



**SIÇANLARDA TAMOKSİFEN İLE
OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARINA
KARŞI KROSİNİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Elif KERİMOĞLU
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Yavuz Osman BİRDANE
Tez No: 2022-019
Afyonkarahisar

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA TAMOKSİFEN İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER
HASARINA KARŞI KROSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Elif KERİMOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Yavuz Osman BİRDANE

Tez No: 2022-019
AFYONKARAHİSAR

Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: 20.SAĞ.BİL.12

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda Elif KERİMOĞLU** tarafından hazırlanan “Sıçanlarda Tamoksifen ile Oluşturulan Karaciğer Hasarına Karşı Krosinin Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Ünvan, Ad, Soyad

İmza

Üye

Ünvan, Ad, Soyad

İmza

Üye

Ünvan, Ad, Soyad

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

..... / /tarih ve

.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

...../...../.....

İmza

Elif KERİMOĞLU

ÖZET

SIÇANLARDA TAMOKSİFEN İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARINA KARŞI KROSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tamoksifen (TAM) meme kanseri kemoterapisinde sıklıkla kullanılan bir ilaçtır ve en çok görülen yan etkileri arasında karaciğer hasarı yer almaktadır. Safran bitkisinin biyoaktif bir molekülü olan krosin (KRO) ise antioksidan ve antikanser aktiviteler gibi farklı farmakolojik etkilere sahiptir. Bu çalışma, sıçan karaciğerinde KRO'nun TAM'a bağlı hasara karşı koruyucu rolünü değerlendirmek için tasarlanmıştır. Mevcut çalışmada, Wistar Albino cinsi dişi sıçanlara TAM 45 mg/kg ve KRO 12,5-25-50 mg/kg dozlarında 28 gün boyunca oral gavaj ile verildi. TAM'ın karaciğer dokusunda meydana getirdiği hasarlar ve KRO'nun koruyucu etkileri biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelendi. TAM uygulamasının karaciğer enzim aktiviteleri (AST, ALT, ALP ve TP), antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT) ve MDA düzeylerini artırdığı; bununla birlikte indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri ve antioksidan bir enzim olan GPx aktivitelerinde ise azalma meydana getirdiği belirlendi. Ayrıca, TAM uygulamasının karaciğer dokusunda histopatolojik değişikliklere neden olduğu gözlemlendi. TAM ile birlikte verilen 12,5-25-50 mg/kg dozda KRO uygulamalarının ise bu olumsuz değişiklikleri tersine çevirdiği belirlendi. Sonuç olarak KRO'nun oksidatif stresi azaltarak ve karaciğer dokularında antioksidan savunmayı artırarak TAM ile oluşturulan karaciğer hasarını engellediği tespit edildi. Elde edilen bu verilerin moleküler analizlerle desteklenmesi, KRO'nun TAM ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin daha da anlamlı kılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Karaciğer, Krosin, Tamoksifen, Sıçan

SUMMARY

INVESTIGATION OF EFFECTS OF CROCIN ON TAMOXIFEN INDUCED LIVER DAMAGE IN RATS

Tamoxifen (TAM) is a drug often used in breast cancer chemotherapy and liver damage is among the most common side effects. Crocin (CRO), a bioactive molecule of the saffron plant, has different pharmacological effects such as antioxidant and anticancer activities. This study aimed to evaluate the protective role of CRO against TAM-induced damage in rat liver. In the present study, Wistar Albino female rats were used, TAM 45 mg/kg and different doses of CRO 12,5-25-50 mg/kg were administered to rats by oral gavage for 28 days. The damage caused by TAM in the liver tissue and the protective effects of CRO was examined through biochemical and histopathologic methods. It was found that TAM administration increased liver enzyme activities (AST, ALT, ALP and TP), antioxidant enzyme activities (SOD, CAT) and MDA levels, but decreased glutathione (GSH) levels and GPx activities, an antioxidant enzyme decreased, as well as TAM administration caused histopathological changes in liver tissue. It was determined that 12.5, 25 and 50 mg/kg CRO administered together with TAM, reversed these adverse changes. As a result, it was supposed that CRO prevents TAM-induced liver damage by reducing oxidative stress in liver tissues and increasing antioxidant defense. Supporting these data with molecular analyses will make the protective effect of CRO against TAM-induced liver damage even more significant.

Keywords: Antioxidant, Crocin, Liver, Tamoxifen, Rat

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın seçilmesi ve yürütülmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam aynı zamanda Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Yavuz Osman BİRDANE, değerli hocalarım Prof.Dr. Hidayet YAVUZ ve Doç.Dr. Ruhi TÜRKMEN'e, Prof. Dr. Sinan İNCE ve Arş.Gör. Orkun ATİK'e, bu çalışmamın gerçekleşmesinde rol alan Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: 20.SAĞ.BİL.12) teşekkür ederim.

Yüksek lisans dâhil bu yaşıma kadar ki tüm eğitimim boyunca büyük fedakârlık ve sabırla yer mekân fark etmeksizin her daim yanımda olan, her türlü desteği veren, bilgisini tecrübesini yardımını esirgemeyen, bilgisiyle duruşuyla hayranlık duyduğum, çok sevdiğim canım abim Barış Kerimoğlu'na, ayrıca eğitimim boyunca her türlü fedakârlığı gösteren, hayatımın her döneminde sevgi ve destekleri ile daima yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren canımdan çok sevdiğim annem Sevil ve kardeşim Burak'a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim

Elif KERİMOĞLU

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	i
SUMMARY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER.....	vii
ÇİZELGELER.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Karaciğer.....	1
1.2. Tamoksifen	4
1.2.1. Etki Mekanizması.....	5
1.3. Safran	9
1.3.1. Krosin.....	10
1.3.2. Krosinin Etki Mekanizması.....	11
1.3.3. Krosin Toksisitesi	12
2. MATERYAL ve METOT	14
2.1. Materyal	14
2.1.1. Araç ve Gereçler	14
2.1.2. Hayvan Materyali.....	14
2.2. Metot	15
2.2.1. Deneysel Aşama.....	15
2.2.1.1. Deneysel Aşamanın Planlanması ve Uygulanması	15
2.2.1.2. Deneysel Aşamanın Sonlandırılması.....	15
2.2.2. Histopatolojik Değerlendirme	16
2.2.3. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler	16
2.2.3.1. Doku Homojenizasyonu	16
2.2.3.2. Hemolizat Hazırlanması	16
2.2.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	17
2.2.3.4. Katalaz Aktivite Tayini	18
2.2.3.5. Malondialdehit (MDA) Seviye Ölçümü.....	18

2.2.3.6. Glutasyon (GSH) Seviye Ölçümü.....	19
2.2.3.7. Glutasyon peroksidaz (GPX) Aktivite Tayini	20
2.2.3.8. Protein Ölçümü.....	20
2.2.3.9. Kanda Hemoglobin Düzeyinin Belirlenmesi	20
2.2.4. Biyokimyasal Parametrelerinin Ölçümü	21
2.3. İstatistiksel Analiz.....	21
3. BULGULAR	22
3.1. Biyokimyasal Parametre Bulguları	22
3.2. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametre Bulguları	24
3.3. Karaciğer Doku Değerleri.....	26
3.4. Histopatolojik Bulgular.....	28
4. TARTIŞMA.....	32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
6. KAYNAKLAR.....	41
7. EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı ...	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
8. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP:	Alkalın Fosfataz
ALT:	Alanin Aminotransferaz
AST:	Aspartat Aminotransferaz
CAT:	Katalaz
CYP:	Sitokrom P450
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EDX:	Endoxifen
GP-x:	Glutasyon Peroksidaz
GR:	Glutasyon Redüktaz
GSH:	Glutasyon
H&E:	Hematoksilen Eozin
KRO:	Krosin
LDL:	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LPO:	Lipid Peroksidaz
MAPK:	Mitojenle Aktive Protein Kinaz
MDA:	Malondialdehit
mRNA:	Mesajcı RiboNükleik Asit
n:	Örneklem büyüklüğü
NDH:	N-Didesimetil
OHTAM:	4-Hidro Tamoksifen
p:	Anlamlılık (önemlilik) testine ilişkin olasılık değeri
ROS:	Reaktif Oksidan Seviyesi
SD:	Standard Sapma
SOD:	Süper Oksit Dismutaz
TA:	Tamoksifen Asidi
TAM:	Tamoksifen
TAS:	Total Antioksidan Seviyesi
TB:	Total Bilirubin
TOS:	Total Oksidan Seviyesi
TP:	Total Protein

ŞEKİLLER

SAYFA

Şekil 1.1: Karaciğerin ön üst alt yüzeyleri ve lobları	1
Şekil 1.2: Karaciğerin ligamanları ile birlikte anterior görünümü	2
Şekil 1.3: Tamoksifen.....	6
Şekil 1.4: Tamoksifenin metabolik yolları ve aktif metabolitleri.....	7
Şekil 1.5: Tamoksifen yapısına katılan en önemli sitokrom izoformları	7
Şekil 1.6: Krosinin yapısı	10
Şekil 3.1: Histopatolojik Bulgular	30



ÇİZELGELER

SAYFA

Çizelge 1.1: Krosinin Türevleri	11
Çizelge 3.1: Serum Biyokimya Parametreleri	23
Çizelge 3.2: Plazma (MDA, GSH, GPx) ve eritrosit lizatında (SOD, CAT) oksidan ve antioksidan parametreler	26
Çizelge 3.3: Karaciğer dokusundaki oksidan ve antioksidan parametreler	28
Çizelge 3.4: Histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirmesi	31

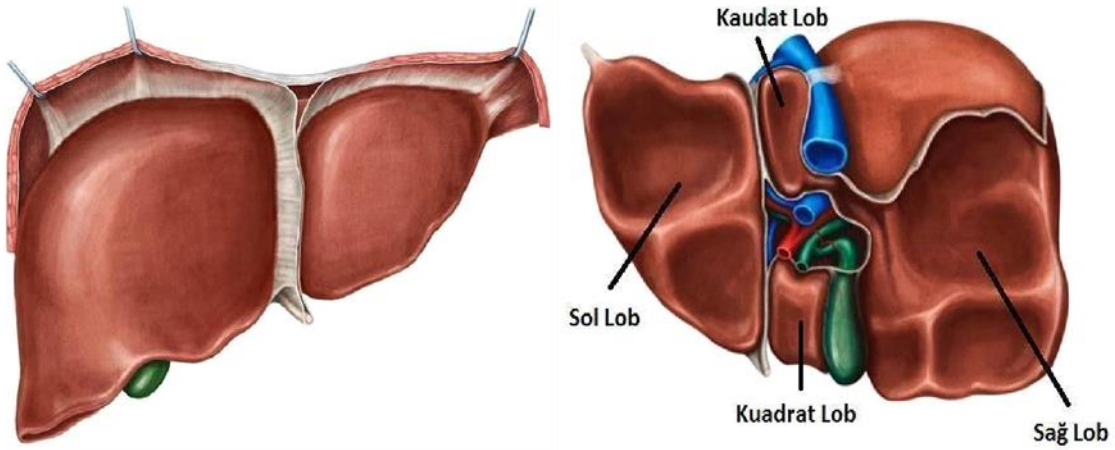


1. GİRİŞ

Son yıllarda kanser vakalarının artması ile beraber antikanser ilaçlarının kullanımı paralel olarak artış göstermiştir. Tamoksifen anti kanser türü bir ilaç olup anti östrojen olarak olarak tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Etkili tedavi edici özelliği ile bilinen bu ilaç uzun süre kullanıldığında karaciğerde hasar gibi önemli derecede yan etkilere de neden olmaktadır. Karaciğerde hasara ve organizmalarda oksidatif strese neden olan bu ilacın zararlı etkilerini azaltmak için çeşitli bitki kökenli tedaviler bulunmuştur. Ancak, çalışmamızda tamoksifenin ratlarda oluşturduğu karaciğer hasarını azaltmak amacıyla krosin kullanımı ilk defa denenerek antioksidan özelliği ile tedavi edici etkisi değerlendirilmiştir.

1.1. Karaciğer

Karaciğer 7. ila 11. Sağ kostalar arasında bulunup, göğüs kafesi ve diyafram aracılığı ile korunmaktadır. Süngerimsi bir yapıda olduğundan travmalara karşı duyarlıdır. Anatomik şekline bakıldığında sağ ve sol olmak üzere iki loba sahiptir ve sağ lob ise kaudat ve kuadrat adında iki kısma ayrılmıştır (Genç, 2018).

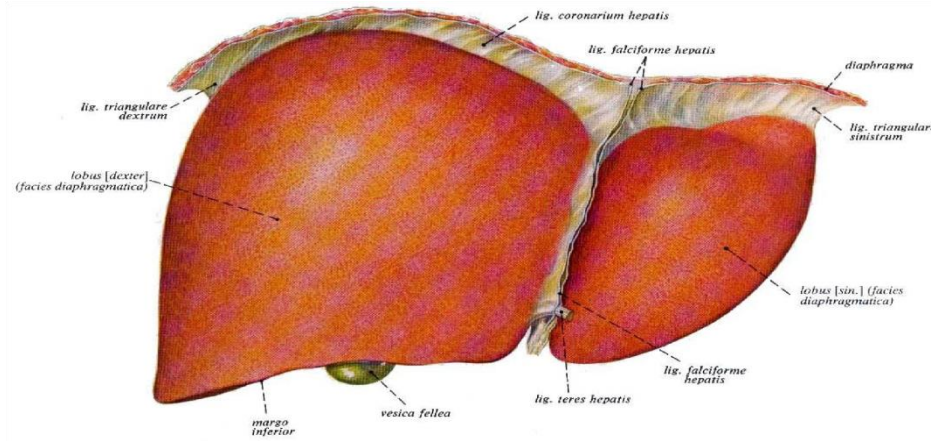


Şekil 1.1: Karaciğerin ön üst alt yüzeyleri ve lobları (Nalbant, 2017)

Endokrin ve ekzokrin işlevleri olan karaciğer bedenin deriden sonra ikinci önemli makro organıdır. Yapısı (morfolojisi, fizyolojisi, biyokimyası, dolaşımı) ile bedenin en

kompleks organlardan biri olan karaciğer karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması gibi önemli görevlerde yer almaktadır. İki ayrı kenarı ve yüzü olan karaciğerin facies diaphragmatica adı verilen yüzü diyafram ile temasta bulunurken facies visceralis adı verilen yüzü ise diğer abdominal organlara bakan damar giriş çıkışlarının olduğu, safra kanalının çıktığı porta hepatis bakmaktadır (Sayar, 2020). Safra safra kanalı aracılığı ile duodenuma döktüğünden ekzokrin, glikoz ve protein (glikoprotein, fibrinojen, protrombin, albumin, globulin) gibi maddeleri direkt olarak kana gönderdiğinden endokrin bez olarakta bilinmektedir (Altınbaşak, 2019).

Yetişkinlerde 1500 g ağırlığında ve abdominal boşluğun sağ üst kısmında yer alan karaciğer üzeri Glisson kapsülü ile çevrilidir. Glisson kapsülü de anterior ve posterior koroner ligamanlar adı verilen kısımlar ile diyaframa yapışır. Diyaframa yapışan bu ligamanlar, sağ-sol triangüler ligamanları oluşturarak ön kısımda birleşir ve falsiform ligaman meydana gelir. Falsiform ligaman içinde ise ligamentum teres hepatis bulunur ve bu ligamanlar karaciğeri sağ-sol iki lob şeklinde yüzeysel olarak ayırmaktadır (Yılmaz, 2010). Karaciğer parankimini ikiye ayıran Glisson kapsülü damar ve sinir dalları ile karaciğeri destekler (Altınbaşak, 2019).



Şekil 1.2: Karaciğerin ligamanları ile birlikte anterior görünümü (Bulut, 2013)

Arka çıplak kısmı dışında periton ile çevrili karaciğerin üç yüzü olduğu bildirilmiştir. Üst-alt-arka olarak bilinen bu üç yüzü sırası ile diyafram üstü organları, karın içi organları, diyafram, vena kava inferior (VKİ), sağ böbrek ve böbrek üstü bezleri ile komşudur. Önden arkaya doğru uzanan alt bölümün ortasında iki yarık mevcuttur. Bu

iki yarıık porta hepatitis adı verilen enine bir oluk ile birleşmektedir. Bu oluk vena porta, arteria hepatica, safra yolları, lenf damarları ve karaciğer sinirleri gibi damar ve sinirlerin giriş çıkış yeri olarak bilinmektedir (Özgüven, 1987).

