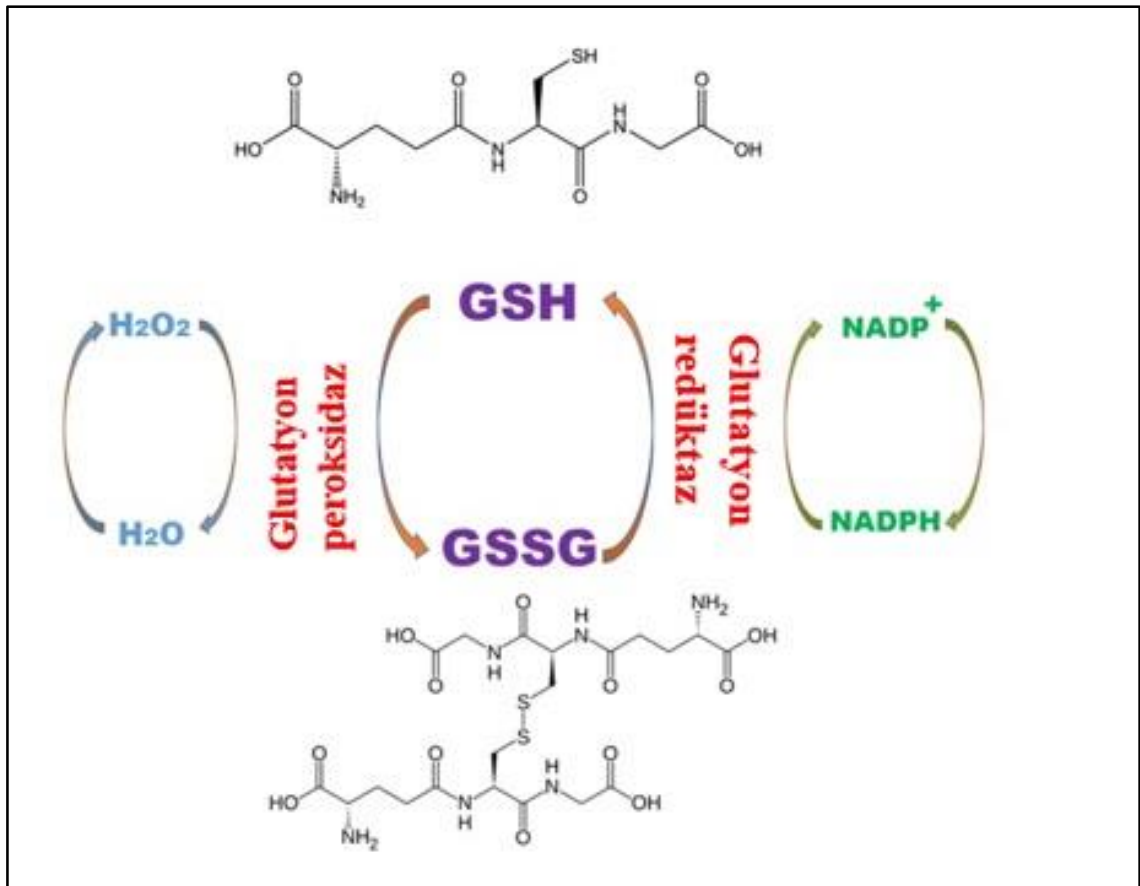
Enzimatik olmayan antioksidanlar kısa ömürlüdür ve redoks aktivitesine sahiptir. Bu moleküller ROS'u doğrudan nötralize etmek veya enzimatik antioksidanların rejenerasyonuna katkıda bulunmak yoluyla hücreleri korur. Antioksidan aktivite sırasında tüketildikleri için sürekli olarak yenilenmeleri gerekir. Enzimatik olmayan antioksidanlara örnek olarak vitaminler, glutatyon, N-asetilsistein ve ferritin gibi metal bağlayıcı proteinler örnek olarak verilebilir. Bu moleküller, ROS'u etkisiz hale getirirken aynı zamanda hücrel savunma sistemlerinin etkinliğini artırarak oksidatif hasarın önlenmesinde etkili bir rol üstlenir (Pisoschi vd., 2021; Hong vd., 2024).

C vitamini, yani askorbik asit, serbest radikalleri nötralize etme yeteneğiyle bilinir. Bu antioksidanın etkisi, elektronları kolayca alıp stabilize edebilmesinden kaynaklanır; bu sayede ROS'un neden olduğu zararlı oksidatif reaksiyonları etkisiz hale getirir. Ayrıca, C vitamininin E vitamini gibi diğer önemli antioksidanları yeniden aktive ettiği ve böylece genel antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği de gösterilmiştir (Pisoschi vd., 2021; Hong vd., 2024).

Anti-TB ilaç uygulaması ROS'un üretimini artırarak lipidlerin peroksidasyonuna ve dolayısıyla OS'ye neden olmaktadır. OS sırayla, tüm hücre içi ana makromoleküllere (Glutatyon, DNA, RNA, proteinler, lipitler ve ATP) zarar verebilir. Bu makromoleküllerdeki herhangi bir dalgalanma, hücre yaşamı için büyük önem taşır ve hücre hasarı ile hücre ölümüne neden olabilir. Glutatyon, memeli hücrelerinde şaşırtıcı derecede yüksek seviyelerde (5 milimolar) bulunan bir tripeptittir (sistein, glisin ve glutamik asit). Hücrelerde indirgenmiş GSH ve oksitlenmiş (GSSG) olmak üzere iki formda bulunur (Şekil 2.7). GSH/GSSG oranı hücrelerin redoks durumunu belirler. Dinlenme halindeki sağlıklı hücrelerde GSH/GSSG oranı >100 iken, oksidan strese maruz kalan hücrelerde bu oran 1 ila 10'a düşer. Glutatyon ayrıca birçok proteinin sülfidril gruplarını indirgenmiş formlarında

tutan bir tiyol tamponu olarak da bilinir. Glutatyon yalnızca sitozolde üretilir ve aktif olarak mitokondriye pompalanır. GSH hücrelerde 3 şekilde kullanılabilir hale getirilir:

1. Glutamat sistein ligaz (GCL) ve glutatyon sentaz enzimleri tarafından katalize edilen 2 aşamalı bir süreçle de novo sentez (ATP gerektirir).
2. Oksitlenmiş GSSG'nin glutatyon redüktaz ile indirgenmiş GSH'ye rejenerasyonu (NADPH gerektirir).
3. GGTP yoluyla konjuge glutatyondan sisteinin geri dönüşümü (NADPH gerektirir) (Pizzorno, 2014).



Şekil 2. 7. Glutatyonun iki farklı formu

Glutatyon, singlet oksijen, hidroksil radikalleri ve süperoksit radikallerinin doğrudan kimyasal nötralizasyonunda, birkaç antioksidan enzim için kofaktör, C ve E vitaminlerinin yenilenmesi, civanın hücrelerden ve beyinden dışarı taşınmasında, hücresel proliferasyon ve apoptozun düzenlenmesinde, kimyasal toksinlerin karaciğerde metabolizması sırasında üretilen serbest radikallerin nötralizasyonunda, mitokondriyal fonksiyon ve mitokondriyal

DNA'nın (mtDNA) bakımı için hayati önem taşır. Ayrıca hem ksenobiyotik hem de endojen bileşiklerin detoksifikasyonunda rol oynar (Pizzorno, 2014).

Proteinler, DNA sentezi ve amino asit taşınması dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte önemli rol oynayan Glutatyonun en önemli rolü, hücreleri oksidanlara karşı korumaktır (Sharma & Sharma, 2017). Glutatyonun sağlık üzerindeki temel rollerinin göstergesi, OS nedeniyle GSSG birikiminin hücreler için doğrudan toksik olması ve stres ile aktive olan protein kinazlar/ mitojenle aktive olan protein kinaz (SAPK/MAPK) yolunun aktivasyonu yoluyla apoptozu indüklemesidir. Glutatyon tükenmesi apoptozu tetikler ancak belirleyici faktörün mitokondriyal mi yoksa sitozol GSH havuzları mı olduğu belirsizdir (Pizzorno, 2014). GSH tükenmesinin nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıkları, amiyotrofik lateral skleroz, Friedreich ataksi), akciğer hastalığı (KOAH, astım ve akut solunum sıkıntısı sendromu), immün hastalıkları (HIV, otoimmün hastalık), kardiyovasküler hastalıklar (hipertansiyon, miyokard enfarktüsü, kolesterol oksidasyonu), kronik yaşa bağlı hastalıklar (katarakt, makula dejenerasyonu, işitme kaybı ve glukom), karaciğer hastalıkları, kistik fibrozis gibi birçok kronik dejeneratif hastalıkta rolü olduğu düşünülmektedir (Ballatori vd., 2009).

Bir dizi diyet antioksidanının biyomoleküllere yönelik serbest radikal saldırılarını azalttığı bilinmektedir. N-Asetilsistein (NAC) sarımsak, soğan, biber ve kuşkonmaz gibi çeşitli sebzelerde bulunan doğal bir bileşiktir. NAC antioksidan, antikarsinojenik ve antianjiyojenik özellikler de dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Güçlü bir antioksidan ve GSH öncüsü olan NAC, ROS'u doğrudan ortadan kaldırmaktadır. Birçok çalışmada NAC'ın kimyasal olarak oluşturulan OS'yi ve DNA hasarını azaltma yeteneğine sahip olduğu ve onlarca yıldır çok sayıda hastalığın tedavisinde klinik olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Özçelik vd., 2020; Tenório vd., 2021).

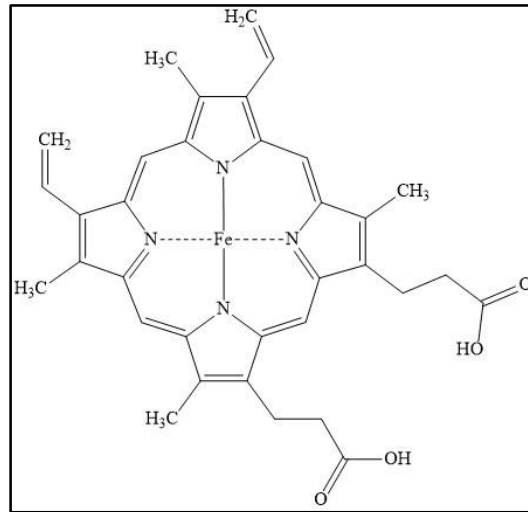
İz elementler (çinko, demir, bakır gibi), sağlığın korunması ve normal yaşam aktivitelerinin gerçekleştirilmesi için gereklidir. Bu iz elementlerin çoğunluğu vücutta doğrudan bir işlev yerine getirmek yerine belirli proteinlere bağlanarak veya onların yapısına katılarak işlev göstermektedir. Böylece metallerin oluşturduğu toksik etkilerden vücudu koruyarak, onları biyolojik olarak kullanılabilir hale getirir ve belirli enzimlerin çalışmasını destekler. Metal iyon homeostazisi bozulduğunda, vücut OS ve vücudun antioksidan savunmasını aşan artan bir ROS oluşumu yaşayabilir ve ayrıca DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna, protein modifikasyonuna ve diğer etkilere neden olabilen ve sonuçta birçok hastalığa neden olabilen diğer etkiler ortaya çıkabilir (Li vd., 2023). Albümin,

seruloplazmin, metallothionein, transferrin, ferritin ve miyoglobulin gibi metal bağlayıcı proteinler, serbest radikallerin üretimini katalize edecek olan geçiş metal iyonlarını etkisiz hale getirerek antioksidan savunma sistemine değerli bir katkı oluşturur (Agarwal vd., 2006).

Heme Oksijenaz-1 (HO-1) gibi antioksidan stres proteinleri de, dokuları korumada ve inflamasyonu azaltmada önemlidir. HO-1, toksik serbest heme'yi parçalayan ve sitoprotektif maddeler üreten bir enzimdir. Heme içeren proteinler temel fizyolojik işlevlere katkıda bulunur ancak yaralanma durumunda serbest heme'yi serbest bırakarak OS'ye, inflamasyona ve apoptoza neden olurlar (Kishi vd., 2023).

2.5. Heme ve HO Sistemi

Demir (Fe) ve protoporfirin IX kompleksi olan heme, memeliler ve bakteriler dahil tüm aerobik organizmaların hayatta kalması için kritik olan çok yönlü işlevlere sahiptir. Heme'deki merkezi Fe, dördü tetrapireol halkasının azot atomları tarafından işgal edilen altı ligand bağlanma bölgesine sahiptir. Kalan iki bağlanma bölgesi ise proteinlerin belirli amino asitleri tarafından ya da O₂, NO ve CO gibi gazlar tarafından doldurulabilir (Vijayan vd., 2018) (Şekil 2.8).



Şekil 2. 8. Heme'nin yapısı

Heme, solunum zincirinin elektron transferi, ilaç metabolizması, oksidaz ve peroksidaz enzim reaksiyonları gibi temel hücresel süreçlere aracılık etmek için çok sayıda protein ile bir araya gelerek hemoproteinler şeklinde kritik işlevler görmektedir (Vijayan vd., 2018; Duvigneau vd., 2019). Üç ana protein sınıfı heme içerir: hemoglobin, oksidaz ve

peroksidaz. Hemoglobindeki heme, oksijen taşınması için esastır; oksidazlar ve peroksidazlardaki heme'ler ise süperoksit üretimi ve elektron transferinde kilit rol oynar (Chrissobolis & Faraci, 2008; Everse & Coates, 2009). Heme içeren oksidazlar mitokondriyal olmayan NADPH oksidaz ve siklooksijenazların yanı sıra mitokondriyal süksinat dehidrojenaz (Kompleks II) ve sitokrom c oksidazı (Kompleks IV) içerir. Tüm bu moleküller başlıca süperoksit ve ROS kaynaklarıdır (Chrissobolis & Faraci, 2008). Öte yandan, heme içeren peroksidazlar H_2O_2 ile büyük biyomoleküller arasındaki reaksiyonları katalize ederek bunların hasar görmesine yol açar (Everse & Coates, 2009). HO-1, heme'yi parçalayarak süperoksit ve diğer ROS'larda net bir azalma yoluyla hücreleri koruyabilir.

2.5.1. Heme oksijenaz-1

HO-1, 1980'lerin ortalarında yapılan araştırmalarda, 32 kDa'lık bir şok proteini (heat shock protein 32, Hsp32) olarak tanımlanmıştır. İnsan HO-1 proteini 288 amino asitten oluşmakla birlikte, sıçan HO-1 proteini ile yaklaşık %80 oranında amino asit benzerliği göstermektedir (Waza vd., 2018). İnsanlarda heme'nin yaklaşık %80'i eritrositlerde, %15'i karaciğerde ve %5'i diğer dokulardaki eritroid olmayan hücrelerde yer almaktadır (Vijayan vd., 2018). HO-1 düz endoplazmik retikulum (DER) ile ilişkilidir, fakat aynı zamanda mitokondri çekirdeği ve kaveollerde de lokalizedir (Waza vd., 2018; Ryter, 2021).

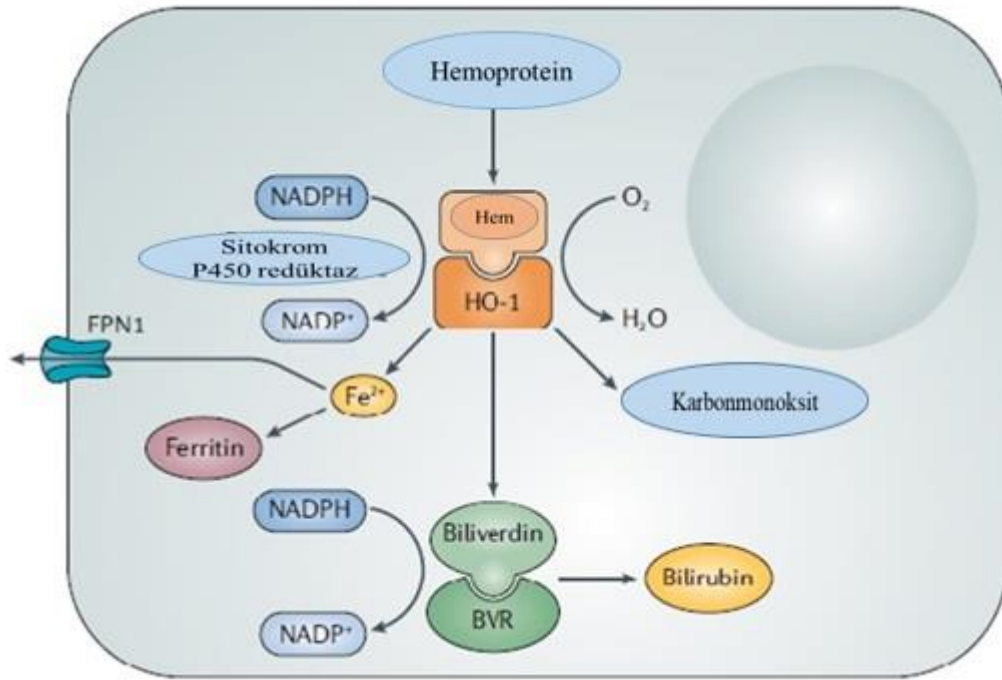
Eritrositlerdeki heme, dalak ve karaciğerin retikuloendotelial sistemi tarafından geri dönüştürülmektedir (Vijayan vd., 2018). Enzimatik heme degradasyonu, üç molekül moleküler oksijen (O_2) ve NADPH sitokrom P450 redüktazdan sağlanan elektronların varlığını gerektirir. HO reaksiyonu sırasında üretilen biliverdin (BV), NAD(P)H ve BV redüktaz aracılığıyla indirgenerek lipidde çözünebilir bir safra pigmenti olan bilirubin (BR)'i oluşturur (Ryter, 2021) (Şekil 2.9).

HO-1'in ekspresyon düzeyleri ve aktivitesindeki değişiklikler terapötik açıdan önemli potansiyel faydalar sağlayabilir (Waza vd., 2018). HO-1'in mitokondriye translokasyonunun artması, epitelyal hücreleri mitokondriye bağlı hücre ölümüne karşı korur (Waza vd., 2018; Ryter, 2021). Ayrıca bu protein OS, UV-A, ağır metaller ve diğer kimyasal veya fiziksel hücresel stres türleri gibi çeşitli uyaranlarla indüklenebilir (Waza vd., 2018).

HO-1'in sistemik homeostaz ve Fe dengesindeki önemi, genetik olarak HO-1 eksikliği taşıyan fare modellerinin hem oksijenaz 1 geni (*Hmox1* $-/-$) incelenmesiyle ortaya konulmuştur (Ryter, 2021). Bu fareler, hepatik ve renal Fe birikimi ve anemi dahil olmak üzere anormal sistemik Fe metabolizması ile karakterize edilmiştir. Dahası bu fareler ve bu

farelerden türetilen endotel hücrelerin OS'ye karşı oldukça duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Makrofaj inflamatuvar yanıtı üzerine yapılan öncü çalışmalar, HO-1'in aktive edilmiş makrofajlarda Toll-benzeri reseptör-4 (TLR4) aracılığıyla gerçekleşen proinflamatuvar sitokin üretimini sınırlayabilen bir antiinflamatuvar mediatör olduğunu ortaya koymuştur. Sonraki çalışmalar, HO-1'in p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) aktivitesinin modülasyonu da dahil olmak üzere çeşitli moleküler mekanizmalar yoluyla inflamasyonu hafifletmede çok yönlü (pleiotropik) roller üstlenebileceğini göstermiştir. Ayrıca, diğer öncü çalışmalar HO-1'in TNF ile indüklenen endotel hücre apoptozunu engelleyen bir antagonist olarak da işlev gördüğünü ortaya koymuştur (Ryter, 2021).

Heme'nin, lipopolisakkarit ve sigara dumanına maruz kalan akciğer epitel hücrelerinde mitokondriyal HO-1 fraksiyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Waza vd., 2018, Duvigneau vd., 2019; Ryter, 2021).



Şekil 2. 9. HO-1 ve heme katabolizması (Kaynak: Campbell vd., 2021)

HO-1, çoğu hücre tipinde ve dokuda çok sayıda uyaran ve yaralanma tarafından yukarı düzenlenir ve fizyolojik homeostazı geri kazandırarak yararlı etkiler sağlar. Özellikle, HO-1, mononükleer fagosit sisteminin önemli bir hücre popülasyonu olan makrofajlarda kritik

immüno-modülatör işlevler sergiler. HO reaksiyonu için heme kaynağı, hemoglobin ve hücrel hemoproteinlerin dönüşümünden elde edilir (Vijayan vd., 2018).

HO aktivitesinden salınan Fe, ferritin depoları tarafından dengelenirken, serbest haldeki Fe, serbest radikal üreten reaksiyonları katalize ederek doku hasarını artırabilir. HO aktivitesinden açığa çıkan CO ise vasküler fonksiyon, bağışıklık yanıtı, inflamasyon, apoptoz ve hücrel proliferasyon gibi süreçleri düzenleyerek hücrel işlevleri kontrol edebilir (Ryter, 2021).

Fizyolojik koşullarda, HO enziminin en yüksek aktivitesi, yaşlanan eritrositlerin yok edilmesinde görev alan hücrelerde ve dokularda görülür (Vijayan vd., 2018; Duvigneau vd., 2019). Hemoliz sırasında serbest kalan bağlanmamış heme, vasküler endotel için OS oluşturarak zararlı bir tehdit oluşturabilir ve inflamatuvar reaksiyonları tetikleyebilir. Buna karşılık, HO aktivitesi sonucu üretilen BV, BV redüktaz enzimi tarafından BR'ye dönüştürülür (Vijayan vd., 2018; Waza vd., 2018; Ryter, 2021; Pisoschi vd., 2021; Kishi vd., 2023). BR, güçlü antioksidan özelliklere sahiptir ve özellikle dolaşımdaki BR'nin kardiyovasküler hastalık riskini azaltıcı bir etkisi olabileceği düşünülmektedir (Ryter, 2021).

Hayati bir metabolik enzim olan HO-1, memelilerde stres tepkisinin merkezi bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (Waza vd., 2018; Ryter, 2021). Heme, genellikle OS kaynağı olarak bilinse de aynı zamanda önemli bir sinyal molekülü olarak da işlev görür. Heme, antioksidan savunma mekanizmalarını, sirkadiyen ritimleri, iyon kanallarının aktivitesini, glikoz metabolizmasını, eritropoezi (kırmızı kan hücresi üretimi) ve makrofaj fonksiyonlarını düzenler. Bu geniş biyolojik etkiler, heme'nin transkripsiyon faktörlerinden enzimlere kadar birçok proteinle etkileşiminden kaynaklanır. Ayrıca, heme'nin HO-1 tarafından parçalanması, heme aracılı yolların modülasyonu yoluyla hücrel süreçleri etkileme potansiyeline sahiptir (Duvigneau vd., 2019).

2.5.1.1. HO-1'in moleküler düzenlenmesi

HO-1, heme'in parçalanmasını sağlayan ve OS ile mücadelede önemli bir rol oynayan bir enzimdir. HO-1 ekspresyonu heme, ROS, NO, ağır metaller, UVA ve doğal antioksidanlar gibi çeşitli kimyasal ve fiziksel uyarılarla indüklenir. Bu süreç, genellikle HMOX1 geninin transkripsiyonel düzenlenmesiyle gerçekleşir. HO-1'in düzenlenmesinde, Nrf2 ve Bach-1 gibi transkripsiyon faktörleri kritik rol oynar. Nrf2, HO-1 ekspresyonunu artırırken, Bach-1 bu ekspresyonu baskılar. Heme, Bach-1'in aktivitesini inhibe ederek HO-1 ekspresyonunu destekler (Ryter,2021).

HO-1'in düzenlenmesi yalnızca transkripsiyonel düzeyde değil, aynı zamanda transkripsiyon sonrası mekanizmalarla da gerçekleşir. MikroRNA'lar (miR'ler), HO-1'in mRNA stabilitesini ve translasyonunu etkileyerek bu düzenlemede önemli bir rol oynar. Örneğin, bazı miR'ler HO-1 ekspresyonunu artırırken diğerleri bu ekspresyonu baskılar. Ayrıca, miR'ler Nrf2 ve Keap1 gibi HO-1'in yukarı akış düzenleyicilerini de etkileyebilir.

HMOX1 genindeki genetik varyasyonlar, HO-1 ekspresyonunu ve dolayısıyla bireylerin OS'ye karşı duyarlılığını etkileyebilir. Özellikle, HMOX1 geninin promotör bölgesindeki (GT)_n polimorfizmleri, HO-1 ekspresyonunu azaltarak kardiyovasküler hastalıklar, KOAH, diyabet ve diğer OS ile ilişkili hastalıklara yatkınlığı artırabilir. Sonuç olarak, HO-1'in düzenlenmesi, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası mekanizmalar, genetik varyasyonlar ve çevresel uyaranların karmaşık bir etkileşimiyle gerçekleşir. Bu düzenleme, OS ile ilişkili hastalıkların gelişiminde ve tedavisinde önemli bir rol oynar. Ancak, bu ilişkilerin daha iyi anlaşılması için ek araştırmalara ihtiyaç vardır (Ryter, 2021)

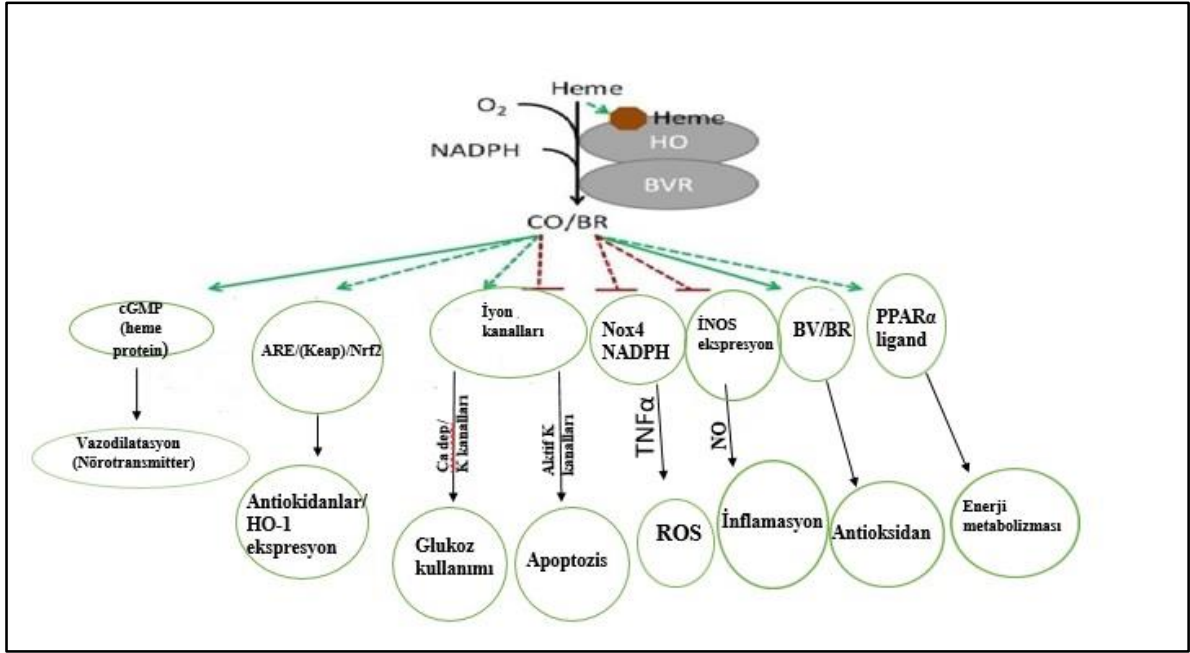
2.5.1.2. HO-1'in hücrel savunmadaki rolü

Fizyolojik koşullarda, HO-1 çoğu dokuda düşük seviyelerde ifade edilir. Ancak, yaşlanan eritrositlerin uzaklaştırıldığı ve yüksek miktarda heme ile mücadele eden retiküloendotelial sistem hücrelerinde HO-1 seviyesi yüksektir. Bunun yanı sıra, hipoksi, iskemi/reperfüzyon, ağır metal maruziyeti, mantar toksinleri, inflamatuvar ajanlar ve UV gibi stresli durumlar HO-1'in hızla indüklenmesine neden olur. Araştırmalar, HO'nun yüksek enzimatik aktivitesinin hücre koruyucu etkiler için temel bir gereklilik olduğunu göstermektedir.

