

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA VİNKRİSTİN İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER
TOKSİSİTESİ ÜZERİNE BİNGÖL YÖRESİNDEN TOPLANAN ARI
SÜTÜNÜN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
RAHİME ERZİNCAN

ARI VE ARI ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN

BİNGÖL 2023

**RATLARDA VİNKRİSTİN İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE BİNGÖL YÖRESİNDEN TOPLANAN ARI SÜTÜNÜN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN danışmanlığında, Rahime ERZİNCAN tarafından hazırlanan bu çalışma 01/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Arı ve Arı Ürünleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Doç. Dr. Adnan AYNA	İmza	:
Üye (Danışman)	: Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Sefa KÜÇÜKLER	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak 1002 projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: (1002-2210684)

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve bu tezi hazırlamamda bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, karşıma çıkan her türlü sorunda desteğini her zaman hissettiğim ve kendisiyle çalışmaktan onur duyduğum sayın danışman hocam Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarım sürecinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve deneysel çalışmalar ile moleküler analizlerin yapılmasında gerekli desteği sağlayan Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR, Doç. Dr. Sefa KÜÇÜKLER, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa İLERİTÜRK, Öğr. Gör. Ebubekir İZOL, Arş. Gör. Dr. Cihan GÜR ve Arş. Gör. Aydın GENÇ'e çok teşekkür ederim. Yine çalışmamın deneysel kısmında yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencileri İbrahim BAYAV ve Sevda SAĞ'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında deneysel ve laboratuvar analiz çalışmalarımı yaparken desteklerini esirgemeyen Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığına, Bingöl Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (BÜDAM) yönetimine ve Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığına teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için (1002-221O684) proje kodu ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a sonsuz teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Tez aşaması boyunca, benden desteklerini esirgemeyen annem Fatma ERYİĞİT, babam Mehmet ERYİĞİT ve eşim Mahmut ERZİNCAN'A teşekkürlerimi sunarım.

Rahime ERZİNCAN

Bingöl 2023

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Karaciğer Yapısı ve Anatomisi	1
1.2. Karaciğerin Fonksiyonları	3
1.2.1. Metabolik Görevler.....	4
1.2.2. Hematolojik Görevler	5
1.2.3. Safra Yapımı ve Salgılanması.....	6
1.3. Karaciğer Toksisitesi	6
1.3.1 Karaciğer Hasarı Mekanizmaları	8
1.4. Kemoteröpatik İlaçlar	10
1.5. Vinkristin.....	11
1.5.1. Vinkristin'in Yapısı	11
1.5.2. Vinkristin Etki Mekanizması	11
1.6. Arı Sütü	13
1.6.1. Arı Sütünün Özellikleri.....	15
1.6.2. Arı Sütünün Kimyasal Bileşimi	15
1.6.3. Arı Sütünün Etkileri.....	17

2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Deney Hayvanları.....	21
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	21
3.3. Arı Sütünün Kimyasal İçeriğinin LC-MS/MS ile Belirlenmesi	21
3.4. Metot.....	22
3.4.1. Deneysel Uygulamalar.....	22
3.4.2. Deney Sonunda Numunelerin Alınması	23
3.5. Karaciğer Fonksiyon Testleri	23
3.6. Biyokimyasal Analizler İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması	23
3.6.1. GPx Aktivitesinin Ölçümü.....	24
3.6.2. GSH Tayini	25
3.6.3. MDA Seviyesinin Ölçümü.....	26
3.6.4. SOD Aktivitesinin Ölçümü.....	28
3.6.5. KAT Aktivitesinin Ölçümü	30
3.7. Gen Ekspresyon Analizleri.....	31
3.7.1. Primer Dizaynı	31
3.7.2. Total RNA İzolasyonu	32
3.7.3. Total RNA’lardan cDNA Eldesi.....	32
3.7.4. Real Time PCR Aşaması	33
3.8. Western Blot Analizi	33
3.8.1. SDS-PAGE Analizinde Kullanılan Ayıraçlar.....	34
3.8.2. SDS-PAGE Analizi.....	35
3.9. İstatiksel Analiz	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Arı Sütünün LC-MS/MS Analiz Sonuçları	37
4.2. Karaciğer Fonksiyon Testleri	39

4.3. Arı Sütü ve Vinkristin'nin Antioksidan Parametreler Üzerine Etkileri	43
4.4. Arı Sütü ve Vinkristin'nin Lipit Peroksidasyonu Üzerine Etkileri	47
4.5. Arı Sütü ve Vinkristin'nin İnflamasyonla İlişkili Parametrelerin mRNA Transkript Seviyeleri Üzerine Etkileri	48
4.6. Arı Sütü ve Vinkristin'nin Endoplazmik Retikulum Stresi ile İlişkili Parametrelerin mRNA Transkript Seviyeleri Üzerine Etkileri.....	51
4.7. Arı Sütü ve Vinkristin'nin Otofaji ile İlişkili Parametrelerin mRNA Transkript Seviyeleri Üzerine Etkileri	55
4.8. Arı Sütü ve VCR'nin Apoptoz ile İlişkili Protein Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkileri	58
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62
EKLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
ANOVA	: One-Way Analysis of Variance (Tek yönlü varyans analizi)
AST	: Aspartat Aminotransferaz
Bax	: Bcl-2 Bağlı X Proteini
Bcl2	: B-hücreli Lenfoma 2
BSA	: Sığır Serum Albümin
CHPO	: Cumen Hidrojen Peroksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Dk.	: Dakika
DTNB	: 5-5-Ditiyo-bis, 2-nitrobenzoik asit
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
G	: Gram
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
HCl	: Hidroklorik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
IL-1 β	: İnterlökin 1 Beta
KAT	: Katalaz
KCl	: Potasyum Klorür
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
NBT	: Nitroblue Tetrazolyum
NF- κ B	: Nükleer Faktör-Kappa B
PBS	: Fosfat Tuzu Tamponu
PMSF	: Fenil Metan Sülfonit Florit

PVDF	: Poliviniliden Florür
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
SDS-PAGE	: Sodyum Dedosil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Tiyoarbütirik Asit
TBS-T	: Tris Tampon Tuzu-Tween 20
TCA	: Trikloroasetik Asit
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü-alfa
μ M	: Mikro Molar
Δ	: Delta

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Karaciğerin anatomisi ve alttan görünümü.....	1
Şekil 1.2.	Karaciğerin fonksiyonları	3
Şekil 1.3.	Vinkristin'in açık yapısı.....	11
Şekil 1.4.	Arı sütü	14
Şekil 3.1.	GSH standart grafiği	26
Şekil 3.2.	MDA standart grafiği	28
Şekil 4.1.	Arı sütünün LC-MS/MS analiz kromatogramı	38
Şekil 4.2.	Serum AST aktivitesi	41
Şekil 4.3.	Serum ALT aktivitesi	42
Şekil 4.4.	Serum ALP aktivitesi	43
Şekil 4.5.	Karaciğer SOD aktivitesi	44
Şekil 4.6.	Karaciğer KAT aktivitesi	45
Şekil 4.7.	Karaciğer GPx aktivitesi	46
Şekil 4.8.	Karaciğer GSH düzeyi	46
Şekil 4.9.	Karaciğer MDA düzeyi	48
Şekil 4.10.	Karaciğer NF- κ B mRNA transkript seviyesi	49
Şekil 4.11.	Karaciğer TNF- α mRNA transkript seviyesi	50
Şekil 4.12.	Karaciğer IL-1 β mRNA transkript seviyesi	51
Şekil 4.13.	Karaciğer ATF6 mRNA transkript seviyesi	53
Şekil 4.14.	Karaciğer PERK mRNA transkript seviyesi	54
Şekil 4.15.	Karaciğer IRE1 mRNA transkript seviyesi	54
Şekil 4.16.	Karaciğer GRP78 mRNA transkript seviyesi	55
Şekil 4.17.	Karaciğer LC3A mRNA transkript seviyesi	57
Şekil 4.18.	Karaciğer LC3B mRNA transkript seviyesi	57
Şekil 4.19.	Karaciğer dokusunda VCR'nin ve arı sütünün apoptoz ile ilişkili protein ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri.....	59

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	GPx aktivitesinin ölçümü	25
Tablo 3.2.	MDA düzeyinin ölçümü	27
Tablo 3.3.	SOD aktivitesinin ölçümü	29
Tablo 3.4.	KAT aktivitesinin ölçümü	30
Tablo 3.5.	Primerlerin dizilimleri	31
Tablo 3.6.	Reaksiyon döngüleri	33
Tablo 3.7.	SDS-PAJE jellerinin kompozisyonları	35
Tablo 4.1.	Arı sütünün analiz sonuçları	37

RATLARDA VINKRİSTİN İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER TOKSİSİTESİ ÜZERİNE BİNGÖL YÖRESİNDE TOPLANAN ARI SÜTÜNÜN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Kanser günümüzde hızla yayılan ve ölüm oranı yüksek olan en önemli hastalıklardan biridir. Çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan vinkristin (VCR), Apocynaceae familyasına ait deniz salyangozu bitkisinden ekstrakte edilen bir alkaloiddir. VCR, lenfomalar, lösemi, meme kanseri ve beyin tümörleri gibi birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Bu ilaç kemoterapötik bir ajan olarak kullanılsa da hepatotoksisite ve periferik nöropati başlıca yan etkileridir. Arı sütü, 5-15 günlük genç işçi arıların boğaz (hipofaringeal) ve üst çene (mandibular) bezlerinden üretilip salgılanan bir maddedir. Zengin protein, vitamin ve fenolik bileşik içeriği ile tüm dikkatleri üzerinde toplayan bir arı ürünüdür.

Bu çalışma VCR'nin neden olduğu hepatotoksisite üzerine Bingöl yöresinde toplanan arı sütünün olası koruyucu etkilerinin araştırmak için tasarlandı. Deneyde 5 grup ve her grupta 7 rat olacak şekilde toplam 35 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanıldı. Gruplar sırasıyla; i) Kontrol, ii) Arı sütü, iii) VCR, iv) VCR+Arı sütü-150 mg/kg ve v) VCR+Arı sütü-300 mg/kg olacak şekilde 14 gün intraperitoneal ve oral yoldan uygulama yapıldı. Arı sütünün LC-MS/MS cihazı ile kimyasal içeriğinde toplam 53 fenolik bileşene bakıldı ve 15 tane fenolik bileşik olduğu tespit etti. Ayrıca, kontrol grubu ile kıyaslandığında VCR grubunda serum ALT, AST ve ALP seviyelerinin yüksek olduğu tespit edildi. VCR uygulamasının karaciğer dokusunda antioksidan enzimler olan SOD, KAT, GSH ve GPx aktivelerini azalttığı lipid peroksidasyonunu ise artırdığı belirlendi. Öte yandan VCR karaciğer dokusunda NF κ B, TNF- α , IL-1 β , PERK, ATF6, IRE1, GRP78, LC3A ve LC3B mRNA transkript seviyelerini kontrol grubuna göre azalttığı kaydedilmiştir. Western blot analizi sonucunda VCR'nin karaciğer dokusunda kaspaz-3 ve Bax ekspresyon seviyelerini artırdığı, Bcl-2 ekspresyon seviyelerini azalttığı tespit edildi. Tedavi amacıyla verilen 150 ve 300 mg/kg dozlarındaki arı sütünün yukarıda bahsi geçen parametreleri regüle ederek koruyucu etki gösterdiği tespit edildi.

Sonuç olarak VCR indüklü karaciğer hasarında arı sütünün antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve anti-otofajik etkiler sergilediği ve her iki dozun da etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Arı sütü, oksidatif stres, inflamasyon, apoptosis, otofaji, vinkristin

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ROYAL JELLY COLLECTED IN BİNGÖL REGION ON VINCRISTINE-INDUCED HEPATOTOXICITY IN RATS

ABSTRACT

Cancer is one of the most important diseases that spreads rapidly and has a high mortality rate. Used in the treatment of various types of cancer, vincristine (VCR) is an alkaloid extracted from the sea snail plant belonging to the Apocynaceae family. VCR is a chemotherapeutic drug used in the treatment of many types of cancer, such as lymphomas, leukemia, breast cancer and brain tumors. Although this drug is used as a chemotherapeutic agent, hepatotoxicity and peripheral neuropathy are its main side effects. Royal jelly is a substance produced and secreted by the throat (hypopharyngeal) and upper jaw (mandibular) glands of young worker bees aged 5-15 days. It is a bee product that attracts all attention with its rich protein, vitamin and phenolic compound content.

This study was designed to investigate the possible protective effects of royal jelly collected in Bingöl region on hepatotoxicity caused by VCR. In the experiment, a total of 35 Wistar Albino male rats were used in 5 groups and 7 rats in each group. The groups are respectively; i) Control, ii) Royal jelly, iii) VCR, iv) VCR+Royal jelly-150 mg/kg and v) VCR+Royal jelly-300 mg/kg were administered intraperitoneally and orally for 14 days. The chemical content of royal jelly was investigated by LC-MS/MS device and it was determined that there were 15 phenolic compounds. In addition, serum ALT, AST and ALP levels were found to be higher in the VCR group compared to the control group. It was determined that VCR application decreased the antioxidant enzymes SOD, CAT, GSH and GPx activities in the liver tissue and increased lipid peroxidation. On the other hand, it was noted that NF κ B, TNF- α , IL-1 β , PERK, ATF6, IRE1, GRP78, LC3A and LC3B mRNA transcript levels were decreased in VCR liver tissue compared to the control group. As a result of western blot analysis, it was determined that VCR increased caspase-3 and Bax expression levels and decreased Bcl-2 expression levels in liver tissue. Royal jelly at doses of 150 and 300 mg/kg given for treatment has shown a protective effect by regulating the above-mentioned parameters.

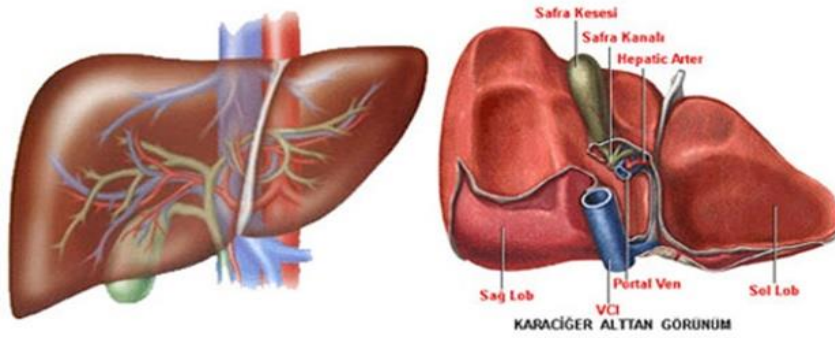
As a result, it was concluded that royal jelly exhibited antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and anti-autophagic effects in VCR-induced liver injury and both doses were effective.

Keywords: Royal jelly, oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, vincristine

1. GİRİŞ

1.1. Karaciğer Yapısı ve Anatomisi

Karaciğer, vücudumuzun en büyük iç organı ve karma bezidir. Diyaframın alt, abdominal boşluğun ise üst kısmında, sağ tarafta dördüncü ile altıncı interkostal aralıktan arka kostaya kadar uzanır. Karaciğer konumu ile midenin sağ tarafını ve safra kesesini örter. Yetişkin bir insan karaciğeri yaklaşık 1.5-2 kg ağırlığında olup kahverengi-kırmızı bir renge sahiptir (Hamed, 2016).



Şekil 1.1. Karaciğerin Anatomisi ve Alttan Görünümü

Karaciğer, fibröz bağ dokusundan oluşan kollajen ve elastik lif içeren, glisson kapsülü ile sarılmıştır. Seröz yapıda bir kılıf olan visserel periton ise, karaciğerin diyafram ve diğer organlarla temas halinde bulunduğu bölgeleri hariç diğer kısımlarını kaplamıştır. Karaciğer, falciform ligamenti ile iki büyük (sağ, sol) loba ayrılır (Başak ve Akan 2015). Falciform ligamenti, parietal peritonuma kadar uzanır ve sabitlenmeye destek olur. Falciform ligamentinin ön kısmındaki kalınlaşma halka ligament ve ligamentum teres adıyla göbeğe kadar bant şeklinde uzanır. Karaciğerin sağ lobu sol lobun yaklaşık 6 katı büyüklüğündedir. Sağ lob visseral yüzeyinde iki küçük (kuadrat, kaudat) loba ayrılmıştır. Kaudat lobun sağ tarafında vena kava sol tarafında ise ligamentum venosus yer almaktadır (Doğan, 2014).

Karaciğer, hepatik lobül adında yapısal ve fonksiyonel birimlerden oluşmuştur. Hepatik lobüller birkaç mikrometre (μm) boyunda 0.7-2 μm çapında, sayıları yaklaşık 50.000 ile 100.000 arasında değişen çok kenarlı (poligonal) yapıdadırlar. Hepatik lobüller; hepatik arter, portal ven, safra kanalı ve sinir damarlarından oluşmaktadırlar. Hepatosit bir hepatik lobülün işlevsel olan endokrin ve ekzokrin birimidir. Hepatositler kandaki maddelerin emilimi ve plazma proteinlerinin salgılanmasında görevlidirler (Yılmaz, 2021).

Hepatositler, sinüzoid boşluklar ile çevrili hepatosit plaklarından gelişmişlerdir, bazolateral ve apikal olmak üzere iki bölümden oluşurlar. Bazolateral bölgede çok sayıda mikrovillus bulunur. Hepatositler, bir merkez venin etrafında toplanmışlardır. Merkez venül, çevredeki hepatik ve portal venlerden gelen kanı toplar. Hücrel sinüzoid ise boşluklarla kaplı plakalalar oluşturur ve disse aralığı ile sinüzoidal aralıktaki kanı ayırırlar (Şentürk ve Karabıyık 2019).

Karaciğerin işlevsel ve yapısal hücreleri olan hepatositler; yaklaşık 20-30 μm çapında, büyük, poligonal hücreler olup tüm karaciğer hücrelerin yaklaşık %80'ini oluştururlar. Bu epitel hücreler birbirleriyle bağlantılı plaklar şeklinde gruplanmışlardır. Işık mikroskopunda bu plaklar “karaciğer lobülü” şeklinde görülmektedir. Yapısındaki endotel hücreler ile sinüzoid damarlarının iç yüzünü kaplar ve metabolik olaylarda aktif rol oynarlar. Karaciğerin parankimatik olmayan hücreleri ise kendi içinde; kupffer hücreleri, lenfositler ve yıldızlı hücreler olarak ayrılırlar (Hall, 2010).

Kupffer hücreleri (sinüzoidal makrofajlar), sitokin salgılar ve fagositoz yaparlar. Lenfositler, bağışıklık sistemi elemanlarıdır. Yıldızlı hücreler ise hücre içi matriks üretir ve A vitamini depolarlar (Yayla, 2014).

Rapport ve arkadaşları karaciğer parankimasını yapısal olan “karaciğer asinüsü” bölümlerine ayırmışlardır. Eşkenar üçgen şeklinde olan bu modelde; lobüllerdeki portal alan üçgeninin tabanına, merkez ven ise üçgenin tepe kısmına denk gelmektedir. Böylece her karaciğer asinüsü üç eliptik zonal kısma ayrılmaktadır (Rapport et al., 1954).

Zon1: Portal ven ve hepatik arterlerden gelen kana en yakın olduğu bölgedir. Klasik lobül şemasında periferde denk gelmektedir.

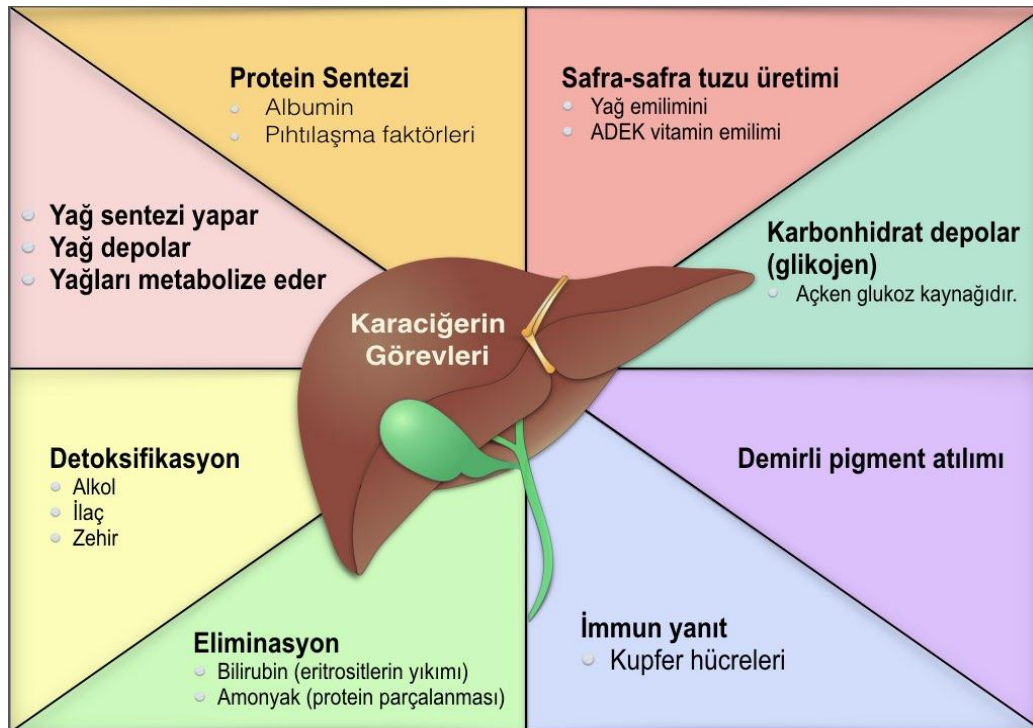
Zon 2: Zon 1 ve 3 arasında çok belirgin olmayan bir bölgedir.

Zon 3: Kısa eksene en uzak ve santral vene en yakın olan zondur. Klasik lobül şemasında merkezi kısma denk gelmektedir (Hüz, 2017).

Karaciğer, vücudumuzda aynı anda hem arteriyel hem de venöz kanı alabilmesiyle diğer organlardan ayrılır. Kalpteki kan akışının yaklaşık %25'ini alır ve neredeyse dakikada 1500 ml kan ile buluşur. Kan ihtiyacının yaklaşık %75'i hepatik portal ven, geriye kalan %25'i ise hepatik arter ile sağlanır. Hepatik portal ven ile sindirim sistemi, pankreas, dalak safra kesesi ve kapiller yataklardan toplanan besin miktarınca zengin kan karaciğere getirilir. Hepatik arter ise aorttan dallanarak oksijen bakımından zengin, temiz kan karaciğere getirir. Getirilen kan karaciğer sinüzoidlerine ulaştırıp, oksijence fakirleştikten sonra, hepatik venler ile inferior vena cavaya aktarılır ve karaciğerden çıkarılır (Aydın, 2000).

1.2. Karaciğerin Fonksiyonları

Karaciğerin vücutta birçok önemli maddenin üretimi, depolanması ve salgılanmasında temel rol oynar. Karaciğerin görevleri metabolik, hematolojik ve safra ile ilgili olarak üç grupta sınıflandırılabilir (Aktümsek, 2010).



Şekil 1.2. Karaciğerin Fonksiyonları

1.2.1. Metabolik Görevler

Karaciğer, vücudaki kanın kompozisyonunun ayarlanmasında aktif rol oynar. Karaciğer, bağırsak epitellerinden emilen kandaki kompleks lipidler hariç tüm besinlerin ulaştığı, işlendiği ve vücudun diğer bölümlerinde kullanılmak üzere depolandığı organdır. Bağırsak epitellerinden emilen besinler, hepatik portal sistemle karaciğere gelir besinlerin fazlası alınır, depolanır, kandaki toksinler uzaklaştırılıp hepatik venler ile tekrar dolaşıma aktarılır (Zong and Friedman 2014).

Karbonhidrat metabolizması; sağlıklı insanlarda kan glukoz konsantrasyonu yaklaşık 80 ile 100 mg/dl arasında sabit tutulmaktadır. Kandaki glikoz seviyesinin düşmesi ile hepatositler depoladıkları glikojenleri parçalayarak, kana glukoz verirler. Böylece kandaki glukoz seviyesi yükselir. Kandaki glukoz oranı yükselirse, fazla glukoz yağ ve glikojen olarak depolanır böylece kan glukoz konsantrasyonu dengede tutulur. Karaciğerde gerekli durumlarda aminoasit, laktat, pirüvat ve gliserolden glukoz sentezi de yapılır (Bergman et al. 2019).

Lipid metabolizması; karaciğerde yağ asitleri, fosfolipit, kolesterol, lipoprotein, safra tuzları ve safra asitlerinin sentezi aynı zamanda yağ asitlerinden trigliserit sentezi gerçekleştirilir. Karaciğer trigliserit, triaçilgliserol, yağ asitleri ve kolesterolün kandaki seviyesini, depolama ve salgılama reaksiyonları ile dengede tutar (Ponziani et al., 2015).

