

Sıçanlarda Siklofosfamid Nedenli Mesane Hasarı Üzerine Borik Asidin Koruyucu
Etkisi

Döndü Tuğçe Tanrıverdi

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2019

The Protective Effect of Boric Acid on Cyclophosphamide-Induced
Bladder Damage in Rats

Döndü Tuğçe Tanrıverdi

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

May 2019

Sıçanlarda Siklofosfamid Nedenli Mesane Hasarı Üzerine Borik Asidin Koruyucu Etkisi

Döndü Tuğçe Tanrıverdi

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Adnan Ayhancı

“Bu Tez Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
“2018/648-1” no’lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.”

Mayıs 2019

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Döndü Tuğçe Tanrıverdi'nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Sıçanlarda siklofosfamid nedenli mesane hasarı üzerine borik asidin koruyucu etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Adnan Ayhancı

İkinci Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Cengiz

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. Adnan Ayhancı

Üye : Prof. Dr. Hakan Şentürk

Üye : Doç. Dr. Gökhan Kuş

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Adnan Ayhancı danışmanlığında hazırlamış olduğum “Sıçanlarda siklofosamid nedenli mesane hasarı üzerine borik asidin koruyucu etkisi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

Tez kapsamında yürütülen tüm deney hayvanı çalışmaları için ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)’nin 648-1/2018 protokol numaralı izni alınmış ‘Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi’ ve ‘Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi’nde yer alan tüm şartlara uyulduğunu beyan ederim. 24/05/2019

Döndü Tuğçe Tanrıverdi

İmza

ÖZET

Sitotoksik bir alkilleme maddesi olan siklofosfamid (CP), yaygın olarak kullanılan bir antimitotik ajandır. Ancak CP kullanımı, hemotoksisite ve ürotoksisitenin de dahil olduğu çoklu organ toksisitelerine neden olmaktadır. Hemorajik sistit, CP nedenli oksidatif strese atfedilen doz sınırlandırıcı yan etkilerden biridir. Borik asit (BA) serbest radikallere ve oksidatif ataklara karşı olduğu bilinen güçlü antioksidanlardan biridir. Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda CP'nin neden olduğu mesane hasarı üzerine BA'nın olası koruyucu etkisini belirlemektir. Toplam 24 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçana standart kemirgen diyeti uygulandı. Sıçanlar rastgele 4 eşit gruba ayrıldı: Kontrol grubundaki sıçanlara 6 gün boyunca her gün 0.5 mL serum fizyolojik (SF) intraperitonel (i.p.) olarak verildi. 2. gruptaki sıçanlara 6 gün boyunca her gün 0.5 mL SF, 4. gün tek doz 200 mg/kg CP verildi. 3. gruptaki sıçanlara 6 gün boyunca her gün 200 mg/kg BA verildi. 4. grupta 6 gün boyunca her gün 200 mg/kg BA alan sıçanlara 4. günde tek doz 200 mg/kg CP verildi. Son BA veya SF uygulamasından 24 saat sonra, sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Deneyin sonunda etik kurallara uygun olarak, sıçanların mesaneleri ışık mikroskopik (histolojik) ve immünohistokimyasal (bax, bcl-2 ve kaspaz-3 gibi apoptotik belirteçler) analizler için alındı. CP uygulanan sıçanların mesanelerinde, geçici epitelyal incelme, belirgin bir inflamatuvar reaksiyon ve kanama gözlemlendi. CP uygulanan grupta ayrıca, bcl-2'nin aktivitesi azalırken, bax ve kaspaz-3 pozitif hücrelerin sayısında artış görüldü. Buna karşılık, tedavi edilen CP+BA grubunda, mesane dokusunda hasarın oldukça azaldığı, bax ve kaspaz-3 pozitif hücre sayısında bir azalma, bcl-2 pozitif hücre sayısında bir artış saptandı. Ayrıca BA'nın kendi başına verildiğinde mesanede herhangi bir dejenerasyon ve apoptoza neden olmadığı tespit edildi. Sonuçlarımız, BA ön tedavisinin, anti-apoptotik ve antioksidan özellikleri ile CP nedenli mesane hasarına karşı sıçan mesanesini önemli derecede koruduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Siklofosfamid, mesane hasarı, borik asit, apoptotik belirteçler, sıçan.

SUMMARY

Cyclophosphamide (CP), a cytotoxic alkylating agent, is an prevalently used antimetabolic agent. However, the use of CP leads to multiple organ toxicities including hemotoxicity and urotoxicity. Hemorrhagic cystitis noted as one of the dose limiting side effects of its use, which is attributed to oxidative stress. Boron (B) is strong antioxidants against free radicals and oxidative attacks. The aim of the current study was to assess the probable caring effect of B on CP induced bladder damage in rats. A total of 24 Sprague Dawley male rats received a standard rodent diet. Rats were randomly divided into 4 equal groups: Rats in the control group were given 0.5 mL saline (SF) intraperitoneally (i.p.) every day for 6 days. Rats in group 2 were given 0.5 mL of SF daily for 6 days and 200 mg/kg of CP on day 4. The rats in group 3 were given 200 mg/kg BA every day for 6 days. The rats in group 4 receiving 200 mg / kg BA every day for 6 days were given 200 mg/kg CP on the 4th day. Twenty-four hours after the last BA or SF administration, the rats were sacrificed under anesthesia. In accordance with the ethical rules, at the end of the experiment, bladders of rats were taken for light microscopic (histological) and immunohistochemistry (apoptotic markers such as bax, bcl-2 and caspase-3). In the bladders of rats treated with CP, transient epithelial thinning, marked inflammatory reaction and bleeding were observed. In the CP-treated group, the activity of bcl-2 decreased while the number of bax and caspase-3 positive cells increased. On the other hand, in the treated CP+BA group, there was a decrease in bax and caspase-3 positive cell number, an increase in the number of bcl-2 positive cells, and a decrease in bax and caspase-3 positive cells. As well it was determined that boric acid did not cause any degeneration and apoptosis in the bladder when given on its own. Our results indicate that BA pretreatment significantly protects rat bladder against CP-induced bladder damage with its anti-apoptotic and antioxidant properties.

Keywords: Cyclophosphamide, bladder damage, boric acid, apoptotic markers, rat.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin planlanmasında ve yürütülmesinde bana danışmanlık eden, beni yönlendiren; bilgi, tecrübe ve hoşgörülerinden yararlandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Adnan Ayhancı'ya saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez Savunma Sunumum sırasında teknik bilgi ve tecrübeleri ile desteklerini esirgemeyen Tez Savunma Jürisi üyelerimiz Sayın Prof. Dr. Hakan Şentürk ve Doç. Dr. Gökhan Kuş'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım süresince bana fikirleri ve deneyimleriyle destek olan, vakit ayıran Sayın Prof. Dr. Varol Şahintürk, Dr. Öğr. Üyesi İlknur Kulcanay Şahin, Dr. Öğr. Üyesi Sibel Güneş, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Cengiz ve Biyolog Dr. Özgün Teksoy'a saygı ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca BAP'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca her türlü imkanı bana sağlayan, başarılarımın esas kaynağını oluşturan verdikleri emeklerin karşılığını ödeyemeyeceğim annem Nergis Tanrıverdi ve babam Durmuş Tanrıverdi'ye sonsuz teşekkür ederim.

DÖNDÜ TUĞÇE TANRIVERDİ

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZET | vi |
| SUMMARY | vii |
| TEŞEKKÜR | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xiii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xiv |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI | 4 |
| 3. GENEL BİLGİLER | 7 |
| 3.1. Siklofosfamid | 7 |
| 3.1.1. Siklofosfamidin Kullanım Alanları ve Yan Etkileri | 8 |
| 3.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres | 9 |
| 3.2.1. Antioksidanlar | 10 |
| 3.3. Apoptozis | 11 |
| 3.3.1. Apoptozis Mekanizmaları | 12 |
| 3.3.2. Dış Sinyallerle Apoptozisin Tetiklenmesi | 15 |
| 3.3.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması | 15 |
| 3.3.4. Apoptozisin Genetik Kontrolü ve Antiapoptotik Proteinler | 16 |
| 3.3.5. Apoptozisde Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler | 18 |
| 3.3.6. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler | 19 |
| 3.3.6.1. <u>Yüzey organellerinin kaybı</u> | 19 |
| 3.3.6.2. <u>Hücre büzülmesi</u> | 20 |
| 3.3.6.3. <u>Kromatin yoğunlaşması</u> | 20 |
| 3.3.6.4. <u>Sitoplazmik baloncuklar ve apoptotik cisimlerin oluşması</u> | 20 |
| 3.3.7. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar | 21 |
| 3.3.7.1. <u>Fiziksel Farklılıklar</u> | 21 |
| 3.3.7.2. <u>Morfolojik Farklılıklar</u> | 22 |
| 3.3.7.3. <u>Biyokimyasal Farklılıklar</u> | 22 |
| 3.3.8. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar | 23 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 3.3.8.1. <u>Fizyolojik Olaylar</u> | 23 |
| 3.3.8.2. <u>Patolojik Olaylar</u> | 23 |
| 3.3.9. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler | 24 |
| 3.3.9.1. <u>Morfolojik İmaging Metotları</u> | 25 |
| 3.3.9.2. <u>Histokimyasal Yöntemler</u> | 26 |
| 3.3.9.3. <u>Biyokimyasal Yöntemler</u> | 27 |
| 3.3.9.4. <u>İmmünolojik Yöntemler</u> | 28 |
| 3.3.9.5. <u>Moleküler Biyoloji Yöntemleri</u> | 29 |
| 3.4. Bor ve Borik Asit | 29 |
| 3.4.1. Borik Asitin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri..... | 31 |
| 3.4.2. Borik asit ve kanser tedavisi | 32 |
| 3.5. Mesane Anatomisi | 35 |
| 3.5.1. Mukoza | 36 |
| 3.5.2. Submukoza | 36 |
| 3.5.3. Tunika Muskularis | 37 |
| 3.5.4. Seroza | 37 |
| 3.5.5. Arteriyal Sistem | 37 |
| 3.5.6. Venöz Sistem | 38 |
| 3.5.7. Lenfatik Sistem | 38 |
| 3.5.8. Mesane Nöroanatomisi | 39 |
| 3.5.9. Mesane Histolojisi | 39 |
| 3.5.10. Muskularis Propriya | 40 |
| 3.5.11. Adventisya | 41 |
| 4. MATERYAL VE YÖNTEM | 42 |
| 4.1. Kimyasallar | 42 |
| 4.2. Uygulama | 42 |
| 4.3. Histolojik Analizler | 43 |
| 4.4. İmmünohistokimyasal Analizler | 43 |
| 4.5. İstatistiksel Analizler | 43 |
| 5. BULGULAR VE TARTIŞMA | 44 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| 5.1. Histolojik Bulgular | 44 |
| 5.2. İmmunohistokimyasal Bulgular..... | 46 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 51 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ | 52 |
| EK AÇIKLAMALAR..... | 72 |
| Ek Açıklama-A: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı..... | 73 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 3.1. Siklofosfamidin moleküler yapısı | 7 |
| 3.2. Mitokondri/Sitokrom-c aracılı apoptozisin uyarılması..... | 13 |
| 3.3. Apoptosom | 14 |
| 3.4.Mitokondri/Sitokrom-c aracılı apoptozis oluşturulması. | 14 |
| 3.5. Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi. | 15 |
| 3.6. Apoptosisin morfolojik değişiklikleri. | 20 |
| 3.7. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar. | 21 |
| 3.8. Mesanenin uzunlamasına kesitle açılmış koronal görünümü ve trigon bölgesi. | 38 |
| 3.9. Alt üriner sistemin innervasyonu. | 39 |
| 3.10. Mesanenin katları. | 41 |
| 5.1. Rat deney gruplarına ait mesane kesitleri. a) Kontrol, b) Borik asit ve d)Siklofosfamid+borik asit gruplarında tipik histolojik görünümü..... | 44 |
| 5.2. Sıçan deney gruplarına ait mesane kesitlerinin Bax ekspresyonu. a) Kontrol ve b) Borik asit gruplarında transisyonel epitelde negatif boyanma..... | 46 |
| 5.3. Rat deney gruplarına ait mesane kesitlerinin Bcl-2 ekspresyonu. a) Kontrol ve b) BA gruplarında transisyonel epitelde pozitif boyanma..... | 47 |
| 5.4. Rat deney gruplarına ait mesane kesitlerinin kaspaz 3 ekspresyonu. a) Kontrol, b) BA ve d) CP+BA gruplarında transisyonel epitelde negatif boyanma..... | 48 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Cizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 5.1. Kruskal-Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi, Medyanı. | 45 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

| | |
|-------------------------|--------------------------------|
| mL | Mililitre (10^{-3} litre) |
| mg | Miligram (10^{-3} gram) |
| kg | Kilogram |
| μm | Mikrometre |
| g | Gram |
| H_3BO_3 | Borik Asit |
| H_2O_2 | Hidrojen Peroksit |
| NO | Nitrik Oksit |
| ONOOH | Peroksinitrik Asit |
| O^{2-} | Süperoksit |
| 4-HC | 4-Hidroksiperoksisiklofosfamid |

Açıklama

Kısaltmalar

| | |
|--------|---------------------------------------|
| ACR | Akrolein |
| AO | Antioksidan |
| Apaf-1 | Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör |
| ATP | Adenozin Trifosfat |
| B | Bor |
| BA | Borik Asit |
| cAMP | Siklik Adenozin Mono Fosfat |
| CP | Siklofosfamid |
| FADD | Fas Bağımlı Ölüm Domain Proteini |
| FAM | Fosforamid Mustard |
| Fas-L | Fas Ligand |
| GSH | Glutatyon |
| HB | Hematoksilen boyama |
| HC | Hemorajik Sistit |
| HDAC | Histone Deacetylase |

Açıklama

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar****Açıklama**

| | |
|---------------|---|
| ICC | İnterstisyel Hücreler |
| IF | İfosfamid |
| IGF | İnsulin Like Growth Factor |
| IGFBP-3 | İnsulin Like Growth Factor Binding Protein3 |
| IL-1 β | İnterlökin-1 Beta |
| İ.p. | İntraperitoneal |
| İV | İntravenöz |
| PAF | Platelet Aktive Edici Faktör |
| PUFA | Çoklu Doymamış Yağ Asidi |
| RNT | Reaktif Nitrojen Türevleri |
| ROT | Reaktif Oksijen Türevleri |
| SF | Serum Fizyolojik |
| SOD | Süperoksit Dismutaz |
| TNF- α | Tümör Nekrozis Faktör-Alfa |
| TNFR | Tümör Nekrozis Faktör Reseptör |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, günümüzün önde gelen hastalıklarından biridir. Türkiye’de 70’li yıllarda 4. sıradaki ölüm nedeni olan kanser son yıllarda ilk sıraya yerleşmeye başlamıştır. Kanser oluşumu, somatik hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını düzenleyen karmaşık mekanizmaların kontrolünden kurtularak hızlı ve sürekli bir şekilde çoğalması olarak tanımlanmaktadır (Giray vd., 1996).

Kanser gelişiminde 3 evre bulunmaktadır:

1. Normal hücrenin neoplastik hücreye dönüştüğü başlama evresi.
2. Neoplastik hücrenin çoğaldığı gelişme evresi.
3. Malign özelliğin kazanıldığı gelişme evresi (Giray vd., 1996).

Günümüzde kanser tedavisinde, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerinden bir veya birkaçı kullanılmaktadır (Kızılcı, 1999). Kanser kemoterapisinde amaçlanan, tümörün büyümesini ve farklı odaklarda yeniden gelişmesini engelleyecek ve hatta tümüyle ortadan kaldırılmasını sağlayacak sitotoksik etki oluşturmaktır. Burada en büyük sınırlayıcı faktör tümörün tedavide kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirmesidir. Karşılaşılan diğer temel sorun ise kemoterapötiklerin normal dokular üzerindeki toksik etkisidir (Kızılcı, 1999; Calabresi ve Welch, 1962). Kanser kemoterapisindeki gelişmeler sayesinde hastalık ve ölüm oranları kaydadeğer derecede düşmüştür. Fakat tedavide yüksek doz antikanser ilaçlar kullanılması ve hastaların yaşam sürelerinin uzaması ilaçların toksik yan etkilerini de yükseltmiştir (Meister ve Meadows, 1993). Antikanser ilaçların bazıları özellikle alkilleyici (Siklofosamid, Karmustin, Klorambusil, Prokarbazin vb.) tipte olanları sekonder kanserlere neden olabilmektedir (Kayaalp, 1989). Kanser tedavisi sırasında immünosupresyon oluşturmaları alkilleyici ilaçların dozunu kısıtlamaktadır (Turc and Poulter, 1972; Stockman vd., 1973; Pool vd., 1988; Kawabata vd., 1990).

Siklofosamid (CP), bir oksazafosforin alkilleyici ajan olarak, iltihabı azaltan ve bağışıklık sistemini baskılayan (immünosüpressif) bir ilaçtır. DNA sentezini değiştirerek hücrelerin çoğalmasını engeller (Dollery, 1999). CP diğer kemoterapötiklerle birlikte geniş bir kullanım alanına sahiptir ve yan etkileri vardır. Bunlardan başlıcaları; hematopöietik

depresyon, hemorajik sistit (HC) ve renal toksisitedir (Abraham ve Isaac, 2011). HC, CP'nin en önemli yan etkisidir (Manikandan vd., 2010).

Ciddi HC; idrar torbası kasılması, kansızlık, tekrarlayan idrar yolları enfeksiyonu, idrar torbası delinmesi, renal yetmezlik ve ölüme yol açabilir. CP ayrıca, nekrozis, iç kanama ve fibrosis meydana getirmektedir (Mahmoud vd., 2009). CP'nin iki aktif metaboliti fosforamid mustard (FAM) ve akroleindir (ACR). CP'nin antineoplastik etkileri FAM ile ilişkilidir. FAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CP'nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir. CP'nin toksik etkisi aktif metaboliti olan ACR ile ilgilidir. ACR büyük oranda SOR (serbest oksijen radikalleri) oluşumuna yol açar ve memeli hücreleri için mutajeniktir (Kawabata vd.,1990). CP metabolitleri; COOH, SH, NH₂, PO₃ ve OH gruplarıyla reaksiyon verebilir ve DNA ve proteinlerle çapraz bağ oluşturabilir (Todorova vd., 2009). CP'nin yüksek dozları akut kardiyotoksikite, konjestif kalp yetmezliği, kalp tamponadı ve miyokard depresyonu gibi ölümcül komplikasyonlara yol açabilmektedir (Goldberg vd., 1986). CP'nin toksik etkilerini önleyerek daha yüksek dozlarda kullanılmasına olanak sağlayan yöntemler geliştirilmişse de halen ilaç uygulama sistemleri daha duyarlı olabilecek metodların arayışı içindedir (Ayhanci vd., 2008). Antioksidanların (AO), kemoterapiye bağlı toksisiteyi azaltarak, antikanser ilaçların daha yüksek ve etkin dozlarının kullanılmasına olanak sağlanabileceği ileri sürülmüştür (Block vd., 2007; Ladas vd., 2004; Simone vd., 2007; Christenson vd., 2001; Blumenthal vd., 2000; Borek, 2004).

Kanser nedenleri arasında lipid peroksidasyonunun düşünölmeye başlanması; çalışmaları çeşitli besinsel AO'ların kanser oluşumu üzerine etkilerini araştırmaya yöneltmiştir (Byers ve Perry, 1992). Nitekim AO'ların karsinogenezin başlama ve gelişme dönemini baskıladıkları, hücre ölümü ve değişmesini önledikleri bulunmuştur (İşcan ve Çoban, 1998). Vitaminler (C ve E vitaminleri), enzimler (katalaz, glutatyon peroksidaz) ve mineraller (çinko, selenyum ve bor) gibi antioksidanların, hücreleri birçok patolojik süreçte ilk adım olan lipit peroksidasyonuna ve DNA hasarına karşı koruduğu bildirilmiştir (Ince vd., 2014) Birçok deneysel çalışmada araştırmacılar, artan radikal üretiminin bir sonucu olarak antioksidan seviyelerinin azaldığını bildirmişlerdir. Borik asit (BA) ile birlikte, doğal olarak oluşan bir mineral olan bor, geleneksel olarak tıpta kullanılmasının yanı sıra

endüstriyel, tarımsal ve kozmetik uygulamalarda da yaygın olarak kullanılır (Sogut vd., 2018).

Bor, (B), doğada hiçbir zaman serbest halde bulunmaz. Doğada başta oksijen olmak üzere çeşitli elementler ile bileşik halindedir. Borat olarak isimlendirilen bu bileşiklerden en önemlileri borik asit ve borakstır (Farfán-García vd., 2016). B günlük diyetin bir parçası olarak borik asit (BA) formunda alınmaktadır. BA sindirim sisteminden absorbe edilir, vücut sıvıları ile dağılıma uğrar. (Yılmaz vd., 2016). Birçok çalışmada BA'nın antioksidan (Cengiz, 2018), hepatoprotektif (Söğüt vd., 2018) ve antigenotoksik etkileri (Ince vd., 2014) olduğu gösterilmiştir. Ayrıca BA'nın vücuttaki glutatyon birikimini arttırdığı ve diğer reaktif oksijen türlerini engelleyerek oksidatif hasarı önlediği rapor edilmiştir. Ayrıca BA, vücudun glutatyon depolarını artırarak ve diğer reaktif oksijen türlerini inhibe ederek oksidatif hasarı sınırlamaktadır (Cengiz, 2018).

BA'nın kanser tedavisinde kullanılabilirliğini destekleyen bazı önemli kimyasal özellikleri de bulunmaktadır (Ayodele, 2016). BA kimyasal olarak zayıf bir Lewis asittir ve yapısal özellikleri karbon atomuna benzemektedir. Bu nedenle karbon içerikli birçok substratın yarışmalı inhibitörü olarak davranabilmektedir. Bu özelliği ile BA peptidaz, proteaz, arjinaz, nitrik oksit sentaz ve transpeptidaz gibi birçok enzimi etkili bir şekilde inhibe edebilmektedir (Bradke vd., 2008). BA, fizyolojik doz aralığında, doz bağımlı olarak LNCaP ve Du 145 prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmektedir (Henderson vd., 2015). Bununla birlikte MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında ise BA, apoptozu uyarmakta ve hücre çoğalmasını doz bağımlı bir şekilde azaltmaktadır (Scorei vd., 2008). Ayrıca BA melanoma hücre hatları üzerinde apoptozu uyararak çoğalmayı engelleyici etkiler göstermektedir (Acerbo ve Miller, 2009).

