

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



MUNZUR
ÜNİVERSİTESİ
2008

**RATLARDA DOXORUBİCİN KAYNAKLI KARACİĞER HASARI
ÜZERİNE CURCUMİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Seval YILMAZ

Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği

I. DANIŞMAN
Prof. Dr. Fulya BENZER
II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR

TUNCELİ-2018

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

RATLARDA DOXORUBİCİN KAYNAKLI KARACİĞER HASARI
ÜZERİNE CURCUMİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Seval YILMAZ
(142101102)

Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği

I. DANIŞMAN
Prof. Dr. Fulya BENZER
II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR

TUNCELİ-2018

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA DOXORUBİCİN KAYNAKLI KARACİĞER HASARI
ÜZERİNE CURCUMİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Seval YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 17.07.2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği/oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fulya BENZER
(Munzur Üniversitesi)

İ.DANIŞMAN

Prof. Dr. Mine ERİŞİR
(Fırat Üniversitesi)

ÜYE

Prof. Dr. Murat ÇİMEN
(Munzur Üniversitesi)

ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Numan YILDIRIM
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: YLMÜB016-23

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı "Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu"ndaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Bu çalışma doxorubicin (DXR) kaynaklı karaciğer hasarı üzerine curcuminin (CMN) etkilerinin araştırılması amacıyla yapıldı. Çalışmada 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat, her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. 1. Grup (Kontrol): Oral yolla serum fizyolojik verildi. 2. Grup (CMN grubu): CMN (200 mg kg⁻¹ ağırlık-gün) 7 gün boyunca oral olarak ratlara verildi. 3. Grup (DXR grubu): DXR (40 mg kg⁻¹) tek doz olarak 5. günde intra peritoneal olarak ratlara enjekte edildi. 4. Grup (DXR+CMN 100 grubu): 7 gün süreyle (100 mg kg⁻¹ gün) CMN uygulamasının 5. gününde tek doz DXR (40 mg kg⁻¹) intra peritoneal olarak ratlara enjekte edildi. 5. Grup (DXR+CMN 200 grubu): 7 gün süreyle (200 mg kg⁻¹ gün) CMN uygulamasının 5. gününde tek doz DXR (40 mg kg⁻¹) sonra ratlar hafif sevofloran anestezisi altında ötenazileri yapılarak, doku ve kan örnekleri alındı. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST), Alanin Aminotransferaz (ALT) ve Alkalın Fosfataz (ALP) düzeylerine, karaciğer dokusunda Malondialdehid (MDA), Glutatyon (GSH) ve Nitrik Oksid (NO[•]) düzeyleri ile Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (KAT), Glutatyon Peroksidaz (GPx), Arginaz enzim aktivitelerine bakıldı. Kontrol ile kıyaslandığı zaman serum ALT, AST ve ALP düzeyleri DXR verilen grupta arttı, bu artış CMN ile kısmen düzeltildi. Karaciğer MDA ve NO[•] düzeyleri DXR verilen gruplarda artarken antioksidan enzim aktiviteleri ile GSH düzeyi azaldı. CMN uygulanması; artan MDA ve NO[•] düzeylerini azalttı, azalan antioksidan enzim aktiviteleri ile GSH düzeylerini ise artırdı. Histolojik olarak bakıldığında ise, Kontrol ve CMN gruplarındaki ratların karaciğer dokuları normal histolojik görünümdeydi. Tek başına DXR uygulanan grup ile DXR+CMN 100 grubundaki ratların karaciğerlerinde hepatositlerde şiddetli düzeyde nekrotik değişiklikler ve hidropik dejenerasyon görüldü. Bu gruplarda ayrıca yer yer periportal ve perivasküler alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonlarına rastlandı. DXR ile birlikte CMN 200 uygulanan gruptaki ratların karaciğerlerinde ise nekroz, hidropik dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonlarının azaldığı belirlendi. Sonuç olarak DXR kaynaklı hasarları azaltmada CMN etkili olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, Arginaz, Curcumin, Doksorubisin, Karaciğer, Rat, Serbest Radikal Hasarı

ABSTRACT

Investigation of Curcumin Effects On Doxorubicin-Induced Liver Damage in Rats

This study was conducted to investigate the effects of curcumin (CMN) on doxorubicin (DXR) induced liver injury. In the study, 35 male Sprague Dawley rats were divided into 5 groups as 7 rats in each group. Group 1 (Control): Oral saline was administered. Group 2 (CMN group): CMN (200 mg kg⁻¹ weight day) was given orally to rats for 7 days. Group 3 (DXR group): DXR (40 mg kg⁻¹) was injected intraperitoneally into the rats on day 5 as a single dose. Group 4 (DXR+CMN 100 group): A single dose of DXR (40 mg kg⁻¹) was injected intraperitoneally into the rats on day 5 of CMN administration for 7 days (100 mg kg⁻¹ day). Group 5 (DXR+CMN 200 group): A single dose of DXR (40 mg kg⁻¹) was injected intraperitoneally into the rats on the 5th day of CMN administration for 7 days (200 mg kg⁻¹ day). After twenty-four hours of the experimental application, rats were euthanized under light sevoflurane anesthesia, and tissues and blood samples were taken. Serum Aspartate Aminotransferase (AST), Alanine Aminotransferase (ALT) and Alkaline Phosphatase (ALP) levels, Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH) and Nitric Oxide (NO[•]) levels in liver tissue and Süperoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) and arginase enzyme activities were examined. Serum ALT, AST and ALP levels increased in the DXR group when compared with the control, and this increase was partially corrected with CMN. Liver MDA and NO[•] levels increased in the DXR administered groups while antioxidant enzyme activities and GSH levels decreased. Increased MDA and NO[•] levels were decreased by CMN administration. However, decreased antioxidant enzyme activities and GSH levels were increased. Histologically, the liver tissues of control and CMN groups were in normal histological appearance. Severe necrotic changes and hydropic degeneration were observed in hepatocytes in the DXR+CMN 100 group of rats treated with DXR alone. In these groups, mononuclear cell infiltrations were also occasionally observed in the periportal and perivascular areas. Noxious, hydropic degeneration and mononuclear cell infiltrations were decreased in the livers of the rats in the group treated with DXR and CMN 200. As a result, curcumin is effective in reducing DXR damages.

Key Words: Antioxidants, Arginase, Curcumin, Doxorubicin, Liver, Rat, Free Radical Damage

TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde bilgi ve tecrübesiyle bana ışık tutan I. Danışman hocam danışman Prof. Dr. Fulya BENZER'e, deneysel çalışmamı yürütmemde ve analizlerin yapılmasında her türlü yardımı yapan Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya A.D öğretim üyesi II. Danışman hocam Doç. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımın histolojik analizlerini yapan Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji A.D öğretim üyesi Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA'ya, deneysel ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya A.D öğretim üyesi Dr. Sefa KÜÇÜKLER'e ayrıca bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (MÜNİBAP) teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hayatım ve tüm eğitim yaşantım süresince her zaman yanımda olan, ilgi ve sevgilerini esirgemeyen ve sabırlarıyla destek olan canım aileme, sevgili eşim Mehmet YILMAZ' a, güzel oğluşlarım Ömer Eymen YILMAZ ve Egemen Bera YILMAZ'a sonsuz teşekkürler.

Seval YILMAZ

Tunceli, 2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller	3
1.1.1. Hidroperoksil Radikali	4
1.1.2. Süperoksit Radikali	5
1.1.3. Hidrojen Peroksit.....	5
1.1.4. Tekli Oksijen	5
1.1.5. Üçlü Oksijen.....	5
1.1.6. Nitrik Oksit.....	6
1.2. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri.....	7
1.2.1. Proteinlere Oksidatif Etkileri.....	7
1.2.2. DNA'ya Oksidatif Etkileri	7
1.2.3. Lipitlere Oksidatif Etkileri	8
1.3. Serbest Radikal ve Hastalıklar.....	8
1.4. Serbest Radikallerin Oluşumu Mekanizmaları.....	8
1.5. Serbest Radikal Kaynakları	9
1.5.1. Eksojen kaynaklar.....	9
1.5.2. Endojen kaynaklar	10
1.6. Antioksidanlar	10
1.6.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları	11
1.6.1.1. Toplayıcı Etki	11
1.6.1.2. Bastırıcı Etki	11
1.6.1.3. Zincir Kırıcı Etki	11
1.6.1.4. Onarıcı Etki	12
1.6.1.5. Enzimatik Etki	12
1.6.2. Enzimatik Antioksidanlar	12
1.6.2.1. Glutasyon Peroksidaz(GPx).....	12
1.6.2.2. Katalaz (KAT)	13
1.6.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)	13
1.6.2.4. Glutasyon Redüktaz (GR).....	14
1.6.3. Nonenzimatik Antioksidanlar	14
1.6.3.1. E vitamini	14
1.6.3.2. C Vitamini (Askorbik Asit).....	14
1.6.3.3. Tiyo Antioksidanları.....	15
1.6.3.4. Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin)	15
1.6.3.5. Karotenoidler	15
1.6.3.6. Flavonoidler.....	16
1.6.3.7. Curcumin	16

2. MATERYAL VE METOT	18
2.1. Materyal.....	18
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	18
2.1.2. Kullanılan Deney Hayvanları	18
2.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	18
2.1.4. Deneysel Uygulamalar	19
2.1.5. Deney Sonunda Numunelerin Alınması	19
2.2. Metot.....	20
2.2.1. ALT Aktivitesinin Tayini	20
2.2.2. AST Aktivitesinin Tayini	21
2.2.3. ALP Aktivitesinin Tayini	22
2.2.4. Biyokimyasal Analizler için Doku Örneklerinin Hazırlanması	23
2.2.4.1. MDA, GSH, GPx, SOD, KAT ve Protein Tayini İçin Karaciğer Doku Örneklerinin Hazırlanması	23
2.2.5. Biyokimyasal Analizler (MDA, GSH, GPx, SOD, KAT ve Protein Tayini).....	23
2.2.5.1. MDA Tayini.....	23
2.2.5.2. GSH Tayini.....	25
2.2.5.3. SOD Tayini.....	26
2.2.5.4. KAT Tayini	28
2.2.5.5. GPx Tayini.....	28
2.2.5.6. Arginaz Tayini.....	30
2.2.5.7. Nitrik Oksit (NO ⁻) Seviyesinin Ölçülmesi.....	32
2.2.5.8. Protein Tayini	34
2.2.5.9. Histopatolojik İnceleme.....	35
2.2.5.10. İstatistiksel Analiz	36
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. DXR metabolizmasındaki serbest radikal reaksiyonları	2
Şekil 1.2. CMN ve metabolitleri.....	3
Şekil 1.3. CMN'nin biyolojik etkileri.....	3
Şekil 1.4. Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu ve NO [•] ilişkisi	6
Şekil 1.5. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu	12
Şekil 1.6. Tümör başlangıcının durdurulmasında CMN kemopreventif hedeflerinin şematik sunumu	17
Şekil 2.1. MDA standart grafiği	24
Şekil 2.2. GSH standart grafiği.....	26
Şekil 2.3. NO [•] standart grafiği	33
Şekil 3.1. Serum ALT aktivitesi	33
Şekil 3.2. Serum AST aktivitesi	36
Şekil 3.3. Serum ALP aktivitesi	37
Şekil 3.4. Karaciğer MDA düzeyi	37
Şekil 3.5. Karaciğer GSH düzeyi	38
Şekil 3.6. Karaciğer SOD aktivitesi	38
Şekil 3.7. Karaciğer KAT aktivitesi	39
Şekil 3.8. Karaciğer GPx aktivitesi	39
Şekil 3.9. Karaciğer Arginaz aktivitesi.....	40
Şekil 3.10. Karaciğer NO [•] düzeyi	40
Şekil 3.11. Kontrol grubunun histolojik görünümü	41
Şekil 3.12. CMN grubunun histolojik görünümü.....	41
Şekil 3.13. DXR grubunun histopatolojik görünümü.....	42
Şekil 3.14. DXR+CMN 100 grubunun histopatolojik görünümü	42
Şekil 3.15. DXR+CMN 200 grubunun histopatolojik görünümü	43

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)	4
Tablo 1.2. Reaktif nitrojen türleri (RNS)	4
Tablo 2.1. MDA düzeyinin ölçümü.....	24
Tablo 2.2. SOD aktivitesinin ölçümü	27
Tablo 2.3. KAT aktivitesinin ölçümü.....	28
Tablo 2.4. GPx aktivitesinin ölçümü	29
Tablo 2.5. Karaciğer dokusunda arginaz aktivitesi ölçümü	32
Tablo 2.6. NO düzeyinin ölçümü.....	32
Tablo 2.7. Protein ölçümü	34
Tablo 3.1. Histopatolojik Bulgular	43



KISALTMALAR LİSTESİ

SOD	: Süperoksit dismutaz
KAT	: Katalaz
GSH	: Glutasyon
GPx	: Glutasyon peroksidaz
MDA	: Malondialdhyde
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
HO·	: Hidroksil
RO·	: Alkoksil
ROO·	: Peroksil
O₂⁻	: Süperoksit
NO·	: Nitrikoksit
NO₂·	: Azot dioksit
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
*O₂	: Singlet oksijen
O₃	: Ozon
HOCl	: Hipoklorit asit
LOOH	: Lipit hidroperoksit
NO₂·	: Nitrojen dioksit
HNO₃	: Nitrik asit
NO·	: Nitrik oksit
NO⁺	: Nitrosil katyonu
NO·	: Nitroksil anyonu
N₂O₄	: Dinitrojen tetroksid
ONOO·	: Peroksinitrit
XOD	: Ksantin oksidaz

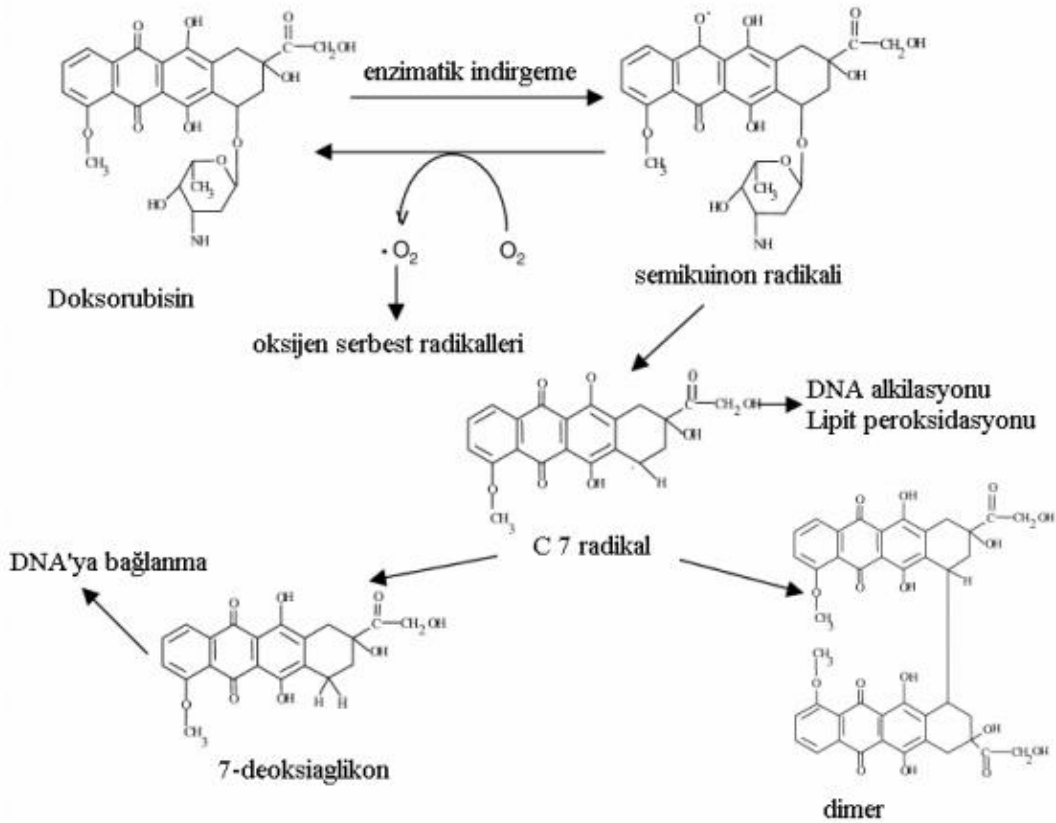
1. GİRİŞ

Serbest radikaller ve onlarla ilgili türler son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinden kaynaklanan bu radikaller farklı fizyokimyasal ve patofizyolojik durumlara maruz kalan endojen sistemler tarafından vücutta üretilmektedirler. Serbest radikaller lipid, protein ve DNA'yı olumsuz etkileyebilir ve birtakım hastalıklar ve yaşlanma üzerine olumsuz etki gösterebilir. Proteinler üzerine serbest radikal hasarı enzimatik aktivitenin kaybıyla, DNA üzerine hasarı mutagenesis ve karsinogenesis ile sonuçlanabilir. Redoks reaksiyonları serbest radikal hasarı araştırmalarında en dikkat çekici alandır. Doğa canlılara pek çok besinsel komponent dışında koruyucu antioksidan mekanizmaları olarak SOD, KAT, GSH, GPx, GR, Vitamin E, Vitamin C'yi bağışlamıştır. İnsanlarda antioksidan etkili besinlerin alımı ile çeşitli hastalıklarda mortalite ve morbiditesinin düştüğüne yönelik epidemiyolojik çalışmalar mevcuttur (Devasagayam ve ark., 2004).

Karaciğer, vücut homeostazının korunmasında birinci derecede rol oynayan çok işlevli hayati bir organdır. Karaciğerin başlıca fonksiyonları arasında; plazma proteinlerinin sentezi (Tacke ve ark., 2009), hormon üretimi, ölü kırmızı kan hücrelerini işleme, detoksifikasyon (Zhao ve ark., 2009; Yu ve ark., 2011) ile glikoz ve lipid metabolizması bulunmaktadır (Liu ve ark., 2012). Tıp alanında yapılan çalışmalar karaciğer hastalıklarının patogenezisinde nükleer faktör-kappa B (NF-kB) sinyal yollarının (Sun ve Karin, 2008; Lee ve ark., 2010) ve oksidatif stresin (Caraglia ve ark., 2011; Tanaka ve ark., 2013) rolünün olduğunu ve bu hastalıkların iyileştirilmesinde besinsel antioksidanların etkili olduğunu göstermiştir (Bishayee ve ark., 2010).

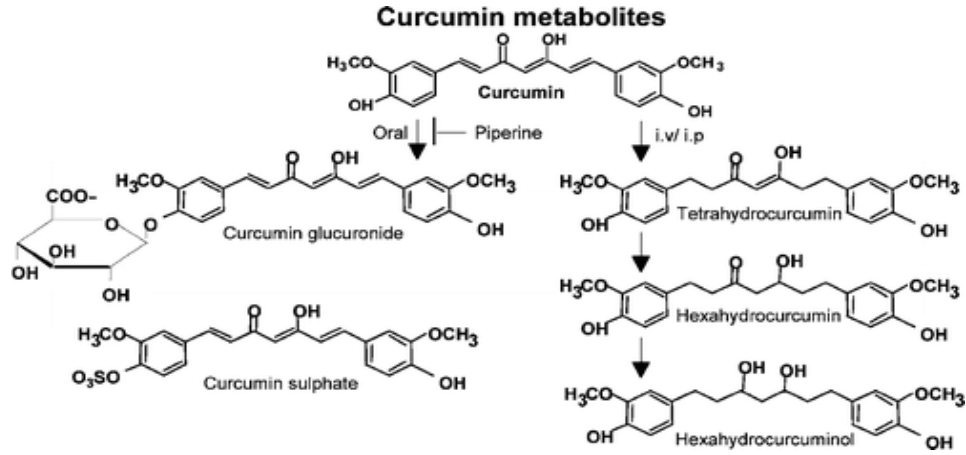
Antrasiklinler solid tümör ve lösemiye kapsayan çok geniş bir anti-tümör spektruma sahip olan son derece etkili anti-neoplastik ajanlardır. En yaygın olarak kullanılan antrasiklinler doksorubisin (Adriamycin), daunorubisin (Cerubidine) ve idarubisin (Idamycin) dir (Weiss, 1992; Giantris ve ark., 1998; Franco ve ark., 2001). Antrasiklinlerin DNA Topoizomeraz II enzimine müdahale ederek anti-tümör ve sitotoksik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Zunino ve Capranico, 1990; Chen ve Liu, 1994). Hepatotoksisitenin oluşumunda DXR etkisini ispatlayan çeşitli görüşler vardır. İlacın özellikle karaciğerde toksik etki göstererek bazal metabolizmada bozulmaya neden olduğu bulunmuştur. Bu toksik etkiler arasında, serbest radikal üretim mekanizması en kapsamlı

şekilde araştırılmaktadır. DXR, karaciğerde serbest radikal üretimini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda karaciğerin reaktif oksijen türlerini detoksifiye etme yeteneğini de azaltır. Karaciğer dokularında SOD, KAT ve GPx aktivitelerindeki artış DXR'nin hepatotoksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda DXR kaynaklı karaciğer hasarının bir göstergesi olarak sıçanlarda MDA seviyesinin arttığı da bildirilmiştir (Durak ve ark., 1998; Kalender ve ark., 2001; Kalender ve ark., 2005; Kwiecien ve ark., 2006).

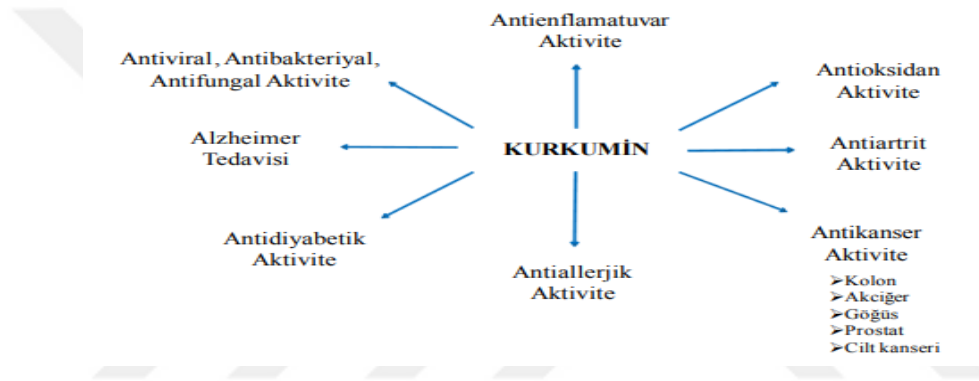


Şekil 1.1. DXR metabolizmasındaki serbest radikal reaksiyonları (Jung ve Rezska, 2001).