Karaciğerin fonksiyonel ve yapısal birimi lobül olarak adlandırılmaktadır. Lobüller hepatosit plakların oluşturduğu ve sinüzoid boşlukların birleşimi ile çevrenmiştir. Endotelial yüzeyi ile sinüzoidler ve hepatositler arasında disse aralığı adı verilen boşluk bulunmaktadır. Disse aralığında ise; stellat hücreleri, hepatosit villuslar, proteoglikanlar, kollajen, fibronektin ve endotelin filtre ettiği plazma bulunur. Karaciğerin makrofaj hücreleri olarak bilinen kupffer hücreleri tüm vücudun %80-90 makrofajlarını temsil eder. Sitoplazmik uzantıları vardır ve endotel hücrelerine bağılı olarak bulunur. Fagositoz özelliğı olan kupffer hücrelerinin görevi ise patojen gibi zararlı maddeleri fagozite etmek, her türlü bağıışıklık olaylarına protein salgılamak ve eritrositlerin yapım yıkım olaylarında görev almaktadır (Kurtoğlu, 2017). Ayrıca sebebi fark etmeksizin karaciğerde hasar gören hepatosit hücreler reaktif oksijen türlerinin üretimine sebep olduğundan, kupffer hücreleri ve stellat hücreleri hasar durumunda aktif hale gelir (Uçar ve Göktaş, 2018).

Oksijene duyulan gereksiniminin yarısını karşılayan portal ven %75 oranında karaciğer kanlanmasını gerçekleştirirken, oksijene duyulan gereksinimin geri kalan kısmını ise hepatik arter karşılar ve %25 oranında karaciğere kanlanma sağlar (Sarıaltın, 2018).

Splenik ven ve superior mezenterik ven birleşiminden oluşan portal ven, porta hepatitis geçtikten sonra sağ-sol portal ven kollarına ayrılır. Portal venin kapakçığı olmadığından düşük basınç ile yüksek kanlanma sağlamaktadır. Hepatik ven ise kendi arasında üç hepatik ven dallarına ayrılarak bağlandığı segmentleri (5-8 segment arasını sağ hepatik ven, 4-5-8 segment arasını orta hepatik ven, 2-3 segment arasını sol hepatik ven) drene eder (Uzunoğlu, 2018). Drenajı sağlayan bu hepatik venler dorsal venler ile VKİ' a boşalır (Nalbant, 2017).

Zararlı toksik maddeleri uzaklaştırmada bedenin detoksifikasyon merkezi olan karaciğer; oksidasyon, redüksiyon, metilasyon, asetilasyon, konjugasyon,

detoksifikasyon gibi çeşitli fonksiyonlarda da görev alır. Bu fonksiyonları ile hormon-ilaç-kimyasal madde gibi iç-dış kaynaklı maddelerin yıkımına veya değişimine neden olmaktadır (Yılmaz, 2010).

Kandaki glikoz seviyesini belli bir dengede tutarak önemli fonksiyonlarından birini yerine getiren karaciğer, yeme-içme anında alınan glikozun kandaki seviyesini sürekli olarak kontrol eder. Glikozu glikojen formuna dönüştürerek karaciğerde depo eder, kandaki glikoz seviyesi düştüğü takdirde ise dönüştürdüğü glikojen formunu yine glikoza çevirerek kana verir. Rejenerasyon özelliği ile bir kısmı hasara uğradığında yeniden üretilip çoğalarak hasarlı kısmı onarır. Kupffer hücreleri ile bağırsaktan gelen bakterileri temizleyerek yok eder. Besin ve metabolik atıkları, vücuttan arındırmasının yanında globulin gibi bağışıklık maddeleri ve enzimleri üreterek bedeninin savunma sistemine katkıda bulunur. Yapısı itibarıyla gerektiğinde küçülebilen veya genişleyebilen karaciğer bu özelliği ile kanı depolayabilir veya bırakabilir. Vücuttaki toplam kanın %10' nu bünyesinde tutarak depo ederken ihtiyaç anında depolamış olduğu bu kanı tekrar dolaşıma gönderir (Altınbaşak, 2019).

1.2. Tamoksifen

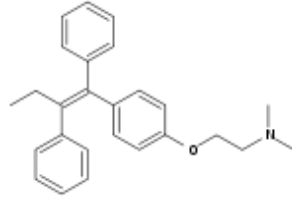
Östrojen reseptörlerinin meme kanseri hücrelerinde görüldüğünü keşfeden Jensen ve arkadaşları 1971 yılında endokrin tedavinin bu reseptörlerin bulunduğu tümör hücreleri üzerinde daha etkili olacağını düşünmüştür (Jensen vd., 1971).

Endokrin tedavinin %60 oranında olumlu yanıt vermesi üzerine tümör hücrelerinde bulunan östrojenin etkilerini durdurmak için anti östrojen ilaç çalışmaları başlanmıştır. Antiöstrojen olarak ilk bulunan madde Etamoksitritofol olmuştur fakat şiddetli yan etkisi olduğundan kullanımı tercih edilmemiştir (Asmaz, 2017). Çalışmaların ilerlemesi ile tamoksifen (TAM) keşfedilmiş ve diğer antiösrojen maddelere kıyasla daha az yan tesire ve östrojen reseptörleri üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu görülmüştür (Cole vd., 1971). Tedavi amaçlı olarak ilk defa 1971'de İngiltere'de piyasaya çıkmış, 1977'de ise Amerika'da Besin ve İlaç Dairesi ((FDA) Food Drug Administration) tarafından onaylanarak ileri evre meme kanseri görülen kadınların tedavisinde kullanılmıştır (Wylde

vd., 1998). Kısa süreli TAM tedavisi uygulandığında hastalığın nüks etme ihtimali olduğundan, etkili bir TAM tedavisi için en az 5 yıl süre ile devam edilmesi gerektiği öne sürülmektedir (Jordan ve Chem, 1983). 5 yıldan kısa süren TAM tedavisinde TAM'a karşı direnç geliştiği ve hastalığın tekrarlanma sıklığının arttığı bildirilmektedir (Asmaz, 2017). TAM'in meme kanserini tedavi edici özelliğinin yanı sıra myokard infarktüs risk oluşumunu düşürücü ve menopoz sonrası kadınlarda kemik yoğunluğunu koruyucu etkileri de vardır (Süzme, 1999). İyi tolere edilen TAM adjuvan olarak kullanılan hormonal tedavinin başında yer alırken en sık görülen yan etkileri arasında karaciğer yağlanması (Pan vd., 2016) ve karaciğer hasarı yer almaktadır (Zhou vd., 2019). 1980 yılında yapılmış bir çalışmada sıçanlara günlük 35 mg/kg dozunda TAM verilmiş, 26 hafta sonunda TAM verilen bu sıçanların karaciğerlerinde nodüler hiperplazi oluşumu görülmüştür (Süzme, 1999). Deoksiribonükleik Asit (DNA) hasarı ve DNA adductları uzun süren TAM tedavisi sonucu meydana gelirken, bu oluşumu askorbik asit ve N-asetilsistein gibi karsinogenezi inhibe edici maddelerin bile engelleyemediği görülmüştür (Han ve Liehr, 1992). Yapılan başka bir çalışmada sıçanlara 60 gün boyunca 0,4-0,8 mg/kg dozunda TAM kullanılmış ve TAM'in endometrium, karaciğer, meme dokusu ve serum lipidleri üzerindeki etkisi incelenmiş, sonuç olarak hepatolojik bulgularda bir farklılık gözlenmez iken kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) seviyelerinin düştüğü, endometriumda hiçbir östrojenik etkilere rastlanmadığı, meme dokusunda ise atrofi oluşumu gözlemlenmiştir (Kafkaslı vd., 1998).

1.2.1. Etki Mekanizması

Sağlıklı meme dokusunun büyüme ve çoğalması için östrojen ve prolaktin hormonları düzenleyici olarak görev yapar. Meme kanserinin tetiklenmesi ve ilerlemesinden sorumlu olan östrojenler, endokrin tedavinin temel mantığını oluşturur. Bu yüzden meme kanserinde uygulanan endokrin tedavinin ana mantığı tümör hücresinin östrojenlerin sağladığı büyüme yönündeki etkisinden mahrum bırakılmasıdır (Love vd., 1993).



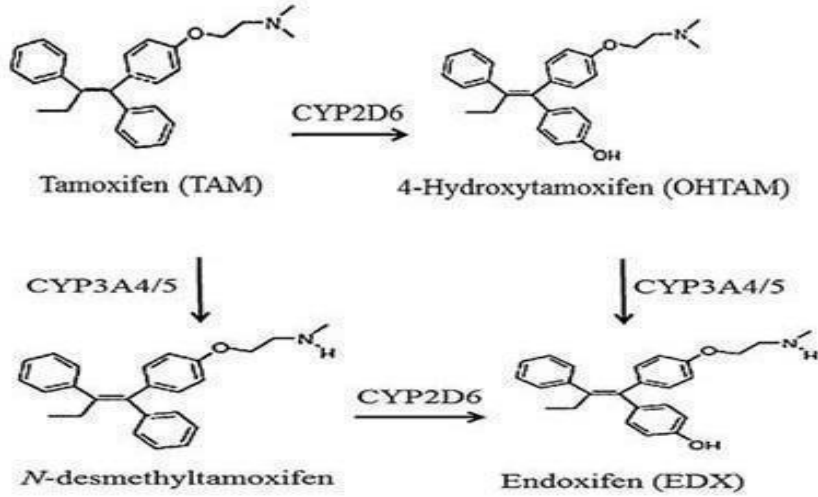
Şekil 1.3: Tamoksifen (Okat vd., 2018)

TAM, östrojen reseptörlerine bir yarış yolu ile bağlanıp seçici östrojen reseptör özelliği göstererek östrojenlerin bağlanmasını engeller. Seçici reseptör özelliği gösteren TAM nükleusa taşınarak nükleik asidin görevini etkiler. Böylece tümörün büyümesine yardımcı olan faktörler azalırken, tümör DNA sentezinde gerileme olur (Abe vd., 2005). Zayıf östrojenik etki gösteren TAM cis-trans izomerleri olan bir bileşiktir (Özbek, 2017). Cis izomerler östrojenik, trans izomerler anti östrojenik etkiye sahip iken bu etkileri sayesinde LDL ve kolesterol seviyesini düşürerek menopoz sonrası bayanlarda osteoporozu önleyici etki gösterir (Clemons vd., 2002).

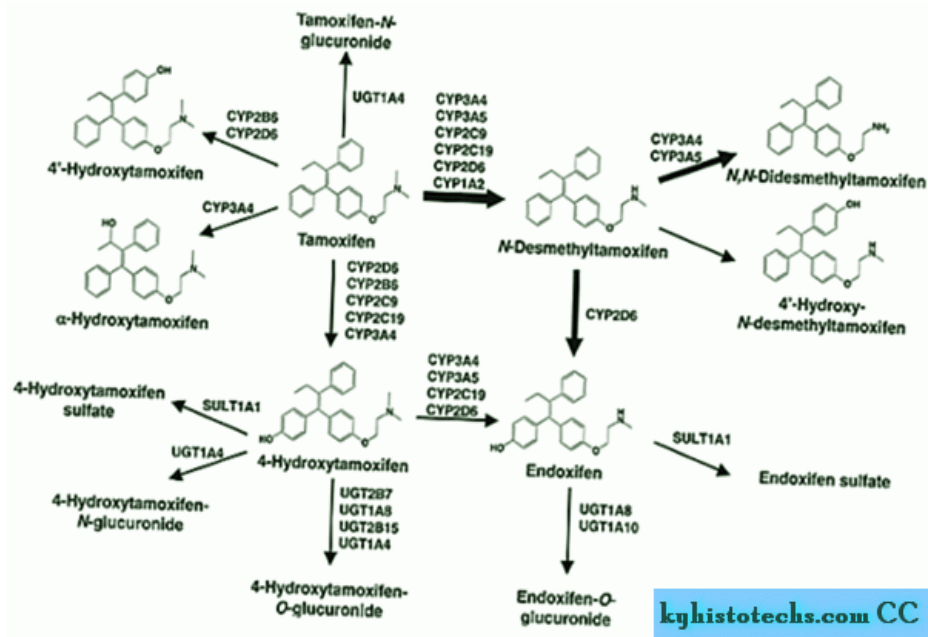
Oral yolla alınan TAM midede çözünür. Hormonal ve hormonal olmayan şeklinde çift etkiye sahip TAM'ın hormonal olmayan etkilerinden biri de transforming growth faktör β (TGF- β)'dır. Bir meme kanseri vakasında TAM tedavisinden üç ay sonra alınan biyopsi sonucuna göre ekstrasellüler TGF- β 'nın arttığı gözlemlenmiştir. TGF- β büyümeyi durdurucu etki göstererek TAM'ın östrojen reseptör (-) tümör hücrelerindeki etki mekanizmasına katıldığı düşünülmektedir (Süzme, 1999).

TAM, östrojen reseptörüne bağlandığı sırada DNA'daki östrojenlerin bağlanmasını bloke ederek östrojenlerin yapısında farklılaşmaya yol açmaktadır. Normal şartlar altında bir vücutta östrojen uyarılması, tümör hücresi ürünü olan TGF- β artırır. TAM, G1 fazındaki meme kanserinin otokrin uyarısını net bir şekilde bloke ederek azaltır (Asmaz, 2017). TAM, gonadotropin seviyesini değiştirmeden hipofiz bezine etki ederek premenopozal kadınlarda plazma östrojen seviyesini yükseltir. Postmenopozal kadınlarda ise gonadotropin düzeyini düşürür (Craig Jordan vd., 1991; Lønning vd., 1995).

TAM hücre ölümüne neden olmadan yani sitosidal etki göstermeden hücrelerin bölünmesini durduran sitostatik bir etki sergiler. Bu yüzden kanser hücrelerini G1 fazında durdurarak bölünmelerine engel olur. TAM'ın tek başına bir etkisi yoktur. Vücuda alındıktan sonra karaciğerde bazı enzimler ile aktif ara maddelere dönüştürülür. Bu durum TAM'ı bir ön ilaç yani prodrug yapar.



Şekil 1.4: Tamoksifenin metabolik yolları ve aktif metabolitleri (Ribeiro vd., 2014)



Şekil 1.5: Tamoksifen yapısına katılan en önemli sitokrom izoformları (Okat vd., 2018)

Karaciğerde sitokrom-P450 izoformları (CYP2D6-CYP3A4) tarafından aktif ara maddelere dönüştürülür (Kodal, 2009). TAM'ın aktif metabolitleri 4-hidroksi tamoksifen (OHTAM), N-desmetil-TAM (NDT) ve endoksifen (EDX)'dir. Normalde östrojen reseptörlerine ilgisi az olan TAM, aktif metabolitlerine dönüştürüldükten sonra bu reseptörlere olan afinitesi 30 ila 100 kat arasında artmaktadır (Desta vd., 2004).

EDX, OHTAM'a göre daha kararlı yapıda ve TAM'a göre ise daha etkili aynı zamanda TAM'ın anahtar metaboliti olarak kabul edilir. Yapılan bir çalışmada TAM'ın intraperitoneal enjeksiyonu sonrasında serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve reaktif oksijen seviyelerini (ROS) yükselttiği, glutatyon (GSH) seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Yapılan bu enjeksiyondan yaklaşık 5 ila 20 saat sonrasında ise ratlarda belirgin şekilde karaciğer hasarı meydana geldiği tespit edilmiştir (Zhou vd., 2019).

TAM iki evrede tepkimeye girmektedir. Evre I, oksidasyon reaksiyonlarından oluşur. TAM bu evre de CYP450 enzimi ile tepkimeye girerek aktif ve toksik metabolitler meydana getirir. Evre II konjugasyon reaksiyonlarıdır ve evre I' de oluşan metabolitlerin eliminasyonunu gerçekleştirmektedir. Primer ve sekonder olarak adlandırılan bu metabolitlerden primer metabolitler N-didesmetil-TAM (NDT) ve alfa-hidroksi TAM iken, sekonder metabolitler ise endoksifen ve alfa-hidroksi-NDT'dir (Okat vd., 2018). TAM'ın oksidatif biyotransformasyonu sonucu yan zincirinde değişiklikler meydana gelir (Adam vd., 1979).