Amino asit metabolizması; dolaşım sistemindeki fazla amino asit karaciğer mekanizmalarınca uzaklaştırılır. Hepatositlerdeki kupffer hücreleri tarafından yapısal ve plazma proteinleri (albumin, protrombin, fibrinojen vb.) sentezlenir (Doğan, 2014).

Detoksifikasyon metabolizması; karaciğerde amino asitlerin yağ ve glikojene dönüşüm reaksiyonları gerçekleştirilir. Amino asitlerin deaminasyon ile oluşan toksik amonyak, karaciğerde üre ve ürik aside dönüştürülür. Yine karaciğerde, dolaşımdaki ilaç veya benzeri toksik etkilere sahip maddelerin ayrıştırılması ve metabolitlerine yıkılması gerçekleştirilir (Zhao et al., 2019).

Vitamin ve mineral metabolizması; karaciğerde yağda çözünen (A, D, E, K) vitaminleri, suda çözünen bazı (B9 ve B12) vitaminler ve az miktarda C vitamini depolanır (Efdal, 2014).

Bilirubin metabolizması; hematopoetik sistemin hücreleri olan eritrositler 120 gün olan yaşam süresi dolunca dalak, kemik iliği ve karaciğerdeki fagositler tarafından retikülo endoteliyal sistemde (RES) parçalanırlar. Sağlıklı insan vücudunda eritrositlerin parçalanmasıyla her gün yaklaşık 6.5-7 g kadar hemoglobin ortaya çıkar. Hemoglobinin hem kısmı, globin kısmından uzaklaştırılır. Hem grubundan bilirubin sentezlenir. Bilirubin kanda albuminle taşınarak karaciğere gelir. Karaciğerde glukronik asitle konjuge olup safra sentezine katılır. Hemoglobinin globin grubu ise aminoasitlere parçalanır. Ayıca hemoglobinden ayrılan demir karaciğerde veya kemik iliğinde depolanır, yeni kan hücrelerinin yapımında kullanılır (Vítek, 2020).

1.2.2. Hematolojik Görevler

Karaciğer kalpteki kan akışının yaklaşık %25'ini alır ve nerdeyse dakikada 1500 ml kan ile buluşur. Vücudumuz en büyük kan deposunun, kan ile ilgili çeşitli görevleri vardır. Embriyolojik dönemde, hematopoetik sistemin hücreleri olan eritrosit, eritroblast, miyelosit ve megakaryositlerin üretimi de karaciğerde gerçekleştirilir (Saral ve Kolaylı, 2012).

Plazma protein sentezi; kandaki plazma proteinlerinin birçoğu hepatositler tarafından üretilip salgılanmaktadır. Plazmanın ozmatik konsantrasyonunu, plazma hacmi ve doku sıvısı dengesinin düzenlenmesini sağlayan albümin, trigliseritlerin diğer organlara taşınmasında rol oynayan lipoprotein (VLDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), karaciğerde üretilir. Demir taşınmasında görevli glikoproteinler, kan pıhtılaşma elemanlarından olan fibrinojen ve protrombin, plazma kolloid basıncından sorumlu globülinler, karaciğer tarafından üretilir (Ross and Pawlina, 2016).

Hormonların dönüştürülmesi; karaciğerde D3 vitamini baskın formu olan 25-hidroksikolekalsiferole ve tiroid bezi tarafından salgılanan tiroksin hormonu aktif formu olan triiyodotironine dönüştürülür. İnsülin ve glukagon hormonları indirgenir, epinefrin nöroepinefrin, kortikosteroidler gibi eşey hormonları da absorbsiyona uğrayarak tekrar dolaşıma verilir (Altınışik, 2010; Çimen ve Çimen, 2016).

Toksinlerin uzaklaştırılması ve depolanması; vücuda alınan birçok ilaç ve toksin suda çözünabilir özellikte değildir. Vücuttan uzaklaştırılabilmeleri için suda çözünabilir formlara dönüştürülmeleri gerekir. Karaciğer toksinleri, ilaçları ve ksenobiyotikleri daha çözünabilir formlara dönüştürmektedir (Guggenheimer and Moore, 2011).

Fagositoz; hepatosit elemanlarından olan kupffer hücreleri, yaşlanmış bozulmuş eritrositleri, patojenleri ve hücre atıklarını yok ederler. Karaciğerde antikorlar parçalanır, amino asitlerine kadar yıkılarak tekrar dolaşıma verilir (Kelekcio, 2020).

1.2.3. Safra Yapımı ve Salgılanması

Safra; su, sodyum, bikarbonat, safra tuzları, safra pigmentleri, kolesterol, lesitin, bilirubin, ster kobilin ve elektrolitlerden oluşmuştur. Yaklaşık 8.0-8.6 arasında bir pH'ya sahip ve sarı renklidir. Yağların sindirimini kolaylaştıran safra, karaciğer tarafından üretilip duodenuma verilmeden önce safra kesesinde depolanır ve olgunlaştırılır. Duodenuma verilen safranın fazlası ince bağırsaklardan hepatik portal sistem ile tekrar karaciğere getirilir, enterohepatik dolaşımla karaciğerde ayrıştırılarak tekrar safra yapımında kullanılır. Sağlıklı bireylerde karaciğer tarafından yaklaşık her gün bir litre safra salgılanmaktadır (Guillot and Tacke, 2019).

1.3. Karaciğer Toksisitesi

Karaciğer dolaşımdaki ilaçların, toksinlerin ve yabancı proteinlerin vücuttan uzaklaştırılabilmeleri için daha hidrofilik formlarına dönüşmesini sağlar. İlaçların dönüşümü ve eliminasyonu sırasında kimyasal yapı karaciğere zarar verebilmektedir. Karaciğer hasarı, hepatotoksisite olarak da adlandırılmaktadır (Karanfil, 2020).

Hepatoksisite çoğunlukla akut, kronik, fulminan hepatit, siroz veya tümör şeklinde kendisini göstermektedir. Genetik faktörler, ilaçların kimyasal içeriği, yaş, cinsiyet, alkol kullanımı ve vücudun diğer kısmındaki rahatsızlıklar karaciğer için risk faktörlerindendir. İlerleyen yaşlarda riskin arttığı bildirilmektedir. Elli yaş ve üzerinde risk faktörünün yüksek olması, sitokrom P450 enzim aktivitesinin, renal fonksiyonların azalması ve ilaçların yarılanma ömrünün daha uzun olmasına bağlanmaktadır (Güngör vd., 2008; Doğan, 2014). Hepatoksisite nedenleri arasında, genel olarak ilaçlar, doğal toksik ajanlar, kimyasal maddeler, vitaminler, alkol, kokain, ekstazi, bazı mantarlar ve endüstriyel kimyasallar gösterilmektedir (Arıcı, 2008).

İlaç kaynaklı toksik hepatit, karaciğer hasarının en çok karşılaşılan biçimlerinden biridir. Karaciğer hasarı, iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Karaciğerde oluşan toksik etkide iki mekanizma birlikte rol oynayabileceği gibi ayrı ayrı da etkili olabilirler. Ayrıca ilaçların karaciğerde oluşturacağı hasar kişiye özgüdür, aynı ilaç farklı kişilerde farklı tahribatlara yol açabilmektedir (Eren vd., 2004; Aycan, 2015).

Karaciğer toksisitesini oluşturan mekanizmalardan ilki intrinsik mekanizmadır. İntrinsik mekanizma, yüksek dozda ilaç alımıyla ortaya çıkar. Doza bağımlıdır ve tahmin edilebilir. Bu hasar mekanizmasında” ilaçların kimyasal metabolitleri “direk” olarak hücrede ve organellerde yapısal aksaklıklara yol açabilir veya “indirek” olarak metabolik yollara etki ederek immun mekanizmalarda aksaklıklara yol açabilirler. Metotreksat, valproat, asetaminofen, kontraseptif steroidler, vinil klorid, kokain, siklofosfamid ve niasin indirek mekanizmayla etki eden ilaçlardan bazılarıdır (Kabakcı, 2023).

Karaciğer toksisite mekanizmalarının ikincisi ise; idiyosenkrazik mekanizmadır. Toksik reaksiyon doza bağımlı değildir ve önceden tahmin edilemez. Genetik ve çevresel faktörler önemli olup genel toksisite mekanizmalarından en sık karşılaşılan formudur. İlaç alımı ile karaciğer hasarı arasına uzun zaman girebilir bu durum tanı konulması aşamasını zorlaştırır. İzonyazid, klorpromazin, fenilbutazon, halotan, diklofenak fenitoin, asetilsalisilik asit, tetrasiklin, oral kontraseptifler ve eritromisin idiyosenkrazik mekanizmayla etki eden ilaçlardan bazılarıdır (Doğan, 2014; Aycan, 2015).

Vücuda alınan ilaçlar biyotransformasyon mekanizmaları ile hidrofilik formlara dönüştükten sonra idrar veya safra ile vücuttan uzaklaştırılabilir. Bu dönüşüm bazı ilaçların formlarının aktifleşebilmeleri içinde gereklidir. Hepatositlerde biyotransformasyon iki fazda gerçekleştirilir (Zimmerman, 2000).

FAZ I (Oksidasyon): Hepatositlerin, granülsüz endoplazmik retikulum ve mitokondri organellerinde gerçekleşir. Bu fazda, ilaç bileşiklerine hidrosil (-OH) ve karboksil (-COOH) grupları eklenir, sitokrom P450 proteinleri ile yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz gibi biyokimyasal reaksiyonlar yürütülür (Doğan, 2014; Ross and Pawlina, 2016).

FAZ II (Konjugasyon): Bu fazda, faz I ürünü olan bileşikler, daha hidrofilik forma dönüştürülür. Ürünün glukuronik asit, glisin, taurin, glutatyon ve sülfat gibi endojen bileşenler ile konjugasyonu gerçekleştirilir. Toksik bileşikler, böbreklerden veya gastrointestinal sistemden atılabilecek derişikliğe ulaştırılır (Zimmerman, 2000).

1.3.1 Karaciğer Hasarı Mekanizmaları

Karaciğerde toksisite oluşturan mekanizmalar halen araştırma konusu olup, temel olarak beş temel mekanizma bulunmaktadır (Kelekcio, 2020).

1) **Hücre İçi İyon Dengesinin Bozulması:** İlaçların hücre içi proteinlerine, kovalent bağlarla bağlanması ile hücre içi kalsiyum dengesini bozulur, aktinler dağılarak hücrenin şişmesine ve hücre zarının bütünlüğünün bozulmasına neden olurlar. Böylece hücre yıkımına yol açarlar (Altuğ, 2010).

2) **Safra Kanalikülerinin Hasarı:** Bazı ilaçlar safra kanaliküleri zarındaki, taşıyıcı proteinlere etki eder, o bölgede aktif liflerinin yıkımıyla safra sekresyonuna engel olurlar. Daha sonra safra tuzları aktarılamaz, karaciğerde kolestaza neden olurlar. Hücre içinde biriken safra tuzları apoptoza neden olan reseptörlerin hücre içine geçişine izin verir. Genetik etmenler ve hormonlarla etkileşimiyle, hamilelik esnasında kullanılan östrojen içeren ilaçların da kolestazı teşvik ettiği bildirilmektedir (Lee, 2003).

3) **Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü):** İlaçların oluşturduğu hücre zedelenmesi ile immün sistem sitokinleri (TNF ve fas yolakları) uyarılıp aktifleştirir. Hücre içi kaspazlar uyarılarak nükleer kromatin kaybına ve hücre ölümüne neden olurlar (Göçer, 2016).

4) İmmun Mekanizma: İlaçlar immün yanıt oluşturabilecek büyüklükteki bileşikler değildir. İlaçların biyotransformasyonunda p450 enzim reaksiyonları sırasında oluşan ara metabolitler enzimler ile birleşip “addukt” adı verilen ve antijen gibi davranan bileşikler oluştururlar. Addukt bileşiklerinin hepatositlerin yüzeyine taşınması esnasında antikor oluşumunu ve sitolitik T hücresi tepkilerini indükleyebilirler. Bu şekilde uyarılan ikincil sitokin yanıtı, iltihaplanmaya, nötrofil aracılı hepatotoksisiteye ve direkt T hücre cevabı ile sitolize neden olurlar (Shehu et al., 2017).

5) Mitokondriyal Disfonksiyon: Yağ asitlerinin beta oksidasyonunun inhibisyonu ve solunum zinciri enzimlerinin inhibisyonu esnasında açığa çıkan serbest yağ asitleri, metabolizmaya katılamayıp, laktat ve reaktif oksijen radikallerinin birikmesine yol açarak mitokondriyal DNA’yı zedelerler. Hücrede aerobik metabolizma da aksaklıklar meydana gelir ve hücre içinde yağ birikimi neden olurlar (Kamal and French, 2004).

Toksite hasar mekanizmaları doğrultusunda, karaciğerin diğer birimleri, hepatositler, safra duktusları, vasküler sistemi, sinuzoidal hücreleri ve kupffer hücreleri ilaç hasarından etkilenir ve karaciğerde çeşitli morfolojik değişimlere sebep olurlar (Goodman et al. 2006).

Hepatoselüler hasar kronik (uzun süreli) veya akut (kısa süreli) olarak gerçekleşmektedir. Akut karaciğer toksisitesi tüm karaciğer hastalıklarının yaklaşık olarak %90’nını kapsar. Serumda alanin aminotransferaz (ALT) değeri ile belirlenir. Akut karaciğer toksisitesi; sitotoksik, kolestatik ve mikst tip olarak ortaya çıkmaktadır. Karaciğerde; asetaminofen, NSAİİ (non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar), antidepresanlar, sülfonamidler, izoniyazid, ketokanazol, halotan, antidiabetik ajanlar, ekstazi, psikotropik ve nörotropik ilaçlar ve kokain sitotoksik hasara neden ilaçlar arasında gösterilir (Njoku, 2014).

Vasküler sistem ile taşınan ilaçlar ve kimyasal maddeler sistemin, portal ven, hepatik arter, sinuzoidler ve santral ven ve diğer kısımlarında hasara neden olabilir. Sinuzoidal dilatasyon, peliozis, venookluzif hastalık, hepatoportal skleroz, hepatik arterde intimal hiperplazi gibi çeşitli lezyonlarla da oluşabilmektedir. Östrojen, tamoksifen, danazol, antineoplastik ilaçlar, alkol ve oral kontraseptifler vasküler sistemde hasara neden olan ilaçlardır (Björnsson et al., 2010; Heneghan et al., 2013; Kelekcio, 2020).

Toksik ajanlar sinozoidal hücrelerden olan iğsi ve kupffer hücrelerine etki ederek de hasara sebep olabilirler. İlaçlar ve kimyasal bileşenler sadece granulomatöz reaksiyon ya da sitolitik ve kolestatik hepatit ile birlikte hasar oluşturabilir. Granulomatöz hepatite sebep olan ilaçlardan birisi fenilbutazondur. Fosfolipidozis birtakım ilaçlara bağlı oluşan steatoz (yağlanma), makro veya mikro veziküler yapıdadır. Makroveziküler yağlanma; alkol, kortikosteroidler, metotreksat, minosiklin, nifedipin ve total parenteral nutrisyon nedeniyle oluşabilmektedir. Mikroveziküler yağlanma ise aspirin, valproik asit, trimetoprim, amiodaron, sülfometoksazol, piroksikam, didanozin, sitavudin, nevirapin, yüksek doz tetrasiklin ve parenteral nütrisyon kullanımıyla oluşabilmektedir. İlaçlar fosfolipite bağlanıp, fasfolipazın inhibisyonu ile lizozomlarda fosfolipid birikimine neden olalabilirler (Lee 2003; Doğan 2014).

1.4. Kemoteröpatik İlaçlar

Yirminci yüzyılın ortalarından itibaren kullanılan antikanser ilaçlar, genel olarak normal hücrelere zarar vermeden anormal hücreleri yok etmeyi amaçlar. Terapötik ajanların büyük bir kısmının seçici öldürme yeteneğinin olmaması, normal hücrelerde de önemli hasarlara neden olmaktadır. Bu ajanlar, vücutta spesifik dağılıma sahip değildir ve bu da normal sağlıklı dokularda toksisiteye neden olan tümörlere ve yetersiz penetrasyonlara neden olabilmektedir. Bu durum doz veya dozlama sıklığını daha da sınırlandırmaktadır (Creixell and Peppas 2012; Patil et al., 2013).

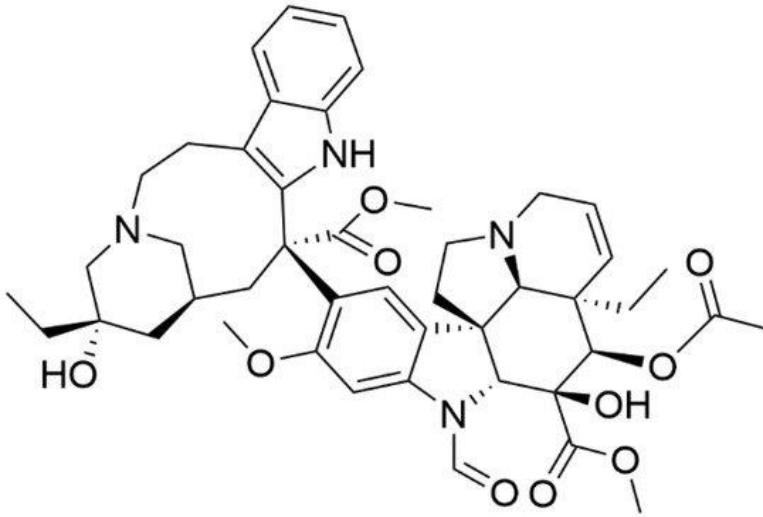
Kemoterapötik ajanlar; kaynaklarına, kimyasal yapılarına, etki mekanizmalarına, kullanım şekli ve zamanı, dokudaki tahribat potansiyelleri ve hastalık etmenlerine göre çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulmuşlardır. Klasik sınıflandırmada, antikanser ilaçlar; sitotoksik kemoterapötikler, hormonal terapötikler ve immunoterapötikler olmak üzere üç başlık altında toplanmışlardır (Temel, 2015). Vinka alkaloidleri (vinkristin, vindesin, vinorelbin ve vinblastin) immunoterapötikler sınıfında yer almakta olup, tübülün dimerlerini değişime uğratıp mikrotübüllerle birleşmelerini engellererek, anormal hücrelerin bölünmelerini durdururlar (Lind, 2011).

1.5. Vinkristin

Kemoterapötik ajanlardan biri olan vinkristin, Apocynaceae ailesine *Catharanthus roseus* isimli Cezayir Menekşesi bitkisinden elde edilen doğal bir alkaloiddir (Geylan vd. 2018).

1.5.1. Vinkristin'in Yapısı

Kimyasal formülü $C_{46}H_{56}N_4O_{10}$ 'dur. Moleküler ağırlığı 824, 96 g/mol'dür. Moleküler yapı olarak dihidroindol yapısı içeren vindolin ile indol yapısı içeren katarantin, karbon-karbon bağı ile bağlanmasıyla meydana gelir. Vinkristin suda, methanolde ve %95'lik ethanolde çözünür (Tarhan 2013; Geylan vd. 2018).



Şekil 1.3. Vinkristin'in Açık Yapısı

1.5.2. Vinkristin Etki Mekanizması

Bir vinka alkaloidi olan vinkristin, 1962'de kemoterapötik ajan olarak çocuklarda ve yetişkinlerde kullanılmaya başlanmıştır. Dünya genelinde hala tedavilerde, özellikle kemik iliği baskılaması yapmadığı ve ekonomik olarak uygun bir ajan olduğu için sıkça kullanılmaktadır (Temel, 2015).

Vinkristin kanser hücrelerinin mikrotübüllerine etki ederek hücre bölünmelerini kontrol altına almaya çalışmaktadır. Mikrotübüller, alfa ve beta tübülün polimeridir. Hücre içinde sinyal iletimi, transport taşıma ve mitozdan sorumludurlar. Vinkristin, mikrotübüllerin β -tübül noktasına bağlanır ve mikrotübüllerin kısalıp uzama mekaniğini değiştirir. İğ ipliklerinin oluşumunu engellediği için kromozomlar, ekvatorial düzleme doğru ilerleyemezler. Mitoz bölünmenin metafaz fazından, anafaz fazına geçiş yapılmadığı için hücre bölünmesi gerçekleşmez. Bu durum mitotik tutulma olarak adlandırılır, bu aşamada kalan hücreler döngüden çıkabilir ya da döngüyü devam ettirip apoptoz veya senesense uğrayabilirler. Vinkristin aynı zamanda tümör hücrelerinin kan akış mekanizmasını etkileyerek, hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Tarhan, 2013; Mian et al., 2016).

Vinkristin, akut lösemilerin, hodgkin ve hodgkin olmayan habis lenfomaların, (lenfositik, mikst-hücreli, histiyositik, indifferansiyel, nodüler ve diffüz tip), nöroblastoma, Wilm tümörü, osteojenik sarkoma, mikozis fungoides, Ewing sarkoması, meme kanseri, lösemi, tiroid kanserleri, habis melanoma, akciğer kanseri ve çocukluk çağı jinekolojik tümör ve hepatoselüler karsinoma gibi pek çok tümörün tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır (Dorchin et al., 2013; Khalilzadeh et al., 2018).

Vinkristin, malign kötü huylu olmayan tümörlerden, hemanjiomların (hemanjioendotelyoma, kaposiform, hemajioendotelyoma) tedavisinde, dokulardaki yoğun tübülün varlığından dolayı oldukça başarılı sonuçlar vermektedir (Tarhan, 2013). Düşük konsantrasyonlar da vinkristin, tübülün proteinlerine bağlanarak mikrotübül yapısında değişikliklere neden olur ve hücreyi metafaz safhasında tutarak mitozu inhibe eder. Yüksek konsantrasyonlarda ise mikrotübüllerin yapısındaki bozulmanın uzun süreli devam etmesi sitotoksikite ile sonuçlanabilmektedir (Bedikian et al., 2011).

Vinkristinin doz yoğunluğu ile klinik etkinliği arasında pozitif bir ilişki vardır. Vinkristin dozunun artırılması tedavi için olumlu iken, doz miktarıyla orantılı istenmeyen yan etkileri doz sınırlandırmasını gerekli kılmıştır (Dilek, 2010). Vinkristin'in tespit edilmiş ağır yan etkileri sebebi ile dozu, çocuklarda 2-2,5 mg/m² iken yetişkinlerde ise 1,5-2 mg/m² arasında sınırlandırılmıştır. Bu sınırlama akut lenfoblastik lösemi ve diğer lenfoid malignitelerin tedavisinde önemli bir ajan olan vinkristinden istenilen düzeyde fayda sağlanamamasına neden olmaktadır (Said et al., 2014).

Potansiyel olarak ciddi bir nörotoksin olan vinkristin'in ağırlı motor ve duyuşal periferik nöropatilere sebep olabilmekte ayrıca kullanımından sonra hastalarda orta derecede miyelosupresyon (eritrositler ve lökositler de dahil), iştahsızlık, bağırsak rahatsızlıkları, alopesi, nekroz ve karaciğer toksisitesi, ağırlı nöropatiler, motor ve duyuşal periferik nöropatilere sebep olduğu belirtilmiştir (Martins et al., 2011; Barbaros ve Dikmen, 2015).

Bu istenmeyen yan etkiler hasta refahını bozmakta, tedavi sürecini geciktirmekte ve hastaların psikolojik, fizyolojik ve ekonomik durumunu olumsuz etkilemektedir (Duran, 2011; Yardım et vd., 2020). Karaciğer vücuda alınan ilaçların biyolojik dönüşümü ve detoksifikasyonundan sorumlu bir organ olmasından ötürü kemoterapötik ajanlar tarafından indüklenen toksisiteye karşı oldukça duyarlıdır (Mukherjee et al., 2013). Vinkristin vücut içerisine alındığında dokular arasında hızlı bir şekilde yayılmakta ve diğerk vinka alkaloidleri gibi, öncelikle karaciğer tarafından metabolize edilmekte ve safra yolu ile atılmaktadır (Bedikian et al., 2011).

Vinkristin, karaciğer ve diğerk organlarda çeşitli metabolik bozukluklara neden olabilmektedir. Bu bozulmaların belirtisi olarak hiperbilirubinemi'nin karaciğerde oluşturabileceğı hasar belirtilmiştir (Mora et al., 2016). Vinkristin uygulamayı takiben hemen (akut) hasar görülebileceğı gibi uzun süreçtede (kronik) hasar görülebilmektedir (Dilek, 2010). Karaciğerdeki akut veya kronik hasarların serum AST, ALT ve ALP gibi enzim aktivitelerinde yükselmeye yol açtığı bildirilmiştir (Akşit, 2015).