Bütün bunlar dikkate alındığında, bu çalışma BA'nın sıçanlarda CP kaynaklı mesane hasarı üzerindeki koruyucu etkilerini araştırmayı amaçlamıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

İdrar torbası, fizyolojik işlevlerinin yanında birçok ilaç ve kimyasalın vücuttan atılmasında görev alan son organdır (Devries ve Freiha, 1990). Bu kimyasalların uzaklaştırılması aşamasında idrar torbasında harabiyet oluşması kaçınılmazdır. Gelişen harabiyet klinik olarak hemorajik sistitis (HS) ile sonuçlanır (Birder ve Andersson, 2013). HS, mesanenin kanamalı iltihabıdır (Manikandan vd., 2010). Birçok prokaryot, virus, tek hücreli organizma asalak, toksik madde ve ışınımın idrar torbası değişici epitelini ve damarları hasarlayıcı etkisi sonucu kayda değer oranlarda HS oluşmaktadır (Del Pizzo vd., 1998).

Kanser kemoterapisinde en çok rastlanılan HS, hastalara CP ve İfosfamid (IF) verildiğinde oluşan HS'dir (Devries ve Freiha, 1990; Philips vd., 1961; West, 1997). CP nedenli HS'nin görülme sıklığı doza bağlıdır. Alçak doz ve mesane koruyucu kullanmadan CP tedavisinin uzun süre yapıldığı vakalarda HS'nin insidansı %2-40 oranındadır. Yüksek dozda toplardamar içi CP tedavilerinde hastaların %75'inde HS kaydedilmiştir (Etlik vd., 1997). Belirtiler sık işeme, idrar zorluğu, idrarını tam yapamama hissi, çatı kemiği üstü ağrı, mikro hematüri gibi görece hafif belirtilerden ölümcül olabilen ağır bulgulara kadar farklılıklar arzedebilir (Gray vd., 1986).

Siklofosfamid, özellikle karaciğerde, karma mikrozomal fonksiyon oksidaz enzim sistemleri (P450) ile biyotransformasyona uğratarak aktif ürünlerine dönüşür. P450 önce hidroksilasyon ile 4-hidroksiperoksisiklofosfamide (4-HC) akabinde dokularda aldofosfamide ve takiben akrolein (ACR) ve fosforamid mustard (FAM) haline dönüştürülür. FAM antitümöral etkiliyken ACR üriner sisteme temas ettiğinde ürotoksik etki oluşturur (Gray vd., 1986; Brock ve Pohl, 1983; Smith vd., 1997).

Akrolein aynı zamanda sigara, yanmış organik maddeler, insektisitler ve bazı besinlerin kullanılması yolu ile de bedene alınmaktadır (Matsuda vd., 2006). ACR etkisiyle üroepitelin tamamı hasarlanabilir fakat temas süresi daha uzun olduğundan idrar torbası daha büyük bir hasarlanma potansiyeline sahiptir. Hasar görmüş idrar torbası mukozası çıplak gözle görülecek şekilde ödemli ve kanlıdır. Ayrıca açık yaralar, kanamalar, ve doku

ölümleri de gelişebilir (Soysal, 2004). CP nedenli HS'nin patogenezinde interlekin-1beta (IL-1 β), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) ve trombosit aktive edici faktör (PAF) gibi iltihabı uyaran araçların görev aldığı, düşünülmektedir (Gomes vd., 1995; Ribeiro vd., 2002).

İdrar torbası dokusunda yükselmiş reaktif oksijen türevleri (ROT) ve reaktif nitrojen türevleri (RNT) zar lipidlerinde peroksidasyon oluşturur. Dahası hasarlanmış hücrelerde protein denatürasyonu ve DNA hasarı da gelişir (Szabó, 1996; Virág vd., 2003). Siklofosamid verilen deney hayvanlarında antioksidan (AO) enzimlerde fonksiyon belirlenmiştir (Keles vd., 2018). CP nedenli HS'de gelişen toksisitenin sadece ACR kaynaklı olmadığı, ROT ve RNT'nin de bu hasarın oluşmasında etkili olduğu belirtilmiştir (Halliwell, 1991). CP, TNF- α ve IL-1 β salgılanmasına ve bu mediatörlerde aşırı nitrik oksit (NO) salgılanmasına yol açar, bu şekilde üroepitel hasarına serbest radikaller de katılır (Ribeiro vd.,2002; Oter vd., 2004). Yüksek oranda NO üretimi damar dokuda genişlemesine ve ödeme neden olur (Szabó, 1996; Virág vd., 2003). CP'den kaynaklanmayan aşırı NO yükselmelerinde de mesane epiteli hasarının bir markırı olarak Uroplakin 3 transmembran proteininin yapısının haraplandığı gösterilmiştir (Keles vd., 2018). Normal düzeylerde fizyolojik etki gösteren NO, süperoksit (O²⁻) miktarı yükseldiğinde O²⁻ ile birleşerek mesane hasarını daha da arttıran peroksinitrit (ONOOH)'i oluşturur. Dokuda oksidatif hasarın başlıca sorumlusu olarak gösterilen peroksinitrit (Virág vd., 2003; Praticò,2005) öncüllerinden çok daha reaktiftir (Beckman ve Koppenol, 1996).

Bor (B), periyodik sistemde "B" harfi ile simgelenen, proton sayısı 5, molekül ağırlığı 10,81 g/mol olan, metal-ametal arası yarı iletken bir maddedir. B doğada daima bileşik halinde bulunur. Tabiatta başta oksijen olmak üzere çeşitli elementler ile bileşik halindedir. Borat olarak isimlendirilen bu bileşiklerden en önemlileri borik asit ve borakstır (Farfán-García vd., 2016). Borun hayvanlarda ve insanda en yaygın bulunan formu olan borik asit (H₃BO₃); renksiz, kokusuz ve suda kolayca çözünebilen şeffaf kristal yapıdadır. Bor günlük diyetin bir parçası olarak borik asit (BA) formunda alınmaktadır.

BA, gastrointestinal yoldan emilir, beden sıvıları ile dağılır ve yarı ömrü yaklaşık olarak 24 saattir. Akut alımlarda BA'in yarısı 12 saatte, kalanın %90'ı ise 96 saatte bedenden uzaklaştırılır. Kronik alımlarda tamamının ancak 3 haftada vücuttan atılabildiği

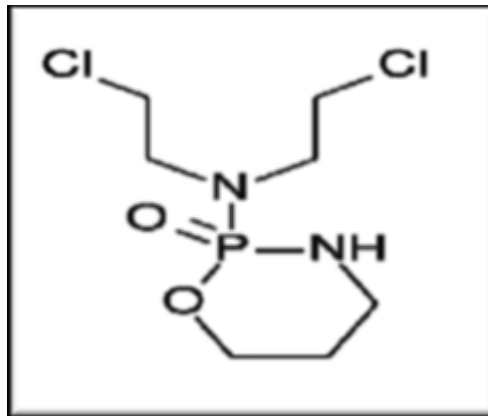
kaydedilmiştir. Bor böbrekler tarafından atılıncaya kadar beyin, kemik, testis ve karaciğer gibi organlarda birikim göstermektedir. Bu durumda bor düşük konsantrasyonlarda tüm organlara dağılmış durumdadır (Yılmaz vd., 2016). BA'nın kanser tedavisinde kullanılabilirliğini destekleyen bazı önemli kimyasal özellikleri de bulunmaktadır (Ayodele, 2016). BA kimyasal olarak zayıf bir Lewis asittir ve yapısal özellikleri karbon atomuna benzemektedir. Bu nedenle karbon içerikli birçok substratın yarışmalı inhibitörü olarak davranabilmektedir. Bu özelliği ile BA peptidaz, proteaz, arjinaz, nitrik oksit sentaz ve transpeptidaz gibi birçok enzimi etkili bir şekilde inhibe edebilmektedir (Bradke vd., 2008). BA, fizyolojik doz aralığında, doz bağımlı olarak LNCaP ve Du 145 prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmektedir (Henderson vd., 2015). Bununla birlikte MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında ise BA, apoptozu uyarmakta ve hücre çoğalmasını doz bağımlı bir şekilde azaltmaktadır (Scorei vd., 2008). Ayrıca BA melanoma hücre hatları üzerinde apoptozu uyurarak çoğalmayı engelleyici etkiler göstermektedir (Acerbo ve Miller, 2009).

3.GENEL BİLGİLER

3.1. Siklofosfamid

Siklofosfamid (CP) kokusuz, beyaz renkli ve moleküler ağırlığı 279,1 olan kristalin tozdur (Şekil 3.1). CP immünsüpresyon ve birçok malignensi tedavisinde oral olarak günlük 100-200 mg ya da intravenöz olarak üç dört haftada bir 600-1000 m²/kg dozda verilebilir. Her iki yöntemle de maksimum kan plazma konsantrasyon seviyesine yaklaşık bir saat içinde ulaşır. Eleminasyon yarı ömrü beş ile sekiz saat arasındadır. Dokulardaki siklofosfamidin dağılımı plazma ile paralellik gösterir, %67'si proteine bağlı CP metaboliti olarak bulunur. Normal hepatik ve renal fonksiyona sahip hastalarda tüm vucüttan hepatik eleminasyonu 5,4 l/h hızla gerçekleşir. İlacın %10'u idrarla değişmeden atılırken CP'nin çoğunluğu inaktif metabolitler halinde atılır (Hadidi vd., 1988). İlacın safradaki konsantrasyonu kan plazmasındakiyle benzer olmasına karşın enterohepatik geri dolaşıma bağlı olarak dışkıda oldukça az bulunur (Dooley vd., 1982).

CP karaciğerde aktif karma fonksiyonlu oksidazlarca aktif metabolitlerine dönüşür. Bu metabolitler kan akımı yoluyla kanserli hücrelere ulaştırılır (Graham ve Riley, 1991).



Şekil 3.1 Siklofosfamid'in moleküler yapısı.

3.1.1. Siklofosfamid'in Kullanım Alanları ve Yan Etkileri

Siklofosfamid (CP), hücre öldürücü etkileri olan ve kanser tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Kanser tedavilerinin yanısıra non-malignant tedavilerde de kullanılmaktadır (Stillwell ve Benson, 1988). CP'nin başlıca kullanıldığı durumlar, akut-kronik kan kanserleri, yumurtalık ve meme kanserleri gibi kanserler ile immun kökenli böbrek hastalıkları, Wegener granülomatozu ve tedaviye dirençli romatizma gibi non-malignant patolojilerde de kullanılmaktadır (Levine ve Richie, 1989).

Siklofosfamid, güçlü antikanser etkisini transforme hücrenin DNA'sına çapraz bağla bağlanarak gösterir (Smith vd., 1997). Ancak CP normal dokularda da DNA, RNA ve proteinlerin sülfidril, karboksil, amino ve fosfat gruplarına kovalent bağlanarak hücre işlevlerini bozmaktadır. (Yagoda vd., 1972). Böylece tedavi edici etkisinin yanı sıra zararlı etkiler de oluşturan CP, aynı zamanda B ve T lenfositlerini de etkileyerek hücrel ve sıvısal bağışıklığı baskılar (Watson ve Notley, 1973; Shepherd vd., 1991).

Diğer taraftan CP, tedavi edici dozlarda kullanılsa bile oldukça çok sayı ve çeşitte yan etkilere neden olabilmektedir. En büyük yan etkisi olan HS'den başka karaciğer toksisitesi (Hamzeh vd., 2018), böbrek toksisitesi (Sheth vd., 2018), testis toksisitesi (Anan vd., 2018), akciğer hasarı (El-kashef, 2018), kalp kası hasarı (Koldysheva vd., 2018) ve pankreas langerhans adacıkları hücrelerinin harabiyeti (Brode vd., 2006) tedavi edici doz sınırları kapsamındaki tedavilerde bile gözlenmiştir.

Hastalığın seyri açısından en büyük hasarlar, yüksek doz CP verilmesinin ardından belirlenmiştir. CP tedavisi alan hastalarda hastalığın seyri ifosfamid ile karşılaştırıldığında daha kötü prognozludur (Lima vd., 2007). HC oluşması, genellikle yüksek doz toplardamar içi CP uygulamasının ardından hemen veya uzun süre ağız yoluyla alçak doz CP verilmesine bağlı olarak aylar sonra da gelişebilir (Devries ve Freiha, 1990). Çok yüksek dozlarda, ani kalp kası iltihabı ve kalp zarı iltihabı gelişebilmektedir. CP'nin en önemli ve doz sınırlayıcı yan etkisi myelosupresyon olup yüksek doza bağlı ender olgular hipotiroidi, katarakt ve sarılıktır. (Kayaalp, 2017).

3.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Oksijen insan hayatı için elzem bir moleküldür ancak vücudun sıradan fizyolojik metabolik faaliyetlerinde oluşan bazı reaktif oksijen türleri hücre hasarlanması oluşturabilir (Diplock, 1998). Reaktif oksijen türleri değişime uğramamış oksijene göre kimyasal tepkimelere girmeye daha meğillidir. Bunların birçoğu serbest radikaldir (Nawar, 1996). Dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu olan yüksek enerjili atom, molekül veya iyonlara radikal ya da çoğu zaman serbest radikal denir. Kararsız yapıda olan bu radikaller hızla reaksiyona girerek kararlı hale geçmek isterler. Dolayısıyla oldukça reaktiftirler (Del Maestro, 1980). Protein, lipid, DNA gibi hücre bilşenlerine zarar verebilecek reaksiyonlara girebilirler. Kalp ve damar hastalıkları, dejeneratif hastalıklar, kanser, yaşlanma, immün sistemi hastalıkları gibi çeşitli hastalıklara neden olur (Diplock, 1998).

Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali hücre zarında varolan polyunsature yağ asitlerinin alfa metilen gruplarından hidrojen atomunu ayırarak lipid peroksidasyonunu başlatır. Superoksit anyonu veya hidrojen peroksitin (H_2O_2); demir iyonunun katalizör olduğu Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla oluşan hidroksil radikali peroksidasyondan esas sorumlu radikaldir (Kehre ve Smith, 1994).

Serbest oksijen radikalleri hücreyi üç yolla hasarladığı bilinir;

a. Hücre zarındaki kolesterol ve çoklu doymamış yağ asitleriyle tepkimeye girerek peroksidasyon metabolitleri meydana getirirler. Lipid peroksidasyonu denilen bu oksidatif tepkimeler hücre zarında irreversible haraplanma oluşturur.

b. Lipid peroksidasyonu ile oluşan radikallerden malondialdehit yapılıdır. Hücre zarındaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına neden olarak iyon geçirgenliğini ve enzim aktivitesini bozar (Mercan, 2004). MDA (malondialdehit) hücre zarını kolayca geçerek DNA ile tepkimeye girer ve hasar oluşturur (Knight, 1995). Hücrenin yaşlanmasına ve kanserleşmesine sebep olabilecek DNA haraplanması yapabilir.

c. Glutatyon ile oksidatif reaksiyona girerek sülfür içerikli radikaller oluştururlar. Bu radikaller proteinlerdeki sülfür ile disülfid bağı yaparak yapılarını bozarlar (Nordberg ve Arner, 2001).

Organizmada prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulmasına oksidatif stres denir. Serbest oksijen radikalleri artarsa oksidatif stres tetiklenir (Berk vd., 2008). Antioksidan enzim sistemleri aktive edilir. Hücre içi savunma sistemleri yeterli olmazsa oksidasyona duyarlı DNA, lipid, protein ve karbonhidratları içeren hücre yapıları hasarlanır (Wildburger vd., 2009). Oksidatif stres oluşturan prooksidanlar canlıda bulunan glutasyon peroksidaz, superoksit dismutaz, katalaz gibi enzimlerle ve de transferin, seruloplazmin, askorbik asit, indirgenmiş glutasyon, alfa-tokoferol gibi antioksidanlarla elemine edilirler (Valko vd., 2006). Antioksidanların azalması veya metabolitlerinin azalmasına bakılarak antioksidan tüketimi belirlenmek suretiyle oksidatif stres değerlendirilebilir (White vd., 2006).

3.2.1. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin canlılarda önemli hasarlar oluşturduğu bilinmektedir. Bu hasarları önlemeye karşı antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemler SOD (süperoksit dismutaz), katalaz, ferritin gibi hücre içi ya da serüloplazmin, haptoglobulin, hemopeksin, transferin gibi hücre dışı olabilmektedir (John ve Halliwell, 1999; Sikka vd., 2013).

Antioksidanlar organizmayı serbest radikal hasarından korumak için çeşitli savunma yöntemleri kullanırlar;

- a. SOD ve katalaz gibi enzimlerle katalitik olarak uzaklaştırılabilir.
- b. Serbest radikal oluşumu proteinler yapılarını ayırarak veya oksijen molekülüne elektron aktarımını engelleyerek kontrol edebilir. Bu yolla transferrin, albumin, haptoglobulin, hemopeksin, hemoksijenazlar kullanılarak hem, bakır ve demir iyonları gibi prooksidanların etkinliği sınırlandırılabilir.
- c. Şaperon proteinleri DNA molekülünü sararak, mitokondriyal enzimler membrandaki PUFA (çoklu doymamış yağ asidi) miktarını ayarlayarak biyomolekülleri oksidatif stresten korurlar.
- d. Karotenoidler super oksid radikalinin reaktivitesini baskırlar. Bu özellik karotenoidlere özgüdür.

e. E. coli bakterisinin fumaraz-c enzimi oksidatif hasara duyarlı molekülleri duyarsız olanla yer değiştirerek koruma sağlar.

f. Glutasyon (GSH), alfa-tokoferol, askorbat, urat, albumin ve plazminojenler gibi antioksidanlar serbest radikallerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek önemli biyolojik moleküllerin zararlı radikallerle etkileşmesini önlerler. Normal hücre yapısının bozulması metal iyonları salınmasına sebep olur ve oksidatif hasar hızlanır. Demir iyonlarının H_2O_2 'den uzak tutmak koruma sağlar (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

g. Süperoksid dismutaz, glutasyon peroksidaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz, katalaz enzim fonksiyonu olan endojen antioksidanlardır. Transferin, serüloplazmin, ferritin, myoglobin, hemoglobin, melatonin, glutasyon, sistein, bilirubin, urat, albumin, karnozin ve laktoferrin enzim görevi olmayan endojen antioksidanlardır (Silva, 2006). Folik asit, alfa-tokoferol, beta-karoten, demir şelatörleri ve askorbik asit ise organizmaya dışarıdan alınan ekzojen antioksidanlara örnek oluşturur (Cross, 2003; Burtis, 1999).

3.3. Apoptozis

Çok hücreli kesintisiz bir şekilde yeni hücreler üretirken, yıpranmış ya da hasarlanmış hücreler hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylelikle vücudun dengesi korunmaktadır. Hücreler ölümünün apoptoz ve nekroz olmak üzere iki türü vardır (Ameisen, 1996; Thompson, 1995). Apoptoz ve nekrozda hücre ölümü, düzenli bir şekilde işleyen biyokimyasal ve morfolojik mekanizmalar sonucu gerçekleşir (Kiess ve Gallaher, 1998).

Vogt 1842 yılında normal gelişim sürecinde gerçekleşen hücre ölümü belirlemiştir. Programlanmış hücre ölümü kavramı ilk kez 1965'te, apoptozis ifadesi ise 1972'de Kerr ve ekibince tanımlanmıştır (Kerr vd., 1972). Kerr, programlanmış bir şekilde ölen hücrelerin nükleuslarında kondanse olmuş kromatin materyalini belirlemiş ve organellerin bozulmadan kaldığını farkedince bunu büzüşme nekrozu olarak isimlendirmiştir.

Apoptozis'in orjini "apo-TOE-sis" 'dir ve Latince anlamı "sonbaharda yaprak dökümü" demektir (Touchette ve Fogle, 1991). Hücre çoğalması mitoz bölünme ile sağlanırken herhangi bir dokuda bulunması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir

(Bellamy vd., 1995, Cummings vd., 1997). Programlanmış hücre ölümü olan apoptozis fizyolojik hücre ölümü ya da hücre intiharı olarak da bilinir ve bölünebilen dokuların hücrelerinde mitozis ile bir denge halindedir (Bellamy vd., 1995; Majno ve Torisl, 1995, Schwartzman ve Cidloski, 1993).

Deneysel bir apoptozis modelinde glukokortikoid verilerek immatür timus hücrelerinde oluşturulmuş apoptozda, apoptotik hücre DNA'sının jel elektroforetik ayrımında, DNA'nın dağıldığı, apoptoza özgü merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğu belirlenmiştir (Wyllie, 1980). Yüksek doz steroidler verilerek yapılan diğer bir çalışmada, timus hücrelerinin doğrudan apoptozise girmediği, önce apoptozu uyaracak genlerin aktive edildiği daha sonra da hücrelerin apoptozise itildiği bu şekilde programlı hücre ölümünün genler kullanılarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla düzenlenir (Cohen, 1993).

KontROLSÜZ hücre ölümü olan nekroziste hücre deplazmolize olur, mitokondri şişer, organeller bozulur, hücre zarı yırtılır ve sitoplazma hücre dışına geçerek iltihap oluşumuna yol açar. Apoptoziste ise hücre zarı bütünlüğünü korur. Apoptoziste fazla miktarda ATP'ye gereksinim duyulmaktadır. Nitekim hücrenin apoptozise mi yoksa nekrozise mi gideceğine ATP miktarı yön verir. Bu durum mitokondrinin önemini apoptozisin erken aşamasında ortaya koymaktadır. Zira ciddi hücre yaralanmalarında apoptoz için gerekli enerji karşılanamadığından hücre nekroz yolu ile ölmektedir (Lu vd., 2000). Hücre intihar şekli olan apoptoziste, hücre kendisini aktif bir şekilde öldürür. Apoptozis, çekirdek bütünlüğü ve DNA parçalanması ile belirlenir (Gavrieli vd., 1992; Lu vd., 2000).

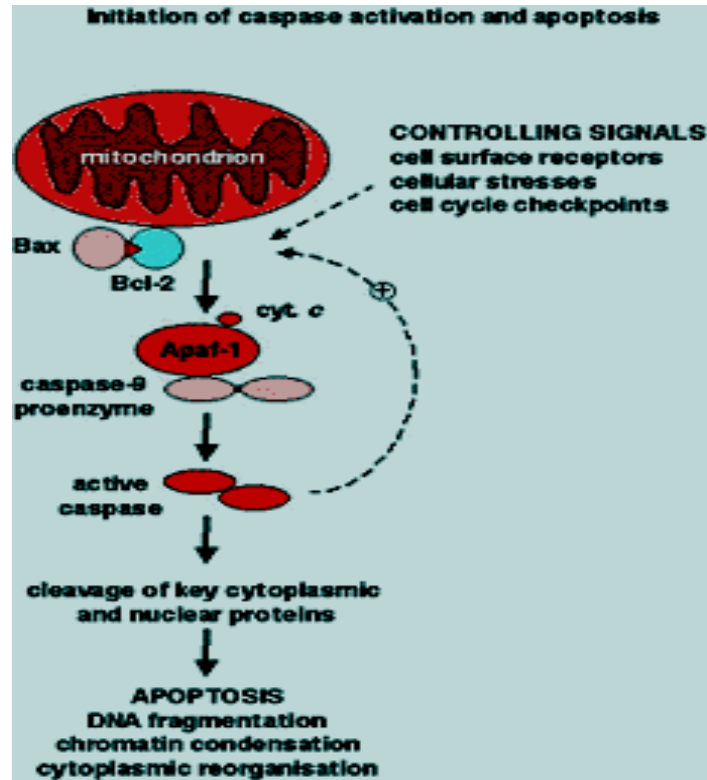
3.3.1. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisin uyarılmasında üç sinyal yolu görev almaktadır.

