



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD UYGULAMASINA BAĞLI  
TESTİS HASARININ ÖNLENMESİNDE VE/VEYA TEDAVİ  
EDİLMESİNDE BERBERİN'İN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HAKAN ALTUNTAŞ**

**Doç. Dr. MAHMUT ÖZDEMİR**

**MAYIS-2019**



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD UYGULAMASINA BAĞLI  
TESTİS HASARININ ÖNLENMESİNDE VE/VEYA TEDAVİ  
EDİLMESİNDE BERBERİN'İN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HAKAN ALTUNTAŞ**

**Doç. Dr. MAHMUT ÖZDEMİR**

**MAYIS-2019**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Hakan ALTUNTAŞ**'ın Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak hazırladığı "**Sıçanlarda Siklofosfamid Uygulamasına Bağlı Testis Hasarının Önlenmesinde ve/veya Tedavi Edilmesinde Berberin'in Etkisi**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek "**KABUL**" edilmiştir.

27.05.2019

Üye : Prof. Dr. Kevser EROL



Üye : Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ



Üye : Doç. Dr. Mahmut ÖZDEMİR



Üye : Doç. Dr. Semra YİĞİTASLAN



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Fikriye Yasemin ÖZATİK



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../...../ tarih ve ...../..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Özkan ALATAŞ  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD UYGULAMASINA BAĞLI TESTİS HASARININ ÖNLENMESİNDE VE/VEYA TEDAVİ EDİLMESİNDE BERBERİN'İN ETKİSİ

Çalışmamızda sıçanlarda farklı dozlarda oral berberin uygulamasının intraperitoneal (i.p.) uygulanan siklofosfamide (CP) bağlı testis hasarı üzerine koruyucu ve/veya terapötik etkisi incelenmiştir. Bu amaçla toplam 40 adet Sprague-Dawley erkek sıçan her grupta 8'er hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna 14 gün boyunca SF oral olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna 8.gün i.p. SF uygulanmıştır. CP, ber75, ber150, ber300 gruplarına ise 8. günde 200 mg/kg tek doz i.p. CP enjeksiyonunun öncesinde 7 gün ve sonrasında 7 gün olmak üzere, CP grubunda SF ve tedavi gruplarında da 75 mg/kg, 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarında berberin gavaj yoluyla uygulanmıştır. Son tedavi dozundan 24 saat sonra genel anestezi ve ötenazi sonrasında hayvanların testis dokuları alınmış ve birisi histolojik inceleme ve immunohistokimyasal apoptoz değerlendirmesi için diğeri de homojenat hazırlamak için kullanılmıştır. Morfometrik ölçümler için vücut ağırlıkları ve testis ağırlıkları değerlendirilmiştir. Testis homojenatında oksidatif stres ve sitokin düzeyleri değerlendirilmiştir. Çalışmamızda CP vücut ağırlığı ve testis ağırlığında önemli bir değişikliğe sebep olmamış, berberin tedavisi ise vücut ağırlığını anlamlı ölçüde azaltmıştır. Yine oksidatif stres belirteçleri ve sitokin düzeyleri açısından anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş olmakla birlikte histolojik olarak CP verilen grupta dejeneratif değişiklikler ve apoptotik bulgular olduğu ve bu bulguların berberin tedavisi ile artan dozlarla birlikte artacak şekilde iyileştiği saptanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada berberin tedavisinin CP ile oluşturulan testis hasarı üzerine oksidatif stres ve inflamasyon aracılı olmaktan ziyade anti-dejeneratif ve anti-apoptotik etkiler gösterdiği saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Berberin, siklofosfamid, sıçan, testis hasarı

## SUMMARY

### THE EFFECT OF BERBERINE ON THE PREVENTION AND / OR TREATMENT ON CYCLOPHOSPHAMIDE INDUCED TESTICULAR DAMAGE IN RATS

In our study, the protective and/or therapeutic effect of oral berberine treatment in different doses on cyclophosphamide-induced testicular injury was investigated in rats. For this purpose, a total of 40 male Sprague-Dawley rats were divided into 5 groups with 8 animals in each group. The control group was administered orally in SF for 14 days. Saline solution was applied to control group by ip on day 8. In CP, ber75, ber150 and ber300 groups, 200 mg / kg single dose of i.p CP was administered on Day 8 with administering SF, 75 mg / kg, 150 mg / kg and 300 mg / kg berberine by oral gavage for 7 days before and after the CP injection, respectively. After 24 hours of the last treatment dose, testicular tissues were removed in animals under general anesthesia and after euthanasia, and then one was used for histological examination and immunohistochemical apoptosis evaluation and the other was used to prepare testis homogenate. Body weights and testis weights were evaluated for morphometric measurements. Oxidative stress and cytokine levels were evaluated in testis homogenate. In our study, CP did not cause a significant change in body weight and testis weight, whereas berberine treatment significantly decreased body weight. Although no significant change was observed in terms of oxidative stress markers and cytokine levels, degenerative changes and apoptotic findings were found in the CP group; which were improved significantly with increasing doses of berberine treatment. In conclusion, in this study, it was found that treatment with berberine showed anti-degenerative and anti-apoptotic effects rather than affecting oxidative stress and inflammatory pathways in CP-induced testicular damage.