1.6. Arı Sütü

Arılar, yüz milyonu aşkın süredir yeryüzünde yaşamaktadırlar. Koloniler halinde yaşayan bu canlılar gerek diğerk canlılara gerek ekolojik dengeye katkıları ile tarih boyunca ilgi odağı olmuşlardır. Bu sosyal canlılar, kolonide yaklaşık otuz ile yüz bin arasında değışen birey sayısı ve belirlenmiş görev dağılımıyla kast sistemine sahiptirler. Bal arılarında kovan sistemi dişi işçi arılar, dişi üreme kraliçesi ve erkek kastından oluşmaktadır. Dölllenmiş yumurtalar kraliçe ve işçi arıya dönüşken, dölllenmemiş yumurtalar ise erkek arıları oluşturmaktadırlar (Adaşkeviçiüt et al., 2019).



Şekil 1.4. Arı Sütü

Son zamanlarda bilim insanlarının, doğal kaynaklardan elde edilen biyofonksiyonel besin ürünlerine olan ilgileri dünya çapında giderek daha fazla kabul görmektedir. Arı sütünün ilaç, gıda, kozmetik ve imalat sanayi sektörlerinde kullanımı giderek artmaktadır. Alternatif tedavi kategorisinde adı sıkça anılan arı sütü; ingilizcede mükemmel besin anlamına gelen "Royal Jelly" olarak tanımlanmış olup, önemi 1600'lü yıllarda fark edilmiştir (Haddadin et al., 2012).

Arı sütü yaklaşık 5-15 günlük genç işçi arıların boğaz (hipofaringeal) ve üst çene (mandibular) bezlerinden üretilip salgılanır. İşçi arıların tüm larvaları ilk üç gün arı sütü ile beslerken kraliçe arılar yaşamları boyunca arı sütü ile beslenir. Kraliçe arılar doğurganlıkları ortalama 1000 yumurta/gün, ömürleri 4-5 yıl arasında iken, işçi arılar ise doğurgan olmayan dişilerdir ve 6-8 haftalık kısa bir ömre sahiptirler (Akyol, 2015). Tüm işçi ve kraliçe arıların doğurganlık ve ömür uzunlukları arasındaki anlamlı farklılıklar, beslenmelerinden kaynaklı olabileceğini düşündürmüştü ve bilim insanlarını bu konu hakkında araştırmalara sevk etmiştir (Ramadan and Al-Ghamdi, 2012; Buttstedt et al., 2018; Ramanathan et al., 2018).

Yapılan çalışmalarda, arı larvalarının işçi ve kraliçe gibi alt popülasyonlara farklılaşmasında güçlü bir epigenetik etki olduğu anlaşılmıştır. DNA'da epigenetik modifikasyon ve CpG adalarının metilasyonu ile gen ekspresyonunu değiştirdiği düşünülmektedir (Kucharski et al., 2008).

1.6.1. Arı Sütünün Özellikleri

Arı sütü, işçi arıların çiçek tozu ve nektarı fermente etmeleri ile oluşturdukları doğal bir maddedir. İlk oluştuğunda beyazımsı renkte olup, zamanla sarımtırak renge dönüşmektedir. Asidik, jelatinimsi bir kıvamda, keskin koku ve tada sahiptir. İçeriğinde değişik büyüklükteki çözünmemiş parçacıkların varlığından dolayı genellikle homojen yapıda değildir (Bărnău et al., 2011).

Arı sütü üretimi yaklaşık bir günlük larvaların, yüksüklere aşılmasından 72 saat sonra yapılır. Arı sütünün kovandan 72 saatten daha kısa sürede hasat edilmesine erken hasat denilmektedir. Bu hasat biçiminin, ürünün niteliği ve miktarı üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Kolonilerin arı sütü verimliliği; koloninin gücüne, yavru alanına, polen varlığına, beslenme şekline, başlatıcı kolonilerin ana arı durumuna, aşılana yüksük sayısına, tutma miktarına, hasat zamanına ve mevsim şartlarına bağlıdır. Arı sütü hasatının üzerinden vakit geçtikçe rengi koyulaşır. Tazeliğini koruması için +4 °C’de veya dondurularak saklanması gerekmektedir (Zheng et al., 2011; Kösoğlu vd., 2013).

1.6.2. Arı Sütünün Kimyasal Bileşimi

Arı sütünün kimyasal içeriği; koloninin ırkına, kastına, işçi arılar arasındaki metabolik farklara, yaşadıkları bölgedeki flora zenginliğine ve diğer çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bu yüzden arı sütü üzerine yürütülen çalışmaların verileri, temin edildikleri bölgeye göre farklılık gösterir ve belirli bir standart oluşturmak zordur (Yılmaz vd., 2017).

Arı sütü içeriğinde yaklaşık %66 su, %14,5 karbohidrat, %4,5 lipid, %13 aminoasit, B grubu vitaminlerinin tümüne ek olarak A, D, C, E vitaminleri, biyolojik aktif maddeler ve önemli bazı mineral maddeler bulunmaktadır. Ayrıca 10 esansiyel amino asitten sekizini (metionin, lizin, lösin, fenilalanin, valin, triptofan, treonin, izolösin) polifenoller, başlıca fenolik asitler, flavonoidler, 10-hidroksi-2-dekenoik Asit (10-HDA), royalisin, jelleines, aspimin ve royalactina gibi yüksek biyoaktif bileşikler içeriğinde barındırır (Zorer, 2016). Arı sütünün yaklaşık %14,5’ini oluşturan karbohidrat içeriğinde bol miktarda fruktoz, glikoz, maltoz, trehaloz, gentiobioz eser miktarda da izomaltoz, rafinoz ve melezitoz bulundurmaktadır. (Sabatini et al., 2009; Kheyri et al., 2012).

Arı sütünde bulunan proteinler, insanlar için çeşitli farmakolojik ve biyolojik etkilere sahiptir. Arı sütü proteinlerinin yaklaşık % 80'ini temel arı sütü proteinleri oluşturur, kalan kısmında hormon ve enzim yapısında proteinler bulundurulur. İçeriğinde ayrıca, glukoz oksidaz, glukoz dehidrogenaz, amilaz, katalaz, asit fosfataz, apismin, insülin benzeri peptid, lipid transport fonksiyonlu apolipoprotein III benzeri proteinler ayrıca royalactina, jelleinler, apalbumin ve royalisin bulunduğu bildirilmiştir (Zheng et al., 2011; Foret et al., 2012; Han et al., 2014).

Arı sütünün yağ içeriğinin yaklaşık %80-85'i yağ asitleri, %5-6'sı mumlar, %4-10'u fenoller, %3-4'ü steroidler ve %0,4-0,8'i fosfolipidlerden oluşmaktadır. Arı sütündeki lipit miktarı, lipit oksidasyonu nedeniyle zamanla azalabilmektedir (Terada et al., 2011; Mureşan et al., 2016).

Arı sütünün içeriğinde vitamin olarak; tiamin (B1), riboflavin (B2), piridoksin (B6), biotin, askorbik asit, pantotenik asit, nikotinik asit, folik asit ve inositole farklı oranlarda rastlandığı bildirilmiştir (Akyol, 2015).

Arı sütünün kimyasal içeriğinde adenozin, adenozin mono fosfat (AMP) ve adenozin mono fosfat N1 oksit'in olduğu tespit edilmiştir. Adenozin, ATP ve nükleik asitlerin sentezinde kullanılır. Enzimlerin substratı ve membran potansiyelinin değişikliği, nöronların ve kronik arterlerdeki vasküler düz kas hücrelerinin inhibisyonunda rol oynadığı tespit edilmiştir (Bogdanov, 2012; Uçar, 2018).

Arı sütünün mineral içeriği, kolonin iç (arıların biyolojik) ve dış faktörlerine (çevre, gıda temini ve üretim süresi) bağlı olarak değişmektedir. Arı sütü içeriğinde yaklaşık yirmi sekiz iz element ve mineral bulunduğu tespit edilmiştir (Bărnău et al., 2011; Ramadan and Al-Ghamdi, 2012).

Arı sütü içeriğinde başlıca quercetin, kaempferol, fisetin, flavononların pinosembirin, galangin, naringin, hesperidin, flavonların ise apigenin, acacetin, krisin, galangin ve luteoline flavonoidlerine rastlandığı bildirilmektedir (Bărnău et al., 2011; Ramadan and Al-Ghamdi, 2012).

Arı sütünün, su içeriği yaklaşık %60'ın üzerinde ve homojendir. Yine yaklaşık 0.92'nin üzerinde su aktivitesi ile mikrobiyal stabiliteye sahiptir. Nem içeriğinin sabitliği, temel olarak arıların taze malzeme üretimi, arı sütünün maddenin içinde bulunan suyu uzaklaştırabilme kapasitesi (higroskopikliği) ve koloninin nem koruma davranışları ile sağlanır. Arı sütünün, su içeriğinin bazı bileşiklerin çözünürlüğü ve derişikliğini etkilediği belirtilmiştir (Sbatini et al., 2009; Ramadan and Al-Ghamdi, 2012).

1.6.3. Arı Sütünün Etkileri

Arı sütü zengin içeriği ile anti-bakteriyel, anti-oksidan, anti-kanser, immünmodülatör, anti-inflamatuar, vazodilatatif, hipotansif ve anti-tümör aktivite gibi biyolojik aktivitelerinin yanında hafıza geliştirici, sindirim sistemi, kan şekeri (antidiyabetik etki), obezite düzenleyici özelliklere sahip bir arı ürünüdür (Viuda-Martos et al. 2017). Yine apoptoz ve antiproliferatif yolların indüklenmesinde ve hücre sinyal yolları ile etkileşimi sayesinde antikanser özelliğe sahip olduğu bazı bilimsel çalışmalarda gösterilmiştir (Pasupuleti et al., 2017).

Alternatif besin olarak tüketilen arı sütünün sağlıklı büyümeyi etkilediği, bağışıklık sistemini güçlendirdiği, nörogenezi, hipoglisemik, antihiperkolestrolemik, diyabet, kalp damar hastalıkları, yaşlanma ve metabolik sendroma karşı insanları koruduğu, üreme hücrelerinin sayı ve kalitesini artırdığı, yara iyileştirmede etkili, östrojenik etkiye sahip, antiviral, antifungal, antiinflamatuar, antitümoral aktivite gibi pek çok özelliğe sahip olduğu bilimsel çalışmalarda bildirilmektedir (Pavel et al., 2011; Viuda-Martos et al., 2017; Sorucu, 2019).

Arı sütü ve probiyotik bakteri türlerinin simbiyotik etkisine önemli antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Nabas et al., 2014). Arı sütünde bulunan royalisin antibakteriyel bir peptittir ve gram pozitif-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Bărnău et al., 2011; Biliková et al., 2015). Arı sütünde bulunan bir diğer bileşik olan royalactin, bal arılarında kraliçenin farklılaşması için gerekli olan bir glikoproteindir. Royalactin, araştırmacılara göre epigenetik değişikliklere yol açan, epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptör sinyal yolunu açarak bu süreçte merkezi bir rol oynamaktadır (Kamakura, 2011).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Vinkristin çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Yapılan deneysel bir çalışmada vinkristin uygulaması sonucu sıçanların hepatik serum parametreleri olan ALT ve AST seviyelerinin yükseldiği tespit edilmiştir. Ayrıca karaciğer IL-4 ve IL-12 gibi sitokinlerin mRNA transkript seviyelerinde yükselme görülmüştür. Öte yandan vinkristin tedavisinin kaspaz-3 ve Bax protein seviyelerini arttırdığı ve Bcl-2 mRNA transkript seviyelerini azaltarak hepatik apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Shati et al., 2019).

Bir başka çalışmada, sıçanlarda vinkristin sülfat kaynaklı hepatotoksisite incelenmiştir. Vinkristin uygulamasının ardından sıçanlarda AST, ALT ve ALP enzimlerinin yanı sıra bilirubin seviyelerinde önemli artışlar rapor edilmiştir (Harchegani et al., 2019).

Rezaeikia ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, yetişkin erkek sıçanlara verilen vinkristin karaciğerde oksidatif stres ile birlikte AST, ALT ve ALP enzimleri ve MDA seviyelerinde yükselmelere neden olduğu bildirilmiştir (Rezaeikia et al., 2019).

Sisplatin, en aktif sitotoksik antineoplastik ajanlardan biridir ve hepatotoksisite başta olmak üzere istenmeyen birçok yan etkilere sahiptir. Sisplatin ile yapılan bir çalışmada sıçan karaciğerlerinde glutatyon, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzim aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı öte yandan ALT ve AST aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir. Çalışmada arı sütünün karaciğerde, güçlü bir serbest radikal temizleyicisi olarak sisplatin kaynaklı hepatotoksisiteye karşı koruma sağladığı bildirilmiştir (Ashry and Elkady, 2014).

Sisplatin, çeşitli kanser tedavilerinde etkin kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Yetişkin erkek sıçanlar ile yürütülen bir çalışmada sisplatin ile indüklenen karaciğer hasarına karşı arı sütünün etkileri incelenmiştir. Arı sütünün, karaciğerde oluşan toksisite ile artan AST ve ALT aktivitelerini azalttığı belirtilmiştir (Silici et al., 2011).

Diyabetik sıçanlar ile yapılan bir çalışmada, sıçanların streptozotosin (STZ) tarafından indüklenmesi ile karaciğer ve pankreaslarında oluşan oksidatif stres hasarına karşı arı sütünün iyileştirici etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Ghanbari et al., 2016).

Malign tümörlerin tedavisinde kullanılan siklofosfamid etkin bir kemoterapötik ajandır. Siklofosfamid diğer birçok kemoterapötik ajanlarda görüldüğü gibi istenmeyen yan etkilere sahiptir. Wistar sıçanları ile yapılan bir çalışmada kırmızı ve beyaz kan hücreleri (RBC, WBC) ve trombositlerin (PLT), sayısında azalışa neden olmakta ve ayrıca dalak, kemik iliği ve testislerde histolojik tahribatlara neden olmuştur. Arı sütünün siklofosfamid kaynaklı kemik iliği, dalak ve testis histolojik dokuyu ve trombositopeniye karşı koruyucu etkiler seğılediğı bildirilmiştir (Khazaei et al., 2020).

Deneyssel bir çalışmada sıçanların STZ ile indüklenmesi sonucu diyabetik sıçanların böbreklerinde hasar meydana gelmiştir. Sıçanların arı sütü ile tedavisi sonucunda, böbrek dokusu morfolojisi ve idrar parametrelerinin seviyelerinde önemli bir iyileşme gözleendiğini ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar arı sütünün diabetes mellitustan etkilenen böbrekler üzerinde koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir (Ghanbari et al., 2015).

Sentetik bir androjen analogu olan oxymetholone, osteoporoz ve anemi hastalıkları için aktif kullanılan bir ilaçtır. Otuz iki yetişkin erkek fare üzerinde yürütölen bir çalışmada, oxymetholone ile karaciğer dokusu indüklenerek oksidatif stres ve hepatoksisite meydana gelmiştir. Arı sütünün antioksidan ve radikal süpürücü aktiviteleri ile karaciğer dokusundaki hasarda iyileşme gözleendiğı bildirilmiştir (Nejati et al., 2016).

Diklofenak, analjezik anti-inflamatuar ve anti-piretik aktiviteleri sebebi ile çeşitli tedavilerde kullanılan steroid olmayan antienflamatuar (NSAID) bir ilaçtır. Diklofenak kaynaklı karaciğer toksisitesinin çoklu sitokrom P-450 enzimleri tarafından metabolize edilmesi ile karaciğerde protein, ilaç eklentileri, GSH konjugasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve organ hasarı oluşmuştur. Arı sütünün hepato-renal hasara ve gastrointestinal ülserasyona karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Mostafa et al., 2020).

Azatioprin, katı organ transplantasyonu, hematolojik maligniteler, aktif romatoid artrit ve inflammatuar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanılan immünosupresif bir ilaçtır. Otuz yetişkin erkek Wistar Albino sıçanı ile yürütölen çalışmada, arı sütü güçlü antioksidan ve serbest radikal temizleme kapasitesi ile azatioprinin neden olduğı hepatoksisiteyi önemli ölçüde iyileştirdiğı bildirilmiştir (Ahmed et al., 2014).

Kadmiyum klorür, toksik bir ağır metaldir. Kadmiyumun apoptoza, inflamasyona ve oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada; arı sütünün antiinflamatuvar ve antioksidan aktivitesi ile Nrf2 yolağını geliştirdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca kadmiyum kaynaklı hepatotoksik yan etkileri iyileştirdiği oksidatif stres, inflamasyonu önlediği ve hepatik doku hasarını inhibe ettiği bildirilmiştir (Almeer et al., 2018).

Hidroksiüre, talasemi çeşitli maligniteler ve orak hücreli anemi için aktif olarak kullanılan bir ilaçtır. Yapılan çalışmada, ratlar hidroksiüre ile tedavi edildikten sonra, AST, ALT ve ALP gibi karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme gözlemlenmiştir. Çalışmada arı sütü uygulamasının, karaciğer histolojisi ve hepatik oksidatif/antioksidatif değerlerini iyileştirdiği bildirilmiştir (Tohamy et al., 2022).

Diklorvos, normal dokular üzerinde çeşitli yan etkiler sebep olan organofosforlu bir pestisittir. Kırk sekiz erkek sıçan ile yürütülen çalışmada, diklorvos uygulanan sıçanların, karaciğerindeki hepatositlerin sayısının azaldığı ve merkezi damar çaplarının büyüdüğü gözlemlenmiştir. Çalışma da arı sütünün uygulamasının ardından, diklorvos kaynaklı karaciğer parametrelerinde iyileşme gözlemlenmiş ve karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Jalili et al., 2022).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada, Bingöl Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde (BÜDAM) yetiştirilen ve ağırlıkları 250-300 gr olan 35 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar 24-25 °C sabit sıcaklık ve onikişer saatlik karanlık-aydınlık siklusü (07:00-19:00 aydınlık; 19:00-07:00 karanlık) sağlanarak kontrollü bir odada, kafeslerde tutuldu. Ratlar bu şekilde bir hafta boyunca kafeslerinde dinlendirilerek ortama uyumları sağlandıktan sonra deneylere başlandı. Deneysel süreçte ratlara standart rat yemi ve su *ad libitum* verildi. Tüm hayvan deneyleri BÜDAM merkezinde yapıldı. Çalışma Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığının 08.09.2021 tarihli (toplantı sayısı 2021/5) ve karar no: 05/02 izni ile belgelendirildi.

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Vinkristin: Çalışmada vincristine sulfate (1mg/1ml, Koçak Farma) kullanıldı. Deneysel uygulamada vinkristin intraperitoneal olarak uygulandı. Kullanılan diğer kimyasal maddeler Sigma-Aldrich (ABD) ve Merck (Almanya) firmalarından satın alınmıştır.

Arı sütü: Çalışmada kullanılan arı sütü, Bingöl Arıcılar Birliğine kayıtlı yerel arıcılardan temin edildi. Arı sütü, 2021 ilkbaharında Bingöl'de yerel arıcılar tarafından üretilip toplandı ve -20 °C'de muhafaza edildi. Arı sütü distile suda çözülerek oral yoldan verildi.

3.3. Arı Sütünün Kimyasal İçeriğinin LC-MS/MS ile Belirlenmesi

Arı sütünün sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile kimyasal içeriğinin kantitatif olarak belirlenmesi, içeriğinde birçok biyolojik aktivite gösteren bileşiklerin araştırılmasıyla yapıldı. Bu kapsamda internal standartlar da dahil olmak üzere 53 fitokimyasal bileşiğin kantitatif analizi yapıldı. Bu bileşikler şunlardır: Kinik asit, fumarik asit, akonitik asit, gallik asit, epigallokateşin, protokateşik asit, kateşin, gentisik asit, klorojenik asit, protokateşik aldehit, tannik asit, epigallokatekin galat, 1,5-

dikaffeoilkinik asit, 4-OH benzoik asit, epikateşin, vanilik asit, kafeik asit, şiringik asit, vanilin, şiringik aldehit, daidzin, epikateşin gallat, piceid, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, kumarin, salisilik asit, sinarosid, miquelianin, rutin, izokersitrin, hesperidin, o-kumarik asit, genistin, rosmarinik asit, ellagik asit, kozmosin, kuersitrin, astragalin, nikotiflorin, fisetin, daidzein, kuersetin, naringenin, hesperetin, luteolin, genistein, kaempferol, apigenin, amentoflavon, chrysin ve acacetin (Yılmaz, 2020). Arı sütünün LS-MS/MS analizi için öncelikle arı sütünün ekstraksiyonu yapıldı ve cihaz için uygun hale dönüştürüldü. Bunun için 0.15 gr numune tartıldı ve 1.5 mL saf su ilave edildi. Sonrasında 2 dk vortekslandı. Daha sonra, özütten 500 µL, mobil faz (amonyum asetat 30 mM, pH 5 ve MeOH, 50:50, v/v) ile 5 mL'ye kadar seyreltildi. Son olarak 0.20 µm naylon filtreden (numunelerde bulunan partikülleri elimine etmek için) süzüldü ve vialde alındıktan sonra cihaza verildi. Analiz ise önceden metot validasyonu yapılmış ve oturtulmuş metot üzerinden yapıldı (Yılmaz, 2020). Sonuç olarak arı sütünde biyolojik aktivite gösteren bileşiklerin kantitatif analizi yapılarak hangi bileşiklerin ne kadar bulunduğu hesaplandı.

3.4. Metot

3.4.1. Deneysel Uygulamalar

Wistar Albino cinsi erkek ratlar rastgele, her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

1. Grup (Kontrol grubu); 1-6 ve 9-14. günler serum fizyolojik çözeltisi intraperitoneal (i.p.) uygulandı.
2. Grup (Arı sütü grubu); 1-6 ve 9-14. günler 300 mg/kg dozunda arı sütü oral yoldan gavaj ile birlikte verildi. (Mostafa et al 2020).
3. Grup (VCR grubu); 1-6 ve 9-14. günler 0.1 mg/kg vinkristin serum fizyolojikte çözdürülerek i.p. enjeksiyon yapıldı (Yardım et al. 2020).
4. Grup (VCR + Arı sütü 150 mg/kg grubu); 1-6 ve 9-14. günler 0.1 mg/kg dozunda vinkristin (total kümülatif doz 1.2 mg/kg olacak şekilde) serum fizyolojikte çözdürülerek i.p. enjeksiyon yapıldı. Vinkristin uygulamasından 30 dk önce arı sütü 150 mg/kg dozunda oral yoldan gavaj ile verildi.

5. Grup (VCR + Arı sütü 300 mg/kg grubu); 1-6 ve 9-14. günler 0.1 mg/kg dozunda vinkristin (total kümülatif doz 1.2 mg/kg olacak şekilde) serum fizyolojikte çözündürülerek i.p. enjeksiyon yapıldı. Vinkristin uygulamasından 30 dk önce arı sütü 300 mg/kg dozunda oral yoldan gavaj ile verildi.

3.4.2. Deney Sonunda Numunelerin Alınması

Çalışma süresinin bitiminde (son vinkristin ve arı sütü uygulamasından 24 saat sonra) hayvanlar hafif sevofloran anestezisi altında dekapite edilerek kan ve karaciğer dokuları alındı. Kan örnekleri biyokimyasal analizler için sarı kapaklı serum tüplerine aktararak, 4000 devirde +4 °C’de 10 dk santrifüj edilerek serumlar ayrılıp, biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -20 °C’de buzdolabında saklandı. Karaciğer dokuları ise biyokimyasal ve moleküler analizler için alınarak analizler yapılncaya kadar -20 °C’de saklandı. Deneyleri yapmaya başlamadan önce sıvı azot kullanarak TissueLyser II (Qiagen) cihazı ile 5 mikron çapa kadar öğütülen karaciğer dokularından gerekli miktarlar tartılarak analizlere göre uygun olan tamponlarla sulandırıldı ve homojenizasyon yapıldı.

3.5. Karaciğer Fonksiyon Testleri

Karaciğer fonksiyonlarının en önemli göstergelerinden olan serum ALP, AST ve ALT aktiviteleri Randox otonalizatör cihazı vasıtasıyla ölçüldü.

3.6. Biyokimyasal Analizler İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması

Ratlardan alınan karaciğer dokularında oksidatif stres belirteçlerinden olan malondialdehit (MDA) seviyesi ile antioksidan savunma sistemi parametrelerinden olan enzimatik antioksidanlardan glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktiviteleri ile non-enzimatik antioksidan olan glutatyon (GSH) seviyeleri incelenmiştir. Enzim aktivitelerini g protein cinsinden ifade edebilmek için karaciğer doku homojenatında protein düzeyleri de incelenmiştir.