1. Mitokondri/Sitokrom-c aracılı yol
2. Hücre zarındaki almaçlara bağlanan ölüm aktivatörleri ile uyarma
3. Endoplazmik Retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

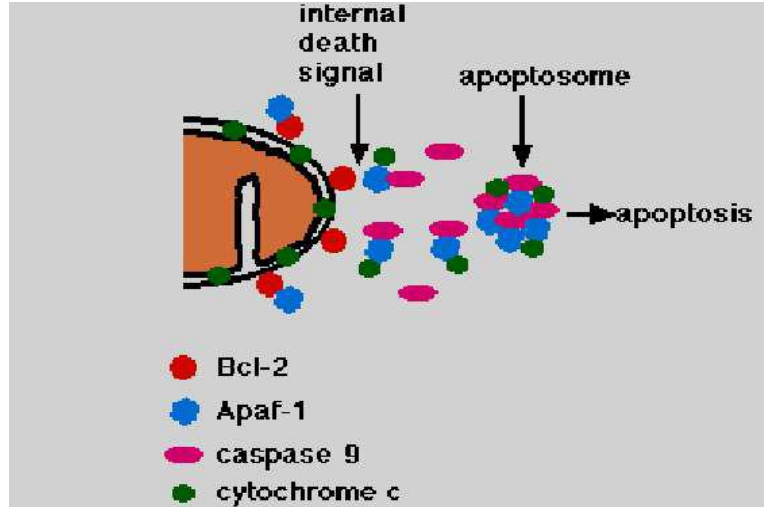
Normal koşullarda ATP üretmek için sitokrom-c içeren mitokondri, mitokondrial baskı olduğu şartlarda salgıladığı sitokrom-c aracılığı ile hücreyi apoptoza götürecektir. kaspaz-3 aktivasyonunu sağlamaktadır (Crowe vd., 1997; Li vd., 2000; 34. Lou vd., 1998;

Lu vd., 2000; Takagi vd., 2003). Mitokondri/Sitokrom-c aracılı yolda mitokondrinin kontrolünde olan apoptotik proteaz aktive edici faktor (Apaf-1) ve kaspaz-9 yer almaktadır (Hu vd., 1999; Liu vd., 1997; Krajewski vd., 1999). ATP ile aktive edilmiş sitokrom-c Apaf-1 ile birleşerek prokaspaz-9'u kaspaz-9 şeklinde aktifleştirir. Kaspaz-9 da kaspaz-3'ü aktifleştirerek diğer kaspaz kaskadının uyarılmasını sağlar (Krajewski vd., 1999; Keane vd., 2001) (Şekil 3.2).



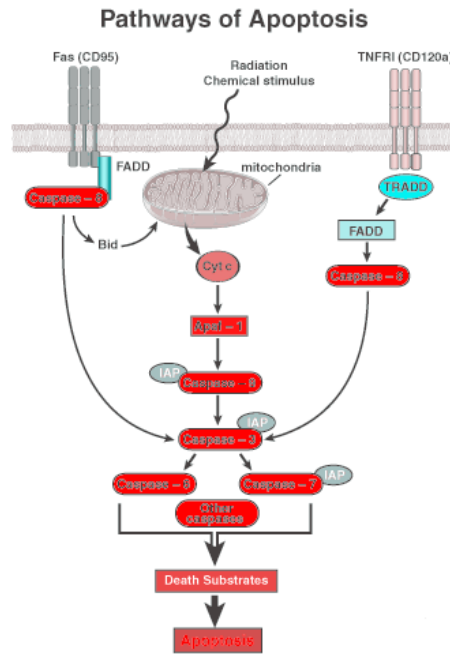
Şekil 3.2 Mitokondri/Sitokrom-c aracılı apoptozisin uyarılması (Krajewski vd.,1999).

Normal bir hücre mitokondrisinin dış zarında Bcl-2 proteini bulunur (Choi vd., 2001; Newton ve Strasser, 1998.). Apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlayan Bcl-2, gelişen hasar sonucu mitokondride yarıklar meydana getirerek sitozole Apaf-1 ve Sitokrom-C salınımına neden olur (Hu vd., 1999; Takahaski vd., 1999).



Şekil 3.3 Apoptosom (Krajewski vd., 1999).

Mitokondri/Sitokrom-c aracılı apoptozis yolağında terminal uç kaspaz-3'tür. Başlayan proteolitik aktivite ile sitozoldeki yapısal proteinlerin sindirimi, DNA'nın parçalanması ve hücrenin fagositozu gerçekleşir (Lu vd., 2000; Keane vd., 2001; Nakatsuka vd., 1999).

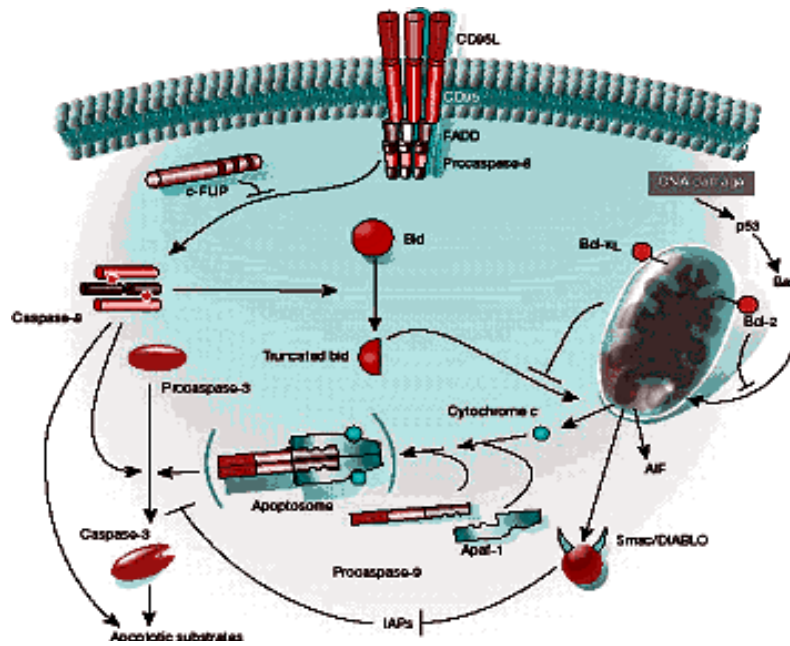


Şekil 3.4 Mitokondri/Sitokrom-c aracılı apoptozis oluşturulması (Keane vd., 2001).

3.3.2. Dış Sinyallerle Apoptozisin Tetiklenmesi

FAS-L ve TNF gibi birbirini bütünleyen ölüm uyarıcılarının hücre yüzeyindeki FAS ve TNF almaçları ile birleşmesiyle sitozole kaspaz-8 aktive edici uyarılar ulaşır. Kaspaz-8, kaspaz-9'a benzer şekilde öteki kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna neden olur (Keane vd., 2001; Lou vd., 1998).

FAS ve p-75 ile ilişkili olan SCI reseptörleri, tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesinin üyeleri olup apoptotik hücre ölümüne yol açan kaspaz kaskadını aktive etmektedirler (Banasiak ve Haddad, 1998). FAS-L'nin FAS almaçına bağlanıp etkileşmesi, FADD (FAS bağımlı ölüm proteini) aracılığı ile gerçekleşir ve akabinde de kaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptotik süreç gelişir (Banasiak ve Haddad, 1998; Kromer vd., 1995) (Şekil 5).



Şekil 3.5 Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi (Banasiak ve Haddad, 1998).

3.3.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması

Kaspaz- 12, amiloid β norotoksitesine katkıda bulunan endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptotik yolu kullanmaktadır (Keane vd.,2001; Nakamura vd., 2000) ve bu yol mitokondrial/sitokrom-c ile ölüm almaçlı aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum (Ca^{++}) dengesi ve zar proteinlerinin katlanmasını içeren pekçok olayda hayati öneme sahiptir (Nakamura vd., 2000). ER zarında yer alan Kaspaz-12, ve ER aracılı

apoptoziste temel oluşturan bir kaspazdır. Yapılan son çalışmalarda Ca^{++} miktarının yükselmesi ile aktive olan kalpain'in ER'yi etkilemesi sonucu prokaspaz-12 aktive edilerek kaspaz-12 şeklinde sitozole geçer. Sitoplazmaya geçen kaspaz-12, kaspaz-9 ile etkileşerek sitoplazmada kaspaz kaskadını aktive eder (Rao vd., 2001; Bao ve Liu, 2003).

3.3.4. Apoptozisin Genetik Kontrolü ve Antiapoptotik Proteinler

Hücrenin normal büyüme ve gelişmesini düzenleyen genler olan protoonkogenler, mutasyon geçirdiklerinde onkogenlere dönüşerek hücrenin aşırı bir şekilde büyüme ve bölünmesi yönünde uyarılar çıkarırlar. Hücrenin gereksiz çoğalmasını uyarıcı genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise tümör supressör genlerdir (Akins vd., 1996; Miller vd., 1990; Nowell, 1990). Son araştırmalar, bazı onkogenlerin ve tümör supressör genlerin apoptozu kontrol ettiğini ortaya koymaktadır (Caotes vd., 1996). Vertebrata'da programlı hücre ölümünü düzenleyen genler c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir. Bu genlerin ürettikleri proteinler de aynı isimlerle bilinmektedir (Choi vd., 2001; Newton ve Strasser, 1998; Nakano, 1997; Wyllie, 1995).

p-53:

p-53 geni, apoptozisi düzenleyen diğer bir tümör supressör gen olup hipoksi ve reaktif oksijen türlerinin artışı p-53 aracılı DNA onarımını ve/veya apoptozisi başlatır (Banasiak ve Haddad, 1998). DNA hasarlanmışsa S safhasına geçişi durdurarak, DNA onarımı için vakit kazanılır, eğer hasarın onarımı imkansız ise zarar görmüş hücreler apoptozis ile imha edilir (Nakano, 1997; Miyashita vd., 1994; Spencer vd., 1996).

c-myc

c-myc protoonkogeni bir transkripsiyon düzenleyici protein olup ortamda bazı faktörlerin varlığına bağlı olarak hücrenin çoğalmasına ve fizyolojik ölümüne sebep olur (Evan vd., 1992). c-myc geni hücrenin büyümesini programlayan bir genidir. Eğer hücrede hem c-myc hem de gerekli büyüme faktörleri yoksa çoğalma durur, c-myc ve büyüme faktörleri de yeterli ise çoğalma olur, c-myc var fakat büyüme faktörleri yoksa apoptozis görülür (Schwartzman ve Cidloski, 1993; Evan vd., 1992; Wagner vd., 1993).

Bcl-2 ve Bcl-xl

Bir on ikiden fazla üyesi olan Bcl-2 (antiapoptotik protein) ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur (Lu vd., 2000; Newton ve Strasser, 1998). Bcl-2 ailesi üyelerinden bazıları proapoptotik aktiviteye sahipken (bax ve bad), bazıları da antiapoptotik (hücre koruyucu) aktivite gösterirler. Hücrenin yaşayacağını veya öleceğini bu proteinlerin düzeyleri belirler. Bcl-2 ailesinin etki yeri mitokondridir ve bcl-2 güçlü bir antiapoptotik proteindir (Newton ve Strasser, 1998). Antiapoptotik yolakta mitokondriden sitozole sitokrom-c salınmasını önlemede görev alır. Bcl-2 mitokondri zarından başka, ER ve çekirdek zarında da yer alır (Choi vd., 2001; Miyashita vd., 1994; Korsmeyer, 1992). Mitokondri dış zarında yer alan ile birlikte mitokondri zar permeabilitesini düzenlerler. Bcl-xl ve Bcl-2, proapoptotik Bax ve Bad proteinlerini inaktive ederek apoptozisi önlerler (Keane vd., 2001). Bcl-xl, kaspaz aktivitesini Apaf-1 üzerinden engellerken (Lu vd., 2000; Hu vd., 1999) Bax ve bad proteinleri ise aktiviteyi sayıları bir düzineden fazla olan kaspazlar üzerinden sağlarlar. Kaspazlar aktif merkezlerinde sistein aminoasiti bulunan ve aktiviteyi hücre ölüm yolunda ortaya çıkan proteazlardır. Bcl-2 ailesi, kaspaz-9'u aktive veya inaktive edebilir. TNF- α gibi sitokinler kaspaz-2 ve kaspaz-8'i, uyarır (Choi vd., 2001).

XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP

Memelilerde, XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Bruce, Survivin ve pIAP gibi proteinler antiapoptotik protein ailesi olarak tanımlanmıştır. Bu proteinlerin çoğu antiapoptotik etkilerini kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'a bağlanıp onları inaktive ederek gösterirler (Keane vd., 2001). Antiapoptotik proteinler kaspazları ölüm almaçları ve mitokondrial yolak üzerinden inaktive ederler (Li vd., 2000; Keane vd., 2001; Bao ve Liu, 2003).

Proapoptotik Proteinler

Bax, Bad ve Bid

Normal bir hücrede sitoplazmada bulunan Bax, apoptotik bir uyarının alınmasıyla mitokondriye yönelir. Bazı konformasyon farklılaşmaları Bax'ın hidrofobik C terminal ucunun acığa çıkmasına ve sitokrom-c'nin sitozole salınmasına yol açar. Bax salınımı kalpain tarafından indüklenir ve sitokrom-c sitozole salınır (Miyashita vd., 1994; Wingrave vd., 2003). Bad, normal hücrelerde mitokondri dış membranında bulunur. Apoptozisde

farklılaşan Bax'ın N terminal ucu ortaya çıkınca, bcl-xl bad'dan ayrılır (Takahaski vd., 1999; Wingrave vd., 2003). Diğer taraftan Bid, bcl-2'yi inhibe etmek veya Bax'ı aktive etmek üzere mitokondriye yönelir (Newton ve Strasser, 1998). Endojen bid'in yarısı sitoplazmada erirken diğer yarısı hücre içi zarlarda bilhassa da ER'de yer alır (Li vd., 2000; Lu vd., 2000; Rao vd., 2000).

3.3.5. Apoptozisde Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler

Apoptotik uyarı taşınımı ile alakalı kazanılan veriler, hücre içi diğer uyarıların taşınmasında görev alan bazı bileşik ve enzimlerin, apoptozisteki uyarı taşınmasında da rol oynadığını ortaya koymaktadır (Cohen, 1993; Eastman, 1995).

Hücre içi uyarı taşınımında yoğun bir şekilde kullanılan Ca^{++} , apoptoziste de görev almaktadır. Nitekim hücre içi Ca^{++} artışı hücreyi apoptozise yöneltmektedir (Cohen, 1993). Sitozolde Ca^{++} konsantrasyonundaki hafif artış, c-myc, c-fos ve ısı şok proteinlerini harekete geçirerek hücrenin apoptozise gitmesine yol açar. Ca^{++} , adenilat siklazları uyarma ve inaktive etme yeteneğine sahip olup (Bellamy vd., 1995; Brinley vd., 1978) c-AMP ve protein kinazlar yoluyla uyarı taşınmasını etkiler. Hücre içi c-AMP seviyesindeki artışın birçok hücre türünde apoptozisi uyardığı rapor edilmiştir. Diğer taraftan Ca^{++} 'dan bağımsız olarak da apoptozis gerçekleşebilmektedir (Bellamy vd., 1995). Artmış sitozolik Ca^{++} , inaktif haldeki Ca^{++} bağımlı proteazları ve nükleazları aktive ederek sitozolik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü nükleozomlar arası DNA fragmentasyonuna yol açar (Touchette ve Fogle, 1991). Ca^{++} minerali, inaktif haldeki endonükleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz gibi inaktif enzimleri aktive ederek apoptozise yol açar (Earnshaw, 1978).

Kalsiyum bağımlı endonükleazlar: Endonükleazlar, sitozolde yükselen Ca^{++} ile aktiveleştirildiğinde, H1 histon kısmından DNA zincirini, 180-200 baz çifti ve katları uzunluğunda parçalar oluşur (Eastman, 1995; Earnshaw, 1978; Balakumran vd., 1996; Collins vd., 1997).

Transglutamazlar: Fizyolojik ölümden büzüşüp ve küçük parçalara ayrılan hücreler, transglutamazların oluşturduğu çapraz protein bağlanmaları ile kimyasallara karşı direnç kazanırlar (Bellamy vd., 1995; Cohen, 1993; Eastman, 1995).

Proteazlar: Histon proteinleri ve kromatini stabilize eden proteinleri parçalayan enzimlerdir (Collins vd., 1997). 'Kalpin, Ca^{++} bağımlı nötral bir proteazdır ve hücre iskeletinin yıkılmasına neden olur (Earnshaw, 1978). Lizozomların proteolitik etkinliğinde işlev gören katepsin-D, lizozomal bir proteaz olup geç apoptoziste ortaya çıkan bir endopeptidazdır (Schwartzman ve Cidloski, 1993; Cohen, 1993).

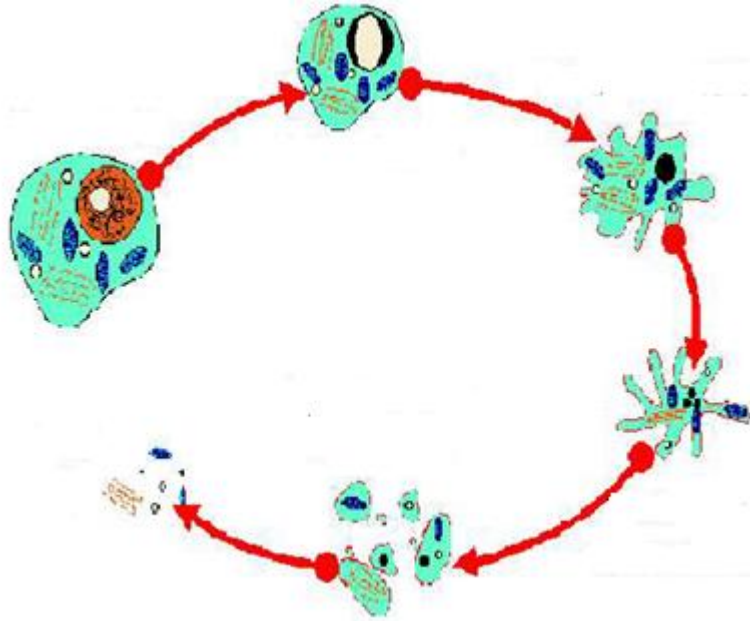
Lipid Modifiye Edici Enzimler: Sağlıklı hücrelerin zarlarında ATP bağımlı fosfolipid translokaz enzimi ile sağlanan asimetrik bir fosfolipid sıralanması bulunmaktadır (Bellamy vd., 1995). Apoptotik uyarı başladığında, fosfolipid translokaz enziminin etkilenmesi sonucu bozulan membran asimetrisi, makrofajların hücreyi yabancı olarak algılamasına ve hücreyi fagosite etmelerine neden olur (Bortner vd., 1995).

Protein Kinazlar: Proteinlerin fosforlanmasında görev alan membran ve sitoplazma enzimlerinin, apoptotik uyarıların taşınmasında çok önemli fonksiyona sahip oldukları belirlenmiştir (Bellamy vd.,1995). Bu proteinkinazlardan protein kinaz-C apoptozisi inhibe ederken, protein kinaz-A, apoptozisi aktive eder (Cohen, 1993; Eastman, 1995).

3.3.6. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

3.3.6.1. Yüzey organellerinin kaybı

Apoptozise giden hücrenin yüzeyi yuvarlaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısı, hücrenin yüzeyindeki mikrovillüsler ve özel bağları kesilir (Balakumran vd., 1996; Wyllie, 1980) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Apoptosisin morfolojik değişiklikleri (Balakumran vd., 1996)

3.3.6.2. Hücre büzülmesi

Apoptotik hücre, bulunduğu ortamdaki normal hücelere kıyasla daha ufak ve daha yoğun sitoplazmalıdır. Endoplazmik retikulum hariç diğer organeller düzgün durumlarını sürdürürler (Cohen, 1993). Ancak sitozol kondanse olduğundan organeller yoğun gözlenir. Hücre membranı düzgün olduğu için nekrozda görülen iltihabi durum apoptozda görülmez (Wyllie, 1980; Balakumran vd., 1996) (Şekil 3.6).

3.3.6.3. Kromatin yoğunlaşması

Apoptoziste yapısal değişikliğin odağı nukleustur ve genel olarak büzülür (Balakumran vd., 1996). Kondanse olan kromatin parçalanmış halde bir arada bulunur. Porları kaybolan nukleus, düzgün yapısını yitirir ve akabinde küçük kromatin parçalarına ayrılır. Nukleolus genişler ve granülleri dağılır (Balakumran vd., 1996) (Şekil 3.6).

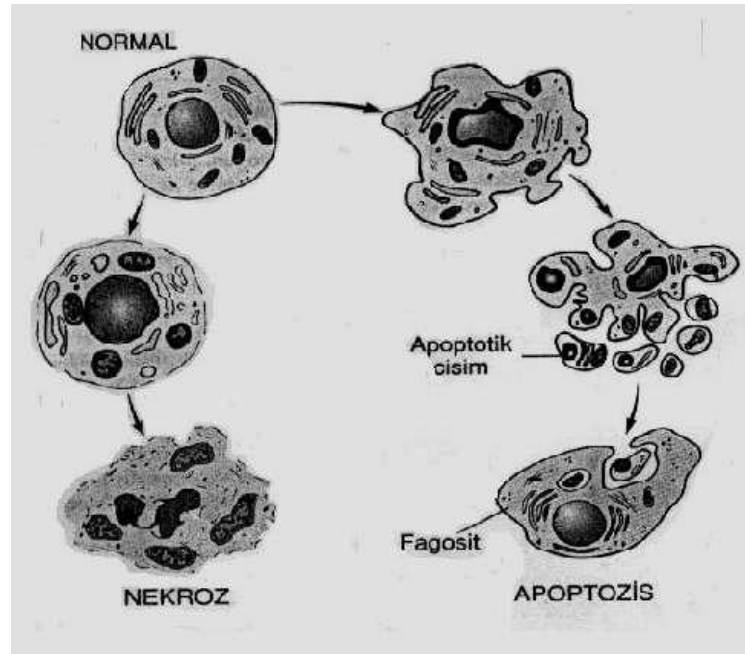
3.3.6.4. Sitoplazmik baloncuklar ve apoptotik cisimlerin oluşması

Hücre zarının yüzeyinde şekillenen tomurcuklanmalardan bazıları, sitoplazma ve zar ile paketlenmiş organelleri içeren apoptotik cisimlere dönüşür (Balakumran vd., 1996). Apoptoziste morfolojik olarak, hücre büzülür ve kromatin kondanse olurken membran tomurcuklanması sonucu fosfotidilserin fosfolipidi ortaya çıkar. Normal hücrelerde zarın iç

kısmında bulunan fosfolipidlerin apoptoziste zarın dış yüzüne çıkar ve fagositoz yapan hücreler için işaret oluşturur (Lu vd., 2000) (Şekil 3.6).