HO-1'in koruyucu etkileri iki ana mekanizma ile gerçekleşir. Birincisi, ROS oluşumunu katalize edebilen heme'nin uzaklaştırılmasıdır. Bu mekanizma, özellikle yüksek hemoliz koşullarında endotelin korunmasına önemli ölçüde katkıda bulunur. İkincisi ise, HO-1 aktivitesiyle üretilen BV, BR ve CO gibi ürünlerin antioksidan ve hücre koruyucu özellikler göstermesidir.

BV ve BR, önemli endojen antioksidanlar olarak kabul edilir. Ancak, BR/BV'nin BV redüktaz aracılı redoks döngüsünün hücrel antioksidan savunmada daha az önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Bununla birlikte, BR'nin bağışıklık sistemini düzenleyici etkileri ve hücre koruyucu özellikleri birçok çalışmada gösterilmiştir (Longhi vd.,2017; Valaskova vd., 2019). Ayrıca, BR'nin peroksisom proliferatör aktiveli reseptör (PPAR) α aracılığıyla gen düzenleyici bir rol oynadığı ve lipid birikimini baskıladığı bulunmuştur

(Gordon vd., 2019). PPAR α , enerji depolama, lipid ve yağ asidi dengesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. BR'nin bu etkileri, lipotoksisteyi önlemede ve glikoz metabolizmasını düzenlemede önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Bu bulgular, BR'nin yalnızca bir metabolik atık değil aynı zamanda metabolik bir sinyal molekülü olarak işlev gördüğünü ortaya koymaktadır (Duvigneau vd., 2019) (Şekil 2.10).



Şekil 2. 10. Heme metabolizmasının hücresel düzenlenmesi ve HO-1'in koruyucu etkileri
(Kaynak: Duvigneau vd., 2019)

Son yıllarda, HO reaksiyonunun hücre koruyucu özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve farklı bağlamlarda açıklığa kavuşturulmuştur. Ancak, HO'nun aşırı aktivitesi ve buna bağlı olarak artan ürün oluşumu olumsuz etkilere de yol açabilir (Duvigneau vd., 2019; Ryter, 2021).

HO'nun aşırı aktivitesi, serbest feröz Fe birikimi ve ROS oluşumu gibi zararlı etkilere yol açabilir. Serbest Fe, pro-oksidatif özelliklere sahiptir ve hücrelerin bu durumu dengelemek için yeterli Fe şelatlama kapasitesine ihtiyaç duyar. Ayrıca, HO'nun artan aktivitesi, hücresel antioksidan savunma için kritik olan NADPH'nin tüketimini artırır. NADPH, glutasyon peroksidaz gibi enzimlerin işlevi için gereklidir ve hipoksi gibi durumlarda NADPH'nin yenilenmesini sağlayan pentoz fosfat yolunun baskılanması, OS'ye karşı duyarlılığı artırabilir (Duvigneau vd., 2019).

Artan HO aktivitesi, hücre içi serbest Fe havuzunu genişleterek ROS oluşumunu tetikler. Bu durum, ferritin gibi Fe depolama mekanizmalarını uyarabilir ancak sürekli HO aşırı ekspresyonu, Fe aşırı yüklenmesine ve oksidatif hasar riskine neden olabilir. Şiddetli inflamasyon ve hipoksi gibi durumlarda, ferritin ve diğer Fe depolarından serbest Fe salınımı OS'yi artırarak doku hasarına yol açabilir. Bu tür durumlarda, Fe şelatörleri (örneğin, desferrioksamin) serbest Fe etkisiz hale getirerek hasarı azaltabilir (Duvigneau vd., 2019).

HO'nun etkileri yalnızca reaksiyon ürünleriyle sınırlı değildir; heme'nin bozunumu yoluyla da hücrel süreçleri etkiler. Artan HO aktivitesi, hücre içi heme seviyelerini azaltarak sitokrom P450 gibi heme proteinlerinin seviyelerini düşürebilir. Heme seviyelerinin düşmesi, heme kaynaklı ROS oluşumunu sınırlayarak antioksidatif bir savunma mekanizması olarak faydalı kabul edilir. Ancak heme, gen ekspresyonu, hücre çoğalması ve farklılaşması gibi birçok temel süreci düzenleyen önemli bir moleküldür. Bu nedenle, HO'nun heme seviyelerini azaltması, bu düzenleyici yolları da etkileyebilir. Heme'nin pro-oksidan ve sinyal molekülü olarak oynadığı roller HO'nun hücrel etkilerinin daha iyi anlaşılması için kritik öneme sahiptir (Duvigneau vd., 2019).

2.5.1.3. Düzenlenmiş hücre ölümü (RCD) programlarının modülatörü olarak HO-1

Apoptosis modülatörü olarak HO-1

Apoptozis, Tip 1 programlanmış hücre ölümü (PCD) olarak bilinen klasik bir düzenlenmiş hücre ölümü (RCD) programıdır ve ilk olarak *C. elegans*'ta keşfedilmiştir. Apoptozis, organların büyümesi ve gelişimi ile dokuların zararlı uyarılara (örneğin, ksenobiyotikler veya olumsuz çevre koşulları) verdiği tepkilerde temel homeostatik işlevler sağlar. Apoptozisin bozulması tümör oluşumuna veya otoimmün hastalıklara yol açabilirken, aşırı apoptozis organ yetmezliğine neden olabilir (Galluzi vd., 2007).

HO-1'in apoptozis üzerindeki etkileri, fibroblastlarda HO-1 aşırı ekspresyonunun antiapoptotik bir etki göstermesiyle kanıtlanmıştır (Petrache vd.,2000). HO-1'in reaksiyon ürünü olan CO, fare fibroblastlarında ve endotel hücrelerinde tümör nekroz faktörü- α (TNF α) ile başlatılan apoptozu engellemiştir. CO'nun bu antiapoptotik etkisi, p38 MAPK yolu ve NF- κ B'nin aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Brouard vd., 2000; Brouard vd., 2002). Ayrıca, vasküler düz kas hücrelerinde CO, çözünür guanilat siklazın (sGC) aktivasyonuna bağlı olarak sitokin kaynaklı apoptozu inhibe etmiştir (Liu vd., 2003). Bu bulgular, HO-1'in apoptozisi düzenleyerek homeostatik bir işlev sağladığını göstermektedir.

HO-1 ve piroptosis arasındaki ilişki

Piroptosis, makrofajlar gibi inflammatuar hücrelerde meydana gelen ve kaspaz-1 aktivasyonunu gerektiren inflamasyonla ilişkili bir PCD'dir. Bu süreç, inflamazom aktivasyonu sırasında gerçekleşir ve hücrelerin proinflammatuar sitokinler salarak yırtılmasına neden olur. Akut inflamasyon sırasında piroptosis, enfekte makrofajların ortadan kaldırılması yoluyla enfeksiyonu sınırlayan bir savunma mekanizmasıdır. Ancak, kronik inflamasyonda piroptosisin aşırı aktivasyonu doku hasarına ve patojenik süreçlere yol açabilir (Jorgensen & Miao, 2015).

Nrf2/HO-1 yolunun aktivasyonu, piroptosisi inhibe eden bir mekanizma olarak tanımlanmıştır. HO-1'in piroptoz üzerindeki düzenleyici mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte muhtemelen inflamazom aktivasyonunun modülasyonu yoluyla etki göstermektedir. Liu vd. (2023)'lerinin yaptığı çalışmada, H₂O₂ ile indüklenen RSC96 hücrelerinde HO-1 aktivatörü kobalt protoporfirin (CoPP) uygulaması sonrası Nod benzeri reseptör pyrin alanı içeren 3 (NLRP3), Gasdermin D (GSDMD) ve kaspaz-1 ekspresyonlarında anlamlı bir azalma gözlenirken, HO-1 inhibitörü çinko protoporfirin (ZnPP) uygulaması sonrasında piroptoz ile ilişkili bu proteinlerin ekspresyonlarında artış saptanmıştır. Ayrıca, HO-1'in aktivasyonu IL-1 β ve IL-18 gibi inflammatuar sitokinlerin salınımını da baskılamıştır. Bu bulgular, HO-1'in inflamazom aktivasyonunu ve buna bağlı piroptotik hücre ölümünü düzenleyici rolünü göstermektedir (Liu vd., 2023a). Benzer şekilde, Nrf2/HO-1'in piroptosisi baskıladığı, akciğer iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı ve hemorajik şok modellerinde de gösterilmiştir (Fei vd., 2020). Bu bulgular, HO-1'in inflammatuar hücre ölümünü inhibe edebileceğini ancak mekanizmaların daha fazla araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

HO-1 ve nekroptoz arasındaki ilişki

Nekroptoz, genetik olarak düzenlenen bir nekrotik hücre ölümü biçimidir ve organel şişmesi, plazma membranı yırtılması ile hücre lizisi gibi morfolojik özellikler gösterir. Nekroptoz yolu, ölüm reseptör ligandları ile hücrel uyarım dahil olmak üzere çeşitli sinyallere yanıt verir. Nekroptoz, reseptörle etkileşime giren protein kinazlar-1 ve -3 (RIPK1, RIPK3) ve kanonik yolda düzenleyici bir "nekrozom" kompleksi oluşturmak üzere oligomerize olan mixed-lineage kinaz domain-benzeri psödokinaz (MLKL) tarafından

düzenlenir (Chen vd., 2019). MLKL'nin RIPK3 tarafından fosforilasyonu, nekroptoz aktivasyonundaki birincil olaydır.

HO-1, hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümüne karşı sitoprotektif bir rol oynayabilir. Ancak bugüne kadar yalnızca birkaç çalışma HO-1 ile nekroptoz arasındaki ilişkiyi hücrel ve yaralanma modellerinde incelemiştir. Serbest heme, merkezi Fe şelatı yoluyla pro-oksidan olarak hareket edebilen bir sitotoksik ajandır. Hemoglobinden salınan heme, membran hasarına neden olarak damar sisteminin endotel hücrelerine zarar verebilir. Heme'nin pro-inflamatuar etkileri sepsis ve sıtmanın patogeneğinde rol oynar. *In vitro* deneyler, makrofajların heme tedavisinin nekroz tipi hücre ölümüne neden olabileceğini göstermiştir. Serbest heme'nin pro-oksidan özellikleriyle hücre hasarına neden olabileceği ve makrofajlarda nekroz benzeri hücre ölümüne yol açtığı ve bu sürecin TLR4 aracılı TNF üretimi ve ROS artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca antioksidanlar, JNK inhibitörleri ve RIPK1 inhibitörlerinin bu süreci engellediği de bildirilmiştir (Fortes vd., 2012).

Yüksek yağlı diyetle indüklenen hepatosteatoz modelinde, RIPK3 eksikliğinin OS'yi ve inflamasyonu azalttığı, Nrf2/HO-1 sistemini aktive ederek karaciğer hasarını iyileştirdiği gösterilmiştir (Chenxu vd., 2019). Kolorektal kanser metastaz modelinde ise, iskemi-reperfüzyon (I/R) sonrasında RIPK3'ün etkisi farklı görünmektedir. RIPK3, Kupffer hücrelerinin ölümüne ve metastazın artmasına neden olurken, makrofajlarda TNF ve HO-1 üretimini artırarak immünoşüpresif bir etki yaratmaktadır. TNF'nin azalması tümör büyümesini artırırken, HO-1'in inhibisyonu veya eksikliği tam tersine makrofajların bağışıklık baskılayıcı etkisini ortadan kaldırarak tümör ilerlemesini azaltmaktadır. Ayrıca, RIPK3 eksikliği HO-1 seviyelerini düşürerek bağışıklık hücrelerinin bölgeye toplanmasını ve tümör büyümesini engellemektedir (Germanova vd., 2021). Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, HO-1 ve RIPK3 aracılı nekroptoz arasında düzenleyici bir etkileşim olduğu ve RIPK3'ün uzaklaştırılmasının, HO-1'in hücre koruyucu etkisini göstermesinde önemli bir mekanizma olabileceği anlaşılmaktadır.

HO-1 ve ferroptoz arasındaki ilişki

Ferroptozis, otofaji, apoptozis ve nekroptozis de dahil olmak üzere nekroz benzeri RCD'nin diğer formlarından farklı olan ve inflamasyonun yayılmasında rol oynayan nekrotik hücre ölümünün benzersiz bir Fe bağımlı nekrotik formu olarak tanımlanır (Dixon vd., 2012; Sun vd., 2020). Ferroptozun morfolojik olarak farklı özellikleri arasında mitokondriyal

büzülme ve artmış mitokondriyal membran yoğunluğu bulunur (Dixon vd., 2012). Ferroptoz, GPX4 aktivitesinin azalması ve Fe birikimi ile tetiklenir. HO-1, ferroptozda hem koruyucu hem de tetikleyici bir rol oynayabilir.

HO-1, mitokondriyal fonksiyonun korunması yoluyla ferroptozu baskılayabilirken, serbest Fe salınımı yoluyla ferroptozu tetikleyebilir. Örneğin, HO-1'in inhibisyonu, doksorubisin kaynaklı kardiyomiyopati modellerinde koruyucu bir etki göstermiştir (Fang vd., 2019). Ancak, HO-1'in kanser hücrelerinde ferroptozu teşvik ettiği ve bu sürecin HO-1 inhibitörleriyle engellenebildiği de bulunmuştur (Kwon vd., 2015).

Bazı çalışmalarda, HO-1'in ferroptozu karşı koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir. Kurkumin adlı antioksidan madde böbrekte HO-1'i aktive ederek ve ferroptoz sürecini baskılayarak rabdomiyolize bağlı böbrek hasarını azaltmaktadır (Guerrero-Hue vd., 2019). Ayrıca laboratuvar çalışmaları ile, HO-1 geni olmayan böbrek hücrelerinin erastin kaynaklı ferroptozu karşı daha hassas olduğu gösterilmiştir (Adedoyin vd., 2018). Bu bulgular, HO-1'in ferroptoz sürecindeki rolünün karmaşık olduğunu ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır.

Terapötik uygulamalar için hedef olarak makrofajlardaki heme-HO-1 sistemi

Makrofajlar, fagosit edilmiş yaşlanmış eritrositlerden heme/heme Fe'nin geri dönüşümünde veya hemolizden kaynaklanan fazla heme alımında rol oynar. Memelilerde HO-1 eksikliğinin eritrofagositoz yapan makrofajların aktivitesini ve dalak, karaciğer ve böbrek hasarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Duvigneau vd., 2019). Makrofajlar, bulundukları dokuya özgü görevlerinin yanında, bağışıklık sisteminin dengesini düzenleyen önemli hücrelerdir. M1 tipi makrofajlar olarak bilinen bu hücreler pro-inflamatuar sitokinler ve ROS üreterek yangısal yanıtı tetiklerler. Plazmadaki serbest heme, düşük yoğunluklu lipoproteini oksitleyebilir, endotelial hücrelere zarar verebilir, aşırı immün stimülasyonuna ve heme işleyen makrofajların ölüm oranının artmasına yol açabilir. Heme, sıklıkla bahsedilen bir OS oluşturucu olmasının yanı sıra, bir sinyal molekülü olarak da önemli bir rol oynar (Duvigneau vd., 2019; Ryter, 2021).

Heme, antioksidatif savunmayı, sirkadiyen ritimleri, iyon kanallarının aktivitesini, glikoz kullanımını, eritropoezi ve makrofaj fonksiyonunu düzenler. Metabolik sendromda, HO-1'in adiposit proliferasyonunu inhibe eden ve makrofajları inflamatuvar bir profile yönlendiren ROS üretimini artırarak mitokondriyal solunumu modüle ettiği bilinmektedir. Metabolizmayı çevresel koşullara uyarlama yeteneği, makrofajlar için kritik bir rol oynar ve

bu hücrelerin farklı işlevleri yerine getirmesine olanak tanır (Duvigneau vd., 2019). Enflamasyon ve OS, ateroskleroz ve Alzheimer hastalığı gibi kardiyovasküler veya nörolojik bozukluklar da olmak üzere pek çok sayıda patolojik durumun patogeneğinde kritik bir rol oynamaktadır (Waza vd, 2018; Vijayan vd., 2018).

HO-1 hiperaktivitesi, mitokondriyal ilişkili transferrin dışı Fe tutulumunu ve makrotofajiyi teşvik ederek Parkinson, Alzheimer ve diğer nörodegeneratif hastalıklarda görülen biyoenerjetik başarısızlığa ve patolojik Fe birikimine yol açar. Bu durum, hücresel işlevlerin bozulmasına ve çeşitli nörolojik sorunların gelişmesine katkıda bulunabilir (Waza vd., 2018).

Şimdiye kadar HO-1'in tedavi potansiyeli ve klinik uygulamaları konusunda önemli gelişmeler kaydedilmektedir. HO-1'in sitoprotektif etkilerinin ortaya çıkması için sıkı bir düzenleme gerektirdiği anlaşılmış ve bu proteinin, inflamatuvar ve diğer hastalıkların tedavisinde umut verici bir hedef olduğu bildirilmiştir (Ryter & Choi, 2016). Araştırmacılar doğal antioksidanlarla ön koşullandırma (Singh vd., 2020), Hmox1 gen terapisi (Abraham vd. 2007), HO aktivitesi son ürünlerinin kullanımı ve özellikle CO bazlı tedaviler (Otterbein vd., 2003; Ryter & Choi, 2016) gibi çeşitli tedavi stratejileri geliştirmişlerdir. CO tedavileri, doğrudan gaz uygulaması veya geçiş metali içeren CO salgılayan moleküller ve organik CO donörleri gibi kimyasal bileşikler şeklinde uygulanabilmektedir (Ryter, 2021). Ancak HO-1'in terapötik potansiyelinin tam olarak kullanılabilmesi için, otofaji, piroptoz, nekroptoz ve ferroptoz gibi hücre ölüm mekanizmalarıyla olan karmaşık ilişkisinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Çünkü bu süreçlerin her biri hastalıkların ilerlemesinde farklı roller oynayabilmekte ve HO-1'in bu süreçler üzerindeki etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bazı mekanizmaların (örneğin otofaji ve nekroptoz) hem koruyucu hem de zararlı etkilere sahip olabileceği gerçeği, bu alandaki araştırmaların önemini daha da artırmaktadır (Ryter, 2021).

2.6. Bitki Etken Maddeleri: Terpenoidler

İnsanlık tarihi boyunca bitkiler, medeniyetlerin başlangıcından itibaren tüm kültürlerde çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde önemli bir kaynak olarak kullanılmıştır. Bu bitkiler, etki güçleri hafiften şiddetliye kadar değişen önemli bir ekzojen antioksidan kaynağı oluştururlar. Bu doğal antioksidanlar vücutta çeşitli mekanizmalarla etki gösterirler:

- İndirgeyici ajan olarak görev yaparlar,
- Serbest radikalleri temizlerler,

- Tekli oksijen oluşumunu engellerler,
- Pro-oksidan metalleri etkisiz hale getirirler,
- Lokal oksijen konsantrasyonunu düşürürler,
- Vücudun doğal antioksidan savunma sistemlerini güçlendirirler,
- Hücrel onarım sistemlerindeki hasarı önlerler.

Bu mekanizmaların birçoğu aynı anda çalışabildiği gibi farklı kombinasyonlarda da etki gösterebilirler. Bitkilerin en önemli özelliklerinden biri vücuttaki oksidan-antioksidan dengesinin korunmasına yardımcı olarak OS'ye karşı koruma sağlamalarıdır. Bu denge, sağlıklı bir metabolizma için hayati öneme sahiptir ve bitkilerin doğal antioksidan özellikleri sayesinde korunabilmektedir (Salehi vd., 2020).

ROS, yaklaşık 2,7 milyar yıl önce moleküler oksijenin dünya atmosferine girişinden bu yana aerobik yaşamın kaçınılmaz bir parçası olmuştur. Normal fizyolojik koşullar altında, vücuttaki çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları ROS moleküllerini etkisiz hale getirmektedir. Bitkilerin antioksidan özellikleri özellikle dikkat çekicidir, çünkü artan OS'nin yaşlanma sürecinde ve nörodejeneratif hastalıklar ile kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi yaşamı tehdit eden birçok hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Bitkiler, yüksek oksijen seviyelerine maruz kalan fizyolojileri nedeniyle olağanüstü antioksidan özellikler geliştirmişlerdir. İnsanlara kıyasla daha fazla ROS üretim alanına sahip olan bitkiler, bu duruma adaptasyon sağlamak için daha gelişmiş enzimatik olmayan antioksidan sistemler geliştirmişlerdir. Bitkiler, yapılarında çeşitli doğal antioksidanlar barındırır ve bu antioksidanlar bileşimleri, fizikokimyasal özellikleri, bulundukları yerler ve etki mekanizmaları açısından farklılıklar gösterir.

Antioksidan etki gösteren fitokimyasallar genel olarak alkaloid, karotenoid, kumarin, flavonoid, fenolik ve terpenoid grupları ve diğer organik bileşikler olarak sınıflandırılır. Bu bileşikler, hidroksil radikalleri, peroksil radikalleri, hipokloröz asitler, süperoksit anyonları ve peroksinitrit gibi çeşitli ROS türlerini etkisiz hale getirerek koruyucu etki gösterirler (Salehi vd., 2020).

Terpenoidler, bitkilerde bulunan en büyük ikincil metabolit gruplarından biridir. Günümüzde 90.000'den fazla terpenoid tanımlanmış olup, bunların çoğu tıbbi bitkilerde ikincil metabolit olarak bulunmaktadır. Terpenoidler, $(C_5H_8)_n$ genel formülüne sahip izopren ünitelerinden oluşur ve karbon sayılarına göre monoterpenoidler (C_{10}), seskiterpenoidler (C_{15}), diterpenoidler (C_{20}) ve triterpenoidler (C_{30}) olarak sınıflandırılır (Lu vd., 2023). Terpenoidlerin, antioksidan, antialerjik, antimikrobiyal, anti-inflamatuar,

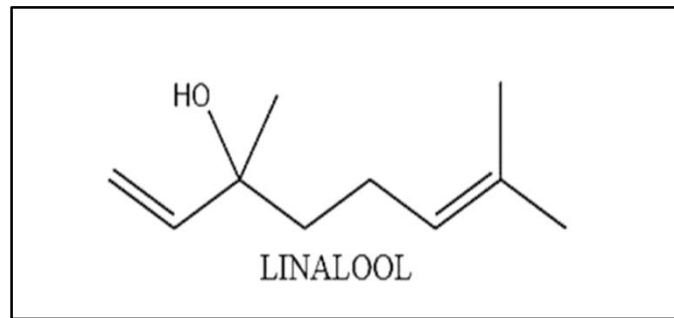
antikanser, antimetastatik, antianjiyogenez ve apoptoz indüksiyonu gibi farklı biyolojik aktiviteleri sergileyerek, çeşitli tedavi alanlarında önemli potansiyellere sahip olduğu rapor edilmiştir (Camara vd., 2024).

Esansiyel yağların temel bileşeni olan monoterpenlerden apoptozu tetikleyenler, 1,8-sineol, α -tuyon, bornil asetat, β -pinen, karvon, limonen ve timokinon; apoptoz ve tümör inhibisyonunu tetikleyenler, α -pinen, borneol, kamphen, karvakrol, sitral, sitronellol, geraniol ve geranil asetat, LN, perillil alkol, perillaldehit 8,9-epoksit ve dehidroperillik asit, terpineol, timol; diğer antitümör mekanizmalarını ve *in vivo* olarak tümör inhibisyonunu tetikleyenler ise kuminaldehit, fenchone, mersin; ve son olarak *in vitro* koşullarda diğer antitümör mekanizmalarını tetikleyen monoterpenler ise α -fellandren, simen ve rotundifolon olarak rapor edilmiştir (Machado vd., 2022).

2.6.1. Linalool

En çok araştırılan monoterpenlerden ikisi, çeşitli kanser türlerinde *in vitro* ve *in vivo* tümör inhibisyonu açısından oldukça önemli olan karvakrol ve LN'dir. Bu doğal bileşiklerin etki mekanizmaları, apoptoz, hücre döngüsü bozukluğu, ROS üretimi, otofaji, nekroptoz ve diğer süreçler gibi geniş bir yelpazeyi kapsamaktadır (Machado vd., 2022).

LN, çeşitli aromatik bitki türlerinde bulunan bir monoterpen alkoldür (Şekil 2.11). LN içeren en baskın bitki aileleri Lamiaceae, Lauraceae ve Apiaceae'dir (Davoodi vd., 2024). LN (3,7-dimetil-1,6-oktadien-3-ol), aromatik bitkilerde bulunan ve antioksidan, antidepresan ve anti-anksiyete özellikleri sergileyen bir monoterpendir (Chang vd., 2024).



Şekil 2. 11. LN'nin kimyasal yapısı

Doğal LN, iki çift bağ ve asimetric karbon atomları sayesinde genellikle iki izomerik formda bulunur: sola dönen izomer ((S)-(+)-LN) ve sağa dönen izomer ((R)-(-)-LN) (Zhang vd., 2023; Taratynova vd., 2024). (S)-(+)-LN çoğunlukla linal yağı, lavanta yağı (Nishimura

vd., 2024), bergamot yağı ve gül yağında bulunurken, (R)-(-)-LN çoğunlukla tatlı portakal yağı, hindistan cevizi yağı ve kişniş yağında (Nishimura vd., 2024) bulunur. (S)-(+)-LN tipi tablo 2.1' de belirtilen özelliklere sahip olup, (R)-(-)-LN formundan kabaca dokuz kat daha güçlü bir kokuya sahiptir.

Tablo 2. 1. *LN'nin özellikleri (Kaynak: Soulimani & Joshi, 2020)*

SN	Parametreler	Değerler
1	Moleküler formül	C ₁₀ H ₁₈ O
2	Eş anlamlılar	Linalol, Linalil alkol, Linalil Oksit, p-linalool, allo-osimenol, (RS)-linalool
3	Molekül ağırlığı	154,25 gr/mol
4	Kaynama noktası	194-197°C
5	Alevlenme noktası	78°C
6	Erime Noktası	<25°C
7	Çözünürlük	25 °C'de 1,59 mg/mL
8	LogP	2,65-2,68

LN üretimi için iki ana endüstriyel yöntem bulunmaktadır (Zhang vd., 2023). Bunlardan ilki, LN içeren esansiyel yağlar, örneğin lavanta yağı ve gül yağı kullanarak LN ayrıştırılmasıdır. İkinci yöntem ise kimyasal sentez yoluyla elde edilmesidir (Santos vd., 2022; Zhang vd., 2023). Bu yöntem temelde iki ana yola sahiptir: bunlardan biri α -pinen veya β -pinen'in redoks ve dönüşüm reaksiyonlarıyla işlenmesi diğeri ise dehidrolinalool oluşturmak için sodyum asetilen ve 6-metil-5-hepten-2-on'un yoğunlaştırılmasıdır (Zhang vd., 2023). Bu yöntemler, LN üretimini farklı endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir hale getirir (Santos vd., 2022; Zhang vd., 2023).