Bir çalışmaya göre TAM metabolitleri; TAM asid (TA) ve TAM alkol olarak bildirilmiş olup bu ara ürünlerden TAM alkol karaciğer mikrozomlarında TAM aldehite dönüşürken, TA ise OHTAM'a dönüşür. Vucutta metabolize edilen TA'nın idrardaki metaboliti TA, dışkıdaki metaboliti ise OHTAM'dır (Süzme, 1999).

TAM'ın östrojenik etkisi plazma lipidlerinde de görülmektedir. 5 yıllık TAM tedavisi sonrası plazma trigliseridleri artarken, total kolesterol ve LDL kolesterol seviyelerinde (%13-%19) azalma görülür. Aynı zamanda 5 yıllık bu tedavi sonucunda kemik mineral yoğunluğunda anlamlı şekilde artış gözlemlenmektedir (Kök, 2019).

1.3. Safran

Safran (*Crocus sativus*) soğanlı bir bitki olup süsengiller (*Iridaceae*) ailesine ait (Coşgun, 2017) olarak bilinen ve geleneksel Çin tıbbında aktif olarak kullanılan bir bitkidir (Ochiai vd., 2004). Akdeniz ve Güney Asya gibi bölgelerde de yetiştirildiği, tıbbın yanı sıra baharat olarak kullanıldığı da bilinmekte olup renklendirici özelliği de bulunmakta, asıl rengini de krosinden almaktadır (Sumaiya vd., 2020).

Bu bitkinin kendi halinde çoğalma özelliği olmadığından soğanlar halinde yetiştirilmektedir. 150'den fazla uçucu ve uçucu olmayan aktif karotenoid bileşenlerden oluşur. Aynı zamanda içeriğinde su, şeker, çözünür özler, azotlu madde, uçucu yağ ve liflerde bulunur (Razak vd., 2017). Kokusunu safranal'dan tadını pikrokrosin'den rengini ise krosin'den almaktadır (Kumar vd., 2009). Bölgelere bağlı kullanım alanı değişmekle birlikte birçok çeşitli hastalıkların (menoraji, amenore, baş ağrısı, boğaz ağrısı, bronşit, antispazmodik vs.) tedavisinde kullanılmaktadır (Sumaiya vd., 2020). Aynı zamanda antioksidan olan safran bitkisinin mutasyonu önleme özelliğide bulunmaktadır (Kumar vd., 2009).

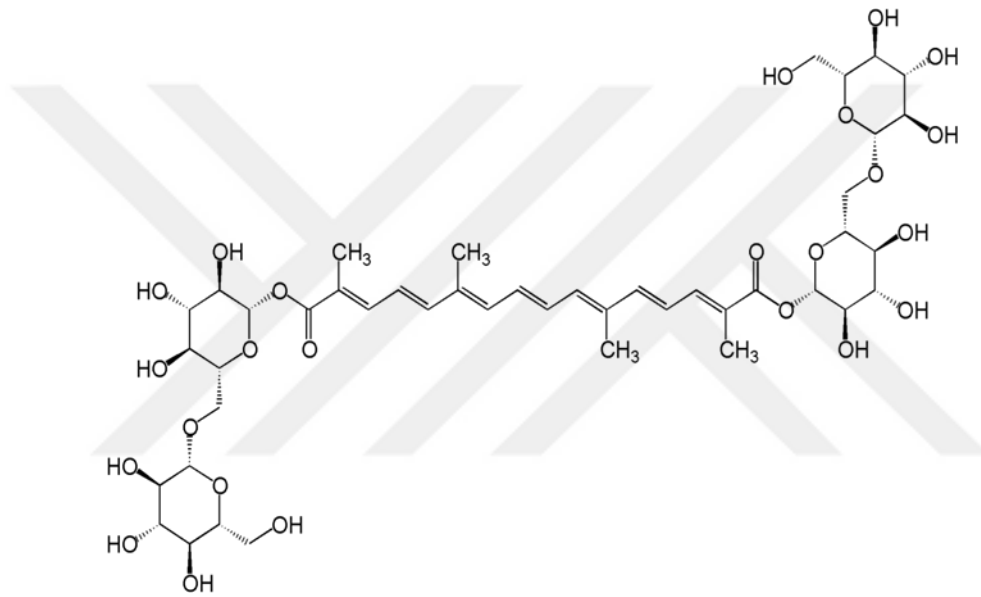
Yıllardır aktif olarak kullanılan safran bitkisini; Mezopotamya tıbbi tedavilerde, Fenikeliler kumaşa boyama maddelerinde, Roma ise bunlara ek olarak parfüm ve merhem yapımından kullanmıştır. Üst solunum yolları hastalıklarından öksürük ve bronşite, kadın hastalıklarından uterus kasılmalarını hafifletmesine kadar etki etmektedir. Safran içeriğinde bulunan bileşenler ile hücrelere oksijen alımını artırdığı ve oksijen dağılımını plazma sıvıları aracılığı ile yaptığı ortaya konulmuştur. Siklofosfamidin kaynaklı mesane toksisitesinde koruyucu etki gösterirken, aflatoksin B1 kaynaklı hepatotoksik lezyonlarda baskılayıcı etki göstermektedir (Giaccio, 2004).

Safranin içeriğinde bulunan krosin, krosetin ve safranal'ın tip2 diyabete karşı olumlu gelişim göstererek insülin direncine karşı hassas bir etki gösterdiği ve kaslarda glikoz alımını aktive ettiği gözlemlenirken, genotoksinlerin neden olduğu oksidatif stres engelleyerek öğrenme ve hafıza becerilerini geliştirmektedir. Kalpteki elektriksel iletim hızını yavaşlatarak aritmiyi önler. İmmünolojik bir etkiye sahip olan safran bağışıklık

sistemini güçlendirerek insan sağlığına katkıda bulunur. Safran içeriğinde bulunan en etkili biyoaktif bileşenlerden biri de krosindir (Razak vd., 2017).

1.3.1. Krosin

Krosin (KRO), safran bitkisinin ana bileşenidir ve karotenoid pigment yapısına sahip ve krosetin di-gentiobiose ester yapılıdır (Altınöz vd., 2016). İçeriğinde yedi çift bağ (Ochiai vd., 2004) ve dört metil grubu bulunmaktadır (Giaccio, 2004).



Şekil 1.6: Krosinin yapısı (Coşgun, 2017)

KRO turuncu rengini alfa-KRO'dan alırken yapısındaki sülfirik asit yoğunluğuna göre renginde değişimler görülür (Coşgun, 2017).

Safranda altı çeşit KRO bulunurken, KRO'da kendi içerisinde cis-trans izomere ayrılır. KRO safran içerisinde bulunan diğer tüm karotenoidlere göre içerisinde bulunan trans izomerleri sayesinde suda en yüksek çözünürlüğe ulaşarak en iyi renk verimini sağlamaktadır (Velioğlu, 2018).

Çizelge 1.1: Krosinin Türevleri (Velioğlu, 2018)

Bileşik	Şeker parçaları	Kimyasal formül	Safranda izomer oluşumu
Krosetin	R1 = R2 = OH	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	cis-trans
Krosin 1	R1 = b-D-glukosil R2 = H	C ₂₆ H ₃₄ O ₉	trans
Krosin 2	R1 = b-D-gentiobiosyl R2 = H	C ₃₂ H ₃₂ O ₁₄	cis-trans
Krosin 2	R1 = R2 = b-D-glucosyl	C ₃₂ H ₃₂ O ₁₄	cis-trans
Krosin 3	R1 = b-D-gentiobiosyl R2 = b-D-glucosyl	C ₃₈ H ₅₄ O ₁₉	cis-trans
Krosin 4	R1 = R2 = b-D-gentiobiosyl	C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄	cis-trans
Krosin 5	R1 = 3 b-D-glucosyl R2 = b-D-gentiobiosyl	C ₅₀ H ₇₄ O ₂₉	cis-trans

KRO antioksidan karakterde olduğundan inhibe edici etki gösterdiği ve aynı zamanda oksidatif stresle de baş ettiği düşünülmektedir (Ochiai vd., 2004). Safranın ana aktif bileşeni olan KRO, antioksidan özelliği yanında antiinflamatuvar özellikte gösterir ve suda çözünür (El-Kharrag vd., 2017; Giaccio, 2004). Güçlü bir antioksidan olup cilt kanserinde (Wang vd., 2018), kolorektal kanserinde (Aung vd., 2007), kanserin yanı sıra motor ve bilişsel bozukluklarda dahi etkili bir şekilde tedavi ettiği, iskemiye bağlı apoptozu, şizofreni benzeri semptomları ve buna bağlı oksidatif stresi hafiflettiği gözlemlenmiştir (Sun vd., 2020). KRO, hücre büyümesini engelleyici özelliği ile antitümör etki gösterirken, bu özelliği ile çeşitli hastalıklarda olumlu farmakolojik etkilere ve anti-kanser aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Aung vd., 2007). Serbest radikalleri ile savaşarak oksidatif hasarı engeller (Giaccio, 2004).

1.3.2. Krosinin Etki Mekanizması

Serbest radikaller tarafından artmış olan lipit peroksidasyon ve malondialdehit (MDA) seviyeleri safran özütü ve KRO'nun antioksidan özelliği ile azalma göstermiştir (Ochiai et al., 2004). Yapılan bir çalışma da KRO, hipoksik sıçan feokromasitoma hücre hattı (PC-12)' ndaki hücre ölümünü intraselüler redükte GSH düzeyini artırarak önlediği bulunmuştur (Ochiai vd., 2007). Radikal süpürücü antioksidan özellik baz alınarak

yapılan başka bir çalışmada KRO'nun lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) ve total oksidan seviyesi (TOS) düzeylerini ciddi oranda düşürdüğü gözlemlenmiştir (Velioğlu, 2018). Belirli dozlarda oral olarak uygulanan safran ekstresinin (25-100-250 mg/kg), krosin'in (2,5-5-10 mg/kg) ve safranal'ın (0,25-2,5-5ml/kg) gastrik mukozada lipit peroksidasyon seviyesini düşürerek GSH seviyesini artırdığı böylece gastrik mukoza hasarını önlediği görülmüştür (Kianbakht ve Mozaffari, 2009).

İnsülin duyarlılığını tedavi ederek kanda glikoz birikimini önlediği, oral yolla alındığında serum insülin seviyesini, redükte GSH ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyelerini artırarak hasar görmüş pankreasın yenilenmesine yardımcı olduğu, asetilkolinesteraz (ACHE) aktivitesini azaltarak serebral antioksidan belirteçlerini tedavi ettiği, amiloid birikimini ortadan kaldırarak öğrenme hafıza işlevlerini artırdığı, karaciğerde katalaz (CAT) aktivitesini, SOD ve GSH seviyelerini artırdığı , antagonistik etki göstererek serotonin alımını artırarak depresyonu önlediği bulunmuştur (Razak vd., 2017). 2017'de yapılan bir çalışmada KRO'nun karbon tetraklorür üzerindeki koruyucu etkisini inceleyen Coşgun (2017), karaciğerde artmış MDA-SOD-CAT ve TOS seviyelerini düşürdüğü, azalmış GSH ve TAS (total antioksidan seviyesi) seviyelerini artırdığı gözlemlenmiştir (Coşgun, 2017). 2018'de Tartazinin karaciğerde yapmış olduğu hasarı KRO ile onarmaya çalışan Velioğlu, (2018) tartazin kaynaklı artmış MDA-SOD-TOS-AST-ALT-ALP (alkalin fosfataz) enzim seviyelerinin KRO ile düştüğünü gözlemler iken, GSH-CAT-TAS enzim seviyelerinin ise KRO ile arttığını gözlemlenmiştir (Velioğlu, 2018).

1.3.3. Krosin Toksisitesi

KRO ve safran'ın Baharat ve gıda renklendirici olarak kullanımı hayati önem taşıdığından, toksik etkileri araştırılmıştır. 2004 de yapılan bir çalışmada, sıçanlara 2 hafta boyunca günlük belirli dozlarda intraperitoneal (i.p.) safranin sulu tepecik ve taç yaprak ekstraktı uygulanmıştır. Taç yaprak ekstraktının karaciğer ve akciğerde toksik etkilere neden olduğu görülürken, her iki ekstratın ise kronik anemiye neden olduğu görülmüştür (Karimi vd., 2004; Velioğlu, 2018).

Yapılan geçmiş çalışmalarda Gardenia Jasminoides bitkisinden ayrılan KRO boyalarının doza bağlı olarak karaciğerde siyah pigmentasyon ve renk değişikliklerinin neden olduğu akut hasar gözlemlenmiştir. Günlük 50 mg/kg dozda ve 8 gün süre ile uygulandığında karaciğer de herhangi bir fonksiyonel değişiklik gözlemlenmez iken 2 hafta boyunca 100 mg/kg gibi yüksek dozun karaciğer hasarını ve siyah pigmentasyon oluşumunu tetiklediği grlmştir (Wang vd., 2004; Velioğlu, 2018). Hosseinzadeh vd. 2017' de yaptığı çalışmada farelere uygulanan KRO'nun ardından incelenen biyokimya hematoloji ve patoloji kriterleri sonucuna göre krosinin vücutta hiçbir hayati organa zarar vermediği ortaya konmuştur (Hosseinzadeh ve Jahanian, 2010).

Bu tezin amacı: Sıçanlarda, TAM ile oluşturduğumuz karaciğer hasarına karşı KRO'nun etkilerini araştırmaktır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Araç ve Gereçler

Cam malzemeler [Erlenmayer (50-100 ml), beher (25-50-100 ml), mezür, tüp]

Cerrahi malzemeler (pens, makas)

Distile su cihazı

Hassas terazi (Denver Instrument)

Otomatik pipetler (VWR; 10–100 µl; 10-200µl; 100–1000 µl)

Santrifüj (Thermo Scientific™, Megafuge™ 16)

Spektrofotometre (Shimadzu 1601 Uv-Visible)

2.1.2. Hayvan Materyali

Yapılan bu çalışmada kullanılan hayvanlar Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edildi. Her biri 200-250 g ağırlığında 36 adet Wistar Albino cinsi dişi yetişkin sıçan kullanıldı. Sıçanlar her bir grupta 6 sıçan olacak şekilde, rastgele 6 ayrı gruba ayrıldı. Sıçanlar özel rat kafesleri içerisinde standart laboratuvar şartları altında 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda ortalama 25°C oda sıcaklığında tutuldu. Deney boyunca sıçanların önlerinde daima standart ticari pelet yemi ve su bulunduruldu. Çalışmanın gerçekleştirilmesi için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (AKUHADYEK) 49533702/118 sayı ile onay alındı (EK-1).

2.2. Metot

2.2.1. Deneysel Aşama

2.2.1.1. Deneysel Aşamanın Planlanması ve Uygulanması

- Grup I'deki kontrol grubu sıçanlara, 28 gün boyunca %0,9'luk salin (KRO ve TAM çözücüsü olarak) oral yolla uygulandı.
- Grup II'deki sıçanlara, 28 gün boyunca 45 mg/kg dozunda TAM, %0,9'luk salinde çözündürülerek oral yolla uygulandı (El-Beshbishy, 2005; El-Dessouki vd., 2018).
- Grup III'teki sıçanlara, 28 gün boyunca 50 mg/kg dozunda KRO, %0,9'luk salinde çözündürülerek oral yol ile uygulandı
- Grup IV, V ve VI daki sıçanlara ise 28 gün boyunca sırasıyla 12,5 mg/kg, 25 mg/kg (Sun vd., 2020; 25 mg/kg) ve 50 mg/kg (Ben Salem vd., 2015; 50 mg/kg; Velioğlu, 2018) dozlarında KRO oral yol ile uygulanmasının yanı sıra gruplara 28 gün boyunca 45 mg/kg (Albukhari vd., 2009; 45 mg/kg) dozunda TAM oral yoldan uygulandı. Tüm uygulamalar arasında 30 dakika beklendi.