3.3.7. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptozis ile nekrozun aralarındaki farklar şunlardır (Şekil 3.7):



Şekil 3.7 Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar (Cohen, 1993)

3.3.7.1. Fiziksel Farklılıklar

1. Apoptoziste hücreler tek tek etkilenirken nekrozda hücreler grup olarak etkilenir (Cummings vd., 1997; Spencer vd., 1996).
2. Nekroz non-fizyolojik stimuluslarla başlarken, apoptozis fizyolojik stimuluslarla da başlayabilir (Bellamy vd., 1995; Wyllie, 1980).
3. Nekroze hücreler, etrafa verilen kemotaktik bileşikler yoluyla cezbedilen makrofajlarla yutulurlar.

Apoptotik hücreler etrafa kimyasal çekici maddeler yaymadıklarından komşu epitel hücreleri veya makrofajlar tarafından fagozite edilirlir. Dolayısıyla nekrozda gelişen iltihap apoptoziste oluşmaz (Bellamy vd., 1995; Majno ve Torisl, 1995).

3.3.7.2. Morfolojik Farklılıklar

1. Apoptoziste hücre membranında kabarcıklar oluşur ancak hücre membran bütünlüğü bozulmaz, nekrozda hücre membran bütünlüğü bozulur (Spencer vd., 1996).
2. Apoptozis sitoplazmik büzülme ve nuklear kondensasyon ile başlarken nekroz ise sitoplazma genişlemesi ve mitokondride şişme ile başlar (Spencer vd., 1996).
3. Nekrozda hücre tümünden parçalanırken apoptoziste hücre apoptotik cisimler denen daha küçük parçalara dönüşür (Cummings vd., 1997).
4. Nekrozda hücre membranında kesecik oluşmaz ve hücre tümünden parçalanırken apoptoziste membrana bağlı kesecikler şekillenir (Cohen, 1993).
5. Nekrozda hücre organelleri giderek bozulurken apoptoziste ise bcl-2 gen ailesinin oluşturduğu por yapıcı proteinler sayesinde organel bütünlüğü korunur (Cohen, 1993) (Şekil 3.7).

3.3.7.3. Biyokimyasal Farklılıklar

1. Nekrozda membran yapısı bozulduğundan iyon dengesi ortadan kalkar, apoptoziste ise iyon dengesi enzimatik olarak iyi bir şekilde kontrol edilir (Wyllie, 1980).
2. Nekroz pasif bir olay olduğundan enerjiye gerektirmez ve +4°C'de bile oluşabilir. Apoptozis ise enerjiye gereksinim duyulan aktif bir olay olduğundan +4°C'de oluşmaz (Cohen, 1993).
3. Agaroz jel elektroforezinde, nekroz esnasında DNA'nın rastgele sindirimi gözlenmektedir. Apoptoziste ise tesadüfi olmayan, monoooligonukleozomal parçalanma mevcuttur. Bu parçalanma elektroforezde apoptozise özgü "ladder pattern" adı verilen merdiven şeklinde kırılmalar oluşturur (Eastman, 1995; Wyllie, 1980).
4. Nekrozda DNA, hücre bütünlüğü bozulmadan önce parçalanır. Apoptoziste mitokondri sitozole sitokrom-c v.b birçok etken madde salgılar (Bortner vd., 1995).
5. Apoptoziste membran asimetrisinde apoptotik hücrenin iltihap oluşturmadan yerel hücrelerce tanınıp, fagosite edilmesini sağlayan farklılaşmalar oluşurken, nekrozda spesifik olmayan membran parçalanması meydana gelir (Cohen, 1993).

3.3.8. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar

Müller ve Wolf kanallarının içe kıvrılması, kalp ve diğer bazı iç organların boşluklarının oluşması ve bazı organların biyolojik gelişimleri sürecinde apoptozise rastlamak mümkündür (Bellamy vd., 1995). Dahası çeşitli neoplastik oluşumda hem büyüme hem gerileme sürecinde apoptozis görülebilir (Majno ve Torisl, 1995). Diğer taraftan yüksek ısı, alçak doz antikanser ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, düşük oksijen, düşük şiddette fiziksel ve toksik uygulamalara tabi tutulan dokularda da apoptozis görülür (Bellamy vd., 1995). Bu manada apoptozis, özgün bir uyarıya tabi tutulan hücrenin, bu stimulusa aktif bir şekilde verdiği düzenleyici bir yanıttır (Cummings vd., 1997). Programlı bir şekilde ölen hücreler normal doku içinde dağılmış olarak yer alır (Cohen, 1993). Apoptozisin görüldüğü belli başlı durumlar şunlardır:

3.3.8.1. Fizyolojik Olaylar

a. Embriyonun uterus endometriyumuna tutunup yerleşmesi, organogenez ve gelişim sırasında oluşan kıvrılmalar gibi embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre ölümü (Levison ve Hopvwood, 1976).

b. Yetişkinde hormon bağımlı kıvrılma (adet döngüsünde dölyatağını astarlayan hücrelerinin yıkımı, adet kesilmesi sonrasında folikül açıklığının azalması, süt salgılanmasının durmasından sonra meme bezlerinin rejenerasyonu) (Cohen, 1993).

c. Bağırsak kripta epitelleri gibi devamlı çoğalan hücre tiplerinde hücre sayısının dengede kalması için hücre azaltılması (Majno ve Torisl, 1995).

d. Bağışıklık hücrelerin seçimi (hem B hem de T lenfositlerinin sitokin tükenmesinden sonra ve timusun gelişimi sırasında otoreaktif T lenfositlerinin yok edilmesi) (Cohen, 1993).

3.3.8.2. Patolojik Olaylar:

a. Kanserli hücrelerin hem çoğalma hem de gerileme süreçlerindeki hücre ölümü (Cohen, 1993)

b. Kastrasyondan sonra gelişen prostat küçülmesi, glukokortikoid kullanımı sonrası timus bezinde lenfosit kaybı gibi hormonlara bağlı dokularda patolojik küçülme (Cummings vd., 1997).

c. Pankreas ve böbrek kanallarında olduğu gibi parankimden zengin dokularda kanal tıkanmasından sonra patolojik küçülme (Schwartzman ve Cidloski, 1993).

d. Otoimmün hastalıklarda sitotoksik T lenfositleri tarafından gerçekleştirilen hücre ölümü (Cohen, 1993).

e. Işınım, sitotoksik ilaçlar, sodyum fazlalığı, oksijen azlığı ve travma gibi değişik faktörlerle gelişen hücre ölümü (Schwartzman ve Cidloski, 1993).

Yapılan birçok çalışmada apoptozisin artması ya da düşmesinin kanser, otoimmün hastalıklar, virüs enfeksiyonları, sinir sistemini haraplayan hastalıklar gibi bir çok hastalığın gelişiminde rol aldığı belirlenmiştir (Coolsaet, 1980; Kiess ve Gallaher, 1998; Hetts, 1998).

Apoptozisin engellenmesi ile alakalı hastalıklar şunlardır;

1. Kanser: Foliküler lenf kanseri, P53 mutasyonları ile oluşan karsinomlar, Hormon bağımlı tümörler, Akciğer, Prostat ve Yumurtalık kanserleri.

2. Otoimmün bozukluklar: Sistemik lupus eritematozus, İmmün ilişkili glomerulonefritler, Otoimmün şeker, doku reddi.

3. Viral enfeksiyonlar: Herpes virüs, poliovirus, adenovirus.

Apoptozisin Uyarılması ile Alakalı Hastalıklar şunlardır;

1. AIDS

2. Sinir sistemini haraplayan hastalıklar: Alzheimer ve Parkinson hastalığı, amyotrofik lateral skleroz, retinitis pigmentosa, serebellar dejenerasyon.

3. Miyelodisplastik sendromlar: Aplastik anemi.

4. İskemik hasarlar: Myokard infarktüsü, felç, reperfüzyon hasarı.

5. Toksikite kaynaklı karaciğer hasarı

3.3.9. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi belirlemede birçok yöntem geliştirilmiştir. İlk morfolojik özelliklere göre saptanan apoptozis, DNA kırıklarının oluştuğunun belirlenmesiyle beraber 80'li yılların sonuna doğru bu kırıkların saptanmasına yönelik metodlar oluşturulmaya başlandı. 90'lı yıllarda ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği rapor edildi. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının saptanmasına ilişkin yöntemlerle belirlenebilen apoptozis, 90'ların sonunda fosfatidilserin değişimini belirleyen yöntemlerle de ortaya konmaya başlandı. Apoptozisin ortaya konmasına ilişkin geliştirilen bütün yöntemleri, 2000'li yılların başlarında, yalnızca apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan

bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki spesifik formunu belirleyen antikorların kullanılarak daha özgün bir şekilde belirlenmesi izledi. Apoptozisin saptanmasında uygulanan metodlar şunlardır:

1. Morfolojik imaging metotları
2. İmmunohistokimyasal metotlar
3. Biyokimyasal metotlar
4. İmmünolojik metotlar
5. Moleküler biyoloji metotları

3.3.9.1. Morfolojik İmaging Metotları

I. Işık mikroskobu kullanımı

a. Hematoksilen boyama: Hem kültüre edilen hücre araştırmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilen hematoksilen boyama (HB) apoptotik hücrelerin belirlenmesinde de ilk yöntem olarak kullanılması uygundur ve ilk değerlendirme, maliyet gibi çeşitli açılardan diğer yöntemlere karşı üstünlük sağlar. HB'de, boya kromatini boyadığı için apoptotik hücreler çekirdek morfolojisine göre kıymetlendirilir.

İyi bir boyama yapılmışsa apoptozise ilişkin rahatlıkla görülebilen değişimler; hücre büzülmesi "cell shrinkage", kromatin yoğunlaşması "nuclear condensation" ve çekirdek membranının çevrede toplanması, çekirdek küçülmesi "pyknosis" ya da çekirdeğin parçalara ayrılması "nuclear fragmentation" şeklindedir.

b. Giemsa boyama (GB): Giemsa ile boyamada HB'deki gibi çekirdek şekli göz önünde tutularak apoptotik hücreler belirlenir. Sitoplazma sınırları HB'ye kıyasla daha iyi görülmekle beraber HB'ya belli başlı bir avantajı bulunmamaktadır.

II. Floresan mikroskobu/lazerli konfokal mikroskop kullanımı

Floresan boyaların DNA'ya ilgisi fazla olduğundan, hücre kromatini ve çekirdeği kolayca görülebilir. Floresan boyalar hücre kültüründe kullanılırsa, canlı hücre ile ölen hücrenin belirlenmesine imkan verir. Halbuki, HB ya da GB'nın uygulandığı numunelerde hücrelerin tümü metodun özelliğinden dolayı ölmektedir. Bu nedenle hayatta kalan ve ölen hücrelerin ayrımını yapabilmek için, canlı veya ölü bütün hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir diğer boya (örn. propidium iyodur) birlikte kullanılır. Bu boyama metodundaki özellik şudur: Bu metodlarda canlılığın saptayıcısı, hücre zarının sağlam yani işler halde bulunup bulunmadığıdır. Zarı sağlam olan

(canlı) hücreler propidium iyodur gibi yalnızca zar bütünlüğü ortadan kalkmış (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı bütün hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre farkına imkan verir. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskobu ile tanınabilir. Bu metotla hücrelerin ölü ya da canlı olduğu belirlenebilse de ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayrımı HB olduğu gibi çekirdek şekline bakılarak yapılır.

III. Elektron mikroskobu

Apoptoziste en kıymetli metot (gold standard) elektron mikroskobu ile değerlendirme metodu olduğu düşünülmektedir. Şekilsel farklılaşmaların en doğru olarak gözleendiği metoddur. Zira, hücrenin mitokondriyal durumu, hücre membranı ya da çekirdek zarının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi alt bölümlerinin ayrıntıları da izlenebilir. Elektron mikroskobu araştırmalarında, çekirdek parçalanması net bir şekilde gözlenebilir

IV. Faz kontrast mikroskobu

Faz kontrast mikroskobu yalnızca kültür ortamında hücrelerin, "flask" veya "plate"lerde çoğaltıldığı çalışmalarda, hücre veya hücre topluluğunu incelemek maksadıyla kullanılmaktadır.

3.3.9.2. Histokimyasal Yöntemler

I. Anneksin V yöntemi

Sağlıklı hücrelerde membranın sitozole bakan tarafında fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse, PS molekülleri membranın dış tarafına taşınır. Dış yüze taşınan PS'ler, floresan veren bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Bu şekilde apoptotik hücreler belirlenmiş olur.

II. TUNEL yöntemi

DNA'da meydana gelen kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültüre edilmiş solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde çoğaltılmış hücrelerde apoptozisin varlığı bu yöntem ile belirlenebilir.

III. M30 yöntemi

M30 metodunda apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu oluşan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal metotla boyanması prensibine göre saptanır. Yalnızca sitokeratin 18'i ifade eden dokularda kullanılması olanaklıdır. Bu dokular epitelyal kökenli dokulardır.

IV. Kaspaz-3 Yöntemi:

Kaspaz-3 metodu ile yalnızca apoptotik hücrelerde ortaya çıkan aktif kaspaz-3 saptanabilir. Bundan dolayı, dokunun kaspaz-3 ifade ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise neden olan maddenin kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir..

3.3.9.3. Biyokimyasal Yöntemler

I. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA parçalanmasının gösterilebildiği diğer bir methodur. Apoptoziste DNA, 180 baz çifti ve katları şeklinde noktalardan kırıldığı için merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu bulgu apoptozise özgüdür ve nekroziste oluşmaz. Bu nedenle apoptozisi nekrozisten ayırmada yararlı bir methodur.

II. Western Blott

- Substrat kırılmaları
- Aktif kaspazın saptanması
- Sitokrom c salınımı

Bu yöntem aracılığıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin ifade edilip edilmediği (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) belirlenmesi olanaklıdır. Sitokrom c'nin mitokondriden salınıp salınmadığı da bu yöntemle saptanabilir. Yalnız, sitokrom c'nin belirlenmesinde önce alt gruplama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik

yapıları ayrılır. Normalde sitoptazmada bulunmayan sitokrom c'nin bu fraksiyonda bulunması halinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılır.

III. Flow sitometri

- DNA azalması
- Annexin V

Flow sitometri yardımıyla floresan veren bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste ifade edildiği bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin belirlenmesi olanaklıdır. Bu şekilde apoptotik hücreler saptanabilir. Flow sitometri, uygulanmasının kolay olması, kısa zamanda yapılabilmesi ve nitel sonuç verebilmesi bakımından, klinikte apoptozisin belirlenmesinde uygun bir metoddur. Flow sitometri İki ayrı şekilde uygulanmaktadır:

- a. Floresan bir madde olan propidium iyodur kullanılarak,
- b. Anneksin V kullanılarak.

Propidium iyodur kullanılarak uygulanan metotta, kompleks bilgisayar işlemleri kullanılarak hücre boyutu ile kapsadığı DNA miktarı karşılaştırılarak, azalan DNA miktarının apoptozis lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu (sub-G1 piki) belirlenir. Anneksin V kullanılan yöntemde, floresan veren bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak floresan mikroskopuyla uzun süren sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınır.

3.3.9.4. İmmünojenik Yöntemler

I. ELISA

- DNA parçalanması
- M30 düzeyi

ELISA ile hem kültüre edilmiş hücre popülasyonlarında hem de insan plazmasında DNA parçalanmasını saptamak olanaklıdır. Benzer şekilde M30 seviyelerinin belirlenmesi de olanaklıdır.

II. Flourimetrik yöntem

- Kaspaz aktivasyonu (Hücre kültürü)

Kültüre edilmiş hücrelerde kaspaz etkinliğinin belirlenmesinde uygulanan bir metoddur. Bu metotta aranan kaspazın antikorunun olduğu "plate"lere hücre lizatlarının

konulması ile kaspazlar tutulur ve akabinde ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat eklenir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak oluşan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi belirlenir.

3.3.9.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

I. DNA microarrays

Gen ifade dereceleri (mRNA)

- Hücre ölüm almaçları
- Kaspazlar

DNA microarray teknolojisi halihazırda çok yeni pahalı bir metoddur. Ancak, yakın bir zamanda tıp pratiğini kökten değiştirecek. Bu yöntemle aynı anda ve kısa bir süre içinde (eskiden aylarca süren) yüzlerce hatta binlerce genin ifade düzeylerinin belirlenmesi olanak dahilinde olabilecektir (Ulukaya, 2003).

3.4. Bor ve Borik Asit

Bor periyodik tabloda 3A grubunda bulunan bir yarı metaldir. Yarı metal özelliğe sahip olması nedeniyle metallere daha az fakat ametallerden daha yüksek iletkenliğe sahiptir (Alkan, 1985). Periyodik tabloda B simgesi ile gösterilir ve atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81 g/mol'dür (Ishii vd., 1993). Bor kelimesinin kökenleri; Arapça buraq, baurach ve Farsça burah kelimelerinden gelmektedir. Tarihte ilk defa Babiller tarafından M.Ö. 2000 yıllarında metallere eritilmesi işlemlerinde kullandığı yönünde verilere rastlanmaktadır. Bunun yanı sıra bor Mısır, Mezopotamya ve Arap yarımadasında birçok uygarlık tarafından tedavi, mumyalama, ilaç ham maddesi ve temizlik maddesi olarak kullanılmıştır. Yakın tarihte bor element olarak ilk defa 1808'de Fransız bilim adamı Joseph Gay-Lussac ve Baron Louis Thenard tarafından bilim tarihine kazandırılmıştır. Bor ve bileşiklerinin endüstriyel amaçlarla Avrupa Kıtasında kullanılmaya başlaması ise daha eski dönemlere, yaklaşık 13. yüzyıla uzanmaktadır (Woods, 1994). Ülkemiz topraklarında ise bor madeni ilk defa 18. yüzyıl ortalarında tespit edilmiş ve işlenmeye başlamıştır. Cumhuriyet dönemiyle birlikte yapılan yatırımlar sonucunda günümüzde Türkiye, dünya bor üretiminde önemli bir pozisyona ulaşmıştır (Sizmaz ve Yıldız, 2013). Ülkemiz dünya ülkeleri arasında, sahip olduğu bor rezervleri açısından %72'lik pay ile ilk sırada yer almaktadır. Başlıca bor yatakları, Batı Anadolu ve Marmara Denizi güney kesimlerinde,

özellikle Eskişehir ve Kütahya yörelerinde bulunmaktadır (Yenmez, 2009). Bor bileşikleri günümüzde birçok alanda kullanılmaktadır. Tıpta (çeşitli ilaçların üretiminde, vitamin takviyesinde, kanser tedavisi gibi alanlarda), sterilizasyon ve temizlik alanında (çeşitli fungusit, insektisit ve antiseptik maddelerin üretiminde), tarımda (zirai mücadele ilaçlarında, gübre yapımında) ve çeşitli endüstriyel alanlarda (cam, seramik, metal, kozmetik gibi) kullanılmaktadır (Ayrancı, 2005). Doğada bor çeşitli moleküller ile bileşikler yapmış halde bulunur. Bor atomları oksijene yüksek afinite göstermektedir. Borun oksijenle yaptığı bileşikler borat olarak isimlendirilir. Bor doğada en sık borat formunda bulunur. Boratlar arasında özellikle kalsiyum ve sodyum boratlar önemli yer tutar. Boratların diğer önemli bir formu ise borik asittir ve borun insanlarda ve hayvanlarda en sık gözlenen formudur (Boncukçuoğlu vd., 2004).

Borun çözünür formları arasında en yaygın olarak görüleni borik asittir. Borik asit (H_3BO_3); renksiz, kokusuz ve suda kolayca çözünebilir şeffaf kristal yapıda ya da beyaz granüllü toz halinde bulunan bir Lewis asittir ve özgül ağırlığı 1.43 gr/cm^3 'tür (Barranco ve Eckhart, 2004). Borik asitin bilinen üç formu vardır. Bunlar orto, tetra ve meta borik asitlerdir.

Borik asit olarak bilinen ve en yaygın görülen formu ortoborik asittir. Bu formlar ısı ile etkisiyle oluşmaktadır. Örneğin ortoborik asit 100°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda önce metaborik asite, 160°C 'nin üzerinde ise tetraborik asite dönüşmektedir (Kalaçay, 2013). Borik asit doğada yaygın olarak bulunan bir mineral üründür ve geleneksel tıp uygulamaları yanında tarım, sanayi ve kozmetik sektöründe de sıklıkla kullanılmaktadır. Borik asit vücuda alındıktan sonra hızla absorbe edilir ve pasif difüzyon aracılığı ile tüm vücut sıvılarına dağılır. Bazı çalışmalar hem insan hem de sıçanlarda borik asitin kan doku dağılım oranının 1:1 olduğunu göstermektedir. Borik asit vücutta metabolize edilmez ve idrar yoluyla atılır. Vücuttaki yarı ömrü yaklaşık bir gün kadardır ve yumuşak dokularda birikim göstermediği tespit edilmiştir. Ancak buna karşılık borik asitin özellikle kemik dokuya karşı artmış affinitesi bulunmakta olup burada birikim gösterebilmektedir (Qureshi vd., 2001).

3.4.1. Borik Asitin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

İnsanda günlük alınan bor miktarı, coğrafi koşullara bağlı olarak yerleşim bölgesi tarafından belirlenmektedir. Çünkü bor çoğunlukla beslenme esnasında gıdalarla veya su ile vücuda alınmaktadır. Bunun yanı sıra solunum ve deri yoluyla da alımı mümkündür. Bor miktarının yoğun olduğu sularda ve topraklarda yetişen ürünlerin tüketimi, alınan bor miktarını doğrudan etkileyen bir faktör olarak karşımıza çıkar. Günlük olarak beslenme sonucu alınan bor miktarı yaklaşık 2 mg kadardır (Henderson vd., 2015).

Beslenme ile alınan bor önce bağırsak mukozasında borik asite dönüşmekte ve ardından pasif difüzyon ile absorbe olmaktadır. Bor, kan dolaşımına da borik asit şeklinde transfer edilmektedir (Kalaçay, 2013). Vücuda alınan borun %83-98'lik kısmı tüm dokulara borik asit olarak dağılmakta ve 96 saat içinde idrar yolu ile metabolize olmadan atılmaktadır (Henderson vd., 2015). Boratların ve borik asitin metabolize olmamasının nedeni ise bor ve oksijen arasındaki kimyasal bağların koparılması için çok yüksek düzeyde enerjiye ihtiyaç duyulmasıdır (Kalaçay, 2013). Borik asitin yaklaşık yarısı alımdan sonraki ilk 12 saatte, kalan kısmı ise azalan oranlarda 7 gün içerisinde böbreklerden atılmaktadır (Ayrancı, 2005). İnsan böbrek tübül hücrelerinin, voltaj kapılı Na^+ bağımlı NaBCl taşıyıcılar içerdiği ve plazma borik asit seviyelerinin bu şekilde kontrol edildiği bilinmektedir (Barranco ve Eckhert, 2006). Sağlıklı bir insanda kan borik asit miktarı, borun az bulunduğu bölgelerde tespit edilebilir en düşük düzey olarak $4.7 \mu\text{M}$ ($48,5 \mu\text{g}$) ve en yüksek düzey olarak da bor madeni işçilerinde $350 \mu\text{M}$ ($3600 \mu\text{g}$) olarak tespit edilmiştir (Henderson vd., 2015).