M.Ö. 1900 yılından beri karaciğer hastalıkları dahil olmak üzere pek çok hastalıkta *curcuma longa* bitkisinin rizomlarının iyileştirici etkisine atıflarda bulunulmuştur. Bu bitkinin ana aktif bileşiği olan CMN, iki asır önce izole edilmiş olup diferulometan yapısı 1910 yılında belirlenmiştir. CMN antioksidan, anti-inflamatuar, antifungal, antibakteriyel ve antikanser aktivitelere sahiptir. CMN'nin farmakolojik özellikleri yakın zamanda gözden geçirilmiş ve antikanser özellikleri üzerine odaklanılmıştır (Rivera ve ark., 2009).



Şekil 1.2. CMN ve metabolitleri (Ghosh ve Banerjee, 2015)



Şekil 1.3. CMN nin biyolojik etkileri (Kapucu, 2012)

1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller vücudun normal oksijen kullanımı sırasında sürekli üretilmektedir (Tiwari, 2004). Oksijen yaşam için vazgeçilmez bir elementtir. Enerji elde etmek için hücreler oksijeni kullandığı zaman mitokondri tarafından serbest radikaller üretilmektedir. Bu yan ürünler genel olarak hücrel redoks reaksiyonlarından kaynaklanan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS)'dir. Bu radikaller lipid, protein ve karbonhidratlara karşı özel bir ilgiye sahiptirler (Sivanandham, 2011). Serbest radikal, orbitalinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran kimyasal türlerdir. En basit radikal hidrojen atomudur. Elektronlar orbitallerde farklı spinlere yerleştiği zaman daha karardır. Şayet iki radikal birleşirse eşleşmemiş elektronlar kovalent bağ oluştururlar. İn vivo moleküllerin çoğu non radikaldirler. Bu durumda bir radikal eşleşmemiş elektronunu bir diğer moleküle bağışlayabilir veya ondan bir elektron alarak ona radikal karakter kazandırabilir (Halliwell, 1997). ROS ve RNS atmosferde kirleticiler

olarak mevcut olup, (i) UV, X ray ve gama ışınları ile, (ii) metal katalizisi esnasında, (iii) yangısel hücre aktivasyonu sonucu makrofaj, nötrofil, özonofiller vasıtasıyla (Cadenas ve Davies, 2000; Inoue ve ark., 2003) ve (v) mitokondriyal elektron zinciri sırasında yan ürün olarak meydana gelebilirler (Valko ve ark., 2004).

Tablo 1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Radikaller	Radikal olmayanlar
Hidroksil HO [·]	Singlet oksijen *O ₂
Alkoksil RO [·]	Ozon O ₃
Peroksil ROO [·]	Hipoklorit asit HOCl
Süperoksit O ₂ ⁻	Lipit hidroperoksit LOOH
Nitrikoksit NO [·]	Hidrojen peroksit H ₂ O ₂
Azot dioksit NO ₂ [·]	

Tablo 1.2. Reaktif nitrojen türleri (RNS)

Radikaller	Radikal olmayanlar
Nitrojen dioksit NO ₂ ⁻	Nitrik asit HNO ₃
Nitrik oksit NO ⁻	Nitrosil katyonu NO ⁺
	Nitroksil anyonu NO ⁻
	Dinitrojen tetroksid N ₂ O ₄
	Peroksinitrit ONOO ⁻

1.1.1. Hidroperoksil Radikali

Perhidroksil radikali olarak da bilinen hidroperoksil radikali (HO₂[·]) süperoksitin protonlanmış şeklidir. HO₂[·] bir protonun bir oksijen atomuna aktarılması ile oluşur. HO₂[·] bir oksidant olarak hareket edebilir, lipid tabakasındaki doymamış yağ asitlerinden ve tokoferolden hidrojen atomlarını ayırabilir ve bunun sonucunda lipid peroksidasyonunun önemli bir başlatıcısı olabilir (Kumar, 2011).

1.1.2. Süperoksit Radikali

Süperoksit ya yükseltgeyici ya da indirgeyici olarak hareket edebilir, sülfür, askorbik asit veya NADPH i oksitleyebilir ve Sitokrom C ile metal iyonlarını indirgeyebilir. Oksijenin ve hidrojen peroksidin dismutasyonuna yol açan bu reaksiyon kendiliğinde olabilir veya SOD tarafından katalize edilebilir. Protonlanmış formunda (pKa 4.8), süperoksit formları ve perhidroksil radikali güçlü bir oksidandır (Gebiki ve Bielski, 1981) ancak fizyolojik pH ve düşük konsantrasyon nedeniyle bu ihtimal düşüktür (Kumar, 2011).

1.1.3. Hidrojen Peroksit

Süperoksitin tek değerlikli indirgenmesi sonucu hidrojen peroksit (H_2O_2) üretilir. Tüm elektronları eşleştirildiği için serbest radikal olmayan H_2O_2 membranlardan kolayca geçer. H_2O_2 'nin neden olduğu ana hasarlar DNA parçalanması, tek iplik kopmaları ve DNA protein çapraz bağının oluşması şeklindedir (Kumar, 2011). Kompleks organik moleküllerin sentezini içeren oksidasyon reaksiyonlarında bir takım enzimler substrat olarak hidrojen peroksit kullanırlar. Bu, oksitleyici bir maddedir, fakat özel olarak reaktif değildir ve bunun esas önemi, reaktif geçiş metali iyonlarının varlığında bir hidroksil radikal kaynağı olmasıdır (Kumar, 2011).

1.1.4. Tekli Oksijen

Serbest radikal değildir, ancak bazı radikal reaksiyonlarda oluşabilir ve başka molekülleri tetikleyebilir. Singlet oksijen hidrojen peroksit moleküllerinden köken alır. Singlet oksijenin yıkımı süperoksit ve hidroksil radikallerini oluşturur (Kumar, 2011).

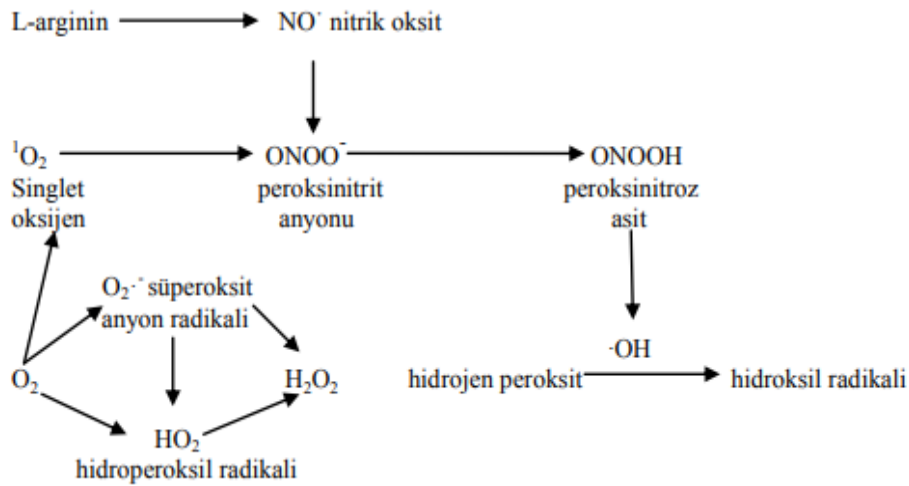
1.1.5. Üçlü Oksijen

Üçlü oksijen, oksitleri oluşturmak için iyon ve elementlerle reaksiyona girebilir, fakat genellikle tekli durumdaki organik bileşiklerle giremez. Bununla birlikte üçlü oksijen ısı, ultraviyole ışık, radyasyon ve diğer aktif radikallerin etkisiyle üretilen serbest radikal

molekülleri ile kolayca reaksiyona girer veya aktif peroksit radikallerini üreten geçiş metalleri ve oksijen ile kompleks oluşturarak reaksiyon verir ve doymamış yağ asitleri ile diğer moleküllerin oto oksidasyonunu tetikler. (Kumar, 2011).

1.1.6. Nitrik Oksit

NO^\cdot (:N: :O:); azot monoksit veya nitrik oksit olarak adlandırılır. Atmosferdeki bakteriler, asit yağmurları, baca gazları, jetler, egzoz gazları ile tüten sigaralar NO^\cdot ve diğer reaktif oksijen türlerini üreterek hava kirliliğine neden olur. Havadaki NO^\cdot oksijenle oksitlenerek çok kısa sürede NO_2^- (nitrit) ve NO_3^- (nitrat) oluşturur NO^\cdot ' in açık formülünde görülen çiftlenmemiş elektronu, azot ve oksijen atomları üzerinde yer değiştirerek 'rezonans stabilitesi' sağlar, reseptörden bağımsız olarak membranlardan kolayca diffüze olur (Lowenstein ve ark., 1994; Yallampalli ve ark., 1994). Tüm bu özellikleri NO^\cdot 'e ideal bir haberci molekül özelliği kazandırmaktadır (Lowenstein ve ark., 1994). Ayrıca su ve oksijen varlığında, 3-20 saniye gibi çok kısa bir yarı ömre sahiptir ve kolayca oksitlenir (Marletta, 1987; Yallampalli ve ark., 1994).



Şekil 1.4. Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu ve NO^\cdot ilişkisi (Reiter 1995)

1.2. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri

Serbest radikaller inaktif edilmemişse, kimyasal reaktiviteleri, proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve nükleik asitler dahil olmak üzere hücrelerin tüm makromoleküllerine zarar verebilirler. Protein üzerindeki yıkıcı etki, katarakt gibi hastalıkların nedenselleşmesinde rol oynayabilir. Serbest radikal hasarı DNA'da hasara neden olur ve LDL kolesterol üzerindeki etkisi kalp hastalığından sorumludur. Serbest radikaller ayrıca yaşlanmadan sorumludur (Bagchi ve Puri, 1998).

1.2.1. Proteinlere Oksidatif Etkileri

Proteinler üzerindeki oksidatif saldırı, bölgeye özgü amino asit modifikasyonu, peptit zincirinin parçalanması, çapraz bağlı reaksiyon ürünlerinin agregasyonu, değiştirilmiş elektriksel yükler ve proteolize karşı artan duyarlılık ile sonuçlanır (Farr ve Kogoma, 1991). Serbest radikaller, yapısal proteinlerin fonksiyonunu ve enzim aktivitesini engelleyerek birçok proteinin hasarına neden olabilirler. ROS ve RNS'nin neden olduğu protein oksidasyonu neticesinde, protein hidroperoksitler gibi kararlı ve yüksek derecede reaktif ürünler meydana gelir. Bu ürünler ile geçiş metal iyonlarının etkileşimi sonucunda da radikaller oluşabilir. Bununla beraber oksitlenmiş proteinlerin birçoğu, fonksiyonel olarak doğada inaktiftir ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılır. Fakat zamanla kademeli olarak bir miktar birikebilir. Böylece çeşitli hastalıkların yanı sıra yaşlılık ile ilişkili hasarlara da sebep olurlar (Devasagayam ve ark., 2004).

1.2.2. DNA'ya Oksidatif Etkileri

Aktif oksijen ve iyonize edici radyasyon gibi serbest radikal üreten ajanlar DNA'da kopma, mutasyon ve diğer öldürücü genetik etkilere sebep olurlar. DNA'da meydana gelen hasarlar hem şeker hem de baz kısımlarının oksidasyonu, baz yıkımı, tek iplik kopması ve proteinlere çapraz bağlanmalar şeklindedir (Imlay ve Linn, 1986). DNA'da ROS tarafından oluşturulan oksidatif hasar başta yaşlanma olmak üzere kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immun sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların başlıca nedeni ve göstergesi

olarak kabul edilmektedir (Fraga ve ark., 1990; Loft ve Poulsen, 1999; Senturkler ve Dizdaroglu, 1999).

1.2.3. Lipitlere Oksidatif Etkileri

Serbest radikaller, membran kolesterolü ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerek, peroksidasyonunu başlatırlar. Radikallerin reaksiyonu sonucu, lipit peroksitler, lipit alkoller ve aldehit yapısında yan ürünler oluşur. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda malondialdehit meydana gelir (Senturkler ve Dizdaroglu, 1999).

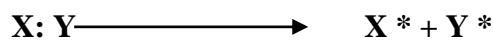
1.3. Serbest Radikal ve Hastalıklar

Serbest radikaller ateroskleroz, iskemi/reperfüzyon (I/R) yaralanması, inflamatuvar hastalıklar (romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve pankreatit), kanser, nörolojik hastalıklar, hipertansiyon, diyabet vb. gibi çeşitli dejeneratif hastalıklardan sorumludur (Cui ve ark., 2004). Ancak serbest radikaller her zaman zararlı değildir. Aynı zamanda insan vücudundaki oksijen radikalleri hücrel yapının olgunlaşma süreci için gerekli bileşiklerdir. Beyaz kan hücreleri patojen mikroplara karşı serbest radikalleri oluşturarak hastalıklara karşı vücut savunma mekanizmasının bir parçası olarak işlev görür. Bu nedenle, bu radikallerin tamamen ortadan kaldırılması sadece imkansız değil, aynı zamanda zararlıdır (Bagchi ve Puri, 1998).

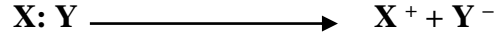
1.4. Serbest Radikallerin Oluşumu Mekanizmaları

Serbest radikaller üç şekilde oluşturulabilir:

- Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



• Normal molekülden tek elektron kaybı ile ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar.



• Normal moleküle tek elektron eklenmesiyle



Bir radikal, eşlenmemiş elektronunu başka bir moleküle bağışlayabilir. Başka bir molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilir. Radikal elektron verdiğinde veya bir elektron aldığı anda anyon veya katyona dönüşür. (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

1.5. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller, ROS da dahil olmak üzere tüm reaktif oksijen formlarını içeren kolektif bir terimdir. Serbest radikaller, oldukça reaktif ara kimyasal bileşikler sınıfını temsil eder. Reaktivitesi, yapısındaki eşleşmemiş elektronun varlığından kaynaklanır (Cui ve ark., 2004). Serbest radikaller ve diğer reaktif türler ya normal temel metabolik olaylardan veya x-ışınlarına maruz kalma, ozon, sigara içimi, hava gibi dış etkenlerden kaynaklanabilir.

1.5.1. Eksojen Kaynaklar

Bunlar, oksijenin organik bileşiklerle enzimatik olmayan reaksiyonlarını içerir. Serbest radikaller ayrıca iyonlaştırıcı radyasyonlarla başlatılan reaksiyonlarda da ortaya çıkar. Bazı dış kaynak radikalleri:

- Parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma,
- Karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları,
- İyonize ve ultraviyole radyasyon,
- Hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, egzoz dumanı, solventler gibi çevresel faktörler,

- Nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar,
- Alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir (Sinclair ve ark., 1990; Janssen ve ark., 1993; Özdem ve Şadan, 1994; Yagi, 1994).

1.5.2. Endojen kaynaklar

Bunlar serbest radikallerin kaynağı olarak işlev gören enzimatik reaksiyonlar olabilir. Bunlar arasında:

- Mitokondride aerobik solunum sırasında elektron transport sistemi tarafından katalize edilen oksijenler serbest radikalleri yan ürün olarak üretirler.
- Serbest radikaller lipit peroksidasyonu, ksantin oksidaz ve mitokondriyel sitokrom oksidaz gibi çeşitli kaynaklardan oluşabilir.
- Düz kas hücreleri, plateletler ve araşidonik asit metabolizması tarafından serbest radikaller üretilebilir.
- Reaktif oksijen türleri, ksantin oksidaz (XOD), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz, nötrofil miyeloperoksidaz (MPO) gibi birçok enzimin aktivitesinin bir sonucu olarak üretilmektedir (Sacher, 1977). Ksantin oksidaz canlı sistemde ROS oluşturan başlıca enzimatik kaynaklardan biridir.
- Egzersiz, stres, yaşlılık, kronik hastalıklar, enfeksiyon, malabsorbsiyon gibi antioksidanların alınmasını engelleyen durumlarda serbest radikaller açığa çıkmasıyla birlikte hücresele düzeyde de meydana gelirler.
- İmmun sistem hücreleri patojenlere yanıt olarak ROS ve oksi-radikaller üretebilir.

1.6. Antioksidanlar

“Antioksidan” terimi, hücrelere saldırmadan önce serbest radikalleri stabilize veya deaktive edebilen herhangi bir molekülü ifade eder. İnsanlar sinerjik olarak çalışan çok kompleks antioksidan sistemlerine (enzimik ve nonenzimik) sahiptir. Antioksidanlar endojen olabilir veya örneğin diyetin bir parçası veya diyet takviyeleri gibi eksojen de

olabilir. Serbest radikalleri nötralize etmeyen fakat endojen aktiviteyi artıran bazı diyet bileşikleri de antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir.

İdeal bir antioksidan, serbest radikalleri kolayca emmeli ve söndürmeli ve redoks metalleri fizyolojik olarak ilgili seviyelerde şelatlandırmalıdır. Aynı zamanda hem sulu hem de zar etki alanlarında çalışmalı ve gen ekspresyonunu pozitif bir şekilde etkilemelidir. Endojen antioksidanlar optimal hücrel fonksiyonları ve dolayısıyla sistemik sağlığı ve refahı korumak için çok önemli bir rol oynarlar. Bununla birlikte, oksidatif stresi destekleyen koşullar altında, endojen antioksidanlar yeterli olmayabilir ve optimal hücrel fonksiyonları korumak için diyet antioksidanları gerekli olabilir. En etkili enzimatik antioksidanlar glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz içerir (Mates ve ark., 1999). Nonenzimatik antioksidanlar arasında Vitamin E ve C, tiyol antioksidanlar (glutatyon, tioredoksin ve lipoik asit), melatonin, karotenoidler, doğal flavonoidler ve diğer bileşikler bulunur (Mccall ve Frei, 1999). Bazı antioksidanlar, orijinal özelliklerini yeniden oluşturan diğer antioksidanlarla etkileşebilir; Bu mekanizmaya genellikle “antioksidan ağ” denir (Sies ve ark., 2005).

1.6.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

1.6.1.1. Toplayıcı Etki

Serbest oksijen radikallerini tutarak veya daha zayıf moleküllere dönüştürerek etki gösterirler. Antioksidan enzimler bu şekilde işlev görürler.

1.6.1.2. Bastırıcı Etki

Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen ekleyerek aktivitelerini azaltarak veya inaktif hale dönüştürerek etki gösterirler. Vitaminler ve flavanoidler bu özellikteki antioksidanlardır.

1.6.1.3. Zincir Kırıcı Etki

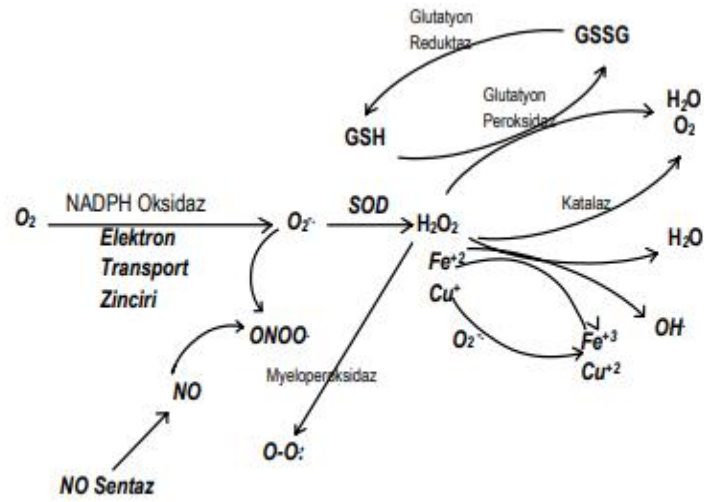
Serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırıcı etki gösterirler. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

1.6.1.4. Onarıcı Etki

Serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı onarıcı etkiye sahiptirler.

1.6.1.5. Enzimatik Etki

SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırarak etkilerini gösterirler (Akkuş, 1995).



Şekil 1.5. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu (Vincent, 2012)

1.6.2. Enzimatik Antioksidanlar

1.6.2.1. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

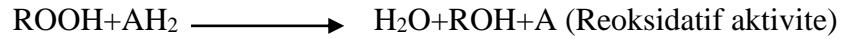
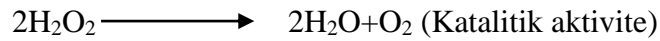
Selenyum bağımlı (GPx) ve selenyum bağımsız olmak üzere iki şekli vardır (Matesve ark., 1999). Farklılıklar alt ünite sayısı, katalitik mekanizma ve selenyumun aktif merkezdeki bağından kaynaklanır ve glutatyon metabolizması hücrelerde bulunan en önemli antioksidatif savunma mekanizmalarından biridir. İnsanlarda dört farklı Se-bağımlı

glutasyon peroksidaz vardır (Chaudière ve Ferrari-Iliou, 1999). Selenyum-bağımlı glutasyon peroksidaz, hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan ve aynı anda GSH'yi okside ederken hidrojen peroksit veya organik peroksidin suya ya da alkole dönüşmesini katalize eden tripeptid glutasyon (GSH) ile birlikte hareket eder. Aynı zamanda, bir substrat olarak hidrojen peroksit için katalaz ile rekabet eder ve düşük seviyelerdeki oksidatif strese karşı ana koruma kaynağıdır (Chaudière ve Ferrari-Iliou, 1999).

1.6.2.2. Katalaz (KAT)

Bu enzim, aerobik hücrelerin peroksizomunda bulunur ve hidrojen peroksidin suya ve moleküler oksijene dönüşmesini desteklemede çok önemlidir. Katalaz molekülü, yaklaşık 6 milyon hidrojen peroksit molekülünü bir dakikada su ve oksijene dönüştürebilir (Mates ve ark., 1999).

Katalaz canlılarda aşağıdaki reaksiyonları katalizler (Fuhrman ve ark., 1995).



Katalazın temel fonksiyonu, moleküler O_2 mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, H_2O_2 ve ROOH gibi bir peroksitleri gidererek, özellikle membranlarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektir. Çünkü H_2O_2 , singlet oksijen ve hidroksil radikalinin potansiyel kaynağıdır (Huang ve ark., 1983).