2.2.1.2. Deneysel Aşamanın Sonlandırılması

Son ilaç uygulamasından 24 saat sonra bir gece öncesinden aç bırakılan ratlar, 87 mg/kg ketamin ve 13 mg/kg dozda ksilazin enjeksiyonu ile anestezi altına alındı. Genel anestezi altında tekniğine uygun olarak göğüs kafesleri açıldı. Karaciğer dokusu örnekleri ile çalışır durumda iken kalpten yaklaşık 5 ml kan örnekleri normal ve heparinli tüplere alındı. Santrifüj yapılarak serum ve plazmaları ayrıldı, dipte kalan eritrositler fosfat tamponu ile (pH 7.4) yıkama işleminden sonra eritrosit hemolizatı elde edilerek aynı tampon içerisinde analiz edilinceye kadar -20°C'de saklandı. Alınan doku örnekleri soğuk salin ile yıkandıktan sonra analiz edilinceye kadar -70°C'de saklandı. Alınan kan ve doku örneklerinden oksidatif stres parametreleri, biyokimyasal ölçümler ve histopatolojik incelemeler gerçekleştirildi.

2.2.2. Histopatolojik Değerlendirme

Farklı büyüklüklerde alınan karaciğer dokuları, doku takip kabına konuldu. Hazırlanan bu dokular 5 gün boyunca %10'luk formalin içinde bekletildi. Sonrasında normal doku takibine alınarak akan suda 30 dk boyunca fazla formaldehitten arındırıldı. Dehidratasyon işlemi için yükselen alkol derecelerinde hazırlanan solüsyonlarından geçirilerek ardından ksilene konulup 1,5 saat boyunca şeffaflaştırma işlemi yapıldı. 3 ve 2 saatlik önce yumuşak sonra sert parafine gömülerek 5-6 mikron kalınlığında doku kesitleri alındı (Thermo Excelsior ES doku takip cihazı ve Leica RM2255 mikrotom cihazı kullanıldı) ve tekrar parafinle bloklandı. Ardından hematoksilin-eozin (H&E) boyama için gruplara ayrılarak dokular boyandı. Boyanan örnekler ışık mikroskobu altında değerlendirilerek dokularda gruplar arasında görülen farklılıklar ve kontrol grubu ile aralarındaki farklar değerlendirildi.

2.2.3. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler

2.2.3.1. Doku Homojenizasyonu

Alınan doku örneklerine 50 mM olarak hazırlanan 5 ml soğuk KH_2PO_4 (PH=7) eklenerek ardından homojenizasyonları yapılmak üzere mekanik ve ultrasonik homojenizatör cihazına (20k Hz) konuldu. Daha sonra santrifüj edilmek üzere solüsyon içindeki dokular santrifüj cihazına konularak 5000 devirde 15 dk boyunca santrifüj edildi ve elde edilen doku süpernatantları biyokimyasal analizlerde kullanılmak için hazır hale getirildi.

2.2.3.2. Hemolizat Hazırlanması

Eşit miktarda KH_2PO_4 tampon solüsyonu alınan kan örneklerine eklenerek 3000 devirde 5 dk boyunca toplamda 3 defa santrifüj edildi. Üstte kalan kısım atılarak ependorflara aktarımı yapılmak üzere 0,5 ml KH_2PO_4 tamponu üzerine 0,5 ml eritrositlerden çekildi. Analiz aşamasına kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de saklandı. Üzerine soğuk distile su eklemek için

eritrosit paketinden 0,8 ml alındı ve hemolizat hazırlığı yapıldı. Bu hemolizat örnekleri SOD ve CAT enzim aktivite tayininde kullanıldı (Winterbourn vd., 1975).

2.2.3.3. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

SOD ölçümleri Sun ve ark. (1988) metoduna göre belirlendi (Sun, Y vd., 1988). Ksantin - ksantin oksidaz enzimi ile nitroblue tetrazolium (NBT) indirgenmesi ilkesine dayanır. 2,45 ml reaktif karışımından alınarak işaretli tüplere konuldu ardından kör tüpüne 0,5 ml bidistile su, test tüpüne 0,5 ml numune konuldu. Daha sonra üzerlerine 50 µl ksantin oksidaz eklenerek karıştırıldı. İnkübe edilmek üzere 20°C de 20 dk su banyosu işleminden geçirildi. İşlemi tamamlanmış inkübe edilen örnek tüplere 1 ml CuCl_2 eklendi ve reaksiyon durduruldu. NBT'in indirgemesi sonucunda oluşan rengin absorbansı 560 nm' de spektrofotometrik olarak değerlendirildi ve SOD ölçümleri yapıldı.

Kullanılan Çözeltiler:

Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi (PBS): pH'sı 7,4'e ayarlanmak üzere bir litre tridistile suda 8,06 g NaCl, 0,201 g KCl, 12,636 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 çözdürüldü.

Ksantin stok çözeltisi (3 milimol/L): 5 ml 0,1 N NaOH ile ısıtılarak çözdürmek üzere 23 mg ksantin 50 ml'lik bir balon joje içine konuldu. Üzerine Distile su ilave edilerek 50 ml'ye tamamlandı. Her kullanımda 10 kez sulandırıldı.

EDTA çözeltisi (0,6 milimol/L): 0,249 g EDTA (dihidrat) bir litrelik balon joje içinde çözdürmek hacim distile su tamamlandı.

Nitroblue Tetrazolium (NBT) çözeltisi (150 milimol/L) : 100 ml'lik bir balon joje içine 12,3 mg NBT konularak çözdürüldü ardından 100 ml ye tamamlanması için üzerine distile su eklendi.

Na_2CO_3 çözeltisi (400 µmol/L): 4,2 g Na_2CO_3 100 ml'lik bir balon joje içine konularak çözdürüldü ve hacim 100 ml ye tamamlanması için üzerine distile su eklendi.

Sığır albümini çözeltisi (1g/L): 100 mg sığır albümini 100 ml lik balon jodede çözdürüldü ve üzerine hacim 100 ml ye tamamlanmak üzere distile su eklendi.

CuCl_2 (0,8 mmol/L): 100 ml'lik balon joje içine 10,7 mg CuCl_2 konularak çözdürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlamak için üzerine distile su eklendi.

Ksantin Oksidaz enzim çözeltisi: 20 U/ml aktiviteye sahip ksantin oksidaz enzim çözeltisinden 20 µmol alınarak 2 ml 2 M amonyum sülfat çözeltisi ile karıştırıldı.

Reaktif Karışımı: 20 tüplük bir seri analiz için 100 ml'lik bir erlen içerisine 10 kez sulandırılmış 20 ml ksantin stok çözeltisi, 10 ml EDTA çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi, 6 ml Na₂CO₃ çözeltisi ve 3 ml sığır albümini çözeltisi konuldu ve iyice karıştırıldı.

2.2.3.4. Katalaz Aktivite Tayini

Araştırmamızda Katalaz'ın (CAT) eritrositlerdeki konsantrasyonları, CAT tarafından Hidrojen Peroksit'in (H₂O₂) ayrıştırılma oranlarına göre belirlendi. Reaksiyonu gerçekleştirecek karışım; pH'ı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponu ve 10 mM H₂O₂'den oluştu. H₂O₂'nin indirgenme hızı oda sıcaklığında 45 sn boyunca 240 nm'de izlendi (bir birim CAT 25⁰C ve pH'ın 4,5 olduğu koşullarda 1 µmol H₂O₂ ayrıştırır) (Luck, 1955; Aebi, 1984).

Kullanılan Çözeltiler:

Fosfat tamponu; 3,5 gram Mono potasyum fosfat (KH₂PO₄)

7,26 gram Sodyum fosfat dibazik dihidrat (Na₂HPO₄.2H₂O)

1 litre distile suda çözdürüldü. pH 7 değilse 7 ye ayarlanır.

Hidrojen peroksit (H₂O₂ ; %30); %30 luk H₂O₂ den, 0,16 mL alınıp 100 mL fosfat tamponu ile karıştırılır.

2.2.3.5. Malondialdehit (MDA) Seviye Ölçümü

MDA doku ölçümleri Ohkawa ve ark (1979), plazma ölçümleri ise Yoshioka ve ark (1979) metotlarına göre yapıldı. Kimyasallar katılarak hazırlanan numuneler (doku için) 95 derecelik su banyosunda 1 saat kaynatıldı. Daha sonra soğutulularak üzerlerine n-butanol/piridin karışım eklendi ve santrifüjden sonra MDA seviyelerinin absorbansı 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. MDA seviyelerinin birimi nmol/ml olarak ifade edildi. Plazma analizi içinde TCA ve TBA karıştırıldı ve 95 derecelik su banyosunda 30 dakika kaynatıldı. Daha sonra n-butanol ilavesi ve santrifüj

işlemlerinden sonra MDA seviyelerinin absorbansı 535 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Kullanılan Çözeltiler (Doku):

% 8’lik Sodyum Dodesil Sülfat (distile suda)

%20’lik glasiyel asetik asit (distile suda) (pH’ı 3,5 olmalı)

Not: Eğer solüsyon asidik olursa 0,05 M NaOH ile pH 3,5’a çekilebilir.

%0.8’lik tiyobarbitürik asit (0,05 M NaOH’da).

N-butanol.

Piridin.

[N-butanol ve Piridin karışım şeklinde kullanılacak. (15 birim n-butanol; 1 birim piridin şeklinde)].

Kullanılan Çözeltiler (Plazma):

% 20’lik triklorasetik asit (TCA) distile suda.

% 0,67’lik tiyobarbitürik asit (TBA) distile suda.

n-Butanol.

2.2.3.6. Glutasyon (GSH) Seviye Ölçümü

GSH seviyeleri Beutler ve ark. (1963) metoduna göre ölçüldü. Bu metoda göre sıçanlardan alınan numune örneklerine %10’luk TCA eklenmesiyle birlikte örnekler +4 °C’de 10 dk boyunda santrifüj edildi. Santrifüjlenen numunelere 2-sodyum hidrojen fosfat çözeltisi ve 5-5-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile oluşturulan karışımın (Ellmann’s solüsyonu) eklenmesiyle elde edilen ürünün spektrofotometrik olarak 412 nm dalga boyunda ölçülme esasına dayanır. 0,2 ml doku ve kan alınarak üzerine 3 ml çöktürücü konuldu. Adi süzgeç kâğıdından süzdürmek üzere 5 dk boyunca bekletildi. Ayrı bir tüpe konulan 1 ml filtrat üzerine 4 ml fosfat tamponu ve 0,5 ml DTNB ayırıcı ilave edilip iyi bir karışım elde edene kadar karıştırıldı. Standart tüpünde 0,2 ml GSH standardı kullanıldı. 2 ml distile su ve 3 ml çöktürücü kör tüpüne konularak adi süzgeç kâğıdından geçirildi. Ölçümler 412 nm de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Kullanılan Çözeltiler:

Çöktürücü: Distile suda 5 g metafosforik asit + 1 g EDTA + 90 g NaCl 300 ml çözdürüldü.

Fosfat çözeltisi (0,3 M): 500 ml distile suda 40,02 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözdürüldü.

DTNB: 100 ml'lik sodyum sitrat çözeltisiyle 40 mg DTNB çözdürüldü.

GSH standardı: 25 ml distile suda 10 mg GSH çözdürüldü.

2.2.3.7. Glutasyon peroksidaz (GPX) Aktivite Tayini

Plazma GPx düzeyleri ticari kitlerin prospektüslerine uygun olarak enzyme linked immunosorbent assay (ELİSA) yöntemiyle belirlendi (Cayman Chemical, Michigan, USA; katalog numarası: 703102).

2.2.3.8. Protein Ölçümü

Alkali ortamda proteinlerdeki peptid bağlarının bakır iyonu (Cu^{+2}) ile tepkimeye girmesi sonucu bakır iyonu Cu^+ na indirgendir. Folin-Fenol reaktifinin Bu reaksiyon zincirinde yer alan aminoasitler (Tyr, Trp ve Cys) tarafından indirgenmesi ile renk oluşumu meydana geldi. Bu rengin derecesi protein konsantrasyonu ile paralel ilerlemektedir ve spektrofotometrik olarak 660 nm de ölçüldü (Lowry vd., 1951). Örnek ve standart tüplerine 1 ml homojenat çözeltisi ve standart çözeltiler, kör tüpüne de 1 ml saf su konuldu. Tüm tüplere A ve B reaktifi (100:1) karışımından oluşturulan 3 ml C reaktifi eklendi (A reaktifi %2 Na_2CO_3 , %1 NaOH, %0,16 Na-tartarat; B reaktifi ise %4 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). 300 ml Folin-Fenol reaktifi vortekslemek üzere oda sıcaklığında 30 dk bekletilip ardından vorteks işlemi gerçekleştirildi. Ardından tekrar oda sıcaklığında 45 dk bekletildi ve absorbanslar 660 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü.

2.2.3.9. Kanda Hemoglobin Düzeyinin Belirlenmesi

Ferrisiyanür tarafından hemoglobin içerisindeki demir (Fe^{+2}) iyonu Fe^{+3} 'e yükseltgenerek methemoglobine dönüştürüldü. Ardından methemoglobinin siyanomethemoglobine dönüşmesi için KCN eklenerek karıştırılıp 5 dk boyunca

bekletildi. Kör, standart ve numune tüplerine 6 ml Drabkin çözeltisi konuldu. Ardından standart tüpüne 0,02 ml standart çözeltisi, kör tüpüne 0,02 ml distile su koyularak 0,02 ml numuneler alınarak tüplerine konuldu. Absorbansı spektrofotometrik olarak 540 nm de ölçülerek miktar belirlendi (Drabkin ve Austin, 1935).

Kullanılan çözeltiler:

Drabkin çözeltisi: Distile suda Sırasıyla 0,2 g potasyum ferrosiyanür ($K_3Fe[CN]_6$), 0,05 g KCN ve 1 g $NaHCO_3$ çözündürülerek 1 litreye tamamlandı.

Siyanomethemoglobin standardı (Std): Bilinen konsantrasyonda hemoglobin çözeltisi (g/dl) kullanıldı.

2.2.4. Biyokimyasal Parametrelerinin Ölçümü

Alınan serum örneklerinden TP, TB, AST, ALT, ALP değerleri temin edilen ticari kitlerle otoanalizör cihazı (BT-300 plus, Roma, İtalya) kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi.

2.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences ver. 22.0 SPSS Inc, Chicago Illinois, USA) programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (SD) olarak verildi. Elde edilen verilerin normallik testleri yapıldı ve gruplar arasındaki istatistiksel analiz için gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ve önemliliklerin belirlenmesinde post-hoc Duncan testi kullanıldı. $P < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Biyokimyasal Parametre Bulguları

Yapılan bu çalışma sonucunda tüm gruplardan alınan kan örneklerinden ALT değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler; kontrol grubunda 43 U/L, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 67,33 U/L ve sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 34,33 U/L olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 66,16 U/L, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 63,83 U/L ve TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 53,33 U/L olarak bulundu. Elde edilen ALT değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol grubuna göre sadece KRO verilen grupta anlamlı bir azalma gözlenirken, diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait ALT değerleri çizelge 3.1’de gösterildi.

Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden AST değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler; kontrol grubunda 121,66 U/L, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 136,66 U/L, sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 109,16 U/L olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 133,16 U/L, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 134,16 U/L ve TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 128 U/L olarak bulundu. Elde edilen AST değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda ALT değerlerinde olduğu gibi AST değerlerinde de sadece KRO verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlenirken, diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait AST değerleri çizelge 3.1’de gösterildi.

Yapılan bu çalışma sonucunda tüm gruplardan alınan kan örneklerinden ALP değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler; kontrol grubunda 183 U/L, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 242,5 U/L, sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 127,16 U/L olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 221,83 U/L, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 206,33 U/L ve TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 193,83 U/L olarak bulundu. Elde edilen ALP değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda ALT ve AST değerlerinde olduğu gibi, kontrol grubuna

göre sadece KRO verilen grupta anlamlı bir azalma gözlemlenirken, diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait ALP değerleri çizelge 3.1' de gösterildi.

Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden Total Protein (TP) değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler; kontrol grubunda 6,05 g/dl , sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 6,95 g/dl , sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 6,58 g/dl olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 7,11 g/dl, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 6,8 g/dl ve TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 6,63 g/dl olarak bulundu. ALT, AST ve ALP değerlerinden farklı olarak tüm grupların TP değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait TP değerleri çizelge 3.1' de gösterildi.

Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden Total Bilirubin (TB) değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler; tüm gruplarda 0,2 mg/dl olarak bulundu. Tüm grupların TB değerleri ile kontrol grubu arasında bir değişiklik görülmedi. Tüm deney gruplarına ait TB değerleri çizelge 3.1'te gösterildi.

Çizelge 3.1: Serum Biyokimya Parametreleri

Gruplar	ALT (U / L)	AST (U / L)	ALP (U / L)	TP (g / dl)	TB (mg / dl)
Kontrol	43±8,09 ^c	121,66±7,33 ^b	183±64,98 ^b	6,05±0,42 ^b	0,2
TAM	67,33±6,97 ^a	136,66±12,09 ^a	242,5±32,08 ^a	6,95±0,33 ^a	0,2
KRO	34,33±5,75 ^d	109,16±13,16 ^c	127,16±43,89 ^c	6,58±0,52 ^a	0,2
TAM + 12,5 mg/kg KRO	66,16±4,26 ^a	133,16±7,78 ^{ab}	221,83±16,32 ^{ab}	7,11±0,34 ^a	0,2
TAM + 25 mg/kg KRO	63,83±7,33 ^a	134,16±9,23 ^a	206,33±11,12 ^{ab}	6,8±0,25 ^a	0,2
TAM + 50 mg/kg KRO	53,33±9,68 ^b	128±7,04 ^{ab}	193,83±8,01 ^b	6,63±0,57 ^a	0,2

Değerler, ortalama ± (SD) şeklinde belirtilmiştir; n:6 ; a,b,c,d Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade eder ($P<0,05$). Kontrol: Kontrol grubu, TAM: Tamoksifen grubu, KRO: Krosin grubu

3.2. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametre Bulguları

Yapılan bu çalışma sonucunda tüm gruplardan alınan kan örneklerinden MDA Plazma değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler; kontrol grubunda 5,24 nmol/ml, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 7,21 nmol/ml, sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 5,82 nmol/ml olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 7,02 nmol/ml, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 6,72 nmol/ml ve TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO grupta 5,96 nmol/ml olarak bulundu. Elde edilen MDA Plazma değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol grubuna göre diğer tüm grupların MDA Plazma değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait MDA Plazma değerleri çizelge 3.2' de gösterildi.

Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden GSH Plazma değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler; kontrol grubunda 45,85 nmol/ml, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 33,09 nmol/ml, sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 48,54 nmol/ml olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 36,92 nmol/ml, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 37,37 nmol/ml ve TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 43,82 nmol/ml olarak bulundu. Elde edilen GSH Plazma değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol grubuna göre sadece KRO verilen grubun GSH Plazma değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülürken, diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait GSH Plazma değerleri çizelge 3.2'da gösterildi.

Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden GPx Plazma değerlerine bakıldı ve elde edilen veriler; kontrol grubunda 705,65 U/ml, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 465,23 U/ml ve sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 687,48 U/ml olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 524,79 U/ml, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 571,5 U/ml ve TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 635,44 U/ml olarak bulundu. Elde edilen GPx Plazma değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol grubuna göre tüm grupların GPx Plazma değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait GPx Plazma değerleri çizelge 3.2' de gösterildi.

Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden SOD Eritrosit değerlerine bakıldı ve buna göre elde edilen veriler; kontrol grubunda 72,97 U/gHb, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 94,77 U/gHb ve sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 79,86 U/gHb olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 89,55 U/gHb, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 86,57 U/gHb ve TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 81,56 U/gHb olarak bulundu. Elde edilen SOD Eritrosit değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda, MDA Eritrosit değerlerinde olduğu gibi, kontrol grubuna göre diğer tüm grupların SOD Eritrosit değerlerinde de istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait SOD Eritrosit değerleri çizelge 3.2’te gösterildi.

Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden CAT Eritrosit değerlerine bakıldı ve buna göre elde edilen veriler; kontrol grubunda 31,36 k/gHb, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 48,62 k/gHb ve sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 30,39 k/gHb olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 43,15 k/gHb, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 40,49 k/gHb, TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 34,87 k/gHb olarak bulundu. Elde edilen CAT Eritrosit değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol değerine göre sadece KRO verilen grubun CAT Eritrosit değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülürken, diğer tüm grupların CAT Eritrosit değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait CAT Eritrosit değerleri çizelge 3.2’ te gösterildi.

Çizelge 3.2: Plazma (MDA, GSH, GPx) ve eritrosit lizatında (SOD, CAT) oksidan ve antioksidan parametreler

Gruplar	MDA (nmol/ml)	GSH (nmol/ml)	GPx (U/ml)	SOD (U/gHb)	CAT (k/gHb)
Kontrol	5,24±0,34 ^d	45,85±1,23 ^{ab}	705,65±7,32 ^a	72,97±3,24 ^d	31,36±1,68 ^c
TAM	7,21±0,32 ^a	33,09±1,28 ^d	465,23±16,8 ^f	94,77±3,98 ^a	48,62±5,2 ^a
KRO	5,82±0,34 ^c	48,54±1,63 ^a	687,48±13,56 ^b	79,86±2,06 ^c	30,39±2,95 ^c
TAM+ 12,5mg/kg KRO	7,02±0,33 ^{ab}	36,92±7,57 ^{cd}	524,79±14,57 ^e	89,55±2,24 ^b	43,15±5,31 ^b
TAM+ 25mg/kg KRO	6,72±0,51 ^b	37,37±0,93 ^c	571,5±7,45 ^d	86,57±2,37 ^b	40,49±3,88 ^b
TAM+ 50mg/kg KRO	5,96±0,19 ^c	43,82±1,87 ^b	635,44±6,04 ^c	81,56±2,47 ^c	34,87±2,65 ^c

Değerler, ortalama ± (SD) şeklinde belirtilmiştir; n:6, a,b,c,d,e,f Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade eder (P < 0.05), Kontrol: Kontrol grubu, TAM: Tamoksifen grubu, KRO: Krosin grubu

3.3. Karaciğer Doku Değerleri

Yapılan bu çalışma sonucunda tüm gruplardan alınan kan örneklerinden MDA Karaciğer değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler; kontrol grubunda 4,46 nmol/g doku, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 7,09 nmol/gdoku, sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 4,9 nmol/gdoku olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 7,18 nmol/gdoku, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 6,97 nmol/gdoku ve TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 5,39 nmol/gdoku olarak bulundu. Elde edilen MDA Karaciğer değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü (p<0,05). Tüm deney gruplarına ait MDA Karaciğer değerleri çizelge 3.3'te gösterildi.

Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden GSH Karaciğer değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler; kontrol grubunda 40,59 nmol/gdoku, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 22,88 nmol/gdoku, sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 42,33 nmol/gdoku olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 25,81 nmol/gdoku,

TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 27,92 nmol/gdoku ve TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 34,66 nmol/gdoku olarak bulundu. Elde edilen GSH Karaciğer değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol grubuna göre sadece KRO verilen grubun GSH Karaciğer değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülürken, diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait GSH Karaciğer değerleri çizelge 3.3'te gösterildi.

Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden GPx Karaciğer değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler; kontrol grubunda 257,82 U/mg, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 152,37 U/mg ve sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 249,87 U/mg olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 187,29 U/mg, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 196,65 U/mg, TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 219,03 U/mg olarak bulundu. Elde edilen GPx Karaciğer değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol grubuna göre diğer tüm grupların GPx Karaciğer değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait GPx Karaciğer değerleri çizelge 3.3'te gösterildi.

Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden SOD Karaciğer değerlerine bakıldı ve buna göre elde edilen veriler; kontrol grubunda 3,25 U/ μ g, sadece TAM (45mg/kg) verilen grupta 5,6 U/ μ g ve sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 3,73 U/ μ g olarak bulundu. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg KRO verilen grupta 5,15 U/ μ g, TAM ile birlikte 25 mg/kg KRO verilen grupta 4,81 U/ μ g ve TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 4,11 U/ μ g olarak bulundu. Elde edilen SOD Karaciğer değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda, MDA Karaciğer ve MDA Eritrosit değerlerinde olduğu gibi, kontrol grubuna göre diğer tüm grupların SOD Karaciğer değerlerinde de istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait SOD Karaciğer değerleri çizelge 3.3' te gösterildi.

Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden CAT Karaciğer değerlerine bakıldı ve buna göre elde edilen veriler; kontrol grubunda 1,84 k/ μ g, sadece TAM (45 mg/kg) verilen grupta 2,98 k/ μ g, sadece KRO (50 mg/kg) verilen grupta 2,07 k/ μ g olarak bulundu. TAM ile birlikte 12, mg/kg KRO verilen grupta 2,85 k/ μ g, TAM ile birlikte 25 mg/kg

KRO verilen grupta 2,69 k/μg, TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grupta 2,25 k/μg olarak bulundu. Elde edilen CAT Karaciğer değerleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda, MDA Karaciğer, MDA Plazma, SOD Karaciğer, SOD Eritrosit değerlerinde olduğu gibi, kontrol grubuna göre diğer tüm grupların CAT Karaciğer değerlerinde de istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$). Tüm deney gruplarına ait CAT Karaciğer değerleri çizelge 3.3'te gösterildi.

Çizelge 3.3: Karaciğer dokusundaki oksidan ve antioksidan parametreler

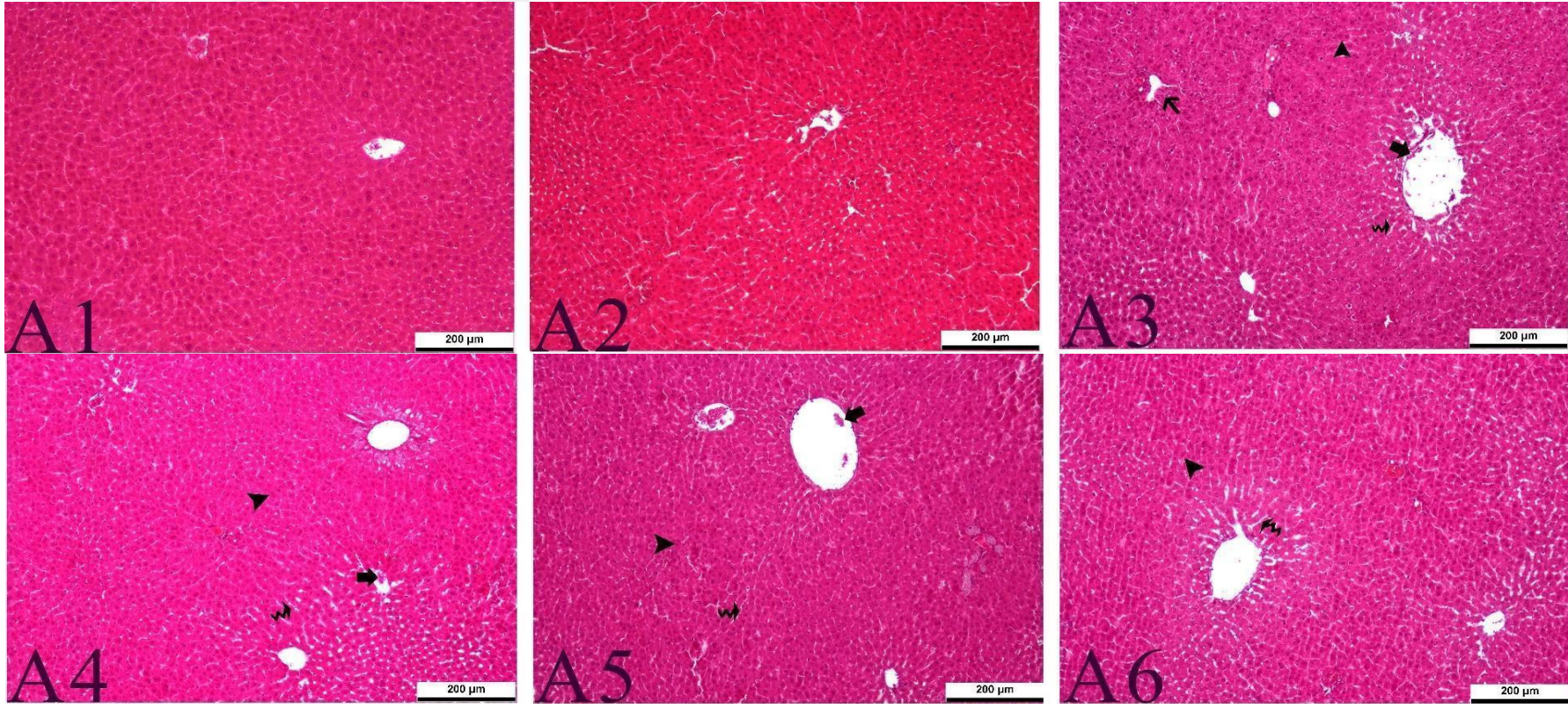
Gruplar	MDA (nmol/g doku)	GSH (nmol/g doku)	GPx (U/mg)	SOD (U/μg protein)	CAT (k/μg protein)
Kontrol	4,46±0,23 ^c	40,59±1,2 ^a	257,82±5,78 ^a	3,25±0,16 ^f	1,84±0,18 ^e
TAM	7,09±0,45 ^a	22,88±2,08 ^e	152,37±8,59 ^d	5,6±0,36 ^a	2,98±0,19 ^a
KRO	4,9±0,43 ^{bc}	42,33±1,7 ^a	249,87±14,83 ^a	3,73±0,1 ^e	2,07±0,16 ^d
TAM + 12,5 mg/kg KRO	7,18±0,42 ^a	25,81±1,49 ^d	187,29±10,71 ^c	5,15±0,27 ^b	2,85±0,08 ^{ab}
TAM + 25 mg/kg KRO	6,97±0,36 ^a	27,92±0,66 ^c	196,65±8,36 ^c	4,81±0,22 ^c	2,69±0,12 ^b
TAM + 50 mg/kg KRO	5,39±0,58 ^b	34,66±1,43 ^b	219,03±6 ^b	4,11±0,22 ^d	2,25±0,08 ^c

Değerler, ortalama ± (SD) şeklinde belirtilmiştir; n:6, a,b,c,d,e,f Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade eder ($P < 0,05$), Kontrol: Kontrol grubu, TAM: Tamoksifen grubu, KRO: Krosin grubu

3.4. Histopatolojik Bulgular

Çalışmanın bu aşamasında, grupların karaciğerleri mikroskopik olarak histopatolojik incelemelere ve değerlendirmelere tabi tutuldu. Kontrol grubuna (Şekil 3.1. A1) ait karaciğer doku kesitlerinin histolojik olarak normal yapıya sahip olduğu gözlemlendi. Karaciğer lobül yapısında yer alan vena centralis, hepatosit kordonları ve bu kordonlar arasındaki sinüzoid yapılar ile portal alanların normal olduğu görüldü. KRO grubuna (Şekil 3.1. A2) ait karaciğer kesitleri de kontrol grubu ile benzer histolojik görünüme sahipti. Bu grupta da klasik lobül yapısı, portal alanlar histolojik olarak yapısını korumakta ve kontrol grubunda görüldüğü gibi dokuların normal olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1.).