Bor bitkiler ve bazı hayvanlar için esansiyel olmakla beraber, beslenme sırasında alınan miktarı ile insan için de faydalı etkilere sahiptir. Besin takviyesi ile bor alınımının insanlarda ve hayvanlarda çeşitli metabolik ve fizyolojik sistemler üzerine önemli etkileri bulunmaktadır. Bor, özellikle bazı minerallerin (Ca, P), vitamin D'nin, bazı enzimlerin (aldehid dehidrojenaz, ksantin oksidaz, sitokrom b5 redüktaz), çeşitli hormonların (insülin, östrojen, testosteron ve tiroid hormonları), enerji substratlarının (trigliserid, glikoz) ve reaktif oksijen türlerinin metabolizmalarını etkilemektedir. Borun bu etkilerine aracılık eden biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak borun biyokimyasal ve fizyolojik etkilerini açıklamaya yönelik olarak iki farklı hipotez

ortaya konulmaktadır. Bunlardan ilki borun hücre zarında hormon yanıtlarını ve transmembran sinyal iletimini etkileyebileceği üzerinedir. İkincisi ise borun çeşitli enzimatik sistemleri düzenleyici etkileri olabileceğine yöneliktir. Ayrıca bor bileşikleri süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz düzeyleri üzerinden antioksidan sistemlere de etki etmektedir (Ince vd., 2010). İnsan sağlığına olan yararlı etkilerinin keşfi ile son yıllarda bor ve bileşikleri üzerine yürütülen çalışmaların sayısında artış gözlenmektedir. Bor ve bileşiklerinin özellikle üreme sistemi üzerine belirgin etkileri olduğu bilinmektedir. Bu etkileri endokrin sistem üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Sıçanlarda yapılan araştırmalarda *in vivo* koşullarda borik asitin östrojen benzeri etkileri olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, MCF7 meme kanseri hücre hatları ile gerçekleştirilen çalışmalar ile *in vitro* koşullarda bu etki doğrulanamamıştır (Wang vd., 2008). Özellikle diyetle alınan bor, kemik sağlığını olumlu yönde etkilemekte, bazı steroid hormonlar ile etkileşmekte, dolaşımdaki 25 hidroksikolekalsiferol ve 17 β - estradiol miktarını artırmaktadır. Bor ve bileşiklerinin inflamasyonda ve immun sistemde rol oynayan eikozonoid yolağı ile ilgili çeşitli enzimlerin *in vitro* aktiviteleri üzerine etkileri olduğu da bilinmektedir. Ayrıca, lipid metabolizması üzerine etkileri ile LDL, trigliserid ve kolesterol düzeylerini düşürdüğü HDL'yi ise artırdığı gösterilmiştir (Scorei vd., 2008). Borik asit toksik olmayan bir ajan olarak sınıflandırılmaktadır.

Sıçanlarda oral LD50 dozu 4 g/kg'dan, subkutanöz LD50 dozu ise 1 g/kg'dan fazla olarak belirlenmiştir (Dieter, 1994). Fransa'da reşit sağlıklı bir insanın günde 7 mg kadar B aldığı rapor edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü günlük alınabilecek B oranını yıllarca 1-3 mg ile sınırlamıştır. Ancak son yıllarda yürütülen çalışmalara dayanarak 1996'da bu miktar 1-13 mg/gün olarak yükseltilmiştir (Şayli, 2003). Kısa sürede çok yüksek dozda maruziyete bağlı olarak depresyon, konvulsiyon ve ataksi gibi belirtiler ortaya çıkabilir. Bununla birlikte borun özellikle üreme sistemini etkilediği ve hamilelikte yüksek dozlarda gelişimsel anomalilere neden olabileceği bildirilmiştir (Henderson vd., 2015).

3.4.2. Borik asit ve kanser tedavisi

Doğal bileşikler günümüzde kanser tedavisi için oldukça önemli potansiyel kaynaklardır. Bunlar arasında en önemli adaylardan biri de bor ve bileşikleridir. Bor doğal olarak meyve ve sebzelerde, ayrıca içme suyunda bulunmaktadır ve bu nedenle normal

günlük bir diyetin parçasıdır. Diyet ile ortalama 15 µM kadar borik asit alındığı tahmin edilmektedir. Borun plazmada dolaşan formu olan borik asitin kemoterapotik olarak kullanılabilirliğini araştırmak üzerine çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalarını olumlu yönde destekleyen en önemli etken, borik asitin bazı önemli kimyasal özelliklerinin kanser tedavisinde etkili olabileceğini gösteren verilerdir.

Borik asit kimyasal olarak zayıf bir Lewis asittir ve yapısal özellikleri karbon atomuna benzemektedir. Bu nedenle karbon içerikli birçok substratın yarışmalı inhibitörü olarak davranabilmektedir. Bu özelliği ile borik asit peptidaz, proteaz, proteozomaz, arjinaz, nitrik oksit sentaz ve transpeptidaz gibi birçok enzimi etkili bir şekilde inhibe edebilmektedir. Bu farmakolojik özelliklerinin yanı sıra; kolay elde edilmesi, düşük toksisite düzeyi, kısa süre içerisinde idrar ile metabolize edilmeden atılımı gibi kanser tedavisi açısından ilgi çeken önemli özelliklere de sahiptir (Bradke vd., 2008).

Bazı epidemiyolojik çalışmalara ait veriler de borik asitin anti-kanserojen etkileri olabileceğine işaret etmektedir. Örneğin, borun diyetle alınımının prostat kanserine karşı koruyucu etkileri olduğuna dair epidemiyolojik veriler bulunmaktadır. Özellikle borik asitin diyet yoluyla yoğun olarak alındığı bölgelerde prostat kanseri görülme oranlarında anlamlı bir azalma söz konusudur. Bunun yanı sıra prostat kanser hücreleri enjekte edilen deney hayvanlarında borik asit kullanımının tümör oluşumunu azalttığı görülmüştür (Gallardo-Williams vd., 2004). Bu bulgu borik asitin nude farelere verilen LNCaP prostat kanser hücrelerinin gelişimini inhibe etmesi ile de desteklenmiştir (Barranco ve Eckhart, 2004). Borik asit, fizyolojik doz aralığında, doz bağımlı olarak LNCaP ve Du 145 prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmektedir. Borik asit hücre düzeyinde bu kanser hücrelerinde siklik ADP riboz ile aktive olan, endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımını inhibe etmekte ve bu organeldeki lüminal Ca^{+2} konsantrasyonlarını düşürmektedir (Henderson vd., 2015). Alvin ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise borik asitin SK-MEL28 insan deri melanoma hücre hatlarında, hücrelerin biyokimyasal yapısını değiştirdiği gösterilmiştir. Buna göre düşük dozlarda borik asit varlığında hücrelerde nükleik asit/protein oranında bir artış görülmektedir ve bu durum hücrelerin aktif olarak replike olduğuna işaret etmektedir. Buna karşılık lipid ve protein içerikte herhangi bir değişiklik görülmemektedir. Yüksek doz borik asit uygulamasında ise nükleik asit protein

oranı düşük olarak tespit edilmekte ve aktif replikasyonun olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte yüksek dozlarda hücre canlılığında belirgin bir azalma olmaktadır ve borik asitin melanoma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği görülmektedir. Bu etkinin ise doz bağımlı olarak, pre-mRNA kesiminin ikinci aşamasını geri dönüşümlü olarak inhibe olması ile gerçekleştiği ifade edilmektedir (Acerbo ve Miller, 2009).

Bor ve bileşiklerinin sahip olduğu anti-tümorojenik etkilerin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak üzerinde en çok durulan muhtemel etki mekanizmalarından biri, karışık bulguların da varlığı ile birlikte kanser hücrelerinde apoptozun uyarılmasıdır. Bu açıdan bakıldığında örneğin, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine borik asit uygulaması ile yapılan bir çalışma bu hücrelerde borik asitin, proliferasyonu doz bağımlı bir şekilde azalttığını ve bunu da apoptozu uyararak gerçekleştirdiğini göstermektedir (Scorei vd., 2008). Ancak bunun yanı sıra hem MDAMB-231 meme kanseri hem de Du-145 prostat kanseri hücre hattı ile yapılan farklı çalışmalarda ise borik asitin hücre çoğalmasını apoptozu uyardan inhibe ettiği vurgulanmaktadır (Scorei vd., 2008). Bu çalışmaların sonuçlarına göre hücreler borik asit etkisi ile yaşlı bir fenotipe dönüşmekte ve siklin A-E ve mitojen aktive protein kinaz proteinlerinde bir azalma görülmektedir (Scorei vd., 2008). Bunun yanı sıra yine prostat kanser hücreleri ile yapılan çalışmalar borik asitin kanser hücrelerinin göçünde anahtar rol oynayan sinyal ağlarının güçlü bir inhibitörü olduğunu ortaya koymaktadır (McAuley vd., 2011).

Prostat spesifik antijen (PSA) prostat dokusu tarafından üretilen kimyasal olarak tripsin benzeri bir serin proteazdır. Normalde prostat salgısına eklenen bu bileşik kanda çok düşük düzeylerde bulunur. Ancak prostat kanserinde serumdaki PSA düzeyleri belirgin oranda artmaktadır. İlginç bir şekilde PSA, IGFBP-3'ü (insulin like growth factor binding protein 3) parçalayarak IGF (insulin like growth factor) oluşumuna neden olmaktadır. IGF'de prostat kanser hücrelerinde mitojenik yeteneği artırmaktadır. Özgül olmayan serin proteaz inhibitör özellikleri bilinen borik asitin, PSA aktivitesini geri dönüşümlü olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu özelliğin keşfi ile de borik asitin prostat kanser hücreleri üzerindeki etkilerine aracılık eden farklı bir mekanizma daha ortaya çıkarılmıştır (Gallardo-Williams vd., 2003). Yine prostat kanseri ile yapılan farklı çalışmalar da borik asitin prostat kanser hücre hatlarında hücre çoğalmasını inhibe ettiğini, ancak bu etkiyi

hücre siklusunda bir değişiklik oluşturmada ve hücre ölümüne neden olmadan ortaya çıkardığını göstermektedir (Barranco ve Eckhert, 2006). Bunlardan farklı olarak borik asitin hücrelerde HDAC'ı da (histone deacetylase) inhibe ettiği gösterilmiştir. HDAC'lar nükelozomların ve dolayısı ile gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahip enzimlerdir. Histon kuyruklarındaki lizin rezidülerini deasetilleyerek transkripsiyonel baskılamaya yol açarlar. HDAC'ları inhibe eden ilaçlar ise hücre büyümesini inhibe ederken hücreleri terminal farklılaşma yönünde uyarır ve kanser gelişimini önleyici bir etki gösterir.

Deney hayvanları embriyoları ile yapılan çalışmalar borik asitin HDAC'ı belirgin bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Bu etki aynı zamanda borik asitin kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden alternatif bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir (Di Renzo vd., 2007).

Sonuç olarak, bor ve borik asit anti-kanserojen bir ajan olarak iyi bir adaydır. Çünkü borik asit doğal olarak zaten kanda bulunmaktadır, günlük diyetin bir parçasıdır, diyetle alım sonrası hızlı bir şekilde absorbe olarak yeterli bir plazma düzeyine ulaşır ve tüm dokulara dağılım gösterir. Ayrıca hücre kültürü, hayvan deneyleri ve epidemiyolojik çalışmalar çeşitli kanser hücreleri üzerine borik asitin antiproliferatif etkileri olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır (Barranco ve Eckhert, 2006).

3.5. Mesane Anatomisi

İdrar torbası, idrar depolama ve boşaltılmasını sağlayan leğen boşluğuna yerleşmiş, içi boş kassal yapıda bir organ olup erişkinlerde boş idrar torbası simfizis pubisin arkasında yer alırken, çocuklarda ve yenidoğanlarda iniş tamamlanmadığından daha yukarı konumda bulunmaktadır (Tanagho,1995). Mesane üçgen şeklinde bir organdır (Şekil 1). Bu üçgenin tepesi önde, tabanı arkada bulunmaktadır. Üreterler arasında uzanan arka kenar, üst yüzeyi tabandan ayırırken yan kenarlar arkada üreterden başlayarak önde mesanenin tepesine kadar uzanırlar ve üst yüzeyi alt-yan yüzeylerden ayırırlar.

Periton üst yüzeyi örter ve bu yan kenarlardan leğen boşluğu yan duvarına geçerek idrar torbası ile leğen boşluğu yan duvarları arasında fossa paravezikalisleri, idrar torbası ile karın ön duvarı arasında ise plika umblikalis mediananın her iki yanında sağ ve sol fossa supravezikalisleri oluşturur. İdrar torbasının üst yüzeyi erkeklerde bütünüyle karın

zarıyla kaplı olup ince barsaklar ve sigmoid kolonla komşudur. Kadınlarda ise döl yatağı ve ince barsaklarla komşudur (James, 1997).

İdrar torbası hareketsiz bölümünü oluşturan mesane boynu ise prostatın tabanına oturur ve içinde üretranın başlangıcı olan internal sfinkter vardır. İdrar torbası boş iken, tümü oblitere olan umblikal arter seviyesinin altında olmak üzere pelvis içerisinde yer alır. Mesane boynu bazı bağlarla komşu yapılara sıkıca tutunurken diğer bölümler subseröz bir fasya ile kaplıdır. Mesane boynu erkeklerde önde sağ ve sol puboprostatik bağlarla pubis alt kenarına, arka yanlarda ise rektovezikal bağlarla rektuma tutunmuştur.

Ligamentum umblikale medianum mesanenin tepesinden başlayarak orta hatta karın ön duvarının arka yüzünden umblikusa uzanır ve mesaneyi göbeğe bağlar. Mesaneden karın ön duvarına doğru uzanan periton kıvrımlarından oluşan; önde tek, yanlarda ise ikişer adet olmak üzere periton plikaları vardır. Mesanenin katları 1. Mukoza, 2. Submukoza, 3. Tunika muskularis (kas tabakası), 4. Seroza.

3.5.1. Mukoza

Mesanenin iç yüzünü örten mukoza, çok katlı değişici epitelden (tranzisyonel epitel) oluşmuştur (James, 1997). Değişici epitelin yüzeydeki hücreleri oval, derindeki hücreleri ise kübik şekilde sıralanır dört-sekiz kat hücreden oluşur. Mesane boş iken bu kübik ve oval hücreler mesane dolduğunda yassı hale gelir. Mukoza tabakası tunika muskularise gevşek bağ dokusundan yapılmış submukoza ile tutunur.

3.5.2. Submukoza

Mukoza altında bulunan submukoza katmanında (lamina propria) her yöne uzanan elastik ve kollajen liflerden oluşan gevşek fibröz dokusu ve kılcıl damarlar uzanır (Hmman, 1993). Mesane kas tabakasına gevşek submukoza tabakasıyla tutunan mesane mukozasında bu durum yalnızca submukoza tabakasının olmadığı trigonda görülmez. Bu nedenle boş mesanenin içyüzü plikalı ve buruşuk görünürken dolu mesanede duvarın gerilmesiyle bu kıvrımlar kaybolur ve mukozanın düz olarak görünür. Submukozanın trigon bölgesinde bulunmaması ve mukozanın kas tabakasına sıkıca tutunması nedeniyle trigon her zaman düz olarak görünür. Mesane tabanında yer alan üçgen şeklindeki trigon üst

köşelerine üreterler açılır. Her iki üreter orifisi arasında yer alan belirgin mukozal kıvrıntıya interüreterik bağ (Mercierebağı) denir (Hmman, 1993).

3.5.3. Tunika Muskularis

1. Stratum longitudinale internum (iç longitudinal tabaka), 2. Stratum circulare (sirküler tabaka), 3. Stratum longitudinale eksternum (dış longitudinal tabaka) Bu kas yapısı belirli bir düzene bağlı olmaksızın her yöne doğru uzanır ve bir tabakadan diğerine doğru uzayarak mesane duvarını bir ağ gibi sarar. Detrusor olarak adlandırılan bu yapı ancak mesane boynunda gerçek anlamda üç tabaka oluşturur. Sirküler lifler korpus etrafında yoğunlaştıkları halde longitudinal lifler apeksten fundusa kadar uzanırlar. Mesane uzun eksenine transvers ve oblik olarak uzanırlar. Dış longitudinal kas tabakası özellikle mesane anterior ve posteriorunda daha belirgin, lateral duvarlarda daha ince iken iç longitudinal kas tabakası gerçek bir longitudinal kas tabakası olarak mesane boynunda yer alır. Eksternal longitudinal liflerin bir kısmı komşu oluşumlara atlayarak özel kasları oluştururlar (Yıldırım, 1990). Örneğin rektumun önü ile mesane arasında uzananlar musculus rektovezikalis, mesane ile pubisin pelvik yüzü arasında uzananlar musculus pubovezikalis olarak adlandırılır.

Sirküler kas tabakasının mesane boynunda sona erdiği ve üretral yapıya katılmadığı bilinmektedir. Öte yandan iç longitudinal tabaka longitudinal olarak, dış longitudinal tabaka ise sirküler ve spiral şekle dönüşerek kadınlarda üretranın eksternal meatusuna, erkeklerde ise prostatik üretranın distaline kadar uzanır ve kısmen prostatın yapısına katılır (Tanagho, 1995; Hmman, 1993).

3.5.4. Seroza

Mesane ile beraber diğer pelvis organlarının en dış katmanını örten seroza (adventisya), kollajen ve birkaç elastik kas lifinden oluşur. İçerisinde kan damarları, küçük sinirler ve çok küçük ganglionlar bulunur. Bu gerçek bir seroza yapısında değildir.

3.5.5. Arteriyel Sistem

Mesane arteria iliaca interna'dan (hipogastrik arter) çıkan arterlerle beslenir. Mesanenin kanlanması büyük oranda a. iliaca interna'nın anteriorundan çıkan a. vezikalis

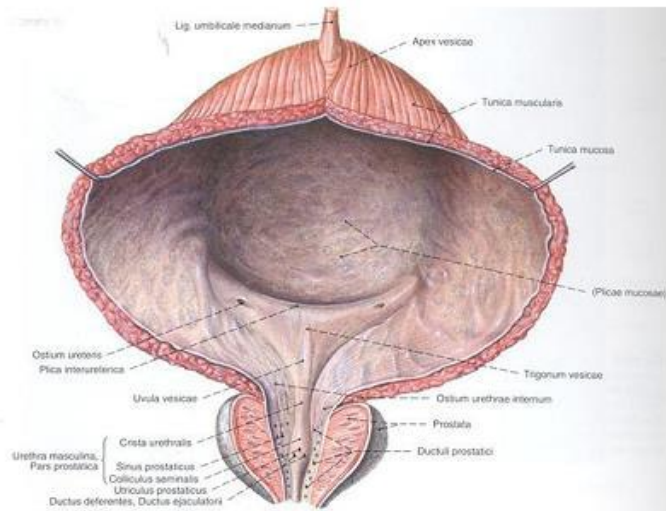
superior ve inferior ile olur. Mesanenin üst ve orta bölümünün kanlanması a. vezikalis superior sağlarken, a. vezikalis inferior ise genellikle a. iliaca interna'dan tek dal olarak bazen a. rektalis media ile birlikte çıkar ve mesanenin tabanına, vezikula seminalislere, prostata dallar verir. Ayrıca obturator ve inferior gluteal arterlerden mesaneye küçük dallar gelir. Kadınlarda uterin ve vajinal arterler de bu bölgeye küçük dallar verir (Tanagho, 1995; Hmman, 1993).

3.5.6. Venöz Sistem

Mesane çevresi ve adventisyası altında çok zengin toplar damar ağları bulunur. Bu pleksuslardan mesaneye gelen venöz kan, idra torbası ve prostatın ön, yan ve arka yüzeylerini saran geniş vezikal ve prostatik venöz ağlarla boşalır. Ön taraftan v. dorsalis penisi de içine alan bu pleksuslar daha sonra internal iliak vene açılırlar (Tanagho, 1995; Hmman, 1993).

3.5.7. Lenfatik Sistem

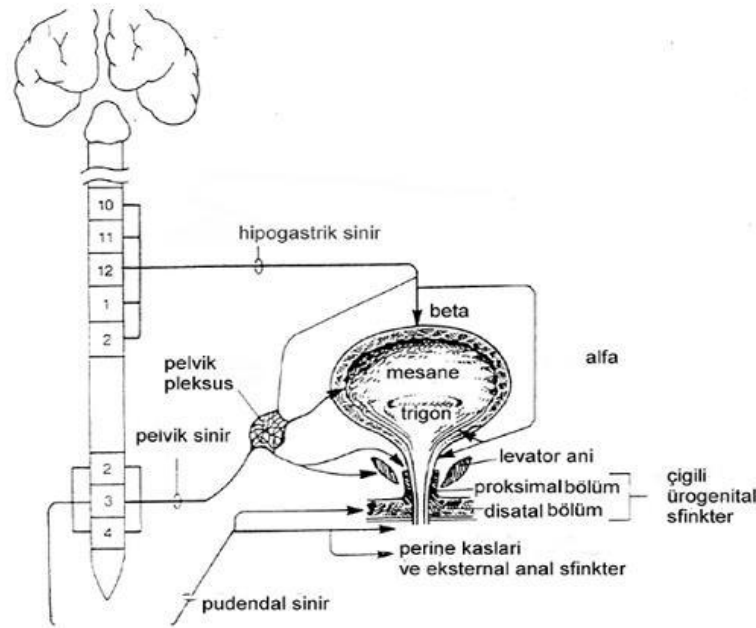
Mesanenin lenf damarları kas tabakası arasında ve dışında olmak üzere iki ağda toplanır. İdrar torbasının üst kısmından çıkan lenf damarları dış iliak lenf bezlerine alt kısımdan çıkanlar ise iç iliak lenf bezlerine açılırlar. Mesane boynundan çıkan lenf yapıları da sakral veya ana iliak lenf bezlerine drene olurlar (Tanagho, 1995; Hmman, 1993).