1.6.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Bu en etkili hücre içi enzimatik antioksidanlardan biridir ve süperoksit anyonlarının dioksijen ve hidrojen peroksite dönüşmesini katalize eder. İnsanlarda SOD'un üç şekli vardır: sitosolik Cu, Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve ekstra hücrel SOD (Landis ve Tower, 2005). Süperoksit dismutaz, aktif bölgedeki geçiş metali iyonlarının ardışık oksidatif ve indirgeyici döngülerinden geçerek süperoksit iyonlarını nötralize eder (Chaudière ve Ferrari-Iliou, 1999). Cu, Zn-SOD molekül ağırlığı 32 kDa olan iki özdeş altbirime sahiptir (Mates ve ark., 1999) ve her bir alt birim, aktif bölge olarak, bakır ve

Çinko iyonları tarafından oluşturulan bir parça metal küme içerir ve özellikle süperoksit anyonunun oksijen ve suya olan değişimini katalize eder. Mitokondriyal Mn-SOD, 96 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip bir tetramerdir ve alt birim başına bir manganez atomu içerir (Mates ve ark., 1999). Ekstraselüler süperoksit dismutaz, bakır ve çinko içerir, heparin ve heparin sülfat gibi bazı glikozaminoglikanlar için yüksek afiniteye sahip bir tetramerik glikoproteindir (Mates ve ark., 1999).

1.6.2.4. Glutasyon Redüktaz (GR)

Antioksidan bir enzim olan glutasyon peroksidaz (GPx) enziminin katalizlediği reaksiyonlarda, özellikle hidroperoksitlerin detoksifikasyonu ve diğer bazı bileşiklerin indirgenmesi sonucu GSSG oluştuğu için glutasyon redüktaz hücre içi glutasyon indirgeme yükseltgeme olayında merkezi bir role sahiptir. Glutasyon redüktaz, GSH-GSSG oranını yükselterek hücre içi –SH/–SS oranını korur (Toribio ve ark., 1996).

1.6.3. Nonenzimatik Antioksidanlar

1.6.3.1. E vitamini

E vitamini sekiz farklı formda bulunan ve yağda znen bir vitamindir. İnsanlarda, α -tokoferol en aktif formdur ve hücre tarafından kullanılan büyük güçlü membrana bağlı antioksidandır (Hensley ve ark., 2004). Vitamin E'nin ana işlevi lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlamaktır (Pryor, 2000). α -tokoferol ve askorbik asidin döngüsel olarak birlikte çalıştığını gösteren kanıtlar vardır (Kojo, 2004). Yüksek oksijen konsantrasyonlarında, tokoferollerin antioksidan etkisi daha yüksektir. Lipid peroksil radikalleri ile tokoferoller reaksiyona girerek tokoferoksil radikalleri oluşturup, serbest radikalleri giderirler (Güleşci ve Aygül, 2016).

1.6.3.2. C Vitamini (Askorbik Asit)

Bu önemli ve suda znen bir antioksidandır ve bu nedenle vücudun sulu ortamlarında çalışır. Birincil antioksidan partnerleri, E vitamini ve karotenoidler ile birlikte antioksidan enzimlerle birlikte çalışmaktadır. C vitamini, membranlar ve lipoproteinlerdeki

α - tokoferol radikallerinden α - tokoferol yenilemek için E Vitamini ile işbirliği yapar (Carr ve Frei, 1999; Kojo, 2004) ve ayrıca hücre içi glutasyon seviyelerini yükselterek protein tiyol grubunun oksidasyona karşı korunmasında önemli bir rol oynar (Naziroğlu ve Butterworth, 2005).

1.6.3.3. Tiyol Antioksidanları

Majör tiyol antioksidan, çok işlevli bir intraselüler antioksidan olan ve hücrenin ana tiyol-disülfid redoks tamponu olarak kabul edilen tripeptid (GSH)' dır. (Masella ve ark., 2005). Sitosol, çekirdek ve mitokondrilerde bol miktarda bulunur ve bu hücre bölmelerinde başlıca çözüner antioksidandır (Masella ve ark., 2005). İndirgenmiş glutasyon biçimi GSH, oksitlenmiş form GSSG'dir. Tiyol bileşiklerinin antioksidan kapasitesi, tek bir elektronun kaybını kolayca karşılayabilen kükürt atomuna bağlıdır (Karoui ve ark., 1996). Oksitlenmiş glutasyon (GSSG) hücrelerin içinde birikmiştir ve GSH-GSSG oranı bir organizmanın oksidatif stresinin iyi bir ölçüsüdür (Dröge, 2002).

1.6.3.4. Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin)

Bu, özellikle epifiz bezinde sentezlenen ve çok çeşitli fizyopatolojik işlevler üzerinde birçok etkiye sahip olan bir indoleamine nörohormondur. Melatoninin başlıca işlevi oksijen metabolizmasındaki serbest radikalleri temizlemektir, böylece potansiyel olarak DNA, protein ve zarlara karşı serbest radikal kaynaklı hasara karşı koruma sağlar, dolayısıyla serbest radikal aracılı hastalıkların azaltılmasında önemli bir rol oynama potansiyeline sahiptir (Rahimi ve ark., 2005).

1.6.3.5. Karotenoidler

Bunlar, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan renkli pigmentlerdir. Epidemiyolojik çalışmalar, karotenoidler açısından zengin bir diyet tüketiminin, yaşla ilişkili hastalıkların azalmasında daha etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Karotenoidler, konjuge çift bağlar içerir ve bunların antioksidan aktivitesi eşlenmemiş elektronlarından dolayı artar (Mortensen ve ark., 2001). Bu eşleşmemiş elektronlar (konjuge çift bağlar) aynı zamanda karotenoidlerin bozulma olmadan singlet oksijeni fiziksel olarak söndürme

yeteneğinden ve karotenoidlerin serbest radikaller ile kimyasal reaksiyon yeteneğinden sorumludur. Karotenoidlerin fiziksel olarak söndürme yetenekleri mevcut moleküldeki çift bağ sayısı ile ilgilidir.

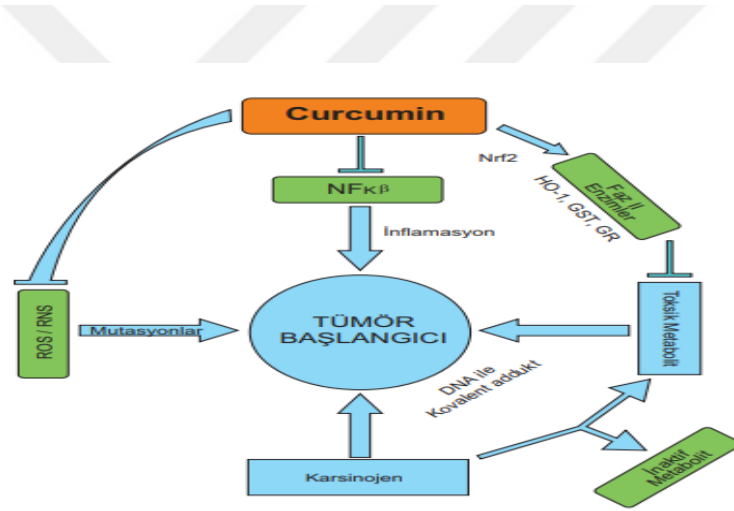
1.6.3.6. Flavonoidler

Flavonoidler, fenolik ve piran halkalarından oluşan benzo-p-pirone türevleridir ve metabolizma sırasında hidroksil grupları eklenir, metillendirilir, sülfatlanır veya glukuronatlanır. Antioksidan ve şelatlama özellikleri ile kronik ve yaşa bağlı hastalıkların önlenmesinde etkin rolleri nedeniyle flavonoidlere yoğun ilgi vardır (Schroeter ve ark., 2002). Flavonoidler gıdada çoğunlukla glikozitler ve polimerler (Hammerstone ve ark., 2000) olarak bulunurlar ve bunlar, diyet flavonoidlerinin önemli bir kısmını içerir (Santos-Buelga ve Scalbert, 2000). Flavonoidlerin biyolojik özellikleri, ikame edicilerin kapsamı, niteliği ve pozisyonu ile hidroksil gruplarının sayısına göre belirlenir (Schroeter ve ark., 2002). Bu faktörler aynı zamanda bir flavonoidin bir antioksidan veya enzim aktivitesinin bir modülatörü olarak mı hareket edeceğini veya antimutagenik veya sitotoksik özelliklere sahip olup olmadığını da belirler. Flavonoidlerin en çok bildirilen aktivitesi, onların oksidatif strese karşı korunmasıdır (Rice-Evans, 2001). Bu nedenle flavonoidler peroksil radikallerini temizleyebilir ve lipid peroksidasyonunun etkili inhibitörleridir ve redoks-aktif metalleri şelatlayabilir ve böylece hidrojen peroksidin (Fenton kimyası) katalitik bozulmasını önleyebilir. Bununla birlikte, belirli koşullar altında flavonoidler, pro-oksidan aktiviteyi de gösterebilir ve bunun, toplam hidroksil grup sayısı ile doğru orantılı olduğu düşünülür (Cao ve ark., 1997) ve ayrıca, hücre sinyallemesini modüle ettiği bildirilmiştir (Schroeter ve ark., 2002).

1.6.3.7. Curcumin

Curcumin, 1815 yılında *Curcuma longa* L. (*zerdeçal*) rizomlarından izole edilen parlak sarı renkli bir fenolik bileşiktir (Gupta ve ark., 2013). *Curcuma* cinsi, Hindistan, Güneydoğu Asya ve diğer tropikal bölgelerde yetişen Zingiberaceae ailesinin bir üyesidir (Martin ve ark., 2012). Sarı renginin sebebi CMN olan Zerdeçalın geleneksel tıpta kullanımı uzun bir tarihe dayanmaktadır (Benzie ve Wachtel-Galor, 2011; Martin ve ark., 2012). CMN çeşitli enzimleri, metalleri, albumin gibi proteinleri, büyüme faktör

reseptörlerini ve diğer önemli biyomolekülleri bağlayabilir ve inhibe edebilir (Goel ve ark., 2008). CMN aynı zamanda ksantin dehidrojenaz, ksantin oksidaz, lipoksijenaz, siklooksijenaz ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz gibi reaktif oksijen üreten enzimlere karşı inhibitör etkiler ve anti inflamatuvar etkiler göstermektedir (Lin, 2007). CMN'nin bazı dokularda lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi azaltıcı yönde güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğuna dair çalışmalar bildirilmiştir (Nabavi ve ark., 2011a; 2012b). CMN'nin bu koruyucu etkisi süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin gücünü artırma yeteneğine bağlıdır (Nabavi ve ve ark., 2011a; 2012b). Bu bağlamda, CMN'in vitamin E'den daha aktif olduğu bildirilmiştir (Shishodia ve ark., 2006). Fenolik hidroksil gruplarının CMN'in antioksidan aktivitesinde önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir (Feng-Liu, 2009).



Şekil 1.6. Tümör başlangıcının durdurulmasında CMN'in kemopreventif hedeflerinin şematik sunumu. ROS, reaktif oksijen türleri; RNS, reaktif nitrojen türleri; NFκB, nükleer faktör kappa B; Nrf2, (NF-E2) aracılı faktör 2; HO-1, heme oksijenaz-1; GST, glutasyon S-transferaz; GR, glutasyon redüktaz (Thangapazham ve ark. 2006).

Bu tez çalışması, kemoterapide yaygın olarak kullanılan DXR'nin karaciğer de meydana getirdiği hasarın göstergelerinden serum ALT, AST, ALP düzeyleri ile karaciğer dokusu MDA, GSH ve NO⁻ düzeyleriyle beraber SOD, KAT, GPx ile arginaz aktiviteleri üzerine CMN'nin koruyucu etkisini araştırmak amacıyla yapıldı.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

DXR: Adrimisin VR (50 mg 25 mL⁻¹, Saba, İstanbul, Türkiye).

CMN: Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO)

DXR ve CMN analitik saflıkta kullanıldı ve doz ayarlamaları sırasıyla Manikandan ve ark., 2011; Rashid ve ark., 2013 makalelerine göre yapıldı.

2.1.2. Kullanılan Deneysel Hayvanları

Çalışmada Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde (ATADEM) yetiştirilen 250-270 g ağırlığındaki 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Deneysel kullanılacak olan ratlar uygulamadan 7 gün önce gruplar arası istatistiksel fark olmayacak şekilde tartılarak seçildi ve ortamlarına uyumları sağlandı. Hayvanlar 24-25 °C sabit sıcaklık ve onikişer saatlik karanlık aydınlık siklusü sağlanarak kafeslerde tutuldu. Deneysel süreçte ratlara standart rat yemi ve su ad libitum olarak verildi. Çalışma, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneysel Yerel Etik Kurul Başkanlığının tarihli (09.11.2016) ve karar No: E.16560 izni ile belgelendirildi.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

UV-visible Spektrofotometre: BIO-TEK EPOCH, GEN 5 Yazılımlı

Soğutmalı Santrifüj: Hettich Rotina 38 R

pH Metre: METTLER TOLEDO (Seven Compact)

Etüv: MMM Group, Ecocell 55

Vorteks: IKA MS-2

Otomatik Pipetler: BRAND transferpette ®

Saf Su Cihazı: GFL 2001/2

Buzdolabı: Vestel Nofrost

Hassas Terazi: SHIMADZU ATX224
Çalkalamalı Su Banyosu: GFL 1083
Homojenizatör: TissueLyser II, Qiagen
Trackman: GILSON®

2.1.4. Deneysel Uygulamalar

Çalışmada kullanılan ratlar her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu; 7 gün boyunca oral Serum fizyolojik uygulandı.

CMN Grubu: CMN (200 mg kg⁻¹ ağırlık/gün) 7 gün boyunca oral olarak ratlara verildi.

DXR Grubu: DXR (40 mg kg⁻¹) tek doz olarak 5. günde intra peritoneal olarak ratlara enjekte edildi.

DXR+CMN 100 Grubu: 7 gün süreyle (100 mg kg⁻¹ ağırlık/gün) CMN uygulamasının 5. gününde tek doz DXR (40 mg kg⁻¹) intra peritoneal olarak ratlara enjekte edildi.

DXR+CMN 200 Grubu: 7 gün süreyle (200 mg kg⁻¹ ağırlık/gün) CMN uygulamasının 5. gününde tek doz DXR (40 mg kg⁻¹) intra peritoneal olarak ratlara enjekte edildi.

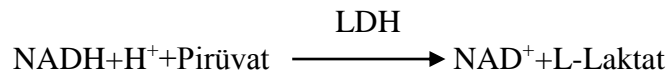
2.1.5. Deney Sonunda Numunelerin Alınması

Deneysel uygulamalardan 24 saat sonra ratlar hafif sevofloran anestezisi altında ötenazileri yapılarak, doku ve kan örnekleri alındı. Kan örnekleri serum enzim analizleri için antikoagülanlı tüplere aktarıldı, +4 °C'de 3000 devirde, 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Karaciğer dokuları ile serum örnekleri biyokimyasal analizler yapılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Deneyleri yapmaya başlamadan önce sıvı azot kullanarak TissueLyser II (Qiagen) ile 5 mikron çapa kadar öğütülen karaciğer dokularından gerekli miktarlar tartılarak analizlere uygun olan tamponlarla sulandırıldı ve TissueLyser II (Qiagen) kullanılarak homojenizasyon yapıldı.

2.2. Metot

2.2.1. ALT Aktivitesinin Tayini

ALT tayini prensibi aşağıdaki denklemde yer almaktadır (Matsuda ve ark., 2012).



Analizde Kullanılan Reaktifler

Reaktif 1: Tris buffer (pH 7.5): 110 mmol L⁻¹, L-Alanin: 600 mmol L⁻¹, LDH ≥ 1500 U L⁻¹

Reaktif 2: α-Ketoglutarat: 16 mmol L⁻¹, NADH: 0.24 mmol L⁻¹

Çalışma Reaktifi (Rç): Reaktif 1'den 4 hacim, Reaktif 2'den 1 hacim alınıp karıştırılır.

Deneyin Yapılışı

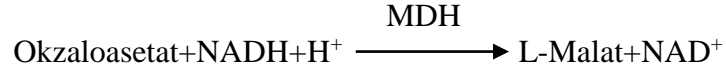
- Çalışma reaktifinden 1 mL alındı
- 100 µL örnek eklendi.
- Vorteksle karıştırıldı.
- Örnek 37 °C' de 1 dakika inkübatör de bekletildi.
- 340 nm'de 3 dakika boyunca dakika başına değişen absorbans spektrofotometrik olarak okundu.
- Dakika başına değişen optik yoğunluk ölçüldü. Sonuç U L⁻¹ olarak verildi.

Hesaplama

340 nm: ΔOD dakika⁻¹ x 1746

2.2.2. AST Aktivitesinin Tayini

AST tayini prensibi aşağıdaki denklemde yer almaktadır (Matsuda ve ark., 2012).



Analizde Kullanılan Reaktifler

Reaktif 1: Tris buffer (pH 7.8): 88 mmol L⁻¹, L-Aspartat: 260 mmol L⁻¹, LDH ≥ 1500 U L⁻¹, MDH ≥ 900 U L⁻¹

Reaktif 2: α -Ketoglutarat: 12 mmol L⁻¹, NADH: 0.24 mmol L⁻¹

Çalışma Reaktifi (Rç): Reaktif 1'den 4 hacim, Reaktif 2'den 1 hacim alınıp karıştırılır.

Deneyin yapılışı

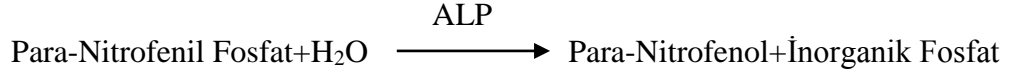
- Çalışma reaktifinden 1mL alındı.
- 100 μ L örnek eklendi.
- Vorteks ile karıştırıldı.
- Örnek 37 °C'de 1 dakika inkübatör de bekletildi.
- 340 nm'de 3 dakika boyunca dakika başına değişen absorbans spektrofotometrik olarak okundu.
- Dakika başına değişen optik yoğunluk ölçüldü. Sonuç U L⁻¹ olarak verildi.

Hesaplama

340 nm: ΔOD dakika⁻¹ x 1746

2.2.3. ALP Aktivitesinin Tayini

ALP tayini prensibi aşağıdaki denklemde yer almaktadır (Matsuda ve ark., 2012).



Analizde Kullanılan Reaktifler

Reaktif 1: Diethanolamin tamponu (pH 10.2): 1.25 mol L⁻¹, Magnezyum Klorür: 0.625 mmol L⁻¹

Reaktif 2: Para-Nitrofenil Fosfat: 50 mmol L⁻¹

Çalışma Reaktifi (Rç): Reaktif 1'den 4 hacim Reaktif 2'den 1 hacim alınıp karıştırılır.

Deneyin Yapılışı

- Çalışma reaktifinden 1mL alındı.
- 20 µL örnek eklendi.
- Vorteksle karıştırıldı.
- Örnek 37 °C'de 1 dakika inkübatörde bekletildi.
- 405 nm'de 3 dakika boyunca dakika başına değişen absorbans spektrofotometrik olarak okundu.
- Dakika başına değişen optik yoğunluk ölçüldü. Sonuç U L⁻¹ olarak verildi.

Hesaplama

405 nm: $\Delta\text{OD dakika}^{-1} \times 2750$

2.2.4. MDA, GSH, GPx, SOD, KAT ve Protein Tayini İçin Karaciğer Doku Örneklerinin Hazırlanması

TissueLyser II kullanılarak toz haline getirilmiş olan karaciğer dokuları MDA, GSH, GPx ve protein analizleri için %1.15'lik KCl ile sulandırılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar MDA ve protein için 3500 rpm'de 15 dakika GSH ve GPx için 11000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım analizlerde kullanıldı. SOD aktivite tayini için karaciğer ve böbrek dokuları için Tris-HCl Tamponu (pH 7.4) ile sulandırılarak homojenize edilmiş ve 7000 rpm'de 60 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım analizde kullanıldı. KAT aktivite tayininde ise dokular Triton-x-100 ile sulandırılarak homojenize edildi ve 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım analiz için hazır hale getirildi.

2.2.5. Biyokimyasal Analizler (MDA, GSH, GPx, SOD, KAT ve Protein Tayini)

2.2.5.1. MDA Tayini

Hazırlanan homojenatta MDA düzeyinin ölçümü Placer ve ark., (1966) bildirdiği metoda göre yapıldı. Bu metot'ta MDA bir lipid peroksidasyon aldehit ürünüdür ve bu yöneme göre tiyobarbitürik asit (TBA) ile analiz sırasında pembe renkli olan bir yapı oluşumu gözlenir. Analiz sonrası oluşan bu çözeltinin absorbanı ELISA okuyucusunda 532 nm dalga boyunda ölçülür ve standart grafiğe göre hesaplanır.

Analizde Kullanılan Reaktifler

Tiyobarbitürik Asit (TBA) Solüsyonu: 0.67 g tiyobarbitürik asit %10' luk 80 mL perklorik asit içinde çözdürülüp toplam hacim 100 mL'ye distile suyla tamamlandı.

Trikloroasetik asit (TCA) Solüsyonu: % 10'luk (100 mL'de 10 g TCA olacak şekilde) hazırlanan çözelti ışık almayacak şekilde kahverengi cam şişelerde +4 °C muhafaza edildi.

Renk Ayırıcı: 3 birim TCA ile 1 birim TBA'nın karıştırılmasıyla elde edilir ve analizde kullanılmak üzere deneyden hemen önce hazırlandı.

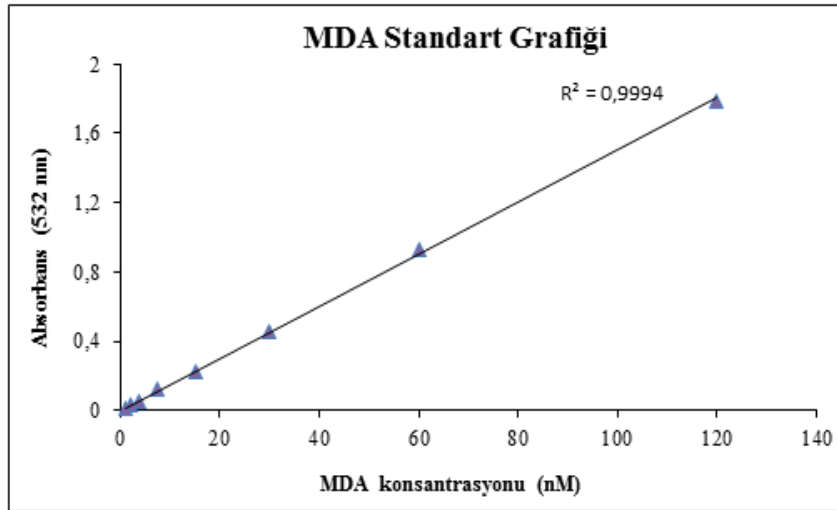
Deneyin Yapılışı

Tablo 2.1. MDA Düzeyinin Ölçümü

	Kör (mL)	Standart (mL)	Örnek (mL)
Örnek	-	-	0.25
%0.9 NaCl	0.25	-	-
Renk Ayıracı	2.25	2.25	2.25
Standart	-	0.25	-

- Vida kapaklı cam tüplerin kapakları kapatıldı ve vortekste 5 dakika karıştırıldı.
- Su banyosu 100 °C'ye ayarlandı tüpler su banyosunda 20 dakika kaynatıldı ardından soğutuldu.
- Soğutulan tüpler 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant alındı.
- Pleyte yüklenen numuneler köre karşı 532 nm dalga boyunda okundu.