Bu tez kapsamında derin dondurucuda bulunan karaciğer dokuları çıkarılıp üzerine sıvı azot ilavesi yapılarak doku parçalayıcı (TissueLyser II) cihazı ile dokular parçalanıp toz haline getirildi. Sonrasında deney protokollere göre dokular tartılarak GPx, GSH, MDA ve protein analizleri için %1,15'lik potasyum klorür (KCl) ile sulandırılarak bir doku homojenizatörü yardımıyla homojenize edildi. Daha sonra bu homojenatlar MDA ve protein analizi için 3500 rpm'de 15 dk, GSH ve GPx aktivite tayini için 11000 rpm'de 20 dk boyunca santrifüj edilerek süpernatant kısım kullanıldı. SOD aktivite tayini için karaciğer dokusu Tris-HCl Tamponu (pH 7.4) ile sulandırılarak homojenize edildi ve 7000 rpm'de 60 dk boyunca santrifüj edilerek süpernatant kısım analizde kullanıldı. KAT enzim aktivite tayininde ise dokular Triton-x-100 ile sulandırılarak homojenize edildi ve 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant kısım aktivite tayini için kullanıldı.

3.6.1. GPx Aktivitesinin Ölçümü

Lawrance and Burk yöntemine göre GPx aktivitesi ölçümleri yapıldı (Lawrance and Burk, 1976).

Reaktifler:

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

Analiz metodu:

Tablo 3.1. GPx aktivitesinin ölçümü

	Kontrol (ml)	Örnek (ml)
Süpernatant	0.5	0.5
Tampon	0.3	0.3
CHPO	-	0.1
Red GSH	0.1	0.1
37 °C’de 10 dk. bekleme	+	+
TCA	1	1

Tüpler karıştırıldıktan sonra;

1. 2500 rpm' de 5 dk. santrifüj edildi.
2. Süpernatant’ dan 1 ml alınarak hazırlanan yeni tüplere konuldu.
3. 2 ml tampon B eklendi.
4. 0.1 ml DTNB ilave edildi.
5. Oda sıcaklığında 5 dk. bekletilerek 412 nm' de distile suya karşı okundu.

Karaciğer dokularında GPx Aktivitesinin Hesaplanması:

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

3.6.2. GSH Tayini

Hazırlanan homojenatta GSH düzeyinin ölçümü Sedlak ve Lindsay’ ın bildirdiği metoda göre yapıldı (Sedlak and Lindsay, 1968). Bu metoda göre, sülfidril gruplu bileşikler tarafından indirgenir ve meydana gelen sarı renk spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ölçülür.

Analizde Kullanılan Ayıraçlar:

%10'luk TCA

Tris (hidroksimetil) aminometan: 48.46 gr alınarak distile suda çözündürülüp toplam hacim 1000 ml distile su ile tamamlandı ve pH: 8.9' a ayarlandı.

DTNB'den 0.099 g alındı 25 ml metanol' de çözüldü.

Analiz metodu:

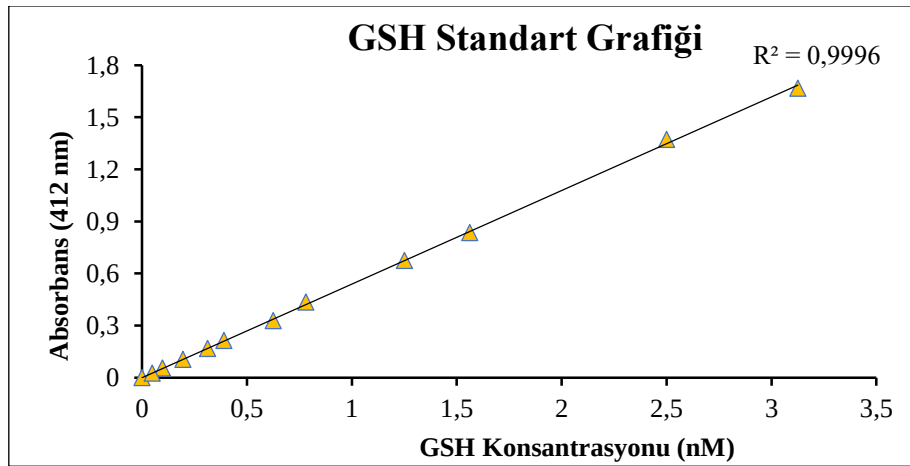
0.5 ml doku homojenatı alınarak deney tüpüne aktarıldı. Deney tüpünün üzerine 2 ml TCA eklendi 20 sn. vortekste karıştırıldı.

2500 rpm' de 5 dk santrifüj edilip süpernetanttan 0.5 ml alındı.

Üzerine 2 ml Tris Tamponu eklendi, sonrasında 0.1 ml DTNB solüsyonu eklendi.

Karıştırılan tüpler 5 dk. bekletildikten sonra 412 nm dalga boyunda distile suya karşı okundu.

Sonuçlar GSH standart grafiğinden hesaplandı.



Şekil 3.1. GSH standart grafiği

3.6.3. MDA Seviyesinin Ölçümü

Karaciğer doku homojenatında MDA tayini Placer vd. (1966) bildirdiği metoda göre yapıldı. Bu yöntemde MDA bir lipid peroksidasyon aldehit ürünüdür ve tiyobarbitürik asit (TBA) ile pembe renkli bir karmaşık yapı oluşturur. Oluşan bu karmaşık çözeltinin absorbansı 532 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülerek lipid peroksidasyon derecesi belirlenmiş olur.

Reaktifler;

1. TCA solüsyonu: %10'luk çözeltisi hazırlandıktan sonra ışık almayacak şekilde oda sıcaklığında muhafaza edildi.
2. TBA solüsyonu: 0.67 g tiyobarbitürik asit % 10'luk 80 ml perklorik asit içinde çözülüp 100 ml' ye distile su ile tamamlandı.
3. Renk ayırıcı: 1 birim TBA ve 3 birim TCA kullanımdan hazırlandı.

Analiz metodu:

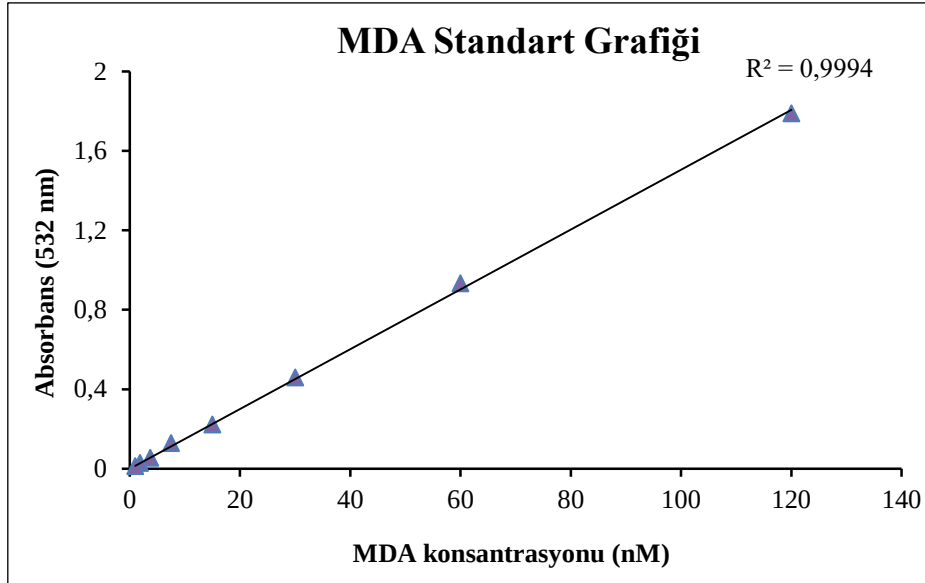
Tablo 3.2. MDA düzeyinin ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	-	0.25
%0.9 NaCl	0.25	-	-
Renk Ayırıcı	2.25	2.25	2.25
Standart	-	0.25	

Deneyde vida kapaklı cam tüpler kullanıldı. Tablodaki işlemler gerçekleştirildikten sonra karışım 5 dk vorteks ile karıştırıldı. Sonrasında tüpler 100 °C'lik su banyosunda 20 dk boyunca kaynatıldı ve ardından çeşme suyu yardımıyla soğutuldu. Tüpler 2500 rpm' de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant alındı ve 532 nm dalga boyunda köre karşı okundu.

Dokuda MDA düzeyinin hesaplanması;

Dokudaki MDA düzeyleri, MDA standart grafiğinden (şekil 3.2) yararlanılarak hesaplandı ve sonuçlar nmol/g doku olarak verildi.



Şekil 3.2. MDA Standart Grafiği

3.6.4. SOD Aktivitesinin Ölçümü

Karaciğer doku homojenatındaki SOD aktivitesinin ölçümü Sun ve vd. yöntemine göre yapıldı (Sun et al., 1988). Kısacası bu yöntem ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalının nitroblue tetrazolyumu (NBT) indirgeyerek oluşan renk esasına dayanır. Oluşan bu renkli çözelti 560 nm’ de maksimum absorbans veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlanır. Enzimin olmadığı ortamda indirgenme maksimum olup, koyu mavi renk oluşmaktadır. SOD olduğu ortamda ise enzim, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit’e dönüştürerek NBT indirgenmesini azaltmakta ve renk değişimi gözlenmemektedir. Formazonun oluşumu enzim konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Formazonun 560 nm’ de vermiş olduğu absorbans ile SOD aktivitesi hesaplanmış olur.

Reaktifler;

1. SOD ölçüm karışımı:

- a) 0.3 mmol/L ksantin: 9.13 mg alınıp toplam hacim 200 ml olacak şekilde distile suda çözündürüldü.
- b) 0.6 mmol/L Na₂EDTA: 23 mg alınıp toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözündürüldü.
- c) 150 µmol/L NBT: 12.3 mg alınıp distile suda çözündürüldü ve toplam hacim 100 ml’ye tamamlandı.

d) 400 mmol/L Na_2CO_3 : 2.54 g alınıp distile suda çözdürüldü ve toplam hacim 60 ml'ye tamamlandı.

e) 1 g/L Bovine serum albumine (BSA): 30 mg alınıp 30 ml distile suda çözdürüldü.

Hepsi karıştırılıp koyu renkli şişede +4 °C' de muhafaza edildi.

2. 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2.64 g amonyum sülfat tartılıp distile suyla 10 ml' ye tamamlandı.

3. Ksantin oksidaz (167 U/L): Mililitresinde 0.167 U olacak şekilde 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içinde çözdürüldü.

4. 0.8 mmol/L CuCl_2 : 13.6 mg CuCl_2 alınıp distile suyla 100 ml' ye tamamlandı.

Analiz metodu:

Tablo 3.3. SOD aktivitesinin ölçümü

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

20 dk oda ısısında inkübasyon sonunda tüplerin tümüne 1 ml CuCl_2 ilave edilerek reaksiyon sonlandırılıp, 560 nm' de absorbands okundu.

Dokuda SOD aktivitesinin hesabı:

$$\text{EU/g protein} = \frac{\Delta A_{\text{kör}} - \Delta A_{\text{numune}}}{\Delta A_{\text{kör}}}$$

Dokuda U/g protein olarak hesaplanır.

3.6.5. KAT Aktivitesinin Ölçümü

Karaciğer dokusundaki KAT aktivitesi Aebi (1984) metoduna göre ölçüldü. KAT enzimi, hidrojen peroksitin (H_2O_2) suya ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder. Bu enzimatik deney 240 nm' de H_2O_2 ' in ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanır.

Reaktifler:

1. 30 mM H_2O_2 : 0.34 ml %30' luk H_2O_2 fosfat tamponu ile 100 ml' ye tamamlanır.
2. 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0)

Analiz metodu:

Tablo 3.4. KAT aktivitesinin ölçümü:

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

Kör ile 240 nm' de numunenin kinetik olarak 0. (Abs1) ve 30. (Abs2) saniyelerdeki absorbans farkının ölçülmesiyle KAT aktivitesi hesaplandı.

Dokuda KAT aktivitesinin hesabı:

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

Doku için spesifik aktivite: k/g protein olarak verildi.

3.7. Gen Ekspresyon Analizleri

3.7.1. Primer Dizaynı

İlgili genlere ait mRNA transkript seviyelerinin Real Time PCR ile ölçülebilmesi için gerekli primerler <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> linkindeki Primer Dizayn programı ile tasarlanmıştır. İlgili primer dizilimleri tablo 3. 5 de verilmiştir.

Tablo 3. 5. Primerlerin dizilimleri

Gen	Sekans (5'-3')	Uzunluk (bp)	Erişim no
NF-κB	F: AGTCCCGCCCCTTCTAAAAC R: CAATGGCCTCTGTGTAGCCC	106	NM_001276711.1
IL-1β	F: ATGGCAACTGTCCCTGAACT R: AGTGACACTGCCTTCCTGAA	197	NM_031512.2
TNF-α	F: CTCGAGTGACAAGCCCGTAG R: ATCTGCTGGTACCACCAGTT	139	NM_012675.3
ATF-6	F: TCAACTCAGCACGTTCCCTGA R: GACCAGTGACAGGCTTCTCT	130	NM_001107196.1
PERK	F: GATGCCGAGAATCATGGGAA R: AGATTGAGAAAGGGACTCCA	198	NM_031599.2
IRE1	F: GCAGTTCCAGTACATTGCCATTG R: CAGGTCTCTGTGAACAATGTTGA	163	NM_001191926.1
GRP78	F: CATGCAGTTGTGACTGTACCAG R: CTCTTATCCAGGCCATATGCAA	143	NM_013083.2
LC3A	F: GACCATGTTAACATGAGCGA R: CCTGTTCATAGATGTCAGCG	139	NM_199500.2
LC3B	F: GAGCTTCGAACAAAGAGTGG R: CGCTCATATTCACGTGATCA	152	NM_022867.2
β-Actin	F: CAGCCTTCCTTCTTGGGTATG R: AGCTCAGTAACAGTCCGCCT	360	NM_031144.3

3.7.2. Total RNA İzolasyonu

Ratların karaciğer dokuları sıvı azot içerisinde parçalanarak toz hale getirildi. Bu işlem için bir homojenizatör (Tissue Lyser II, Qiagen, Netherlands) kullanıldı. Toz hale getirilen dokulardan 60 mg tartılarak steril ependorf tüplere aktarıldı. Dokuların üzerine 2 ml HibriGen hibrizol reaktifi eklenerek 30 saniye boyunca homojenizatör'de 30 hZ hızda homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası nükleoprotein komplekslerinin ayrışmasının tamamlanması için numuneler oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Daha sonra her 1 ml hibrizol reaktifi için üzerlerine 0.2 ml kloroform eklendi. Tüm tüpler 15 saniye çalkalandı ve 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler 12000 rpm'de 4 °C'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerde oluşan 3 fazdan en üstte bulunan berrak sıvı başka bir ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 1 ml izopropanol eklendi (her 1 ml hibrizol reaktifi için 0.5 ml izopropanol eklenir). Tüpler birkaç kez alt üst edilerek izopropanol ile RNA çözeltisi karıştırıldı ve ardından oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 12000 rpm'de 4 °C'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant dikkatli bir şekilde dökülerek peletin üzerine 1 ml etanol (RNaz bulundurmeyen su ile hazırlanan %75'lik etanol) eklendi ve hafifçe karıştırıldı. Sonrasında 12000 rpm'de 4 °C'de 2 dk boyunca santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Etanol döküldükten sonra tüplerde bulunan RNA peleti etanol uçuncaya kadar kurutuldu. Daha sonra pelet RNaz bulundurmeyen su ile çözdürüldü ve her bir örneğin konsantrasyonu NanoDrop (BIO-TEK INSTRUMENTS EPOCH, USA) cihazında ölçüldü. Elde edilen konsantrasyon değerlerine göre her bir örneğin RNA konsantrasyonu 10 µl hacimde 1000 ng/µl konsantrasyonda eşitlendi.

3.7.3. Total RNA'lardan cDNA Eldesi

Total RNA'larda çift zincirli cDNA eldesi için ticari bir kit (iScript™ cDNA Synthesis Kiti, BIO-RAD, USA) kullanıldı. Firmanın kit ile birlikte sunduğu prosedüre göre 0.2 ml pcr tüpleri içinde 10 µl total RNA, 5 µl 5x iScript Reaction Mix, 1 µl iScript Reverse Transcriptase ve 4 µl iScript Nuclease-free water ile 20 µl hacimde karışım hazırlandı. Daha sonra tüpler yine prosedürde belirtilen sıcaklık ve süreler olan 25°C'de 5 dk, 46°C'de 20 dk ve 95°C'de 1 dk tutularak cDNA sentez işlemi tamamlandı.

Bu işlemler ROTORGENE Q (Qiagen, Germany) cihazında gerçekleştirildi. Daha sonra cDNA konsantrasyonları yine NanoDrop cihazında ölçüldü.

3.7.4. Real Time PCR Aşaması

Tablo 3.5’te dizilimleri verilen genlerin karaciğer dokusunda mRNA transkript seviyelerini belirlemek için 2 µl cDNA üzerine 10 µl iTaq Universal SYBR® Green Supermix (2x), 1 µl forward primer (ilgili gene ait primer), 1 µl reverse primer (ilgili gene ait primer) ve 6 µl RNaz-DNaz içermeyen su eklenerek karışım hazırlandı. Daha sonra karışım ROTOR-GENE Q (Qiagen, Germany) cihazında Tablo 3.6’da verilen döngülere göre inkübe edildi. Tüm işlemler iTaq Universal SYBR® Green Supermix (2x) (BIO-RAD) ile birlikte firmanın sunduğu prosedüre göre yapıldı. İşlem sonunda cihazdan alınan CT değerleri ile $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak her bir genin ekspresyon seviyeleri belirlendi (Livak and Schmittgen, 2001).

Tablo 3.6. Reaksiyon döngüleri

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	Döngü
Polimeraz Aktivasyonu ve DNA Denatürasyonu	95	30	1
Denatürasyon	95	5	40
Annealing/Extension ve Plate Okuma	60	30	40
Erime eğrisi analizi	65-95	2-5	1

3.8. Western Blot Analizi

Elde edilen toz halindeki karaciğer dokuları proteaz inhibitör kokteyl, fosfataz inhibitörü ve sodyum ortovanadat içeren 1ml RIPA liziz tamponunda (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA) 100 mg doku çözündürülerek buz içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 16000 g’de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı western blot analizi için kullanıldı. Homojenatlardaki protein konsantrasyonu BSA standart olarak kullanılarak Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Rockford, IL, USA) ile belirlendi. Süpernatanttan 30 µg protein alınarak örnek tamponunda (Tris-HCl pH:6.8, glycerol,

sodium dodecyl sulphate, β -mercaptoethanol, bromophenol blue) çözöldü ve % 10 sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezinde (SDS-PAGE) proteinler ayrıldı.

3.8.1. SDS-PAGE Analizinde Kullanılan Ayıraçlar

Akrilamid Stok Solüsyonu (%30): 14.6 g akrilamid ve 0.4 g N, N'-metilen bisakrilamid 50 mL'ye distile suyla tamamlandı ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dk süreyle karıştırıldı. Süzgeç kâğıdından geçirilerek süzöldü. Koyu renkli şişede +4°C'de en fazla 2 hafta muhafaza edildi.

Resolving Jel Tamponu [1.5 M tris-HCl (pH 8.8)]: 18.15 g trizma-base yaklaşık 90 mL distile suda eritildi ve 1N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. Toplam hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanarak +4°C'de saklandı.

Stacking Jel Tamponu [0.5 M tris-HCl (pH 6.8)]: 6.1 g trizma-base yaklaşık 90 mL distile suda eritildi ve 1N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. Toplam hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanarak +4 °C' de saklandı.

Tris-Glisin Elektrod Tamponu (pH 8.3): 1.515 g tris, 7.2 g glisin ve 0.25 g SDS distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Örnek Yükleme Tamponu: 4 mL distile su, 1 mL 0.5M tris-HCl (pH 6.8) (stacking jel tamponu), 0.8 mL gliserol, 1.6 mL %10 SDS, 0.4 mL 2- β -merkaptöetanol, 0.2 mL %0.05 bromfenol mavisi karıştırıldı. Koyu renkli şişede, oda ısısında en fazla 3 ay süreyle saklandı.

%10 (a/h) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 10 g SDS 50 mL distile suda hafifçe karıştırılarak çözöldü ve toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

%10 (a/h) Amonyum Persülfat (APS): 100 mg amonyum persülfat üzerine 1 mL distile su ilave edildi. Kullanmadan hemen önce, taze olarak hazırlandı.

Bromfenol Mavisi Solüsyonu: 50 mg bromfenol blue yaklaşık 5 mL distile suda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

%5 (h/h) Asetik Asit Solüsyonu: 50 mL Asetik asit distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Jeller bu solüsyonda saklandı.

3.8.2. SDS-PAGE Analizi

Başlangıçta elektroforez plakaları saf su ile yıkandıktan sonra, düz cam plakalar plastik mikalar yardımı ile 1 mm kalınlığında sandviç teşkil edecek şekilde bir araya getirildi. İlk önce resolving jel (Tablo 3.7) 10 mL'lik bir enjektör yardımıyla plakaların arasına döküldü, bu işlemde hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Doldurma işlemine üst kenara 3 cm kalıncaya kadar devam edildi. Jelin ilavesinden sonra 1 mL'lik bir enjektör ile jel yüzeyi üzerinde distile suyla doyurulmuş bütanol ile ince bir tabaka meydana getirildi. Bu işlemin temel amacı düz bir polimerizasyon hattını meydana getirmek içindi. Polimerizasyon için en az 2 saat beklenildikten sonra süzgeç kağıdıyla su uzaklaştırıldı ve stacking jel (Tablo 3.7) hazırlanıp hava kabarcıklarının oluşmasına izin vermeden bir enjektör yardımı ile döküldü. Hemen ardından plakaların üst kısmına 1 mm kalınlığındaki taraklar yerleştirildi ve en az 3 saat süreyle polimerizasyon için beklenildi. Sürenin sonunda taraklar çıkarıldı ve polimerizasyon artıklarını uzaklaştırmak için 3 defa tris-glisin elektrod tamponuyla (pH 8.3) kuyucuklar yıkandı. Yıkama sonrası aynı tampon ile kuyucuklar dolduruldu ve numuneler 10 µL hacminde kuyucuklara uygulandı. 20 mA/jel sabit akım modunda yaklaşık 1 saat süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi (Laemmli, 1970).

Tablo 3.7. SDS-PAJE jellerinin kompozisyonları

	Rezolving Jel (%10)	Stacking Jel (%4)
dH ₂ O	32.1 mL	12 mL
Tris-HCl pH 8.8	20 mL	-
Tris-HCl pH 6.8	-	5 mL
%10 SDS	0.8 mL	0.2 mL
Akrilamid stok	26.7 mL	2.66 mL
APS	400 µL	100 µL
Tetrametiletildiamin (TEMED)	27 µL	10 µL

Proteinlerin ayrıldıktan sonra Thermo Fischer Pierce Power Station (Model No:22838) cihazında 25V, 1.3A, 10 dk protokolü kullanılarak polyvinylidene fluoride (PVDF) membranlara aktarıldı. Daha sonra membranlar 1.5 saat boyunca % 0.1 Tween 20 ihtiva eden tris-tamponu tuzunda [20 mM Tris, 150 mM NaCl, ve 0.1 Tween 20 (a/h)] çözünmüş %5 BSA ile bloklandı. Bloklamadan sonra membranlar 5 defa 5 dk boyunca TBST ile yıkandı ve spesifik antikorları [Bax (Santa Cruz Biotechnology, sc-7480, 1:500 sulandırma), Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7382, 1:500 sulandırma), Caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7272, 1:500 sulandırma), NF- κ B (Santa Cruz Biotechnology, sc-8008, 1:500 sulandırma), β -Actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778, 1:500 sulandırma)] eklenerek gece boyunca +4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra membranlar 5 dk boyunca 5 defa TBST ile yıkandı ve sonrasında goat anti-mouse IgG sekonder antikor (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005, 1:1000 sulandırma) eklendi ve 1.5 saat boyunca inkübe edildi. Sekonder antikor ile inkübasyondan sonra 5 dk boyunca 5 defa TBST ile yıkandı. Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, USA) kemilüminesan reaktifi eklenerek prtein bantları görünür hale getirildi ve ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) cihazında görüntülendi. ImageLab (Version 6.0.1, Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) programı kullanılarak protein bantlarının rölatif dansitesi hesaplandı.