Şekil 3.8 Mesanenin uzunlamasına kesitle açılmış koronal görünümü ve trigon bölgesi (Putz ve Pabst, 1994)

3.5.8. Mesane Nöroanatomisi

İdrar torbası ve üretranın götürücü parasempatik lifleri S2-S4 omurilik somitlerinde, sempatik lifleri ise T10-L2 omurilik somitlerden çıkmaktadır (Eşrefoğlu, 2004). Bu somitlerden çıkan üç çevresel nöron demeti idrar torbası ve üretrayı uyarmaktadır (Şekil 2). Bu nöron demetleri T10-L2 seviyesinden çıkan sempatik lifleri taşıyan hipogastrik nöron, S2-S4 düzeyinden çıkan parasempatik lifleri taşıyan pelvik nöron ve somatik lifleri taşıyan pudental sinirdir (Walsh vd., 2012). Hipogastrik sempatik nöron detrüörü uyarır ve üretrayı gevşetir. Pelvik parasempatik nöron detrüörü inhibe eder ve idrar torbası ile üretrayı uyarır. Pudental nöron ise dış sfinkterin ve pelvik taban kaslarının istemli kasılmasını sağlar. İdrar torbasının afferent nöronu ise viseraldir ve aşırı distansiyon sonucu gelişen ağrı duyusunu taşır (Tanagho vd., 2009).



Şekil 3.9 Alt üriner sistemin innervasyonu (Tanagho ve McAninch, 2009)

3.5.9. Mesane Histolojisi

İdrar torbası ve üreterler benzer yapıya sahiptir. İçten dışa sırası ile döşeyici epitel, lamina propria, düz kas ve adventisya vardır. İdrar torbası gevşekken epiteli 5-6 sıra hücreden oluşmakta olup, bunlar içinden yüzeydeki hücreler yuvarlak ve lümeneye doğru çıkıntı yapar. İdrar torbası idrar ile dolduğunda (epitel gerildiğinde) epitelin kalınlığı 3-4 hücre sırasından oluşur ve yüzeydeki hücreler uzun ekseninde bazal zara paralel olarak yassılaşırlar (Stephen ve Sternberg, 1997, Junqueira vd., 1998). Değişici epitel bazal

tabakadan yüzeye doğru belirgin ilerleyici bir olgunlaşma gösterir (Peterson, 1992). Şemsiye hücrelerinin yüzeyi üroplakinler denen ve bir protein ailesinin oluşturduğu üç tabakalı rijit bir membrandan oluşur. Bu membran “asimetrik ünit membran” olarak bilinir (Jonathan vd., 1998). Hücrelerin bazılarında longitudinal nükleer oluklar vardır. Bu hücreler şemsiye hücrelerini oluşturmak üzere matürleşirler (Jonathan vd., 1998). Bütün diğer çok katlı epitellerde olduğu gibi değişici epitelin yüzeyel hücreleri mekanik ve kimyasal faktörlerin etkisiyle olumsuz olarak etkilenen idrar yolları lümeni içine düşer ve idrar incelemesinde görülürler. Bu yüzeyel hücre kaybı bazal doğurucu tabaka hücrelerinin çoğalmasıyla karşılanır (Erkoçak, 1984). Bazal tabaka, sadece boş mesanede seçilir, kübik hücrelerden oluşmaktadır.

Lamina propria içinde yaygın lenfoid doku ve bazen küçük lenf follikülleri bulunabilir ve papillalar oluşturmaz. Mesanede yer yer kısa epitel çöküntüleri görünebilirse de, gerçek bez denilebilecek epitel kriptaları ancak trigonun lamina propriasında ve üretrada bulunur (Junqueira vd., 1998).

3.5.10. Muskularis Propriya

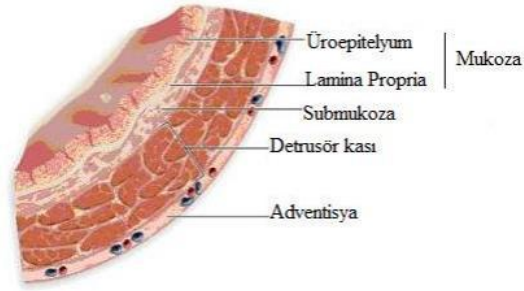
En iç ve en dışta boyuna kaslar ile ortada dairesel kasın olduğu üç kas tabakasından oluşur. Boş mesanede kas lifleri nispeten kalın demetlerde dizelenmişlerdir ve her biri diğerinden kan damarı, lenfatik ve sinir içeren orta derecede ve yoğun bağ dokusu ile ayrılmıştır (Peterson, 1992).

Sık olmasa da sinir ve damar yapıları ile birlikte paraganglion adaları, muskularis propriyada görülebilmektedir. Bu hücreler göze çarpan kordon ya da ada tarzında düzenlenmişlerdir. Berrak ya da granüler sitoplazmalı, yuvarlak veziküler nükleusludurlar. Diğer tabakalara benzer olarak muskularis propriyanın kalınlığı kişiden kişiye, yaşa bağlı olarak ve gerilme derecesi ile değişmektedir (Stephen ve Sternberg, 1997). Mesane duvar kalınlığı boş olduğunda 2.76 mm dolu olduğunda 1.55 mm'dir (Stephen ve Sternberg, 1997).

Evrelemede muskularis propriya, yüzeyel ve derin tabaka olmak üzere iki tabakada incelenir. Bu tabakaların ayrımlanmasında kullanılan belirli bir anatomik işaret yoktur ve kas tabakasının kalınlığının ölçümü ile gösterilebilir (Stephen ve Sternberg, 1997).

3.5.11. Adventisya

Birçok büyük damar ve sinir dallarının yayıldığı bağ dokusu olup kesin bir sınırı olmayıp çevre bağ dokusu ile devam ederek idrar torbasını çevresine bağlar. İdrar torbasının üst yüzeyi karın zarı ile temastadır ve bu yüzden bir serozaya sahiptir (Erkoçak, 1984).



Şekil 3.10. Mesanenin katları (www.academic.kellogg.edu)

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Kimyasallar

%99 saf borik asit (BA), bir bor bileşiği ve Siklofosfamid (CP) ticari bir şirketten (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Almanya) satın alındı. BA ve CP periton içine (i.p.) uygulandı ve damıtılmış su içinde süspansiyon edildi. CP ve BA dozlarının seçimi, İnce ve ark. (İnce vd., 2012), Cengiz (Sogut vd., 2018) ve Goudarzia ve diğ. (Goudarzia vd., 2017) göre yapıldı.

4.2. Uygulama

Tüm hayvan çalışmaları, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu'ndan (No: 2018 / 648-1) alınan onay uyarınca gerçekleştirildi. Bütün deney hayvanları T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'ndan temin edildi. Sıçanlar, içme suyu ve standart pellet yem ile standart bir ortamda beslendi. Sıçanlar standart nem (%45-50), sıcaklık ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) ve ışık (12 saat ışık/12 saat karanlık) koşullarında tutuldu. Bu çalışmada, sıçanlara 200 mg/kg borik asit (BA) intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı.

BA'nın bu dozu hayvanlar için toksik değildir, çünkü BA kısa süreli olarak laboratuvar hayvanlarına oral, deri altı veya intravenöz olarak uygulandığı zaman, (örn. fare ve sıçanlarda) BA için LD50 seviyeleri yaklaşık olarak 1700–3450 mg/kg'dır (İnce vd., 2012; Pfeiffer vd., 1945; Weir ve Fisher, 1972). Sıçanlar, her biri altı sıçandan oluşan dört gruba ayrıldı ve kimyasallar i.p olarak aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

Grup I (kontrol): Sıçanlara 6 gün boyunca her gün 0.5 mL serum fizyolojik (SF) verildi.

Grup II (CP): Sıçanlara 6 gün boyunca her gün 0.5 mL SF, 4. gün tek doz 200 mg/kg CP verildi.

Grup III (BA): Sıçanlara 6 gün boyunca her gün 200 mg/kg BA verildi.

Grup IV (BA+CP): 6 gün boyunca her gün 200 mg/kg BA alan sıçanlara 4. günde tek doz 200 mg/kg CP verildi.

Son BA veya SF uygulamasından yirmi dört saat sonra, sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Etik kurallara uygun olarak, deneyin sonunda, sıçanların mesaneleri histolojik ve immünohistokimyasal analizler için alındı (Cengiz vd., 2016).

4.3. Histolojik analizler

Çıkarılan mesaneler %10'luk nötral tamponlu formaldehit içerisinde 24 saat süreyle tespit edildikten sonra çeşme suyu altında yıkamayı takiben artan konsantrasyondaki etil alkol serisinden (sırasıyla %70, %80, %90 ve %96) geçirilerek dehidrate edildiler. Ksilolde ışık geçirgen hale getirildikten sonra sıvı parafinlerden geçirilerek bloklandılar. Mikrotomla 4-5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak histopatolojik inceleme için hematoxilen-eozin ve bax, kaspaz 3, bcl-2 ekspresyonları için immünohistokimyasal olarak boyanarak binoküler mikroskop altında değerlendirildiler. Grupları temsil eden dijital görüntüler elde edildi.

4.4. İmmünohistokimyasal Analizler

Kesitler parafinize edildi ve yeniden hidratlandı. Sitrata tamponu ile antijen geri kazanımı (pH 6.0), kesitlerin bir mikrodalga fırında 10 dakika boyunca 700W'da ısıtmak suretiyle gerçekleştirildi. 3 mL / L H₂O₂ ile bloke edildikten sonra kesitler inkübe edildi. Birincil antikolar, sırasıyla ultra-vision quanta tespit sisteminin (Thermo Scientific) seyreltilmesinde kaspaz-3'e (Thermo, Waltham, MA, ABD) karşı yöneldi (Ayhancı vd., 2016).

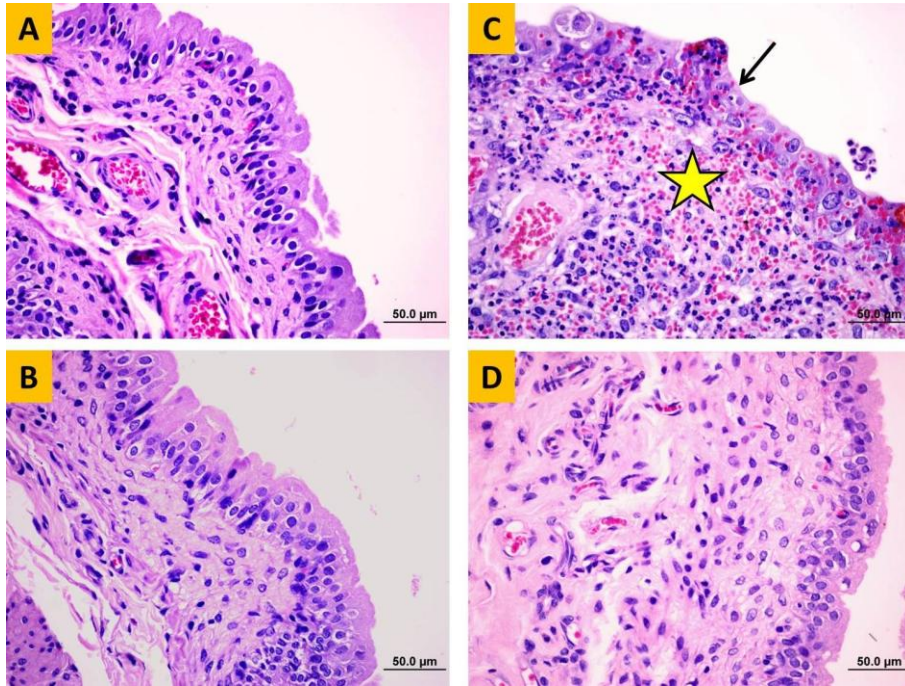
4.5. İstatistiksel Analizler

Hayvan deneylerinden elde edilen veriler, ortalamanın standart hatası (\pm SEM) olarak ifade edildi. Bağımsız dağılımlar ve normal dağılım gösteren sürekli veriler One Way Anova kullanılarak analiz edildi. Ek olarak, değişkenleri anormal dağılımla puanlamak için Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi testi uygulandı. Deney grubunda gözlenen farklar, p değeri <0.001 ve <0.05 ise anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

Farklı etki mekanizmalarına sahip sitotoksik ajanlar ve doğal bileşikler kullanılarak uygulanan kombine kanser kemoterapisi, geleneksel kemoterapi ile ilişkili yan etkileri iyileştirebilir (Üstün vd., 2014). Bu çalışmada kemoterapi reçetelerinde sıklıkla kullanılan antimitotik etkili CP'nin neden olduğu akut hemorajik sistitte, mesane dokusunda antiapoptotik etkisini ilk defa ortaya koyduğumuz BA'nın koruyucu etkisi değerlendirilmiştir.

5.1. Histolojik Bulgular



Şekil 5.1. Rat deney gruplarına ait mesane kesitleri. **a)** Kontrol, **b)** Borik asit ve **d)** Siklofosfamid+borik asit gruplarında tipik histolojik görünüm izlenmektedir. **c)** Siklofosfamid grubunda transisyonel epitelin (*ok*) incelendiği ve belirgin bir iltihabi reaksiyon ve kanamanın (*yıldızla gösterilen alan*) olduğu dikkati çekmektedir. Hematoksilen-eozin, barlar 50 µm.

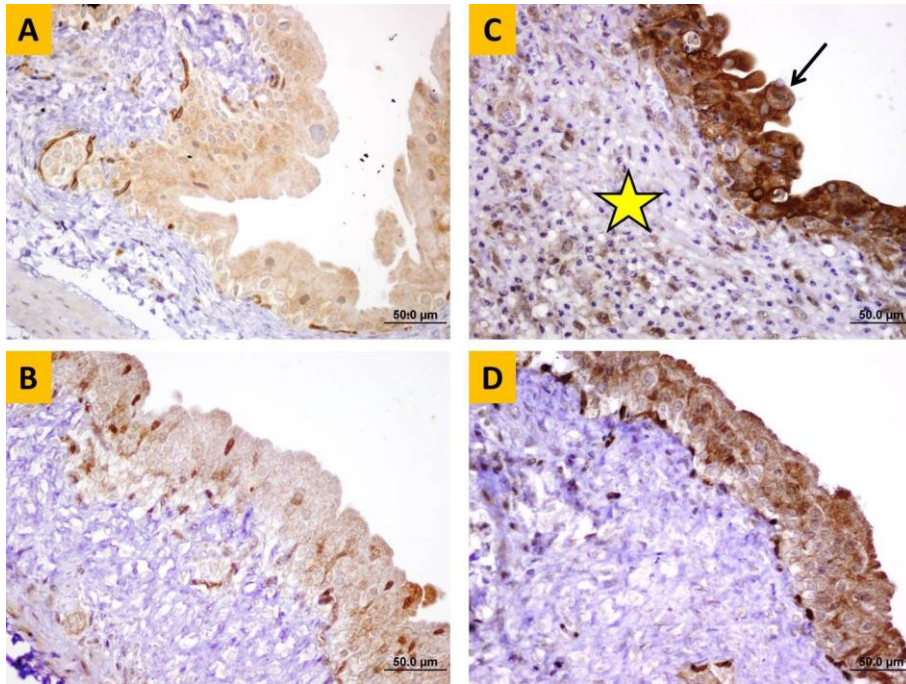
Çizelge 5.1. Kruskal-Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi, Medyanı (%25-%75).

| | Gruplar | N | Mean±Std Dev | Median (25%75%) | P | Çoklu Karşılaştırmalar |
|--|-----------------|---|--------------|------------------|--------|------------------------|
| Ödem | 1- Kontrol | 6 | 0,00±0,00 | 0,00 (0,00-0,00) | <0,001 | 1-2, 2-3, 2-4 |
| | 2- 200 mg/kg CP | 6 | 2,67±0,52 | 3,00 (2,00-3,00) | | |
| | 3- 200 mg/kg BA | 6 | 0,00±0,00 | 0,00 (0,00-0,00) | | |
| | 4- CP + BA | 6 | 0,33±0,52 | 0,00 (0,00-1,00) | | |
| İnflamasyon | 1- Kontrol | 6 | 0,00±0,00 | 0,00 (0,00-0,00) | <0,001 | 1-2, 2-3, 2-4 |
| | 2- 200 mg/kg CP | 6 | 2,33±0,52 | 2,00 (2,00-3,00) | | |
| | 3- 200 mg/kg BA | 6 | 0,00±0,00 | 0,00 (0,00-0,00) | | |
| | 4- CP + BA | 6 | 0,33±0,52 | 0,00 (0,00-1,00) | | |
| Kanama | 1- Kontrol | 6 | 0,00±0,00 | 0,00 (0,00-0,00) | <0,001 | 1-2, 2-3, 2-4 |
| | 2- 200 mg/kg CP | 6 | 2,67±0,52 | 3,00 (2,00-3,00) | | |
| | 3- 200 mg/kg BA | 6 | 0,00±0,00 | 0,00 (0,00-0,00) | | |
| | 4- CP + BA | 6 | 0,17±0,41 | 0,00 (0,00-0,00) | | |
| Transisyonel epitel incelmeleri | 1- Kontrol | 6 | 0,00±0,00 | 0,00 (0,00-0,00) | <0,001 | 1-2, 2-3, 2-4 |
| | 2- 200 mg/kg CP | 6 | 2,67±0,52 | 3,00 (2,00-3,00) | | |
| | 3- 200 mg/kg BA | 6 | 0,00±0,00 | 0,00 (0,00-0,00) | | |
| | 4- CP + BA | 6 | 0,33±0,52 | 0,00 (0,00-1,00) | | |
| İnflamatuar hücre infiltrasyonu | 1- Kontrol | 6 | 0,00±0,00 | 0,00 (0,00-0,00) | <0,001 | 1-2, 2-3, 2-4 |
| | 2- 200 mg/kg CP | 6 | 2,67±0,52 | 3,00 (2,00-3,00) | | |
| | 3- 200 mg/kg BA | 6 | 0,00±0,00 | 0,00 (0,00-0,00) | | |
| | 4- CP + BA | 6 | 0,33±0,52 | 0,00 (0,00-1,00) | | |

Kemirgende tek doz CP uygulaması 24 saat içinde mesanede akut hemorajik sistitin tetiklenmesi için yaygın olarak kullanılır. CP'nin aktif metaboliti olan ACR'nin üroepitelde inflamasyon, ödem, ülserasyon, hemoraji, desquamasyon, nekroz ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Francis vd., 2014). Bizim çalışmamızda da hematoksilen-eozin boyama sonuçlarımıza göre, kontrol ve tek başına borik asit verilen gruplara ait mesane kesitlerinde, lümeni döşeyen tipik transisyonel epitel görünümü mevcuttu. Bağ dokusu ve düz kas tabakaları normal histolojik görünüm sergiledi (Çizelge 5.1). Tek başına CP verilen grupta transisyonel epitelin incelendiği veya yer yer ülserleştiği, mesane doku katmanlarının hepsine yayılan kanamanın olduğu ve mesane duvarında ve bazen de lümeninde yaygın iltihabi materyal bulunduğu gözlemlendi. CP+BA uygulanan grupta ise transisyonel epitelin genelde korunduğu, kanama ve iltihabi reaksiyonun ise önemli ölçüde gerilemekle birlikte bazı hayvanlarda varlığını az da olsa sürdürdüğü gözlemlendi (Şekil 5.1).

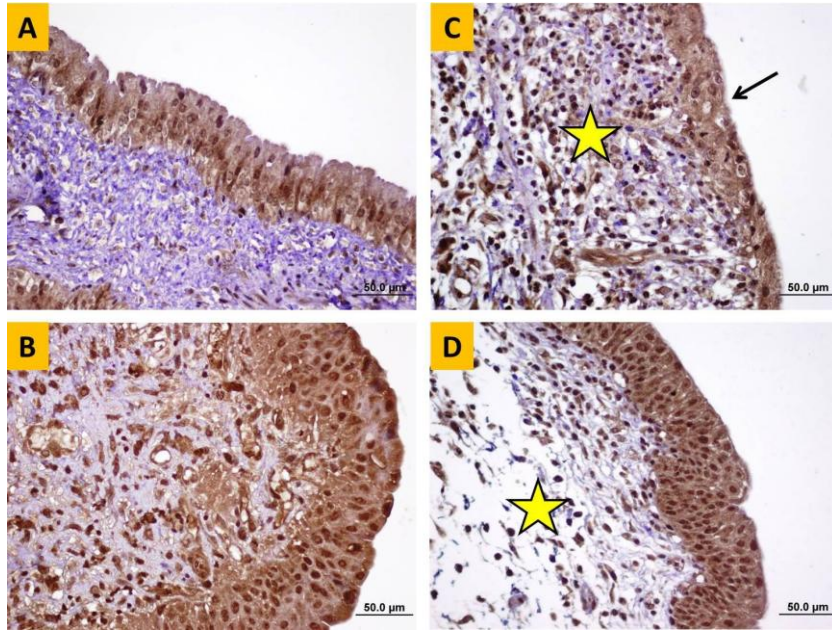
5.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Apoptotik süreç, kusurlu hücreleri ortadan kaldırmak için bir savunma mekanizmasıdır. Bu programlı ölüm için gerekli olan sinyal mekanizmalarındaki bir bozukluk, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına ve kansere yol açabilmektedir. Kanserle savaş stratejilerinden biri de hücrede bozulan apoptozu yeniden devreye sokmaktır. Apoptoz, hücre membranındaki reseptörlerle veya hücre içi sinyallerle başlatılan ligandlar (hem mitokondriye bağlı hem de bağımsız yollar tarafından indüklenerek) tarafından iki yolla gerçekleştirilir (Refaat vd., 2014). Bcl-2 ve Bax proteinleri apoptozun önemli düzenleyicileridir. Bcl-2 apoptozu baskılayarak hücre sağkalımını uzatabilir Bax ise apoptozu artırabilmektedir. Bcl-2 mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerinin açılmasını engelleyerek kaspaz aktivatörlerinin mitokondriden salınmasını önlemektedir (Kluck vd., 1997). Bax'ın aşırı ekspresyonunun apoptozu hızlandırdığı, Bcl-2'nin ise Bax'ın ölüm işlevini baskıladığı belirlenmiştir (Zhao vd., 2004).



Şekil 5.2. Sıçan deney gruplarına ait mesane kesitlerinin Bax ekspresyonu. **a)** Kontrol ve **b)** Borik asit gruplarında transisyonel epitelde negatif boyanma izlenmektedir. **c)** CP grubunda transisyonel epitelin (*ok*) düzensizleştiği ve belirgin bir iltihabi reaksiyonun (*yıldızla gösterilen alan*) olmasının yanında epitelde kuvvetli pozitif reaksiyon dikkati çekmektedir. **d)** CP+BA grubunda transisyonel epitelin bütünlüğünü koruduğu, iltihabi reaksiyonun belirgin şekilde azaldığı ve epiteldeki bazı hücreler pozitif boyansa da çoğunun negatif boyandığı dikkati çekmektedir (Bar 50 µm).

Çalışmamızda Bax sonuçlarımızda kontrol ve tek başına BA verilen gruplara ait mesane kesitlerinde transisyonel epitelde negatif boyanma mevcuttu. Tek başına siklofosfamid verilen grupta ise transisyonel epitelde kuvvetli pozitif boyanma yaygın Bax ekspresyonuna işaret etmektedir. CP+BA uygulanan grupta ise transisyonel epitelin pozitif ve negatif boyanan hücreleri içerdiği, ancak kontrole daha yakın bir görünüm sergilediği gözlenmiştir (Şekil 5.2).