Moleküler biyoloji teknikleri sayesinde LN, mikroorganizmalar tarafından da üretilir. Örneğin, *Escherichia coli* suşları, mevalonat öncülünü yüksek miktarda üreterek (3R)-(-)- LN üretme yeteneğine sahip olmuştur. Ayrıca, *Streptomyces clavuligerus*'tan elde

edilen bakteriyel LN/nerolidol sentaz (bLinS) enzimi kullanılarak, LN 500 mg/L'ye kadar olan konsantrasyonlarda üretilebilmektedir (Maczka vd., 2022).

2.6.1.1. LN'nin biyolojik özellikleri ve etki mekanizmaları

Genel özellikler ve doğal kaynakları

LN, çeşitli tıbbi ve aromatik bitkilerde bulunan önemli bir bileşiktir. Kişniş, gül ağacı, fesleğen, nane, zencefil, defne, kekik, adaçayı, küçük hindistan cevizi ve tarçın gibi birçok bitkide aktif bileşen olarak yer alır (Ola vd., 2021; Guo vd., 2021; Maczka vd., 2022). Özellikle *Aniba rosaeodora* Ducke (%90 LN), *Cinnamomum camphora* (%58-92 LN) ve *Cinnamomum osmophloeum* (%90 LN) gibi bitkiler önemli LN kaynaklarıdır (Singh & Mishra, 2024) (Tablo 2.2).

Tablo 2. 2. LN'nin kaynakları, coğrafi kökenleri ve endüstriyel uygulamaları (Kaynak: Singh & Mishra, 2024)

S.N.	Bitki Türü	Botanik Adı	Menşei	LN İçeriği	Endüstriyel Uygulamalar
1	Gül ağacı	<i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	Brezilya'nın Amazon bölgesi, Guyana, Surinam vb.	Yüksek (%90)	Kozmetik, aromatik
2	Macacaporanga	<i>Aniba parviflora</i>	Amazon bölgesi	Orta (%32-%40)	Aromatik
3	Mulata Caatinga	<i>Aeollanthus suaveolens</i>	Belem, Pensilvanya, Brezilya	Orta (%31,6-%49,3)	Farasötiklerde aromatikler
4	Kişniş	<i>Coriandrum sativum</i>	Akdeniz, Orta Doğu, Hindistan, Kuzey Afrika vb.	Yüksek (%70)	Gıda ve farasötik yardımcılarda aromatik
5	Reyhan	<i>Ocimum basilicum</i>	Küresel	Yüksek (%70)	Aromatik olarak gıda, ilaç ve kozmetik ürünleri
6	Lavanta	<i>Lavandula angustifolia</i>	Akdeniz, Avrupa	Orta (%25-%45)	Parfümler, kozmetikler, aromatik yiyecekler.
7	Tarçın	<i>Cinnamomum camphora</i>	Güney Çin, Japonya	Orta ila yüksek (%58-%92)	Kozmetik ve ilaç endüstrileri
8	Tarçın	<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	Güney Çin, Japonya, Tayvan	Yüksek (%90)	–

Sedatif aktivite

LN açısından zengin bir bitki olan lavanta, insanlık tarihinin en eski yatıştırıcı ve rahatlatıcı etkileriyle bilinen doğal çözümlerinden biridir. Masaj, aromaterapi ve tıbbi

banyolar gibi çeşitli şekillerde kullanılan lavanta, sinir gerginliğini azaltma ve uykuya geçişi kolaylaştırma özellikleriyle öne çıkmaktadır. Lavanta esansiyel yağının sedatif etkisinin, LN (R)-, (S)-enantiyomerleri ve rasemik karışımı gibi bileşenlere dayandığı düşünülmektedir ve bu etkiler çeşitli deneysel modellerde ve klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir (Lopez vd., 2017).

Kafein ile önceden tedavi edilen ve i.p.olarak kafein uygulanan hayvanlarda, lavanta esansiyel yağının inhalasyonu ile sağlanan sedasyonun, kontrol grubuna kıyasla daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. LN'nin sedatif etkisi, doza bağlıdır ve uyku süresinde artış ile spontan hareketlilikte azalma sağlarken motor becerileri etkilemez. Ayrıca, LN ve lavanta esansiyel yağı, sempatik sinir aktivitesini azaltıp parasempatik sinir aktivitesini artırarak sedatif maddelere benzer davranışsal etkiler göstermektedir (Lopez vd., 2017).

Gaston vd. (2016), *Coriandrum sativum* (kişniş) esansiyel yağı ve LN'nin civcivlerde sedatif etkilerini rapor etmişlerdir. İnsanlarda ise lavanta esansiyel yağının ve (R)-LN'nin inhalasyonu, sedasyon, rahatlama ve uyku kalitesinde iyileşme sağlamaktadır (Hudson, 1996; Almeida vd.,2009). Hayvan çalışmalarında, LN inhalasyonunun sosyal etkileşim davranışlarını iyileştirdiği ve agresif davranışları azalttığı da gösterilmiştir (Linck vd., 2010). Kuroda vd. (2005), (R)-LN'nin otonom sinir sistemi ve ruh hali üzerindeki etkileri aracılığıyla sedatif etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur.

Antimikrobiyal aktivite ve etki mekanizması

LN, çeşitli tıbbi ve aromatik bitkilerde bulunan önemli bir bileşiktir. LN, güçlü bir antimikrobiyal etkiye sahiptir ve hem bakterilere hem de mantarlara karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır (Ola vd., 2021; Guo vd., 2021; Maczka vd., 2022). Bununla birlikte, suyla düşük çözünürlük, yüksek uçuculuk ve düşük stabilite gibi fiziksel özellikleri nedeniyle gıda sistemlerinde yaygın kullanımı sınırlıdır. Ancak, sahip olduğu çeşitli biyolojik aktiviteler nedeniyle gelecek vadede bir gıda katkı maddesi olarak değerlendirilmektedir (Maczka vd., 2022).

LN'nin farmakolojik etkileri oldukça geniş bir spektruma sahiptir. Sedatif, analjezik, antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal ve antitümör aktiviteleri bunlar arasında sayılabilir (Ola vd., 2021). LN'nin antimikrobiyal etki mekanizmasını anlamak için hücre içi makromoleküller üzerindeki etkilerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Plazma zarının bütünlüğü, bakteriyel büyüme ve hayatta kalma için kritik bir role sahiptir. LN, bakteriyel plazma zarını etkileyerek hücrelerin iç yapısını ve fonksiyonlarını bozmakta, bu

da bakteriyel hücrelerin büyümesinin engellenmesine veya ölümüne yol açabilmektedir (Guo vd., 2021; Davoodi vd., 2024).

Yapılan bilimsel araştırmalar, LN'nin bakteriyel hücrelerdeki etki mekanizmasını ayrıntılı olarak ortaya koymuştur. Bu monoterpen bileşik, bakteri hücresiyle temas ettiğinde ilk olarak hücre zarını hedef alır. LN, hücre zarının potansiyelini ve yapısal bütünlüğünü bozarak zarın geçirgenliğini değiştirir. Bu bozulma sonucunda, hücre için hayati öneme sahip olan DNA, RNA ve proteinler gibi makromoleküller hücre dışına sızmaya başlar. Bu süreç, hücresel fonksiyonların bozulmasına ve nihayetinde hücre ölümüne yol açabilmektedir (Guo vd., 2021; Maczka vd., 2022).

LN, bakterilerdeki enerji üretim mekanizmalarını da hedef alarak antimikrobiyal etkisini gösterir. Bakterilerin metabolik yollarındaki anahtar enzimlerin aktivitesini inhibe ederek enerji üretimini engeller. Bu metabolik fonksiyon bozuklukları, bakteriyel hücrenin normal yapısının bozulmasına ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açar (Maczka vd., 2022). Bakteriyel hücrelerde, nükleik asitler ve proteinler temel yapısal ve işlevsel makromoleküller olarak kritik roller üstlenirler. Nükleik asitler, genetik bilginin depolanması ve aktarılmasının yanı sıra transkripsiyon ve DNA replikasyonu gibi hayati hücresel süreçlerde görev alırlar. Proteinler ise hücrenin yapısal bütünlüğünü sağlama ve çeşitli metabolik fonksiyonları yerine getirme açısından vazgeçilmezdirler. LN'nin bu temel makromoleküller üzerindeki etkilerinin incelenmesi onun antimikrobiyal etki mekanizmasının daha kapsamlı anlaşılmasına önemli katkılar sağlamaktadır (Guo ve ark., 2021).

Antienflamatuvar etki mekanizması

LN, çeşitli deneysel inflamasyon modellerinde inflamasyonu ve buna bağlı doku değişikliklerini azaltarak anti-ödem (şişlik önleyici) bir etki gösterir (Li vd.,2016) . *In vitro* çalışmalarda, (R)-(-)-LN'nin, bağışıklık sistemi tarafından üretilen TNF- α ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini, lipopolisakkaritler tarafından tetiklendiğinde, doza bağlı olarak önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Peana vd., 2003). Hayvan deneylerinde ise (R)-(-)-LN ve onun rasemik karışımının, karragenan kaynaklı ödemi belirgin şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Ancak bu etkinin gücü ve süresi, kullanılan doz ve LN'nin hangi formunun kullanıldığına göre değişiklik göstermektedir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, (R)-(-)-LN'nin etkisini, NF- κ B ve MAPK sinyal yollarını bloke ederek, NMDA reseptörlerini antagonize ederek ve NO üretimini veya salınımını azaltarak gösterdiğini öne sürmektedir. Bu

mekanizmalar, LN'nin inflamasyonu azaltıcı etkilerinin temelini oluşturur (Soulimani & Joshi, 2020).

Antitümör aktivite

Koruyucu özellikleri ve düşük toksisitesi, LN'nin antikanser ilaçları veya antibiyotiklere destek olarak kullanılma potansiyelini düşündürmektedir. Bu nedenle, LN'nin doğal ve güvenli bir alternatif tedavi olarak kullanımı oldukça umut vericidir (Davoodi vd., 2024). LN, kanser terapisi açısından çeşitli mekanizmalar aracılığıyla etkili olabilen bir bileşiktir. Temel olarak, hücre döngüsünün durdurulması ve OS'nin indüklenmesi yoluyla çeşitli kanser türlerine karşı etki gösterdiği bilinmektedir. Özellikle akciğer adenokarsinomu hücrelerinde LN, hücre döngüsünü durdurarak hücre proliferasyonunu inhibe eder (Ola vd., 2021; Machado vd., 2022). LN'nin güçlü anti-lösemik özelliklere sahip olduğu ve lösemi hücrelerinde hücre döngüsünün durmasını veya apoptozu indükleyerek etkili olduğu bildirilmiştir (Ola vd., 2021). LN, dolaşımdaki tümör hücreleri üzerinde yüksek sitotoksikite ve çoklu ilaç direncine sahip insan meme adenokarsinom hücreleri de dahil olmak üzere geniş bir karsinom hücresi spektrumuna karşı antiproliferatif aktivite sergilediği de rapor edilmiştir (Gautam vd., 2014).

LN'nin, adriamisin dirençli meme kanseri hücreleri (MCF-7) üzerinde Doksorubisin'in terapötik potansiyelini artırdığını ve bu hücrelerdeki birikimini yükselterek daha etkili bir yanıt sağladığı ortaya koyulmuştur. Ayrıca, LN'nin Epirubisin'e dirençli akciğer kanseri hücreleri (H1299) üzerinde membran hasarına yol açtığı bildirilmiştir. Doksorubisin direnci, kanser tedavisinde en sık karşılaşılan kemoterapötik engellerden biri olarak öne çıkmaktadır ve LN'nin bu direnci aşmaya yönelik etkileri, kanser tedavisinde umut verici bir yaklaşım sunmaktadır (Gautam vd., 2014). Ayrıca, LN'nin hücre çoğalmasını inhibe ettiği de gözlemlenmiştir. Kolon kanseri hücrelerinde (Machado vd., 2022), LN'nin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, lipid peroksidasyonunu teşvik ederek apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (Machado vd., 2022; Santos vd., 2022). Bu etkiler, LN'nin kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını engellemeye yönelik potansiyelini desteklemektedir (Guo vd., 2021; Machado vd., 2022; Maczka vd., 2022; Davoodi vd., 2024; Nishimura vd., 2024).

LN'nin etkileri üzerine yapılan başka bir çalışmada, OECM1 oral kanser hücrelerinde LN'nin 10 µM IC50 konsantrasyonunda hücrelerin canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Machado vd., 2022). Bu inhibisyon, hücre döngüsünün durdurulması ve

apoptozun indüklenmesi ile ilişkili bulunmuştur (Machado vd., 2022; Babaeenezhad vd., 2024). LN 200 mg/kg dozunda uygulandığında, LN'nin ksenograft deri altı tümörlerinin ortalama ağırlığında %55 oranında bir azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular, LN'nin kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını engellemeye yönelik potansiyelini ortaya koymaktadır (Machado vd., 2022).

Antioksidan aktivite

LN, esas olarak anti-lipoperoksitleyici bir ajan olarak işlev görmektedir ve güçlü antioksidan özelliklere sahiptir. LN içeren uçucu yağlarda (örneğin lavanta esansiyel yağı), antioksidan aktivitenin büyük olasılıkla aktif bileşikler arasındaki sinerji nedeniyle daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu özellik, özellikle serbest radikalleri yakalama kapasitelerinde kendini göstermektedir ve lavanta esansiyel yağı bu alanda oldukça etkili bir antioksidan olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca, LN'nin sıçan beyin dokusunu RF tarafından indüklenen OSe karşı koruduğu gösterilmiştir (Özgöçmen & Azırak, 2023). Bu koruyucu etkiler, lipoik asit ve E vitamini gibi güçlü antioksidanların sunduğu etkilerle benzerlik göstermektedir (Çelik & Özkaya, 2002). LN'nin güçlü antioksidan özelliklerinden dolayı süperoksit anyon radikali ve H₂O₂ seviyesini azaltma potansiyeline sahip olduğu da bildirmiştir (Ahmad vd., 2024). LN'nin güçlü farmakolojik aktiviteleri sayesinde, hücreleri oksidatif hasarlardan koruduğu ve ROS'u temizleyerek mitokondriyal hasarı engellediği de rapor edilmiştir (Sabogal-Guáqueta vd., 2019).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasallar

3.1.1. Araç-gereçler

- Santrifüj (Thermo Scientific SL16)
- Çalkalayıcı (Cleaver Scientific Ltd. Orbital Shaker)
- Manyetik Karıştırıcı (Benchmark Hotplate Stirrer)
- pH Metre (Consort C1010)
- Soğutmalı Santrifüj (Nuve NF800R)
- Mikroplate Okuyucu Spektrofotometre (Biochrom EZ READ 400)
- Vorteks (Pro Scientific 560-500-00)
- Etüv (Nuve EN 055)
- Mikrotom (Thermo Scientific)
- Doku Takip Cihazı (LEICA TP 1020)
- Abbott Labs Architect C16000 sistemleri (Abbott GmbH & Co, Germany)
- Chemiluminescence Analyzer UniCel Dxl 800 Access Immunoassay System
- Fotoğraf ataçmanlı mikroskop (Carl Zeiss Marka Axiocam ERc5)
- Homojenitör (Ultra-Turrax IKA T25 digital)
- UV spektrofotometre (A & E LAB)
- Vorteks (Dragon LAB MX-S)
- Mikropipet seti (İsolab)
- Derin dondurucu (Nuve DF 290, -80 °C)
- Güvenlik kabini (Bilser BLF2000)
- Hassas terazi (Radwag Wagi Elektroniczne)
- Su banyosu (Nuve BM15)

3.1.2. Kimyasallar

- Rifampisin (saflık >%98) (TCI, Tokyo Kimyasal Endüstri) (CAS RN: 13292-46-1)
- HO-1 ELISA kit USCN (Wuhan USCN Business Co., Ltd) (Lot: L220525431)
- Linalool (saflık > %95) (Sigma-Aldrich) (CAS No: 126-91-0)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (saflık > %99.5) (Sigma-Aldrich) (CAS no: 67-68-5)
- Dipotasyum hidrojenfosfat (K₂HPO₄) (Sigma-Aldrich)

- Potassium dihidrojenfosfat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich)
- Thiobarbiturik asit (TBA) (Sigma-Aldrich)
- Perklorik asit (%60'lık) (HClO_4) (Sigma-Aldrich)
- Trikloroasetik asit (TCA) (Sigma-Aldrich)
- 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma-Aldrich)
- Tris(hidroksimetil)aminometan(Sigma-Aldrich)
- Demir Abbott kiti (Part Number: 06R55-20, Biyokimya Kiti)
- Demir bağlama Abbott kiti (Part Number: 01R85-31, Biyokimya Kiti)
- Bilirubin Abbott kiti (Part Number: 8G63-22, Biyokimya Kiti)
- Ferritin Beckman Coulter kiti (Part Number: 33020, Hormon Kiti)
- Etil Alkol (Isolab)
- Ksilen (Isolab)
- Paraplast (Sigma-Aldrich)
- Formaldehit (Kimyalab)
- Hematoksilen (Sigma-Aldrich)
- %95'lik Etil alkol (Kimyalab)
- Potasyum alum (Isolab)
- Merkürük oksit (Isolab)
- Asetik asit (Isolab)
- Eosine-Y (Yellowish) (Merck)
- Glacial asetik asit (Isolab)
- Asit fuksin (Isolab)
- Oranj G (Isolab)
- Timol (Kimyalab)
- Anilin Blue (Kimyalab)
- İyot (Kimyalab)
- Sodyum Tiyosulfat (Kimyalab)
- Fosfotungstik Asit (Kimyalab)
- Bierbrich Scarlet Asit Fuksin (Kimyalab)
- Demir III klorür (Kimyalab)
- Hidroklorik Asit (Merck)
- Metil Alkol (Merck)

- Sodyum Karbonat (Kimyalab)
- Toluidin Mavisi (Kimyalab)
- Boraks (Kimyalab)

3.1.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Fosfat tamponunun (PBS) hazırlanması

Bir litre (lt) fosfat tamponu hazırlamak için 2,482 g K_2HPO_4 ve 4,864 g KH_2PO_4 tartıldı ve üzeri 1 lt saf su ile tamamlanarak, pH'sı 6,8'e ayarlandı.

TBA çözeltisinin hazırlanması

0,67 g TBA tartıldı ve %10'luk 80 ml $HClO_4$ içerisinde manyetik karıştırıcı ile ısıtılarak çözüldü ve üzeri saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

%10'luk $HClO_4$ 'nın hazırlanması

%60'luk $HClO_4$ 'den 13,3 ml alınıp yavaş bir şekilde 50 ml saf su içerisine bırakıldı ve üzeri 100 ml'ye tamamlandı.

TCA çözeltisinin hazırlanması

10 g TCA 80 ml saf su içerisinde çözdürüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Renk ayıracının hazırlanması

3 birim TCA'dan ve 1 birim TBA'dan alınarak taze olarak hazırlandı.

DTNB'nin hazırlanması

0,099 g DTNB, 25 ml saf metanol (%99'luk) içerisinde çeker ocakta taze olarak hazırlandı.

Tris tamponunun hazırlanması

48,46 g Tris(hydroxymethyl)aminomethane tartılıp 500 ml saf suda çözüldü ve pH'sı 8,9'a ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlandı.

DMSO

RF'nin çözülmesinde çözücü olarak kullanıldı. Sıçanlara 50 mg/kg/gün verilecek şekilde hazırlandı.

RF'nin hazırlanması

RF'yi hazırlamak için uygun çözücü olarak DMSO kullanıldı. Sıçanlara günlük olarak 50 mg/kg/gün verilecek şekilde taze olarak hazırlandı.

Hematoksilen-Eozin boyamada kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- Harris'in hematoksileni

1g Kristal hematoksilen, 10 ml %95'lik alkolde çözdürüldü. Aynı anda 20 g potasyum alum veya amonyum alum 200 ml distile suda kaynatılarak çözdürüldü. Çözülen bu solüsyonlar yavaş yavaş karıştırıldı ve elde edilen karışım, koyu bir renk alana kadar tekardan kaynatıldı. Daha sonra karışıma 0.5 g merkürük oksit eklendi. Karışımın bulunduğu şişe alttan 1/3'ü suda kalacak şekilde hızlıca soğutma işlemine tabi tutuldu.

- Eosin-Y

1g Eosine-Y (Yellowish), 20 ml distile su içerisinde homojenize olana kadar karıştırıldı. Karışıma 80 ml %95'lik etil alkol eklenerek Stock Eozin elde edildi. Bir birim Stock Eozin üzerine 3 birim %80'lik etil alkol eklenerek çalışmada kullanılacak Eozin (Working eosin) hazırlanmış oldu.

Masson Trichrome (üçlü) boyamada kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- Asit fuksin – Oranj G solüsyonu

0,7 g asit fuksin, 0,3 g oranj G, 0.13 g timol, 2 ml asetik asit ve 200 ml distile su karıştırılarak elde edildi.

- Anilin Blue solüsyonu

2 g Anilin blue, 2 ml asetik asit ve 100 ml distile su karıştırılarak elde edildi.

- İyot solüsyonu

2 g iyot ve %70'lik 100 ml alkol karıştırılarak elde edildi.

- Sodyum tiyosülfat solüsyonu

2 g sodyum sülfat ile 100 ml distile su karıştırılarak elde edildi.

- Fosfotungstik asit solüsyonu

3 g fosfotungstik asit ile 100 ml distile su karıştırılarak elde edildi.

- Asetik asit solüsyonu

2 ml asetik asit ile 100 ml distile su karıştırılarak elde edildi.

Weigert'in Hematoksilen solüsyonu

- Solüsyon A

1g kristal hematoksilen, %95'lik 100 ml alkol ile karıştırılarak elde edildi.

- Solüsyon B

1g demir III klorür, 1ml hidroklorik asit ve 99 ml distile su karıştırılarak elde edildi. Weigert hematoksilen solüsyonu elde etmek için, solüsyon A ve solüsyon B'den eşit oranda karıştırıldı.

- Metil karbonat solüsyonu

125 ml distile su, 125 ml metil alkol ile az miktarda sodyum karbonat ilave edilerek elde edildi.

- %1'lik Toluidin Mavisi Boyasının Hazırlanması

1 g toluidin mavisi, 2 g boraks ve 100 ml distile su ile hazırlandı.

3.2. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

3.2.1. Deney hayvanları ve yaşam alanları

Bu çalışmada, Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edilen toplam 30 adet 8-12 haftalık 250-300 g ağırlığında Sprague Dawley türü erkek sıçanlar kullanıldı. Deneysel prosedürler Laboratuvar Hayvanların Bakımı ve Kullanımı için Ulusal Sağlık Enstitüleri Kılavuz İlkeleri doğrultusunda yapıldı. Çalışmaya başlamadan önce Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan çalışmanın yapılabilmesi için gerekli izinler alındı (Protokol no#2022/028) (EK-1). Sıçanların deney gününe kadar standart barınma kafeslerinde bakımı yapıldı. Gün aşırı barınma kafesleri temizliği yapıldı ve günlük suları değiştirildi. Çalışma başlayana kadar ortam şartları stabilize edildi. Sıçanların bulunduğu odanın sıcaklığı 21 ± 2 °C, nemi $\% 45 \pm \% 5$, ışık döngüsü 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Odanın havalandırılması düzenli olarak sağlandı. Sıçanlar çalışma süresince standart pellet yemle *ad libitum* olarak beslendi.

3.2.2. Deney gruplarının oluşturulması

Çalışmada yer alan sıçanlar, bir kafeste üç hayvan olacak şekilde rastgele gruplara ayrıldı. Sıçanlara verilecek indükleyici ve koruyucu ajanlara göre randomize bir şekilde 5 gruba göre deney modellendi. Her bir sıçana yer alacağı deney modeline göre işaretlenme yapıldı. Deney grupları her grupta 6 sıçan olacak şekilde Tablo 3.1’de gösterildiği gibi oluşturuldu. Kontrol grubuna çalışma süresince herhangi bir uygulama yapılmadı. DMSO grubundaki sıçanlara 15 gün boyunca 50 mg/kg/gün DMSO gavaj yolu ile uygulandı (Şekil 3.1). RF grubunda ise 15 gün boyunca 50 mg/kg/gün olacak şekilde RF gavaj yolu ile sıçanlara verildi (Hussain vd., 2018) (Şekil 3.1). LN grubu sıçanlara ise 15 gün boyunca 50 mg/kg/gün LN i.p. olarak uygulandı (Altinoz vd., 2021) (Şekil 3.2). RF + LN grubu sıçanlara ise 15 gün boyunca 50 mg/kg/gün LN i.p. olarak uygulandı ve ardından gavaj yolu ile RF 50 mg/kg/gün olacak şekilde verildi (Tablo 3.1).

Tablo 3. 1. *Çalışma grupları ve yapılan uygulamalar*

Çalışma grupları (n=6)	Yapılan Uygulamalar
Kontrol	Herhangi bir uygulama yapılmadı
DMSO (çözücü grup)	50 mg/kg/gün DMSO 15 gün gavaj yoluyla
RF	50 mg/kg/gün RF 15 gün gavaj yoluyla (Hussain vd., 2018).
LN	50 mg/kg/gün LN 15 gün i.p. yolla (Altinoz vd., 2021).
RF + LN	50 mg/kg/gün LN i.p. yolla ve RF 50 mg/kg/gün gavaj yolla 15 gün



Şekil 3. 1. *Sıçanlara gavaj yolu ile RF verilmesi*



Şekil 3. 2. *Sıçanlara LN'nin i.p. olarak verilmesi*

Çalışma boyunca hem standardizasyonu sağlamak hem de sıçanların strese girmesini önlemek amacıyla uygulamalar hep aynı kişi tarafından günün aynı saatinde yapıldı. İndükleyici ve koruyucu maddelerin dozlarının doğru olarak verilebilmesi için her gün sıçanların ağırlıkları tartıldı ve günlük olarak verilecek dozlar belirlendi.

3.2.3. Cerrahi işlemler

On beş gün boyunca uygulamalara tabi tutulan sıçanlara 16. günde Ketamin/Xylazine (100 mg/kg / 10 mg/kg) anestezisi uygulandıktan sonra OS, enzim, biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeler için dalak doku örnekleri ve portal ven yoluyla kan örnekleri biyokimya tüplerine alındı (Şekil 3.3). Örnekler alındıktan sonra sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildi.

Biyokimya tüplerine alınan kanlar 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve iki eşit parçaya bölünerek -80°C'deki derin dondurucuda çalışmaya kadar saklandı. Dalak doku örnekleri ise iki eşit parçaya bölünerek bir yarısı histolojik incelemeler için %10'luk nötral formalin içerisine konuldu, diğer yarısı ise OS parametreleri ve HO-1 enzim aktivitesini çalışmak üzere -80°C'deki derin dondurucuda saklandı.



Şekil 3. 3. *Sıçanlardan portal ven yoluyla kan alınması*

3.2.4. Doku homojenizasyonu

OS parametreleri ve HO-1 enzim aktivitesini çalışmak üzere -80°C 'deki derin dondurucuda saklanan dalak dokuları çalışmaların yapılacağı gün derin dondurucudan çıkarılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki buzdolabına alınıp, çözünmesi beklendi. Çözünen dalak dokuları soğuk serum fizyolojik ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurulandıktan sonra soğuk buz üzerinde muhafaza edildi. Aynı anda doku homojenatlarını koymak için cam tüpler metal bir spora yerleştirildi ve soğukluğun korunması için altı buz dolu olan bir küvete yerleştirildi.

Doku homojenizasyonu öncesi dokular bistüri yardımı ile 0,5-1 g ağırlığında küçük parçalara ayrıldıktan sonra çevresinde buz olan bir küvet içerisine alındı ve üzerine 1/9 (1 birim doku örneği, 9 birim fosfat tamponu) oranında soğuk PBS eklendi. Ultra-Turrax homojenizatörde 24000 rpm'de yaklaşık 5 sn iki kez homojenize edilen dokular daha sonra buz üzerine oturtulan cam tüplere alındı. Ardından soğutmalı santrifüjde ($+4^{\circ}\text{C}$ 'de) 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek süpernatantları alındı ve OS parametreleri ile HO-1 enzim aktivitesi için kullanıldı.