3.9. İstatiksel Analiz

Biyokimyasal verilerin istatistiksel analizi için SPSS 20.0 paket programı kullanıldı. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 5.01 yazılımı ile gerçekleştirildi. İstatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri “One-way Analysis of Variance (ANOVA)” testi ile belirlenirken gruplar arası farkların tespitinde Tukey testinden yararlanıldı. $P < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Arı Sütünün LC-MS/MS Analiz Sonuçları

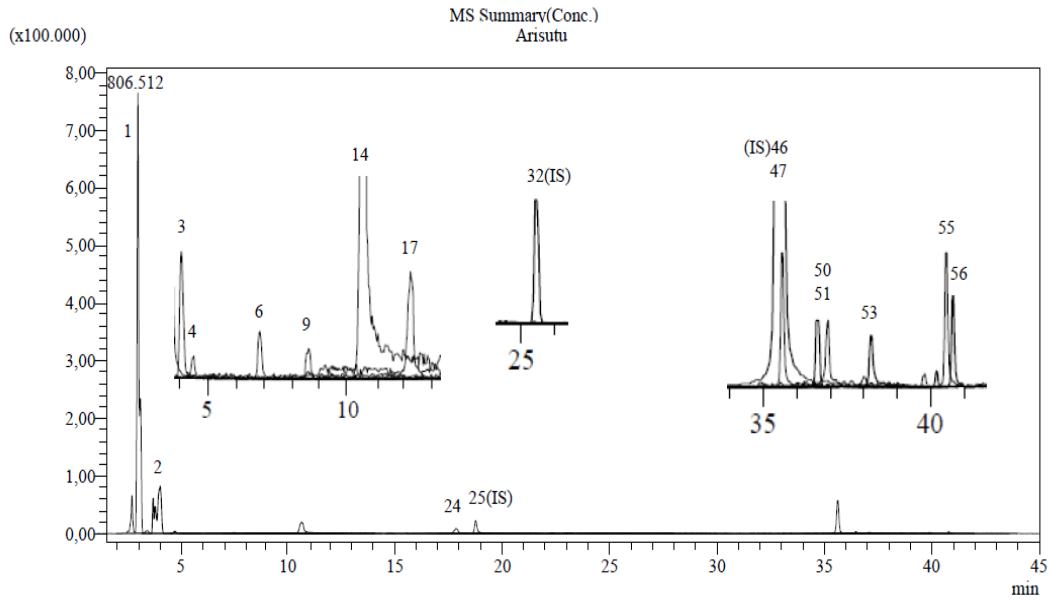
Bu çalışmada, ratlarda vinkristin ‘nin neden olduğu deneysel karaciğer hasarına karşı içerisinde birçok doğal antioksidan bileşiği bulunduran arı sütünün etkileri araştırıldı. Araştırma da kullanılan arı sütünün LC-MS/MS ile içerik analizleri yapıldı.

Tablo 4.1. Arı sütünün analiz sonuçları

No	Analitler	Arı sütü (mg Analit/g Numune)	No	Analitler	Arı sütü (mg Analit/g Numune)
1	Vanillin	ND	28	Ferulic acid	ND
2	Daidzin	ND	29	Salicylic acid	ND
3	Piceid	ND	30	Cyranoside	ND
4	Coumarin	ND	31	Miquelianin	ND
5	Hesperidin	ND	32	isoquercitrin	ND
6	Quinic acid	6.573	33	Rutin	ND
7	Fumaric acid	3.927	34	Genistin	ND
8	Aconitic acid	0.043	35	O-Coumaric acid	ND
9	Gallic acid	0.017	36	Ellagic acid	ND
10	Protocatechuic acid	0.043	37	Rosmarinic acid	ND
11	Gentisic acid	ND	38	Fisetin	ND
12	Epigallocatechin	ND	39	Cosmosiin	ND
13	Protocatechuic aldehyde	ND	40	Quercitrin	ND
14	Catechin	ND	41	Astragalin	ND
15	Chlorogenic acid	0.019	42	Nicotiflorin	ND
16	Tannic acid	-----	43	Daidzein	ND
17	4-OH Benzoic acid	2.91	44	Genistein	0.004
18	Epigallocatechin gallate		45	Quercetin	0.037
19	Cynarin		46	Luteolin	0.005

20	Vanilic acid	-----	47	Hesperetin	ND
21	Epicatechin	-----	48	Naringenin	ND
22	Caffeic acid	0.023	49	Kaempferol	ND
23	Syringic acid	-----	50	Apigenin	0.003
24	Syringic aldehyde	-----	51	Amentoflavone	ND
25	Epicatechin gallate	-----	52	Acacetin	0.011
26	p-Coumaric acid	0.332	53	Chrysin	0.012
27	Sinapic acid	-----			

ND: Not Detected



Şekil 4.1. Arı sütünün LC-MS/MS analiz kromatogramı

Arı sütü başlıca fenolik asitler, flavonoidler, polifenoller, 10-HDA gibi lipidler, royalisin, jelleines, aspimin ve royalaktin gibi bileşiklerden oluşan yüksek biyoaktif içeriğe sahiptir. Bu çalışmada, Bingöl yöresinden elde edilen arı sütünün analizinde, toplam 53 çeşit fenolik bileşene bakıldı. Analizde oransal olarak sırasıyla bu bileşiklerden, quinic asit, fumarik asit, gallik asit, 4-OH benzoik asit, p-kumarik asit, akonitik asit, protocatechuic asit, quersetin, kaffeik asit, klorogenik asit, chrysin, acacetin, luteolin, genistein ve apigenin olmak üzere 15 tane antioksidan bileşik tespit edildi. Özellikle yukarıda ismi geçen antioksidan bileşiklerin bir dizi farmakolojik ve biyolojik etkilerinin olduğu birçok

makalede bildirilmiştir. Dolayısıyla arı sütünün zengin antioksidan içeriğinin bu bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca Tablo 4.1’de ismi geçen diğer bileşiklerin ise tespit edilemediği anlaşılmıştır. Yapılan birçok çalışmada arı sütünün zengin içeriği sayesinde anti-bakteriyel, anti-oksidan, anti-kanser, immünmodülatör, anti-inflamatuar, vazodilatif, hipotansif ve anti-tümör aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Zorer, 2016; Viuda-Martos et al., 2017).

4.2. Karaciğer Fonksiyon Testleri

Karaciğer, kimyasal ve doğal toksinlerden etkilenen ilaç ve ksenobiyotik metabolizması için hayati bir metabolik organdır. Karaciğer hasarı, hücresel nekroz, fibroz, doku lipid peroksidasyonu ve glutatyon düzeylerinde azalmaya yol açan sistemik oksidatif stres ile ilişkilidir (Shirani et al., 2020). Modern tıpta güvenilir hepato-koruyucu ilaçların eksikliği göz önüne alındığında, bitki kaynaklı fito-bileşenler ve doğal arı ürünleri dikkate değer bir seçenek gibi görünmektedir.

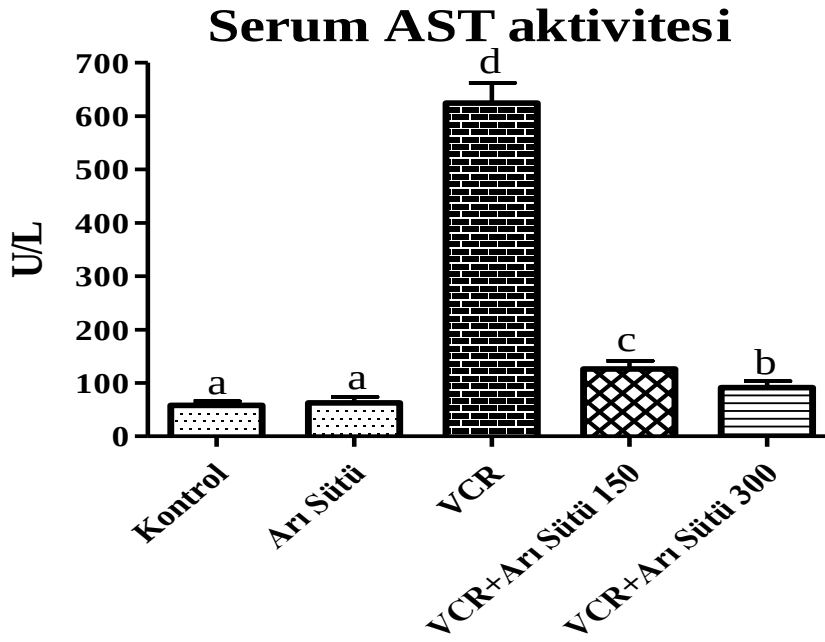
Karaciğer hasarı, ALT, AST, ALP ve bilirubin gibi bazı biyokimyasal belirteçlerle teşhis edilebilir. Serum enzim seviyelerindeki yükselmeler, karaciğer toksisitesinin ilgili göstergeleri olarak alınırken hem toplam hem de konjuge bilirubin seviyelerindeki artışlar, genel karaciğer fonksiyonunun ölçütleridir. Hücrede bulunan bu enzimlerin plazma ya da seruma salınması hepatik hasarın en önemli göstergesidir. Bu enzimlerin kanda ve serumdaki seviyeleri hepatoksisitenin derecesi hakkında bilgi vermektedir (Singh et al., 2011).

Serum ALT aktivite seviyesi, hepatotoksik etkilerin en sık güvenilen laboratuvar göstergesidir ve karaciğer hasarının altın standart klinik kimya belirteci olarak kabul edilir. ALT, amino asit metabolizmasında ve glukoneogenezde önemli bir rol oynar. ALT ve AST, bir amino grubunun sırasıyla alanin veya aspartattan alfa-ketoglutarata indirgeyici transferini katalize ederek sırasıyla glutamat ve piruvat veya oksaloasetat verir. Hasarlı hepatositler, ALT ve AST dahil olmak üzere içeriklerini hücre dışı boşluğa bırakır. Serbest bırakılan enzimler nihayetinde dolaşıma girer ve böylece ALT ve AST'nin serum seviyelerini artırır. ALT, iskelet kası ve kalp dokusunda bulunan daha düşük enzimatik aktivitelerle, öncelikle karaciğere lokalizedir (Ozer et al., 2008).

Serum AST aktivitesi, ALT aktivitesine kıyasla karaciğer fonksiyonunun daha az spesifik bir biyobelirteci olarak kabul edilir. AST kalp, beyin, iskelet kası ve karaciğer dokusunda lokalizedir. AST hasarlı miyositlerden ve hepatositlerden salınır. Serum AST'nin ALT'ye oranı, karaciğer hasarını diğer organ hasarlarından ayırt etmek için kullanılabilir. ALT seviyeleri, hepatit gibi bazı kronik karaciğer hastalığı türlerinde AST seviyelerinden daha yüksektir. Serum ALT ve AST enzimatik seviyelerindeki artışlar, özellikle iskelet kası olmak üzere karaciğer dışı hasardan da kaynaklanabilir (Ozer et al., 2008).

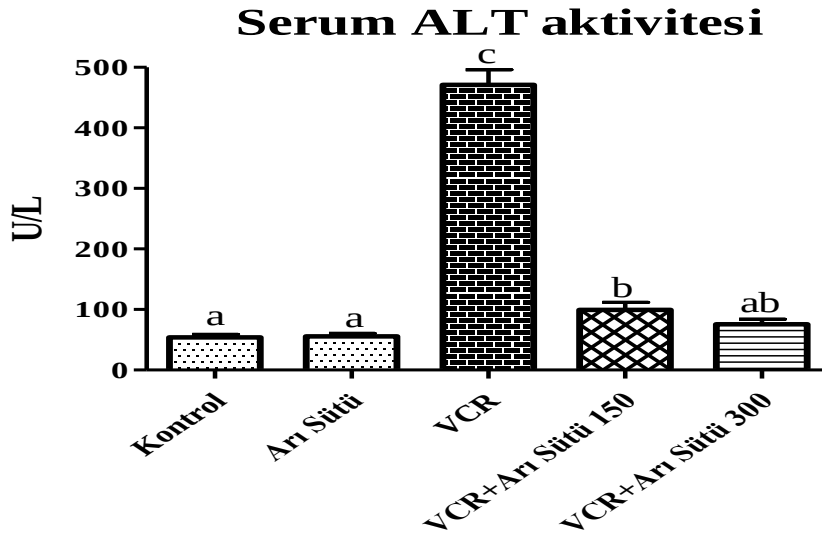
Serum ALP enzimi alkali bir pH'ta monofosfatları hidrolize eder. Özellikle karaciğerin safra kanallarını kaplayan hücrelerde bulunur. Kemik, plasenta, böbrek ve bağırsak gibi diğer organlarda da bulunur. Öncelikle hepatobiliyer etkilerin ve kolestazın bir belirtecidir (Ramaiah, 2007; Singh et al., 2011). İnsanlarda artmış ALP seviyeleri ilaca bağlı kolestaz ile ilişkilendirilmiştir (Wright and Vandenberg, 2007).

Vinkristin kullanımı dozuna bağlı olarak birçok istenmeyen yan etki ile birlikte karaciğerde akut veya kronik hasar oluşturduğu ve serum AST, ALT ve ALP gibi enzim aktivitelerinde yükselmeye yol açtığı bildirilmiştir (Akşit 2015). Yapılan birçok çalışmada, ratlarda vinkristin uygulaması sonucu serum AST ve ALT seviyeleri yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Shati et al., 2019; Rezaeikia et al., 2019). Harchegani ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, ratlara intraperitoneal uygulanan vinkristin sonrasında serum ALT, AST, ALP ve bilirubin seviyelerinin kontrol gruplarına kıyasla arttığını ve tedavi amacıyla verilen safron'un bu değerleri azalttığı bildirilmiştir (Harchegani et al., 2019). Bir başka çalışmada ise, süre bazlı intravenöz vinkristin uygulaması sonucu deneysel karaciğer hasarı modeli oluşturulmuştur. Çalışmanın biyokimyasal verileri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla 2. ve 24. saatlerdeki serum AST, ALT ve ALP seviyelerinin anlamlı bir şekilde attığı rapor edilmiştir (Upmanyu et al., 2009).



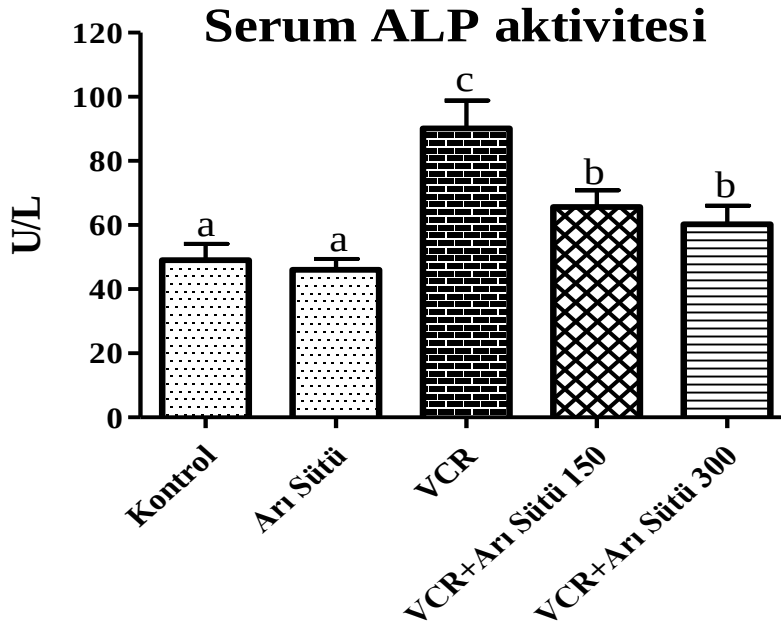
Şekil 4.2. Serum AST aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p<0.05$)

Yapılan çalışmada, karaciğer hasarı belirteçleri olan serum AST, ALT ve ALP aktiviteleri incelendiğinde (şekil 4.2, 4.3 ve 4.4) kontrol ve arı sütü gruplarında enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak aynı olduğu ($p>0.05$), vinkristin uygulamasının serum AST, ALT ve ALP aktivitelerini anlamlı olarak artırdığı ($p<0.05$) ve vinkristin ile birlikte kombine kullanılan arı sütünün (150 ve 300 mg/kg) ise artan bu enzim aktivite seviyelerini düşürdüğü belirlenmiştir ($p<0.05$).



Şekil 4.3. Serum ALT aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p < 0.05$)

Son yıllarda yapılan bazı deneysel hepatotoksisite çalışmalarında arı sütünün biyokimyasal ve farmakolojik etkinliği kanıtlanmıştır. Bu çalışmalarda bazı ağır metal ve kimyasallarla deneysel hepatotoksisite modeli oluşturulmuş ve serum AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir. Güçlü antioksidan özelliği ile ön plana çıkan arı sütünün bu enzim aktivitelerini düşürdüğü rapor edilmiştir (Cemek et al. 2010; Mahmoud and Elsoadaa 2013; Almeer et al., 2018).



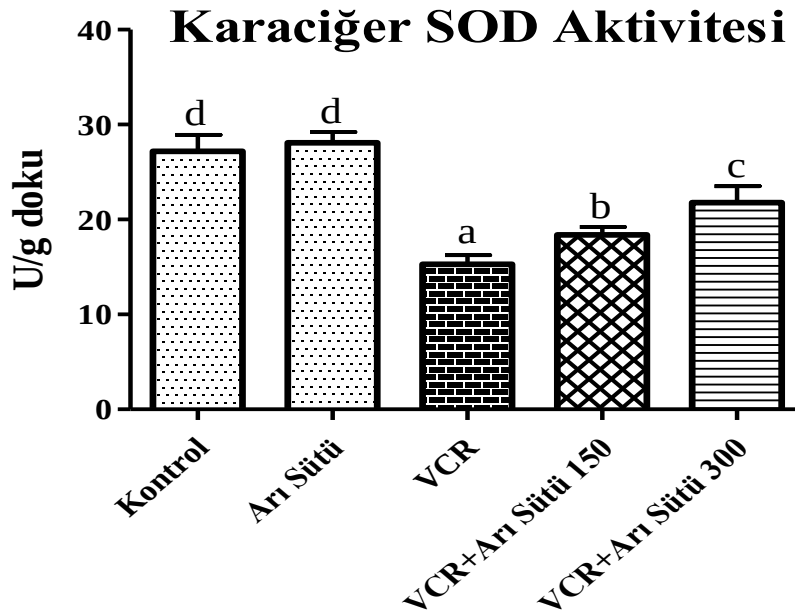
Şekil 4.4. Serum ALP aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p < 0.05$)

4.3. Arı Sütü ve Vinkristin'in Antioksidan Parametreler Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen türleri (ROS), normal hücrel metabolizmanın bir sonucu olarak canlı organizmalar tarafından moleküler oksijenden üretilir. ROS serbest radikal ve radikal olmayanlar olarak 2 gruba ayrılabilir. Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronlara sahip, genellikle kararsız ve oldukça reaktif olan atomlar veya moleküller olarak bilinir. Fizyolojik öneme sahip 3 ana ROS, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\bullet OH$) ve hidrojen peroksittir (H_2O_2). ROS düşük ila orta konsantrasyonlarda, fizyolojik hücre süreçlerinde işlev görürler, ancak yüksek konsantrasyonlarda, lipitler, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenlerinde hasara sebep olmaktadır. Bu hasarlar ayrıca membran bütünlüğünün kaybolmasına, proteinlerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere ve gen mutasyonlarına neden olur. Oksidan/antioksidan arasındaki dengenin oksidanlar lehine değişmesine "oksidatif stres" denir. Oksidatif stres, kanser, nörolojik bozukluklar, hepatotoksisite, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi/perfüzyon, diyabet, akut solunum sıkıntısı sendromu, idiyopatik pulmoner fibroz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı dahil birçok patolojik duruma neden olmaktadır (Birben et al., 2012; Li et al., 2015).

Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan sistem, fizyolojik koşullar altında oksidatif stresle başa çıkmak için hücrel yanıt için gereklidir. Bu nedenle SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimler ve GSH gibi enzimatik olmayan moleküler oksidatif stres düzeyini değerlendirmek için indeks olarak kullanılır.

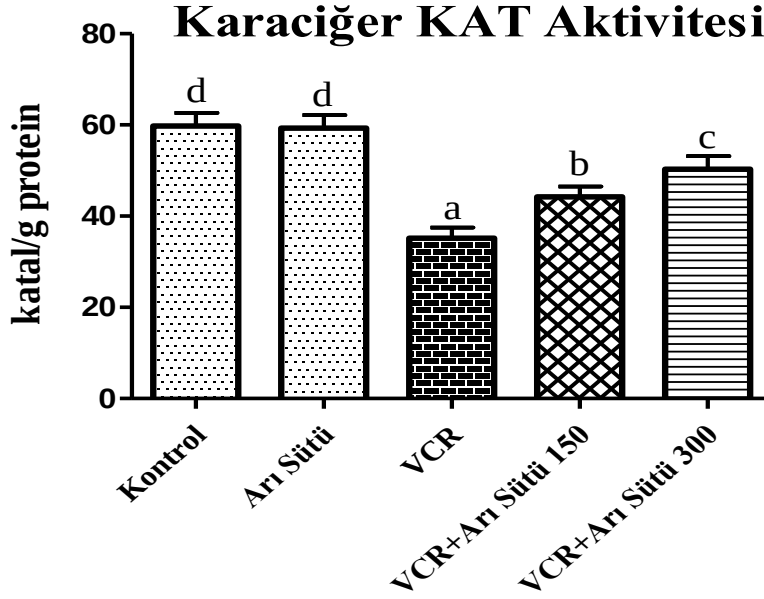
Süperoksit dismutaz, oksiradikal oluşumu inhibe etmede önemli olan bir antioksidan enzimdir ve oksidatif stresi belirtmek için bir biyobelirteç olarak kullanılır. SOD, süperoksit radikallerinin H_2O_2 ve O_2 'ye dönüşümünü katalize eder ve oksiradikallerle ilgilenen ilk enzimdir. KAT, biyolojik sistemi reaktif oksijen türlerine karşı koruyan bir diğer antioksidan enzimdir. Bir oksidatif stres meydana geldiğinde, hücrede salınan süperoksit anyonlarının ($O_2^{\cdot-}$) çoğu, peroksisomların içinde üretilen H_2O_2 moleküllerine dönüşür ve oluşan H_2O_2 molekülleri KAT enzimi tarafından suya ve moleküler oksijene dönüştürülür. Bu antioksidan enzimler doku ve organları oksidatif strese karşı korumak için gereklidir (Kirici et al., 2017).



Şekil 4.5. Karaciğer SOD aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p < 0.05$)

Glutatyon, organları ve dokuları ROS'un istenmeyen etkilerine karşı koruyan enzimatik olmayan bir tripeptit antioksidandır. Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan 4-hidroksi-3-

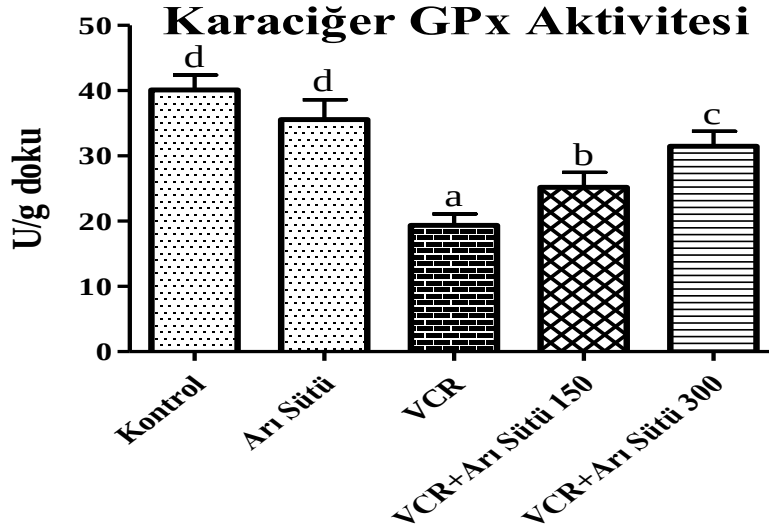
nonenal gibi elektrofil ile konjuge edilerek membran lipidinin peroksidasyonunu korur. GPx enzimi H_2O_2 ve lipid peroksitlerin indirgenmesini katalize eder ve GSH varlığında lipid peroksidasyonuna karşı etkili bir koruyucu enzim olarak kabul edilir. Böylece hücre zarlarının ve mitokondrilerin bütünlüğünü korur (Caglayan et al., 2018).



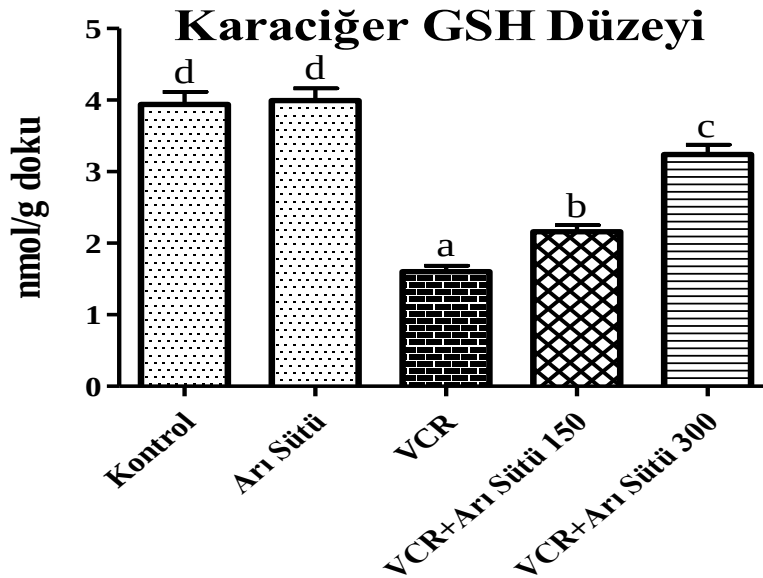
Şekil 4.6. Karaciğer KAT aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p < 0.05$)

Vinkristin kaynaklı karaciğer toksisitesinin altında yatan mekanizma henüz net değildir. Ancak vinkristin olası mekanizması ise ROS'u tetikleyerek hasara neden olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada vinkristin'in karaciğer hasarına neden olduğu ve SOD, KAT, GPx ve GSH seviyelerini düşürerek antioksidan kapasiteyi azalttığı rapor edilmiştir (Çomaklı et al., 2023). Bu çalışmada enzimatik SOD, KAT ve GPx aktiviteleri ile non-enzimatik GSH seviyesi incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla, vinkristin uygulaması sonucu önemli düzeyde düşüşler tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Tedavi amacıyla verilen 150 ve 300 mg/kg dozlarındaki arı sütünün karaciğer antioksidan kapasitesini artırdığı ve 300 mg/kg dozunun daha etkili olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan birkaç çalışmada farklı kimyasal ilaç ve ajanlar kullanılarak deneysel karaciğer toksisitesi oluşturularak arı sütünün olası koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışmalarda arı sütünün artan oksidatif stresi modüle ettiği ve SOD, KAT ve GPx gibi endojen bazı antioksidan enzim aktivelerinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Karadeniz et al., 2011; Hamza et al., 2022; Tohamy et al. 2022).