Karaciğer Dokularında MDA Düzeyinin Hesaplanması: Dokulardaki MDA düzeyleri, 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) kullanılarak hazırlanmış standart grafikten yararlanarak hesaplanmış olup sonuçlar nmol g^{-1} doku olarak verildi.



Şekil 2.1. MDA standart grafiği

2.2.5.2. GSH Tayini

Hazırlanan homojenatta GSH düzeyinin ölçümü Sedlak ve Lindsay'ın (1968) bildirdiği metoda göre yapıldı. Bu metoda göre DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik) asit], sülfidril gruplu bileşikler tarafından indirgenir ve meydana gelen sarı renk spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ölçülür.

Analizde Kullanılan Reaktifler

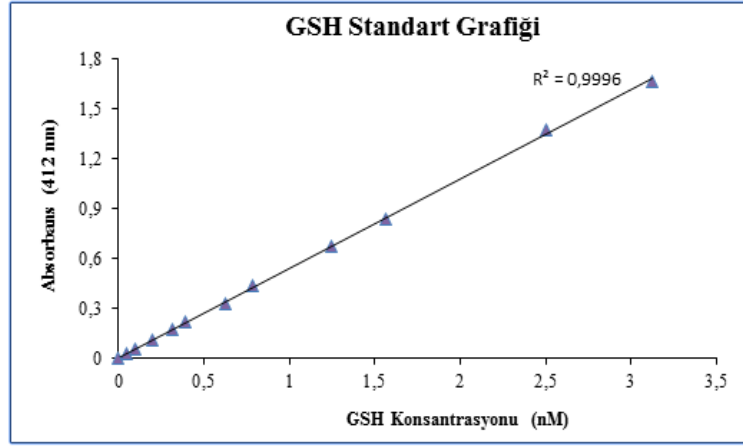
- %10'luk TCA
- Tris (hidroksimetil) aminometan: 48.46 gr alınarak distile suda çözdürülüp toplam hacim 1000 ml distile su ile tamamlandı ve pH: 8.9'a ayarlandı.
- 5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik) asit'den (DTNB) 0.099 g alındı 25 mL metanol'de çözüldü.

Deneyin Yapılışı

- 0.5 mL doku homojenatı alınarak deney tüpüne aktarıldı. Deney tüpünün üzerine 2 mL TCA eklendi 20 saniye vortekste karıştırıldı.
- 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatanttan 0.5 mL alındı.
- Üzerine 2 mL Tris Tamponu eklendi, sonrasında 0.1 mL DTNB solüsyonu eklendi.
- Karıştırılan tüpler 5 dakika bekletildikten sonra 412 nm dalga boyunda distile suya karşı okundu.

Hesaplama

Sonuçlar GSH standart grafiğinden hesaplandı. Sonuçlar nmol g⁻¹ doku olarak verildi.



Şekil 2.2. GSH standart grafiği

2.2.5.3. SOD Tayini

Hazırlanan homojenatta SOD aktivitesinin ölçümü Sun ve ark. (1988) yöntemine göre ölçüldü.

SOD aktivitesinin ölçüldüğü bu deney ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle üretilen süperoksit radikalinin NBT'ü indirgemesiyle oluşan renk esasına dayanmaktadır. Oluşan bu renkli çözeltilerin 560 nm'de mavi renkli formazon oluşumuyla maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda indirgenme maksimum olduğu için koyu mavi renk oluşumu gözlenir. SOD bulunduğu ortamda ise enzim, süperoksit anyonunu H₂O₂'e dönüştürerek NBT indirgenmesini azaltmakta ve renk değişimi gözlenmektedir. Formazonun oluşumu enzim konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Formazonun 560 nm'de verdiği absorbans ile SOD aktivitesi hesaplanmış olur.

Analizde Kullanılan Reaktifler

SOD Ölçüm Karışımı

- 0.6 mmol L⁻¹ Na₂EDTA: 23 mg Na₂EDTA tartılıp distile suda çözündürülüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- 400 mmol L⁻¹ Na₂CO₃: 2.54 g Na₂CO₃: 2.54 g Na₂CO₃ tartılıp distile suda çözündürülüp toplam hacim 60 mL'ye tamamlandı.
- 0.3 mmol L⁻¹ Ksantin: 9.13 mg Ksantin tartılarak distile suda çözündürüldü ve toplam hacim 200 mL'ye tamamlandı.

- 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Nitroblue tetrazolyum (NBT): 12.3 mg NBT tartılarak distile suda çözdürüldü ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- 1 g L^{-1} Bovine Serum Albumin (BSA): 30 mg BSA tartılarak distile suda çözdürüldü ve toplam hacim 30 mL'ye tamamlandı.

Ksantin oksidaz (167 U L^{-1}); Mililitresinde 0.167 U olacak şekilde $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ içinde çözdürüldü .

2M $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; 2.64 g amonyum sülfat tartılarak distile suyla 10 mL'ye distile suyla tamamlandı.

0.8 mmol L^{-1} CuCl_2 ; 13.6 mg CuCl_2 tartılarak distile suda çözdürüldü ve toplam hacim distile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Tablo 2.2. SOD aktivitesinin ölçümü

	Kör (mL)	Örnek (mL)
Reaksiyon çözeltisi	2.85	2.85
Süpernatant	-	0.10
Distile su	0.10	-
Ksantin oksidaz	0.05	0.05

20 dakika oda ısısında inkübasyondan sonra tüplerin hepsine 1 mL CuCl_2 ilave edildi ve reaksiyon durduruldu. 560 nm'de okundu.

Hesaplama

$$\text{U g}^{-1} \text{ protein} = \frac{\text{Kör (O.D)} - \text{Örnek (O.D)}}{\text{Kör (O.D)}}$$

2.2.5.4. KAT Tayini

Karaciğer dokularında KAT aktivitesi Aebi'nin (1983) metoduna göre ölçüldü. KAT, H₂O₂ yıkımını katalize eder. KAT tarafından H₂O₂'in yıkım hızı, H₂O₂' in 240 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Analizde Kullanılan Reaktifler

- 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.0)
- 30 mM H₂O₂: 0.34 mL %30'luk H₂O₂ fosfat tampon ile 100 mL'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Tablo 2.3. KAT aktivitesinin ölçümü

	Kör(mL)	Örnek(mL)
Fosfat tampon	1	-
Hidrojen peroksit	-	1
Homojenat	2	2

Kör ile 240 nm'de numunelerin kinetik ölçümü ile 0. (Abs1) ve 30. (Abs2) saniyelerdeki absorbans farkı ölçülmesiyle KAT aktivitesi hesaplanır.

Hesaplama

$$k = (2.3/30) \times (\log A1/A2) \times \text{Dilüsyon}$$

Doku için spesifik aktivite: k g⁻¹ protein olarak verildi.

2.2.5.5. GPx Tayini

Hazırlanan homojenatta GPx düzeyinin ölçümü Matkovics ve ark., (1988) yöntemine göre ölçüldü.

Analizde Kullanılan Reaktifler

- Tampon A: Tris-HCl tamponu (50 mM, pH: 7.6): 6.057 g tris hidroksimetil aminometan, 0.372 g Na₂EDTA tartıldı ve 3.90 mL HCl balon jojeye alınarak hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
- Tampon B: Tris Tamponu (0.4 M pH:8.9): 48.46 g tris hidroksimetil aminometan alındı ve hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı pH'sı 8.9'a ayarlandı.
- Trikloroasetik asit çözeltisi (TCA): 10 g TCA tartıldı distile su ile 100 mL'ye tamamlandı (%10'luk, w/v).
- Red GSH çözeltisi: 6 mg Red GSH alınarak Tampon A ile hacim 10 mL'ye tamamlandı.
- Cumen Hidrojen Peroksit (CHPO) çözeltisi: CHPO 5µL alınarak Tampon A ile 10 mL'ye tamamlandı ve renkli şişede +4 °C'de saklandı.
- 5-5-Dithio-bis, 2-nitrobenzoik asid (DTNB) solüsyonu: 0.099 g DTNB alındı ve hacim absolut metanol ile 25 mL'ye tamamlandı ve renkli şişede +4 °C'de saklandı.

Deneyin Yapılışı

Tablo 2.4. GPx Aktivitesinin Ölçümü

	Kontrol (mL)	Örnek (mL)
Süpernatant	0.5	0.5
Tampon	0.3	0.3
CHPO	-	0.1
Red GSH	0.1	0.1
37 °C' de 10 dakika bekleme	+	+
TCA	1	1

Tüpler karıştırıldıktan sonra;

- 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant'dan 1 mL alınarak hazırlanan yeni tüplere konuldu.
- Tüplere 2 mL tampon B eklendi.

- 0.1 mL DTNB ilave edildi.
- Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek 412 nm’de distile suya karşı okundu.
- Sonuçlar $U\ g^{-1}$ protein olarak verildi.

Hesaplama

$[\text{Abs}(\text{kontrol}) - \text{Abs}(\text{örnek})] \times 0.76989\ g^{-1}$ protein

2.2.5.6. Arginaz Tayini

Arginaz aktivitesi; Tiyosemikarbazid-Diasetil Monoksim Üre (TDMU) yöntemi esas alınarak ölçülmüştür (Geyer ve Dabich, 1971) Diasetilmonoksim, asitli ortamda ısının etkisiyle diasetil ve hidroksilamine hidroliz olur. Diasetil, asitli ortamda üre ile birleşerek sarı renkli diazin’i oluşturur. Oluşan sarı rengi kararlı hale getirmek için Tiyosemikarbazid ve Fe^{2+} iyonları kullanılır (Pesce ve Kaplan, 1987).

Analizde Kullanılan Reaktifler

- 10 mM $MnCl_2$ Çözeltisi;
- 10 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Molekül Ağırlığı: $197.9\ g\ mol^{-1}$) tartılarak distile su da çözüldü ve distile su ile 500 mL’ye tamamlanarak $+4\ ^\circ C$ ’de saklandı. Çalışma için kullanılacak olan bu çözeltiden sulandırılarak istenilen konsantrasyon da kullanıldı.
- Üre Standartı ($0.1\ \mu mol\ üre\ mL^{-1}$); 3 mg üre (Mol. Ağ. $60.06\ g\ mol^{-1}$), 100 mL $0.016\ M$ Benzoik asit içinde çözüldü. Hazırlanan bu çözelti, deney de 1/5 oranında sulandırıldıktan sonra $0.1\ \mu mol\ üre\ mL^{-1}$ ($0.6\ mg\ dL^{-1}$)’lik üre standartı elde edildi.
- Renk Ayırıcı; $0.0036\ M$ Tiyosemikarbazid (TSC, Mol. Ağ. $91.14\ g\ mol^{-1}$) ve $0.0617\ M$ Diasetilmonoksim (DAM, Mol. Ağ. $101.1\ g\ mol^{-1}$)’den oluşur. 6.23 g DAM ve 0.328 g TCS distile su da çözüldü ve 1000 mL’ye tamamlanarak koyu renkli reaktif şişesinde, oda ısısında saklandı.
- Karbonat Tampon Çözeltisi ($200\ mM\ NaHCO_3/Na_2CO_3$);
- 1.68 g $NaHCO_3$ (Mol. Ağ. $84.01\ g\ mol^{-1}$) alındı ve distile suda çözdürülerek 100 mL’ye tamamlandı.

- 2.12 g Na₂CO₃ (Mol. Ağ. 105.99 g mol⁻¹) alındı ve distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- Karbonat Tamponu hazırlanırken 200 mM'lık NaHCO₃ çözeltisi bir behere konular Na₂CO₃ ile pH' sı 9.5'e ayarlanır ve +4 °C'de saklanır.

120 mM L-Arginin Çözeltisi; 2.52 g L- arginin monohidroklorit (Mol. Ağ. 210.66 g mol⁻¹) alındı ve distile suyla 100 mL tamamlanarak pH'sı 9.5'e ayarlandı.

Asit Karışımı;

- 0.120 M FeCl₃/ %56.7 H₃PO₄, 3.24 g FeCl₃ (Mol. Ağ. 270.3 g mol⁻¹) distile su ile çözdürüldü ardından 66.7 mL % 85'lik H₃PO₄'den (d=1.71, Mol. Ağ. 98.0 g mol⁻¹) eklendi ve distile suyla 100 mL'ye tamamlanıp oda ısısında muhafaza edildi.
- 999 ml %20 (v/v)'lik H₂SO₄ (d=1.84, Mol. Ağ. 98.08 g mol⁻¹) alınarak üzerine 1.0 mL üstte hazırlanan 0.120 M FeCl₃ / % 56.7 H₃PO₄ çözeltisinden eklenerek oda ısısında muhafaza edilir.

Deneyin Yapılışı

Öğütülüp hazırlanan karaciğer doku örneklerinden 0.050 mg tartıldı ve üzerine 250 µL distile su eklendi. (sulandırma 1/6). Örnekler Tissuelyser II'de homojenize edildi. Elde edilen homojenat +4 °C'de 12000 rpm'de 14 dakika santrifüj edildi. Bu işlemden sonra örneklerin süpernatantları ve peletleri (çöken kısım) birbirinden ayrıldı, süpernatant kısım enzim kaynağı olarak kullanıldı. Her bir arginaz aktivitesi 2 örnek 2 zero tüpü kullanılarak çalışıldı. Örnekler daha sonra 2 mM MnCl₂ çözeltisiyle 1x50 oranında sulandırılarak 58 °C'de 13 dakika su banyosunda tutuldu ve preinkübasyon işlemi sağlandı. Preinkübasyondan sonra örnekler enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Tüp içerisindeki enzimatik karışım 1 mL olup 120 mM'lık L-arginin'den 0.3 mL 200 mM'lık karbonat tamponundan 0.4 ml içerecek şekilde düzenlendi. Tüplere önce L-arginin sonra karbonat tamponu sonra da üzerine preinkübasyona tabii tutulan enzim kaynağından 0.3 mL eklenerek 37 °C'de 10 dakika su banyosunda tutularak enzimatik tepkime başlatıldı. Su banyosundan çıkarılan tüplere 3 mL asit karışımı eklenerek enzimatik tepkime durduruldu. Asit eklenmesinin sonrasında tüplere 2'şer mL renk ayırıcı eklenmiş ve tüpler vorteksle karıştırıldıktan sonra 10 dakika kaynar su banyosunda tutulup renk oluşumu sağlandı.

Kaynar su banyosundan çıkarılan tüpler soğutma işlemine tabi tutulduktan sonra 520 nm dalga boyunda okundu.

Çalışmada, 1 ünite enzim: 1 saatte 37 °C'de L-argininden 1 µmol üre oluşturan enzim miktarı olup, spesifik aktivite µmol üre/ saat / mg protein olarak ifade edildi.

Sonuçlar U g⁻¹ protein olarak verildi.

Tablo 2.5. Karaciğer dokusunda arginaz aktivitesi ölçümü

	Örnek (mL)	Zero (mL)	Standart (mL)	Kör (mL)
L-Arginin	0.3	0.3	-	-
Karbonat Tamponu	0.4	0.4	-	-
Enzim Kaynağı	0.3	0.3	-	-
Üre Std. Sol.	-	-	1	-
Distile Su	-	-	-	1
Asit Karışımı	3	3	3	3
Renk Ayırıcı	2	2	2	2

2.2.5.7. Nitrik Oksit (NO) Seviyesinin Ölçülmesi

Karaciğer Dokusu Nitrik Oksit (NO) düzeyleri ticari kit (Enzo Life Sciences, (ELS) AG, Industriestrasse 17 CH-4415 Lausen-İsviçre) kullanılarak ölçüldü.

Kit İçeriği;

- Mikrotiter Plakası
- Nitrat Redüktaz
- Nitrat Redüktaz Depolama Tamponu
- NADH
- Nitrat Standardı (1.000 umol L⁻¹'de bir sodyum nitrat çözeltisi)
- Reaksiyon Tampon
- Griess Reaktifi I, (2M hidroklorik asitte bir sülfanilamid çözeltisi)
- Griess Reaktifi II, (M hidroklorik asit içinde bir N-(1-Naphthyl) etilendiamin çözeltisi)

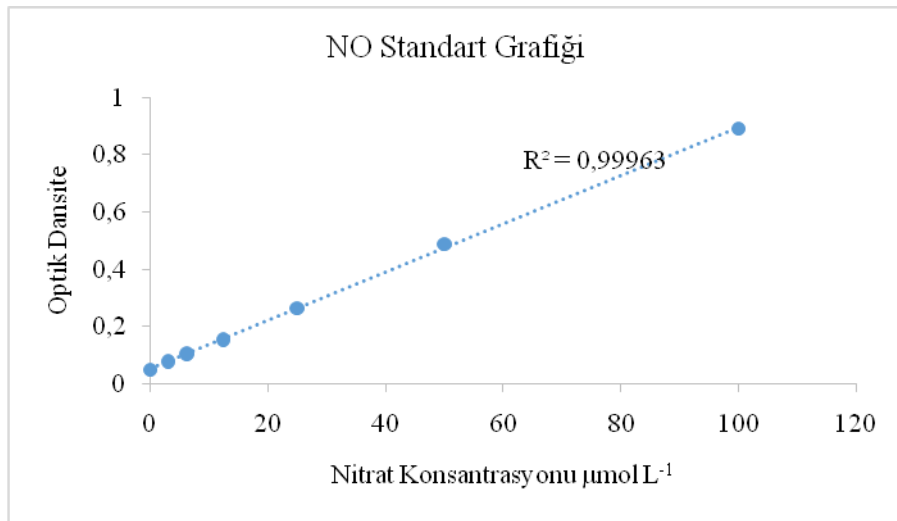
Deneyin Yapılışı

Tüm reaktifler açılmadan önce en az 30 dakika oda sıcaklığına getirildi.

Tablo 2.6. NO düzeyinin ölçümü

	Kör (µL)	Zero (µL)	Standart (µL)	Örnek (µL)
Reaksiyon Tamponu	200	50	-	-
Standart	-	-	50	-
Örnek	-	-	-	50
NADH	-	25	25	25
Nitrat Redüktaz	-	25	25	25
37°C de 30 dk inkübasyon				
Griess Reaktifi I	-	50	50	50
Griess Reaktifi II	-	50	50	50
10 Dakika oda ısısında bekletilir ve 540-570 nm' de okunur.				

Sonuçlar standart grafikten hesaplandı ve n mol g⁻¹ doku olarak verildi.



Şekil 2.3. NO standart grafiği

2.2.5.8. Protein Tayini

Karaciğer dokularında protein tayini modifiye Lowry (1951) metoduna göre belirlendi. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptit bağları ile kompleks oluşturur. Fenol ayırıcı, bakır ile işleme tabi tutulmuş karışıma eklendiğinde mor-mavi renk oluşumu gözlenmektedir. Oluşan bu renk 650 nm dalga boyunda okundu.

Analizde Kullanılan Reaktifler

Protein Standartı; 50 µg BSA/mL

Alkali Bakır Ayırıcı; 10 g Na₂CO₃, 0.1 g Potasyum tartarat ve 0.05 g bakır sülfat, 0.5 N NaOH içinde çözdürülür ve 100 mL'ye tamamlanır. Bu çözelti oda ısısında renkli şişe de 30 gün dayanıklıdır.

Fenol Ayırıcı; 2 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayırıcından 3.75 mL alındı ve distile su ile 67.5 mL' ye tamamlandı. Fenol ayırıcı çalışmanın örnek sayısına göre hesaplanıp günlük olarak hazırlanmalıdır.

Örnek: Analizi yapılmak istenen serum, plazma veya süpernatant.

Deneyin Yapılışı

Tablo 2.7. Protein ölçümü

	Kör (mL)	Standart (mL)	Örnek (mL)
Alkali Bakır Ayırıcı	1.0	1.0	1.0
Protein Standartı	-	1.0	-
Örnek	-	-	1.0
Distile su	1.0	-	-

- Tüpler karıştırılır ve 10 dakika oda ısısında bekletildi.
- Fenol ayırıcı tüm tüplere 4 mL eklendi.
- Tüpler karıştırılır ve su banyosunda 5 dakika 55 °C' de bekletildi.
- İnkübasyon sonrası tüpler soğutulur ve 650 nm'de kör tüpüne karşı okundu.