Yapılan histopatolojik incelemelerde karaciğer dokusu hasarı hematoksil-e-eozin boyama ile saptandı. Değişikliklerin meydana geldiği kısımlar ok işaretleri ile gösterildi ve bunlar sırası ile; dolaşım bozukluğu görülerek Vena centralisin olduğu bölgede hiperemi (Kalın ok) meydana geldiği, pericentral bölgede MNH (mononükleer hücre) infiltrasyon alanlarının (İnce ok) meydana geldiği, karaciğerin vasküler yapısını bozarak sinüzoidal dilatasyon alanlarının (Kıvrımlı ok) meydana geldiği, periportal alanlarda çift çekirdekli hepatositlerin (Ok başı) oluştuğu görüldü. TAM ile birlikte belirli dozlarda (12,5,25,50) KRO uygulanması, karaciğer dokularındaki hasar düzeyini sadece TAM verilen gruba kıyasla belirgin şekilde azalttığı görüldü. Tüm bu değişiklik göz önünde bulundurulduğunda kontrol grubuna kıyasla sadece TAM verilen gruba ait karaciğer doku kesitlerinin bazı bölgelerinde lobül yapısında bozulmalar olduğu, Vena centraliste ve hepatositlerde dağılmalar olduğu, buna bağlı olarak sinüzoid yapılanmasında da bozulmalar olduğu, bazı hepatosit hücrelerinin daha eozinofilik boyandığı belirlendi. Yoğun eozinofili gösteren hepatosit hücre çekirdeklerinin sağlıklı hepatosit hücre çekirdeklerine kıyasla daha koyu boyandığı görüldü. TAM ile birlikte 12,5 mg/kg ve 25 mg/kg KRO verilen gruplara ait karaciğer doku kesitlerinde ise lobül yapılarının sadece TAM verilen gruba kıyasla daha düzenli olduğu, pericentral bölgedeki infiltrasyon alanlarının ortadan kalktığı görüldü. Ayrıca bu gruplarda yoğun eozinofili gösteren hücrelerde de azalma olduğu belirlendi. Kontrol grubu ve sadece KRO verilen grup ile kıyaslandığında ise sinüzoid alanlarında, vena centralislerde ve portal alandaki hepatositlerde bozulmaların halen devam ettiği fakat TAM grubuna kıyasla daha düzenli bir yapıda olduğu görüldü. TAM ile birlikte 50 mg/kg KRO verilen grubun karaciğer doku kesitinde ise sadece sinüzoidal alanlarda ve periportal alanlardaki hepatositlerde bozulmaların devam ettiği fakat 12,5 mg/kg ve 25 mg/kg KRO verilen gruplara kıyasla yüksek oranda düzgün olduğu görüldü. Ayrıca çizelge 3.4'te dokulardaki histopatolojik incelemenin istatistiksel değerlendirmesi gösterildi.



Şekil 3.1::Histopatolojik Bulgular (Dokular H&E ile boyandı. Kontrol grubu (A1), KRO grubu (A2), TAM grubu (A3), TAM + 12,5 mg/kg KRO grubu (A4), TAM + 25 mg/kg KRO grubu (A5), TAM + 50 mg/kg KRO grubu (A6), Kalın ok: V. Centralislerde Hiperemi, İnce ok: Pericentral bölgede MNH infiltrasyonu alanları, Kıvrımlı ok: Sinüzoidal dilatasyon alanları, Ok Başı: Periportal alanlarda çift çekirdekli hepatositler)

Çizelge 3.4: Histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirmesi

Histopatolojik Bulgu	Kontrol	KRO	TAM	TAM + 12,5 mg/kg KRO	TAM + 25 mg/kg KRO	TAM + 50 mg/kg KRO	P değeri
Vena Centralislerde Hiperemi	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	1,56 ± 0,4 ^a	0,8 ± 1,23 ^a	0,7 ± 0,76 ^b	0,23 ± 0,23 ^b	0,002
Pericentral Alanlarda MNH İnfiltrasyon Alanları	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	2,73 ± 0,81 ^a	1,26 ± 1,07 ^b	0,23 ± 0,57 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,000
Periportal Alanlarda Çift Çekirdekli Hepatosit Oluşumları	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	2,4 ± 0,00 ^a	0,8 ± 1,23 ^b	0,63 ± 1,03 ^b	0,4 ± 0,97 ^b	0,000
Sinuzoidal Dilatasyon Alanları	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	2,23 ± 0,4 ^a	0,93 ± 1,01 ^b	0,86 ± 1,23 ^b	0,8 ± 0,72 ^b	0,000

Değerler, ortalama ± (SD) şeklinde belirtilmiştir; n:6 ; a,b,c Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade eder (P<0,05). Kontrol: Kontrol grubu, TAM: Tamoksifen grubu, KRO: Krosin grubu

4. TARTIŞMA

Kullanımı için 1977’de ABD tarafından onay verilen TAM, 10 ile 20 mg tabletler şeklinde ve nolvadex, tamone gibi çeşitli ticari isimler halinde bulunmaktadır. Kemik, beyin ve karaciğerde agonist etkisi bulunurken meme dokusunda antagonist etkiye sahiptir. Meme kanseri tedavisinde ilk sırada tercih edilirken, tedavilerde uygun görülen doz aralığı 20-40 mg’dır (Anonim, 2020). TAM’ın maruz bırakıldığı hücrelerde mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağında hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) ve hücre düzenlenmesinden sorumlu Scr ‘nin fokal adezyon kinaz (FAK)’ı fosforile ederek hücre göçüne neden olduğu tespit edilmiştir. TAM sadece MAPK yolaklarını değil aynı zamanda insülün benzeri büyüme faktörü 1 (IGF 1) yolaklarında da artışa neden olduğu belirlenmiştir. TAM protein ve DNA eklentileri ile DNA da hasar meydana getirebilir, aynı zamanda TAM verildikçe hepato karsinomlarda p53 mutasyonları meydana getirmektedir (Hu vd., 2015). TAM’ın, ER transkripsiyonunun etkinliğini engelleyerek kanserli hücrelerin büyümesinin önüne geçtiğide bilinmektedir (Abdel-Hafız, 2017). TAM’ın fazI tepkimeleri sonucu aktif metabolitlerine ayrılmasından sorumlu enzim sitokrom P4502D6 (CYP2D6), TAM’ın tedavilerde ne derece etkili olacağını da belirlemektedir (Baskın ve Calıbası, 2011). TAM’ın aynı zamanda sfingolipid metabolizmasını ve asit seramid enzimi ile seramid hidrolizini inhibe ettiği böylece seramid yıkımını yavaşlatıp sfingozin 1-fosfat oluşumunu baskıladığı tespit edilmiştir (Morad ve Cabot, 2015). Hormonal tedavilerde genelde tercih edilen TAM vücut tarafından oldukça kabul görürken, bir yandan da karaciğer de yan tesir oluşturarak karaciğere hasar vermektedir (Pan vd., 2016; Zhou vd., 2019). Bazı ilaçlar aktif metabolitlerine dönüşebilmeleri için karaciğerde faz1 faz2 tepkimelerine girerek biyotransformasyon diye adlandırılan bir süreçten geçmeleri gerekir. Sitokrom P450 faz 1 tepkimelerinde en değerli enzim grupları arasında yer alırken karaciğerde santral ven ve çevresinde yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Karaciğere hasar veren mekanizmalardan biri de ilacın biyotransformasyonu ile aktif hale gelen ara metabolitlerin P450 enzimlerine bağlanıp antijen gibi algılanan “adduct” diye adlandırılan bileşik oluşturmalarıdır. Bu bileşiklerin hepatosit üst tabalarına taşınması ile antikor oluşumu ve ardından karaciğer hasarı gerçekleşir (Arıcı, 2008). Pan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TAM’ın yağ asidi beta-oksidasyonu

inhibisyonu ile de novo yağ asidi sentezine neden olarak karaciğer yağlanması sebeptir olduğu, alınan açlık kan testi sonuçlarına göre de yüksek LFT, trigliserit, LDL oranlarının TAM grubunda daha yüksek çıktığını tespit etmişlerdir (Pan vd., 2016). Karaciğere hasar veren mekanizmalardan bir diğeri ise yağ asidi inhibisyonu sürecidir. Bu inhibasyon ile karaciğerde mitokondriyal DNA etkilenecek mitokondriyal disfonksiyonda hasar meydana geldiğinden serbest yağ asitleri metabolizması durarak serbest radikal ve reaktif oksijen birikimi sonrası mitokondriyal DNA tahribatı, laktik asit birikimi olduğu gözlenmiştir (Arıcı, 2008). Kupffer hücrelerinin aktifleşmesine sebep olan zarar görmüş hepatositler reaktif oksijen türlerinin üretimine sebep olur (Uçar ve Göktaş, 2018). Her türlü bağışıklık olayları ile zararlı maddeleri yok eden, gerektiği takdirde enzim üreterek bedenin savunma sistemine katkıda bulunan ve birçok yapım yıkım olaylarının gerçekleştiren bir organ olan karaciğer (Altınbaşak, 2019; Yılmaz, 2010; Kurtoğlu, 2017) aynı zamanda sentez ve salgılama görevleri sırasında önemli derecede kan akımı sağlamaktadır. Bu yapısından dolayı yüksek oranda oksijene ihtiyaç duyar ve bu yüzden hasarlanmalara karşı oldukça duyarlı hale gelir (Uzunoglu, 2018).

Biyokimya parametrelerinden AST ve ALT karaciğer hasarı tespitinde oldukça sık bakılan parametrelerden olup, hasar düzeyine bağlı olarak salınım düzeyi artmaktadır (Koç, 2020). Aynı zamanda hepatositlerin yıkıma uğraması sonucunda da artış gösteren enzimlerdendir (Kurtoğlu, 2017). Koç'un 2020 de yaptığı çalışmada metanol ile sıçanlar üzerinde oluşturduğu karaciğer hasarında AST-ALT düzeylerinde artış olduğunu tespit etmiştir (Koç, 2020). Betto ve arkadaşları bir çalışmalarında parasetamol ile sıçan karaciğerinde toksik etki oluşturmuşlar ve yaptıkları çalışma sonucunda toksik etki oluşan sıçan karaciğerinde kontrol grubu karaciğerine göre AST-ALT düzeylerinde belirgin artış olduğunu görmüşlerdir (Betto vd., 2012). Zhou ve arkadaşlarının 2019 yılında osthole'un farelerde TAM kaynaklı akut karaciğer hasarı üzerindeki terapötik etkilerini araştırırken, TAM'ın fosforilasyon döngüsünü etkileyerek elektron alışverişinde bozulmalara yol açtığı, mitokondriyal membrana zarar verdiği böylece mitokondriyal disfonksiyonda hasar meydana gelerek ROS ve AST-ALT seviyelerinde artışa sebep olduğunu görmüşlerdir (Zhou vd., 2019). Polat'ın ise 2013'te yapmış olduğu çalışmada sıçanlarda ilaç kaynaklı zehirlenme ile karaciğer hasarı oluşturmuşlar

ve araştırma sonucunda toksikasyon ile oluşan karaciğerin hasar durumuna göre AST-ALT değerlerinde artış olduğunu saptamıştır (Polat, 2013). Bulut'un yapmış olduğu çalışmada ratlarda oluşturduğu karaciğer hasarı sonrası AST, ALT, ALP ve MDA değerlerinde artış olduğunu bulmuştur (Bulut, 2013). Moreira ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada TAM ile tedavi edilmiş yumurtalıkları alınmış dişi sıçanların karaciğer mitokondriyal fonksiyonuna etkilerini araştırmışlar ve TAM'ın yüksek miktarda karaciğerde metabolize olduğunu, mitokondriyal solunum fonksiyonlarını etkileyerek oksidatif fosforilasyon sistemini bozduğunu, mitokondrinin hasar görmesi ile beraber Ca^{2+} iyonlarının biriktiğini, ROS üretimine neden olduğunu, ALP ve AST değerlerinin kontrol grubuna göre arttığını gözlemlemişlerdir (Moreira vd., 2007). Liu ve arkadaşlarının 2006 da yapmış oldukları çalışmada TAM ile tedavi edilen meme kanserli hastalarda TAM'ın karaciğer yağlanmasına sebep olduğu, yağlanan karaciğerin hepatik hasarlanmaya yol açtığı tüm bunlarında AST ve ALT düzeylerindeki değişikliklere neden olduğunu ve 115 hastada AST, ALT veya her ikisinde de yükselmeler olduğunu gözlemlemişlerdir (Liu vd., 2006). Yapılan bu çalışma ile literatürler arasında benzer sonuçlar elde edildi. Ratlarda TAM ile oluşturulan karaciğer hasarı sonrası biyokimya parametrelerini değerlendirdiğimizde, hasar tespitinde en sık bakılan AST-ALT düzeylerinde belirgin artışın meydana geldiği ve bu artışın KRO dozları ile belirgin şekilde düştüğünü gözlemledik. Serbest radikallerin doymamış yağ asitlerine etki etmesi sonucunda lipid peroksidasyon (LPO) gerçekleşir. LPO'nun son ürünü olan MDA ise oksidatif strese maruz kaldıkça artış gösterir. Antioksidan özellikte olup ve hücrel savunmada görevli olan GSH, sentezinde azalma olduğu takdirde bu azalmaya bağlı olarak LPO'da artış görülür (Polat, 2013). Aynı zamanda LPO'un meydana getirdiği toksik maddeleri uzaklaştıracak güçlü bir antioksidan olan GSH, hücreleri serbest radikallerin verdiği hasardan koruyarak toksik maddeleri ortadan kaldırmakla sorumludur (Koç, 2020). Endojen kaynaklı antioksidanlardan biri olan GSH-Px enzimi hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyup LPO oluşumunu ve ilerlemesini inhibe eder. Bu fonksiyonunu yapısındaki GSH elektron kaynağı olarak kullanarak hidrojen peroksiti indirgemesi ile yerine getirir (Altınbaşak, 2019). İbrahim ve arkadaşları 2014'te L-karnitin (L-CAR), TAM kaynaklı toksisite ve antitümör aktivitedeki koruyucu etkisini araştırmışlar ve araştırma sonucunda TAM'ın aktif metabolitlerinin hücredeki yağ tabakalarında değişikliklere neden olarak sitoplazmik

enzimlerin zardan geçişini kolaylaştırıp kanda aminotransferaz artışına yol açtığı, yağ asidi oksidasyonunda sorunlara yol açarak mitokondriyal fonksiyonlarını bozduğu, elektron alışverişini inhibe ederek mitokondriyal oksidatif hasarına yol açtığı böylece karaciğerin hasara uğradığını, TAM verilen grupların serum lipid düzeylerinde, karaciğer enzimlerinde ve bilirubin seviyesinde önemli artışın olduğunu, karaciğer ve uterus dokularının SOD aktivitesinde önemli bir azalma ve GSH içeriğinde önemli bir azalma ile birlikte LPO seviyesinde önemli bir artış olduğunu tespit etmişlerdir (İbrahim vd., 2014). Suddek 2014 yılında TAM'ın sıçanlarda hem antitümör aktivitesi hem de karaciğer hasarı üzerindeki etkisini araştırmış ve bu araştırma sonucunda TAM'ın mitokondriyal solunum zincirini inhibe edip yağ asidi oksidasyonunda sorunlara yol açarak ROS üretimine neden olduğu, sıçanlara TAM uygulaması ile ALT ve AST, ALP, LDH, TB ve TNF- α düzeylerinde artışa sebep olduğu, bunlarla birlikte SOD, GSH ve TP seviyelerinde ise önemli bir düşüşe neden olduğunu tespit etmiştir (Suddek, 2014). Albukhari ve arkadaşları dişi sıçanlarda TAM kaynaklı hepatotoksisiteye karşı kafeik asit fenetil ester in (CAPE) koruyucu etkilerini araştırmışlar ve TAM'ın metabolize olduğu sırasında açığa çıkan oksidatif tepkimelere bağlı olarak karaciğerde hasar meydana geldiği, mitokondriyal elektron taşıma zincirini bloke ederek mitokondriyal fonksiyonları bozduğu ve oksidatif strese yol açtığı; sonuç olarak 10 gün boyunca 45 mg/gün dozunda TAM verdikleri grubun AST-ALT-ALP değerlerinin yükseldiğini, GSH değerlerinin tükendiğini, LPO, GPx, glutatyon redüktaz (GR), SOD, CAT değerlerini ise inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Albukhari vd., 2009). Polatın yapmış olduğu çalışmada toksisite oluşturulan sıçanlarda karaciğerin hasarı sonucu MDA düzeyinde artış olduğunu buna paralel olarak GSH değerlerinde azalma olduğunu ve böylece iki parametre arasında ters bağlantı gözlemlemiştir (Polat, 2013). Cabre ve ark. 2020'de yaptığı çalışmada sıçanlarda oluşturulan karaciğer fibrozu deneyinde karaciğer hasarı sonucu lipid peroksidasyonun arttığı GSH düzeyinin azaldığı ve böylece bu iki parametreler arasında ters bir ilişki olduğunu saptamışlardı (Cabr  vd., 2000). El-beshbishy'in 2005 de yaptığı çalışmada TAM'ın karaciğere verdiği hasarı araştırmış ve bu çalışmada sıçanlara 7 gün boyunca ip yolla (45 mg/kg) TAM verilerek karaciğer hasarı oluşturulmuş ve bu hasar sonucunda TAM verilen grubun antioksidan enzimlerinden GSH, GSH-Px, SOD ve CAT düzeylerinde düşüşler gözlemlemiştir (El-Beshbishy, 2005).