3.2.5. Yöntemler

3.2.5.1. Biyokimyasal testler

Çalışmada sıçanların serumlarından demir (Fe^{2+}), ferritin, total ve indirekt BR konsantrasyonları ölçüldü. Abbott Labs Architect C16000 sistemleri (Abbott GmbH & Co, Germany) ve ticari Abbott kitleri ile demir, total ve indirekt BR konsantrasyonları fotometrik

yöntemlerle ölçüldü. Serum ferritin seviyeleri ise ticari Beckman Coulter kiti ile Chemiluminescence Analyzer UniCel DxI 800 Access Immunoassay System kullanılarak tespit edildi.

3.2.5.2. Dalak dokusunda redükte glutatyon (GSH) tayini

Dalak dokusunun homojenizasyonu sonrası elde edilen süpernatandan 0,5 ml alıp üzerine 1,5 ml TCA ilave edildi. Vortekslendikten sonra 4500 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatandan 0,5 ml alınıp ayrı bir tüpte hazırlanan 2 ml tris tamponu ve 0,1 ml DTNB içeren karışma eklendi ve vortekslendi. Karışımı elde ettikten sonra örnekler spektrofotometrede 412 nm’de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanarak $\mu\text{mol/g}$ cinsinden GSH düzeyleri bulundu.

$$\text{GSH düzeyi} = 931 \times A \text{ (Absorbans değeri)} \mu\text{mol/g}$$

3.2.5.3. Dalak dokusunda malondialdehit (MDA) tayini

Dalak dokusunun homojenizasyonu sonrası elde edilen süpernatandan 0,25 ml alınıp cam bir tüp içerisine konuldu ve üzerine renk ayırıcı ilave edildi. İyice vortekslendikten sonra tüpler metal bir spora yerleştirildi ve 100 °C’lik su banyosunda 20 dk bekletildi. Sürenin sonunda tüpler soğuk suda soğumaya bırakıldı. Soğuyan tüpler 3000-5000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Üstte kalan süpernatant spektrofotometrede 532 nm’de köre karşı okunarak absorbans değerleri saptandı. Bir tiyobarbitirik asit reaktifi olan MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olup OS’nin belirlenmesinde en yaygın ve güvenilir kullanım alanı bulunan bir bileşiktir.

Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanarak nmol/g cinsinden MDA düzeyleri bulundu.

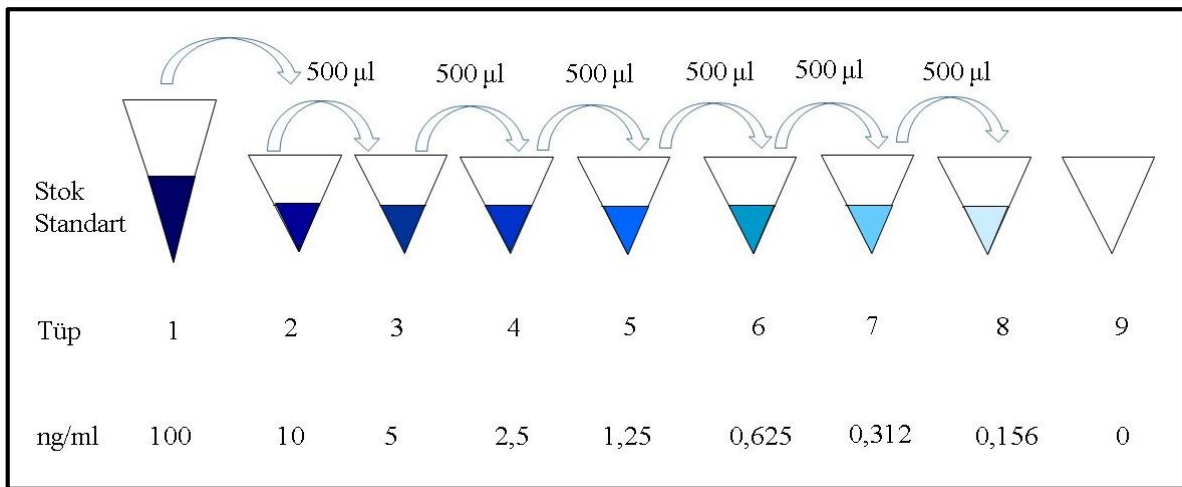
$$\text{MDA düzeyi} = 356,1 \times A \text{ (Absorbans değeri)} \text{ nmol/g}$$

3.2.5.4. HO-1 ELISA yöntemi

Serum numuneleri -80°C’den bir gün önce +4°C’ye, doku homojenatları ise çalışma yapıldığı gün -80°C’den çıkarılıp, buz üzerinde erimeye bırakıldı. HO-1 enzim aktivitesinin ELISA yöntemi ile tespit edilebilmesi için, HO-1 elisa test kılavuzundaki aşamalar sırasıyla yapıldı.

A. Ön Hazırlık

1. HO-1 Elisa Kiti içerisindeki reaktifler çalışma yapılacağı zaman oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi.
2. Testte başlamadan 15 dk önce standartlar veya saptama reaktifi A ve B kitin çalışma esasına göre dikkatlice hazırlandı.
3. Standartların hazırlanması: Standartı 1,0 ml standart dilüsyonu ile sulandırdıktan sonra, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve sonra köpürmeyecek şekilde çalkalandı. Stok solüsyonun standart konsantrasyonu 100 ng/ml'dir. Öncelikle stok solüsyonun standart konsantrasyonu 10 ng/ml olacak şekilde seyreltildi ve daha sonra 0,5 ml'lik standart seyreltici içeren 7 tüp hazırlandı. Seyreltilmiş standart kullanılarak şekildeki gibi çift seyreltme serisi oluşturuldu. Her tüp seyreltmeden sonra pipetaj yöntemiyle karıştırılıp bir sonraki tüpe şekil 3.4'de gösterildiği şekilde tekrar eklendi. Pipetlemeden kaynaklanabilecek hatayı en aza indirmek için pipetlerin öncesinden kalibrasyonu yapıldı.
4. Saptama reaktifi A ve saptama reaktifi B'nin hazırlanması: Stok saptama reaktifi A ve saptama reaktifi B sırasıyla assay dilüent A ve assay dilüent B ile 100 kat seyreltildi ve kullanıma hazır hale getirildi. .
5. Yıkama solüsyonu (1X)'nin hazırlanması: 600 ml 1X yıkama solüsyonu hazırlamak için, 20 ml olan stok yıkama solüsyonu 580 ml distile su ile seyreltildi.
6. TMB (Tetramethylbenzidin) substratı: Kullanım esnasında steril pipet uçlarıyla gereken dozda alınarak kullanıldı.



Şekil 3. 4. Stok standart çözeltisinin seyreltilmesi işlemi

B. Test prosedürünün uygulanması

1. Dilüe edilmiş standartlar, kör ve numuneler için 96'lık okuma plate'indeki kuyucuklar belirlendi. Standart için 7, kör için ise 1 kuyucuk hazırlandı. Standart dilüsyonların, kör ve numunelerin her birinden 100 µl uygun kuyucuklara eklendi. Plak kapatıcıyla kapatılıp, 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyon süresi tamamlandığında kuyucukların içerisindeki sıvılar uzaklaştırıldı. Bu aşamada herhangi bir yıkama işlemi yapılmadı.
3. Daha sonra her kuyucuğa, 100 µl çalışma solüsyonu olan saptama reaktifi A eklendi ve tekrardan plate üzeri kapatıcı ile kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
4. Süre sonunda solüsyon aspire edildi ve çok kanallı otomatik pipet ile her kuyucuk 350 µl 1X yıkama solüsyonu ile yıkandı. 1-2 dk bekledikten sonra emici kağıt yardımıyla kalan sıvı tüm kuyucuklardan çıkarıldı. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Son yıkamadan sonra kalan yıkama tamponu uzaklaştırıldı ve plate ters çevrilip emici kağıt üzerine bırakıldı ve kuruması sağlandı.
5. Kuruma bittikten sonra kuyucuklara bu defa 100 µl saptama reaktifi B solüsyonu eklendi ve plate'in üzeri kapatıcıyla kapatıldıktan sonra 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
6. İnkübasyon süresinin sonunda 4. adımda bahsedilen yıkama işlemi gerçekleşti. Ancak bu aşamada yıkama 5 kez tekrarlandı.
7. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 90 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve plate kapatıcıyla kapatıldı. Daha sonra plate 37°C'deki inkübatörde 10-20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu aşamanın 30 dk'yı aşmamasına ve ışık almamasına dikkat edildi. TMB Substratın eklenmesiyle kuyucuklardaki sıvının maviye döndüğü gözlemlendi.
8. İnkübasyon sonrasında bütün kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi. Stop solüsyonu eklenmesiyle beraber kuyucuklardaki sıvının sarı renge dönüştüğü gözlemlendi.
9. Plate'in alt kısmında parmak izi veya su damlası olmadığına ve kuyucuklardaki sıvıda kabarcık olmamasına dikkat edildi. Daha sonra Biochrom EZ READ 400 marka mikroplate okuyucu çalıştırılarak 450 nm'de okuma gerçekleştirildi. Okuma işlemi 3 kez tekrarlandı. Örneklerdeki HO-1 protein konsantrasyonu, örneklerin optik yoğunluğunun (O.D.) standart eğriyle karşılaştırılmasıyla belirlendi. Sonuçların gerçek protein konsantrasyonlarını belirlemek için Curve Expert 1.4 yazılım programı kullanıldı.

3.2.5.5. Histopatolojik inceleme

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların cerrahi işlem sonrasında alınan dalak dokuları %10'luk formol içerisinde 1 hafta bekletilerek tespit işlemi yapıldı. Daha sonra dokular %10'luk formoldan çıkartıldı ve doku takip işlemleri uygulandı. Otomatik doku takip cihazında (TP1020, Leica, Germany) rutin takip yöntemleri kullanıldı. Formoldan alınan örnekler bir gece akan suda yıkama işlemine tabi tutuldu ve daha sonra dokudaki fazla suyu uzaklaştırmak için (dehidratasyon) artan orandaki alkol serilerinden geçirildi (Tablo 3.2).

Tablo 3. 2. *Dehidratasyon için kullanılan alkol serileri ve süreleri*

Alkol Serisi	Süresi
%70'lik alkol	1 gece
%80'lik alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
%100'lük alkol	1 saat
%100'lük alkol	1 saat

Dokular yeterince dehidratasyona uğradıktan sonra şeffaflaştırma işlemi için ksilende 10'ar dk 3 kez bekletildi. Ksilende saflaştırılan dokular daha sonra 60 °C'lik etüvde bulunan 3 farklı boncuk parafinde 1'er saat bekletildi ve sonra kaset içerisine yerleştirilerek bloklama yapıldı (Şekil 3.5). Bloklama ile parafin içerisine gömülen dalak dokularından mikrotomla (Thermo Scientific) 5 µm'lik kesitler alındı (Şekil 3.6).



Şekil 3. 5. *Dokuların parafinle bloklanması*



Şekil 3. 6. *Bloklanan dokulardan mikrotomla kesit alınması*

Parafin bloklardan lam üzerine alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece etüvde bekletildikten sonra parafin dokulardan uzaklaştırıldı. Ksilende 20 dk ve 10 dk olmak üzere iki kez bekletildi. Azalan alkol serilerinden geçirildi. İki ayrı %96'lık alkol serisinde 5 dakika, ardından %80'lik alkolde 10 dakika bekletildikten sonra çeşme suyunda yıkama işlemi yapıldı. Hazırlanan lamalara daha sonra hematoksislen-eozin (Harris hematoksislen), masson trichrome (üçlü) ve toluidine blue boyamaları uygulandı.

Hematoksilen-Eozin (Harris hematoksislen) Boyama Yöntemi

Deparafinizasyon işlemine tabi olan dokuların yer aldığı lamalar hemotoksilen boyasında 1 dk bekletilip, daha sonra asit- alkol karışımına batırılıp çıkartıldıktan sonra eozin solüsyonunda 1 dk bekletildi. Sürenin sonunda distile suda 1 dk yıkama işlemi yapıldı. Ardından sırasıyla %80'lik alkolde 10 dk, iki ayrı şalede yer alan %96'lık alkolde 10'ar dakika ve ksilende 20 dk bekletildikten sonra lamalar kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamalar, lamel ile entellan yardımı ile kapatıldıktan sonra Carl Zeiss marka Axiocam ERc5 fotoğraf ataçmanlı mikroskopta 10X, 20X ve 40X objektifte incelendi.

Masson Trichrome (Üçlü) Boyama Yöntemi

Hazırlanan lamalar 2 farklı şalede yer alan ksilende sırasıyla 20 dk ve 10 dk beklettikten sonra iki farklı %96'lık alkol serisinde 5'er dk, ardından %80'lik alkolde 10 dk ve %70'lik alkolde ise 10 dk bekletildi. Alkol serisinden sonra lamalar Weigert

hematoksilende 5 dk bekletildikten sonra akan suda 5 dk durularak boya atıkları uzaklaştırıldı. Bierbrich scarlet asit fuksinde 2-3 dk bekletildikten sonra distile su ile çalkalandı. Fosfofungustik asitte 10 dk tutulan lamalar sonrasında asit fuksinde 1 dk bekletildi ve ardından distile suda 1 dk kadar yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra lamalar sırası ile anilin mavisinde ve glasiel asetik asitte 1'er dk bekletilip, distile suda 1 dk yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra lamalar %80'lik alkolde 10 dk bekletildikten sonra iki defa %96'lık alkol serisinde 10'ar dk ve sonrasında ksilende 20 dk bekletildi. Ksilenden çıkarılan lamalar kuruduktan sonra lamel ile entellan yardımı ile kapatıldı. Daimi hale gelen lamalar Carl Zeiss marka Axiocam ERc5 fotoğraf ataçmanlı mikroskopta 10X ve 20X objektifte incelendi.

Toluidine Blue Boyama Yöntemi

Hazırlanan lamalar ksilende 20 dk bekletildikten sonra distile suda çalkalanarak durulanması sağlandı. Ardından Toluidin blue solüsyonu içerisinde 2-3 dk bekletildi ve tekrardan distile su ile durulandı. Daha sonra sırasıyla %95'lik alkolde 5 dk, %100'lük alkolde 5 dk ve ksilende iki kez 3'er dk bekletildikten sonra lamel ile entellan yardımı ile kapatıldı. Hazırlanan lamalar daha sonra Carl Zeiss marka Axiocam ERc5 fotoğraf ataçmanlı mikroskopta 10X ve 20X objektifte incelendi.

Histopatolojik Skorlama

Bu çalışmada Hassanen ve arkadaşlarının histolojik skorlama sistemi modifiye edilerek yarı kantitatif olarak değerlendirilme yapıldı (Hassanen vd., 2019). Değerlendirmede 0 (normal), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (şiddetli) şeklinde derecelendirilme yapıldı. Dalak dokusunda kapsüller fibrozis, hiperemi, lenf nodüllerindeki yapısal değişiklikler, dev hücre ve mast hücre yoğunluğu gibi bulgular incelendi. Her parametre bağımsız kör bir şekilde alanında uzman histolog tarafından değerlendirildi.

3.2.5.6. İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen sayısal veriler SPSS (SPSS Version 21,0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ve GraphPad Prism version 9 software (GraphPad Software Inc.; La Jolla, CA) kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi. Kullanılan veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak ifade edildi. Normallik Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Biyokimyasal testler, MDA ve GSH gibi OS parametreleri ile HO-1 protein seviyeleri gruplar arasında

normal dağılım gösterdiğinden gruplar arasındaki karşılaştırmalarda One-way ANOVA LSD testi uygulandı. Histopatolojik skorlamadan elde edilen veriler normal dağılım göstermediğinden gruplar arasındaki karşılaştırmalarda nonparametrik test olan Kruskal Wallis ve sonrasında Tamhane's T2 testleri ile karşılaştırma yapıldı. Yapılan istatistiksel değerlendirmede $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.



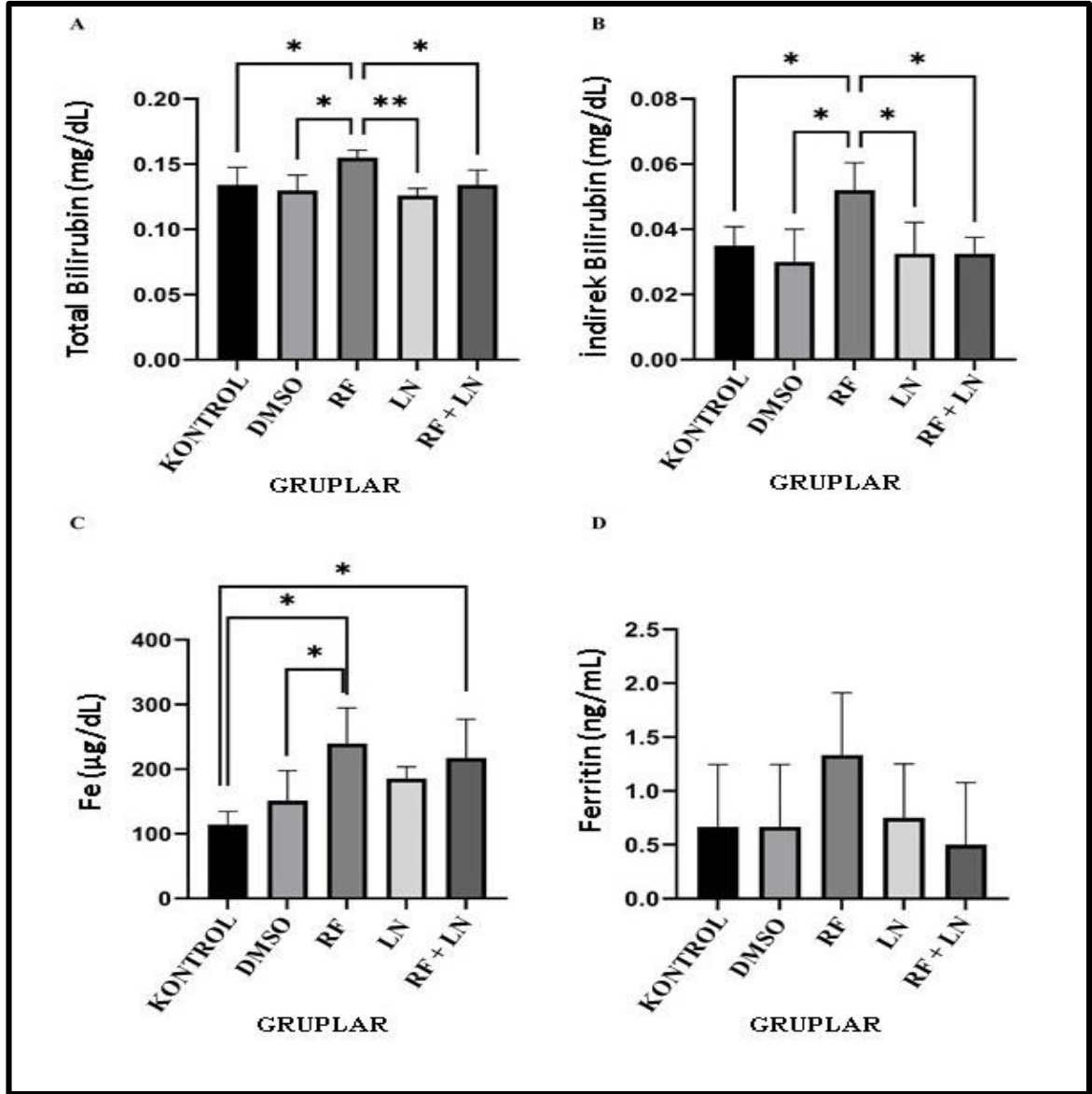
4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

RF ve LN'nin biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisi şekil 4.1 ve tablo 4.1'de gösterildi. Total BR ve indirek BR düzeyleri RF grubunda; kontrol, DMSO, LN ve RF+LN gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). RF + LN grubu RF grubu ile total BR ve indirek BR düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, total BR ve indirek BR düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü ($p<0,05$) (Şekil 4.1A ve B, Tablo 4.1).

Fe^{2+} düzeyinin RF grubunda kontrol ve DMSO gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği görüldü ($p<0,05$). RF + LN grubunda ise Fe^{2+} düzeyinin RF grubuna göre azaldığı ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,5$) (Şekil 4.1C, Tablo 4.1).

Serum Ferritin düzeyi, RF grubunda diğer gruplara göre yüksek düzeyde bulundu ancak gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmada bu artışın anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$) (Şekil 4.1D, Tablo 4.1).



Şekil 4. 1. RF ve LN'nin total BR (A), indirek BR (B), demir (Fe^{2+}) (C) ve ferritin (D) seviyeleri üzerine olan etkileri. Her grup, altı sıçan için ortalama $\pm$ SS'yı temsil etmektedir.
* $p < 0,05$

Tablo 4. 1. Serum biyokimyasal biyobelirteçlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

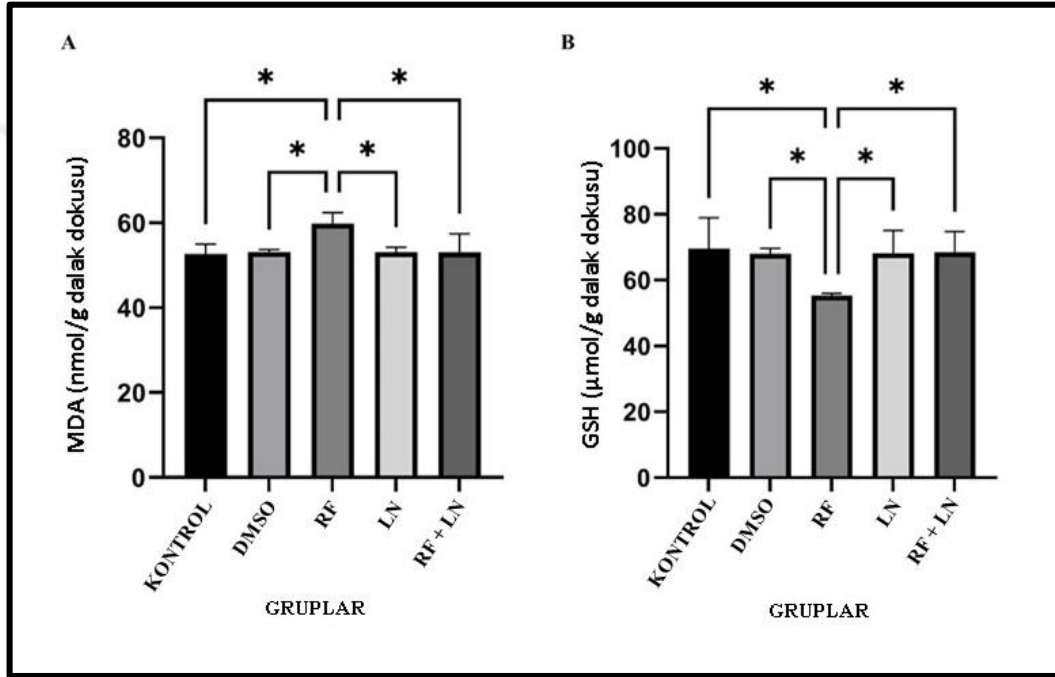
GRUPLAR						
Parametreler	Kontrol	DMSO	RF	LN	RF+LN	p değeri
Total BR (mg/dL)	0,134±0,016 ^c	0,131±0,014 ^c	0,155±0,006 ^{a,b,d,e}	0,124±0,015 ^c	0,134±0,011 ^c	0,043
İndirek BR(mg/dL)	0,035±0,010 ^c	0,030±0,010 ^c	0,050±0,008 ^{a,b,d,e}	0,325±0,009 ^c	0,325±0,005 ^c	0,042
Fe ²⁺ (µg/dL)	114,000±20,554 ^{c,e}	151,250±46,370 ^c	247,800±56,273 ^b	185,000±18,384	217,000±60,224 ^a	0,004
Ferritin (ng/mL)	0,500±0,577	0,666±0,577	1,333±0,577	0,750±0,500	0,500±0,577	0,351

Her grup altı sıçan için ortalama ± SS'yı temsil eder. a: Kontrolden anlamlı; b: DMSO'dan anlamlı; c: RF'den anlamlı; d: LN'den anlamlı; e: RF+LN'den anlamlı. p<0,05. Kısaltmalar; BR: Bilirubin; Fe²⁺: Demir

4.2. Oksidatif Stres Bulguları

Çalışmamızda RF, kontrol, DMSO, LN ve RF+LN grubu sıçanlara ait dalak dokularındaki MDA ve GSH düzeyleri Şekil 4.2 ve Tablo 4.2’de özetlendi.

RF grubu sıçanlara ait dalak dokusunda saptanan MDA düzeyi kontrol, DMSO, LN ve RF+LN grubu sıçanlarda saptanan düzeye göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 4.2, Şekil 4.2A). MDA düzeyinin aksine RF grubu sıçanlarda GSH düzeyinin diğer gruplara göre anlamlı düzeyde düşük düzeyde olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Tablo 4.2, Şekil 4.2B).



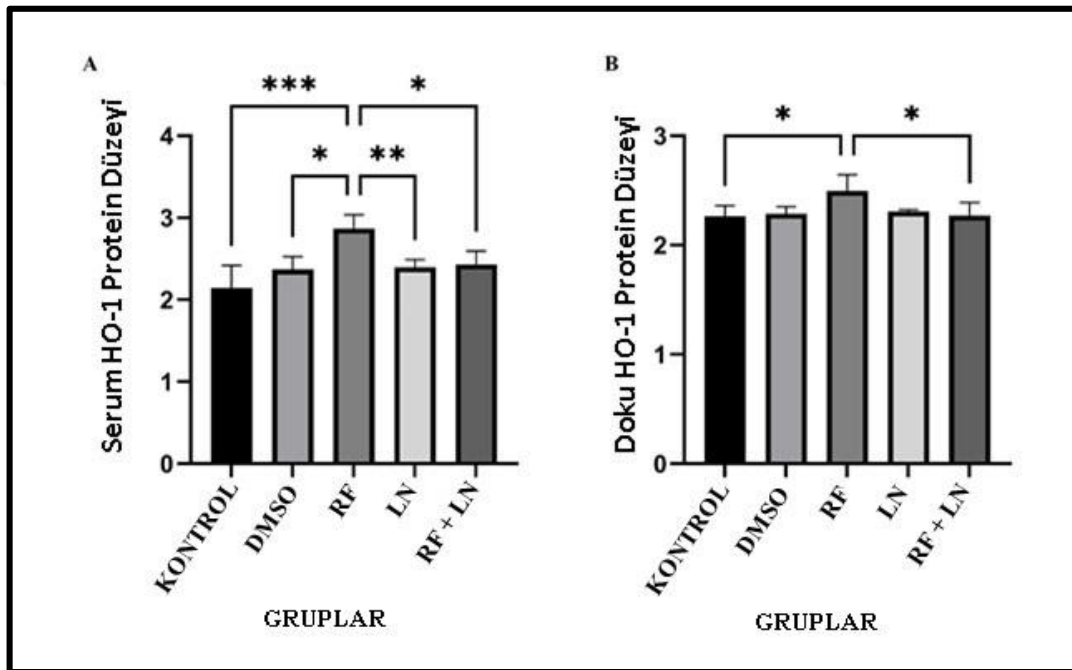
Şekil 4. 2. RF ve LN'nin dalak dokusunda MDA ve GSH düzeyleri üzerine olan etkileri. Her grup, altı sıçan için ortalama $\pm$ SS'yı temsil etmektedir. * $p < 0,05$

Tablo 4. 2. *Dalak dokusu MDA ve GSH düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması*

ÇALIŞMA GRUPLARI						
Parametreler	Kontrol	DMSO	RF	LN	RF+LN	P değeri
GSH	69,597±9,520 ^c	68,083±8,674 ^c	55,301±0,655 ^{a,b,d,e}	68,149±6,936 ^c	68,428±6,341 ^c	0,028
MDA	52,702±4,213 ^c	53,177±0,822 ^c	59,824±2,616 ^{a,b,d,e}	53,110±2,275 ^c	53,058±4,560 ^c	0,039

Her grup, altı sıçan için ortalama ± SS'yi temsil eder. a: Kontrol'den anlamlı; b: DMSO'dan anlamlı; c: RF'den anlamlı; d: LN'den anlamlı; e: RF+LN'den anlamlı. p<0,05.