Hesaplama

$\mu\text{g protein mL}^{-1} = (\text{Örnek Abs.} / \text{Std. Abs.}) \times \text{Std. Konsantrasyonu}$

2.2.5.9. Histopatolojik İnceleme

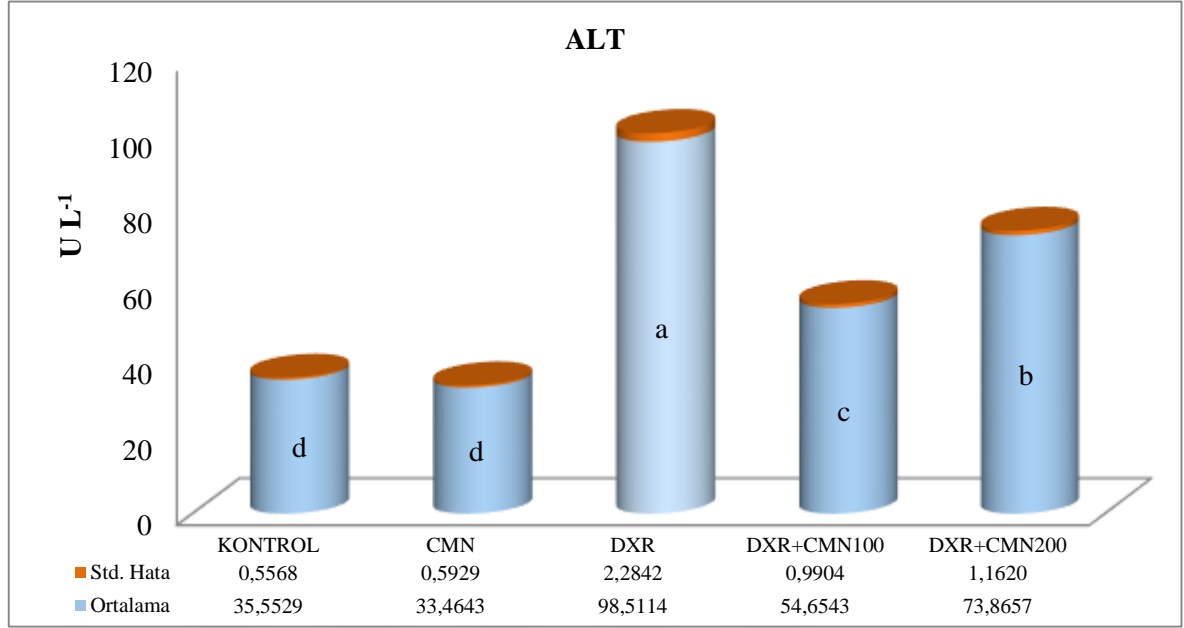
Ratların ötenazi sonrası nekropsileri yapılarak karaciğer dokuları %10'luk tamponlu formalin solüsyonuna alındı. Alınan örnekler daha sonra rutin takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Bloklardan alınan 5 μm 'lik kesitler nekrotik ve dejeneratif değişiklikler yönünden Hematoksilen-Eozin ile boyanarak incelendi. Işık mikroskopunda incelenen kesitler yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

2.2.5.10. İstatistiksel Analiz

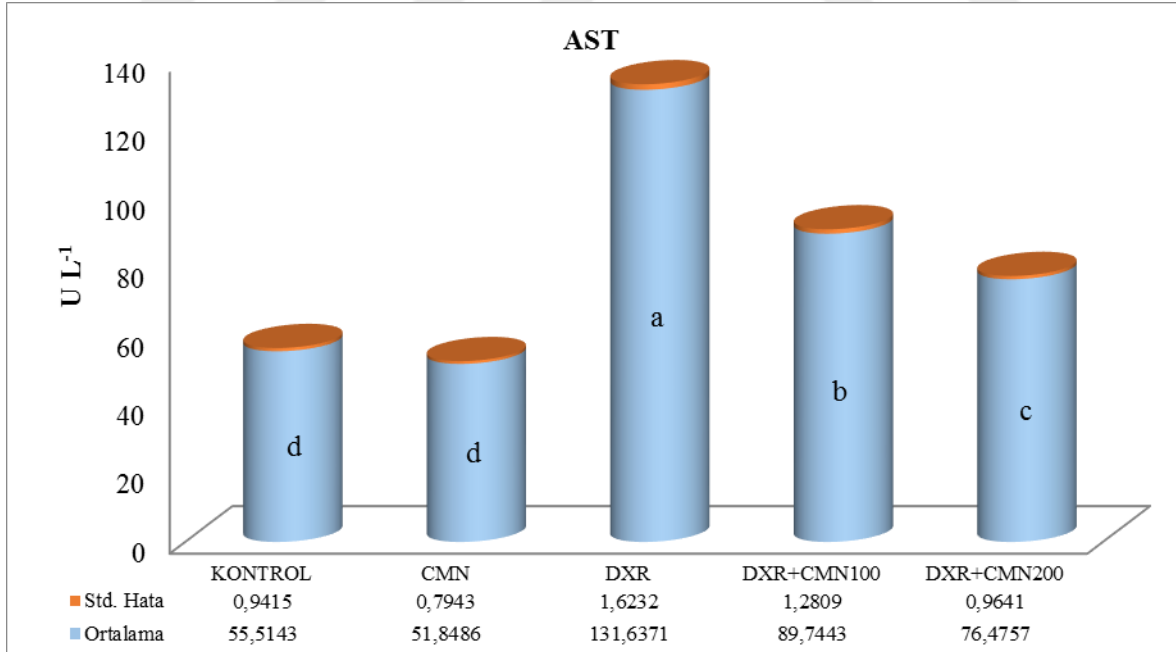
Bu çalışmanın biyokimyasal parametreleri için istatistiksel analizleri SPSS 20.0 yazılım programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analiz yöntemi uygulanmadan önce verilere normal dağılım testi uygulandı. Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri "One-way Analysis of Variance (ANOVA)" testi ile belirlendi ve istatistiksel farklılıkların hangi gruplar arasında gerçekleştiğini belirlemek amacıyla Tukey testi uygulandı ($p < 0.05$).

Histopatolojik verilerle ilgili sonuçların değerlendirilmesinde SPSS 20.0 programı kullanıldı. Histopatolojik incelemede semikantitatif olarak elde edilen verilerin gruplar arası farklılığın belirlenmesinde parametrik olmayan istatistiksel yöntemlerden Kruskal Wallis testi ve farklılığı oluşturan grupların tespitinde Mann Whitney U testi kullanıldı ($p < 0.05$).

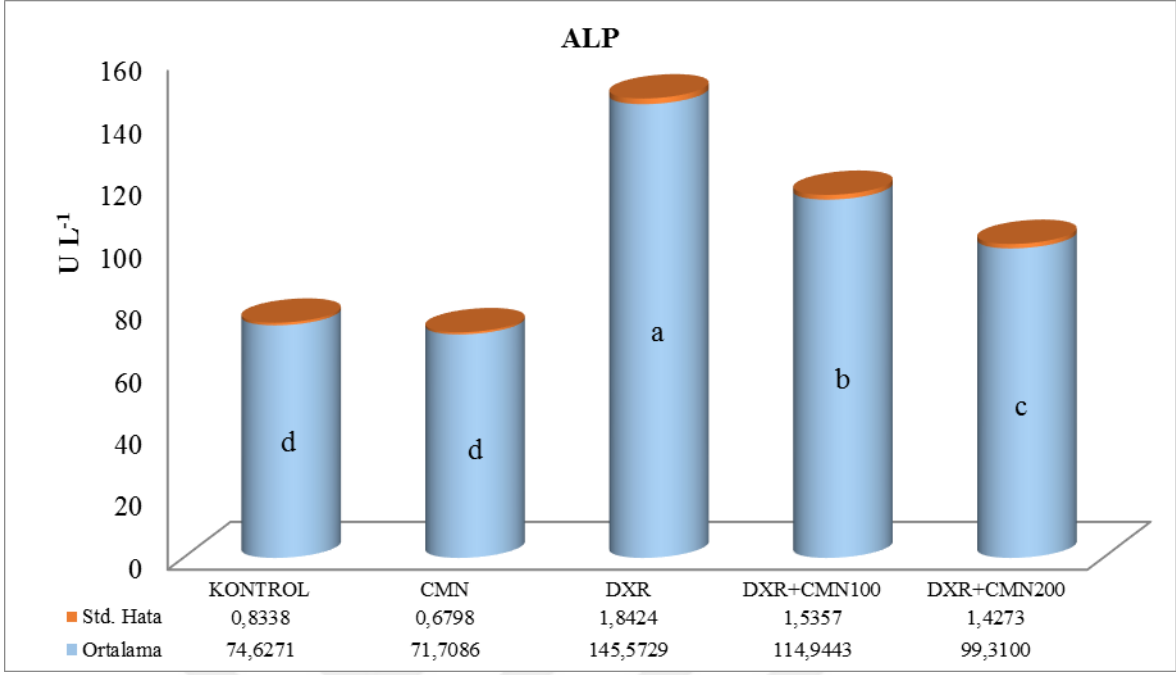
3. BULGULAR VE TARTIŞMA



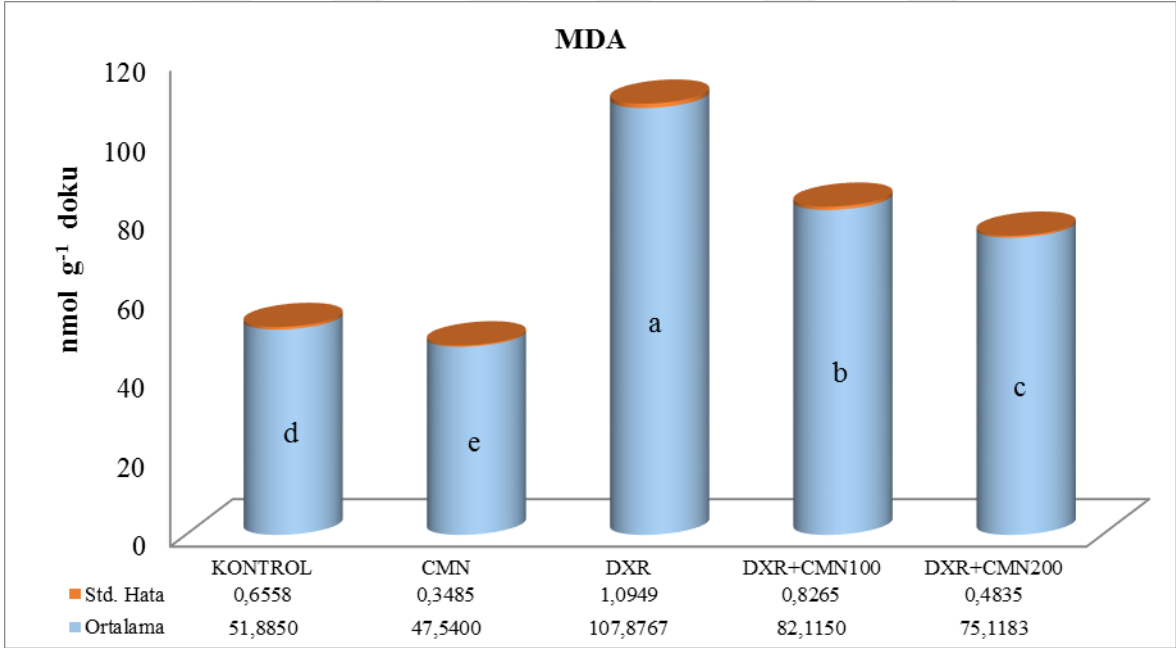
Şekil 3.1. Serum ALT aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



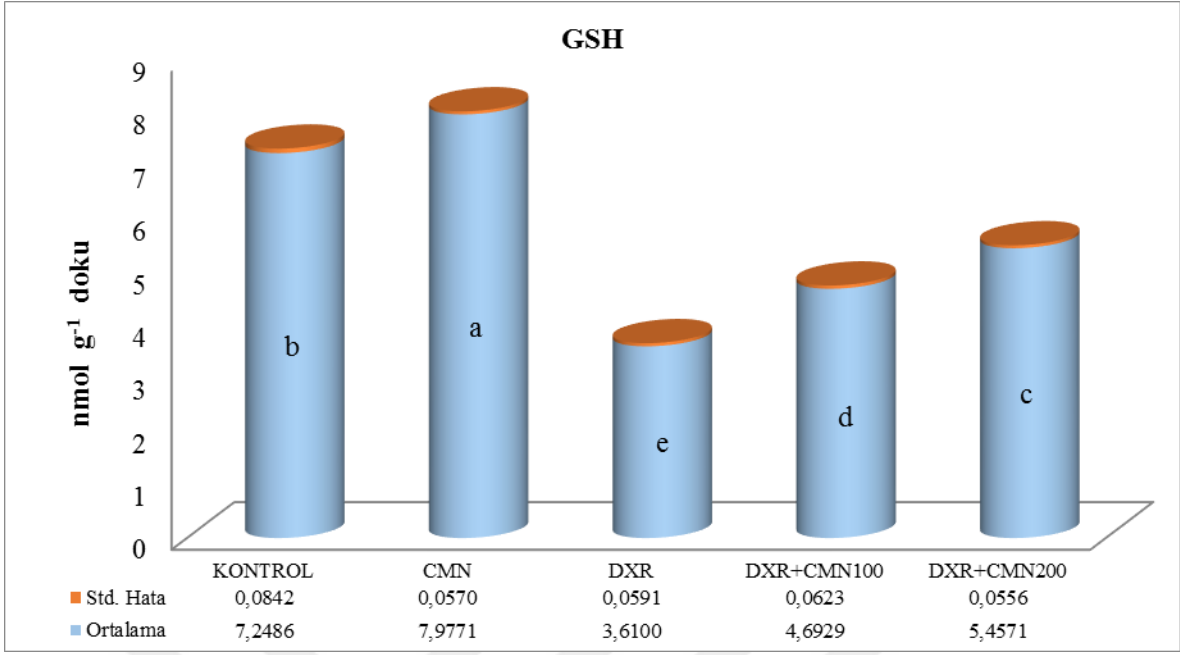
Şekil 3.2. Serum AST aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



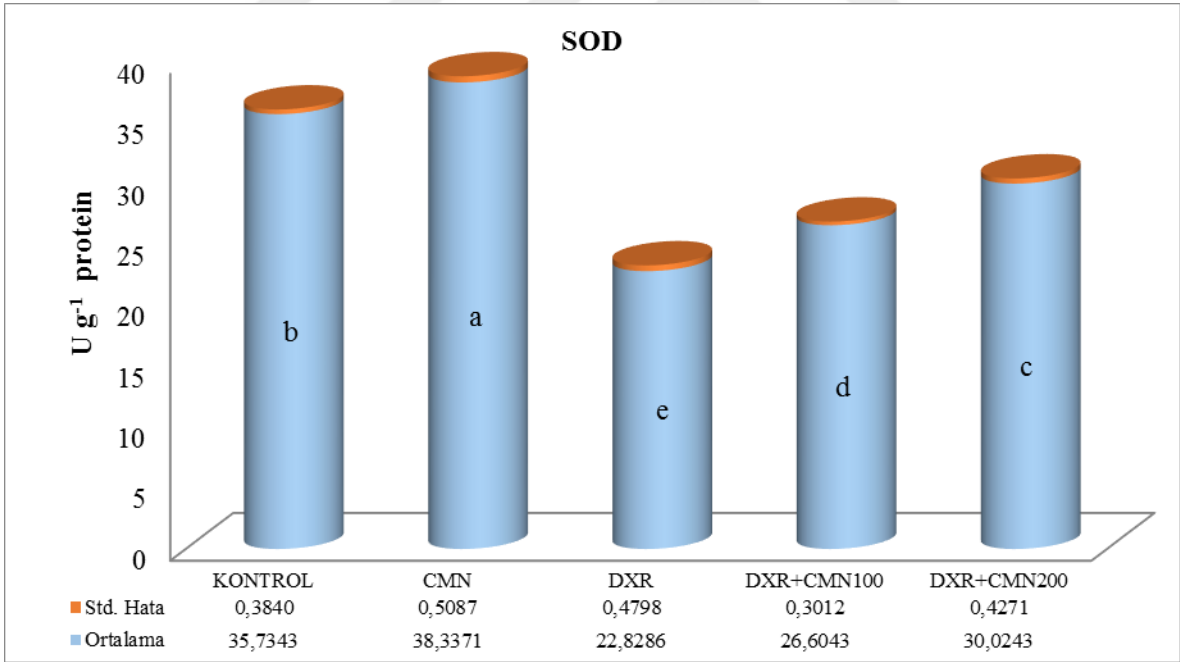
Şekil 3.3. Serum ALP aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



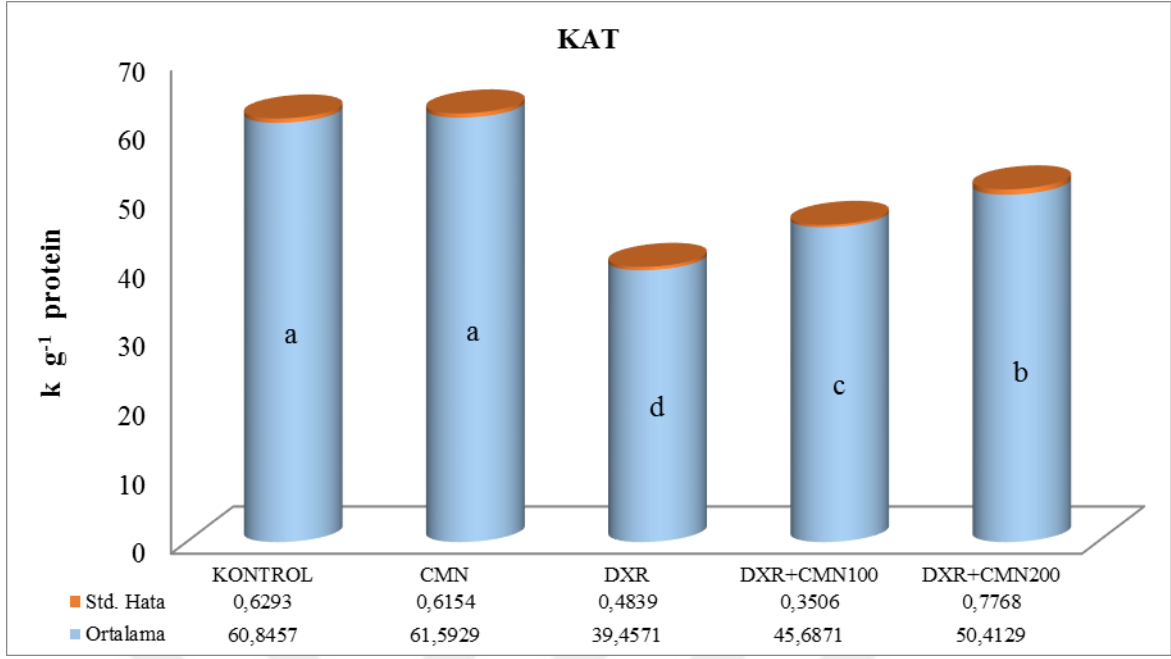
Şekil 3.4. Karaciğer MDA düzeyi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



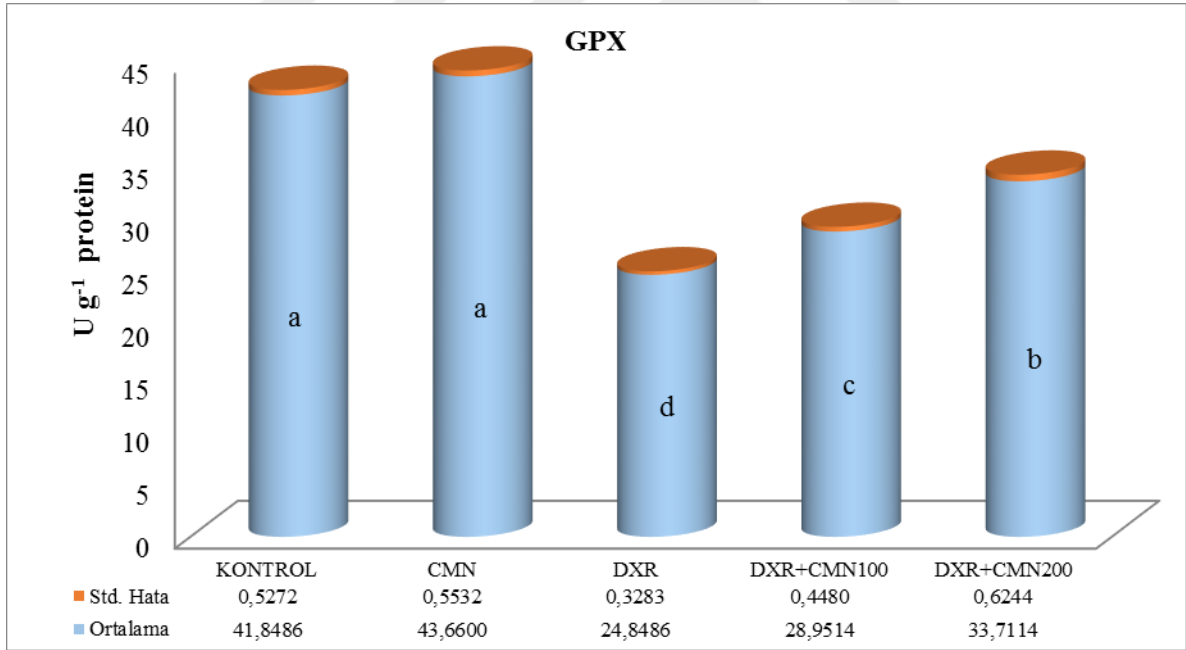
Şekil 3.5. Karaciğer GSH düzeyi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



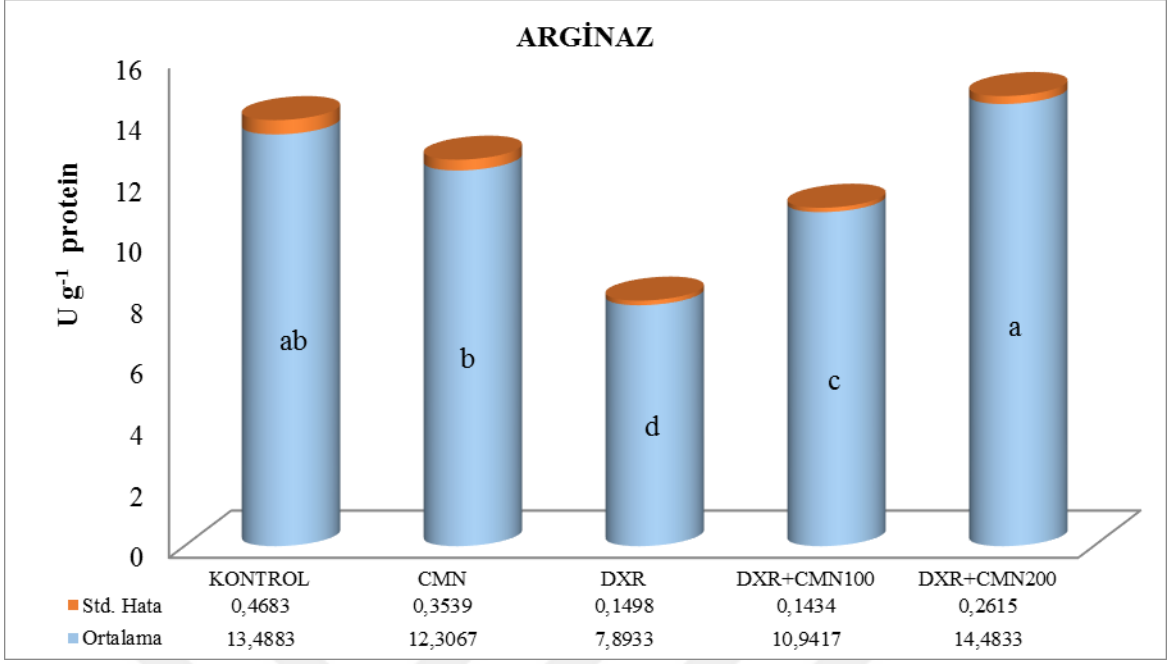
Şekil 3.6. Karaciğer SOD aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