Şekil 4.7. Karaciğer GPx aktivitesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p<0.05$)

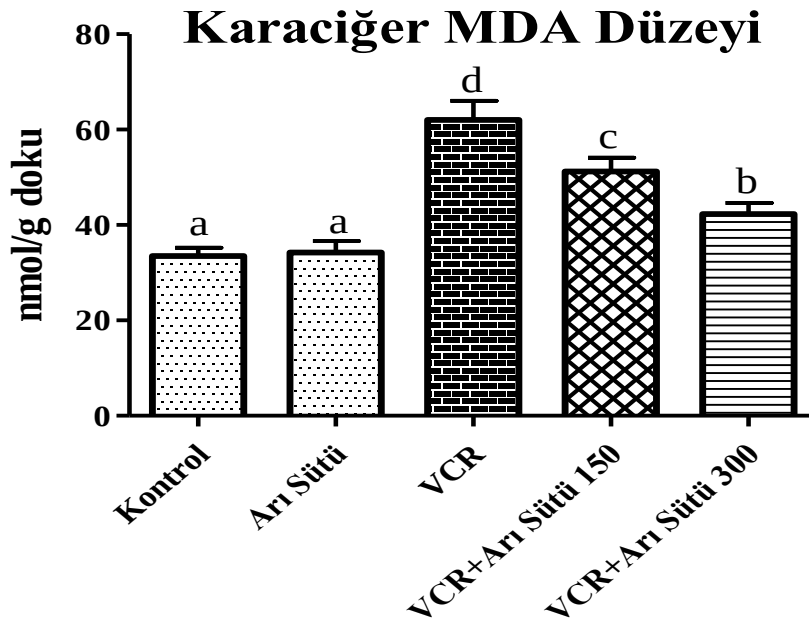


Şekil 4.8. Karaciğer GSH düzeyi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p<0.05$)

4.4. Arı Sütü ve Vinkristin'nin Lipit Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

Oksidatif stres, doymamış lipidleri polar lipid hidroperoksitlere dönüştürerek lipid peroksidasyonu ile sonuçlanan hücresel biyomembranlarda radikal aracılı hasara neden olabilmektedir. Lipit peroksidasyonu, serbest radikallerin (oksil radikalleri, peroksil radikalleri ve hidroksil radikalleri) zar lipidlerine etki etmesi ile oluşur. Lipid peroksidasyonu ayrıca DNA, protein ve diğer makromolekülleri modifiye edebilen epoksitler ve aldehitler gibi reaktif elektrofiller dahil birçok oksitlenmiş ürünlerin oluşumuna yol açmaktadır. Örnekler arasında, oksidatif stresin dolaylı bir indeksi olarak ölçülebilen malondialdehit (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), 2-propenal (akrolein) ve izoprostanlar yer alır (Dalle-Donne et al., 2006). Hücrelerdeki yoğun serbest radikaller, zardaki doymamış yağ asitlerinden elektron uzaklaştıran bir reaksiyon dizisini başlatırlar. Lipit peroksidasyon reaksiyonları membran lipidlerinin yıkılmasına neden olur ve sonuçta basamaklarında reaktif ürünler açığa çıkarılır (Tsikas, 2017; Sies, 2017). MDA, lipit peroksidasyonları sonucu açığa çıkan reaktif bir aldehittir. Oksidatif stres sonucu yükselen MDA seviyesi hücrede dolaylı olarak hasarının belirticidir (Su et al., 2019).

Harchegani ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, deneysel sıçanlarda vinkristin sülfat kaynaklı hepatotoksisite modeli oluşturulmuştur. Deney sonucunda kontrol grubuna kıyasla, vinkristin grubunda lipit peroksidasyonu belirteci olan MDA düzeyinde artış tespit edilmiştir (Harchegani et al., 2019). Bir başka çalışmada ise yetişkin erkek sıçanlara vinkristin enjeksiyonu sonucu karaciğer MDA düzeyinde yükselme tespit edilmiştir (Rezaeikia et al., 2019). Mevcut çalışmada, karaciğer MDA seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.9), kontrol ve arı sütü gruplarının arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p > 0.05$). Sadece vinkristin uygulanan grupta MDA seviyesinde kontrol ve arı sütü gruplarına göre artış tespit edildi ($p < 0.05$). VCR+ Arı Sütü 150 ve VCR + Arı Sütü 300 gruplarında ise artan MDA seviyesinin azaldığı ($p < 0.05$) ve arı sütünün doz bağımlı olarak MDA seviyesi üzerine etki ettiği kaydedilmiştir.

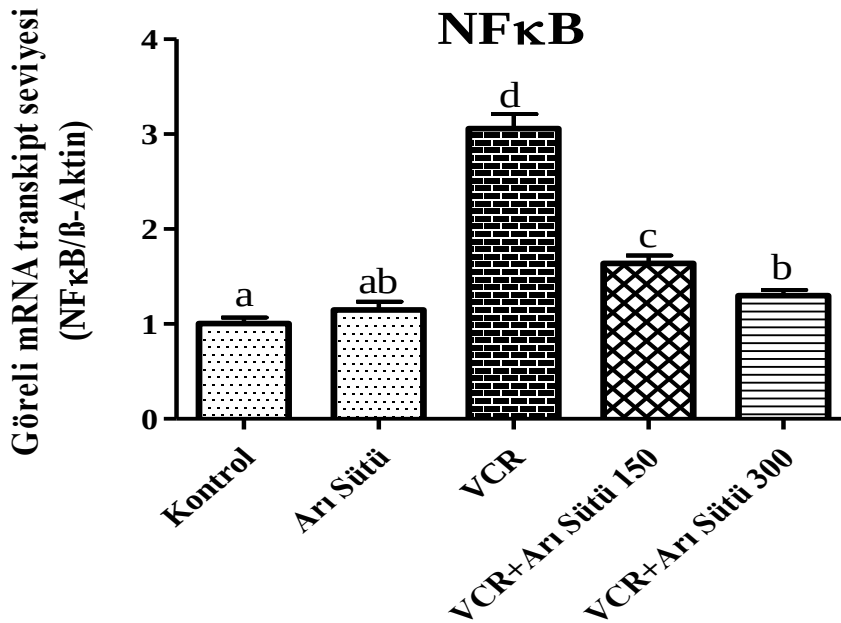


Şekil 4.9. Karaciğer MDA düzeyi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p < 0.05$)

4.5. Arı Sütü ve Vinkristin'in İnflamasyonla İlişkili Parametrelerin mRNA Transkript Seviyeleri Üzerine Etkileri

Sitokinler, hücre-hücre iletişimine aracılık eden küçük moleküler ağırlıklı proteinler veya peptit habercileridir ve birçok fizyolojik sürece katılırlar. Sitokinler ya zayıf anti-inflamatuardırlar, enflamasyonu sınırlayan pro-inflamatuar sinyallerin aktivitesini ve üretimini baskırlar; ya da enfeksiyon ve yaralanma sonucu inflamasyonu indükleyen pro-inflamatuarlardır. Farklı sitokin kombinasyonları, iltihaplanma, proliferasyon ve anjiyogenez gibi farklı sonuçlara yol açar (Mannaa and Abdel-Wahhab, 2016). Hormon benzeri olan bu moleküller monosit, lenfosit, makrofaj ve somatik hücre gibi farklı hücre grupları tarafından salgılanabilirler. Sitokinler depolanamaz ve farklı hücrelerden aynı etki üzerine salgılanabilirler. Antagonist ve sinerjik etki gösterebilirler (Wilson et al., 2002). Sitokinler yapısal ve işlevsel özelliklerine göre interlökinler, interferonlar, transforme büyüme faktörü (TGF- β), tümör nekrozis faktörü süper ailesi, koloni stimulan faktörler olarak çeşitli şekillerde gruplandırılmaktadırlar (Kaiser and Staheli, 2014).

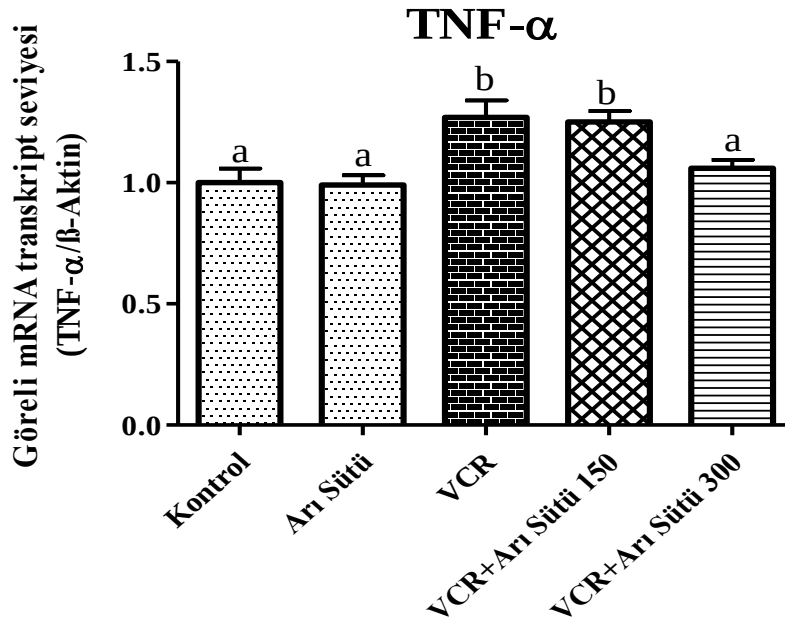
Nükleer faktör kappa B pro-anjiyojenik, proinflamatuvar ve immün düzenleyici aktivitelerle birkaç sitokinin ekspresyonunu kontrol eden birincil bir transkripsiyon faktörüdür. Memeli canlılarda NF- κ B ailesine ait beş çeşit [RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50) ve NF- κ B2 (p52)] transkripsiyon faktörü belirlenmiştir (Uğuz, 2016). NF- κ B sitoplazmada inaktif durumda, çekirdekte ise aktif durumda bulunur. NF- κ B, diğer sitokinler, serbest radikaller ve çeşitli ajanlar tarafından uyarılabilirler (Woods et al., 2002). NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonu terapötik olarak önemlidir çünkü TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinlerin aktivasyonunda ve gen regülasyonunda önemli bir rol oynar. NF- κ B'nin düzensizliği veya seviyesinin artması romatoid artrit ve astım gibi inflamatuvar hastalıkların yanı sıra ülseratif kolit ve Crohn hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Kandemir et al., 2017; Caglayan et al., 2018).



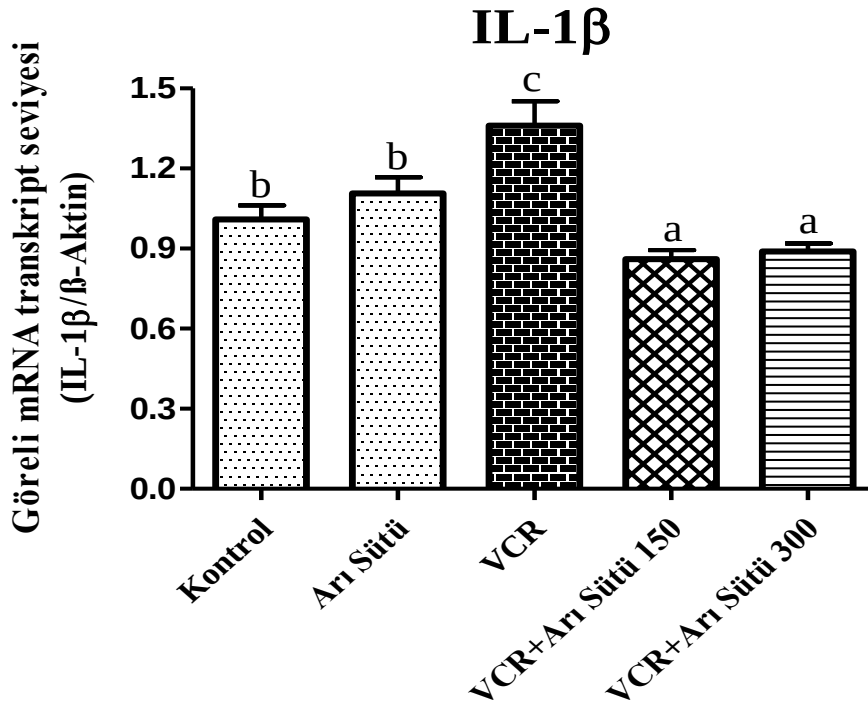
Şekil 4.10. Karaciğer NF- κ B mRNA transkript seviyesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p < 0.05$)

Tümör nekroz faktör alfa makrofajlar ve lenfositler tarafından salgılanan ve hücre bölünmesine etki eden inflamatuvar sitokindir. Birçok inflamatuvar ve enfeksiyöz hastalıkta merkezi bir rol oynadığı bildirilmiştir. TNF- α hücrelerdeki seviyesinin normal olduğu durumlarda doku hasarını onarma ve dokularda yenilenme gibi olumlu etkiler gösterir. Hücredeki seviyesinin artması ise dokularda hasar, sitotoksite ve bazı dokularda nekroz

gibi olumsuz durumlara neden olmaktadır (Papadakis and Targan, 2000). IL-1; interlökinler ailesinden olup dendritik hücreler, B hücreleri, T hücreleri, vasküler endotel, fibroblastlar, keratinositler ve makrofajlar gibi çeşitli hücreler tarafından üretilmektedir. IL-1 molekül ağırlıkları aynı, yükleri farklı olan IL- α ve IL-1 β olarak farklılaşmıştır (Önel ve Yıldırım, 2021). IL-1 β monosit, makrofaj, fibroblast ve endotelial hücrelerden proinflatuar salgı olarak inflammatuar yanıtları düzenlemek için salgılanır. Hücre hasarı, inflamasyon, invazyon, apoptozis, proliferasyon ve farklılaşmada etkin rol oynar (Zhang and An 2007). Yapılan çalışmada, kontrol grubuna kıyasla vinkristin grubunda NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β mRNA transkripsiyon seviyelerinin yükseldiği tespit edildi ($p<0.05$). Tedavi amacıyla verilen arı sütünün NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β mRNA transkripsiyon seviyelerini düşürdüğü belirlendi. Son yıllarda bir grup araştırmacı tarafından yürütülen bir çalışmada ratlarda kadmiyum klorür kaynaklı deneysel karaciğer hasarı modeli oluşturulmuştur. Çalışmada tedavi amacıyla kombine verilen arı sütünün TNF- α ve IL-1 β gibi pro-inflatuar sitokinlerin hem seviyelerini hem de mRNA transkript seviyelerini düşürdüğü rapor edilmiştir (Almeer et al., 2018).



Şekil 4.11. Karaciğer TNF- α mRNA transkript seviyesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p<0.05$)



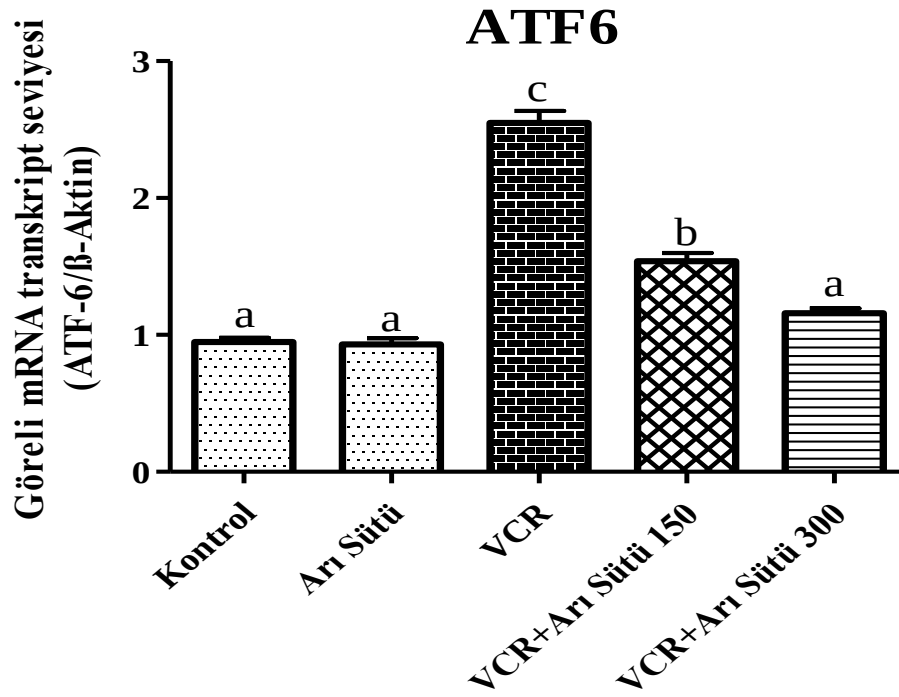
Şekil 4.12. Karaciğer IL-1 β mRNA transkript seviyesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p < 0.05$)

4.6. Arı Sütü ve Vinkristin'in Endoplazmik Retikulum Stresi ile İlişkili Parametrelerin mRNA Transkript Seviyeleri Üzerine Etkileri

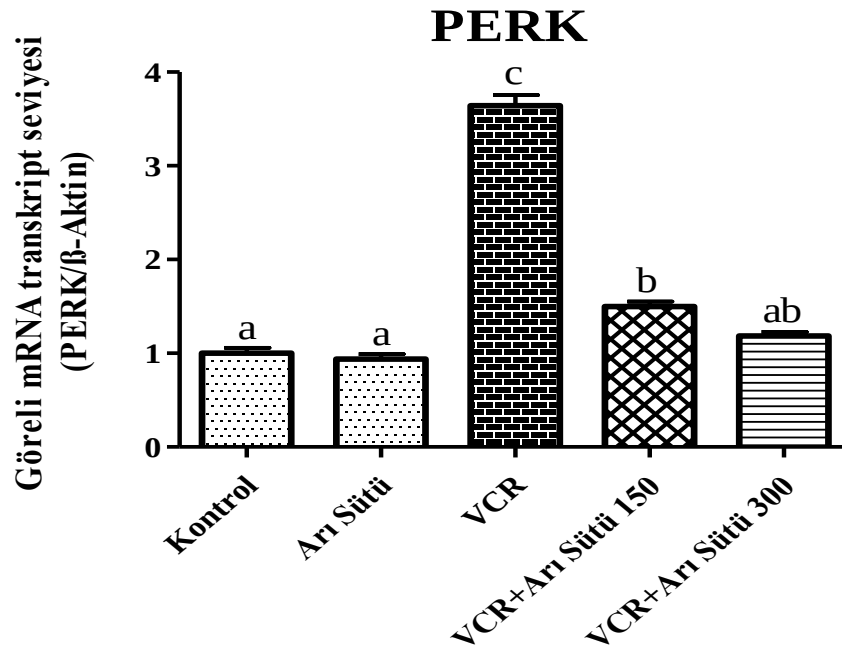
Endoplazmik retikulum ökaryotik organizmaların hücrelerinde bulunan en büyük organeldir. Sitoplazma boyunca nükleer zardan uzanan, zarla çevrili tübüller ve keselerin birbirine bağlı bir ağıdır. Endoplazmik retikulum; proteinlerin katlanması, modifikasyonunu ve taşınmasını düzenleyerek çok çeşitli hücresel süreçlerde kritik bir rol oynar. Ayrıca fosfolipidlerin ve steroidlerin sentezini ve dağıtımını da üstlenir. Endoplazmik retikulum, kalsiyum iyonu depolama bölgesidir ve hücre içi kalsiyum homeostazını da düzenler (Liu et al., 2017). Fizyolojik koşullar altında endoplazmik retikulumün protein yükü ile katlanma kapasitesi arasında bir denge vardır. Artan protein sentezi, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, kalsiyum veya redoks dengesindeki değişiklikler gibi endoplazmik retikulum homeostazındaki değişiklikler, endoplazmik retikulum stresi adı verilen bir duruma yol açar (Ozcan and Tabas, 2012). Endoplazmik retikulum stresiyle başa çıkmak için hücresel adaptif yanıt, katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak bilinir. Başlangıçta UPR, protein katlama kapasitesini artırarak ve

katlanmamış proteinlerin birikimini azaltarak endoplazmik retikulum homeostazını eski haline getirme işlevi görür. Karmaşık bir ağ aracılığıyla UPR, yeni protein translasyonunu kesintiye uğratmak, uygun protein katlanmasına yardımcı olmak ve yanlış katlanmış proteinlerin bozulmasını teşvik ederek endoplazmik retikulum stresinin azalmasına yol açar. Bu adaptasyon ve düzeltme mekanizmaları endoplazmik retikulum homeostazını eski haline getirmek için yetersizse, endoplazmik retikulum stresi devam eder ve apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanır (Morishima et al., 2004; Tabas and Ron, 2011). Bu nedenle, UPR genellikle bir hücresel savunma mekanizması olarak kabul edilir. UPR işlemi, glikozla düzenlenen protein 78 (GRP78) olarak bilinen kritik bir ana oyuncuya sahiptir. GRP78, protein sentezi, katlanması ve birleştirilmesi dahil olmak üzere protein biyosentezinin kalite kontrolünde çok önemli bir rol oynar (Ron and Walter, 2007). Ek olarak, GRP78, UPR sinyal yolunun başlatıcısı olarak işlev görür. UPR'yi başlatan üç adet endoplazmik retikuluma lokalize transmembran sinyal transdüseri olduğu tespit edilmiştir. Bu UPR sensörleri, inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1), protein kinaz benzeri ER Kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) olarak bilinir. Bunlar, hücrelerde yapısal olarak ifade edilir, ancak GRP78 ile sıkı bir şekilde bağlanır ve bu nedenle normal koşullar altında inaktiftirler. Endoplazmik retikulumda yanlış katlanmış proteinler oluştuğunda, GRP78, yanlış katlanmış proteinleri bulmak ve bağlamak için bu transdüserleri çözer ve serbest bırakır (Chong et al., 2017). UPR daha sonra aktive edilmiş serbest PERK, IRE-1 ve ATF6 tarafından spesifik yolları aracılığıyla simüle edilir, böylece yeni proteinlerin sentezi azaltılır ve endoplazmik retikulum içindeki ortamın stabilitesini geri kazanmak için endoplazmik retikulumda katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi azaltılır (Wu et al., 2018). Bir grup bilim insanı tarafından yürütülen bir çalışmada vinkristin kaynaklı periferik sinir hasarında endoplazmik retikulum stres parametreleri olan GRP78, PERK, IRE-1 ve ATF6 mRNA transkript seviyelerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın tedavi amacıyla verilen quersetinin bahsi geçen parametrelerin seviyelerini modüle ederek endoplazmik retikulum stresini azalttığını rapor edilmiştir (Yardım et al., 2020).

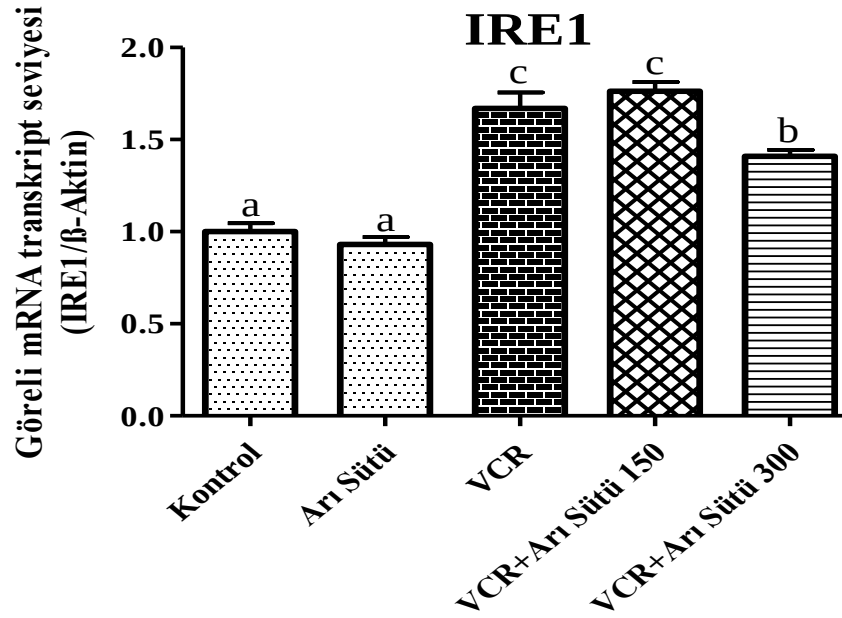
Mevcut çalışmada, GRP78, PERK, IRE-1 ve ATF6 mRNA transkript seviyeleri incelendiğinde kontrol ve arı sütü grubu arasında istatistiksel bir fark bulunamadı. Vinkristin uygulaması GRP78, PERK, IRE-1 ve ATF6 seviyelerini kontrol ve arı sütü gruplarına göre anlamlı bir şekilde artırdı ($p<0.05$). Vinkristin ile birlikte kullanılan arı sütü gruplarında ise artan parametrelerin mRNA transkript seviyeleri anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).