Çalışmamızda yer alan RF, kontrol, DMSO, LN ve RF+LN grubu sıçanlara ait hem serum hem de dalak dokusundaki HO-1 protein düzeylerine ait veriler şekil 4.3 ve tablo 4.3’de özetlendi. RF grubu sıçanlara ait serum örneklerinde saptanan HO-1 protein düzeyinin kontrollere göre ciddi bir oranda yükseldiği ($p<0,001$), ayrıca DMSO, LN ve RF + LN gruplarına göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,05$) (Şekil 4.3A, Tablo 4.3). Dalak dokusunda ise HO-1 protein düzeyinin, RF grubunda kontrol ve RF+LN gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.3B, Tablo 4.3).



Şekil 4. 3. RF ve LN'nin serum (A) ve dalakta (B) HO-1 protein seviyesine olan etkisi. Her grup, altı sıçan için ortalama $\pm$ SS'yi temsil etmektedir. *** $p<0,001$ ** $p<0,01$ * $p<0,05$.

Tablo 4. 3. *HO-1 protein seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması*

ÇALIŞMA GRUPLARI						
	Kontrol	DMSO	RF	LN	RF+LN	p değeri
Serum HO-1	2,1455±0,27073 ^c	2,3695±0,15179 ^c	2,8696±0,36759 ^{a,b,d,e}	2,3920±0,24400 ^c	2,4309±0,16149 ^c	0,020
Doku HO-1	2,3125±0,03862 ^c	2,3575±0,00500	2,5360±0,15339 ^{a,e}	2,3500±0,07118	2,2925±0,11325 ^c	0,011

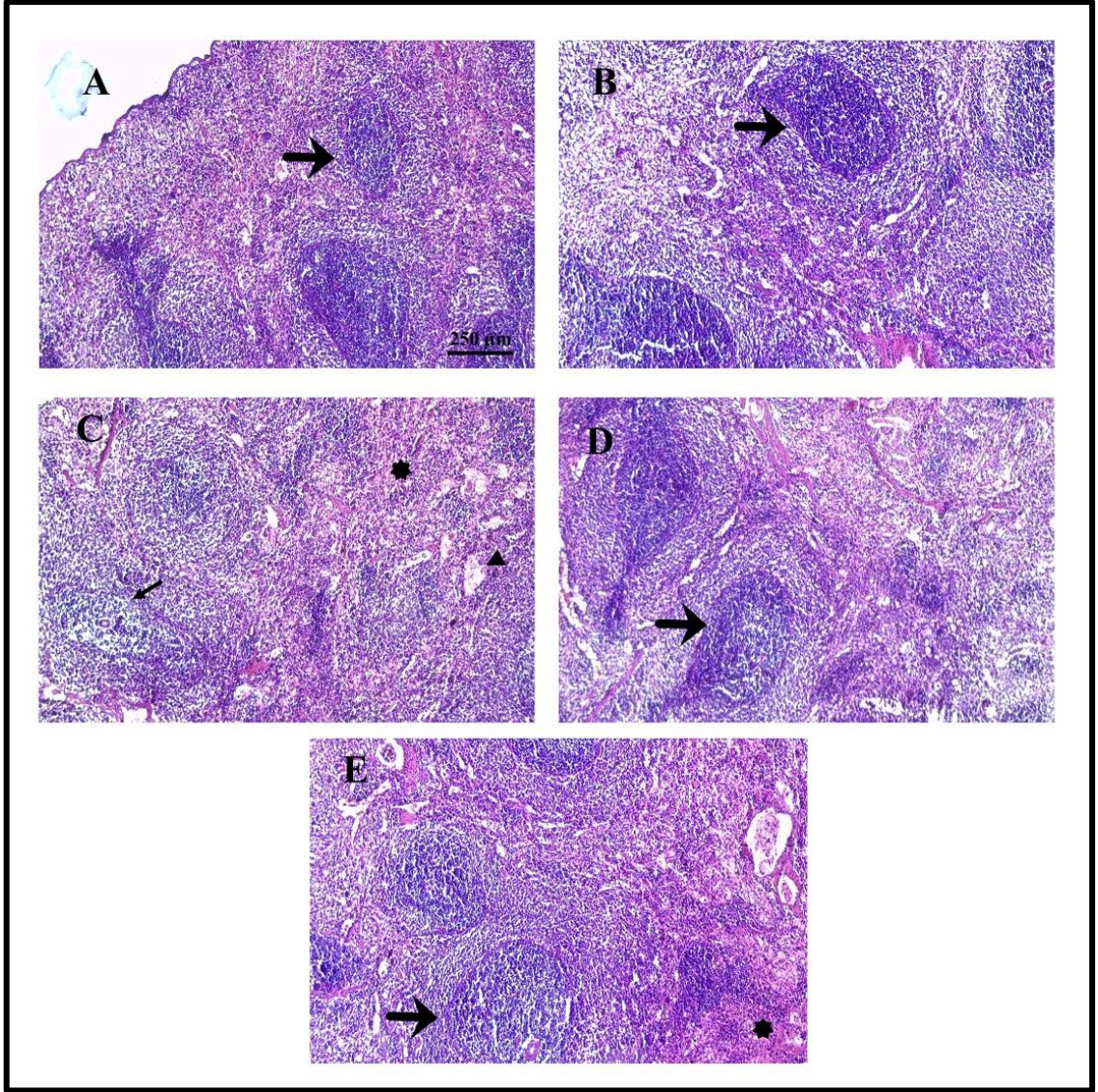
Her grup, altı sıçan için ortalama ± SS' yı temsil eder. a: Kontrolden anlamlı; b: DMSO'dan anlamlı; c: RF'den anlamlı; d: LN'den anlamlı; e: RF+LN'den anlamlı. p<0,05.

4.3. Histopatolojik Bulgular

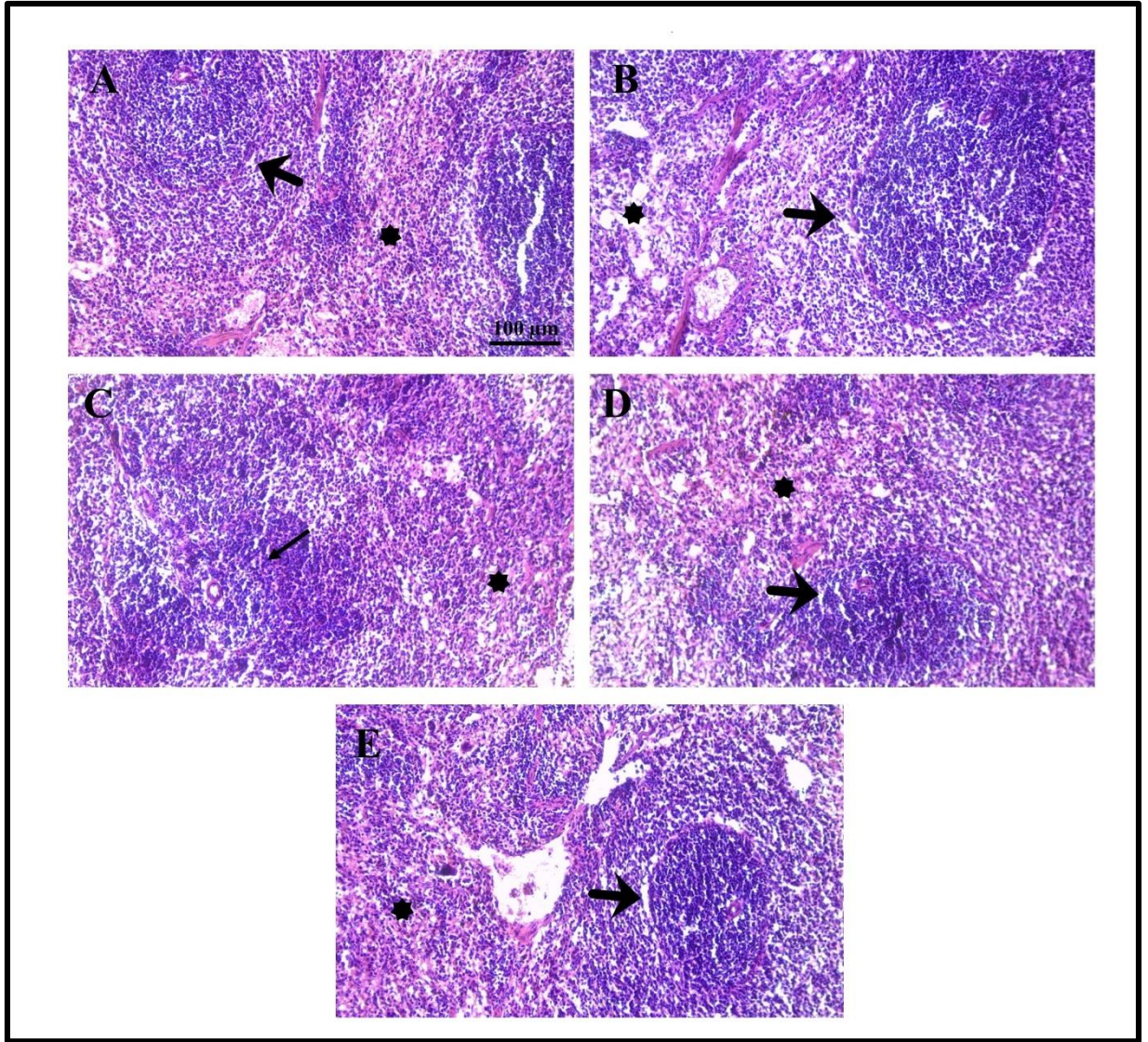
Çalışmamızda sıçanlara ait dalak dokularında histopatolojik olarak WP, RP ve kapsül bölgeleri incelendi. Kontrol, LN ve DMSO gruplarında benzer doku yapılanması görüldü. Kontrol, DMSO ve LN gruplarında WP'nin yoğun organize olmuş lenfosit topluluklarından oluştuğu (Şekil 4.4A, B ve D), RP'nin birçok lenfosit, makrofaj ve nötrofil içeren hücre kordonları ile bu kordonlar arasında yer alan sinuzoidlerden meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.5A, B ve D). Az sayıda çok çekirdekli dev hücrelerin varlığı tespit edildi (Şekil 4.6A, B ve D). Dıştan saran bağ doku kapsülü normal görünümde olduğu (Şekil 4.7A, B ve D) ve mast hücre yoğunluğunda ise herhangi bir artış gözlenmediği saptandı (Şekil 4.8A, B ve D).

RF grubunda diğer gruplara kıyasla patolojik bulgular tespit edildi ve bu grupta WP'nin genişlemiş, gevşek organize olmuş lenfosit topluluklarından oluştuğu ayrıca nodüllerin sayıca azalmış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4C). RP birçok lenfosit, makrofaj ve nötrofil içeren hücre kordonları ile bu kordonlar arasında yer alan sinuzoidlerden meydana geldiği ve bu bölgede hiperemi ve dilate olmuş sinuzoidlerin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4C). Yer yer nodüllerin düzensiz şekillendiği görüldü (Şekil 4.5C). Çok çekirdekli dev hücrelerin yoğunluğunun belirgin derecede arttığı (Şekil 4.6C) ve dıştan saran bağ doku kapsülünde fibrozis olduğu görüldü (Şekil 4.7C). Ayrıca mast hücre yoğunluğunda da artış gözlemlendi (Şekil 4.8C).

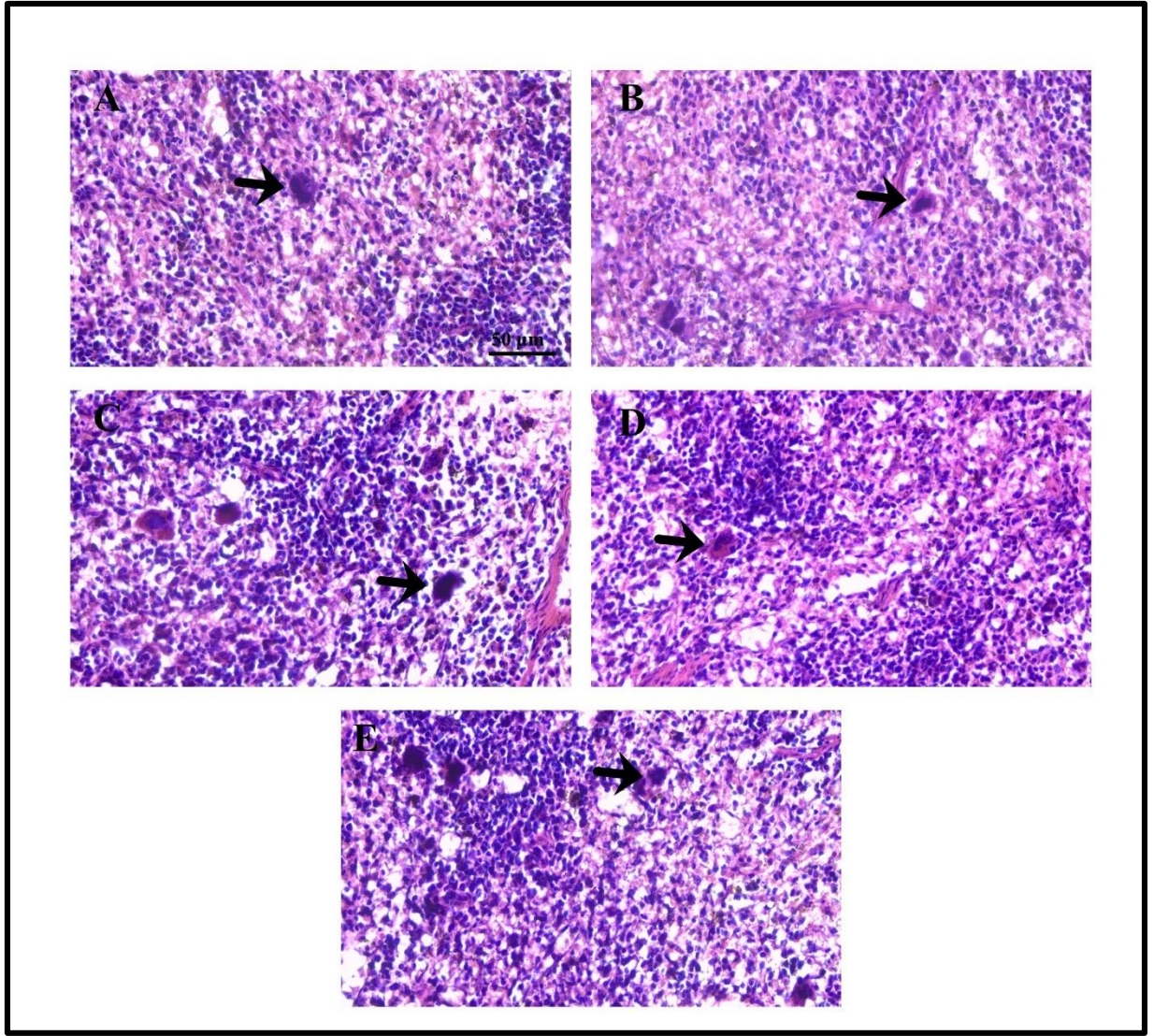
RF+LN grubunda RF etkisinin kısmen elimine edildiği, WP'nin genişlemiş, gevşek organize olmuş lenfosit topluluk sayısının azaldığı ve çoğunlukla yoğun organize olmuş lenfosit toplulukları gözlemlendi (Şekil 4.4E ve Şekil 4.5E). RP birçok lenfosit, makrofaj ve nötrofil içeren hücre kordonları ile bu kordonlar arasında yer alan sinuzoidlerden meydana geldiği ve bu bölgede hiperemi varlığının devam etmekte olduğu tespit edildi (Şekil 4.4E). Çok çekirdekli dev hücrelerin yoğunluğundaki artış, bu grupta da tespit edildi (Şekil 4.6E). Dıştan saran bağ doku kapsülünde fibrozis bulgusu gözlemlendi (Şekil 4.7E). Ayrıca RF grubu hariç diğer gruplarla kıyaslandığında mast hücre yoğunluğunda artış görüldü (Şekil 4.8E).



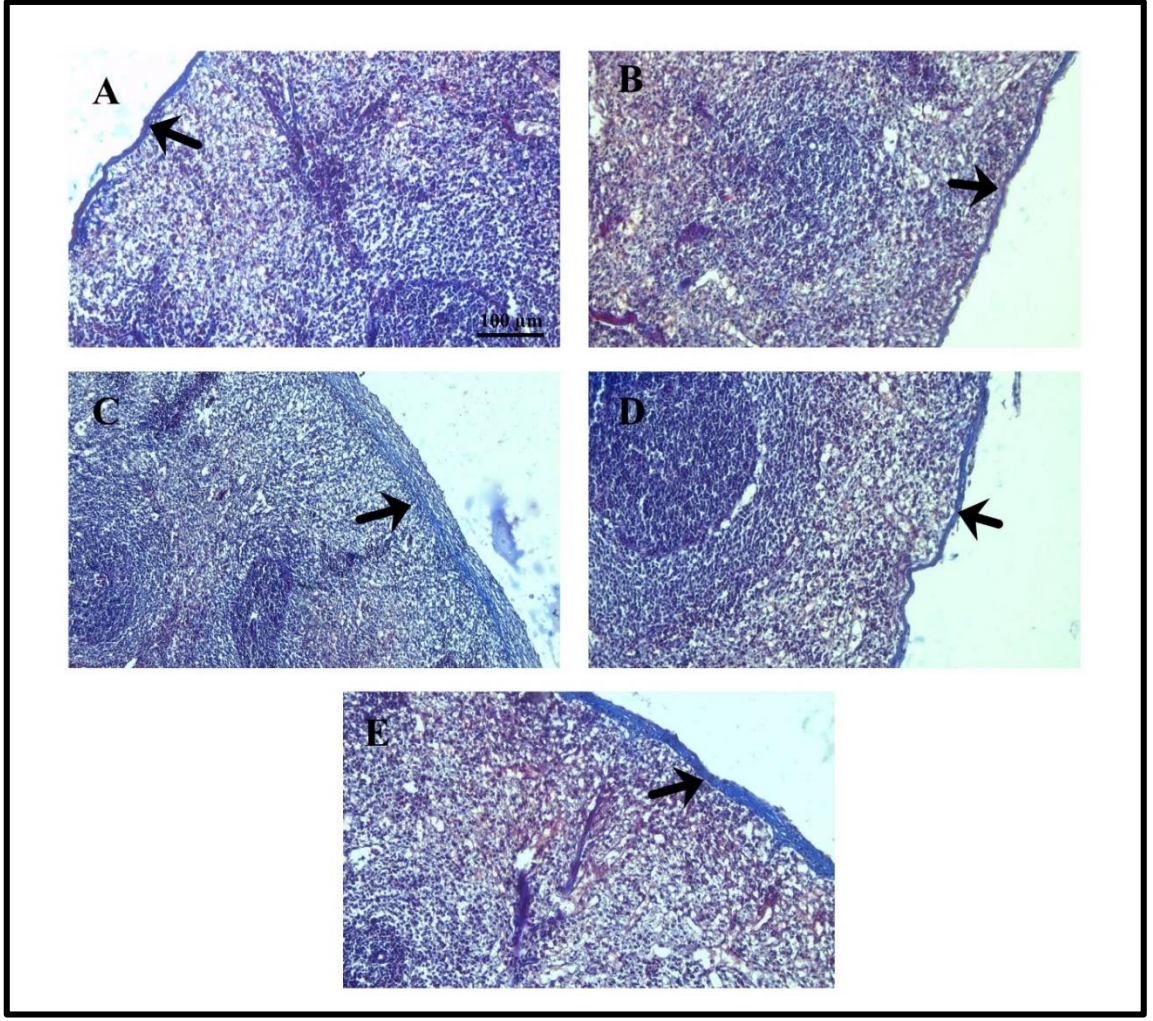
Şekil 4. 4. Kontrol (A), DMSO (B), RF (C), LN (D) ve RF+LN (E) gruplarına ait histopatolojik görüntüler (Hematoksilen-Eozin Boyama). Kalın siyah ok, normal yapıya sahip lenf nodülü; İnce siyah ok, normal yapısı bozulmuş lenf nodülü; siyah ok başı, dilate olmuş sinuzoid; Yıldız, hiperemi. (X10)



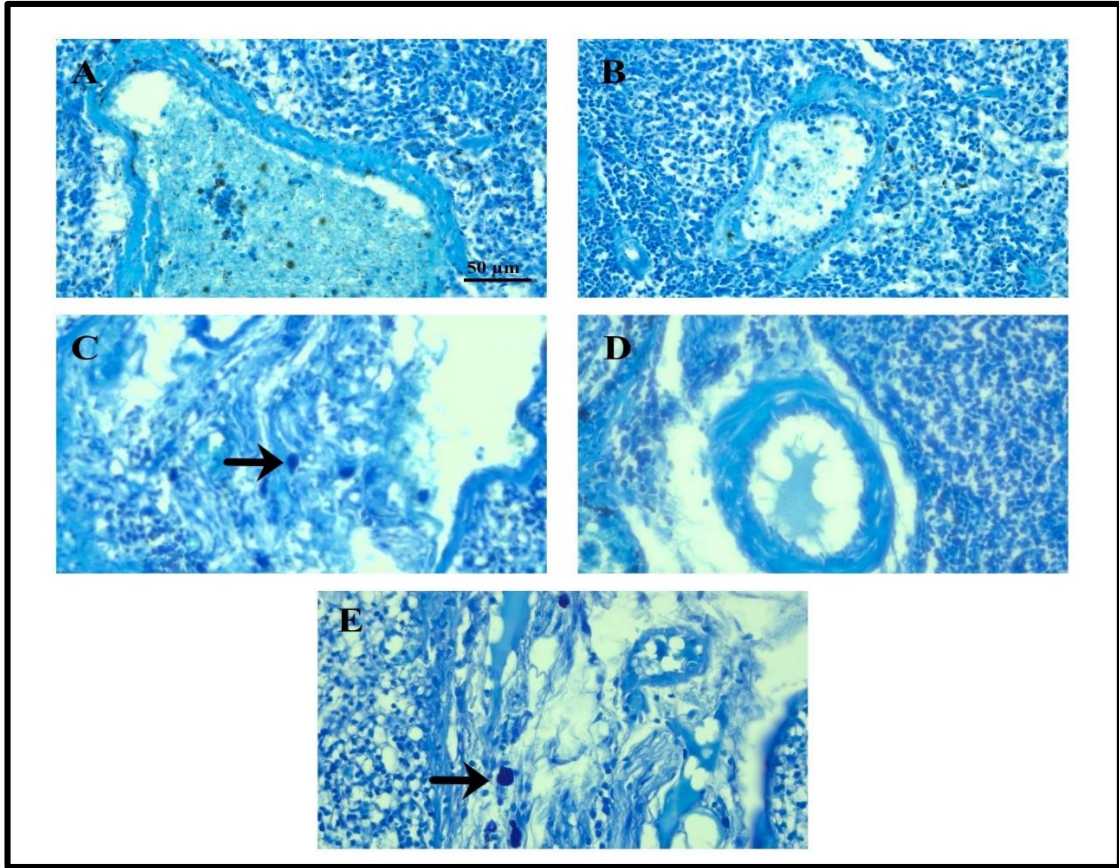
Şekil 4. 5. Kontrol (A), DMSO (B), RF (C), LN (D) ve RF+LN (E) gruplarına ait histopatolojik görüntüler (Hematoksilen-Eozin Boyama). Kalın siyah ok, normal yapıya sahip lenf nodülü; İnce siyah ok, normal yapısı bozulmuş lenf nodülü; Yıldız, kırmızı pulpa alanı (X20)



Şekil 4. 6. Kontrol (A), DMSO (B), RF (C), LN (D) ve RF+LN (E) gruplarına ait histopatolojik görüntüler (Hematoksilen-Eozin Boyama). Kalın siyah ok, Çok çekirdekli dev hücreler (X40)



Şekil 4. 7. Kontrol (A), DMSO (B), RF (C), LN (D) ve RF+LN (E) gruplarına ait histopatolojik görüntüler (Masson Üçlü Boyama). Kalın siyah ok, bağ doku kapsülü (X20)



Şekil 4. 8. Kontrol (A), DMSO (B), RF (C), LN (D) ve RF+LN (E) gruplarına ait histopatolojik görüntüler (Toluidin Mavisi Boyama). Kalın siyah ok, mast hücresi (X20)

4.3.1. Histopatolojik değerlendirme

Çalışmada kontrol, DMSO ve LN gruplarında normal bir doku yapılanmasının hakim olduğu görüldü ve herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. RF grubunda kapsüler fibrozis, mast hücre yoğunluğu ($p<0,005$), hiperemi, nodüllerde yapısal bozukluk ve dev hücre yoğunluğu ($p<0,05$) açısından kontrol, LN ve DMSO gruplarına göre bir artışın olduğu görüldü. RF+LN grubunda dev hücre yoğunluğunun kontrol, LN ve DMSO ile karşılaştırıldığında yüksek olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu, mast hücre yoğunluğunun da benzer şekilde RF + LN grubunda kontrol ve DMSO gruplarına göre yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4. 4. Dalak dokusuna ait histopatolojik değerlendirme (Ortalama $\pm$ SS)

Gruplar	Kapsüler fibrozis	Hiperemi	Nodüllerde yapısal bozukluk	Dev Hücre (makrofaj) yoğunluğu	Mast hücre yoğunluğu
Kontrol	0,50 $\pm$ 0,548	0,83 $\pm$ 0,408	0,50 $\pm$ 0,548	0,50 $\pm$ 0,548	0,50 $\pm$ 0,548
DMSO	0,67 $\pm$ 0,816	0,50 $\pm$ 0,548	0,67 $\pm$ 0,516	0,83 $\pm$ 0,408	0,50 $\pm$ 0,548
RF	2,67 $\pm$ 0,516*	2,5 $\pm$ 0,837 ⁺	2,5 $\pm$ 0,837 ⁺	2,67 $\pm$ 0,816 ⁺	2,67 $\pm$ 0,516*
LN	0,67 $\pm$ 0,516	0,67 $\pm$ 0,516	0,17 $\pm$ 0,408	0,67 $\pm$ 0,516	0,83 $\pm$ 0,753
RF+LN	1,83 $\pm$ 0,753	1,5 $\pm$ 0,837	1,5 $\pm$ 0,548	2,33 $\pm$ 0,816 ^{&}	1,67 $\pm$ 0,516 ^q

* $P<0,005$; RF grubu ile Kontrol, LN ve DMSO grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir; ^q $P<0,05$; RF grubu ile Kontrol, LN ve RF+LN grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir; ⁺ $P<0,05$; RF grubu ile Kontrol, LN ve DMSO grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir; [&] $P<0,05$; RF+LN grubu ile Kontrol, LN ve DMSO grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir; ^q $P<0,05$; RF+LN grubu ile Kontrol ve DMSO grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Tartışma