Birçok rahatsızlıkların iyileştirilmesinde kullanılan safran bitkisi antioksidan özelliği ile farmakolojik etki göstermektedir (Aung vd., 2007; Sumaiya vd., 2020). Safranalin GABA benzodiazepine reseptörü etkili olduğu, KRO'nun tümör nekroz faktörü alfa (TNF-alfa) kaynaklı hücre ölümlerini ve mRNA üzerindeki etkilerini inhibe ettiği, PC-12 hücrelerini baskıladığı, nötral sfingomiyelinaz (nSMAZ) aktivitesini sınırlandırdığı, seramid üretimini ve MAPK yolağı ailesinden olan c-jun kinase (JNK) fosforilasyonunu önlediği görülmüştür, aynı zamanda KRO nun hücre zarından G-protein bağlantılı reseptör kinaz 2 (GRK2) geçişini kestiği, ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK1/2) fosforilasyonu ve kortikal mikro vesellerde matris metalloproteinaz 9 (MMP-9) ekspresyonunu düşürdüğünü tespit etmişlerdir. KRO tüm bunlarla beraber antioksidan enzim kalitesini sağlamlaştırarak mitokondriyal hasarı önlediği anlaşılmıştır (Bathaie ve Mousavi, 2010). Altınöz ve arkadaşlarının 2016 da yaptığı çalışmada, sıçanlarındaki antioksidan enzimlerden SOD, CAT, GPx'in mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Diyabet oluşturulan sıçanlarda SOD, CAT, GPx'in mRNA ekspresyonlarında artış meydana geldiğini, aynı ratlara KRO verildikten sonra bu enzimlerde bir düşüş olduğunu ve böylece KRO'nun oksidatif stresi düzenlediğini ortaya koymuşlardır (Altınöz vd., 2016). Mard ve arkadaşları 2017'de sıçanlarda hepatik iskemi-reperfüzyon (IR) hasarı üzerinde KRO ve çinko sülfatın ($ZnSO_4$) ile ayrı ve kombine ön tedavisinin, karaciğer fonksiyon testleri, Nrf2 ve p53 protein ekspresyonu ve sonrasındaki IR kaynaklı karaciğer hasarında meydana gelen histopatolojik değişiklikler üzerindeki karşılaştırmalı koruyucu etkilerini araştırmışlar ve KRO, $ZnSO_4$ ve bunların kombinasyonunun antioksidan GPx-SOD-CAT aktivitelerini artırdığı, karaciğer enzimlerinin AST-ALT-ALP-TB serum düzeylerini düşürdüğü ve histopatolojik değişiklikleri düzelterek karaciğeri oluşturulan hasara karşı koruduğunu göstermişlerdir (Mard vd., 2017). Özkeçeci ve arkadaşları 2016'da infrarenal aort klempleme (IRAC) modelinde indüklenen karaciğer IR hasarı üzerinde KRO ve safranalin koruyucu etkilerini araştırmışlar, biyokimya kan örneklerinden AST-ALT seviyeleri IR grubunda yüksek bulunur iken KRO ve safranalin uygulanan grubun bu değerlerinde anlamlı bir düşüş gözlenerek KRO ve safranalin karaciğer hasarı üzerinde koruyucu etkileri olduğunu göstermişlerdir (Özkeçeci vd., 2016). Salem ve arkadaşları 2015'te Balb/c cinsi farelerinin karaciğer ve böbreklerinde ilaç (zearalenon) kaynaklı oksidatif strese karşı KRO'nun koruyucu etkisi araştırmışlar ve verilen ilacın

MDA, CAT, SOD aktivitelerinde artış meydana getirerek oksidatif stresi tetiklediğini, farklı dozlarda KRO ile uygulanması birlikte bu seviyelerde düşüşler gözlenerek oksidatif stresi azalttığını, böylece ilaç kaynaklı toksisiteye karşı korumada KRO nun etkili olduğu sonucuna varmışlardır (Ben Salem vd., 2015). El-Beshbishy ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları deneyde Berilyum Klorür'ün (BeCl_2) toksisitesine karşı KRO'nun koruyucu etkilerini araştırmışlar ve toksik oluşturulan grubun MDA seviyesinde artış, CAT ve SOD değerlerinde azalma olduğu görülürken, KRO uygulanması ile MDA seviyesinde azalma CAT ve SOD düzeylerinde normale yakın bir artış olduğu görülmüş ve sonuç olarak KRO uygulamasının, antioksidan genlerin mRNA ekspresyonunun başlatılmasıyla birlikte oluşturulan oksidatif stresi azalttığını tespit etmişlerdir (El-Beshbishy vd., 2012). KRO'nun kontrolsüz hiperglisemi ile gelişen karaciğer dokusunun antioksidan savunması üzerindeki etkisini araştıran bir grup araştırmacı, deneklerden doku örnekleri alarak MDA, GSH, CAT, SOD enzimlerini incelemiş, bu incelemelere göre kontrolsüz diyabetin SOD ve CAT enzimlerini azalttığı, MDA üretimini artırarak antioksidan sistemi düşürdüğü, KRO uygulaması ile diyabetik hayvanların karaciğer dokularında SOD ve CAT enzim seviyelerinin arttığını böylece antioksidan sistemin kuvvetlendiğini, MDA üretimini azaltarak oksidatif stresin vermiş olduğu hasarın azaldığını bulmuşlardır (Yaribeygi vd., 2018). Yapılan bu çalışma ile; sıçanlarda TAM ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı KRO'nun koruyucu etkilerini araştırmayı amaçladık ve çalışmanın literatürler ile benzer sonuçlar gösterdiği görüldü. TAM'ın karaciğere verdiği hasar üzerine karaciğer enzim aktivitelerinden SOD, CAT, MDA seviyelerinde artma görülürken GPx ve GSH değerleri azalırma olduğu, böylece karaciğer dokularında hasarlar meydana gelerek literatürler ile benzer etkilerinin olduğunu ve karaciğer üzerinde hasar bıraktığı bu çalışma ile tespit edildi. Aynı zamanda tedaviye ek olarak TAM ile beraber kombine (12,5-25-50 mg/kg) KRO uygulaması ile bu olumsuzlukların tersine çevrildiği belirlendi. Elde ettiğimiz verilerin literatürler ile benzer olduğu karaciğer enzimleri, dokuları ve oksidatif stress üzerinde olumlu etkiler yaparak normale yakın dönüşümler sağladığını böylece TAM'ın karaciğer üzerindeki toksik etkilerine karşı KRO'nun koruyucu etkisinin olduğu çalışmamız ile tespit edildi.

TAM uygulamasını takiben karaciğer dokularında histopatolojik değişikliklerin meydana gelerek hepatositlerde sorunlara yol açtığı, portal vende dilatasyonların meydana geldiği, lenfatik infiltrasyon alanlarının görüldüğü, hepatosit ve sinüzoidlerde tıkanıklıkların ve ödemlerin olduğu rapor edilmiştir (Albukhari vd., 2009). Mard ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hasar oluşturulan karaciğer dokularında dilatasyonlar, apoptotik hücreler, konjesyon varlığı görülürken kombine KRO tedavisi ile bu histopatolojik sorunlarda hafiften normale doğru düzelmeler olduğu görülmüştür (Mard vd., 2017). Velioğlu'nun yaptığı çalışmada oluşturduğu karaciğer hasarı sonucu karaciğer dokusunda dejenerasyon, konjesyon, inflamatuvar infiltrasyon alanlarının varlığına rastlarken KRO tedavisi ile histopatolojik sorunların minimuma indiği görülmüştür (Velioğlu, 2018). Yaptığı çalışma ile oluşturduğu karaciğer hasarı sonucunda hepatositlerde sinüzoidal dilate alanlarının, nekrotik alanların olduğu, hepatositlerde küçülme görüldüğü, KRO tedavisi ile bu histopatolojik hasarlanmada azalmalar olduğu görülmüştür (Özkeçeci vd., 2016). Yaptığımız bu çalışmada TAM uygulaması ile sinüzoid alanlarında dilatasyonlar, venlerde, portal alanlarda, hepatositlerde bozulmalar meydana geldiğini, sadece TAM verilen gruba ait karaciğer doku kesitlerinin bazı bölgelerinde lobül yapısında bozulmalar olduğu, Vena centraliste ve hepatositlerde dağılmalar olduğu, buna bağlı olarak sinüzoid yapılanmasında bozulmalar olduğu, TAM'ın artan dozlarda KRO ile kombine verilmesi ile gruplara ait karaciğer doku kesitlerinde ise lobül yapılarının sadece TAM verilen gruba kıyasla daha düzenli olduğu, pericentral bölgedeki infiltrasyon alanlarının ortadan kalktığı böylece TAM'ın karaciğer üzerindeki histopatolojik etkilerine karşı KRO'nun koruyucu etkisinin olduğunu çalışmamız ile tespit ettik.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

TAM ile oluşturulan karaciğer hasarını KRO ile tedavi ederken biyokimya parametrelerinden ALT, AST, ALP, TP değerlerinde anlamlı azalma veya artışlar gözlemledik. Sonuç olarak, KRO'nun karaciğer hasarı üzerinde etkisinin olduğunu net bir şekilde gözlemledik.

Çalışmamızda kontrol grubu dışında TAM verilen gruplarda oksidatif hasar oluştuğunu, MDA değerlerinin bunun bir göstergesi olduğunu ve doku örneklerinin değerlendirilmesi sonucunda da hasar yaptığını tespit ettik. Aynı zamanda TAM verilen gruplara artan dozlarda KRO uygulamasının hasarlı doku üzerinde olumlu etki gösterdiğini ve bu seviyeleri kontrol grubu düzeyine doğru düşürdüğünü tespit ettik.

Çalışmamızda ratlardan alınan kan doku örneklerinden elde ettiğimiz MDA, SOD ve CAT seviyelerinin kontrol grubuna göre TAM uygulanan grupta anlamlı olarak arttığını, TAM ile beraber artan dozlarda KRO uygulamasının artan MDA, SOD ve CAT seviyelerini kontrol grubuna doğru yaklaştırdığını tespit ettik.

Artan MDA seviyelerine paralel olarak TAM uygulanan grupta kontrol grubuna göre GSH ve GPx seviyelerinde anlamlı bir düşüş olduğunu, bu düşüşün artan KRO uygulaması ile birlikte kontrol grubu düzeyine ulaşarak arttığını tespit ettik. Böylece KRO'nun karaciğer dokusunda oksidan parametre olarak bilinen MDA'nın artışını önlediği ve antioksidan olan GSH'nın düzeylerini arttırdığını gördük.

Çalışmamızda TAM verilen grubun doku örneğini incelediğimizde, doku üzerindeki hepatositlerde, sinüzoidlerde, portal ve hepatik kısımlarında hasarlanmalar meydana gelerek lezyonlar oluştuğunu tespit ettik. TAM uygulaması ile birlikte KRO uygulamasının lezyonları hafiflettiği, artan dozlarda verildiğinde ise bu hasarların gittikçe küçüldüğünü, kontrol grubu doku örneğine yakın onarımlar olduğunu tespit ettik.

Yapmış olduğumuz çalışmada TAM'in karaciğerde hasar oluşturduğunu hem biyokimyasal hemde histopatolojik olarak tespit ettik. Kontrol grubu dışında TAM verilen sıçanlarda, TAM'a bağlı karaciğerde hasar olduğu, biyokimya serum değerlerinin bunun bir göstergesi olduğu ve karaciğer doku örneklerinin histopatolojik değerlendirilmesi sonucunda TAM'nin karaciğerde hasar oluşturduğu görsel olarak doğruladık. Antioksidan özelliği olarak bilinen KRO'nun de hem biyokimyasal serumlar üzerinde hemde hasarlı dokular üzerinde histolojik olarak iyileşmelere katkı sağladığını gördük.

Bütün bu değerlendirmeler sonucunda KRO'nun karaciğer hasarına karşı önleyici bir madde olarak kullanılabileceğini bununla beraber TAM kaynaklı karaciğer hasarının gelişim sürecinde deneyler ile KRO'nun koruyucu etkisinin olduğu sonucuna varıldı.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Hafiz, H. (2017). Epigenetic mechanisms of tamoxifen resistance in luminal breast cancer. *Diseases*, 5(3), 16. <https://doi.org/10.3390/DISEASES5030016>
- Abe, O., Abe, R., Enomoto, K., Kikuchi, K., Koyama, H., Masuda, H., Nomura, Y., Sakai, K., Sugimachi, K., Tominaga, T., Uchino, J., Yoshida, M., Haybittle, J. L., Davies, C., Harvey, V. J., Holdaway, T. M., Kay, R. G., Mason, B. H., Forbes, J. F., Caffier, H. (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet*, 365(9472), 1687–1717. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66544-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66544-0)
- Adam, H. K., Douglas, E. J., & Kemp, J. v. (1979). The metabolism of tamoxifen in humans. *Biochemical Pharmacology*, 28(1), 145–147. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(79\)90283-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(79)90283-1)
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Albukhari, A. A., Gashlan, H. M., El-Beshbishy, H. A., Nagy, A. A., & Abdel-Naim, A. B. (2009). Caffeic acid phenethyl ester protects against tamoxifen induced hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1689–1695. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.021>
- Altınbaşak, M. (2019). Karbon Tetraklorür (Ccl4) ile Deneysel Oksidatif Stres ve Karaciğer Harabiyeti Oluşturulan Sıçanlarda Alıç (Crataegus Orientalis) Bitkisinin Meyve Liyofilize Ekstraktının Karaciğer Koruyucu ve Antioksidan Rolünün Araştırılması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 144s, Van.
- Altınöz, E., Ekici, C., Özyazgan, B., ve Çiğremiş, Y. (2016). Diyabetik ratlarda safranin aktif içeriği olan krosin tedavisinin beyindeki antioksidan enzimlerin mRNA seviyeleri üzerine etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 41(2), 112–117. <https://doi.org/10.1515/tjb-2016-0018>
- Arıcı, S. (2008). Toxic hepatitis. *Pamukkale Medical Journal*, 1(2), 113–119.
- Asmaz E.D. (2017). Tamoksifenin Fare Ovaryumunda IGF-I Sinyal Yolu Üzerine Etkisi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 83s, Bursa.
- Aung, H. H., Wang, C. Z., Ni, M., Fishbein, A., Mehendale, S. R., Xie, J. T., Shoyama, C. Y., & Yuan, C. S. (2007). Crocin from *Crocus sativus* possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. *Experimental Oncology*, 29(3).
- Aydın, M. (2011). Metallerle Etkinleştirilen Tere Bitkisinde (*Lepidium Sativum*) Bazı Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 74s, Sakarya.
- Baskin, Y., Calibasi, G. (2011). Pharmacogenetic applications and pharmacoeconomics in cancer patients. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 68(3), 152–0. <https://doi.org/10.5505/turkhijyen.2011.77598>
- Bathaie, S. Z., Mousavi, S. Z. (2010). New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(8), 761–786. <https://doi.org/10.1080/10408390902773003>