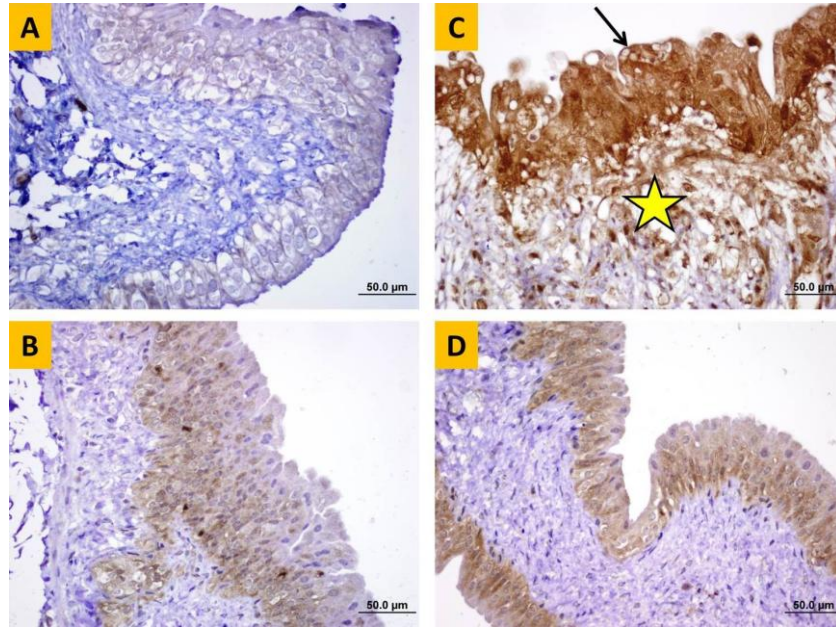


Şekil 5.3. Rat deney gruplarına ait mesane kesitlerinin Bcl-2 ekspresyonu. **a)** Kontrol ve **b)** BA gruplarında transisyonel epitelde pozitif boyanma izlenmektedir. **c)** Siklofosfamid grubunda transisyonel epitelin (*ok*) düzensizleştiği ve belirgin bir iltihabi reaksiyonun (*yıldızla gösterilen alan*) olmasının yanında epitelde negatif reaksiyonun varlığı dikkati çekmektedir. **d)** CP+BA grubunda ise transisyonel epitelin bütünlüğünü koruduğu, iltihabi reaksiyonun varlığını sürdürdüğü ve epiteldeki hücrelerin pozitif boyandığı görülmektedir (Bar 50 µm).

Mesane dokusu Bcl-2 sonuçlarımıza göre kontrol ve tek başına BA verilen gruplara ait mesane kesitlerinde transisyonel epitelde pozitif boyanma (yaygın bcl-2 ekspresyonu) mevcuttu. Tek başına CP verilen grupta ise transisyonel epitelde belirgin incelme ve negatif boyanma bulunduğu gözlemlendi. CP+BA uygulanan grupta ise transisyonel epitelin pozitif ve negatif boyanan hücreleri içerdiği, ancak kontrole daha yakın bir görünüm sergilediği gözlemlendi (Şekil 5.3).

İmmünohistokimyasal bulgularımız, CP'nin mesane dokusunda modülasyonla apoptozu indüklediğini gösterdi. Bcl-2/Bax protein ekspresyonunda, Bcl-2 ekspresyonunun

azalması ve Bax ve kaspaz-3 ekspresyonlarının artması apoptozu indüklemektedir. Bu modülasyon etkisi CP+BA kombinasyonunda daha da belirgin olarak ortaya çıkmıştır. Zira kombine grupta Bcl-2 ekspresyonu artarken Bax ve kaspaz ekspresyonu azalmıştır. Bu durum BA'nın antiapoptotik etkiler gösterdiği anlamına gelmektedir. Deneysel bulgularımız BA gibi doğal bileşiklerin yeni antikanser ajanlar olarak geliştirilmesi için bir temel teşkil etme potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir.



Şekil 5.4. Rat deney gruplarına ait mesane kesitlerinin kaspaz 3 ekspresyonu. **a)** Kontrol, **b)** BA ve **d)** CP+BA gruplarında transisyonel epitelde negatif boyanma izlenmekte, kanama ve iltihaplanmanın bulunmadığı görülmektedir. **c)** CP grubunda ise transisyonel epitelin (*ok*) düzensizleştiği ve belirgin bir iltihabi reaksiyonun (*yıldızla gösterilen alan*) olmasının yanında epitelde kuvvetli pozitif reaksiyonun varlığı dikkati çekmektedir (Bar 50 µm).

Kaspaz 3 sonuçlarımıza göre kontrol ve tek başına BA verilen gruplara ait mesane kesitlerinde transisyonel epitelde negatif boyanma mevcuttu. Tek başına CP verilen grupta ise transisyonel epitelde kuvvetli pozitif boyanma (yaygın kaspaz 3 ekspresyonu) gözlemlendi. CP+BA uygulanan grupta ise transisyonel epitelin negatif boyandığı ve kontrole çok yakın bir görünüm sergiledi (Şekil 5.4).

Bütün bu mikroskopik değerlendirme sonuçlarına göre; CP'nin mesane epitelinde incelme ve ülserasyona neden olduğu, ayrıca kanama ve iltihabi reaksiyonu tetiklediği, Bax ve kaspaz 3 ekspresyonunu arttırarak apoptozu yol açmaktadır. BA'nın ise tek başına verildiğinde mesanede herhangi bir dejenerasyona ve apoptozu yol açmadığı, CP ile

birlikte verildiğinde CP'nin yukarıda belirtilen olumsuz etkilerini azalttığı, hatta bazı hayvanlarda tamamen engellediği/düzeltiltiği belirlendi.

CP' nin yüksek dozlarda kullanımı apoptoza ek olarak mesanede akut inflamasyona, böbrek hasarına ve karaciğer hasarına neden olduğu belirtilmiştir (Mahmoud vd., 2013; Cuce vd., 2015; Said vd., 2015). Hemorajik sistit (HC), CP tedavisinin ciddi bir komplikasyonudur ve deney hayvanlarında ve ilacı alan hastalarda indüklendiği gösterilmiştir (West, 1997). Özellikle yüksek doz CP'ye bağlı olarak HC ortaya çıkmaktadır. HC'de ürotelyal hasar, transmural ödem, kanama, mukozal ülser ve epitel nekrozu gibi patolojiler, CP'nin tek bir dozu ile 24 saat içinde gelişebilmektedir. CP'nin HC yapıcı etkisi renal akrolein salınımına bağlanmıştır (Cox, 1979).

Birçok çalışma, CP maruziyetinin hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini arttırdığını ve biyokimyasal ve fizyolojik bozuklukların oksidatif stres kaynaklı olabileceğini göstermektedir (Premila vd., 2008; Tripathi ve Jena, 2009). Ayhanci ve ark., (2010) yüksek doz CP uygulamasının mesane dokusunda ülser, epitel infiltrasyonu, fokal erozyon, kanama ve lümen yaygın inflamasyona neden olduğunu rapor edilmiştir (Ayhanci vd, 2010). Benzer şekilde Bhatia ve ark., (2008) çalışmasında 200 mg kg CP verilen hayvanların mesanelerinde, şiddetli derecede lamina propria kanaması, ödem, vazodilatasyon, lümen sızıntıları ve ekstrasvazasyonlu kırmızı kan hücrelerinin gözlendiği vurgulanmıştır (Bhatia vd, 2008). Diğer taraftan Anna ve ark., (2014) çalışmalarında CP muamele edilen farelerin mesanelerinde, AKP / mTOR ve ERK1/2 yollarının aktivasyonu ile kaspaza bağımlı PARP degradasyonunda (apoptozun bir göstergesi) artışa eşlik ettiğini vurgulamışlardır (Golubeva vd, 2014).

CP nedenli MDA ve GSH seviyelerindeki değişiklikleri gösteren birçok deneysel çalışmalar mevcut olduğundan, çalışmamızda, CP nedenli HC'nin belirlenmesinde histopatolojik ve immunohistokimyasal (Bax, Bcl-2 ve kaspas-3) değişikliklerin belirlenmesine odaklanılmıştır. CP grubunda mesane dokusunda apoptoz varlığını yansıtan Bax ve kaspas-3 pozitif hücre sayısında artış görülürken, Bcl-2 pozitif hücre sayısında ise azalış görülmüştür.

Çeşitli hastalıklarda ve birçok deneysel çalışmalarda oluşturulan hastalık ve toksikasyon modellerinde Bor (B)'nin antioksidan sistemi destekleyerek oksidatif stresi azalttığı, karaciğer, kan, kalp, böbrek gibi dokuları CP'nin toksik etkilerinden koruduğu ve böylelikle tedavilere katkı sağlayabildiği rapor edilmiştir (Turkez vd., 2007; Ince vd., 2010; Cengiz, 2018;). İnce ve ark. (2014) 75 mg/kg CP verilen deney grubunda meydana gelen lipit peroksidasyonu ve genotoksisiteyi B'nin azalttığını rapor etmişlerdir. Coban ve ark., (2015) yaptıkları deneysel çalışmada B'nin, streptozotosin nedenli oksidatif stres, DNA hasarını ve pankreas doku hasarını önemli oranda düzelttiğini belirtmişlerdir (Coban vd., 2015). Pawa ve Ali, 2006'daki çalışmalarında tiyoasetamid nedenli oksidatif stres ve karaciğer hasarını B'nin iyileştirdiğini vurgulamışlardır (Pawa ve Ali, 2006).

CP kaynaklı sistitin önlenmesi için çinko, seleno-L-methionine, 2-merkaptioetan sülfonat (MESNA) gibi farklı birçok maddeler kullanılmıştır. Ancak bu bileşiklerin CP kaynaklı sistitin şiddetini kısmen azalttığı rapor edilmiştir (Özcan vd., 2005; Ayhanci, vd., 2010).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu deneysel çalışmanın verileri, CP nedenli gelişen HC'de mesane dokusunda proapoptotik Bax ve kaspaz-3 pozitif hücre sayısının artışı antiapoptotik Bcl-2 aktivitesinin azalması, mesane hasarına ve apoptoza işaret etmektedir. Bununla birlikte, CP+BA ile muamele edilen deney grupları, sadece CP verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında Bax ve kaspaz-3 pozitif hücre sayısının azaldığı Bcl-2 aktivitesinin ise arttığı gözlenmiştir. Bu durum BA'nın antioksidan ve sitoprotektif etkileri olduğunu gösterir. Bu çalışmanın histolojik verilerinde, mesane dokusunda CP nedenli gelişen ödem, inflamasyon, kanama, ülserasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu CP+BA combine grubunda oldukça iyileşmesi immunohistokimyasal bulgularımızı desteklemektedir. Bulgular, BA'nın CP kaynaklı mesane toksisitesine karşı potansiyel bir alternatif ilaç kaynağı olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada ürotelyumda steril HC'nin gelişmesinde apoptozisin bir hasar belirteci olarak CP tarafından indüklendiğini belirledik. BA'nın bu hasara karşı koruyucu ve önleyici etkisini ilk kez çalışmamızda hematoksilen-eozin, Bax, kaspaz-3 ve Bcl-2 analizleriyle gösterdik. Literatürde CP ile oluşturulan mesane hasarına BA etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Sonuç olarak CP kemoterapisi alan kanser hastalarında mesane hasarının azaltılması veya giderilebilmesi için BA ön tedavisinin umut verici bir koruyucu ve önleyici tedavi olabileceğini gösterdik. Ancak BA'nın sitoprotektif etkilerinin belirlenmesi için birçok deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. CP'nin yan etkilerini ortadan kaldırmak, ilaca daha iyi tolerans gösterilmesine ve CP tedavisine ihtiyaç duyan hastalar için daha etkili ve konforlu bir tedaviye yol açabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abraham P and Isaac B (2011) Ultrastructural Changes in the Rat Kidney After Single Dose of Cyclophosphamide-Possible Roles for Peroxisome Proliferation and Lysosomal Dysfunction in Cyclophosphamide-Induced Renal Damage. *Hum Exp. Toxicol*, 30:1924 p.
- Acerbo AS, Miller LM (2009) Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging. *Analyst*. 134(8):1669-74 p.
- Akins PT, Liu PK, Hsu CY (1996) Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: Friend or Foe?. *Stroke*. 27: 1682- 1687 p.
- Alkan FU, Anlas C, Cinar S, Yildirim F, O Ustuner, BakirelIT, Gurel A (2014) Effects of curcumin in combination with cyclophosphamide on canine mammary tumour cell lines. *Veterinari Medicina*. 59 (11): 553–572 p.
- Alkan M (1985) Baz bor minerallerinin kükürt dioksitli sulardaki çözünürlükleri. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Erzurum.
- Ameisen JS (1996) The origin of programmed cell death. *Science*. 272:1278 p.
- Anan HH, Zidan RA, EL-Baset ABD, Alı SA (2018) Ameliorative effect of zinc oxide nanoparticles on cyclophosphamide induced testicular injury in adult rat. *Tissue Cell*. 54:80-93 p.
- Ayhanci A, Uyar R, Aral E, Kabadere S, Apak S (2008) Protective Effect of Zinc on Cyclophosphamide-Induced Hematotoxicity and Urotoxicity. *Biol. Trace Elem. Research*. Doi:10.1007/s 12011-008-8189-5.
- Ayhanci A, Yaman S, Sahinturk V, Uyar R, Bayramoglu G, Senturk H, Altuner Y, Appak S, Gunes S (2010) Protective effect of seleno-L-methionine on cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity in rats. *Biol. Trace Elem. Res*. 134:98-108 p.
- Ayhanci A, Cengiz M, Kutlu HM, Vejselova D (2016) Protective effects of ellagic acid in D-galactosamine-induced kidney damage in rats, *Cytotechnology*. 68:1763-1770 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ayodele OT (2016) Boron complexes as anticancer agents and recent advances. 2(2):3 p.
- Ayrancı DFE (2005) Akut borik asit uygulanan sıçanlarda testis, karaciğer, böbrek ve beyin dokuları üzerinde gözlenen histopatolojik değişimler. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Eskişehir.
- Balakumran A, Champbell G A, Maslen M T (1996) Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 139:122-127 p.
- Banasiak K J and Haddad GG (1998) Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res.* 797:295-304 p.
- Bao F and Liu D (2003) Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3. *Neuroscience.* 116:59-70 p.
- Barranco WT, Eckhert CD (2004) Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Letters.* 216(1):21-9 p.
- Barranco W, Eckhert C (2006) Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *British journal of cancer.* 94(6):884-90 p.
- Bellamy C O, Malcomson R D, Harrison D J, Wyllie A H (1995) Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* 6:3-16 p.
- Berk M, Dean O, Dodd S, Bush A (2008) Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in Pharmacological Science.* 29:346-351 p.
- Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271:1424-1437 p.
- Bhatia K, Firoz A, Hina R, Sheikh R (2008) Protective effect of S-allylcysteine against cyclophosphamide-induced bladder hemorrhagic cystitis in mice. *Food and Chemical Toxicology.* 46:3368–3374.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bhatia K, Firoz A, Hina R, Sheikh R (2008) Protective effect of S-allylcysteine against cyclophosphamide-induced bladder hemorrhagic cystitis in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 46:3368–3374.
- Block KI, Koch AC, Mead MN, Tothy PK, Newman RA, Gyllenhaal C (2007) Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Cancer Treatment Reviews*. 33(5):407-418 p.
- Blumenthal RD, Lew W, Reising A, Soyne D, Osorio L, Ying Z, Goldenberg DM (2000) Antioxidant vitamins reduce normal tissue toxicity induced by radioimmunotherapy. *International Journal of Cancer*. 86(2):276-280 p.
- Bradke TM, Hall C, Carper SW, Plopper GE (2008) Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell adhesion & migration*. 2(3):153-60 p.
- Brinley FJJ, Tiffert T, Scarpa A (1978) Mitochondria and other calcium buffers of squid axon studied in situ. *J. Gen. Physiol*. 72:101-127 p.
- Boncukçuoğlu R, Kocakerim M, Yılmaz E, Yılmaz T (2004) Bor elementinin çevresel açıdan değerlendirilmesi. *Türkiye’de çevre kirlenmesi öncelikleri sempozyum bildiri kitabı*, 83-89 p.
- Borek C (2004) Dietary Antioxidants and Human Cancer. *Integrative Cancer Therapies*. 3(4):333-341 p.
- Birder L, Andersson KE (2013) Urothelial Signaling. *Physiol. Rev*. 93:653-680 p.
- Bortner CD, Odernburg NBE, Crdlowski JA (1995) The role of fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 5:21-28 p.
- Brode S, Raine T, Zacccone P, Cooke A (2006) Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim*. 177:6603-6612 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Brock N, Pohl J (1983) The development of mesna for regional detoxification. *Cancer Treat. Rev.* 10:33–43.

Brinley FJJ, Tiffert T, Scarpa A (1978) Mitochondria and other calcium buffers of squid axon studied in situ. *J Gen Physiol.* 72:101-127.

Burtis CA (1999) *Textbook of Clinical Chemistry.* WB. Saunders Company, Pennsylvania, Philadelphia. 1245-1301 p.

Byers T, Perry G (1992) Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu Rev Nutr.* 12: 139-159 p.

Calabresi P, Welch AD (1962) Chemotherapy of neoplastic diseases. *Annu. Rev. Med.* 13:147-202 p.

Caotes PJ, Hales SA, Hall PA (1996) The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. *J. Pathol.* 178:71-7 p.

Cengiz M, Ayhanci A, Kutlu HM, Musmul A (2016) Potential therapeutic effects of silymarin and silymarin-loaded solid lipid nanoparticles on experimental kidney damage in BALB/c mice: biochemical and histopathological evaluation. *Turk. J. Biol.* 40:807-814 p.

Cengiz M (2018) Boric acid protects against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats, *Cell Mol. Biol.* 64(12):11-14 p.

Cohen JJ (1993) Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp. Pract.* 15:35-43 p.