Dünya nüfusunun yaklaşık dörtte biri *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektidir ve enfekte olanların %5-10'u yaşamları boyunca TB geliştirir (Vasiliu vd., 2024). Her yıl yaklaşık 10 milyon kişinin TB geliştirmesi sonucu 1,3 milyon kişinin bu hastalıktan ölmesi küresel çapta önemli bir endişe kaynağı oluşturmaktadır (Singh, 2024). INH ve RF, anti-TB tedavisinde kullanılan iki önemli ilaçtır (Agarwal vd., 2024). RF, *Mycobacteria* ve *Clostridium difficile* gibi çok çeşitli gram-pozitif koklara ve *Hemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis* ve *N. gonorrhoeae* gibi belirli gram-negatif organizmalara karşı antibakteriyel etki gösterir (Beloor Suresh vd., 2024). Çoklu ilaca dirençli (INH/RF) veya sadece RF'ye dirençli TB, dünyanın birçok yerinde ve özellikle Asya, Doğu Avrupa, Sahra Altı Afrika ve Rusya'da büyüyen bir halk sağlığı sorunudur (Dheda & Mirzayev, 2024). Her yıl dünya çapında yaklaşık 500.000 kişinin ise RF'ye dirençli TB geliştirmesi tedavi sonuçlarının başarı oranını %60'tan daha fazla düşürmekte ve yeni tedavilere olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır (Nyang'wa vd., 2024, Souleymane vd., 2022). Klinisyenler genellikle TB'ü tedavi etmedeki yüksek etkinliği nedeniyle RIPE (rifampin, izoniazid, pirazinamid ve etambutol) tedavisini çok sayıda toksik etkiye neden olmasına rağmen tercih etmektedirler (Meade vd., 2024). Canlı organizmalar sıklıkla radyasyon, hava kirliliği, UV ışığı ve ilaç gibi toksik maddelere maruz kalmakta ve bunların toksik etkisi sonucu oluşan OS DNA ve proteinlere zarar vermekte ve sonuç olarak hücresel süreçlerin bozulmasına neden olmaktadır (Loboda vd., 2016). Özellikle ilaç kaynaklı doku hasarının ilaç veya ilaç bileşenini metabolize eden enzimlerin verimsiz çalışması nedeniyle meydana geldiği, bunun da ROS oluşumuna ve OS kaynaklı hücre ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir (Mili vd., 2024). RF kaynaklı toksisitenin altında yatan mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, bu ilacın OS üretimine yol açtığı ve inflamasyon ve apoptoz süreçlerini tetiklediği, böylece biyomoleküllere zarar vererek hücresel disfonksiyona ve toksisiteye yol açtığı düşünülmektedir (Hou vd., 2022; Rani vd., 2024). OS durumunda antioksidanlar ve prooksidanlar arasındaki denge, hem fizyolojik hem de fizyolojik olmayan faktörleri etkileyerek hücrede metabolik süreçlerin sağlıklı bir şekilde yürütülmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Maliar vd., 2024). Yapılan çalışmalarda OS'in doğal ve sentetik antioksidanlar tarafından nötralize edilebilir olduğu gösterilmiştir (Ishtiaq vd., 2024). Bu nedenle, bu çalışma uçucu yağlarda bol miktarda bulunan ve bileşimlerinin büyük bir bölümünü oluşturan doğal bir antioksidan olan LN'nin RF kaynaklı dalak hasarında

koruyucu etkilerini ortaya koyduk. Uçucu yağların temel bileşenlerinden biri olan LN, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antioksidan etkiler de dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özelliklere sahip bir monoterpendir (Kaya & Yalçın, 2024). Monoterpenler tıbbi ve aromatik bitkilerde ve bitki kökenli yiyecek ve içeceklerde bulunan doğal biyoaktiflerdir ve analjezik, anti-inflamatuvar, antioksidan, zeka geliştirici, antibakteriyel ve böcek öldürücü etkiler de dahil olmak üzere geniş bir farmakolojik aktiviteye sahiptir (Huang vd., 2024a). Geleneksel tedavilerle karşılaştırıldığında, bitki kaynaklı fitokimyasallar sitokinleri aşağı düzenleme ve çeşitli enzim/enzim sistemlerini aktive etme, daha ucuz, erişilebilir ve sentetik maddelere göre çok daha az yan etki ile zararlı mekanizmalara karşı üstün koruma sağlamaları nedeniyle tedavide tercih edilmektedir (Rani vd., 2024; Scarpa & Antonelli, 2024).

Çalışmamızda RF kaynaklı dalak hasarında doğal bir antioksidan olan LN'nin koruyucu etkilerini OS göstergeleri olan biyokimyasal parametreler, protein seviyeleri ve histopatolojik incelemelerle belirledik. Vücudun en büyük ikincil lenfoid organı olan dalak aynı zamanda hayati bir hematopoietik ve immünolojik organdır (Huang vd., 2024b). Dalağın özellikle bağışıklık fonksiyonu olmak üzere önemli rolünün son zamanlardaki farkındalığı, dalak hastalıklarının yönetimini kökten değiştirerek dalağı koruyucu cerrahiyi teşvik etmiş ve total splenektomi sonrası sepsis gibi önemli bir riskinden korumuştur (Lazaar vd., 2021). Bu nedenle mevcut çalışmamızda göz ardı edilmiş ve önemi son yıllarda anlaşılmış olan dalak üzerinde farkındalığı artırmak için RF'nin toksisitesi ve buna karşı LN'nin koruyucu etkisini ele aldık. Dalak üzerine yapılan bir çalışmada; RF, INH ve pirazinamidin gibi anti-TB ilaç uygulamasının dalakta ROS artışına, GSH ve protein içeriğinde azalmaya neden olduğu ayrıca hematolojik parametrelerde, DNA parçalanmasında ve kromozomlarda belirgin değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir (Sharma & Sharma, 2017). Başka bir çalışmada ise RF ile tedavi edilen bir hastada aşırı aktif bir bağışıklık tepkisi ile karakterize, nadir görülen ve yaşamı tehdit eden bir sistemik inflamatuvar sendrom (hemofagositik lenfhistiositoz) bildirilmiştir (Wang vd., 2024). Karaciğerle anatomik ve işlevsel ilişkiye sahip olan dalak, immünoglobulin üretimi ve kan filtrasyonu, mikroorganizmaların ve hücre kalıntıların uzaklaştırılması gibi çok sayıda işlev sunmakla birlikte bu konu hakkında çok az sayıda çalışma vardır (Grunewald vd., 2017). Yapılan bir çalışmada akut karaciğer hasarının dalak hasarına yol açtığı gösterilmiştir (Zheng vd., 2020). Anti-TB ilaçların, reaktif nitrojen türlerinin yukarı regülasyonu ile birlikte periferik nevrit, gastrointestinal reaksiyonlar ve akut ilaç kaynaklı karaciğer hasarı

gibi ciddi yan etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Liu vd., 2023b). Başka bir çalışmada ise RF ve INH kullanımının karaciğer hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Dong vd., 2014). RF'in dozdan bağımsız yan etkileri arasında ürtiker, grip benzeri semptomlar, trombositopeni, hemoliz ve böbrek yetmezliği gibi aşırı duyarlılık reaksiyonları yer almaktadır (Beloor Suresh vd., 2024). RF, hepatik ve immünoalerjik karakterde; minör (kutanöz, gastrointestinal veya influenza benzeri sendrom) veya majör (hemolitik anemi, şok veya akut böbrek yetmezliği) birçok yan etkiye sahiptir (Grosset & Leventis, 1983). Asetaminofen, RF, INH, diklofenak, pirogallol ve benzeri ilaçlar, OS, inflamasyon, apoptoz ve fibroz mekanizmalarıyla hepatotoksisiteye neden olan en yaygın sentetik ilaçlar arasında yer almaktadır (Rani vd., 2024).

Mevcut çalışmada dalak fonksiyonunu değerlendirmek için HO-1, serum ferritin, Fe^{2+} , total BR ve indirekt BR, MDA ve GSH seviyeleri ölçüldü. Yapısal bozuklukları tespit etmek için de histopatolojik incelemeler yapıldı.

Mevcut çalışmada stresle indüklenebilir bir protein olan HO-1 seviyelerini hem dokuda hem de serumda ölçtük. HO-1'in çeşitli oksidatif ve inflamatuvar sinyallerle indüklenerek eksprese edilmesi inflamasyona ve oksidatif hasara karşı adaptif bir hücre sel yanıt olarak kabul edilmektedir (Yoo vd., 2019). HO-1 ekspresyonunun altında yatan moleküler mekanizmalar yeterince tanımlanmamıştır. HO-1 ekspresyonunun indüklenmesi veya tolere edilebilir miktarda HO-1 reaksiyon ürünlerinin uygulanmasının hastalık semptomlarını iyileştirebildiği çok sayıda inflamatuvar ve otoimmün hastalık modelinde kanıtlanarak ilaçların hedefi haline gelmiştir (O'Rourke vd., 2024). HO-1 molekülünün faydalı ve zararlı olmak üzere iki yönü bulunmaktadır ve ekspresyon düzeyinin faydalı bir eşiği olduğu tahmin edilmektedir (Suttner vd., 1999). Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmada, HO-1'in bazı hücre tiplerinde ve belirli koşullar altında artış göstermesinin, heme türevleri olan CO, Fe^{2+} ve hücre içi OS'yi artırarak hastalık sürecini şiddetlendirdiği bildirilmiştir (Schipper vd., 2019). Bu nedenle, bu çalışmanın en önemli odak noktası, HO-1 ekspresyonunu artırarak hastalıklara müdahale etmeyi planlayan araştırmalara, HO-1'in bu olumsuz etkilerini de göz önünde bulundurmaları gerektiğini vurgulamaktır. HO-1, heme'yi parçalamak, CO, Fe^{2+} ve BR'ye indirgenen BV üretiminde hız sınırlayıcı enzim olarak hayati bir metabolik işlev görür (Liu vd., 2019). Bulgularımıza göre RF grubunda HO-1 seviyelerinin hem dalak dokusunda hem de serumda önemli oranda arttığı tespit edilmiştir. Çevresel bir kirlenici ve ROS üreten bir madde olan bisfenol A tarafından aktive edilen HO-1'in, apoptoz ve otofaji ile ilgili moleküler sinyalleşmelere aracılık ederek nöronal

dejenerasyona yol açtığını bildiren çalışmanın sonuçları, bulgularımızla benzerlik göstermektedir (Lee & Hsieh, 2021). Daha önce yapılan başka bir çalışmada ise yüksek HO-1 seviyeleri nedeniyle oluşan aşırı ROS'un ve serbest demir (Fe^{2+})'in, lipid peroksidasyonuna ve ferroptozaya yol açarak hücrelerde heme'yi feröz demir, CO ve BV/BR'ye katabolize ettiği tespit edilmiştir (Yang vd., 2022). Ferroptozis, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizliğin neden olduğu bir tür demir bağımlı PCD'dür (Qian vd., 2024). Başka bir çalışmada ise HO-1'in aşırı aktivasyonu sonucu demir metabolizmasının dengesinin bozulduğu bildirilmiştir (Chang vd., 2018). Çalışmamızda kullandığımız antioksidan etkilere sahip olan LN ise bu etkileri tersine çevirdi. RF+LN grubunda RF grubuna kıyasla HO-1 seviyelerinde iyileşme gözlemledik. LN bu etkileri antioksidan özelliği sayesinde serbest radikal üretimini ve OS'yi azaltarak göstermiştir. Sonuçlarımız LN'nin ROS seviyesini düşürdüğü ve hücrelerin antioksidan kapasitesini değiştirerek OS ve inflamasyonu azalttığını bildiren çalışmanın sonuçları ile uyumludur (Pandur vd., 2024). Yapılan bir çalışmada yüksek ROS seviyelerinin antioksidan savunma sistemi tarafından etkisiz hale getirildiği tespit edilmiştir (Tyagi vd., 2021). HO-1 seviyesini dengede tutmak amacıyla doğal bileşiklerin ilaçlarla takviye edildiğini gösteren birçok çalışmaların bulguları sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Örneğin; yapılan bir çalışmada antiinflamatuvar olan prosiyanidin takviyesinin HO-1'i düzenleyerek inflamatuvar sitokinlerin salınımını ve ferroptozu baskılayarak iltihabı azaltmanın etkili bir yolu olduğu bildirilmiştir (Zeng vd., 2024). Başka bir çalışmada, bir antioksidan olan puerarin'in HO-1 seviyesini azaltarak GSH ve GPX4 seviyelerini artırdığı, böylece ROS üretimini ve ferroptozu engellediği gösterilmiştir (Yue vd., 2024). Daha önce yapılan bir çalışmada ise, likopen gibi çoklu antioksidan ajanların RF uygulamasıyla oluşan oksidatif böbrek hasarını azalttığını ve bunun biyokimyasal ve histopatolojik incelemelerle tespit edildiği bildirilmiştir (Bedir & Kocaturk, 2021). Bir başka çalışmada ise Heptoplus ile beslenen sıçanların, normal antioksidan profillerini koruyarak karaciğeri RF kaynaklı oksidatif hasardan koruduğu gösterilmiştir (Sankar vd., 2015).

Çalışmamızda RF grubunda Fe düzeylerinde önemli oranda artma gözlemlenirken serum ferritin düzeylerinde ise önemli olmayan düzeyde bir artış gözlemledik. HO-1'in aktivasyonunun Fe düzeyini artırarak ferroptozu indüklediği ile ilgili bulgularımızı destekleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Giderek artan sayıda araştırma, HO-1'in Fe^{2+} üretimini ve demire bağlı lipid peroksidasyonunu düzenleyerek ferroptozda kritik bir rol oynayabileceğini ve ferroptozu indükleyerek miyokardiyal hasara katkıda bulunabileceğini

ortaya koymaktadır (Mancardi vd., 2021). Son yapılan araştırmalar, hemoglobinden salınan heme'nin HO-1 tarafından parçalanarak hücre içinde demir birikimini ve lipid peroksidasyonunu teşvik ettiğini ve bunun kardiyomiyosit ferroptozuna yol açtığını ortaya koymaktadır. Bu çalışmaların sonuçları, bulgularımızı destekler niteliktedir (Hou vd., 2024, Mancardi vd., 2021). Demir birikimi, redoks homeostazının bozulmasına ve hücre ölümüne yol açan çeşitli sitotoksik mekanizmaların temel aracısıdır (Mancardi vd., 2021). Demir metabolizmasındaki değişiklikler ROS bozukluğuyla ilişkilidir (Chen vd., 2024b). Ferritinin en önemli işlevi ise Fe^{2+} 'yi bağlayarak, onu okside etmek ve hücrenin ihtiyaçlarına göre demiri salmaktır. Bulgularımıza göre ferritin oranı da kontrole nazaran önemli olmasa da artış göstermiştir. Bu bulgu, Jin vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda ferritin artışının iltihap, enfeksiyon, metabolik anormallikler, hemofagositik lenfositosis ve malignite gibi birçok hastalık ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ing vd., 2023; Piperno & Pelucchi, 2023). Daha önce yapılan bir çalışmada artan karaciğer demir seviyelerinin hepatositlerde hasar oluşturduğu ve bu hasarlı hepatositler tarafından seruma salınan demirin geri taşınarak ferritinler aracılığıyla depolandığı bildirilmiştir (Malik vd., 2017). Ancak artan ferritin oranının artan Fe^{2+} oranından az olması durumunda hücrelerin ferroptozu yöneleceklerini gösteren çalışmamızın sonuçları daha önce yapılan başka bir çalışmanın sonuçları ile uyumludur (Lin vd., 2023). Buna göre ferritin oranının Fe^{2+} oranından az artmış ya da çok artmış olması iki farklı patolojik sonucu doğuracaktır. Bu nedenle normal hücrelerde Fe^{2+} ve ferritin oranlarının sağlıklı ve korelasyon içerisinde olması beklenmektedir. Yapılan çalışmalarda yaşlanma ve yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıklar sırasında HO-1'in artan ekspresyonunu nörotoksik ferrik demir birikimleriyle ilişkilendirilmiştir (Fernández-Mendivil vd., 2021). Yapılan başka bir çalışmada bozulmuş ROS'un HO-1'in yukarı regülasyonu ile ilişkili olduğunu ve sonuç olarak bu durumun Fe^{2+} yüklenmesi, mitoROS, mtROS ve lipROS homeostazı dahil olmak üzere mitokondriyal işlev bozukluğu yoluyla ferroptozu indükleyebileceği gösterilmiştir (Chen vd., 2024a). Birkaç kanıt dizisinde Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında nöronal hasar ve nörodejenerasyonla ilişkili olarak HO-1'in yukarı regülasyonunun sorumlu olduğu vurgulanmıştır (Nitti vd., 2018). Çalışmamızda kullandığımız LN ise HO-1 seviyelerini önemli oranda iyileştirmiştir. Bulgularımız, HO-1'in inhibisyonu ile OS ve ferroptozun önlenerek hücre canlılığını önemli ölçüde iyileştirdiğini ve hücre içi demir birikiminin azaldığını gösteren çalışmanın sonuçları ile uyumludur (Tang vd., 2021). Başka bir çalışmada ise HO-1'in baskılanması ile glutatyon peroksidaz 4 (GPX4)

seviyesinin arttığı, in vitro ve in vivo lipid peroksidasyonu ve ferroptozisin ise azaldığı bildirilmiştir (Zhou vd., 2024).

Ayrıca bulgularımıza göre RF, HO-1'i yukarı regüle ederek total BR ve indirekt BR seviyelerini de artırmıştır. Yapılan bir çalışmada BR seviyesinin artmasının patofizyolojik sonuçlarla ilişkili güçlü immünoşüpresif etkilere neden olduğu tespit edilmiştir (Vitek vd., 2023). Daha önce yapılan bir çalışmada HO-1'in aşırı üretimi ve artan HO aktivitesi sonucu oluşan yenidoğan sarılığının, HO aktivitesi inhibitörleri ile klinik müdahale gerektiren yüksek BR seviyelerine neden olduğu bildirilmiştir (Drummond vd., 2019). Başka bir çalışmada ise HO-1 ifadesinin sarılıklı sıçan karaciğerlerinde oldukça artmış olduğu tespit edilmiştir (Matsumoto vd., 1998; Abrahám vd., 2012). Yapılan başka bir çalışmada RF tedavisi sonucu hastalarda hiperbilirubinemi, hepatotoksisite ve klinik sarılık gelişmesini takiben tedavinin kesildiği bildirilmiştir (Perumal Kannabiran vd., 2024). Çalışmamızda kullandığımız LN ise total BR ve indirekt BR seviyelerini iyileştirmiştir. Antioksidan özelliklere sahip birçok madde bulgularımızla uyumlu sonuçlar göstermiştir. Örneğin, yapılan bir çalışmada, anti-inflamatuvar ve antioksidatif özelliklere sahip rosmarinik asit ve norgalanthamine'in, karbon tetraklorür kaynaklı total BR seviyelerindeki artışları önemli ölçüde tersine çevirdiği bildirilmiştir (Lu vd., 2022; Yang vd., 2023). Yapılan bir çalışmada anti-oksidatif özelliklere sahip taraxasterol'un, aflatoksin kaynaklı total BR seviyelerindeki artışları önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir (Sang vd., 2023). Yapılan başka bir çalışmada ise anti-oksidatif özelliklere sahip kuercetagenin'in, zearalenon kaynaklı total BR seviyelerindeki artışları önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir (Wu vd., 2023). Dai vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada ise hepatoprotektif özelliklere sahip Schisandrin C'in, parasetamol kaynaklı total BR seviyelerindeki artışları önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir. Xia vd. (1997) ise yenidoğan sarılığının önlenmesi ve tedavisi için HO-1 aktivitesinin Sn-protoporfirin kullanılarak inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Mevcut çalışmada, RF'nin oksidan/antioksidan dengesini önemli ölçüde değiştirdiği gösterilmiştir. RF kaynaklı dalak homojenatlarındaki oksidan hasarı değerlendirmek için dalak dokusunun serbest radikallere karşı savunma yeteneğini ortaya koyan vücudumuzun ana antioksidanı olan GSH ve bir lipid peroksidi olan MDA seviyelerini de ölçtük. RF'nin aşırı ROS üretimi ile hücre zarlarını bozarak dalak dokusunda MDA düzeylerini artırdığı ve GSH antioksidan enzim aktivitesini ise kontrol grubuna göre azalttığını tespit ettik. Bulgularımız, RF uygulamasının lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde artırdığı ve GSH, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan aktivitelerinin seviyelerini azalttığını

gösteren başka bir çalışmanın sonuçları ile uyumludur (Swamy vd., 2012). OS, GSH gibi antioksidan savunma sisteminin enzimlerini olumsuz yönde etkiler. Bu sonuçlar, RF kaynaklı gelişen oksidatif hasara ilişkin önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzerdir (Anwer vd., 2023; Azırak & Özgöçmen, 2023; Sun vd., 2023). Çalışmamızda RF'in, HO-1'i artırarak ROS ve MDA seviyelerini artırdığını, GSH'yi azalttığı ve Fe²⁺ birikimini teşvik ederek dalak dokusunda ferroptozu indüklediğini tespit ettik. Ferroptozu duyarlılık hücre içi antioksidan kapasitesine bağlıdır (Mancardi vd., 2021). Mevcut çalışmamız, HO-1'in aşırı ekspresyonu, aşırı Fe²⁺ üretimi, ROS birikimi ve GPX4'ün tükenmesi sonucu ferroptozu neden olduğunu gösteren çalışmanın sonuçları ile benzemektedir (Lu vd., 2024). Yine başka bir çalışmada ferroptozisin, apoptozis, nekroptozis ve otofajiden farklı, demir, ROS ve lipid peroksit birikiminin yanı sıra GSH tükenmesi ve GPX4 inaktivasyonu ile karakterize yeni bir demir bağımlı PCD türü olduğu bildirilmiştir (Xu vd., 2024). Aşırı HO-1 yukarı düzenlemesinin, kadmiyum kaynaklı böbrek hasarında ferroptozu tetiklemek için demir yüklenmesini ve mtROS aşırı üretimini teşvik ettiğini göstermiştir (Lv vd., 2024). Artan kanıtlar, HO-1'in malignitelerde yukarı düzenlenerek tümör hücresi invazyonunu teşvik ettiğini ve metastazla ilişkili protein ekspresyonunu artırdığını göstermiştir (Kang vd., 2015).

Çalışmamızda kullandığımız LN'nin, MDA üretimini azalttığını ve antioksidan olan GSH enziminin aktivitesini arttırdığını gösterdik. Bulgularımız LN'nin ROS aktivitesini inhibe ederek dalak dokusunda antioksidan özellikleri ile lipid oksidasyonunu ve OS'nin artmasına engel olduğunu gösteren çalışmaların sonuçları ile uyumludur (Salimi vd., 2022; Tamilmani vd., 2023). LN'nin antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri, dalakta koruyucu etkilerinin muhtemel mekanizmalarıdır (Chen vd., 2023). LN, adezyon oluşumunu önlemede ve inflamasyon, anjiyogenezis, apoptoz ve OS'i azaltmada etkilidir (Davoodi vd., 2024). Bir monoterpen olan LN'nin antioksidan, antibakteriyel, antiviral ve enzim inhibitörü özellikleri nedeniyle serbest radikalleri temizlediği Wojtunik-Kulesza & Oniszezuk (2024) tarafından rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada LN'nin antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antidiyabetik, antiobezite, kardiyovasküler, gastrointestinal ve merkezi sinir sistemlerine yönelik etkilerinin yanı sıra antioksidan aktiviteler gibi birçok farmakolojik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Mandal & Sarkar, 2023). Yapılan başka bir çalışmada ise antioksidan özelliklere sahip *Lasianthera africana*'nın (Icacinaceae) RF kaynaklı OS'nin bozduğu biyokimyasal parametreler ile GSH, GPx, SOD ve CAT gibi antioksidanların seviyelerini iyileştirerek doku hasarını önlediği tespit edilmiştir (Nwidu & Teme, 2018).

Çalışmamızda, biyokimyasal ve OS parametrelerinin analizi ile saptanan RF kaynaklı oksidatif hasar belirteçlerindeki değişiklikler dalak dokusundaki histopatolojik gözlemlerimizle de uyumlu olarak bulundu. Dalak dokularında beyaz pulpa, RP ve kapsül bölgeleri incelendi. Çalışmamızda, dalakta hasarlı RP makrofajlarının artan eritrofagositoz sonucu Fe^{2+} salınımında artışa neden olduğunu ve bunun ferroptozla ilişkili olarak ROS ve lipid peroksidasyonunda yükselmelere yol açtığını gözlemledik. Bu bulgularımız, daha önce yapılan bir çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Youssef vd., 2018). RF grubunda beyaz pulpada gevşek organize olmuş lenfosit toplulukları, RPda birçok lenfosit, makrofaj ve nötrofil içeren, hiperemi ve dilate olmuş sinuzoidler ile gözlemlendi. Çok çekirdekli dev hücrelerin yanı sıra fibrozis ve mast hücre yoğunluğunda artış gibi patolojik bulgular tespit edildi. Benzer histopatolojik sonuçlar daha önce in vivo modeller kullanan çok sayıda RF çalışması tarafından bildirilmiştir (Awodele vd., 2010; Danjuma vd., 2018; He vd., 2020; Al-Rehemi vd., 2024). Yapılan başka bir çalışmada ise hepatit E virüsü ile enfekte olmuş dalak dokusunda hiperemi, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve nekroz gibi patolojik değişikliklerin şiddetli olduğu bildirilmiştir (Yang vd., 2015). Çalışmamızda LN tedavisi sonrasında bu histopatolojik değişikliklerde anlamlı azalmalar gözlemledik. Sonuçlarımız LN'nin dalak dokusunda RF kaynaklı histopatolojik değişikliklere karşı dalağı koruduğunu göstermektedir. Bulgularımız LN'nin oksidatif hasar kaynaklı doku hasarını önleyebildiği çalışmaların bulguları ile benzerlik göstermiştir. Yapılan bir çalışmada bulgularımızla uyumlu olarak antioksidan olan arpanın dalak dokularını makrofaj, fibrinoid birikimi, hiperemi ve dilate olmuş sinuzoidler, beyaz ve RPdaki yapısal hasarlar gibi değişikliklerden koruduğu gösterilmiştir (Shehata vd., 2019). Ayrıca, ferroptoz inhibitörü ferrostatin-1'in, hasarlı RP makrofajlarından salınan Fe^{2+} 'i ve ferroptozu inhibe ederek ROS ve lipid peroksidasyonundaki artışları tersine çevirdiğini ortaya koyan önceki bir çalışmanın sonuçları, bulgularımızla uyum göstermektedir (Youssef vd., 2018). Yapılan bir başka çalışmada ise zeytin yaprağı özütünün antioksidan kapasiteyi artırarak ve apoptozu azaltarak kurşun kaynaklı dalak hasarını engelleyebileceğini göstermiştir (Wang vd., 2013). El-Sokkary vd. (2002), *Schistosoma mansoni* ile enfekte olmuş dalak, karaciğer ve böbrekte antioksidan olan melatoninin eozinofil infiltrasyonu, granülom oluşumu, megakaryosit ve nekrotik hücreli dejenerasyon gibi histopatolojik değişikliklerin çoğunu engellediğini bildirmişlerdir.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada, fizyolojik koşullar altında hücrede düşük seviyelerde bulunan HO-1'in, RF'nin OS üzerindeki etkisiyle anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Aşırı HO-1 aktivitesi, heme parçalanması yoluyla yüksek miktarda CO ve BV/BR üretimine, ayrıca aşırı labil demir (Fe^{2+}) birikimine neden olmuş ve bu durum ferritin seviyelerinin artışına yol açmıştır. Sonuç olarak, ROS üretimi artmış, bu da lipid peroksidasyonu ve ferroptozise zemin hazırlamıştır. MDA seviyeleri artarken, GSH seviyeleri belirgin bir şekilde azalmıştır. Histopatolojik incelemeler ise doku hasarının arttığını göstermiştir.