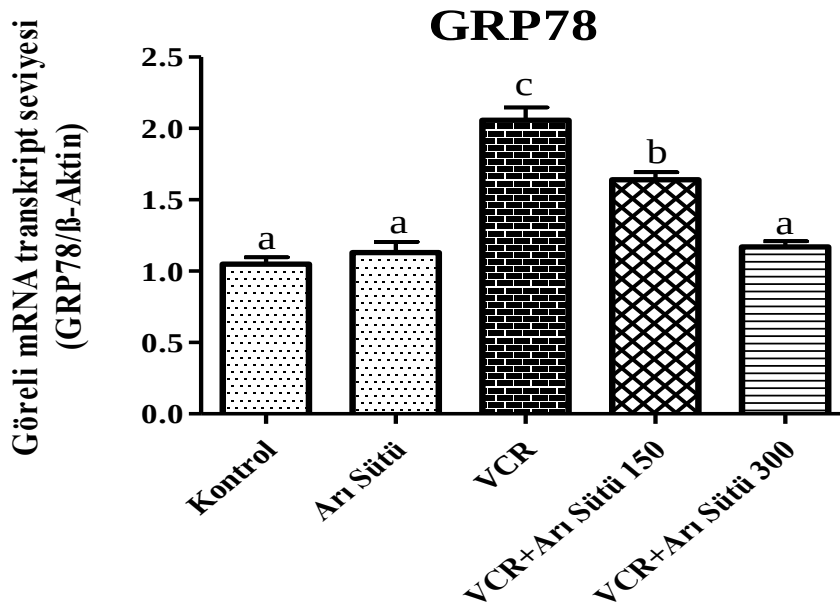
Şekil 4.13. Karaciğer ATF6 mRNA transkript seviyesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p<0.05$)



Şekil 4.14. Karaciğer PERK mRNA transkript seviyesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p<0.05$)



Şekil 4.15. Karaciğer IRE1 mRNA transkript seviyesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p<0.05$)



Şekil 4.16. Karaciğer GRP78 mRNA transkript seviyesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p < 0.05$)

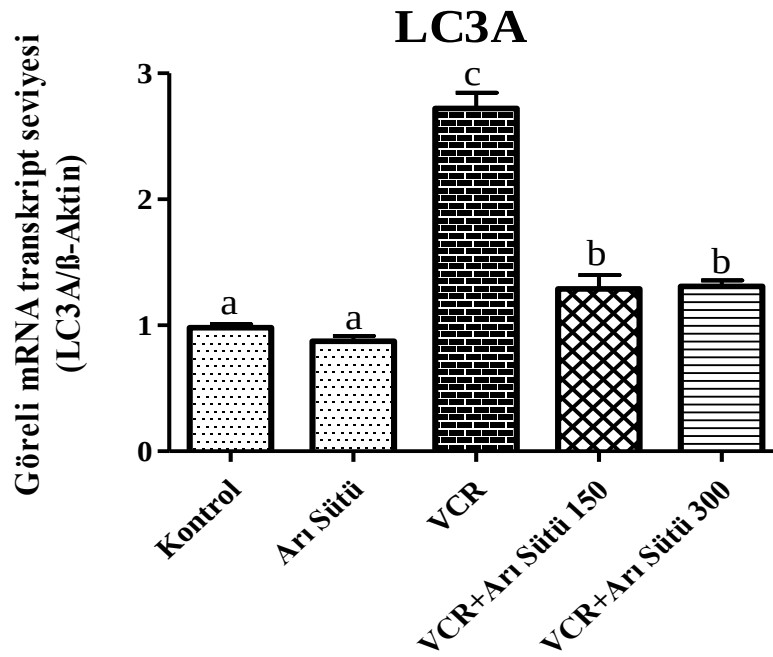
4.7. Arı Sütü ve Vinkristin'nin Otofaji ile İlişkili Parametrelerin mRNA Transkript Seviyeleri Üzerine Etkileri

Otofaji, hücredeki yaşlanmış ve hasarlı organeller ile yanlış katlanmış sitozolik proteinlerin lizozom organeli aracılığı ile parçalanmasını sağlayan bir mekanizmadır. Otofaji hücrede besin kıtlığında, patojen enfeksiyonunda, hipoksi ve ROS durumlarında tetiklenebilen katabolik reaksiyonları üstlenmiştir. İntrasellüler moleküllerin geri dönüşümüne etki ederek homeostasiyi korur (Liu, 2017). Otofaji reaksiyonlarının hücre ölümü, hücre farklılaşması, hücre yaşlanması, metabolik aktivite düzenlenmesi ve yabancı madde yıkımı gibi görevleri vardır (Arslan et al., 2011). Otofaji memeli canlılarda mikrootofaji, şaperon aracılı otofaji ve makrootofaji olarak çeşitlenmiştir. Mikrootofajide, küçük moleküller lizozoma alınarak parçalanır. Makrootofajide, bazal düzeyde hasar görmüş organeller otofajik vakuoller (otofagozom) oluşturularak parçalanır. Şaperon aracılı otofajide ise proteinler lizozoma şaperonlar vasıtası ile getirilir (Karadağ, 2016).

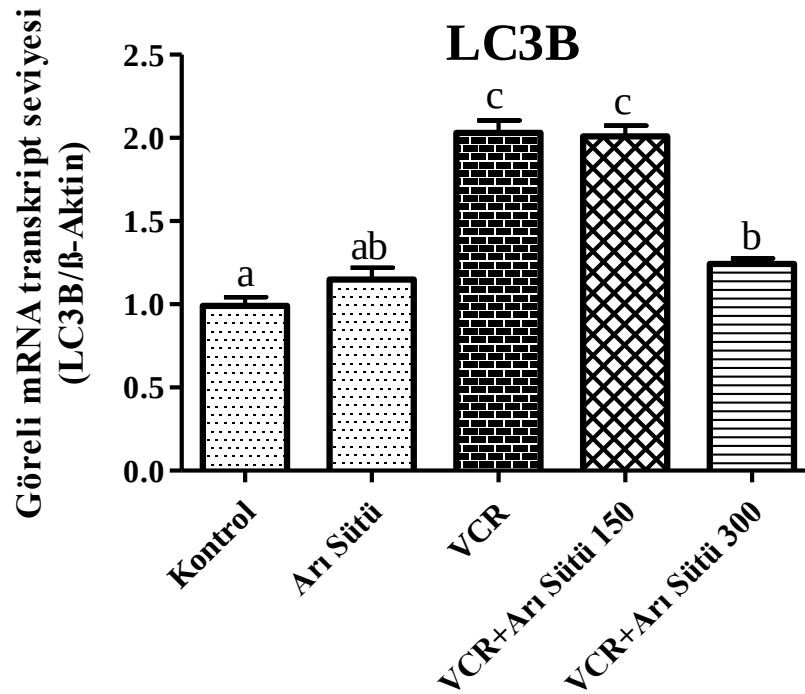
Otofaji hem hücrel sinyalleşme de hem de hasarda ROS ile ilişkili patolojik yanıtların kritik bir aracısı olarak ortaya çıkmıştır (Wible and Bratton, 2018). Mitokondri, hücrelerdeki ana ROS kaynağıdır ve mitokondriyal ROS genellikle oksidatif fosforilasyon

sırasında biyoenerjetiklerin yan ürünleri olarak üretilir. ROS, O_2 'nin elektron indirgenmesiyle oluşan $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 dahil olmak üzere O_2 'nin oldukça reaktif metabolitleridir. Geçiş metali iyonlarının varlığında, daha reaktif $OH^{\cdot}$ radikali üretilir. ROS, proliferasyon, farklılaşma, programlanmış hücre ölümü, otofaji, redoks sinyali, kalsiyum homeostazı, hipoksik stres tepkileri ve kök hücre yeniden programlanması dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlere katkıda bulunan fizyolojik düzeyde sinyal molekülleri olarak hareket edebilir. Tersine, aşırı oksidatif stres, çeşitli patolojilerde yer alan proteinlere ve hücresel bileşenlere zarar verir. Fizyolojik ROS, farklı hücre tiplerinde hücresel homeostazı sürdürmek için otofajiyi indüklerken, redoks sinyallemedeki düzensizlik, çeşitli hastalıklara yol açan otofajik aktiviteyi artırabilir (Yun et al., 2020).

Beclin 1, LC3A ve LC3B otofajiyi incelemek için yaygın olarak kullanılan üç anahtar proteindir. LC3, otofagozomal bir protein olup, otofaji hakkında belirteç rol üstlenmektedir. MAP1LC3 ailesinin olan bu proteinin LC3A, LC3B ve LC3C olmak üzere üç farklı izoformu bulunmaktadır (Koukourakis et al., 2015; Kadiçesme vd., 2021). LC3A sitoplazmada bulunurken, LC3B otofagozomların iç ve dış zarlarında bulunur. Otofaji meydana geldiğinde, LC3A LC3B'ye dönüştürülür. Bu nedenle, LC3B'nin LC3A'ya oranı, otofajinin bir göstergesi olarak kullanılır (Wang et al., 2020). Çomaklı ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada vinkristin indüklü karaciğer hasarında immunohistokimyasal tekniklerle LC3B ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda LC3B ekspresyon seviyelerinin arttığı ve tedavi amacıyla verilen doğal bir antioksidan bileşik olan quersetin'in vinkristin kaynaklı artışı azalttığını rapor etmişlerdir (Çomaklı et al. 2023). Bir başka çalışmada ise kemoterapötik bir ilaç olan paksitaksel'in neden olduğu spinal kord ve siyatik sinir hasarında Beclin 1, LC3A ve LC3B mRNA transkript seviyelerinin arttığı, buna karşın tedavi amacıyla verilen kurkumin'in bu parametrelerin seviyelerini düşürerek anti-otofajik özellik sergilediği bildirilmiştir (Yardım et al., 2021).



Şekil 4.17. Karaciğer LC3A mRNA transkript seviyesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p<0.05$)



Şekil 4.18. Karaciğer LC3B mRNA transkript seviyesi (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel bir farklılık göstermektedir, $p<0.05$)

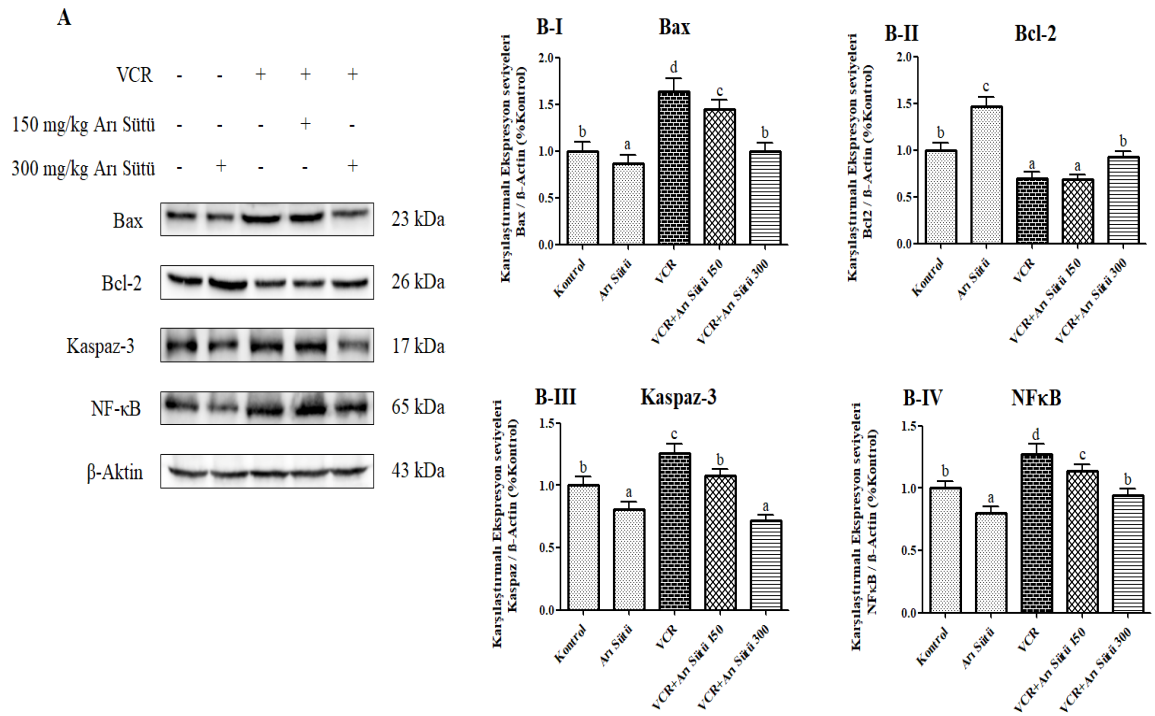
Yapılan çalışmada, karaciğer LC3A ve LC3B mRNA transkript seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.17 ve şekil 4.18), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında vinkristin grubunda bu parametrelerin seviyeleri önemli ölçüde artmıştır ($p<0.05$). Vinkristin ile birlikte verilen arı sütünün (150 ve 300 mg/kg) ise artan LC3A ve LC3B mRNA transkript seviyelerini anlamlı bir düzeyde düşürmüştür ($p<0.05$).

4.8. Arı Sütü ve VCR'nin Apoptoz ile İlişkili Protein Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkileri

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, tüm çok hücreli organizmaların normal gelişimi ve homeostazı için gerekli olan ve doğal olarak meydana gelen bir hücre ölüm sürecidir. Bu işlem ayrıca hasarlı, enfekte veya potansiyel olarak neoplastik hücrelerin çıkarılması için önemlidir. Çok hücreli canlılarda hücreler oluşturulup yıkılarak denge sağlanmaktadır. Programlı hücre ölümü olarak adlandırılan bu süreç organizmalar için hayati bir fizyolojik süreçtir (Kaya et al., 2012). Apoptoz orgaizmalarda; hücre ölümü sinyallerinin alınması, kaspazların aktive olması, apoptozom gerçekleşmesi, hücrenin parçalanma ve kalan materyalin fagositoz ile yenilmesi basamaklarını takip etmektedir (Canpolat, 2016).

Apoptoz organizmalarda kontrollü bir şekilde yürütülür. Mitokondri organeli, kalsiyum minerali, kaspazlar, p53 ve Bcl-2 gen ailesi gibi moleküller tarafından apoptoz mekanizmaları düzenlenir. Bu düzenlemeler esnasında bazı moleküller apoptozu aktive ederken bazı moleküllerde anti-apoptotik rol üstlenirler. Bax, Bad, Bak, Bid, BclXs, Bim ve Puma proteinleri mitokondri organeli vasıtası ile apoptozu aktive ederler. Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 proteinleri ise apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve kalsiyum miktarına etki ederek anti-apoptotik rol üstlenirler (Akl et al., 2014; Wang et al., 2015). Kaspazlar olarak adlandırılan proteolitik enzimler apoptoz sürecinin baş faktörlerindendir. Aspartata özgül olan bu enzimlerin aktif merkezlerinde sistein kalıntısı bulunur (Ghavami et al., 2014). Mitokondride üretilen ROS, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybedilmesi sonucu membran fosfolipidlerine hasar vermeye ve dolayısıyla sitokrom c salınımına neden olur (Caglayan et al., 2018). Serbest bırakılan sitokrom c apoptoz proteaz aktivasyon faktörü-1'e bağlanır ve başlatıcı caspase-9'u aktive eder. Bu da apoptotik bozunma fazını başlatan caspase-3 efektörünü harekete geçirir (Nicholson and Thornberry, 2003).

Öte yandan proteinlerin Bcl-2 ailesi esas olarak apoptozdaki rolü için incelenmektedir (Akl et al., 2014). Anti-apoptotik Bcl-2, sitokrom c salımına aracılık eden iyon kanallarının oluşumu, mitokondriyal homeostaz ve mitokondriyal zar potansiyelinin oluşturulması da dahil olmak üzere apoptozisdeki birkaç önemli adımı kontrol eder (Chang et al., 2015). Bax ve Bcl-2 protein seviyelerindeki değişimler apoptoz seviyesinin belirlenmesinde önemli bir göstergedir (Yardim et al., 2020). Daha önce yapılan bir çalışmada vinkristin'in kaspaz 3 ekspresyonunu artırarak periferik sinirlerde hasara neden olduğu bildirilmiştir (Khalilzadeh et al., 2018). Bir başka deneysel çalışmada ise, vinkristin neden olduğu preriferal sinir hasarında kaspaz-3 ve Bax mRNA transkript seviyeleri artarken, Bcl-2 mRNA transkript seviyelerinin azaldığı rapor edilmiştir (Yardim et al., 2020).



Şekil 4.19. Karaciğer dokusunda VCR'nin ve arı sütünün apoptoz ile ilişkili protein ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri. (A) Bax (23 kDa), Bcl-2 (26 kDa), kaspaz-3 (17 kDa) ve NF-κB (65 kDa) protein ekspresyon seviyelerinin Western blot analiz sonuçları. Yükleme kontrolü olarak β-Aktin (43 kDa) protein ekspresyon seviyesi bakıldı. (B-I) Bax, (B-II) Bcl-2, (B-III) Kaspaz-3 ve (B-IV) NF-κB protein ekspresyonlarının karşılaştırmalı ekspresyon seviyeleri Graphpad Prism 5 programı kullanılarak belirlenmiştir. (Farklı harfle gösterilen sütunlar, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel bir farklılık göstermektedir).

Karaciğer apoptotik parametrelerinin western blot yöntemiyle protein ekspresyon seviyeleri şekil 4.19’da gösterilmiştir. Yapılan çalışmada, vinkristin uygulanan gruplarda Bax ve kaspaz-3 protein seviyeleri kontrol ve arı sütü gruplarına göre önemli ölçüde artarken, buna karşın Bcl-2 protein seviyeleri ise azalış göstermiştir ($p<0.05$). Tedavi amacıyla verilen arı sütünün vinkristin ile kombine gruplarında ise bu değerleri tersine çevirdiği gözlenmiştir ($p<0.05$). Karadeniz ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada kemoterapötik bir ilaç olan sisplatin’nin neden olduğu karaciğer hasarında immünohistokimyasal yöntemle kaspaz-3 ve Bcl-XL ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Çalışmada sisplatinin kaspaz-3 ekspresyon seviyesini artırırken, Bcl-XL ekspresyon seviyesini azalttığı bildirilmiştir. Sisplatin ile birlikte verilen arı sütünün mevcut parametrelerin ekspresyon seviyelerini düzenleyerek apoptotik şiddeti azalttığını rapor etmişlerdir (Karadeniz et al., 2011).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, Bingöl yöresinden toplanan arı sütünün vinkristin kaynaklı karaciğer toksisitesine karşı koruyucu etki gösterip göstermediğini incelemek için deneysel hayvanlar kullanılmıştır. Çalışmada otuz beş adet Wistar albino cinsi erkek ratlar beş farklı gruba ayrılmıştır. Bu gruplar sırasıyla, i) Kontrol, ii) Arı Sütü, iii) VCR, iv) VCR+ Arı Sütü 150, v) VCR+ Arı Sütü 300 olarak isimlendirilmiştir.

Deney sonuçlarından elde edilen verilere göre, vinkristin'nin karaciğer hasarı belirteçleri olan serum AST, ALT ve ALP enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonunu artırdığı ve antioksidan savunma sistemini düşürdüğü bulunmuştur. Antioksidan özelliği bulunan arı sütünün (150 ve 300 mg/kg) dozlarının, vinkristin ile birlikte kullanılmasının antioksidan savunma sistemini üzerine olumlu etki gösterdiği ve serum enzim aktivitelerini azaltarak karaciğer hasarını iyileştirdiği anlaşılmıştır.

Çalışmada sonucunda, vinkristin karaciğer dokusunda inflamasyonla ve endoplazmik retikulum stresi ile ilişkili parametrelerden olan NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , GRP78, IRE1, PERK ve ATF-6 mRNA transkript seviyelerini artırmıştır. VCR ile birlikte tedavi için kullanılan arı sütünün (150 ve 300 mg/k) dozlarının artan parametrelerin mRNA transkript seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir. Ek olarak bu çalışmada LC3A ve LC3B gibi otofajik markırlar RT-PCR yöntemi ile incelenirken; Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3 gibi apoptotik markırlar ise western blot yöntemi ile araştırılmıştır. Vinkristin uygulaması sonucu LC3A, LC3B, Bax ve kaspaz-3 seviyeleri artarken, Bcl-2 seviyeleri ise azalmıştır. Tedavi amaçlı verilen arı sütünün yukarıdaki parametreleri modüle ederek anti-apoptotik ve anti-otofajik etkiler sergilemiştir.

Elde edilen veriler ışığında, vinkristin'in indüklediği karaciğer toksisitesine karşı Bingöl yöresinden toplanan arı sütünün antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik özellikler sergilemiştir. Arı sütünün klinik açıdan terapötik amaçla kullanılabilmesi için daha üst düzey çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Adaškevičiūtė, V., Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Barčauskaitė, K., and Maruška, A. (2019). Comparison of physicochemical properties of bee pollen with other bee products. *Biomolecules*, 9(12), 819.

Aebi, H. (1984). *Catalase in vitro*. In *Methods in enzymology*, Vol. 105, pp. 121-126. Academic press.

Ahmed, W. M., Khalaf, A. A., Moselhy, W. A., Safwat, G. M. (2014). Royal jelly attenuates azathioprine induced toxicity in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1), 431-437.

Akl, H., Vervloessem, T., Kiviluoto, S., Bittremieux, M., Parys, J. B., De Smedt, H., Bultynck, G., (2014). A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(10), 2240-2252.

Akşit, H., Akşit, D., Bildik, A., Kara H., Yavuz, Ö., ve Seyrek, K. (2015). Deneysel karaciğer intoksikasyonunda N-asetil sistein'in glutatyon metabolizması ve lipid peroksidasyonuna etkileri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 62(1), 1-5.

Aktümsek, A., ve Konuk, M. (2010). *Genel biyoloji (pp.160-161)*. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.

Akyol, E., ve Baran, Y., (2015). Arı sütünün yapısı, insanlar ve arılar için önemi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 15(1), 16-21.

Almeer, R. S., Alarifi, S., Alkahtani, S., Ibrahim, S. R., Ali, D., Moneim, A. (2018). The potential hepatoprotective effect of royal jelly against cadmium chloride-induced hepatotoxicity in mice is mediated by suppression of oxidative stress and upregulation of Nrf2 expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1490-1498.

Altınışik, M. (2010). Karbonhidrat metabolizması bozukluklarına biyokimyasal yaklaşım. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 11(1), 51-59.

Altuğ, E., (2010). *Zencefil ekstresinin safra yolları bağlanarak oluşturulan karaciğer hasarında koruyucu etkileri*. (Doktora tezi, Gazi Üniversitesi).

Arıcı, S., (2008). Toksik hepatit. *Pamukkale Tıp Dergisi*, (2), 113-119.

Arslan, D. Ö., Korkmaz, G., ve Gözüaıcık, D. (2011). Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, (4), 184-194.

Ashry, K., and Elkady, A. A. (2014). Royal jelly modulates hepatotoxic effect of rats treated with cisplatin. *Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications*, 47(1), 172-180.

Aycan, S. (2015). *Ratlarda tiyoasetamidle oluşturulan karaciğer toksisitesi üzerine üzüm çekirdeği ekstraktının etkileri*. (Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi).

Aydın, S. (2000). İnsan anatomisi ve fizyolojisi. Anadolu Üniversitesi, 218-223.

Barbaros, M. B., ve Dikmen, M. (2015). Kanser immünoterapisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 31(4), 177-182.

Bărnăuțiu, L.I., Mărghitaș, L.A., Dezmirean, D.S., Mihai, C. M., and Bobiș, O. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of royal jelly-review. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 67-72.

Başak, M., ve Akan, D. (2015). Karaciğerin ve safra yollarının radyolojik anatomisi. *Türk Radiol Semin*, 3, 336-348.