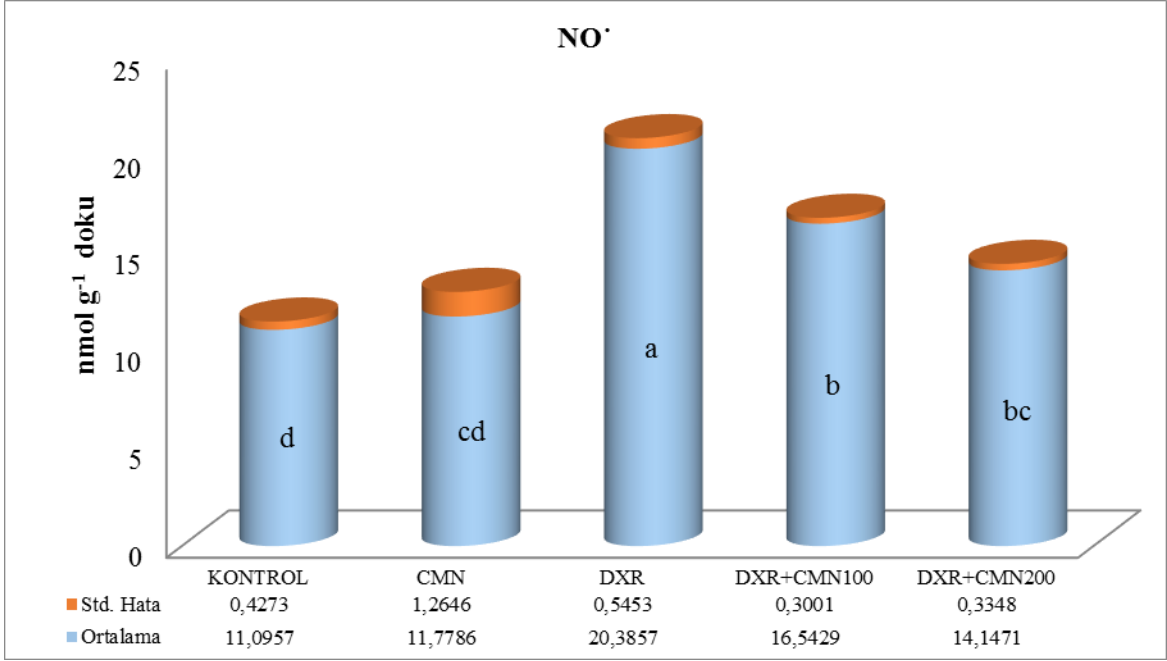
Şekil 3.7. Karaciğer KAT aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



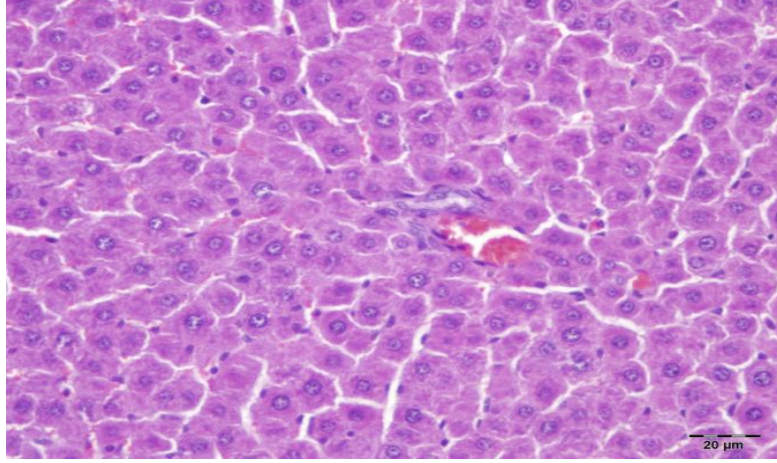
Şekil 3.8. Karaciğer GPx aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



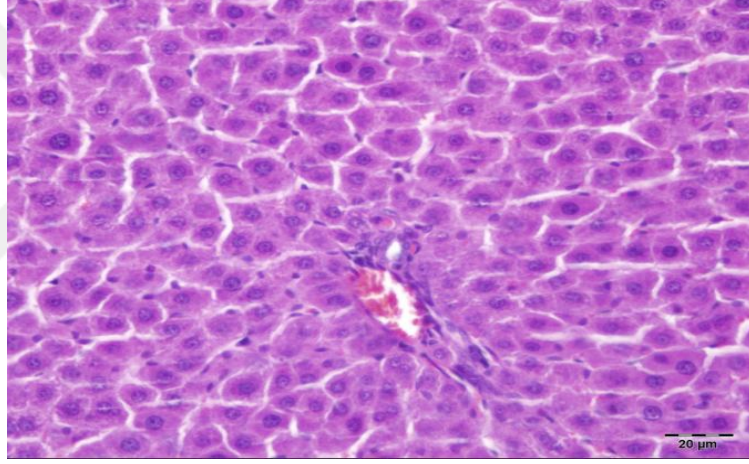
Şekil 3.9. Karaciğer arginaz aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



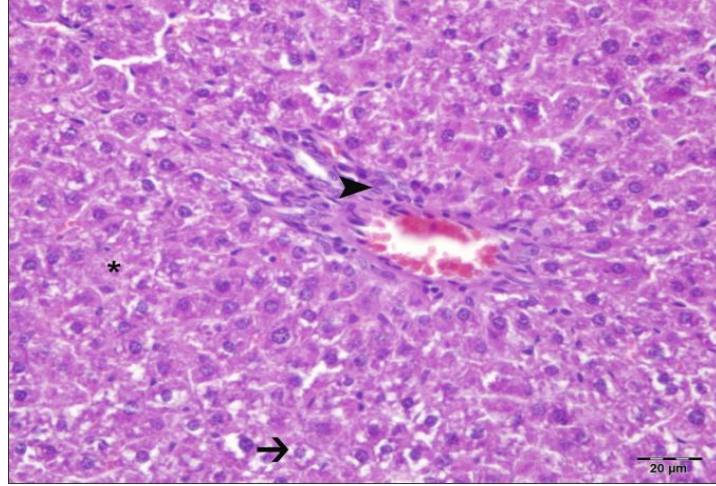
Şekil 3.10. Karaciğer NO düzeyi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir).



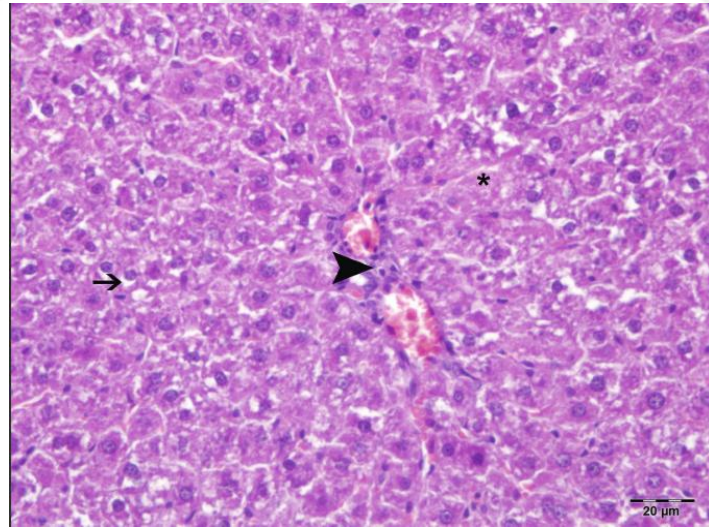
Şekil 3.11. Kontrol grubunun histolojik görünümü



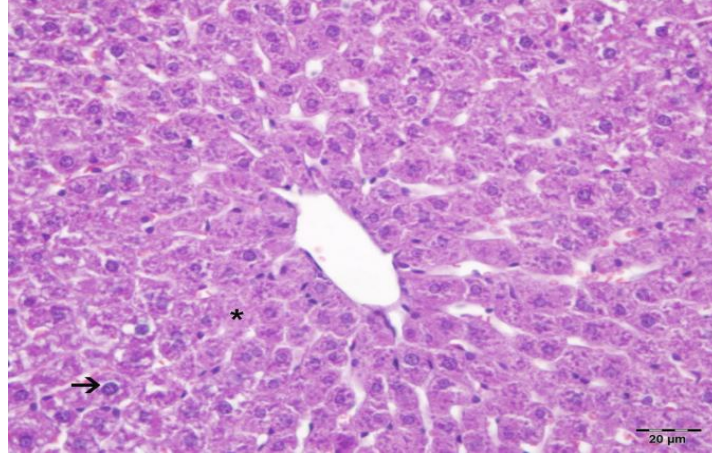
Şekil 3.12. CMN grubunun histolojik görünümü



Şekil 3.13. DXR grubunun histopatolojik görünümü. Hepatositlerde şiddetli düzeyde nekrotik değişiklikler (*), hidropik dejenerasyon (ok) ve mononükleer hücre infiltrasyonları (ok başı).



Şekil 3.14. DXR+CMN 100 grubunun histopatolojik görünümü. Hepatositlerde şiddetli düzeyde nekrotik değişiklikler (*), hidropik dejenerasyon (ok) ve mononükleer hücre infiltrasyonları (ok başı).



Şekil 3.15. DXR+CMN 200 grubunun histopatolojik görünümü. Hepatositlerde orta düzeyde nekrotik değişiklikler (*) ve hidropik dejenerasyon (ok).

Tablo 3.1. Histopatolojik bulgular

	Grup	Mean Rank	Asymp. Sig. (p)	Min.	Max
Nekroz	Kontrol	8,14	0,000	0	3
	CMN	7,07			
	DXR	27,64			
	DXR+CMN 100	27,64			
	DXR+CMN 200	19,50			
Hidropik Dejenerasyon	Kontrol	8,07	0,000	0	3
	CMN	8,07			
	DXR	26,71			
	DXR+ CMN 100	27,93			
	DXR+ CMN 200	19,50			
MN Hücre infiltrasyonu	Kontrol	8,64	0,000	0	2
	CMN	8,64			
	DXR	27,21			
	DXR+ CMN 100	27,21			
	DXR+ CMN 200	18,29			

Karaciğer hasarının belirteçlerinden olan serum ALT (Şekil 3.1), AST (Şekil 3.2) ve ALP (Şekil 3.3) aktiviteleri incelendiğinde her üç grafikte de kontrol ve CMN gruplarının en düşük düzeylerde olduğu ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür. DXR uygulanan ratlarda her üç parametrede de kontrole ve CMN grubuna kıyasla bir artış meydana geldiği gözlemlendi. Karaciğer doku hasarına bağlı olarak meydana gelen bu serum enzim aktivitelerindeki artışlar üzerine CMN'nin önleyici etkisi

olduğu görüldü. Serum AST ve ALP değerleri üzerine CMN 200 daha etkili olurken, serum ALT'de CMN 100 daha etkili olmuştur. Her üç şekilde de CMN uygulanmasının DXR hasarına bağlı olarak meydana gelen enzim aktivitelerini kontrol düzeyine getiremediği görülmüştür.

Serbest radikal hasarının en iyi göstergelerinden biri olan MDA düzeylerine bakıldığında (Şekil 3.4) kontrole göre CMN grubunda bir düşüş olması CMN'nin normal metabolik olaylarda meydana gelen serbest radikal hasarını azaltmada etkili olduğunu göstermektedir. DXR'nin karaciğerde meydana getirdiği hasar sonucu kontrol ve CMN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. CMN uygulanmasının DXR'ye bağlı doku hasarını azalttığı ancak bu hasarı azaltmada CMN'nin yüksek dozunun (CMN 200) daha da etkili olduğu görüldü.

Enzimatik olmayan antioksidanlardan karaciğer GSH düzeyleri incelendiğinde (Şekil 3.5) kontrole oranla CMN grubunda bir artış olması CMN'nin antioksidan sistemi güçlendirdiğini göstermektedir. DXR grubunun kontrole oranla düşmesi de DXR'nin antioksidan sistemi zayıflattığını göstermektedir. DXR'ye bağlı olarak GSH düzeyindeki bu azalma üzerine CMN'nin her iki dozunun da artırıcı yönde etki gösterdiği ve yüksek dozun daha etkili olduğunu görülmüştür. Ancak uygulanan bu dozlar GSH seviyelerini normal düzeye getirememiştir.

Serbest radikal hasarını önlemede antioksidan savunmanın ilk enzimi olan SOD aktivitesine bakıldığında (Şekil 3.6) kontrole oranla CMN grubunun daha yüksek olması CMN'nin sağlıklı bireylerde antioksidan sistemi güçlendirdiğini göstermektedir. SOD aktivitesi DXR grubunda en düşük düzeyde bulunmuştur. SOD aktivitesindeki bu düşüşü artırmada CMN 200'ün daha etkili olduğu görülmüş olup uygulanan bu dozların SOD aktivitesini kontrol seviyesine getirmeğe yeterli olmadığı görülmüştür.

Hidrojen peroksitin yıkımlanmasından sorumlu olan enzimlerden KAT (Şekil 3.7) ve GPx (Şekil 3.8) enzim aktivitelerine bakıldığında kontrol ve CMN grupları arasında fark olmaması CMN'nin bu iki enzim üzerine sağlıklı grupta herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir. DXR grubunun her iki enzim aktivitesinde de en düşük grup olduğu ve bu enzim aktivitelerindeki düşüşü önlemede CMN'nin yüksek dozunun daha etkili olduğu görülmüştür. Diğer antioksidanlarda olduğu gibi CMN'nin KAT ve GPx üzerinde enzim aktivitesini artırıcı etkisi olmasına rağmen kontrol seviyelerine getirmeğe yeterli olmadığı bulunmuştur.

Üre döngüsü enzimlerinde olan arginaz enzim aktivitesine (Şekil 3.9) bakıldığında CMN grubunun kontrolden farklı olmadığı, DXR grubunun kontrole oranla düşük olduğu ve DXR ile birlikte uygulanan CMN'nin her iki dozunun arginaz aktivitesini artırdığı ancak yüksek dozunun enzim aktivitesi kontrol grubu seviyesine getirmeğe yeterli olduğu görülmüştür.

Karaciğer NO[•] düzeyleri incelendiğinde (Şekil 3.10) kontrol ve tek başına CMN grubunun aynı olduğu, DXR uygulamasının NO[•] düzeyini kontrole göre artırdığı ve bu artış üzerine DXR ile birlikte uygulanan CMN'nin her iki dozunun da NO[•] Düzeyini azalttığı ve bu iki doz arasında NO[•]'yu azaltmada fark olmadığı görülmüştür.

Histopatolojik incelemede istatistiksel olarak bazı gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi (Tablo 2.7) Kontrol ve CMN gruplarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark görülmedi. DXR ve DXR+CMN 100 gruplarında ise nekroz, hidropik dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonlarının istatistiksel olarak, DXR+CMN 200 grubuna göre daha yüksek düzeyde olduğu belirlendi (p<0.001).

Histopatolojik olarak incelendiğinde Kontrol ve CMN gruplarındaki ratların karaciğer dokuları normal histolojik görünümdeydi (Şekil 3.11, Şekil 3.12). DXR grubunda hepatositlerde şiddetli düzeyde nekrotik değişiklikler, hidropik dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonları gözlemlendi (Şekil 3.13). DXR+CMN 100 grubunda da hepatositlerde şiddetli düzeyde nekrotik değişiklikler, hidropik dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü (Şekil 3.14). Fakat DXR+CMN 200 grubunda görülen hepatositlerde görülen nekrotik değişiklikler ve hidropik dejenerasyonların DXR ve DXR+CMN 100 grubuna göre daha hafif olduğu düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 3.15).

Adriamisin olarak da bilinen antrasiklin grubu antibiyotik olan DXR 1960'ların sonlarından beri onkolojik olarak kullanılmaktadır. DXR tek başına veya diğer kemoterapötik ilaçlarla birlikte lösemi, lenfoma ve solid tümörlerin tedavisine katkıda bulunmaktadır, fakat ilerleyici ve geri dönüşümsüz toksik etkisi onun bu kullanımını sınırlandırmaktadır (Buzdar ve ark., 1985). DXR'nin sebep olduğu karaciğer hasarı esas olarak NF-kB ve serbest radikal üretimi yoluyla meydana gelir (Mimnaugh ve ark., 1982; Kalender ve ark., 2005). Antitümör ilaç olan DXR'nin pek çok kanser çeşidinin tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur (Weiss, 1992) ancak ciddi yan etkilerinden dolayı kanser tedavisinde kullanımı kısıtlıdır. DXR'nin klinikte kullanımı ile ilgili akut ve kronik yan etkileri kardiyotoksisite ve hepatotoksisitenin başlaması şeklindedir (Kotamraju ve

ark., 2000; Kalender ve ark., 2005). Karaciğer fonksiyon bozukluğu zaman zaman sadece DXR'nin değil, aynı zamanda komplikasyonları önlemek için verilen yardımcı ilaçların da dozunu ayarlamayı ya da geri çekmeyi zorunlu kılabilir, böylece kemoterapötideki başarısızlık riski artar (Nagai, 2016). Bu nedenle antrasiklinlerin karaciğer toksisitesindeki şiddet ve insidensini azaltmak için stratejiler geliştirmek son derece önemli olmuştur. Oksidatif stresin DXR kaynaklı karaciğer toksisitesinin en önemli sebeplerinden biri olduğu kabul edilmektedir (Kassner, 2008). Bununla birlikte DXR uyarımlı karaciğer hasarının altındaki mekanizma henüz tam detaylı bir şekilde açıklanamamıştır.

Serumdaki aminotransferaz aktivitelerindeki artışın sebebi DXR kullanımından sonra karaciğer hücre membranında meydana gelen hasar olabilir (Cho ve ark., 2007; Pradeep ve ark., 2007). Gerçekten de, serum transaminazları karaciğer bozukluğunun hassas belirteçleridir. Hepatositler hasara uğradığı zaman membran permeabilitesinde ve taşıma fonksiyonlarında meydana gelen değişiklikler sonucu, enzimler hücrelerden sızar ve dokuda AST ve ALT seviyeleri azalmaya başlarken serumdaki miktarları artışlar göstermeye başlar (Mohan ve ark., 2011). Zhao ve arkadaşları (2012) tarafından DXR kaynaklı karaciğer hasarı üzerine doğal bir alkaloid olan berberinin etkisinin araştırıldığı çalışmada, karaciğer fonksiyon testleri olarak serum AST ve ALT seviyeleri ölçülmüş, berberinin DXR kaynaklı karaciğer hasarını azalttığı belirlenmiştir. Pizzuto ve ark., (1983) tarafından yapılan çalışmada DXR'nin eritrositlerde ve plazmada MDA, karbonil protein, AST ve ALT düzeylerini artırmak suretiyle oksidatif stresi uyarıp bazı antioksidan enzim aktivitelerinde şiddetli düşmelere sebep olduğu bildirilmiştir. DXR serbest demir ve H₂O₂'yi artırarak eritrositler ve plazma içindeki Ca²⁺ düzeyini baskılar, böylece son derece toksik OH⁻'ni Ca²⁺ homeostasisini etkileyerek uyarır. DXR tarafından serbest radikal oluşumu iki farklı yol şeklinde gösterilmiştir (Ludwig ve ark., 1989). Serbest radikal oluşumunun ilk yolu DXR'nin bazı semi inhibitörler oluşumu yoluyla semikinon radikalini oluşturmasıdır. Oksijen varlığında DXR kaynaklı semikinon O₂• oluşturur (Doria ve ark., 1986). İkinci yol demir kaynaklı non enzimatik DXR serbest radikallerinin oluşumudur. Örneğin, Fe³⁺, demir atomunun bir elektronu kabul ettiği bir redoks reaksiyonunda DXR ile reaksiyona girer ve bir Fe²⁺-DXR serbest radikal kompleksi üretilir. Bu Fe²⁺-DXR kompleksi O₂'yi H₂O₂'ye ve diğer aktif oksijen türlerine indirgeyebilir (Doria ve ark., 1986). DXR, sıçanlarda oksidatif metabolizmanın bir sonucu olarak O₂⁻, H₂O₂ ve OH⁻ üretir (Joerger ve ark., 2014).

Karaciğer ve kalpte benzer şekilde DXR'nin özellikle semikinon formu hepatotoksitenin gelişiminde etkili olan ROS'u üreterek oksidatif stresi başlatır (Rashid ve ark., 2013). Llesuy ve Arnaiz (1990) tarafından yapılan çalışmada DXR ilavesinin karaciğerde MDA oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir. Dahası serum transaminazlar ve bilirubin seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir. DXR'nin NADPH-sitokrom P-450 Redüktaz varlığında bir elektron kaybına uğradığı ve bunun sonucunda antioksidan enzim (GPx, GR, SOD, KAT gibi) aktivitelerinde azalma ile MDA seviyesinde bir artış olduğu bildirilmiştir (Llesuy ve Arnaiz, 1990; Lee ve ark., 1991; Kalender ve ark., 2005). Tek doz DXR ile uygulanan tedavi sıçan karaciğerinde sitokrom P-450 redüktaz aktivitesi ile GSH düzeyini düşürmüştür (Marchand ve Renton, 1981). DXR verilen ratların karaciğerlerinde aşırı miktarda lipid peroksidasyon (Mohan ve ark., 2011), LDH enzim aktivitelerinde artış olduğunu (Saad ve ark., 2001; Rašković ve ark., 2011) bildiren çalışmalar mevcuttur. Kalender ve ark., (2005) tarafından yapılan çalışmada 6 hafta boyunca günlük 5 mg kg⁻¹ dozunda verilen DXR'nin MDA seviyesi, SOD, GPx ve KAT enzim aktivitelerinde artışa sebep olduğu bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalar ile uyumlu olan tez çalışmamızda DXR serbest radikal hasar göstergelerinden MDA'yı artırmış, enzimatik antioksidanlardan SOD, GPx, KAT ile non enzimatik antioksidan olan GSH düzeyinde düşmelere sebep olmuştur. Ayrıca karaciğer hasarının belirteçlerinden olan serum AST, ALT, ALP seviyelerinde DXR kullanımına bağlı olarak artış meydana gelmiştir.

CMN geleneksel olarak mutfak, boyama ve tıbbi amaçlar için kullanılan *Curcuma longa* (*zerdeçal*) rizomlarından izole edilir (Mohajeri ve ark., 2017). CMN'nin pek çok hayvan doku ve hücrelerinde oksidatif strese karşı koruyucu etkisi ile beraber ROS üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Cohly ve ark., 1998; Venkatesan, 1998). Bunun dışında zerdeçal ekstraktı olan CMN ve derivelerinin DXR kaynaklı toksisiteyi hafifletmede faydalı olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Somasundaram ve ark., 2002; Notarbartolo ve ark., 2005; Dayton ve ark., 2011; Benzer ve ark. 2018a; Benzer ve ark. 2018b).