Buna karşın, LN ile yapılan kombine tedavi, HO-1 ekspresyonunu aşağı yönde düzenlemiş ve hücre içi Fe^{2+} seviyelerini azaltarak kararsız demir birikimini önlemiştir. Bu durum, ferroptozisin zararlı etkilerini tersine çevirirken, GSH seviyelerini önemli ölçüde artırmış ve MDA ile ROS seviyelerini düşürmüştür. Bu bulgular, LN'nin RF kaynaklı bozulan ROS homeostazını iyileştirdiğini ve oksidatif savunmaları güçlendirerek HO-1 kaynaklı ferroptozu ve dolayısıyla dalakta meydana gelen doku hasarını önlediğini göstermektedir.

Mevcut çalışma, RF'nin dalak hasarına neden olduğunu ve yaygın bir antioksidan olan LN'nin bu hasarı hafifletme potansiyelini ortaya koyarak bu alandaki bilgiyi zenginleştirmiştir. Gerçekten de, LN'nin sıçanların dalak dokusundaki RF ile ilişkili protein seviyeleri, biyokimyasal ve histolojik değişiklikleri iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Bu çalışma, HO-1'i hedeflemenin bazı hastalıkların tedavisinde umut verici bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, burada vurgulanması gereken önemli bir nokta, HO-1 seviyelerinin fizyolojik sınırlarının dikkate alınması gerektiğidir. Aksi takdirde, aşırı HO-1 aktivitesi, hücresel dengeyi bozarak istenmeyen yan etkilere yol açabilir.

Ayrıca, HO-1 aracılı ferroptozu hedefleyerek RF kaynaklı toksisitenin önlenmesine yönelik yeni stratejiler geliştirmek mümkündür. Bu bağlamda, antioksidan tedavilerin yanı sıra, hücresel savunma mekanizmalarını güçlendiren diğer moleküllerin de araştırılması önemlidir. Örneğin, doğal bileşiklerin ve bitkisel ekstraktların potansiyel faydaları, gelecekteki çalışmalarda incelenmelidir.

Sonuç olarak, RF'ye bağlı dalak hasarının mekanizmasının muhtemelen OS yollarını içerdiği ve dalak dokusunda hasara yol açan bu durumun, LN gibi antioksidan ajanların terapötik olarak uygulanmasıyla önlenebileceği sonucuna varılmıştır. Ancak, bu ilginç teoriyi doğrulamak için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır. Gelecek araştırmalar, bu

bulguların insan sağlığı üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak ve potansiyel tedavi yöntemlerini geliştirmek için kritik öneme sahiptir.



KAYNAKÇA

Abraham, N.G., Asija, A., Drummond, G. & Peterson, S. (2007). "Heme oxygenase -1 gene therapy: recent advances and therapeutic applications". *Current Gene Therapy*, 7(2), 89-108.

Abrahám, S., Hermes, E., Szabó, A., Ferencz, A., Jancsó, Z., Duda, E., Abrahám, M., Lázár, G. & Lázár, G. Jr. (2012). "Effects of Kupffer cell blockade on the hepatic expression of metallothionein and heme oxygenase genes in endotoxemic rats with obstructive jaundice". *Life Sciences*, 90(3-4), 140-146.

Abulfathi, A.A., Decloedt, E.H., Svensson, E.M., Diacon, A.H., Donald, P. & Reuter, H. (2019). "Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Rifampicin in Human Tuberculosis". *Clinical Pharmacokinetics*, 58(9), 1103-1129.

Adams, R.A., Leon, G., Miller, N.M., Reyes, S.P., Thantrong, C.H., Thokkadam, A.M., Lemma, A.S., Sivaloganathan, D.M., Wan, X. & Brynildsen, M.P. (2021). "Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure". *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 74(11), 786-798.

Adedoyin, O., Boddu, R., Traylor, A., Lever, J. M., Bolisetty, S., George, J. F. & Agarwal, A. (2018). "Heme oxygenase-1 mitigates ferroptosis in renal proximal tubule cells. *American journal of physiology*". *Renal physiology*, 314(5), 702-714.

Agarwal, A., Das, P., Mathur, S.B., Hanif, M., Dwivedi, K.K., Khanna, A., Arora, R. & Dabas, A. (2024). "Isoniazid resistance in Rifampicin sensitive pulmonary tuberculosis in children and adolescents". *The Indian Journal of Tuberculosis*, 71(1), 145-148.

Agarwal, A., Prabakaran, S. & Allamaneni, S. (2006). "What an andrologist/urologist should know about free radicals and why". *Urology*, 67(1), 2-8.

Ahmad, A., Prakash, R., Kumar, A., Fareed, M., Ali, N., Raza, S.S. & Khan, R. (2024). "Therapeutic cargo-free Linalool-based nanoparticles attenuate inflammation by targeting NLRP3 Inflammasome". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 134337.

Al-Rehemi, S.M., Dosh, R.H., Frayyeh, M.J., Al Mudhafar, R.H. & Abdulkadhim, H. (2024). "Histopathological, immunohistochemical and physiological study for the hepatoprotective effect of melatonin against inh rifampicin-induced hepatotoxicity in mice model". *Wiadomosci Lekarskie*, 77(9), 1745-1752.

Altinoz, E., Oner, Z., Elbe, H., Uremis, N. & Uremis, M. (2022). "Linalool exhibits therapeutic and protective effects in a rat model of doxorubicin-induced kidney injury by modulating oxidative stress". *Drug and Chemical Toxicology*, 45(5), 2024-2030.

An, Q., Ren, J.N., Li, X., Fan, G., Qu, S.S., Song, Y., Li, Y. & Pan, S.Y. (2021). "Recent updates on bioactive properties of linalool". *Food & Function*, 12(21), 10370-10389.

Anwer, T., Alruwaili, M.N., Alshahrani, S., Alqahtani, S.S., Jali, A., Ahmed, R.A., Alam, M.F. & Moni, S.S. (2023). "Hepatoprotective potential of diosmin against hepatotoxic effect of isoniazid and rifampin in wistar rats". *Human & Experimental Toxicology*, 42.

Awodele, O., Akintonwa, A., Osunkalu, V.O. & Coker, H.A. (2010). "Modulatory activity of antioxidants against the toxicity of Rifampicin in vivo". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 52(1), 43-6.

Azirak, S. & Özgöçmen, M. (2023). "Linalool prevents kidney damage by inhibiting rifampicin-induced oxidative stress and apoptosis". *Tissue & Cell*, 82, 102097.

Babaeenezhad, E., Dezfoulan, O., Moradi Sarabi, M. & Ahmadvand, H. (2024). "Monoterpene linalool restrains gentamicin-mediated acute kidney injury in rats by subsiding oxidative stress, apoptosis, and the NF- κ B/iNOS/TNF- α /IL-1 β pathway and regulating TGF- β ". *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 397(8), 5701-5714.

Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K. & Hammond, C. L. (2009). "Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases". *Biological Chemistry*, 390(3), 191-214.

Bedir, F., Kocaturk, H., Turangezli, O., Sener, E., Akyuz, S., Ozgeris, F.B., Dabanlioglu, B., Suleyman, H., Altuner, D. & Suleyman, B. (2021). "The protective effect of lycopene against oxidative kidney damage associated with combined use of isoniazid and rifampicin in rats". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 54(8), e10660.

Boeree, M.J., Diacon, A.H., Dawson, R., Narunsky, K., du Bois, J., Venter, A., Phillips, P.P., Gillespie, S.H., McHugh, T.D., Hoelscher, M., Heinrich, N., Rehal, S., van Soolingen, D., van Ingen, J., Magis-Escurra, C., Burger, D., Plemper van Balen, G., Aarnoutse, R.E. & PanACEA, Consortium. (2015). "A dose-ranging trial to optimize the dose of rifampin in the treatment of tuberculosis". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191(9), 1058-1065.

Bouyahya, A., Bakrim, S., Aboulaghras, S., El Kadri, K., Aanniz, T., Khalid, A., Abdalla, A.N., Abdallah, A.A., Ardianto, C., Ming, L.C. & El Omari, N. (2024). "Bioactive compounds from nature: Antioxidants targeting cellular transformation in response to epigenetic perturbations induced by oxidative stress". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 174, 116432.

Brouard, S., Berberat, P. O., Tobiasch, E., Seldon, M. P., Bach, F. H. & Soares, M. P. (2002). "Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis". *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17950-17961.

Brouard, S., Otterbein, L.E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F.H., Choi, A.M. & Soares, M.P. (2000). "Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis". *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1015-1026.

Câmara, J.S., Perestrelo, R., Ferreira, R., Berenguer, C.V., Pereira, J.A.M., & Castilho, P.C. (2024). "Plant-Derived Terpenoids: A Plethora of Bioactive Compounds with Several

Health Functions and Industrial Applications-A Comprehensive Overview". *Molecules* (Basel, Switzerland), 29(16), 3861.

Campbell, N.K., Fitzgerald, H.K. & Dunne, A. (2021). "Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1". *Nature Reviews Immunology*, 21(7), 411-425.

Celik, S. & Ozkaya, A. (2002). "Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H₂O₂". *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6), 547-552.

Chang, L.C., Chiang, S.K., Chen, S.E., Yu, Y.L., Chou, R.H. & Chang, W.C. (2018). "Heme oxygenase-1 mediates BAY 11-7085 induced ferroptosis". *Cancer Letters*, 416, 124–137.

Chang, W.H., Hsu, H.T., Lin, C.C., An, L.M., Lee, C.H., Ko, H.H., Lin, C.L. & Lo Y.C. (2024). "Linalool, a Fragrance Compound in Plants, Protects Dopaminergic Neurons and Improves Motor Function and Skeletal Muscle Strength in Experimental Models of Parkinson's Disease". *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2514.

Chen, H., Nie, P., Li, J., Wu, Y., Yao, B., Yang, Y., Lash, G.E. & Li, P. (2024a). "Cyclophosphamide induces ovarian granulosa cell ferroptosis via a mechanism associated with HO-1 and ROS-mediated mitochondrial dysfunction". *Journal of Ovarian Research*, 17(1), 107.

Chen, J., Boyaci, H. & Campbell, E.A. (2021). "Diverse and unified mechanisms of transcription initiation in bacteria". *Nature Reviews Microbiology*, 19(2), 95-109.

Chen, J., Kos, R., Garssen, J. & Redegeld, F. (2019). "Molecular Insights into the Mechanism of Necroptosis: The Necrosome As a Potential Therapeutic Target". *Cells*, 8(12), 1486.

Chen, X., Shang, S., Yan, F., Jiang, H., Zhao, G., Tian, S., Chen, R., Chen, D. & Dang, Y. (2023). "Antioxidant Activities of Essential Oils and Their Major Components in Scavenging Free Radicals, Inhibiting Lipid Oxidation and Reducing Cellular Oxidative Stress". *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(11), 4559.

Chen, Y., Zhang, J., Tian, Y., Xu, X., Wang, B., Huang, Z., Lou, S., Kang, J., Zhang, N., Weng, J., Liang, Y. & Ma, W. (2024b). "Iron accumulation in ovarian microenvironment damages the local redox balance and oocyte quality in aging mice". *Redox Biology*, 73, 103195.

Chenxu, G., Minxuan, X., Yuting, Q., Tingting, G., Jing, F., Jinxiao, L., Sujun, W., Yongjie, M., Deshuai, L., Qiang, L., Linfeng, H., Xuyuan, N., Mingxing, W., Ping, H. & Jun, T. (2019). "Loss of RIP3 initiates annihilation of high-fat diet initialized nonalcoholic hepatosteatosis: A mechanism involving Toll-like receptor 4 and oxidative stress". *Free Radical Biology & Medicine*, 134, 23-41.

Chrissobolis, S. & Faraci, F.M. (2008). "The role of oxidative stress and NADPH oxidase in cerebrovascular disease". *Trends in Molecular Medicine*, 14(11), 495-502.

- Dai, W.Z., Bai, Z.F., He, T.T., Zhan, X.Y., Li, Q., Zhao, J. & Xiao, X.H. (2022). "Schisandrin C improves acetaminophen-induced liver injury in mice by regulating Nrf2 signaling pathway". *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*, 47(19), 5299-5305.
- Danjuma, L., Mok, P.L., Higuchi, A., Hamat, R.A., Teh, S.W., Koh, A.E., Munusamy, M.A., Arulselvan, P., Rajan, M., Nambi, A., Swamy, K.B., Vijayaraman, K., Murugan, K., Natarajaseenivasan, K. & Subbiah, S.K. (2018). "Modulatory and regenerative potential of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells on rifampicin-induced kidney toxicity". *Regenerative Therapy*, 9, 100-110.
- D'Autréaux, B. & Toledano, M.B. (2007). "ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813-824.
- Davoodi, F., Azizi, S., Aghazadeh, S. & Dezfoulan, O. (2024). "Effects of linalool on postoperative peritoneal adhesions in rats". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology*, 397(7), 5145-5155.
- de Almeida, R.N., Araújo, D.A., Gonçalves, J.C., Montenegro, F.C., de Sousa, D.P., Leite, J.R., Mattei, R., Benedito, M.A., de Carvalho, J.G., Cruz, J.S. & Maia, J.G. (2009). "Rosewood oil induces sedation and inhibits compound action potential in rodents". *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3), 440-443.
- Dheda, K., Mirzayev, F., Cirillo, D.M., Udwadia, Z., Dooley, K.E., Chang, K.C., Omar, S.V., Reuter, A., Perumal, T., Horsburgh, C.R., Jr, Murray, M. & Lange, C. (2024). "Multidrug-resistant tuberculosis". *Nature Reviews Disease Primers*, 10(1), 22.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., Morrison, B. 3rd, & Stockwell, B. R. (2012). "Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death". *Cell*, 149(5), 1060-1072.
- Dong, Y., Huang, J., Lin, X., Zhang, S., Jiao, Y., Liang, T., Chen, Z. & Huang, R. (2014). "Hepatoprotective effects of Yulangsan polysaccharide against isoniazid and rifampicin-induced liver injury in mice". *Journal of Ethnopharmacology*, 152(1), 201-206.
- Drummond, G.S., Baum, J., Greenberg, M., Lewis, D. & Abraham, N.G. (2019). "HO-1 overexpression and underexpression: Clinical implications". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 673, 108073.
- Duvigneau, J.C., Esterbauer, H. & Kozlov, AV. (2019). "Role of Heme Oxygenase as a Modulator of Heme-Mediated Pathways". *Antioxidants (Basel)*, 8(10), 475.
- El-Sokkary, G.H., Omar, H.M., Hassanein, A.F., Cuzzocrea, S. & Reiter, R.J. (2002). "Melatonin reduces oxidative damage and increases survival of mice infected with *Schistosoma mansoni*". *Free Radical Biology & Medicine*, 32(4), 319-332.

Everse, J. & Coates, P.W. (2009). "Neurodegeneration and peroxidases". *Neurobiology of Aging*, 30(7), 1011-1025.

Fang, X., Wang, H., Han, D., Xie, E., Yang, X., Wei, J., Gu, S., Gao, F., Zhu, N., Yin, X., Cheng, Q., Zhang, P., Dai, W., Chen, J., Yang, F., Yang, H.T., Linkermann, A., Gu, W., Min, J. & Wang, F. (2019). "Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(7), 2672–2680.

Fei, L., Jingyuan, X., Fangte, L., Huijun, D., Liu, Y., Ren, J., Jinyuan, L. & Linghui, P. (2020). "Preconditioning with rHMGB1 ameliorates lung ischemia-reperfusion injury by inhibiting alveolar macrophage pyroptosis via the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway". *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 301.

Fernández-Mendivil, C., Luengo, E., Trigo-Alonso, P., García-Magro, N., Negro, P. & López, M.G. (2021). "Protective role of microglial HO-1 blockade in aging: Implication of iron metabolism". *Redox Biology*, 38, 101789.

Forrest, GN. & Tamura, K. (2010). "Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections". *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 14-34.

Fortes, G.B., Alves, L.S., de Oliveira, R., Dutra, F.F., Rodrigues, D., Fernandez, P.L., Souto-Padron, T., De Rosa, M.J., Kelliher, M., Golenbock, D., Chan, F.K. & Bozza, M.T. (2012). "Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production". *Blood*, 119(10), 2368-2375.

Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. & Kroemer, G. (2007). "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications". *Cell Death and Differentiation*, 14(7), 1237-1243.

Gautam, N., Mantha, A.K. & Mittal, S. (2014). "Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view". *BioMed Research International*, 2014, 154106.

Germanova, D., Keirsse, J., Köhler, A., Hastir, J.F., Demetter, P., Delbauve, S., Elkrim, Y., Verset, L., Larbanoix, L., Preyat, N., Laurent, S., Nedospasov, S., Donckier, V., Van Ginderachter, J.A. & Flamand, V. (2021). "Myeloid tumor necrosis factor and heme oxygenase-1 regulate the progression of colorectal liver metastases during hepatic ischemia-reperfusion". *International Journal of Cancer*, 148(5), 1276-1288.

Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E. & Pelicci, P.G. (2007). "Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 722-728.

Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J. (2006). "NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later". *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1493-1505.

Gordon, D.M., Blomquist, T.M., Miruzzi, S.A., McCullumsmith, R., Stec, D.E. & Hinds, T.D. Jr. (2019). "RNA sequencing in human HepG2 hepatocytes reveals PPAR- α mediates transcriptome responsiveness of bilirubin". *Physiological Genomics*, 51(6), 234-240.

Grosset, J. & Leventis, S. (1983). “Adverse effects of rifampin”. *Reviews of Infectious Diseases*, 5(3), 440-446.

Grunewald, S.T.F., Rezende, A.B., Figueiredo, B.B.M., Mendonça, A.C.P., Almeida, C.S., de Oliveira, E.E., de Paoli, F. & Teixeira, H.C. (2017). “Autotransplantation of Spleen Mitigates Drug-Induced Liver Damage in Splenectomized Mice”. *Journal of Investigative Surgery : the Official Journal of the Academy of Surgical Research*, 30(6), 368–375.

Guerrero-Hue, M., García-Caballero, C., Palomino-Antolín, A., Rubio-Navarro, A., Vázquez-Carballo, C., Herencia, C., Martín-Sánchez, D., Farré-Alins, V., Egea, J., Cannata, P., Praga, M., Ortiz, A., Egido, J., Sanz, A.B. & Moreno, J.A. (2019). “Curcumin reduces renal damage associated with rhabdomyolysis by decreasing ferroptosis-mediated cell death”. *FASEB Journal*, 33(8), 8961-8975.

Guo, F., Chen, Q., Liang, Q., Zhang, M., Chen, W., Chen, H., Yun, Y., Zhong, Q. & Chen, W. (2021). “Antimicrobial Activity and Proposed Action Mechanism of Linalool Against *Pseudomonas fluorescens*”. *Frontiers Microbiology*, 12, 562094.

Halliwell, B. (2024). “Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(1), 13-33.

Hamanaka, R.B. & Chandel, N.S. (2010). “Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes”. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(9), 505-513.

Hassanen, E.I., Khalaf, A.A., Tohamy, A.F., Mohammed, E.R. & Farroh, K.Y. (2019). “Toxicopathological and immunological studies on different concentrations of chitosan-coated silver nanoparticles in rats”. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4723

He, X., Song, Y., Wang, L. & Xu, J. (2020). “Protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate on isoniazid/rifampicin-induced liver injury in rats”. *Molecular Medicine Reports*, 21(1), 463-469.

Henwood, S.Q., Liebenberg, W., Tiedt, L.R., Lötter, A.P. & de Villiers, M.M. (2001). “Characterization of the solubility and dissolution properties of several new rifampicin polymorphs, solvates, and hydrates”. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(10), 1017-1030.

Hong, Y., Boiti, A., Vallone, D. & Foulkes, N.S. (2024). “Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution”. *Antioxidants (Basel)*, 13(3), 312.

Hosseini, S.H., Bibak, H., Ghara, A.R., Sahebkar, A. & Shakeri, A. (2021). “Ethnobotany of the medicinal plants used by the ethnic communities of Kerman province, Southeast Iran”. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 17(1), 31.

- Hou, D.Y., Lu, J.J., Zhang, X., Abudukeyoumu, A., Li, M.Q., Zhu, X.Y. & Xie, F. (2024). "Heme metabolism and HO-1 in the pathogenesis and potential intervention of endometriosis". *American Journal of Reproductive Immunology*, 91(5), e13855.
- Hou, W., Nsengimana, B., Yan, C., Nashan, B. & Han, S. (2022). "Involvement of endoplasmic reticulum stress in rifampicin-induced liver injury". *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1022809.
- Huang, S.Q., Yi, C., Liu, X.X., Yang, H.Y., Zhang, L.Q., Tang, Y., Zhang, X.L. & Liu, W.L. (2024a). "Chemical composition and pharmacological effects of *Cinnamomum camphora* chvar. borneol essential oil: a review". *China Journal of Chinese Materia Medica*, 49(11), 2863-2870.
- Huang, Z., Sun, K., Luo, Z., Zhang, J., Zhou, H., Yin, H., Liang, Z. & You, J. (2024b). "Spleen-targeted delivery systems and strategies for spleen-related diseases". *Journal of Controlled Release*, 370, 773-797.
- Hudson, R. (1996). "The value of lavender for rest and activity in the elderly patient". *Complementary Therapies in Medicine*, 4(1), 52-57.
- Hussain, T., Subaiea, G.M., Firdous, H. (2018). "Hepatoprotective Evaluation of *Trapa natans* against Drug-induced Hepatotoxicity of Antitubercular Agents in Rats". *Pharmacognosy Magazine*, 14, 180-85.
- Ing, S.K., Lee, G.W.C., Leong, T.S., Lee, Y.H., Lau, G.Y.L., Yusof, N.N., Chang, A.K.W. & Wong, K.K.Y. (2023). "Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis: an unusual complication in disseminated *Mycobacterium tuberculosis*". *Clinical Medicine*, 23(4), 414-416.
- Ishtiaq, A., Mushtaq, I., Rehman, H., Mushtaq, I., Mushtaq, I., Abbasi, S.W., Liaqat, F., Rasheed, A., Ahmad, S., Akhtar, Z. & Murtaza, I. (2024). "Tetra aniline-based polymers ameliorate BPA-induced cardiotoxicity in Sprague Dawley rats, in silico and in vivo analysis". *Life Sciences*, 358, 123104.
- Jin, Z., Zhang, H., Bai, L., Yue, L., Zhang, W., Liang, J., Chang, B., Yang, Y., Hu, Z., Chen, L. & Guo, C. (2023). "Synovium is a sensitive tissue for mapping the negative effects of systemic iron overload in osteoarthritis: identification and validation of two potential targets". *Journal of Translational Medicine*, 21(1), 661.
- Jorgensen, I. & Miao, E.A. (2015). "Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens". *Immunological Reviews*, 265(1), 130-142.
- Kang, X., Kong, F., Wu, X., Ren, Y., Wu, S., Wu, K., Jiang, Z. & Zhang, W. (2015). "High glucose promotes tumor invasion and increases metastasis-associated protein expression in human lung epithelial cells by upregulating heme oxygenase-1 via reactive oxygen species or the TGF- β 1/PI3K/Akt signaling pathway". *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(3), 1008-1022.

Kashimura, M. (2020). "The human spleen as the center of the blood defense system". *International Journal of Hematology*, 112, 147–158.

Kaya, S. & Yalçın, T. (2024). "Linalool may have a therapeutic effect on cadmium-induced nephrotoxicity by regulating NF- κ B/TNF and GRP78/CHOP signaling pathways". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 86, 127510.

Keane, J.A. & Ealy, A.D. (2024). "An Overview of Reactive Oxygen Species Damage Occurring during In Vitro Bovine Oocyte and Embryo Development and the Efficacy of Antioxidant Use to Limit These Adverse Effects". *Animals (Basel)*, 14(2), 330.

Khadka, P., Dummer, J., Hill, P.C., Katare, R. & Das, S.C. (2023). "A review of formulations and preclinical studies of inhaled rifampicin for its clinical translation". *Drug Delivery and Translational Research*, 13(5), 1246-1271.

Khadka, P., Hill, P.C., Zhang, B., Katare, R., Dummer, J. & Das, S.C. (2020). "A study on polymorphic forms of rifampicin for inhaled high dose delivery in tuberculosis treatment". *International Journal of Pharmaceutics*, 587, 119602.

Khadka, P., Sinha, S., Tucker, I.G., Dummer, J., Hill, P.C., Katare, R. & Das, S.C. (2021). "Pharmacokinetics of rifampicin after repeated intra-tracheal administration of amorphous and crystalline powder formulations to Sprague Dawley rats". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 162, 1-11.

Kishi, S., Nagasu, H., Kidokoro, K. & Kashihara, N. (2024). "Oxidative stress and the role of redox signalling in chronic kidney disease". *Nature Reviews Nephrology*, 20(2), 101-119.

Kuroda, K., Inoue, N., Ito, Y., Kubota, K., Sugimoto, A., Kakuda, T. & Fushiki, T. (2005). "Sedative effects of the jasmine tea odor and (R)-(-)-linalool, one of its major odor components, on autonomic nerve activity and mood states". *European Journal of Applied Physiology*, 95(2-3), 107-114.

Kwon, M.Y., Park, E., Lee, S.J. & Chung, S.W. (2015). "Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death". *Oncotarget*, 6(27), 24393–24403.

Lazaar, H., Malki, Y., Bouhout, T., Serji, B. & El Harroudi, T. (2021). "Partial Splenectomy for a Sizeable Cavernous Hemangioma: Case Report and a Review of the Literature". *Cureus*, 13(1), e12882.

Lee, C.T., Hsieh, C.F. & Wang, J.Y. (2021). "Bisphenol a Induces Autophagy Defects and AIF-Dependent Apoptosis via HO-1 and AMPK to Degenerate N2a Neurons". *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 10948.

Lenti, M.V., Luu, S., Carsetti, R., Osier, F., Ogwang, R., Nnodu, O.E., Wiedermann, U., Spencer, J., Locatelli, F., Corazza, G.R. & Di Sabatino, A. (2022). "Asplenia and spleen hypofunction". *Nature Reviews Disease Primers*, 8(1), 71.

Lewis, S.M., Williams, A. & Eisenbarth, S.C. (2019). "Structure and function of the immune system in the spleen". *Science Immunology*, 4(33), eaau6085.