Bedikian, A.Y., Silverman, J.A., Papadopoulos, N.E., Kim, K. B., Hagey, A. E., Vardeleon, A., and Hwu, P. (2011). Pharmacokinetics and safety of Marqibo (vincristine sulfate liposomes injection) in cancer patients with impaired liver function. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 51(8), 1205-1212.

Bergman, R. N., Piccinini, F., Kabir, M., ve Ader, M. (2019). Novel aspects of the role of the liver in carbohydrate metabolism. *Metabolisma*, 99, 119-125.

Biliková, K., Hanes, J., Nordhoff, E., Saenger, W., Klaudiny, J., and Šimúth, J. (2002). Apisimin, a new serine–valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS letters*, 528(1-3), 125-129.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.

Björnsson, E., Talwalkar, J., Treeprasertsuk, S., Kamath, P. S., Takahashi, N., Sanderson, S., and Lindor, K. (2010). Drug-induced autoimmune hepatitis: clinical characteristics and prognosis. *Hepatology*, 51(6), 2040-2048.

Bogdanov, S. (2011). Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. *Lipids*, 3(8), 8-19.

Buttstedt, A., Mureșan, C. I., Lilie, H., Hause, G., Ihling, C. H., Schulze, S. H., and Moritz, R. F. (2018). How honeybees defy gravity with royal jelly to raise queens. *Current Biology*, 28(7), 1095-1100.

Caglayan, C., Kandemir, F. M., Yıldırım, S., Kucukler, S., Kılınc, M. A., and Saglam, Y. S. (2018). Zingerone ameliorates cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity via suppression of sex hormone imbalances, oxidative stress, inflammation and apoptosis in female wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 517-530.

Can, E.D., Dobrcanlı, A. Karaciğer Lobülünün Basit Yapısı. Erişim: 07/06/2023, <https://www.drahmetdobrucali.com/wp-content/uploads/PBS52.jpg>.

Canpolat, F. (2016). Hücre Siklüsü ve Apoptoz. *Güncel Dermatoloji Dergisi*, 1(1), 11-17.

Cemek, M., Aymelek, F., Büyükokuroğlu, M. E., Karaca, T., Büyükben, A., ve Yılmaz, F. (2010). Protective potential of Royal Jelly against carbon tetrachloride induced-toxicity and changes in the serum sialic acid levels. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2827-2832.

Chang, J. W., Hwang, H. S., Kim, Y. S., Kim, H. J., Shin, Y. S., Jittreetat, T., Kim, C. H. (2015). Protective effect of *Artemisia asiatica* (Pamp.) Nakai ex Kitam ethanol extract against cisplatin-induced apoptosis of human HaCaT keratinocytes: Involvement of NF-kappa B-and Bcl-2-controlled mitochondrial signaling. *Phytomedicine*, 22(6), 679-688.

Chong, W. C., Shastri, M. D., Eri, R. (2017). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious nexus implicated in bowel disease pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 771.

Creixell, M., and Peppas, N. A. (2012). Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance. *Nano Today*, 7(4), 367-379.

Çimen, M. B. Y., ve Çimen, Ö. B. (2016). Obezite ve D vitamini. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 9(2), 102-112.

Çomaklı, S., Özdemir, S., Küçükler, S., and Kandemir, FM (2023). Quercetin'in sıçanlarda vinkristin kaynaklı karaciğer hasarı üzerindeki yararlı etkileri: Nrf2/HO-1, NF-kB/STAT3 ve SIRT1/PGC-1α düzeylerini modüle etmek. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 37 (5), e23326.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., and Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52(4), 601-623.

Dilek, İ. (2010). Kemoterapide toksisite değerlendirmesi. XXXVI. Ulusal Hematoloji Kongresi, 63-70.

Doğan, N. (2014). *Ratlarda parasetamole bağlı akut karaciğer toksisitesinde Capparis ovatanın koruyucu etkisi*. (Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi).

Dorchin, M., Dehshiri, R. M., Soleiman, S., Manashi, M. (2013). Evaluation of neuropathy during intensive vincristine chemotherapy for non-hodgkin's lymphoma and acute lymphoblastic leukemia. *Iranian Journal Of Pediatric Hematology And Oncology*, 3(4), 138.

Duran, ET. (2011). Kanser tedavisinin yan etkilerine yönelik alternatif uygulamalar. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(2), 72-77.

Efdal, A. (2014). *Siklofosfamid ile oluşturulmuş karaciğer hasarı üzerine vitamin D3'ün etkileri* (Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi)

Eren, M., Saltık-Temizel, İ. N., ve Koçak, N. (2004). İlaça bağlı hepatotoksisite. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 47, 222-27.

Foret, S., Kucharski, R., Pellegrini, M., Feng, S., Jacobsen, S. E., Robinson, G. E., and Maleszka, R. (2012). DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 4968-4973.

Geylan, H., Çetin, M., ve Karaman, K. (2018). Vinkristin ile ilişkili parsiyel ileus: Bir sunum sunumu. *Van Tıp Dergisi*, 25 (2), 251-252.

Ghanbari, E., Nejati, V., ve Azadbakht, M. (2015). Protective effect of royal jelly against renal damage in streptozotocin induced diabetic rats. *Iranian Journal Of Toxicology*, 9(28),1258-1263.

Ghanbari, E., Nejati, V., ve Khazaei, M. (2016). Improvement in serum biochemical alterations and oxidative stress of liver and pancreas following use of royal jelly in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Journal (Yakhteh)*, 18(3), 362.

Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., ve Łos, M. J. 2014. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 112, 24-49.

Goodman, Z., and Ihsak. K., Medical diseases of the liver. In Silverberg's Principles and practice of Surgical Pathology and Cytopathology. 4th ed. Elsevier: Churchill Livingstone; 2006; 1475–1500.

Göçer, Z. (2016). *Deneyisel karaciğer intoksikasyonunda apoptosis oranlarının tespiti ve galektin-3'ün ekspresyonunun araştırılması* (Yüksek Lisan Tezi, Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Guggenheimer, J., and Moore, P. A., (2011). The therapeutic applications of and risks associated with acetaminophen use: a review and update. *The Journal Of The American Dental Association*, 38-44.

Guillot, A., and Tacke, F. (2019). Liver macrophages: old dogmas and new insights. *Hepatology Communications*, 3(6), 730-743.

Güngör, A., T, Yıldız., ve Akyıldız, L. (2008). Tüberküloz tedavisi sırasında hepatotoksisite. *Dicle Tıp Dergisi*, 35(1), 5-9.

Haddadin, SY., Haddadin, J., and Benguiar, R., (2012). The effect of royal jelly on growth and shortchain acid production of probiotic bacteria and activity of bacterial procarcinogenic enzymes in rat faeces. *Pol J Food Nutr Sci*, 62(4), 251-258.

Hall, J.E., (2010). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Elsevier Health Sciences, 886-889.

Hamed, I.H.K.A. (2016). *Determining Normal Liver Stiffness in Khartoum State Population by Ultrasonography*. (Doctoral dissertation).

Hamza, R. Z., Al-Eisa, R. A., and El-Shenawy, N. S. (2022). Possible ameliorative effects of the royal jelly on hepatotoxicity and oxidative stress induced by molybdenum nanoparticles and/or cadmium chloride in male rats. *Biology*, 11(3), 450.

Han, B., Fang, Y., Feng, M., Lu, X., Huo, X., Meng, L., and Li, J. (2014). In-depth phosphoproteomic analysis of royal jelly derived from western and eastern honeybee species. *Journal of Proteome Research*, 13(12), 5928-5943.

Harchegani, A. B., Khor, A., Niha, M. M., Kaboutaraki, H. B., Shirvani, H., and Shahriary, A. (2019). The hepatoprotective and antioxidative effect of saffron stigma alcoholic extract against vincristine sulfate induced toxicity in rats. *Interdisciplinary Toxicology*, 12(4), 186-191.

Heneghan, M.A., Yeoman, A.D., Verma, S., Smith, A.D., and Longhi, M.S. (2013). Autoimmune hepatitis. *The Lancet*, 382(9902), 1433-1444.

Hüz, M. (2017). *Methotrexate ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı molsidominin koruyucu ve tedavi edici etkisinin ratlarda araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi).

Jalili, C., Farzaei, M. H., Rashidi, I., Mohammadnezamian, A., and Ghanbari, A. (2022). Royal jelly protects dichlorvos liver-induced injury in male Wistar rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 17(2), 209.

Kabakcı, A.G., ve Bozkır, M. G., (2023). Metotreksatın Neden Olduğu Karaciğer Toksisitesi Üzerinde Linoleik Asitin Koruyucu Etkisi. *Uluslararası Morfoloji Dergisi*, 41(1),237-245.

Kadiçesme, Ş. Y., Kara, F., Adali, Y., and Aydın, U. (2021). Ratlarda rottlerin'in otofaji üzerine etkili doz düzeyinin araştırılması. *Dicle Tıp Dergisi*, 48(3), 537-543.

Kaiser, P., and Stäheli, P. (2014). Avian cytokines and chemokines. *In Avian immunology Academic Press*, 2(1), 189-204.

Kamakura, M. (2011). Royalactin duces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 473(7348), 478-483.

Kamal MA, French SW. Drug-induced increased mitochondrial biogenesis in a liver biopsy. *Exp Mol Pathology* 2004, 77 (3), 201-204.

Kandemir, F. M., Kucukler, S., Caglayan, C., Gur, C., Batil, A. A., and Gülçin, İ. (2017). Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: Biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and antiautophagic properties. *Journal of Food Biochemistry*, 41(5), e12398.

Karadağ, A. (2016). Otofaji: programlı hücre ölümü. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 15(2), 19-26.

Karadeniz, A., Simsek, N., Karakus, E., Yildirim, S., Kara, A., Can, I., ... and Turkeli, M. (2011). Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Karanfil, A. (2020). *Parasetamol ile Oluşturulmuş Deneysel Karaciğer Toksisitesi Modelinde Dekspantenol ve Tokoferol'un Olası Koruyucu Etkisi* (Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi).

Kaya, C., Çalışkan, Y., ve Yönden, Z. (2012). Apoptozis. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 3(11), 26-37.

Kelekcio, H. (2020). *Parasetamol ile Oluşturulmuş Deneysel Karaciğer Toksisitesi Modelinde Dekspantenol ve Tokoferol'un Olası Tedavi Edici Etkilerinin Araştırılması* (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi).

Khalilzadeh, M., Panahi, G., Rashidian, A., Hadian, MR., Abdollahi, A., Afshari, K., and Dehpour, AR. (2018). The protective effects of sumatriptan on vincristine-induced peripheral neuropathy in a rat model. *Neurotoxicology*, 67, 279-286.

Khazaei, F., Ghanbari, E., and Khazaei, M. (2020). Protective effect of Royal Jelly against cyclophosphamide-induced thrombocytopenia and spleen and bone marrow damages in rats. *Cell Journal (Yakhteh)*, 22(3), 302.

Kheyri, H., Cribb, B. W., Reinhard, J., Claudianos, C., and Merritt, D. J. (2012). Novel actin rings within the secretory cells of honeybee royal jelly glands. *Cytoskeleton*, 69(12), 1032-1039.

Kirici, M., Turk, C., Caglayan, C., and Kirici, M. (2017). Toxic effects of copper sulphate pentahydrate on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of freshwater fish *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) tissues. *Applied Ecology and Environmental Research*, 15(3), 1685-1696.

Koukourakis, M. I., Kalamida, D., Giatromanolaki, A., Zois, C. E., Sivridis, E., Pouliliou, S., and Harris, A.L. (2015). Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines. *PloS One*, 10(9), 1-13.

Kösoğlu, M., Yücel, B., Gökbulut, C., Konak, R., ve Bircan, C. (2013). Hasat zamanının arı sütünün kimi biyokimyasal ve iz element kompozisyonları üzerine etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 233-237.

Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., and Maleszka, R. (2008). Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319(5871), 1827-1830.

Küçük, E., Karaciğer Görüntüsü. Erişim:02/01/2023, <http://www.invotek.com.tr/tr/blog/hepatoselluler-karsinoma/>

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lawrence, R.A., ve Burk, R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 71(4), 952-958.
- Lee, W. M. (2003). Drug-induced hepatotoxicity. *New England journal of medicine*, 349(5), 474-485.
- Lind, M. J. (2011). Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine*, 39(12), 711-716.
- Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., and Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 26087-26124.
- Liu, D., Ke, Z., and Luo, J. (2017). Thiamine deficiency and neurodegeneration: the interplay among oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy. *Molecular neurobiology*, 54, 5440-5448.
- Liu, X. (2017). *Molecular Mechanisms of Autophagosome-Vacuole Fusion and Degradation of Peroxisomes by Autophagy* (Doctoral dissertation).
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method methods. 25(4), 402-408.
- Mahmoud, M. E., and Elsoadaa, S. S. (2013). Protective effect of ascorbic acid, biopropolis and royal jelly against aluminum toxicity in rats. *Journal of Natural Sciences Research*, 3(1), 102-112.
- Mannaa, F. A., and Abdel-Wahhab, K. G. (2016). Physiological potential of cytokines and liver damages. *Hepatoma Research*, 2, 131-143.
- Martins, D. B., Lopes, S. T. A., Mazzanti, C. M., Spanevello, R., Schmatz, R., Corrêa, M., Veiga, A.P.M. (2011). Lipid peroxidation in rats treated with vincristine sulphate and nandrolone decanoate. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(1), 107-113.
- Mian, M., Tinelli, M. D. E., March, E., Turri, G., Meneghini, V., Pescosta, N., ... and Berno, T., (2016). Bortezomib, thalidomide and lenalidomide: have they really changed the outcome of multiple myeloma. *Anticancer Research*, 36(3), 1059-65.
- Mora, E., Smith, E. M. L., Donohoe, C., and Hertz, D. L. (2016). Vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric cancer patients. *American Journal of Cancer Research*, 6(11), 2416.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Tsuchiya, K., Shibata, T., and Seiwa, E. (2004). Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50375-50381.

- Mostafa, R. E., El-Marasy, S. A., Jaleel, G. A. A., and Bakeer, R. M. (2020). Protective effect of royal jelly against diclofenac-induced hepato-renal damage and gastrointestinal ulcerations in rats. *Heliyon*, 6(2),1-9.
- Mukherjee, S., Ghosh, S., Choudhury, S., Adhikary, A., Manna, K., Dey, S., and Chattopadhyay, S. (2013). Pomegranate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf2-NF- κ B pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(12), 2040-2050.
- Mureşan, C. I., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Bobiş, O., Bonta, V., Zacharias, I., and Paşca, C. (2016). Quality parameters for commercialized royal jelly. Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. *Animal Science & Biotechnologies*, 73(1).
- Nabas, Z., Haddadin, M. S., Haddadin, J., and Nazer, I. K. (2014). Chemical composition of royal jelly and effects of synbiotic with two different locally isolated probiotic strains on antioxidant activities. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(3),171-180.
- Nejati, V., Zahmatkesh, E., and Babaei, M. (2016). Protective effects of royal jelly on oxymetholone-induced liver injury in mice. *Iranian Biomedical Journal*, 20(4), 229-234.
- Nicholson, D. W., Thornberry, N.A. (2003). Life and death decisions. *Sciences*, 299(5604), 214-215.
- Njoku, D. B. (2014). Drug-induced hepatotoxicity: metabolic, genetic and immunological basis. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 6990-7003.
- Ozcan, L., and Tabas, I. (2012). Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annual Review of Medicine*, 63, 317-328.
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., and Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194-205.
- Önel, A. U., ve Yıldırım, M. (2021). Sitokinler ve kanatlılarda sitokinlerin aşı adjuvantı olarak kullanımı. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 12(1), 21-32.
- Papadakis, K. A., and Targan, S. R. (2000). Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annual Review of Medicine*, 51, 289.
- Pasupuleti, VR., Sammugam, L., Ramesh, N., and Gan, SH., (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*,1-22.
- Patil, S. A., Patil, R., Pfeffer, L. M., and Miller, D. D. (2013). Chromenes: potential new chemotherapeutic agents for cancer. *Future Medicinal Chemistry*, 5(14), 1647-1660.
- Pavel, C. I., Mărghitaş, L.A., Bobiş, O., Dezmirean, D. S., Şapcaliu, A., Radoi, I., and Mădaş, M. N. (2011). Biological activities of royal jelly-review. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 108-118.

- Placer, Z. A., Cushman, L.L., and Johnson, B.C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359-364.
- Ponziani, F. R., Pecere, S., Gasbarrini, A., and Ojetti, V. (2015). Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. *Expert Review Of Gastroenterology & Hepatology*, 9(8), 1055-1067.
- Ramadan, M. F., and Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 39-52.
- Ramaiah, S. K. (2007). A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1551-1557.
- Ramanathan, A. N. K. G., Nair, A. J., and Sugunan, V. S. (2018). A review on Royal Jelly proteins and peptides. *Journal of Functional Foods*, 44, 255-264.
- Rapport, A. M., Borowy, C. T., Loughheed, W. M., and Lotto, W. N. (1954). Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. *Anat Rec*, 119, 11-27.
- Rezaeikia, Z., Saeidi-Sar, S., Malakijoo, N., and Mousavi, Z. (2019). Chemoprotective effect of *Fumaria parviflora* L. extract against vincristine induced hepatotoxicity in male rats. *Medical Science*, 29(2), 619-624.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(7), 519-529.
- Ross, MH., Pawlina, W. (2016). Histology A text and atlas. 7th. Ed., Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 626-640.
- Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Caboni, M. F., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L. B. (2009). Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1), 1-6.
- Said, R., and Tsimberidou, A. M. (2014). Pharmacokinetic evaluation of vincristine for the treatment of lymphoid malignancies. *Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology*, 10(3), 483-494.
- Saral, Ö., ve Kolaylı, S. (2012). Arı ürünlerinin karaciğer hasarını önlemedeki rolü nedir. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 12 (4), 147-152.
- Sedlak, J., and Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192-205.
- Shati, A. A., and Elsaid, F. G. (2019). Hepatotoxic effect of subacute vincristine administration activates necrosis and intrinsic apoptosis in rats: protective roles of broccoli and Indian mustard. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 125(1), 1-11.

Shehu, A. I., Ma, X., & Venkataramanan, R. (2017). Mechanisms of drug-induced hepatotoxicity. *Clinics in liver disease*, 21(1), 35-54.

Shirani, K., Yousefsani, B. S., Shirani, M., and Karimi, G. (2020). Protective effects of naringin against drugs and chemical toxins induced hepatotoxicity: A review. *Phytotherapy research*, 34(8), 1734-1744.

Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613-619.

Silici, S., Ekmekcioglu, O., Kanbur, M., and Deniz, K. (2011). The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *World Journal Of Urology*, 29(1), 127-132.

Singh, A., Bhat, T. K., and Sharma, O. P. (2011). Clinical biochemistry of hepatotoxicity. *J Clin Toxicol*, 4, 2161-0495.

Škubník, J., Pavlíčková, V. S., Ruml, T., and Rimpelová, S. (2021). In Combination Therapy of Cancer: Emerging Trends in Clinic. *Biology*, 10(9), 849.

Sorucu, A. (2019). Arı ürünleri ve apiterapi. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 10(1), 1-15.

Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., and Peng, Z. Y. (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, Article ID 5080843:1-13.

Sun, Y. I., Oberley, L. W., and Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3), 497-500.

Şentürk, M., ve Karabıyık, T. N. Hepatektomi ve Karaciğer Rejenerasyonu. 1.Basım. Çanakkale: Rating Academy; 2019.

Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*, 13(3), 184-190.

Tarhan, Ö.D. Karaciğerin Görevleri (Fonksiyonları). Erişim:27/05/2023, <https://www.turkcerrahi.com/makaleler/karaciger/karacigerin-gorevleri/>

Tarhan, S. (2013). *ε-Vinişlerinin tek başına ve kemoterapötik bir ajan ile birlikte HEPG2 hücreleri üzerine antioksidan etkisinin incelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, ESOGÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Temel, M. K. (2015). Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 30(1), 96-108.

Terada, Y., Narukawa, M., and Watanabe, T. (2011). Specific hydroxy fatty acids in royal jelly activate TRPA1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2627-2635.

Tohamy, H. G., El-Neweshy, M. S., Soliman, M. M., Sayed, S., Shukry, M., Ghamry, H. I., and Abd-Ellatieff, H. (2022). Protective potential of royal jelly against hydroxyurea-induced hepatic injury in rats via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptosis properties. *Plos one*, 17(3), e0265261.

Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical biochemistry*, 524, 13-30.

Uçar, M., (2018). Arı sütünün diyabet, tümör oluşumu ve metabolik sendrom üzerine etkisi. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(2), 101-112.

Uğuz, C. (2016). *Ratlarda Borun Gebe Hayvanlarda Karaciğer NF-kB Tnf- α ve IL-6 Ekspresyonları Üzerine Etkileri* (Doktora tezi).

Upmanyu, R., Dvivedi, J., and Saxena, Y. (2009). Hepatotoxic effects of vincristine: an experimental study on albino rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, 53(3), 265-270.

Vítek, L. (2020). Bilirubin as a signaling molecule. *Medicinal Research Reviews*, 40(4), 1335-1351.

Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., and Fernández-López, J. (2017) Royal jelly: Health benefits and uses in medicine In Bee Products-Chemical and Biological Properties. *Springer Cham*, 199-218.

Yardı, A., Kandemir, F. M., Çomaklı, S., Özdemir, S., Caglayan, C., Kucukler, S., and Çelik, H. (2021). Protective effects of curcumin against paclitaxel-induced spinal cord and sciatic nerve injuries in rats. *Neurochemical Research*, 46, 379-395.

Yardim, A., Kandemir, F. M., Ozdemir, S., Kucukler, S., Comakli, S., Gur, C., and Celik, H. (2020). Quercetin provides protection against the peripheral nerve damage caused by vincristine in rats by suppressing caspase 3, NF- κ B, ATF-6 pathways and activating Nrf2, Akt pathways. *Neurotoxicology*, 81, 137-146.

Yayla, N. (2014). *Ratlarda Parasetamolle İndüklenen Akut Karaciğer Toksisitesi Üzerine Nigella Sativa L. Etanol Ekstresinin Etkilerinin Araştırılması* (Doktora Tezi).

Yılmaz, M., Çağlı, A., ve Manav, S. (2017). Arı Sütü. *Apitherapy HandBook*.

Yılmaz, O. F. (2021). Oksidatif Stres ve Karaciğer Hastalıkları. *Muş Alparslan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(1), 8-15.

Yılmaz, M. A. (2020). Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation. *Industrial Crops and Products*, 149, 112347.

Yun, H.R., Jo, Y.H., Kim, J., Shin, Y., Kim, S. S., and Choi, T. G. (2020). Roles of autophagy in oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3289.

Zhang, J.M., and An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27.

Zhao, M., Zhao, H., Deng, J., Guo, L., and Wu, B. (2019). Role of the Clock protein in liver detoxification. *British Journal of Pharmacology*, 176(24), 4639-4652.

Zheng, H. Q., Hu, F. L., and Dietemann, V. (2011). Changes in composition of royal jelly harvested at different times: consequences for quality standards. *Apidologie*, 42(1), 39-47.

Zimmerman, H. J. (2000). Drug-induced liver disease. *Clinics in liver disease*, 4(1), 73-96.

Zong, Y., and Friedman, J. R. (2014). Liver development. *Liver Disease in Children*, 1-813.

Zorer, B. (2016). *Investigation of antiapoptotic, antigenotoxic and antioxidant effects of royal jelly by molecular, biochemical and stereological methods in ultraviolet B-induced skin damage model in albino rats*. (Master's thesis)

Wang, F., Zhong, G., Ning, Z., Liao, J., Yu, W., Wang, C., and Hu, L. (2020). Long-term exposure to copper induces autophagy and apoptosis through oxidative stress in rat kidneys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110158.

Wang, H., Dai, R., Wei, X., and Zhang, Z. (2015). Small-molecule inhibitor of Bcl-2 (TW-37) suppresses growth and enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Journal of Ovarian Research*, 8(1), 3.

Wible, D. J., and Bratton, S. B. (2018). Reciprocity in ROS and autophagic signaling. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 28-36.

Wilson, C. J., Finch, C. E., and Cohen, H. J. (2002). Cytokines and cognition the case for a head to toe inflammatory paradigm. *Journal of the American Geriatrics Society*, 50(12), 2041-2056.

Woods, J. S., Dieguez-Acuña, FJ., Ellis, ME., Kushleika, J., and Simmonds, PL. (2002). Attenuation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) promotes apoptosis of kidney epithelial cells: a potential mechanism of mercury-induced nephrotoxicity. *Environ Health Perspect*, 110- 819.

Wright, T. M., and Vandenberg, A. M. (2007). Risperidone- and quetiapine-induced cholestasis. *Annals of Pharmacotherapy*, 41(9), 1518-1523.

Wu, Z., Wang, H., Fang, S., and Xu, C. (2018). Roles of endoplasmic reticulum stress and autophagy on H₂O₂-induced oxidative stress injury in HepG2 cells. *Molecular medicine reports*, 18(5), 4163-4174.