- Ben Salem, I., Boussabbeh, M., Helali, S., Abid-Essefi, S., Bacha, H. (2015). Protective effect of Crocin against zearalenone-induced oxidative stress in liver and kidney of Balb/c mice. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(23), 19069–19076. <https://doi.org/10.1007/S11356-015-5086-2>
- Betto, M. R. B., Lazarotto, L. F., Watanabe, T. T. N., Driemeier, D., Leite, C. E., Campos, M. M. (2012). Effects of treatment with enalapril on hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (2012) 385(9):933–943, 933–943. <https://doi.org/10.1007/s00210-012-0774-7>
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B. M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882–888.
- Bulut, U. (2013). Deneysel Künt Karaciğer Travması Oluşturulan Ratlarda Abound Beslenme Solüsyonunun Karaciğer Doku İyileşmesi Üzerine Etkileri, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 85s, Elâzığ.
- Cabré, M., Camps, J., Paternáin, J., Ferré, N., Joven, J. (2000). Time-course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 27(9), 694–699. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1681.2000.03322.X>
- Clemons, M., Danson, S., Howell, A. (2002). Tamoxifen ('Nolvadex'): A review. *Cancer Treatment Reviews*, 28(4), 165–180. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(02\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(02)00036-1)
- Cole, M. P., Jones, C. T. A., Todd, I. D. H. (1971). A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer and early clinical appraisal of ICI46474. *British Journal of Cancer*, 25(2), 270–275. <https://doi.org/10.1038/bjc.1971.33>
- Colle, D., Arantes, L. P., Gubert, P., da Luz, S. C. A., Athayde, M. L., Teixeira Rocha, J. B., Soares, F. A. A. (2012). Antioxidant properties of Taraxacum officinale leaf extract are involved in the protective effect against hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. *Journal of Medicinal Food*, 15(6), 549–556. <https://doi.org/10.1089/JMF.2011.0282>
- Coşgun, B. E. (2017). Deneysel Karbon Tetraklorür Toksisitesi Üzerine Krosinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması, Karabük Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 121s, Karabük.
- Desta, Z., Ward, B. A., Soukhova, N. v., Flockhart, D. A. (2004). Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: Prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(3), 1062–1075. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.065607>
- Drabkin, D. L., Austin, J. H. (1935). Spectrophotometric Studies: II. Preparations From Washed Blood Cells; Nitric Oxide Hemoglobin and Sulfhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 112(1), 51–65. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)74965-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)74965-X)
- Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186(C), 421–431. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-I)
- El-Beshbishy, H. A. (2005). Hepatoprotective effect of green tea (Camellia sinensis) extract against tamoxifen induced liver injury in rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(5), 563–570. <https://doi.org/https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.5.563>
- El-Beshbishy, H. A., Hassan, M. H., Aly, H. A. A., Doghish, A. S., Alghaithy, A. A. A. (2012). Crocin "saffron" protects against beryllium chloride toxicity in rats through diminution of oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 83, 47–54. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2012.06.003>

- El-Dessouki, A. M., el Fattah, M. A., Awad, A. S., Zaki, H. F. (2018). Zafirlukast and vincamine ameliorate tamoxifen-induced oxidative stress and inflammation: Role of the JNK/ERK pathway. *Life Sciences*, 202, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.002>
- El-Kharrag, R., Amin, A., Hisaindee, S., Greish, Y., Karam, S. M. (2017). Development of a therapeutic model of precancerous liver using crocin-coated magnetite nanoparticles. *International Journal of Oncology*, 50(1). <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3769>
- Elsherbiny, N. M., Eisa, N. H., El-Sherbiny, M., Said, E. (2020). Chemo-preventive effect of crocin against experimentally-induced hepatocarcinogenesis via regulation of apoptotic and Nrf2 signaling pathways. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103494>
- Genç, A. (2018). Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Ratlarda Sugammadexin Farklı Dozlarının Karaciğer Üzerine Etkisi, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 90s, Bolu.
- Giaccio, M. (2004). Crocetin from saffron: An active component of an ancient spice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(3), 155–172. <https://doi.org/10.1080/10408690490441433>
- Han, X., Liehr, J. G. (1992). Induction of covalent DNA adducts in rodents by Tamoxifen. *Cancer Research*, 52(5), 1360–1363.
- Hosseinzadeh, H., Jahanian, Z. (2010). Effect of Crocus sativus L. (saffron) stigma and its constituents, crocin and safranal, on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytotherapy Research*, 24(5). <https://doi.org/10.1002/ptr.3011>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>. (2020, August 20). *Tamoxifen*. National Library of Medicine. <https://www.niddk.nih.gov/>
- Hu, R., Hilakivi-Clarke, L., Clarke, R. (2015). Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). *Oncology Letters*, 9(4), 1495–1501. <https://doi.org/10.3892/OL.2015.2962>
- Hüz, M. (2017). Methotrexate ile Oluşturulan Karaciğer Hasarına Karşı Molsidominin Koruyucu ve Tedavi Edici Etkisinin Ratlarda Araştırılması, İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 70s, Malatya.
- İdilman, İ. (2011). Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalarında Yağlanma Miktarının Belirlenmesinde Karaciğer Biyopsisi ile MR ideal-quant Yöntemlerinin Karşılaştırılması, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 53s, Ankara.
- Ibrahim, A. B., Mansour, H. H., Shouman, S. A., Eissa, A. A., Abu El Nour, S. M. (2014). Modulatory effects of L-carnitine on tamoxifen toxicity and oncolytic activity: in vivo study. *Human & Experimental Toxicology*, 33(9), 968–979. <https://doi.org/10.1177/0960327113506237>
- Jensen, E. v., Block, G. E., Smith, S., Kyser, K., DeSombre, E. R. (1971). Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *National Cancer Institute Monograph*, 34.
- Jordan, V. C., Chem, C. (1983). Laboratory studies to develop general principles for the adjuvant treatment of breast cancer with antiestrogens: Problems and potential for future clinical applications. In *Breast Cancer Research and Treatment* (Vol. 3, Issue 1 Supplement, pp. 73–86). <https://doi.org/10.1007/BF01855131>
- Jordan, V. C., Fritz, N. F., Langan-Fahey, S., Thompson, M., Tormey, D. C. (1991). Alteration of endocrine parameters in premenopausal women with breast cancer during long-term adjuvant therapy with tamoxifen as the single agent. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(20), 1488–1491. <https://doi.org/10.1093/JNCI/83.20.1488>

- Kafkasli, A., Erdem, F., Müezzinoğlu, B., Akb ak, B., Burak, F., Aksoy, T., Birincioğlu, M., Biotech, M. G., Biotec, F. T. (1998). Side effects of tamoxifen in oophorectomized rats. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 45(2), 93–98. <https://doi.org/10.1159/000009933>
- Karimi, G., Taiebi, N., Hosseinzadeh, Shirzad, F. (2004). Evaluation of subacute toxicity of aqueous extract of *Crocus sativus* L. Stigma and petal in rats. *Journal of Medicinal Plants*, 3(12).
- Kianbakht, S., Mozaffari, K. (2009). Effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal, on prevention of indomethacin induced gastric ulcers in diabetic and nondiabetic rats. *Journal of Medicinal Plants*, 8(5).
- Koç, Y. (2020). Sıçanlarda Metanol ile İndüklenen Oksidatif Karaciğer Hasarına Adenozin Trifosfatın Etkisi, Binali Yıldırım Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 79s, Erzincan.
- Kodal, K. (2009). Deneysel Olarak Oluşturulmuş Meme Tümöründe Tamoksifenin Lipid ve Lipoproteinler  zerine Etkisinin İncelenmesi, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 57s, Edirne.
- Kök, M. İ. (2019). Tamoksifen Kullanan Meme Kanseri Tanılı Hastalardaki Hepatosteatozun NAFLD Fibrozis Skorlaması ve Fibrozis-4 (FIB-4) ile Retrospektif Değerlendirilmesi, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 98s, Bursa.
- Kumar, R., Singh, V., Devi, K., Sharma, M., Singh, M. K., Ahuja, P. S. (2009). State of art of saffron (*Crocussativus* L.) agronomy: A comprehensive review. *Food Reviews International*, 25(1), 44–85. <https://doi.org/10.1080/87559120802458503>
- Kurtoğlu, E. L. (2017). Karaciğer Fibrozu Esnasında Lipoksin A4’ n Karaciğer Hücre Rejenerasyonu ve İmmün Yanıt  zerine Etkisinin Araştırılması, İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 110s, Malatya.
- Liu, C.-L., Huang, J.K., Cheng, S.P., Chang, Y.C., Lee, J.J., Liu, T.-P. (2006). Fatty liver and transaminase changes with adjuvant tamoxifen therapy. *Anti-Cancer Drugs*, 17(6), 709–713. <https://doi.org/10.1097/01.CAD.0000215056.47695.92>
- L nning, P. E., Johannessen, D. C., Lien, E. A., Ekse, D., Fotsis, T., Adlercreutz, H. (1995). Influence of tamoxifen on sex hormones, gonadotropins and sex hormone binding globulin in postmenopausal breast cancer patients. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, cilt:52(sayı:5), 491–496. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(94\)00189-S](https://doi.org/10.1016/0960-0760(94)00189-S)
- Love, R., Barden, H., Masess, R., Chappell, R. (1993). Effect of tamoxifen on lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women after five years. *European Journal of Cancer*, 29. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(93\)91024-f](https://doi.org/10.1016/0959-8049(93)91024-f)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Luck H (1965) Catalase. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York, pp 885–894. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395630-9.50158-4>
- Mard, S. A., Akbari, G., Dianat, M., Mansouri, E. (2017). Protective effects of crocin and zinc sulfate on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: a comparative experimental model study. *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 96, 48–55. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.09.123>
- Morad, S. A. F., Cabot, M. C. (2015). Tamoxifen regulation of sphingolipid metabolismTherapeutic implications. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(9), 1134–1145. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2015.05.001>

- Moreira, P. I., Custódio, J. B. A., Nunes, E., Moreno, A., Seiça, R., Oliveira, C. R., Santos, M. S. (2007). Estradiol affects liver mitochondrial function in ovariectomized and tamoxifen-treated ovariectomized female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(1), 102–110. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2007.02.006>
- Mushtaq, A., Gul, Z., Mehfuza, H., Ameer, A., Dar, A., N., Dar, Z., A., (2014). Saffron (*Crocus sativus* L.) in the light of biotechnological approaches: A review. *Scientific Research and Essays*, 9(2), 13–18. <https://doi.org/10.5897/sre2013.5773>
- Nalbant, B. (2017). Canlı Vericili Karaciğer Nakli Öncesinde, Verici Adaylarının Karaciğer Hacmi ve Anatomik Yapılarının Bilgisayarlı Tomografi Verilerinden Yararlanılarak Elde Edilen 3 Boyutu Yazıcı Modeli ile Değerlendirilmesi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 80s, İzmir. https://doi.org/TEZ_KODU:DEU.HSI.MSc-2014970108
- Ochiai, T., Ohno, S., Soeda, S., Tanaka, H., Shoyama, Y., ve Shimano, H. (2004). Crocin prevents the death of rat pheochromocytoma (PC12) cells by its antioxidant effects stronger than those of α -tocopherol. *Neuroscience Letters*, 362(1), 61–64. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.02.067>
- Ochiai, T., Shimeno, H., Mishima, K. ichi, Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanaka, H., Shoyama, Y., Toda, A., Eyanagi, R., Soeda, S. (2007). Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1770(4), 578–584. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.11.012>
- Okat, Z., Toplayıcı, S., Kurt, E. (2018). The Importance Of Genetic Polymorphism Of CYP2D6 İn Breast Cancer Patients Treated With Tamoxifen: Tamoksifenle Tedavi Edilen Meme Kanseri Hastalarında CYP 2D6 Genetik Polimorfizminin Önemi. *Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*, cilt:6-sayı:2. www.kliniktipdergisi.com
- Özbek, G. (2017). Premenopozal Meme Kanseri Kadınlarında Adjuvan Tamoksifen ile Tamoksifen ve GNRH Analoglarının Birlikte Kullanımının Tedavi Etkinliği Açısından Kıyaslanması, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 75s, Konya.
- Özguven, M. (1987). Karaciğer Hastalığı Yönünden Normallerle Kronik Karaciğer Parenkimal Hastalıklarında Kantitatif Dinamik Karaciğer Perfüzyon Sintigrafisi, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 66s, Diyarbakır.
- Özkeçeci, Z. T., Gonul, Y., Yuksel, Y., Karavelioglu, A., Tunay, K., Gulsari, Y., Cartilli, O., Hazman, O., Bal, A. (2016). Investigation of the effect of safranal and crocin pre-treatment on hepatic injury induced by infrarenal aortic occlusion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 160–166. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.06.027>
- Pan, H. J., Chang, H. T., ve Lee, C. H. (2016). Association between tamoxifen treatment and the development of different stages of nonalcoholic fatty liver disease among breast cancer patients. *Journal of the Formosan Medical Association*, 115(6), 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2015.05.006>
- Papandreou, M. A., Kanakis, C. D., Polissiou, M. G., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, P., Margarity, M., Lamari, F. N. (2006). Inhibitory activity on amyloid- β aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8762–8768. <https://doi.org/10.1021/jf061932a>
- Polat, M. (2013). Parasetamol Zehirlenmesi ile Oluşturulan Karaciğer Hasarında Leptin'in Karaciğer Hasarı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 74s, Erzurum.

- Razak, S. I. A., Anwar Hamzah, M. S., Yee, F. C., Kadir, M. R. A., Nayan, N. H. M. (2017). A review on medicinal properties of Saffron toward major diseases. *Journal of Herbs, Spices And Medicinal Plants*, 23(2), 98–116. <https://doi.org/10.1080/10496475.2016.1272522>
- Ribeiro, M. P. C., Santos, A. E., Custódio, J. B. A. (2014). Mitochondria: The gateway for tamoxifen-induced liver injury. In *Toxicology* (Vol. 323, pp. 10–18). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.05.009>
- Sarıaltın, F. (2018). Kronik Karaciğer Parankim Hastalarında ve Normal Olgularda Karaciğer T1 ve T2 Zamanlarının Değerlendirilmesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Radyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 89s, Ankara.
- Sayar, E. (2020). Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Kabak Çekirdeği Yağı ve Susam Yağı Ekstraktının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 105s, Kayseri.
- Sinha, A. K. (1972). Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*, 47(2), 389–394. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90132-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90132-7)
- Suddek, G. M. (2014). Allicin enhances chemotherapeutic response and ameliorates tamoxifen-induced liver injury in experimental animals. *Pharmaceutical Biology*, 52(8), 1009–1014. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.876053>
- Sumaiya, S., Naved, T., Sharma, A., Sarwat, M. (2020). Amelioration of Liver Ailments by Saffron (*Crocus sativus*) and Its Secondary Metabolites. In *Saffron: The Age-Old Panacea in a New Light* (pp. 1–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818462-2.00001-2>
- Sun, X. Juan, Zhao, X., Xie, J. ning, Wan, H. (2020). Crocin alleviates schizophrenia-like symptoms in rats by upregulating silent information regulator-1 and brain derived neurotrophic factor. *Comprehensive Psychiatry*, 103. <https://doi.org/10.1016/j.comppsych.2020.152209>
- Sun, Y., Oberley, L. W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3), 497–500. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/clinchem/34.3.497>
- Süzme, R. (1999). Hepato Karsinojen Ajanlara Bağlı Hücre Siklusu Değişmelerinde Melatoninin Koruyucu Rolünün İncelenmesi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 78s, İstanbul
- Uçar, K., Göktepe, Z. (2018). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve kafein. *Journal of Nutrition and Dietetics*, 46(2). <https://doi.org/10.33076/2018.bdd.303>
- Uzunoglu, K. (2018). Deneysel Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarında Okserutin'in Karaciğer Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, 86s, Ankara.
- Velioğlu, Ç. (2018). Ratlarda Tartrazin ile Oluşturulan Karaciğer Hasarı Üzerine Krosinin Koruyucu Etkisi, Karabük Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 105s, Karabük.
- Wang, G., Zhang, B., Wang, Y., Han, S., Wang, C. (2018). Crocin promotes apoptosis of human skin cancer cells by inhibiting the jak/stat pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(6), 5079–5084. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6865>

- Wang, S. C., Tseng, T. Y., Huang, C. M., Tsai, T. H. (2004). Gardenia herbal active constituents: Applicable separation procedures. In *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (Vol. 812, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.033>
- Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M., Carrell, R. W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 85(2).
- Wyld, D. K., Chester, J. D., Perren, T. J. (1998). Endocrine aspects of the clinical management of breast cancer – Current issues. In *Endocrine-Related Cancer* (Vol. 5, Issue 2). <https://doi.org/10.1677/erc.0.0050097>
- Yaribeygi, H., Mohammadi, M. T., Sahebkar, A. (2018). Crocin potentiates the antioxidant defense system and improves oxidative damage in liver tissue in diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 333–337. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.12.077>
- Yılmaz, A. F. (2010). Deneysel Künt Karaciğer Travması Oluşturulan Ratlarda Resveratrolün Karaciğer Doku İyileşmesi Üzerine Etkileri, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 75s, Elâzığ.
- Zhou, W. bo, Zhang, X. xin, Cai, Y., Sun, W., Li, H. (2019). Osthole prevents tamoxifen-induced liver injury in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(5), 608–619. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0171-y>