Cohen JJ (1993) Apoptosis. *Immunol Today.* 14:126-130 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Choi WS, Lee EH, Chung CW (2001) Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl2. *J Neurochem.* 77:1531-1541 p.
- Christenson RH, Duh SH, Sanhai WR, Wu AH, Holtman V, Painter P (2001) Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clin. Chem.* 47(3):464-70.
- Coban FK, Liman R, Cigerci IH, Ince S, Hazman O, Bozkurt MF (2015) The antioxidant effect of boron on oxidative stress and DNA damage in diabetic rats. *PSP.* 24(11b).
- Collins JA, Cynthia CA, Young KK, Vesely JM (1997) Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 45:923-934 p.
- Cox PJ (1979) Cyclophosphamide cystitis- identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol.* 28:2045-2049.
- Cross J (2003) The genetics of preeclampsia: a fetoplacental or maternal Problem. *Clinical Genetics.* 64(2):96-103.
- Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS (1997) Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med.* 3:73-76 p.
- Cummings MC, Winterford CM, Walker NI (1997) Apoptosis. *Am. J Surg. Pathol.* 21:88-101 p.
- De Vries CR, Freiha FS (1990) Hemorrhagic cystitis: a review. *J. Urol.* 143:1-9 p.
- Del Maestro RF (1980) An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol.* 492:153-168 p.
- Del Pizzo JJ, Chew BH, Jacobs SC, Sklar GN (1998) Treatment of radiation induced hemorrhagic cystitis with hyperbaric oxygen: long-term followup. *J. Urol.* 160:731-733 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dieter MP (1994) Toxicity and carcinogenicity studies of boric acid in male and female B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect.* 102(7):93-7 p.
- Di Renzo F, Cappelletti G, Broccia ML, Giavini E, Menegola E (2007) Boric acid inhibits embryonic histone deacetylases: a suggested mechanism to explain boric acid-related teratogenicity. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 220(2):178-85 p.
- Diplock A (1998) Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe Concise Monograph Series. 59:189-211 p.
- Dollery (1999) Cyclophosphamide. *Therapeutic drugs*, Edinburg Churchill Livingstone. 349-53.
- Dooley JS, James CA, Rogers HJ, Stuart-Harris R (1982) Biliary elimination of cyclophosphamide in man. *Cancer Chemother Pharmacol.* 9(1):26-9 p.
- Earnshaw WC (1995) Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 7:337-43 p.
- Eastman A (1995) Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. *Cancer Biology* 6:45-52 p.
- Etlík O, Tomur A, Deveci S, Pişkin I, Pekcan M (1997) Comparison of the uroprotective efficacy of mesna and HBO treatments in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *J. Urol.* 158:2296-2299 p.
- El-Kashef DH (2018) Role of venlafaxine in prevention of cyclophosphamide-induced lung toxicity and airway hyperactivity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 58:70-76 p.
- Erkoçak A (1984) Üriner boşaltım yolları. *Özel Histoloji.* 5.baskı. İzmir: REKFO. 157-160 p.
- Eşrefoğlu. M (2004) Genel ve özel histoloji: epitel dokusu. Malatya: Pelikan Yayıncılık.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Evan GL, Wyllie AH, Gilbert GS, Littlewood TD, Lond H, Breaks M (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. 69:119-128 p.
- Farfán-García E, Castillo-Mendieta N, Ciprés-Flores F, Padilla-Martínez I, Trujillo-Ferrara J, Soriano-Ursúa M (2016) Current data regarding the structure-toxicity relationship of boron-containing compounds. *Toxicology Letters*. 258:115-25 p.
- Francis MHJ, Nivardo PV, James GK, Jeffery DPT, Danielle WL, Brooke ES, Paul JN, Laura SS, Purves JT (2014) Inflammasomes are important mediators of cyclophosphamide-induced bladder inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 306:299-308 p.
- Gallardo-Williams MT, Maronpot RR, Wine RN, Brunssen SH, Chapin RE (2003) Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid. *The Prostate*. 54(1):44-9 p.
- Gallardo-Williams MT, Chapin RE, King PE, Moser GJ, Goldsworthy TL, Morrison JP (2004) Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicologic Pathology*. 32(1):73-8 p.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 119:493-501 p.
- Gemalmaz H (2007) Hemorajik Sistit. *Türkiye Klin. Cerrahi Tıp Bilim. Derg.* 3:41-47 p.
- Giray B, Gürboy A, Hıncal F (1996) Kanser oluşumu, risk faktörleri ve korunma. *Sendrom*. May: 96-107 p.
- Goldberg MA, Antin JH, Guinan EC, Rapoport JM (1986) Cyclophosphamide cardiotoxicity: An analysis of dosing as a risk factor. *Blood*. 68:1114-8 p.
- Golubeva AV., Zhdanov AV, Mallel G, Dinan TG, Cryan JF (2014) The mouse cyclophosphamide model of bladder pain syndrome: tissue characterization, immune profiling, and relationship to metabotropic glutamate receptors. *Physiol Rep*. 2 (3) p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gomes TN, Santos CC, Souza-Filho MV, Cunha FQ, Ribeiro RA (1995) Participation of TNF-alpha and IL-1 in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 28:1103-1108 p.
- Goudarzia M, Khodayara MJ, Tabatabaeib SMTH, Ghaznavic HFI, Mehrzadi S (2017) Pretreatment with melatonin protects against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 625-635 p.
- Graham M, Riley RJ (1991) Drug metabolism in carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther.* 51(2):275-89 p.
- Gray KJ, Engelmann UH, Johnson EH, Fishman IJ (1986) Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (Cytosan) therapy. *J. Urol.* 136:497-500 p.
- Halliwell, B. (1991). Drug antioxidant effects. A basis for drug selection. *Drugs.* 42: 569-605 p.
- Halliwell B, Gutteridge J (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. In: fifth edit. Oxford: University Press. 77-79 p.
- Hadidi AHFA, Coulter CEA, Idle JR (1988) Phenotypically Deficient Urinary Elimination of Carboxyphosphamide after Cyclophosphamide Administration to Cancer Patients. *Cancer Res.* 48(18):5167-71 p.
- Hamzeh M, Hosseinimehr SJ, Khalatbary AR, Mohammadi HR, Dashti A, Amiri FT (2018) Atorvastatin mitigates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity via suppression of oxidative stress and apoptosis in rat model. *Res. Pharm. Sci.* 13:440-449 p.
- Henderson KA, Kobylewski SE, Yamada KE, Eckhert CD (2015) Boric acid induces cytoplasmic stress granule formation, eIF2 α phosphorylation, and ATF4 in prostate DU-145 cells. *BioMetals.* 28(1):133-41 p.
- Hetts SW (1998) To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 278:300-307 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hmman JR (1993) Bladder. Ureterovesical Junction and Rectum. In Atlas of Urosurgical Anatomy. Edited by Frank Hinman JR. Philadelphia, WB. Saunders Company. Chapter 13: 309-344 p.
- Hu YM, Benedict MA, Ding LY (1999) Role of cytochrome C and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 18:3586-3595 p.
- Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fidan AF, Eryavuz A (2010) The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *Journal of Trace Element and Medicinal Biology.* 24:161-164 p.
- Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fidan AF, Eryavuz A (2010) The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 24(3):161-4 p.
- Ince S, Keles H, Erdogan M, Hazman O, Kucukkurt I (2012) Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice, *Drug Chem. Toxicol.* 35(3):285-292 p.
- Ince S, Kucukkurt I, Demirel HH, Acaroz DA, E Akbel, Cigerci IH (2014) Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats, *Chemosphere.* 108:197-204 p.
- Ishii Y, Fujizuka N, Takahashi T, Shimizu K, Tuchida A, Yano S (1993) A fatal case of acute boric acid poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology.* 31(2):345-52 p.
- İsmail P (1984) *Medikal Embriyoloji.* İkinci baskı. 228-238 p.
- İşcan M, Çoban T (1998) Normal ve neoplastik meme dokusunda antioksidan enzimler. *Klinik Gelişim.* 11:392-395 p.
- James D. Brooks (1997) *Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia: In campbell's urology* edited by Waish PC, Retik AB, Stamey TA and Vaughan ED: Philadelphia: WB. Saunders Company. Seventh Edition. 3:89-128 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- John MC, Halliwell BG (1999) Free Radicals in biology and medicine. Third Edition. Oxford University Press. 1-29 p.
- Jonathan I, Epstein M.D, Mahul B (1998) Bladder consessus: The world health organization/international society of urological pathology consensus classification 63 of urotelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. The American Journal of Sugical pathology. 22:1435-1448 p.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (1998) Üriner sistem. Temel Histoloji. 8. baskı. Barış Kitapevi, 375-377 p.
- Kalaçay D (2013) Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda borik asitin total oksidan kapasite total antioksidan kapasite düzeyleri ve paraoksonaz aktivitesine etkisi. Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, 4-6 p.
- Kawabata TT, Chapman MY, Kim DH, Stevens WD, Holsapple MP (1990) Mechanism of in vitro immunosuppression by hepatocyte generated cyclophosphamide metabolites and 4-hydroxycyclophosphamide. Biochemical Pharmacology. Vol. 40: No. 5, pp. 927-935 p.
- Kayaalp SO (2017) Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Feryal Matbaacılık, Ankara cilt:1, S:973-993, Cilt: 2, S: 1100-1107 p.
- Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea J R, Krajewski S, Reed J C, Dietrich WD (2001) Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. J Neuropathol Exp Neurol. 60:422-429 p.
- Kehre JP, Smith JV (1994) Free radicals in biology: Sources, reactivites and roles in etiology of human diseases. 25-62 p.
- Keles H, Bozkurt MF, Ulucan A, Demirel HH, Yüksel H, Karadaş E, Özkul İA (2018) The role of inducible nitric oxide synthase in urinary bladders of cattle with enzootic hematuria and its struggle with uroplakin III. Ank. Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg. 65:341-348 p.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 26:239-245 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kiess W, Gallaher B (1998) Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin* 18:482-491 p.
- Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science*. 275:1132-1136 p.
- Knight, JA (1995) Disease related to oxygen-derived free radicals. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 25:111-21 p.
- Koldysheva EV, Klinnikova MG, Nikityuk DB, Ivleva EK, Listvyagova NA, Lushnikova EL (2018) Role of Matrix Metalloproteinase-2 in the development of cyclophosphamide-induced cardiomyopathy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 164:483-487 p.
- Korsmeyer S J (1992) Bcl-2 initiates a new category of oncogenes; regulators of cell death. *Blood*. 80:879-886 p.
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby L M, Welsh K, Xie Z, Deveraux Q L, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC (1999) Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci.* 96:5752- 5757 p.
- Kromer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B (1995) The biochemistry of programmed cell death. *Fedn Am. Soc. exp. Biol. J.* 9:1277-1287 p.
- Kızılcı S (1999) Kemoterapi alan kanserli hastalar ve yakınlarının yaşam kalitesini etkileyen faktörler. *C.Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi.* 3(2).
- Ladas EJ, Jacobson JS, Kennedy DD, Teel K, Fleischauer A, Kelly KM (2004) Antioxidants and cancer therapy: a systematic review. *Journal of Clinical Oncology.* 22(3):517-528 p.
- Levine LA, Richie JP (1989) Urological complications of cyclophosphamide. *J. Urol.* 141:1063-1069 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Levison DA, Hopwood D (1976) Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol.* 119:159-166 p.
- Li M, Ona V O, Chen M, Kaul M, Tenneti L, Zhang X, Stieg P E, Lipton S A, Friedlander RM (2000) Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience.* 99:333-342 p.
- Lima MVA, Ferreira FV, Macedo FYB, Brito DC, Ribeiro RA (2007) Histological changes in bladders of patients submitted to ifosfamide chemotherapy even with mesna prophylaxis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 59:643-650 p.
- Lou J, Lenke LG, Ludwig FJ, O'Brien MF (1998) Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord.* 36: 683-690 p.
- Liu X Z, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW (1997) Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci.* 17:5395-5406 p.
- Lu J, Ashwell K, Ken W S, Waite P (2000) Advances in spinal cord injury: Role of apoptosis. *Spine.* 25:1859-1866 p.
- Matsuda H, Ando S, Kato T, Morikawa T, Yoshikawa M (2006) Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorg. Med. Chem.* 14:138-142 p.
- Manikandan R, Kumar S, Dorairajan LN (2010) Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. *Indian J. Urol. IJU J. Urol. Soc. India.* 26:159-166 p.
- Mercan U (2004) Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg.* 15(1-2):91-96 p.
- Majno G, Torisl A (1995) Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol.* 146:3-15 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mahmoud AM, Hussein OE, Ramadan SA (2013) Amelioration of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by the brown seaweed *Turbenaria ornata*. *Int J Clin Pharmacol Toxicol.* 11:9-17 p.
- Mahmoud NN, Othman A.S, Mohamed M, Sayed MM, Ahmed TV, Vanderpool D, Blossom S (2009) Oral glutamine protects against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in experimental rats through increase of cardiac glutathione. *Nutrition.* 25:812-7 p.
- Meister LA, Meadows AT (1993) Late effects of childhood cancer therapy. *Curr Probl Pediatr.* 23:102-131 p.
- Mercan U (2004) Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg.* 15(1-2):91-96 p.
- Mehmet Yıldırım (1990) Temel İnsan Anatomisi. İstanbul, Birinci Baskı, 339- 357 p.
- McAuley EM, Bradke TA, Plopper GE (2011) Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration. *Cell adhesion & migration.* 5(5):382-6 p.
- Millerk D M, Blume S, Borst M (1990) Oncogenes: Malignant transformation and modern medicine. *Am J Med Sci.* 300:59-65 p.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewsko M (1994) Tumor supressor p53 is a regulator of bcl-2 bax gene expression in vivo. *Oncogene.* 9:1799-1805 p.
- Nakatsuka H, Ohta S, Tanaka J, Toku K, Kumon Y, Maeda N, Sakanaka M, Sakaki S (1999) Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Research.* 849:216-219 p.
- Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K (2000) Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol.* 150: 731-740 p.
- Nakano R (1997) Apoptosis: Gene directed cell death. *Horm Res.* 48:2-4 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nawar WW (1996) Lipids. In "Food Chemistry", Fennema OR (Ed), 225-319 p.
- Newton K, Strasser A (1998) The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 8:68-75 p.
- Nordberg J, Arner ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 31:1287-1312 p.
- Nowell PC (1990) Cytogenetics of tumor progression. *Cancer.* 65:2172-2175 p.
- Oter S, Korkmaz A, Oztas E, Yıldırım I, Topal T, Bilgic H (2004) Inducible nitric oxide synthase inhibition in cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. *Urol. Res.* 32:185-189 p.
- Özcan A, Korkmaz A, Oter S, Coskun O (2005) Contribution of flavonoid antioxidants to the preventive effect of MESNA in cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Arch Toxicol.* 79:461-465 p.
- Pawa S, Ali S (2006) Boron ameliorates fulminant hepatic failure by counteracting the changes associated with the oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions.* 160:89-98 p.
- Peterson RO (1992) Urinary bladder. In urologic pathology. 2nd ed. Philadelphia: J:B. Lippincott: 261-394 p.
- Pfeiffer CC, Hallman LF, Gersh I (1945) Boric acid ointment: a study of possible intoxication in the treatment of burns, *J. Am. Med. Assoc.* 128 266-274 p.
- Philips FS, Sternberg SS, Cronin AP, Vidal PM (1961) Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. *Cancer Res.* 21:1577-1589 p.
- Pool BL, Bos RP, Niemeyer U, Theuvs JLG, Schmalhl D (1988) In vitro/in vivo effect of mesna on the genotoxicity and toxicity.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Praticò D (2005) Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis*. 181:215-224 p.
- Premila A, Indirani K, Preethi K (2008) Alterations in antioxidant enzyme activities and increased oxidative stress in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in the rat. *J Cancer Therapy*. 6:563-570 p.
- Putz R, Pabst R (1994) *Sobotta İnsan Anatomisi Atlası 4. Türkçe Baskı Cilt 2.*, İstanbul, Beta Basım Yayım Dağıtım.
- Qureshi S, Al-Shabanah O, Al-Harbi M, Al-Bekairi A, Raza M (2001) Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. *Toxicology*. 165(1):1-11 p.
- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*. 276:869-874 p.
- Refaat A, Abd Rabou A, Reda A (2014) TRAIL combinations: The new 'trail' for cancer therapy. *Oncology Letters*. 7(5):1327-1332 p.
- Ribeiro RA, Freitas HC, Campos MC, Santos CC, Figueiredo FC, Brito GAC, Cunha FQ (2002) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *J. Urol*. 167:2229-2234 p.
- Said E, Elkashef WF, Abdelaziz RR (2015) Tranilast ameliorates cyclophosphamide-induced lung injury and nephrotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol*. 94:347-358 p.
- Sayli BS (2003) Low frequency of infertility among workers in a borate processing facility. *Biological Trace Element Research*. 93(1-3):19-29 p.
- Scorei R, Ciubar R, Ciofrangeanu CM, Mitran V, Cimpean A, Iordachescu D (2008) Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biological Trace Element Research*. 122(3):197-205 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schwartzman R A, Cidloski J A (1993) Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*. 14:133-144 p.
- Shepherd JD, Pringle LE, Barnett MJ, Klingemann HG, Reece DE, Phillips GL (1991) Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 9:2016-2020 p.
- Sheth VG, Navik U, Maremanda KP, Jena G (2018) Effect of diethyldithiocarbamate in cyclophosphamide-induced nephrotoxicity: Immunohistochemical study of superoxide dismutase 1 in rat. *Indian J. Pharmacol.* 50:4-11 p.
- Simone CB, Simone NL, Simone V, Simone CB (2007) Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Alternative Therapies in Health and Medicine.* 13(1):22-28 p.
- Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS (1998) Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endoc and Metab.* 83:152 p.
- Sizmaz O, Yildiz G (2013) Effects of dietary boric acid and ascorbic acid supplementation on performance, some blood and bone parameters in broilers. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 20(1):65-71 p.
- Smith DR, Balashov KE, Hafler DA, Khoury SJ, Weiner HL (1997) Immune deviation following pulse cyclophosphamide/methylprednisolone treatment of multiple sclerosis: increased interleukin-4 production and associated eosinophilia. *Ann. Neurol.* 42:313-318 p.
- Sogut I, Paltun SO, Tuncdemir M, Ersoz M, Hurdag C (2018) The antioxidant and antiapoptotic effect of boric acid on hepatotoxicity in chronic alcohol-fed rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 96(4):404-411 p.
- Soysal T (2004) Hemorajik sistit. *Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Kursu İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi*, 192-194 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Spencer S, Cataldo NA, Jaffe RB (1995) Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 5:314-323 p.
- Stephen S, Sternberg MD (1997) Urinary bladder, ureter and renal pelvis. *Histology for pathologists*. 2. baskı. Philadelphia: Lippincott- Raven. 835-847 p.
- Stockman GD, Heim LR, South MA, Trentin JJ (1973) Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cell compartments of Adult Mice. *J. Immunol*. 110:277-282 p.
- Stillwell TJ, Benson RC (1988) Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. A review of 100 patients. *Cancer*. 61:451-457 p.
- Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom JG (2013) Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*. 16(4):464 p.
- Silva PFN (2006) Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm. *Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine*. 25-26 p.
- Szabó C (1996) The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock Augusta Ga*. 6:79-88 p.
- Takagi T, Takayasu M, Mizuno M, Yoshimoto M, Yoshida J (2003) Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 43:20-29 p.
- Takahaski K, Schwarz E, Ljubetic C, Murray M, Tessler A, Saavedra RA (1999) DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adults rats. *J Comp Neurol*. 404:159-71 p.
- Tanagho EA (1995) Anatomy of the Genitourinary Tract. In *Smith's General Urology*. Edited by Tanagho EA. and McAninch JW. Fourteenth Edition. California. Appleton & Lange Company. Chapter 1:7-16 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tanagho EA, McAninch JW (2009) Smith Genel Üroloji. Editör: Kazancı G, 17.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Tanagho EA, McAninch JW (2009) Smith Genel Üroloji. Editör: Kazancı G, 17. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267:1456-1462 p.
- Todorova V, Vanderpool D, Blossom S, Nwokedi E, Hennings L, Mrak R (2009) Oral glutamine protects against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in experimental rats through increase of cardiac glutathione. *Nutrition*. 25:812-7 p.
- Touchette N, Fogle S (1991) Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH Res*. 3:75 p.
- Tripathi DN, Jena GB (2009) Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: A study in mice. *Chem Biol Interact*. 180:398-406 p.
- Turc JL and Poulter LW (1972) Selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. *Clin. Exp. Immunol*. 10:285-296 p.
- Turkez H, Geyikoğlu F, Tatar A, Keleş S, Özkanç A (2007) Effects of some boron compounds on peripheral human blood. *Zeitschrift für Naturforschung*. 62:889-896 p.
- Ulukaya, E. Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*: 160:1-40 p.
- Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C (2003) Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett*. 140-141:113-124 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wagner AJ, Small MB, Itoy N (1993) Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of bcl-2. *Mol Cell Biol.* 13:2432-2440 p.
- Walsh PC, Retik AB, Kavoussi LR, Vaughan ED, Novick AC, Wein AJ (2012) *Campbell Walsh Urology*, 10th edition.
- Wang Y, Zhao Y, Chen X (2008) Experimental study on the estrogen-like effect of boric acid. *Biological Trace Element Research.* 121(2):160-70 p.
- Watson NA, Notley RG (1973) Urological complications of cyclophosphamide. *Br. J. Urol.* 45:606-609 p.
- West NJ (1997) Prevention and treatment of hemorrhagic cystitis. *Pharmacotherapy.* 17:696-706 p.
- Wildburger, R., Mrakovcic L., Stroser M., Andrisic L (2009) Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence: Review Citation. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.* 29:189-193 p.
- Weir RJ, Fisher RS (1972) Toxicologic studies on borax and boric acid, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23:351-364 p.
- White AC., Sousa AM., Blumberg J., Ryan HF (2006) Plasma antioxidants in subjects before hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation.* 38(7):513-520 p.
- Wingrave JM, Schaecher KE, Sribnick EA (2003) Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *Journal of Neuroscience Res.*73:95-104 p.
- Woods WG (1994) An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. *Environ Health Perspect.* 102(7):5-11 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284:555-556 p.
- Wyllie AH (1996) The genetic regulation of apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:97-104 p.
- Yagoda A, Mukherji B, Young C, Etcubanas E, Lamonte C, Smith JR, Tan CT, Krakoff IH (1972) Bleomycin, an antitumor antibiotic. Clinical experience in 274 patients. *Ann. Intern. Med.* 77:861-870 p.
- Yenmez N (2009) Stratejik bir maden olarak bor minerallerin Türkiye için önemi. *Coğrafya Dergisi.* (19):59-94 p.
- Yılmaz S, Ustundag A, Cemiloglu Ulker O, Duydu Y (2016) Protective Effect of Boric acid on Oxidative DNA Damage In Chinese Hamster Lung Fibroblast V79 Cell Lines. *Cell journal.*17(4):748-54 p.
- Zhao L, Guo QL, You QD, Wu ZQ, Gu HY (2004) Gambogic acid induces apoptosis and regulates expressions of Bax and Bcl-2 protein in human gastric carcinoma MGC-803 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 27:998-1003 p.

EK AÇIKLAMALAR**Sayfa**

Ek Açıklama-A: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.....73

EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklama-A: Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurul Kararı



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :14. 03. 2018
TOPLANTI SAYISI : 122
DOSYA KAYIT NUMARASI : 648-1
KARAR NUMARASI : 648-1
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof. Dr. Adnan AYHANCI
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Yrd. Doç. Dr. Mustafa CENGİZ
Dokt. Öğr. Özgün TEKSOY
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : Sprague Dawley (28 adet Erkek)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Adnan AYHANCI'nın araştırma yürütücüsü olduğu 648-1/2018 kayıt numaralı ve "Sıçanlarda Siklofosfamid ile Oluşturulan Karaciğer Hasarında Borik Asidin sitogenetik, apoptotik ve doku hasarı üzerine etkileri" konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Keyser ERÖL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

Doç. Dr. Engin YILDIZIM (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Nurdan KIRIMLIOĞLU (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Vet. Hek. Oya ERALP İNAN (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)

Adres: Meşelik Yerleşkesi
26480 Eskişehir

Tel : 0 222 239 29 79 (4563)
Fax: 0 222 239 10 74



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

GEREKÇE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Prof. Dr. Adnan AYHANCI**'nin araştırma yürütücüsü olduğu 648-1/2018 kayıt numaralı ve "Sıçanlarda Siklofosfamid ile Oluşturulan Karaciğer Hasarında Borik Asidin sitogenetik, apoptotik ve doku hasarı üzerine etkileri" konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

Kimyasal Maddeler ve Enjeksiyonları

%99 saflıktaki Borik asit ve Siklofosfamid Sigma firmasından temin edilecektir Bu maddelerden, CP'nin 500 mg'ı 25 mL serum fizyolojik (SF)'de çözülerek enjeksiyona hazır duruma getirilecektir. Kimyasal madde enjeksiyonları, çözeltilerin taze olarak hazırlanmasından sonra, steril tek kullanımlık enjektörler ile intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanacaktır. BA'nın 200mg/kg dozu 0.5 mL SF'de eritilerek çözelti hazırlanacaktır ve i.p. olarak uygulanacaktır.

Bütün hayvanlar ilk enjeksiyondan ve öldürülmeden önce tartılarak ağırlıkları saptanacak ve böylece uygulanacak ilaç dozları belirlenecektir. Sadece CP verilen 2. gruptaki hayvanlar CP enjeksiyonu deneyin 4. günü yapılacak ve deneyin 7. gününde anestezi edilecek. gün sonra anestezi edilecektir. CP ile birlikte BA verilen gruplarda BA uygulamasına CP uygulamasından 3 gün önce başlanacak ve deney süresince devam edilecektir. 4. gün hayvanlar tekrar tartılarak uygulanacak CP dozu belirlenecek ve böylece 4. gün CP+BA verilecektir. Yedinci gün hayvanlar anestezi edilerek periferik kan, mesane, böbrek, karaciğer ve kalpleri alınacaktır [İnce ve ark., 2012]

Deney Grupları

Çalışmada Sprague Dawley (28 adet Erkek) kullanılacaktır. Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinde n=6' şer sıçan olmak üzere toplam 4 grup oluşturulacaktır. Bunlar;

Grup 1: Kontrol: Her hayvana 0.5 mL SF enjeksiyonu yapılacaktır.

Grup 2: Her hayvana tek doz 200 mg/kg CP

Grup 3: Her hayvana 200mg/kg BA

Grup 4: Her hayvana 200mg/kg BA + 200 mg/kg CP

Doku homojenatlarından ve serumdan; malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), Glutatyon peroksidaz (GP-x), toplam antioksidan seviye (TAS), toplam oksidan seviye (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ) ile serum alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH), ürik asit, kan üre azotu (BUN), katalaz (CAT), nitrik oksit (NOx) ve amonyak aktiviteleri ölçülerek, sitogenetik analizler, komet ve mikronükleus (MN) testi yapılarak belirlenecektir. Karaciğer dokusu histopatolojik olarak da incelenerek Bcl-2, Bax, Tunel, TNF- α ve kaspaz-3 immünohistokimyasal olarak belirlenecektir.

Adres: Meşelik Yerleşkesi
26480 Eskişehir

Tel : 0 222 239 29 79 (4563)
Fax: 0 222 239 10 74



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilecektir. Ketamin/Ksilazin ile anestezi edilmiş hayvanlardan intrakardiyak kan alımı yapılacaktır. Alınan kan Eppendorf Centrifuge 5804 R marka ve model cihaz ile 10 dakika 3000 rpm devirde santrifüjlenerek serumlar elde edilecektir. Polietilen tüplere aktarılan serum örnekleri biyokimyasal analizler için -80°C derin dondurucuda korunacaktır [Furuta et al., 2000]. Kreatinin ölçümleri HITACHI-917 oto analizörü ile (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden Germany) marka ticari kitler kullanılarak yapılacaktır.

Kullanılan yöntemler uluslararası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.

Adres: Meşelik Yerleşkesi
26480 Eskişehir

Tel : 0 222 239 29 79 (4563)
Fax: 0 222 239 10 74