- Li, X.J., Yang, Y.J., Li, Y.S., Zhang, W.K. & Tang, H.B. (2016). “ α -Pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2”. *Journal of Ethnopharmacology*, 179, 22-26.
- Lin, X., Zhao, X., Chen, Q., Wang, X., Wu, Y. & Zhao, H. (2023). “Quercetin ameliorates ferroptosis of rat cardiomyocytes via activation of the SIRT1/p53/SLC7A11 signaling pathway to alleviate sepsis-induced cardiomyopathy”. *International Journal of Molecular Medicine*, 52(6), 116.
- Linck, V.M., da Silva, A.L., Figueiró, M., Caramão, E.B., Moreno, P.R. & Elisabetsky, E. (2010). “Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice”. *Phytomedicine*, 17(8-9), 679-683.
- Liu, M., Wang, Y., Li, S., Hou, X., Li, T., Xu, Z., Chen, F., Zhou, Y., Xia, L. & Wang, W. (2023a). “Attenuates reactive oxygen species: induced pyroptosis via activation of the Nrf2/HO-1 signal pathway in models of trigeminal neuralgia”. *Scientific Reports*, 13(1), 18111.
- Liu, X.M., Chapman, G.B., Peyton, K.J., Schafer, A.I. & Durante, W. (2003). “Antiapoptotic action of carbon monoxide on cultured vascular smooth muscle cells”. *Experimental Biology and Medicine*, 228(5), 572-575.
- Liu, X., Ma, Y., Liu, Y., Li, Q., Zhang, H., Fu, S., Chen, S., Li, H., Li, S. & Hou, P. (2023b). “Near-infrared molecular sensor for visualizing and tracking ONOO- during the process of anti-tuberculosis drug-induced liver damage”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(29-30), 7187-7196.
- Liu, Y.T., Lin, Z.M., He, S.J. & Zuo, J.P. (2019). “Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target in rheumatic diseases”. *Life Sciences*, 218, 205-212.
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A. & Dulak, J. (2016). “Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism”. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(17), 3221-3247.
- Longhi, M.S., Vuerich, M., Kalbasi, A., Kenison, J.E., Yeste, A., Csizmadia, E., Vaughn, B., Feldbrugge, L., Mitsunashi, S., Wegiel, B., Otterbein, L., Moss, A., Quintana, F.J. & Robson, S.C. (2017). “Bilirubin suppresses Th17 immunity in colitis by upregulating CD39”. *JCI Insight*, 2(9), e92791.
- López, V., Nielsen, B., Solas, M., Ramírez, M.J. & Jäger, A.K. (2017). “Exploring Pharmacological Mechanisms of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on Central Nervous System Targets”. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 280.
- Lu, C., Zhang, Z., Fan, Y., Wang, X., Qian, J. & Bian, Z. (2024). “Shikonin induces ferroptosis in osteosarcomas through the mitochondrial ROS-regulated HIF-1 α /HO-1 axis”. *Phytomedicine*, 135, 156139.

- Lu, X., Huang, L., Scheller, H.V. & Keasling, J.D. (2023). "Medicinal terpenoid UDP-glycosyltransferases in plants: recent advances and research strategies". *Journal of Experimental Botany*, 74(5), 1343-1357.
- Lu, Y.H., Hong, Y., Zhang, T.Y., Chen, Y.X., Wei, Z.J. & Gao, C.Y. (2022). "Rosmarinic acid exerts anti-inflammatory effect and relieves oxidative stress via Nrf2 activation in carbon tetrachloride-induced liver damage". *Food & Nutrition Research*, 66, 8359.
- Lv, Y.T., Liu, T.B., Li, Y., Wang, Z.Y., Lian, C.Y. & Wang, L. (2024). "HO-1 activation contributes to cadmium-induced ferroptosis in renal tubular epithelial cells via increasing the labile iron pool and promoting mitochondrial ROS generation". *Chemico-Biological Interactions*, 399, 111152.
- Machado, T.Q., Da Fonseca, A.C.C., Duarte, A.B.S., Robbs, B.K. & De Sousa, D.P. (2022). "A Narrative Review of the Antitumor Activity of Monoterpenes from Essential Oil: An Update". *BioMed Research International*, 2022, 6317201.
- Maczka, W., Duda-Madej, A., Grabarczyk, M. & Wińska, K. (2022). "Natural Compounds in the Battle against Microorganisms-Linalool". *Molecules*, 27(20), 6928.
- Maliar, T., Blažková, M., Polák, J., Maliarová, M., Ťurgeová, E. & Viskupičová, J. (2024). "Antioxidant and Pro-Oxidant Properties of Selected Clinically Applied Antibiotics: Therapeutic Insights". *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 17(10), 1257.
- Malik, I.A., Wilting, J., Ramadori, G. & Naz, N. (2017). "Reabsorption of iron into acutely damaged rat liver: A role for ferritins". *World Journal of Gastroenterology*, 23(41), 7347-7358.
- Mancardi, D., Mezzanotte, M., Arrigo, E., Barinotti, A. & Roetto, A. (2021). "Iron Overload, Oxidative Stress, and Ferroptosis in the Failing Heart and Liver". *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1864.
- Mandal, D., Sarkar, T. & Chakraborty, R. (2023). "Critical Review on Nutritional, Bioactive, and Medicinal Potential of Spices and Herbs and Their Application in Food Fortification and Nanotechnology". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(2), 1319-1513.
- Manoharan, R.R., Prasad, A., Pospíšil, P. & Kzhyshkowska, J. (2024). "ROS signaling in innate immunity via oxidative protein modifications". *Frontiers in Immunology*, 15, 1359600.
- Matsumoto, A., Hanayama, R., Nakamura, M., Suzuki, K., Fujii, J., Tatsumi, H. & Taniguchi, N. (1998). "A high expression of heme oxygenase-1 in the liver of LEC rats at the stage of hepatoma: the possible implication of induction in uninvolved tissue". *Free Radical Research*, 28(4), 383-391.
- Meade, J., Back, W., Arif, S., Georgescu, C., Tang, J. & Ellis, M. (2024). "Cervical Tuberculous Lymphadenitis Associated With New-Onset Acanthosis Nigricans Following Antitubercular Therapy: A Case Report". *Cureus*, 16(7), e65012.

Mili, A., Birangal, S., Nandakumar, K. & Lobo, R. (2024). "A computational study to identify Sesamol derivatives as NRF2 activator for protection against drug-induced liver injury (DILI)". *Molecular Diversity*, 28(3), 1709-1731.

Morgan, M.J. & Liu, Z.G. (2011). "Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling". *Cell Research*, 21(1), 103-115.

Niemi, M., Backman, J.T., Fromm, M.F., Neuvonen, P.J. & Kivistö, K.T. (2003). "Pharmacokinetic interactions with rifampicin: clinical relevance". *Clinical Pharmacokinetics*, 42(9), 819-50.

Nishimura, Y., Nomiyama, K., Okamoto, S., Igarashi, M., Sato, Y., Okamoto, H., Kamezaki, A., Itadani, M., Kuribayashi, F. & Yamauchi, A. (2024). "Anti-fatigue activity of methyl dihydrojasmonate and linalool in a rat model evaluated by a novel index for neuro-immune and oxidative stress interactions". *Scientific Reports*, 14(1), 10650.

Nitti, M., Piras, S., Brondolo, L., Marinari, U.M., Pronzato, M.A. & Furfaro, A.L. (2018). "Heme Oxygenase 1 in the Nervous System: Does It Favor Neuronal Cell Survival or Induce Neurodegeneration?" *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2260.

Nwidi, L.L. & Teme, R.E. (2018). "Hot aqueous leaf extract of *Lasianthera africana* (Icacinaceae) attenuates rifampicin-isoniazid-induced hepatotoxicity". *Journal of Integrative Medicine*, 16(4), 263-272.

Nyang'wa, B.T., Berry, C., Kazounis, E., Motta, I., Parpieva, N., Tigay, Z., Moodliar, R., Dodd, M., Solodovnikova, V., Liverko, I., Rajaram, S., Rassool, M., McHugh, T., Spigelman, M., Moore, D.A., Ritmeijer, K., du Cros, P., Fielding, K. & TB-PRACTECAL team (2024). "Short oral regimens for pulmonary rifampicin-resistant tuberculosis (TB-PRACTECAL): an open-label, randomised, controlled, phase 2B-3, multi-arm, multicentre, non-inferiority trial". *The Lancet Respiratory Medicine*, 12(2), 117–128.

Ola, O.S. & Sofolahan, T.A. (2021). "A monoterpene antioxidant, linalool, mitigates benzene-induced oxidative toxicities on hematology and liver of male rats". *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 8(1), 39-53.

O'Rourke, S.A., Shanley, L.C. & Dunne, A. (2024). "The Nrf2-HO-1 system and inflammaging". *Frontiers in Immunology*, 15, 1457010.

Otterbein, L.E., Soares, M.P., Yamashita, K. & Bach, F.H. (2003). "Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme". *Trends in Immunology*, 24(8), 449-455.

Ozcelik, M., Erisir, M., Guler, O. & Baykara, M. (2020). "The Effect of N-Acetylcysteine on Oxidant/Antioxidant Status in Irradiated Rats". *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(3), 221-226.

Özgöçmen, M. & Azırak, S. (2023). "The Curative Role of Linalool In Rifampicin-Induced Brain Tissue Damage". *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 30(3), 362-370.

Pandur, E., Major, B., Rák, T., Sipos, K., Csutak, A. & Horváth, G. (2024). "Linalool and Geraniol Defend Neurons from Oxidative Stress, Inflammation, and Iron Accumulation in In Vitro Parkinson's Models". *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 13(8), 917.

Peana, A.T., D'Aquila, P.S., Chessa, M.L., Moretti, M.D., Serra, G. & Pippia, P. (2003). "(-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain". *European Journal of Pharmacology*, 460(1), 37-41.

Perkins N.D. (2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 49-62.

Perumal Kannabiran, B., Palaniappan, N.A., Manoharan, T., Paramasivam, P.K., Saini, J.K., Ansari, M.S., Jayabal, L., Aggarwal, A.N., Garg, R., Subramanyam, B., Thakur, D., Pantula, S., Ramesh, P.M., Vijayachandar, G.S., Natarajan, S., Ammayappan, R.K., Manpreet, B., Ganesan, M., Angamuthu, D., Chinnaiyan, P., Singh, M., Chandrasekaran, P. & Swaminathan, S. (2024). "Safety and Efficacy of 25 mg/kg and 35 mg/kg vs 10 mg/kg Rifampicin in Pulmonary TB: A Phase IIb Randomized Controlled Trial". *Open Forum Infectious Diseases*, 11(3), ofae034.

Petrache, I., Otterbein, L.E., Alam, J., Wiegand, G.W. & Choi, A.M. (2000). "Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts". *American journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278, L312-L319.

Piperno, A., Pelucchi, S. & Mariani, R. (2023). "Hereditary Hyperferritinemia". *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2560.

Pisoschi, A.M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G. & Serban, A.I. (2021). "Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112891.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. & Bitto, A. (2017). "Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763.

Pizzorno, J. (2014). "Glutathione!". *Integrative Medicine(Encinitas)*, 13(1), 8-12.

Qian, Z., Zhang, Q., Li, P., Li, Y., Zhang, Y., Li, R., Zhao, T., Xia, M., Chen, Y. & Hong, X. (2024). "A Disintegrin and Metalloproteinase-8 Protects Against Erastin-Induced Neuronal Ferroptosis via Activating Nrf2/HO-1/FTH1 Signaling Pathway". *Molecular Neurobiology*, 61(6), 3490-3502.

Rani, J., Dhull, S.B., Rose, P.K. & Kidwai, M.K. (2024). "Drug-induced liver injury and anti-hepatotoxic effect of herbal compounds: a metabolic mechanism perspective". *Phytomedicine*, 122, 155142.

Raza, H., John, A., Brown, E.M., Benedict, S. & Kambal, A. (2008). "Alterations in mitochondrial respiratory functions, redox metabolism and apoptosis by oxidant 4-hydroxynonenal and antioxidants curcumin and melatonin in PC12 cells". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 226(2), 161-168.

Riva, M.A., Ferraina, F., Paleari, A., Lenti, M.V. & Di Sabatino, A. (2019). "From sadness to stiffness: the spleen's progress". *Internal Emergency Medicine*, 14(5), 739-743.

Ryter, S.W. & Choi, A.M. (2016). "Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation". *Translational Research*, 167(1), 7-34.

Ryter, S.W. (2021). "Heme Oxgenase-1, a Cardinal Modulator of Regulated Cell Death and Inflammation". *Cells*, 10(3), 515.

Sabogal-Guáqueta, A.M., Hobbie, F., Keerthi, A., Oun, A., Kortholt, A., Boddeke, E. & Dolga, A. (2019). "Linalool attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated by glutamate and NMDA toxicity". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109295.

Salehi, B., Azzini, E., Zucca, P., Maria Varoni, E., V. Anil Kumar, N., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Valere Tsouh Fokou, P., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., El Beyrouthy, M., Setzer, W.N., Polito, L., Iriti, M., Sureda, A., Magdalena Quetglas-Llabrés, M., ... Sharifi-Rad, J. (2020). "Plant-Derived Bioactives and Oxidative Stress-Related Disorders: A Key Trend towards Healthy Aging and Longevity Promotion". *Applied Sciences*, 10(3), 947.

Salimi, A., Khodaparast, F., Bohlooli, S., Hashemidanesh, N., Baghal, E. & Rezagholizadeh, L. (2022). "Linalool reverses benzene-induced cytotoxicity, oxidative stress and lysosomal/mitochondrial damages in human lymphocytes". *Drug and Chemical Toxicology*, 45(6), 2454-2462.

Sang, R., Ge, B., Li, H., Zhou, H., Yan, K., Wang, W., Cui, Q. & Zhang, X. (2023). "Taraxasterol alleviates aflatoxin B1-induced liver damage in broiler chickens via regulation of oxidative stress, apoptosis and autophagy". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 251, 114546.

Sankar, M., Rajkumar, J. & Sridhar, D. (2015). "Hepatoprotective Activity of Heptoplus on Isoniazid and Rifampicin Induced Liver Damage in Rats". *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(5), 556-562.

Santos, K.P., Rodero, C.F., Ribeiro, C.M., Gremião, M.P.D., Peccinini, R.G., Pavan, F.R., Pearce, C., Gonzalez-Juarrero, M. & Chorilli, M. (2022). "Development of a Mucoadhesive Liquid Crystal System for the Administration of Rifampicin Applicable in Tuberculosis Therapy". *Life (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1138.

Scarpa, E.S., Antonelli, A., Balercia, G., Sabatelli, S., Maggi, F., Caprioli, G., Giacchetti, G. & Micucci, M. (2024). "Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anti-Diabetic, and Pro-Osteogenic Activities of Polyphenols for the Treatment of Two Different Chronic Diseases: Type 2 Diabetes Mellitus and Osteoporosis". *Biomolecules*, 14(7), 836.

Schipper, H.M., Song, W., Tavitian, A. & Cressatti, M. (2019). "The sinister face of heme oxygenase-1 in brain aging and disease". *Progress in Neurobiology*, 172, 40-70.

Sharma, R. & Sharma, V.L. (2017). "Deleterious effects of 28-day oral co-administration of first-line anti-TB drugs on spleen, blood and bone marrow chromosomes in normal rat". *Drug and Chemical Toxicology*, 40(2), 154-163.

Shehata, M.M., Saad Eldien, H.M., Meligy, F.Y. & Bahaidarh, S.Y. (2019). "The Possible Protective Role of Barley Seeds on the Spleen after Administration of Glucocorticoids in Adult Albino Rats: A Histological and Immunohistochemical Study". *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 7(4), 171-180.

Short, C., Lim, H.K., Tan, J. & O'Neill, H.C. (2019) "Targeting the Spleen as an Alternative Site for Hematopoiesis". *Bioessays*, 41(5), e1800234.

Singh V. (2024). "Tuberculosis treatment-shortening". *Drug Discovery Today*, 29(5), 103955.

Singh, S.P., Greenberg, M., Glick, Y., Bellner, L., Favero, G., Rezzani, R., Rodella, L.F., Agostinucci, K., Shapiro, J.I. & Abraham, N.G. (2020). "Adipocyte Specific HO-1 Gene Therapy is Effective in Antioxidant Treatment of Insulin Resistance and Vascular Function in an Obese Mice Model". *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 40.

Siu, J.H.Y., Pitcher, M.J., Tull, T.J., Velounias, R.L., Guesdon, W., Montorsi, L., Mahbubani, K.T., Ellis, R., Dhami, P., Todd, K., Kadolsky, U.D., Kleeman, M., D'Cruz, D.P., Saeb-Parsy, K., Bemark, M., Pettigrew, G.J. & Spencer, J. (2022). "Two subsets of human marginal zone B cells resolved by global analysis of lymphoid tissues and blood". *Science Immunology*, 7(69), eabm9060.

Son, Y.J. & McConville, J.T. (2011). "A new respirable form of rifampicin". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(3), 366-76.

Son, Y.J. & McConville, J.T. (2012). "Preparation of sustained release rifampicin microparticles for inhalation". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(9), 1291-302.

Souleymane, M.B., Decroo, T., Soumana, A., Maman Lawan, I., Gagara-Issoufou, A., Halidou-Moussa, S., Ortuño-Gutiérrez, N., Adehossi, E., Mamadou, S., Van Deun, A. & Piubello, A. (2022). "Safety, effectiveness, and adherence of a short and all-oral treatment regimen for the treatment of rifampicin-resistant tuberculosis in Niger: a study protocol of a pragmatic randomised clinical trial with stratified block randomization". *Trials*, 23(1), 1011.

Soulimani, R. & Joshi, R.K. (2020). "Toxicological aspects and pharmaco-therapeutic properties of linalool, a natural terpene derivative of essential oils: Literature studies". *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 8(4), 24-34.

Sun, Y., Chen, P., Zhai, B., Zhang, M., Xiang, Y., Fang, J., Xu, S., Gao, Y., Chen, X., Sui, X. & Li, G. (2020). "The emerging role of ferroptosis in inflammation". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110108.

Sun, Y., Zhang, Y., Ma, N. & Cai, S. (2023). "Rhus chinensis Mill. fruits alleviate liver injury induced by isoniazid and rifampicin through regulating oxidative stress, apoptosis, and bile acid transport". *Journal of Ethnopharmacology*, 310, 116387.

Suresh, A.B., Rosani, A., Patel, P. & Wadhwa, R. (2024). Rifampin In StatPearls. Treasure Island (FL) relationships with ineligible companies. Disclosure: Alan Rosani declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Preeti Patel declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Roopma Wadhwa declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.

Suttner, D.M., Sridhar, K., Lee, C.S., Tomura, T., Hansen, T.N. & Dennery, P.A. (1999). "Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells". *The American Journal of Physiology*, 276(3), 443-451.

Swamy, A.H., Kulkarni, R.V., Koti, B.C., Gadad, P.C., Thippeswamy, A.H. & Gore, A. (2012). "Hepatoprotective Effect of *Cissus quadrangularis* Stem Extract Against Rifampicin-induced Hepatotoxicity in Rats". *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(2), 183-187.

Tamilmani, P., Sathibabu Uddandrao, V.V., Chandrasekaran, P., Saravanan, G., Brahma Naidu, P., Sengottuvelu, S. & Vadivukkarasi, S. (2023). "Linalool attenuates lipid accumulation and oxidative stress in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease via Sirt1/Akt/PPRA- α /AMPK and Nrf-2/HO-1 signaling pathways". *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 47(10), 102231.

Tang, Z., Ju, Y., Dai, X., Ni, N., Liu, Y., Zhang, D., Gao, H., Sun, H., Zhang, J. & Gu, P. (2021). "HO-1-mediated ferroptosis as a target for protection against retinal pigment epithelium degeneration". *Redox Biology*, 43, 101971.

Taratynova, M.O., Tikhonova, E.E., Fedyaeva, I.M., Dementev, D.A., Yuzbashev, T.V., Solovyev, A.I., Sineoky, S.P. & Yuzbasheva, E.Y. (2024). "Boosting Geranyl Diphosphate Synthesis for Linalool Production in Engineered *Yarrowia lipolytica*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 196(3), 1304-1315.

Tenório, M.C.D.S., Graciliano, N.G., Moura, F.A., Oliveira, A.C.M. & Goulart, M.O.F. (2021). "N-Acetylcysteine (NAC): Impacts on Human Health". *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(6), 967.

Tull, T.J., Pitcher, M.J., Guesdon, W., Siu, J.H.Y., Lebrero-Fernández, C., Zhao, Y., Petrov, N., Heck, S., Ellis, R., Dhami, P., Kadolsky, U.D., Kleeman, M., Kamra, Y., Fear, D.J., John, S., Jassem, W., Groves, R.W., Sanderson, J.D., Robson, M.G., D'Cruz D.P., Bemark, M. & Spencer, J. (2021). "Human marginal zone B cell development from early T2 progenitors". *Journal Experimental Medicine*, 218(4), e20202001.

Tyagi, A., Haq, S. & Ramakrishna, S. (2021). "Redox regulation of DUBs and its therapeutic implications in cancer". *Redox Biology*, 48, 102194.

Umaru, I.J. (2023). Introduction to natural product. In S. A. Bhawani, A. Khan, & F. B. Ahmad (Eds.), *Extraction of Natural Products from Agro-Industrial Wastes* (pp. 19-34). Elsevier.

- Valaskova, P., Dvorak, A., Lenicek, M., Zizalova, K., Kutinova-Canova, N., Zelenka, J., Cahova, M., Vitek, L. & Muchova, L. (2019). "Hyperbilirubinemia in Gunn Rats is Associated with Decreased Inflammatory Response in LPS-Mediated Systemic Inflammation". *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2306.
- van Ingen, J., Aarnoutse, R.E., Donald, P.R., Diacon, A.H., Dawson, R., Plemper van Balen, G., Gillespie, S.H. & Boeree, M.J. (2011). "Why Do We Use 600 mg of Rifampicin in Tuberculosis Treatment?". *Clinical Infectious Diseases*, 52(9), e194-e199.
- Varga, I., Babala, J. & Kachlik, D. (2018). "Anatomic variations of the spleen: current state of terminology, classification, and embryological background". *Surgical Radiologic Anatomy*, 40(1), 21-29.
- Vasiliu, A., Martinez, L., Gupta, R.K., Hamada, Y., Ness, T., Kay, A., Bonnet, M., Sester, M., Kaufmann, S.H.E., Lange, C. & Mandalakas, A.M. (2024). "Tuberculosis prevention: current strategies and future directions". *Clinical Microbiology and Infection*, 30(9), 1123-1130.
- Velásquez, G.E., Brooks, M.B., Coit, J.M., Pertinez, H., Vargas, Vásquez D., Sánchez Garavito, E., Calderón, R.I., Jiménez, J., Tintaya, K., Peloquin, C.A., Osso, E., Tierney, D.B., Seung, K.J., Lecca, L., Davies, G.R. & Mitnick, C.D. (2018). "Efficacy and Safety of High-Dose Rifampin in Pulmonary Tuberculosis. A Randomized Controlled Trial". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 198(5), 657-666.
- Vijayan, V., Wagener, F.A.D.T.G. & Immenschuh, S. (2018). "The macrophage heme-heme oxygenase-1 system and its role in inflammation". *Biochemical Pharmacology*, 153, 159-167.
- Vitek, L., Hinds, T.D.Jr, Stec, D.E. & Tiribelli, C. (2023). "The physiology of bilirubin: health and disease equilibrium". *Trends in Molecular Medicine*, 29(4), 315-328.
- Wang, C., Qiu, J., Huang, X., Xu, J. & Pan, L. (2024). "Hemophagocytic lymphohistiocytosis secondary to rifampin treatment: A case report". *Medicine*, 103(29), e39011.
- Wang, Y., Wang, S., Cui, W., He, J., Wang, Z. & Yang, X. (2013). "Olive leaf extract inhibits lead poisoning-induced brain injury". *Neural Regeneration Research*, 8(22), 2021-2029.
- Waza, A.A., Hamid, Z., Ali, S., Bhat, S.A. & Bhat, M.A. (2018). "A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil". *Inflammation Research*, 67(7), 579-588.
- Weinzirl, J., Scheffers, T., Garnitschnig, L., Andrae, L. & Heusser, P. (2020). "Does the Spleen Have a Function in Digestion?" *Medical History, Phylogenetic and Embryological Development of the Splenogastric System. Complementary Medicine Research*, 27(5), 357-363.

- Wojtunik-Kulesza, K.A. & Oniszczuk, A. (2024). “Ability of Selected Monoterpenes to Reduce Fe(III) Ions Being Pro-Neurodegenerative Factors: Tests Based on a FRAP Reaction Extended to 48 Hours”. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 2191.
- Wu, F., Wang, F., Tang, Z., Yang, X., Liu, Y., Zhao, M., Liu, S., Han, S., Zhang, Z. & Chen, B. (2023). “Quercetagenin alleviates zearalenone-induced liver injury in rabbits through Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway”. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1271384.
- Xia, Z., Yu, S. C. & Li, Y. (1997). “The preliminary study on prevention and treatment of neonatal jaundice”. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 77(2), 126-129.
- Xu, M., Zhang, D. & Yan, J. (2024). “Targeting ferroptosis using Chinese herbal compounds to treat respiratory diseases”. *Phytomedicine*, 130, 155738.
- Yang, N., Ko, M., Ahn, M. & Shin, T. (2023). “Hepatoprotective effects of norgalanthamine on carbon tetrachloride induced-hepatotoxicity in mice”. *Drug and Chemical Toxicology*, 46(1), 144-154.
- Yang, S., Ouyang, J., Lu, Y., Harypursat, V. & Chen, Y. (2022). “A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Tuberculosis”. *Frontiers in Immunology*, 13, 842858.
- Yang, Y., Shi, R., She, R., Mao, J., Zhao, Y., Du, F., Liu, C., Liu, J., Cheng, M., Zhu, R., Li, W., Wang, X. & Soomro, M.H. (2015). “Fatal disease associated with Swine Hepatitis E virus and Porcine circovirus 2 co-infection in four weaned pigs in China”. *BMC Veterinary Research*, 11, 77.
- Yoneyama, H., Kondo, C., Yamasaki, A., Nakanishi, T. & Sakai, S. (2015). “Comparison of situs ambiguous patterns between heterotaxy syndromes with polysplenia and asplenia”. *European Journal of Radiology*, 84(11), 2301-2306.
- Yoo, E.J., Lee, H.H., Ye, B.J., Lee, J.H., Lee, C.Y., Kang, H.J., Jeong, G.W., Park, H., Lim, S.W., Lee-Kwon, W., Kwon, H.M. & Choi, S.Y. (2019). “TonEBP Suppresses the HO-1 Gene by Blocking Recruitment of Nrf2 to Its Promoter”. *Frontiers in Immunology*, 10, 850.
- Youssef, L.A., Rebbaa, A., Pampou, S., Weisberg, S.P., Stockwell, B.R., Hod, E.A. & Spitalnik, S.L. (2018). “Increased erythrophagocytosis induces ferroptosis in red pulp macrophages in a mouse model of transfusion”. *Blood*, 131(23), 2581-2593.
- Yu, T., Chen, D., Qi, H., Lin, L. & Tang, Y. (2024). “Resolvins protect against diabetes-induced colonic oxidative stress, barrier dysfunction, and associated diarrhea via the HO-1 pathway”. *Biofactors*, 50(5), 967-979.
- Yue, X., Pang, M., Chen, Y., Cheng, Z., Zhou, R., Wang, Y., Zha, Z. & Huang, L. (2024). “Puerarin alleviates symptoms of preeclampsia through the repression of trophoblast ferroptosis via the CREB/HO-1 pathway”. *Placenta*, 158, 145-155.
- Zeng, J., Weng, Y., Lai, T., Chen, L., Li, Y., Huang, Q., Zhong, S., Wan, S. & Luo, L. (2024). “Procyanidin alleviates ferroptosis and inflammation of LPS-induced RAW264.7

cell via the Nrf2/HO-1 pathway”. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 397(6), 4055-4067.

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y. & Dong, W. (2016). “ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1), 4350965.

Zhang, L., Su, Q.F., Wang, L.S., Lv, M.W., Hou, Y.X. & Li, S.S. (2023). “Linalool: A ubiquitous floral volatile mediating the communication between plants and insects”. *Journal of Systematics and Evolution*, 61(3), 538–549.

Zheng, Y., Cui, B., Sun, W., Wang, S., Huang, X., Gao, H., Gao, F., Cheng, Q., Lu, L., An, Y., Li, X. & Sun, N. (2020). “Potential Crosstalk between Liver and Extra-liver Organs in Mouse Models of Acute Liver Injury”. *International Journal of Biological Sciences*, 16(7), 1166-1179.

Zhou, H., Li, B., Wang, Z., Cai, Y., Yoshida, S., Zhou, Y. & Li, Y. (2025). “HO-1-mediated ferroptosis regulates retinal neovascularization via the COX2/VEGFA axis”. *Free Radical Biology & Medicine*, 226, 84-95.