CMN'nin çeşitli hastalıklar üzerindeki yararlı etkileri altında yatan sebeplerden en iyi bilineni birden fazla antioksidan aktiviteye sahip olması (Miquel ve ark., 2002), ROS (Das KC ve Das CK, 2002; Ak, 2008) ve RNS (Brouet ve Ohshima, 1995; Kim ve ark., 2003) oluşumunu engellemesidir. CMN'nin glutatyon transferaz (Iqbal ve ark., 2003), hem-oksijenaz-1 (Motterlini ve ark., 2000) ve KAT (Iqbal ve ark., 2003) gibi çeşitli

enzimatik antioksidanları uyardığı bildirilmiştir. Park ve ark., (2000) tarafından sıçanlarda yapılan çalışmada CCl₄ kaynaklı karaciğer hasarı üzerine CMN'nin koruyucu etkisi incelenmiş ve CMN'nin karaciğer hasarına bağlı olarak artan AST ve ALT düzeylerini düşürdüğü tespit edilmiştir.

CMN ve türevlerinin antioksidan kabiliyeti, ilaca bağlı karaciğer hasarlarına karşı koruyucu mekanizması (Negi ve ark., 2008) şeklinde gösterilmektedir. CMN güçlü bir sitokrom P450 inhibitörü olarak (Thapliyal ve Maru, 2001), antioksidan enzimleri ve GSH gibi nonenzimatik antioksidan bileşikler (Oetari ve ark., 1996) normalize edebilir.

Doğal ve güvenli bir antioksidan ajan olan CMN, 12 g gün⁻¹'e kadar güvenli, tolere edilebilir ve nontoksik olduğu yapılan insan denemeleri ile bulunmuştur (Gupta ve ark., 2012; Lv ve ark., 2016; Vogel ve Pelletier, 1815). CMN'nin antioksidan, antiinflamatuvar ve anti tümöral aktiviteleri üzerine çalışmalar mevcuttur (Outomuro ve ark., 2007; Ganjali ve ark., 2014; Lv ve ark., 2016; Mirzaei ve ark., 2016; Momtazi ve Sahebkar, 2016; Momtazi ve ark., 2016; Panahi ve ark., 2016a, 2016b, 2014; Sahebkar ve ark., 2016; Mohajeri ve ark., 2017).

DXR'nin akut toksisitesi üzerine CMN'nin koruyucu etkisi onun lipid peroksidasyona karşı sahip olduğu antioksidan kapasitesi ile ilgilidir (Namdari ve Eatemadi, 2017). CMN veya onun aktif metabolitlerinin önceden uygulanması DXR'den kaynaklanan lipid peroksidleri, konjuge dienleri, süperoksid anyonlarını ve TBARS artışını önemli derecede azaltmıştır (Venkatesan ve ark., 2000; Sadzuka ve ark., 2012; Sompar ve ark., 2015). Bu iyileştirici etkiler enzimatik (GPx, SOD, KAT) ve non enzimatik (GSH) antioksidanların düzeyleri (Venkatesan ve ark., 2000; Dąbrowska ve ark., 2008) haricinde ALT, AST gibi karaciğer enzimleri ve doku hasarının göstergesi olarak MDA seviyelerindeki düzelmeler ile de kendini göstermiştir (Swamy ve ark., 2012; Sheu ve ark., 2015; Namdari ve Eatemadi, 2017). Lipid peroksidasyona karşı antioksidan aktivitedeki artış serbest radikallerin temizlenmesi şeklinde ortaya çıkmıştır ve bunun sonucunda zincirleme lipid reaksiyonu baskılanmıştır (Sharma, 1976). Dahası CMN'nin GSH üzerindeki paralel etkisi sonucu sülfidril seviyelerinde meydana gelen yükselmeler membran bütünlüğünün korunmasını ve OH[•] ile lipid peroksitlerin non enzimatik detoksifikasyonuna yeteri kadar destek sağlamıştır (Venkatesan ve ark., 2000).

Farelerde DXR kaynaklı hepatotoksosite üzerinde farklı dozlarda irbesartanın etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, DXR ile tedavi edilen farelere serum ALT, AST ve ALP düzeyleri kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiş ve bu artışı

iyileştirme konusunda irbesartanın yüksek dozları daha etkili olmuştur. Karaciğer dokusunda DXR'e bağlı olarak KAT, GR aktiviteleri düşmüş, MDA düzeyleri artmıştır. Aynı şekilde irbesartanın yüksek dozları KAT ve GR aktivitesini artırırken, MDA seviyesini düşürmüştür fakat bu düşüşler ne serumdaki değerleri ne de karaciğerdeki değerleri kontrol seviyesine getirmeye yeterli olmamıştır.

DXR kaynaklı hepatotoksiteden sorumlu ana mekanizmanın oksidatif stres olduğu kabul edilmektedir (Mansouri ve ark., 2017). Mansouri ve arkadaşları DXR'nin normal oksijen metabolizmasındaki dengeyi sağlayan antioksidan savunma mekanizmasını azaltarak veya ROS oluşumunu artırarak oksidatif stresi uyardığını bildirmiştir. DXR'nin kinon parçasına bir elektron ilavesi ile oluşan semikinon, reaktif oksijen oluşturmak üzere moleküler oksijeni indirger ve bu reaktif oksijen türleri DNA'yı okside eder ve hepatositlerde apoptosisi uyarır (Shivakumar, 2012).

Yapmış olduğumuz çalışmada, DXR kullanımına bağlı olarak ratların karaciğer dokusunda MDA düzeyinde artış, enzimatik ve non enzimatik enzim aktivitesinde ise azalmalar olduğu görüldü. Artan MDA ve azalan antioksidan enzim aktiviteleri üzerine CMN'nin olumlu etki yaptığı, ancak CMN'nin her iki dozunun da meydana gelen bu değişimleri kontrol seviyesine getiremediği görüldü.

Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO \cdot serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısa olup NO \cdot lipofilik özelliktedir. Oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda erir (Moncada ve ark., 1989; Palmer ve Moncada, 1989). Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında bile stabilitesini koruyabilen NO \cdot bilinen en düşük molekül ağırlıklı, reaktif (biyoaktif) memeli hücreleri sekresyon ürünüdür (Grisham, 1997). Düşük konsantrasyonlarda iken NO \cdot toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevlerin gerçekleşmesinde rol oynar.

Vücuda alınan toksik maddelerin metabolize edilememesi sonucu açığa çıkan serbest radikaller karaciğer hasarına neden olmaktadır (Stehbens, 2003). Bu sebeplerden birisi olan DXR'nin de karaciğer üzerinde toksik etkisinin olduğu bildirilmiştir (Kalender ve ark., 2005). CMN yangınel sitokinler, ROS ve Protein Kinaz C (PKC) tarafından NF-kB aktivasyonunu inhibe eder. NF-kB-aracılı iNOS salınımı CMN tarafından inhibe edilir (Singh ve Aggarwal, 1995; Nanji ve ark., 2003). Çalışmamızda DXR sonucu artan NO \cdot düzeyinin CMN kullanımına bağlı olarak azalması yukarıdaki ifade ile açıklanabilir.

CMN'nin böbrek, testis, kalp, beyin yanında, karaciğer üzerinde de güçlü bir antioksidan olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda meydana gelen

oksidatif stresin ve doku hasarının CMN tarafından hafifletildiği bildirilmiştir (Thiyagarajan ve Sharma, 2004; Yousef ve ark., 2010; Ghosh ve ark., 2015; Salahshoor ve ark., 2016).

Yağmurca ve ark., (2007) tarafından yapılan çalışmada tek doz (20 mg kg⁻¹) DXR KAT ve SOD aktivitelerinde azalmaya, NO[•] seviyesinde artışa neden olduğu görülmüştür. KAT ve SOD aktivitelerindeki azalmanın O₂^{-•} ile NO[•]'nun peroksinitrit radikalini oluşturmasından kaynaklanabileceği ve oluşan bu peroksinitrit radikalinin de MDA artışıyla sonuçlanan doku hasarına yol açabileceği söylenmiştir. Çalışmamızda tek doz uygulanan DXR'nin NO[•] seviyesinde artışa neden olması yukarıdaki çalışma ile uyum göstermektedir.

Aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) gibi karaciğer enzimleri, klinik laboratuvarındaki karaciğer hastalıklarının tanısında rutin olarak ölçülmektedir. Ancak bu enzimler karaciğere özgü değildir, çünkü bu enzimler hem karaciğer hem de karaciğer dışı dokular arasında yaygın olarak dağılmıştır. Arginaz, L-argininini L-ornitin ve üre'ye hidrolize eden bir üre döngüsü enzimidir. L-arginin aynı zamanda nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-sitrülin ve NO[•]'e dönüştürülür. Arginaz karaciğerde bol miktarda bulunur, bir dereceye kadar eritrositlerde ve ince bağırsaklarda ve nadiren böbrek ve beyinde de bulunur. İnsan arginazının neredeyse sadece karaciğerde mevcut olması nedeniyle, dolaşımdaki karaciğer tipi arginazın, karaciğer hasarı için daha spesifik bir belirteç olarak hizmet etmesi beklenir. Arginaz enzimi hepatoselüler hasarın mükemmel bir göstergesidir ve aynı zamanda, karaciğer fonksiyon testlerinden daha iyi bir şekilde prognostik tanı göstergedir (Ikemoto ve ark., 2001).

Üre dışında arginaz, prolin, glutamat ve poliaminler için bir ana bileşik olan ornitin biyosentezinde yer alır. Birçok önemli biyokimyasal yola dahil olduğundan dolayı arginaz çeşitli patolojik süreçlerin gelişiminde anahtar rol oynayabilir (Chrzanowska ve ark., 2009).

NO[•], karaciğer parankimal ve nonparankimal hücreler tarafından üretilen yüksek düzeyde reaktif bir oksidan ve birçok fizyolojik ve patofizyolojik olayda önemli bir regülatör ve mediyatördür. NO[•]'in karaciğer hasarı ya direkt NO[•]'in sitotoksitesinden ya da süperoksid ile reaksiyona girerek oluşturduğu peroksinitritten kaynaklanabilir (Sesti ve ark., 2005). Arginaz enzimi, L-ornitin ve üre üretmek için L-arginin hidrolize eder. Herhangi bir karaciğer hasarı ile arginaz, kan dolaşımına salınır ve ornitin üretimini artırırken arginini tüketir. Son zamanlardaki çalışmaların arginaz aktivitesinin, hücre içi

argininin mevcudiyetini sınırlandırarak NO \cdot üretimini azaltabildiği öne sürülmüştür. Ayrıca, artan arginaz aktivitesinin, makrofajlarda NO \cdot üretimini, argininin azaltılması yoluyla rekabetçi inhibisyon ile azalttığı gösterilmiştir (Chang ve ark., 1998; Erbas ve ark., 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, NO \cdot 'nun bir antioksidan olarak işlev görebileceğini ve daha az toksik tür üretmek için süperoksit anyonu ve diğer radikallerle etkileşime girebileceğini göstermektedir. Aksine, diğer kanıtlar NO \cdot 'nun, daha toksik türler oluşturmak için reaktif oksijen ara maddeleri ile etkileşime girebileceğini düşündürmektedir. Endojen NO \cdot ilaç hepatotoksitesinde hepatoprotektif bir rol oynar. NO \cdot 'nun bu etkisi, daha az toksik tür üretmek için süperoksit anyonu ve diğer radikallerle etkileşime girme kabiliyetine bağlanabilir (Muriel, 1998). Özçelik ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada, asetaminofen grubunda NO düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Ancak, bu düşüşün faydalı mı yoksa zarar verici mi olduğu hala tartışmalıdır. Çalışmanın sonuçları arginazın NO \cdot üretimini azaltabildiğini göstermektedir. Aktif makrofajlarda NO \cdot üretimine yönelik çalışmalar, hem NO \cdot sentez yolunun hem de arginaz yolunun, L-argininin hücre dışı tedarikine bağlı olduğunu ve L-argininin% 90'ının arginaz tarafından tüketildiğini ve L-argininin% 10'unun NO \cdot sentez yolunda tüketildiğini göstermiştir. Bu görüş, arginazın asetaminofen grubunda daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğunu ve NO \cdot seviyelerinin azaldığını gösteren veriler tarafından desteklenmektedir. Bu nedenle, arginazın NO \cdot üretiminin modülasyonunda önemli bir rol oynayabileceğini düşünmektedirler (Chang ve ark., 1998).

Çalışmamızda DXR uygulaması NO \cdot düzeyini artırmış olması Yağmurca ve ark., (2007) tarafından yapılan çalışmayla uyum göstermiştir. Ancak DXR grubunda arginaz aktivitesi azalmıştır. Özçelik ve ark., tarafından yapılan çalışmada asetaminofen uygulaması arginaz aktivitesini düşürmüştür. Çalışmamızda arginaz aktivitesinin düşmesi ve NO \cdot 'in artması, argininin NO \cdot üretiminde kullanılmış olduğu şeklinde yorumlanabilir. Bazı çalışmalar serbest radikal hasarını korumada NO \cdot 'in peroksinitrit oluşturmak üzere süperoksit radikali ile birleştiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda DXR'nin meydana getirdiği süperoksit radikallerini bertaraf etmek için NO \cdot seviyesinin artmış olabileceği ihtimaller arasında düşünülebilir. NO \cdot ile arginaz arasındaki bu yarışmayı tam olarak açıklığa kavuşturabilmek için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yaptığımız çalışmada DXR uygulanan ratların karaciğerlerinde hepatositlerde nekrotik değişiklikler ve hidropik dejenerasyon ile mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü. Yağmurca ve ark., (2007) tarafından yapılan çalışmada DXR'nin hepatositlerde

nekrotik, dejeneratif değişiklikler ile yangısal hücre infiltrasyonlarına sebep olduğu, Saad ve ark., (2001) tarafından yapılan çalışmada hepatositlerde nekrozun yanında atipi, mitotik fiğre yangısal hücre infiltrasyonlarının görüldüğü, Kalender ve ark., (2005)'nin yapmış olduğu çalışmada ise hepatositlerde piknoz ve hepatositler arasında dilatasyona rastlandığı, Ayla ve ark., (2009)'nin yaptıkları bir diğer çalışmada ise hepatositlerde dejenerasyon, yangısal hücre infiltrasyonları ve dilatasyonlar görüldüğü ifade edilmiştir.

Rashid ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada DXR ile tedavi edilen ratlarda histopatolojik olarak vasküler tıkanıklık, sinüzoidal dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatosit dejenerasyonu olduğu bildirilmiş, DXR'nin sebep olduğu serbest radikal üretimi sonucu antioksidan savunma sisteminin tükenmesine bağlı olarak hepatotoksisite gelişebileceği görüşü ileri sürülmüştür. Zhao ve arkadaşları (2012) tarafından DXR kaynaklı karaciğer hasarı üzerine doğal bir alkaloid olan berberinin etkisinin araştırıldığı çalışmada, histopatolojik olarak DXR'nin vasküler konjestion, yangısel hücre infiltrasyonu, hepatosellüler dejenerasyon, nekroz ve fibrozise sebep olduğu ve bu histopatolojik değişimler üzerine berberinin semptomları hafifletici etkisi olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda DXR'nin sebep olduğu histopatolojik değişimlerin yüksek doz CMN uygulaması ile (DXR+CMN 200) hafiflemeye başladığı tespit edilmiş ve bulgularımızın önceki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada, DXR ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda, curcuminin antioksidan etkileri araştırıldı. Çalışmada elde edilen sonuçlar kısaca aşağıda belirtilmiştir.

1. Çalışma sonucunda DXR uygulanan ratlarda karaciğer hasarının göstergesi olarak serum AST, ALT düzeyleri arttı. Ayrıca serum ALP düzeyi de DXR kullanımına bağlı olarak artış gösterdi. Serbest radikal hasarının göstergesi olarak karaciğer dokusunda MDA düzeyinde artış ile enzimatik ve non enzimatik antioksidanlarda azalma gözlemlendi.
2. DXR kaynaklı hasarı gidermek için verilen CMN dozlarının (100 ve 200 mg kg⁻¹) MDA seviyesinde azalmaya, KAT, SOD, GPx aktivitelerinde ve GSH seviyelerinde artışa neden olduğu, böylece CMN'nin antioksidan özellik gösterdiği belirlendi.
3. DXR kullanımına bağlı olarak NO[•] düzeyinde artış, arginaz enzim aktivitesinde ise bir azalma gözlemlendi. CMN kullanımına bağlı olarak NO[•] düzeyinde azalma, arginaz aktivitesindeki artış CMN'nin hasara bağlı değişiklikleri düzeltmede başarılı olduğu görüldü.
4. CMN'nin kemoterapötide etkin olan fakat yan etkisi fazla olan DXR'nin meydana getirdiği hasarları onarmada faydalı olabileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

Aebi, H., 1983. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3: 273.

Ak, T., Gulc, I., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 174:27-37.

Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları. 1:3-95. Konya.

Ayla, Ş, Oktar, H., Tanrıverdi, G., Cengiz, M., Özkılıç, A.Ç., Can, G., Özücer, B., Eser, M., Demirci, S., Batur, Ş., 2009. Doksorubicin nedenli sıçan hepatotoksisitesine Nikotinamidin koruyucu etkisi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 10:229-238.

Bagchi, K., Puri, S., 1998. Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 4:350-60.

Benzer, F., Kandemir, F.M., Kucukler, S., Comaklı, S., Caglayan, C., 2018a. Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress and oxidative DNA damage. *Archives of Physiology and Biochemistry*, <https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1422766>.

Benzer, F., Kandemir, F.M., Ozkaraca, M., Kucukler, S., Caglayan, C., 2018b. Curcumin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by abrogation of inflammation, apoptosis, oxidative DNA damage, and protein oxidation in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32 (2): e22030.

Benzie, I.F.F., Wachtel-Galor, S., 2011. Herbal treatment for dermatologic disorders. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, Chapter 18. Bookshelf ID: NBK92761 PMID: [22593930](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22593930/).

- Bishayee, A., Darvesh, A.S., Politis, T., MCGory, R.,** 2010. Resveratrol and liver disease: from bench to bedside and community. *Liver International*, 30:1103-1114.
- Brouet, I., Ohshima, H.,** 1995. Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 206:533-540.
- Buzdar, A.U., Marcus, C., Smith, T.L., Blumenschein, G.R.,** 1985. Early and delayed clinical cardiotoxicity of doxorubicin. *Cancer*, 55:2761-2765.
- Cadenas, E., Davies, K.J.A.,** 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29:222-230.
- Cao, G., Sofik, E., Previous, R.L.,** 1997. prooxidant behavior of flavonoids and antioxidants: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22:749-760.
- Caraglia, M., Giuberti, G., Marra, M., Addeo, R., Montella, L., Murolo, M., Sperlongano, P., Vincenzi, B., Naviglio, S., Prete, S.D., Abbruzzese, A., Stiuso, P.,** 2011. Oxidative stress and ERK1/2 phosphorylation as predictors of outcome in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib plus octreotide LAR. *Cell Death & Disease*, 2:e-150, 1-7.
- Chang, C.I., Liao, J.C., Kuo, L.,** 1998. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *American Journal of Physiology*, 274:342-348.
- Chaudiere, J., Ferrari-Ihou, R.,** 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food chemical Toxicology*, 37:949-962.
- Chen, A.Y., Liu, L.F.,** 1994. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu. Rev. Pharmacology and Toxicology*, 34:191-218.

- Cho, B.J., Im, E.K., Kwon, J.H., Lee, K.H., Shin, H.J.,** 2007 Effect of cassia fistula Linn. leaf extract on diethylnitrosamine induced hepatic injury in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 167:12-18.
- Chrzanowska, A., Gajewska, B., Barańczyk-Kuźma, A.** 2009. Arginase isoenzymes in human cirrhotic liver. *Acta Biochimica Polonica*, 56:465–469.
- Cohly, H.H., Taylor, A., Angel, M.F., Salahudeen, A.K.,** 1998. Effect of turmeric, turmerin and curcumin on H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK 1) cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 24:49-54.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K., Ven Murthy, M.R.,** 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(5):771-799.
- Dabrowska, K., Stuss, M., Gromadzinska, J., Wasowicz, W., Sewerynek, E.,** 2008. The effects of melatonin on glutathione peroxidase activity in serum and erythrocytes after adriamycin in normal and pinealectomised rats. *Endokrynologia Polska*, 59: 200-206.
- Das, K.C., Das, C.K.,** 2002. Curcumin (diferuloylmethane), a singlet oxygen ((1)O(2)) quencher. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295:62-66.
- Dayton, A., Selvendiran, K., Meduru, S., Khan, M., Kuppusamy, M.L., Naidu, S., Kálai, T., Hideg, K., Kuppusamy, P.,** 2011. Amelioration of doxorubicin-induced cardiotoxicity by an anticancer-antioxidant dual-function compound, HO-3867. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339:350-357.
- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D.,** 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects, *Journal of The Association of Physicians of India* ,52:794-804.

- Doria, M.I., Shepard, K.V., Levin, B., Riddell, R.H.,** 1986. Liver pathology following hepatic arterial infusion chemotherapy. *Hepatic toxicity with FUDR*, 58:855-861.
- Dröge, W.,** 2002. Thiol/disulfide redox status related to aging: the use of thiol antioxidants. *Experimental Gerontology*, 37:133-145.
- Durak, I., Ozturk, H.S., Kavutcu, M., Birey, M., Yel, M., Guven, T., Olcay, E., Kacmaz, M., Canbolat, O.,** 1998. Protective role of antioxidant vitamins on adriamycin-induced free radical production and cardiotoxicity in guinea pigs. *Cancer Research and Therapeutics*, 5:133-141.
- Erbas, H., Aydogdu, N., Kaymak, K.,** 2004. Effects of N-acetylcysteine on arginase, ornithine and nitric oxide in renal ischemia-reperfusion injury. *Pharmacological Research*, 50:523–527.
- Farr, S.B., Kogoma, T.,** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews*, 55:561-585.
- Feng, J.Y., Liu, Z.Q.,** 2009. Phenolic and enolic hydroxyl groups in curcumin: which plays the major role in scavenging radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1041-1046.
- Fraga, C., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P., Ames, B.N.,** 1990. Oxidative damage to DNA during aging; 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87:4533-4537.
- Franco, Z., Graziella, P., Paola, P.,** 2001. Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs. *Biochemical Pharmacology*, 61:933-938.

- Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M.,** 1995, Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *The American Journal of Clinical*, 61:549-554.
- Ganjali, S., Sahebkar, A., Mahdipour, E., Jamialahmadi, K., Torabi, S., Akhlaghi, S., Ferns, G., Parizadeh, S.M.R., Ghayour-Mobarhan, M.,** 2014. Investigation of the effects of curcumin on serum cytokines in obese individuals: a randomized controlled trial. *Send to Scientific World Journal*, 11:8983-61.
- Gebiki, J.M. and Bielski, B.H.J.,**1981. Comparison of the capacities of the perhydroxyl and the superoxide radicals to initiate chain oxidation of linoleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 103(23):7020-7022.
- Geyer, J.W., Dabich, D.,** 1971. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, 39:412-417.
- Ghosh, S., Bhattacharyya, S., Rashid, K., C. Sil, P.C.,** 2015. Curcumin protects rat liver from streptozotocin-induced diabetic pathophysiology by counteracting reactive oxygen species and inhibiting the activation of p53 and MAPKs mediated stress response pathways. *Toxicology Reports*, 2:365-376.
- Giantris, A., Abdurrahman, L., Hinkle, A., Asselin, B., Lipshultz, S.E.,** 1998. Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 27:53-68.
- Goel, A., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B.,** 2008. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*, 75:787-809.
- Gupta, S.C., Patchva, S., Koh, W., Aggarwal, B.B.,** 2012. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39:283-299.

- Gupta, S.C., Kismali, G., Aggarwal, B.B.,** 2013. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. *BioFactors*, 39:2-13.
- Güleşci, N., , Aygül, İ.,** 2016. Beslenmede yer alan antioksidan ve fenolik madde içerikli çerezler, *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1): 109-129.
- Halliwell, B.,** 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*, 55:44-52.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.,**1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219:1-14.
- Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A., Schmitz, H.H.,** 2000. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *The Journal of Nutrition*, 130:2086-2092.
- Hensley, K., Benekas, E.J., Bolli, R., Comp, P., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mou, S., Pye, Q.N., Stoddard, M.F., Wallis, G., Williamson, K.S., West, M., Wechter, W.C.J, Floyd, R.A.,** 2004. New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology & Medicine*, 36:1-15.
- Huang, A.H.C., Trelease, R.N., Moore, T.S.** 1983, Plant Peroxisomes, Academic Press, New York. 1st edition, ISBN: 978-0-12-358260-7, 266.
- Ikemoto, M., Tsunekawa, S., Awane, M., Fukuda, Y., Murayama, H., Igarashi, M., Nagata, A., Kasai, Y., Totani, M.,** 2001. A useful ELISA system for human liver-type arginase and its utility in diagnosis of liver diseases. *Clinical Biochemistry*, 34:455-461.
- Imlay, J.A., Linn, S.,** 1986. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240:1302-1309.

- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M.,** 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, 10:2495-2505.
- Iqbal, M., Sharma, S.D., Okazaki, Y., Fujisawa, M., Okada, S.,** 2003. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacology and Toxicology*, 92:33-38.
- Janssen, Y.M.W., Houten, B.V., Borm, P.J.A., Mossman, B.T.,** 1993. Biology of disease, cell and tissue responses to oxidative damage. *Laboratory Investigation*, 69:261-274.
- Joerger, M., Huitema, A.D., Koeberle, D., Rosing, H., Beijnen, J.H., Hitz, F.,** 2014. Safety and pharmacology of gemcitabine and capecitabine in patients with advanced pancreatico-biliary cancer and hepatic dysfunction. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 73:113-124.
- Jung, K., Reszka, R.,** 2001. Mitochondria as subcellular targets of clinically useful anthracyclines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49, 87-105.
- Kalender, S., Kavutcu, M., Kalender, Y., Olcay, E., Yel, M., Ates, A.,** 2001. Protective role of antioxidant vitamin E and catechin on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cancer Research and Therapeutics*, 175-182.
- Kalender, Y., Yel, M., Kalender, S.,** 2005. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin E and catechin. *Toxicology*, 209: 39-45.
- Kapucu, A.Ş.,** 2012. Türkiye'de piyasalarda bulunan bazı *curcuma longa* L. rizom ve preparatları üzerinde farmakognozok araştırmalar. *Hacettepe üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*.

- Karoui, H., Hogg, N., Frejaville, C.,** 1996. Characterization of sulfur-centered radical intermediates is formed during the oxidation of thiols and sulfite with peroxynitrite-ESR-spin capture and oxygen uptake studies. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 6000-6009.
- Kassner, N., Huse, K., Martin, H.J., Gödtel-Armbrust, U., Metzger, A.,** 2008. Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 36:2113-2120.
- Kim, J.E., Kim, A.R., Chung, H.Y., Han, S.Y., Kim, B.S., Choi, J.S.,** 2003. In vitro peroxynitrite scavenging activity of diarylheptanoids from *Curcuma longa*. *Phytotherapy Research*, 17:481-484.
- Kojo, S.,** 2004. Vitamin C: function as an index of essential metabolism and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 11:1041-1064.
- Kotamraju, S., Konorev, E.A., Joseph, J., Kalyanaraman, B.,** 2000. Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Biological Chemistry*, 275:33585-33592.
- Kumar, S.,** 2011. Free radicals and antioxidants: human and food system. *Advances in Applied Science Research*, Vol. 2, No.1, pp. 129-135.
- Kwiecien, I., Michalska, M., Wlodek, L.,** 2006. The selective effect of cystathionine on doxorubicin hepatotoxicity in tumor-bearing mice. *European Journal Of Pharmacology*, 550:39-46.
- Landis, G.N., Tower, J.,** 2005. Superoxide dismutase evolution and lifetime regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126:365-379.

- Lee, K.H., Yeh, M.H., Kao, S.T., Hung, C.M., Liu, C.J., Huang, Y.Y., Yeh, C.C.,** 2010. The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor-kappaB in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicology Letters*, 194:42-49.
- Lee, V., Randhawa, A.K., Singal, P.K.,** 1991. Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 261 (4): H989–H995.
- Lin, J.K.,** 2007. Molecular targets of curcumin. In: Aggarwal, Bharat B.; Surh, Young-Joon; Shishodia, S. editor., The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. New York NY, USA: Springer. ISSN 0065-2598, 227–243.
- Liu, Q., Yuan, B., Lo, K.A., Patterson, H.C., Sun, Y., Lodish, H.F.,** 2012. Adiponectin regulates expression of hepatic genes critical for glucose and lipid metabolism. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:1456-1473.
- Llesuy, S.F., Arnaiz, S.L.,** 1990. Hepatotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin. *Toxicology*, 63:187-198.
- Loft, S., Poulsen, H.E.,** 1999. Markers of oxidative damage to DNA. Antioxidants and molecular damage. *Methods in Enzymology*, 300:167-184.
- Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L., Snyder, S.H.,** 1994. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine*, 120:227-237.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.,** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Ludwig, J., Kim, C.H., Wiesner, R.H., Krom, R.A.,** 1986. Floxuridine-induced sclerosing cholangitis: An ischemic cholangiopathy. *Journal of Hepatology*, 9:215-218.

- Lv, L., Qiu, K., Yu, X., Chen, C., Qin, F., Shi, Y., Ou, J., Zhang, T., Zhu, H., Wu, J.,** 2016. Amphiphilic copolymeric micelles for doxorubicin and curcumin co-delivery to reverse multidrug resistance in breast cancer. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 12:973-985.
- Mansouri, E., Jangaran, A., Ashtari, A.,** 2017. Protective effect of pravastatin on doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Bratislavske Lekarske Listy*, 118:273.
- Marchand, D.J., Renton, K.W.,** 1981. Depression of cytochrome P-450-dependent drug biotransformation by adriamycin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 58:83-88.
- Marletta, M.A.,** 1987. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide and N-nitrosating agents. *Chemical Research in Toxicology*, 249-257.
- Martin, R.C., Aiyer, H.S., Malik, D., Li, Y.,** 2012. Effect on pro-inflammatory and antioxidant genes and bioavailable distribution of whole turmeric vs curcumin: similar root but different effects. *Food and Chemical Toxicology*, 50:227-231.
- Masella, R., Di, B.R., Vari, R.,** 2005. New mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: participation of glutathione and glutathione related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16:577-586.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., De, C.I.N.,** 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32:595-603.
- Matkovics, B.,** 1988. Determination of enzyme activity in lipid peroxidation and glutathione pathways. *Laboratoriumi Diagnosztika*, 15: 248-250.
- Matsuda, T., Tao, H., Goto, M., Yamada, H., Suzuki, M., Wu, Y., Xiao, N., He, Q., Guo, W., Cai, Z.,** 2012. Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa. *Carcinogenesis*, 34:121-127.

- Mccall, M.R., Frei, B.,** 1999. Can antioxidant vitamins reduce oxidative damage in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:1034-1053.
- Mimnaugh, E.G., Trush, M.A., Ginsburg, E., Gram, T.E.,** 1982. Differential effects of anthracycline drugs on rat heart and liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent lipid peroxidation. *Cancer Research*, 42:3574-3582.
- Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J.M.,** 2002. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34:37-46.
- Mirzaei, H., Naseri, G., Rezaee, R., Mohammadi, M., Banikazemi, Z., Mirzaei, H.R., Salehi, H., Peyvandi, M., Pawelek, J.M., Sahebkar, A.,** 2016. Curcumin: A new candidate for melanoma therapy. *International Journal of Cancer*, 139:1683-1695.
- Mohajeri, M., Rezaee, M., Sahebkar, A.,** 2017. Cadmium-induced toxicity is rescued by curcumin. A review. *Biofactors*, September, 5:645-661.
- Mohan, M., Kamble, S., Satyanarayana, J., Reddy, N.,** 2011. Protective effect of *Solanum torvum* on Doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats. *International Journal of Drug Development and Research*, 3:131-138.
- Momtazi, A.A., Shahabipour, F., Khatibi, S., Johnston, T.P., Pirro, M., Sahebkar, A.,** 2016. Curcumin as a micro RNA regulator in cancer. A review. *Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 171:1-38.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A.,** 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginin. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemical Pharmacology*, 38:1709-1715.
- Mortensene, S.LH., Truscott, T.G.,** 2001. Interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385:13-19.

- Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R., Green, C.J.,** 2000. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 28:1303-1312.
- Muriel, P.,** 1998. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical Pharmacology*, 56:773–779.
- Nabavi, S.F., Eslami, S., Moghaddam, A.H., Nabavi, S.M.,** 2011a. Protective effects of curcumin against fluoride-induced oxidative stress in the rat brain. *Neurophysiology*, 43:287-291.
- Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Abolhasani, F., Moghaddam, A.H., Eslami, S.,** 2012b. Cytoprotective effects of curcumin on sodium fluoride-induced intoxication in rat erythrocytes. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88:486-490.
- Nagai, K., Fukuno, S., Oda, A., Konishi, H.,** 2016. Protective effects of taurine on doxorubicin-induced acute hepatotoxicity through suppression of oxidative stress and apoptotic responses. *Anti-cancer Drugs*, 27:17-23.
- Namdari, M., Eatemadi, A.,** 2017. Cardioprotective effects of curcumin-loaded magnetic hydrogel nanocomposite (nanocurcumin) against doxorubicin-induced cardiac toxicity in rat cardiomyocyte cell lines. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 45:731-739.
- Nanji, A.A., Jokelainen, K., Tipoe, G.L., Rahemtulla, A., Thomas, P., Dannenberg, A.J.,** 2003. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappa B-dependent genes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284:321-327.

- Naziroğlu, M., Butterworth, P.,** 2005. Protective effects of diuretic vitamins C and E on blood antioxidative defense mechanism of middle-range training in diabetic rats with streptozotocin. *Journal of Applied Physiology*, 30:172-185.
- Negi, A.,S, Kumar, J.K., Luqman, S., Shanker, K., Gupta, M.M., Khanuja, S.P.S.,** 2008. Recent advances in plant hepatoprotectives: a chemical and biological profile of some important leads. *Medicinal Research Reviews*, 28(5):746-772.
- Notarbartolo, M., Poma, P., Perri, D., Dusonchet, L., Cervello, M., D'Alessandro, N.,** 2005. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Letters*, 224:53-65.
- Oetari, S., Sudibyo, M., Commandeur, J.N., Samhoedi, R., Vermeulen, N.P.,** 1996. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 51:39-45.
- Outomuro, D., Grana, D.R., Azzato, F., Milei, J.,** 2007. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem. *The International Journal of Cardiology*, 117:6-15.
- Ozcelik, E., Uslu, S., Burukoglu, D., Musmul, A.,** 2014. Chitosan and blueberry treatment induces arginase activity and inhibits nitric oxide production during acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Pharmacognosy Magazine*, 10(2):217-224.
- Özdem, S.S., Şadan, G.,** 1994. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. *Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 11:63-71.
- Palmer, R.M.J., Moncada, S.,** 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 158:348-352.

- Panahi, Y., Saadat, A., Beiraghdar, F., Sahebkar, A.,** 2014. Adjuvant therapy with bioavailability-boosted curcuminoids suppresses systemic inflammation and improves quality of life in patients with solid tumors: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Phytotherapy Research*, 28:1461-1467.
- Panahi, Y., Alishiri, G.H., Parvin, S., Sahebkar, A.,** 2016a. Mitigation of systemic oxidative stress by curcuminoids in osteoarthritis: results of a randomized controlled trial. *Journal of Dietary Supplements*, 13:209-220.
- Panahi, Y., Ghanei, M., Hajhashemi, A., Sahebkar, A.,** 2016b. Effects of curcuminoidspiperine combination on systemic oxidative stress, clinical symptoms and quality of life in subjects with chronic pulmonary complications due to sulfur mustard: a randomized controlled trial. *Journal of Dietary Supplements*, 13:93-105.
- Park, E.J., Jeon, C.H., Ko, G., Kim, J., Sohn, D.H.,** 2000. Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52:437-440.
- Pesce, A.J., Kaplan, L.A.,** 1987. *Methods in Clinical Chemistry*. The CV Mosby Company, St. Louis MO.
- Pizzuto, J., Avile's, A., Ramos, E., Cervera, J., Aguirre, J.,** 1983. Cytosine arabinoside induced liver damage: histopathologic demonstration. *Medical and Pediatric Oncology*, 11:287-290.
- Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C.,** 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16: 359-364.
- Pradeep, K., Mohan, C.V., Gobianand, K., Karthikeyan, S.,** 2007. Effect of *Cassia fistula* LINN. leaf extract on diethylnitrosamine induced hepatic injury in rats. *Chemico- Biological Interactions*, 167, 12–18.

- Pryor, W.A.**, 2000. Vitamin E and heart disease: basic science of clinical intervention experiments. *Free Radical Biology and Medicine*, 28:141-164.
- Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B.**, 2005. A review of the role and complications of antioxidants in diabetes management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59:365-373.
- Rashid, S., Ali, N., Nafees, S., Ahmad, S.T., Arjumand, W., Hasan, S.K., Sultana, S.**, 2013. Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23:337-345.
- Rašković, A., Stilinović, N., Kolarović, J., Vasović, V., Vukmirović, S., Mikov, M.**, 2011. The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Molecules*, 16:8601-8613.
- Reiter, R.J.**, 1995. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *The Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9:526-533.
- Rice-Evans, C.**, 2001. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8:797-807.
- Rivera-Espinoza, Y., Muriel, P.**, 2009. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. *Liver International*, 1457-1466.
- Saad, S.Y., Najjar, T.A., Al-Rikabi, A.C.**, 2001. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacological Research*, 43:211-218.
- Sacher, G.A.**, 1977. Life table modifications and life prolongation. In: Finch C.E., Hayflick L., editors. Handbook of the biology of aging. *Van Nostrand Reinhold*, New York, 582-638.

- Sadzuka, Y., Nagamine, M., Toyooka, T., Ibuki, Y., Sonobe, T.,** 2012. Beneficial effects of curcumin on antitumor activity and adverse reactions of doxorubicin. *International Journal of Pharmaceutics*, 432:42-49.
- Sahebkar, A., Cicero, A.F.G., Simental-Mendía, L.E., Aggarwal, B.B., Gupta, S.C.,** 2016. Curcumin downregulates human tumor necrosis factor- α levels: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological Research*, 107:234-242.
- Salahshoor, M., Mohamadian, M., Kakabaraei, S., Roshankhah, S., Jalili, C.,**2016. Curcumin improves liver damage in male mice exposed to nicotine. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6:176-183.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A.,** 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds in human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1094-1117.
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J.P.E.,** 2002. MAPK signal in neurodegeneration: effects of flavonoids and nitric acid. *Neurobiology of Aging*, 23:861-880.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H.,** 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25: 192-205.
- Senturkler, S., Dizdaroglu, M.,** 1999. The effect of experimental conditions on the levels of oxidatively modified bases in DNA as measured by gas chromatography-mass spectrometry: How many modified bases are involved. Purification or not. *Free Radical Biology and Medicine*, 27:370-380.
- Sesti, S., Martino, G., Mazzulla, S., Chimenti, R.,** 2005. Effect of bradykinin on nitric oxide production, urea synthesis and viability of rat hepatocyte cultures. *BMC Physiology*, 5(2):1-7.

- Sharma, O.**, 1976. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochemical Pharmacology*, 25:1811-1812.
- Sheu, M.T., Jhan, H.J., Hsieh, C.M., Wang, C.J., Ho, H.O.**, 2015. Efficacy of antioxidants as a complementary and alternative medicine (CAM) in combination with the chemotherapeutic agent doxorubicin. *Integrative Cancer Therapies*, 14: 184-195.
- Shishodia, S., Sethi, G., Aggarwal, B.B.**, 2005. "Curcumin: Getting Back to the Roots," *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1056:206-217.
- Shivakumar, P., Rani, M.U., Reddy, A.G., Anjaneyulu, Y.**, 2012. A study on the toxic effects of doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicology International*, 19:241-244.
- Sies, H., Stahl, W., Sevanian, A.**, 2005. Nutrition, diet and post-prandial oxidative stress. *Journal of Nutrition*, 135:969-72.
- Sinclair, A.J., Barnett, A.H., Junec, J.**, 1990. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *British Journal of Hospital Medicine*, 43:334-344.
- Singh, S., Aggarwal, B.B.**, 1995. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *The Journal of Biological Chemistry*, 270:24995-25000.
- Sivanandham, V.**, 2011. Free radicals in health and diseases-a mini review. *Pharmacologyonline 1*:1062-1077.
- Somasundaram, S., Edmund, N.A., Moore, D.T., Small, G.W., Shi, Y.Y., Orłowski, R.Z.**, 2002. Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Research*, 62:3868-3875.

- Sompar, N., Kukongviriyapan, V., Kukongviriyapan, U., Senggunprai, L., Prawan, A.,** 2015. Protective effects of tetrahydrocurcumin and curcumin against doxorubicin and cadmium-induced cytotoxicity in Chang liver cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14:769-776.
- Stehbens, E.W.,** 2003. Oxidative stress, toxic hepatitis and antioxidant with particular emphasis on zinc. *Experimental and Molecular Pathology*, 75:265-276.
- Sun, B., Karin, M.,** 2008. NF- κ B signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene*, 27:6228-6244.
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y.,** 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34: 497-500.
- Swamy, A.V., Gullaiya, S., Thippeswamy, A., Koti, B.C., Manjula, D.V.,** 2012. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 44:73-77.
- Tacke, F., Luedde, T., Trautwein, C.,** 2009. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 36:4-12.
- Tanaka, J., Tajima, S., Asakawa, K., Sakagami, T., Moriyama, H., Takada, T., Suzuki, E., Narita, I.,** 2013. Preventive effect of irbesartan on bleomycin-induced lung injury in mice. *Respiratory Investigation*, 51:76-83.
- Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK.,** 2006. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*; 8:443-449.
- Thapliyal, R., Maru, G.B.,** 2001. Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 39:541-547.

- Thiyagarajan, M., Shar, S.,** 2004. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sciences*, 74:969-985.
- Tiwari, A.K.,** 2004. Antioxidants: New generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Current Science*, 86:1092-1102.
- Toribio, F., Martinet, L.E., Pascual, P., Lopez, B.J.,** 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, *Journal of Chromatography B*, 684:77-97.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M.,** 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Journal Of Cellular Biochemistry*, 266:37-56.
- Venkatesan, N.,** 1998. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *British Journal of Pharmacology*, 124:425-427.
- Venkatesan, N., Punithavathi, D., Arumugam, V.,** 2000. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *British Journal of Pharmacology*, 129:231-234.
- Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P., Feldman, E.L.,** 2004. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25:612-628.
- Vogel, A., Pelletier, J.,** 1815. Examen chimique de la racine de Curcuma. (Chemical examination of the root of curcuma). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1:289-300.
- Weiss, R.B.,** 1992. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin. *Seminars in Oncology*, 19:670-686.
- Yagi, K.,** 1994. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: D., Armstrong, (Editor). Free radicals in diagnostic medicine. *Plenum Press*, New York, 1-14.

- Yağmurca, M., Baş, O., Mollaoğlu, H., Şahin, O., Nacar, A., Karaman, O., Songur, A.,** 2007. Protective effects of Erdosteine on Doxorubicin- induced Hepatotoxicity in Rats. *Archives of Medical Research*, 38:380-385.
- Yallampalli, D.V.M., Smith, M.B., Sharon, M.S.,** 1994. Steroid hormones modulate the production of no and cgmp in the rat uterus. *Endocrinology*, 134:1971-1974.
- Yousef, M.I., Omar, S.A.M., El-Guandi, M.I., Abdelmegid, L.A.,** 2010. Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology*, 48:3246-3261.
- Yu, Y.D., Kim, K.H., Lee, S.G., Choi, S.Y., Kim, Y.C., Byun, K.S., Cha, I.H., Park, K.Y., Cho, C.H., Choi, D.H.,** 2011. Hepatic differentiation from human embryonic stem cells using stromal cells. *The Journal of Surgical Research*, 170:253-261.
- Zhao, D., Chen, S., Cai, J., Guo, Y., Song, Z., Che, J., Liu, C., Wu, C., Ding, M., Deng, H.,** 2009. Derivation and characterization of hepatic progenitor cells from human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 4:e6468, 1-10.
- Zhao, X., Zhang, J., Tong, N., Chen, Y., Luo, Y.,** 2012. Protective effects of berberine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35:796-800.
- Zunino, F., Capranico, G.,** 1990. DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anti-cancer Drug Design*, 5:307-317.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Doğum Tarihi: 1985

Doğum Yeri: Elazığ

Medeni Hali: Evli

Eğitim Durumu

1992- 1997 Elazığ Namık Kemal İlkokulu

1997- 1999 Elazığ Mezre Orta Okulu

1999- 2003 Elazığ Mehmet Akif Ersoy Lisesi

2005- 2007 Balıkesir Bandırma Meslek Yüksek Okulu/ Gıda Teknolojisi Bölümü

2007- 2010 Elazığ Fırat Üniversitesi/ Kimya Bölümü

2014-... Munzur Üniversitesi/ Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı

İş Deneyimi

2010-... Aile ve Sosyal Politikalar İl Müdürlüğü/ Öğretmen