**Key words:** Berberine, cyclophosphamide, rat, testicular injury

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK .....	i
KABUL VE ONAY SAYFASI .....	ii
ÖZET .....	iii
SUMMARY .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİL DİZİNİ .....	viii
TABLO DİZİNİ .....	ix
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Siklofoamid .....	3
2.1.1 Endikasyonları .....	4
2.1.2 Farmakodinami .....	4
2.1.3 Farmakokinetik .....	5
2.1.3.1 Emilim .....	6
2.1.3.2 Dağılım .....	6
2.1.3.3 Metabolizma .....	7
2.1.3.3.1 Aktivasyon .....	8
2.1.3.3.2 N-dekloroetilasyon .....	9
2.1.3.3.3 Detoksifikasyon .....	10
2.1.3.4 Eliminasyon .....	11
2.1.4 Farmakogenetik .....	12
2.1.5 Yan etkileri .....	13
2.1.5.1. DNA hasarı .....	13
2.1.5.2. Kemik iliği üzerine etkisi .....	14
2.1.5.3. Cilt ve saç üzerine etkileri .....	14
2.1.5.4. Fertilite üzerine etkileri .....	14
2.1.5.5. Malign tümörler .....	16
2.1.5.6. Enfeksiyon .....	17
2.1.5.7. Hemorajik sistit .....	17
2.1.5.8. Oksidatif stres .....	18
2.1.5.9. Apoptoz .....	20
2.1.5.10. Testis hasarı .....	22

2.2. Berberin .....	24
2.2.1. Farmakokinetik .....	25
2.2.1.1. Emilim .....	26
2.2.1.2. Dağılım .....	26
2.2.1.3. Metabolizma .....	27
2.2.1.4. Eliminasyon .....	29
2.2.2. Farmakodinami .....	29
2.2.3. Berberinin temel etkileri .....	29
2.2.3.1. Oksidatif stres belirteçlerinin modülasyonu .....	29
2.2.3.2. Anti-inflamatuvar etki .....	31
2.2.3.3. Antiapoptotik etkisi .....	36
2.2.3.3.1. PI3K/AKT/Bcl-2 yolu .....	37
2.2.3.3.2. PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ sinyal yolu ve Wnt/GSK3 $\beta$ yolu .....	38
2.2.3.3.3. AMPK yolu .....	38
2.2.3.3.4. Hücre döngüsüne etkisi .....	40
2.2.4. Güvenlik önlemleri ve ilaç etkileşimleri .....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	41
3.1. Gereçler .....	41
3.1.1. Kullanılan hayvanlar .....	41
3.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	41
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve Kitler .....	41
3.2. Yöntem .....	42
3.2.1. Deney protokolü .....	42
3.2.2. Örneklerin alınması .....	43
3.2.3. Biyokimyasal analizler .....	44
3.2.3.1. Oksidatif stres değerlendirilmesi .....	44
3.2.3.2. Sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi .....	45
3.2.3.3. Histolojik değerlendirme .....	45
3.2.3.4. İstatistiksel analiz .....	45
4. BULGULAR .....	46
4.1. Morfometrik Bulgular .....	46
4.2. Biyokimyasal Bulgular .....	48
4.3. Histolojik Bulgular .....	50
4.3.1. Genel histopatolojik değerlendirme .....	50
4.3.2. Apoptoz değerlendirilmesi .....	51

5. TARTIŞMA .....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	63
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	64
ÖZGEÇMİŞ .....	92



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Siklofosfamidin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 2.2 Siklofosfamidin etki mekanizması.....	5
Şekil 2.3 Siklofosfamidin metabolizması.....	7
Şekil 2.4 Sperm hücrelerinde siklofosfamid toksisitesinin mekanizması.....	16
Şekil 2.5 Siklofosfamidin proapoptatik rolünün şematize görünümü .....	21
Şekil 2.6 Hydrastis canadensis bitkisi.....	24
Şekil 2.7 Berberinin kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2.8 Berberinin faz I metabolitleri.....	28
Şekil 2.9 Oksidatif stres ve inflamasyonda berberin mekanizması.....	36
Şekil 2.10 Berberinin çeşitli hastalıklara karşı etkisinin mekanizması.....	39
Şekil 4.1 Deney prosedürün başlangıcında (ilk V.A.) ve bitiminde (son V.A.) ölçülen vücut ağırlıkları (g).....	46
Şekil 4.2 Deney prosedürünün bitiminde vücut ağırlığında gözlenen yüzde değişim (VA%).....	47
Şekil 4.3 Deney prosedürünün bitiminde testis ağırlığının vücut ağırlığına oranı (TA/VA) (mg/g).....	48
Şekil 4.4 Testis homojenatlarında ölçülen IL-2 düzeyleri (ng/L).....	49
Şekil 4.5 Testis homojenatlarında ölçülen IL-6 düzeyleri (ng/L).....	49
Şekil 4.6 Testis homojenatlarında oksidatif stres indeksi (OSI).....	50
Şekil 4.7 Deney gruplarına ait sıçan testis kesitleri.....	52
Şekil 4.8 Deney gruplarına ait sıçan testis kesitleri.....	53
Şekil 4.9 Deney gruplarına ait sıçan testis kesitlerinin kaspaz 3 immüno reaksiyonu.....	54
Şekil 4.10 Deney gruplarına ait sıçan testis kesitlerinin bcl-2 immüno reaksiyonu.....	55

## **TABLO DİZİNİ**

<b>Tablo 2.1</b> Sıçanlarda berberinin inflamasyon ve sitokinler üzerine etkileri.....	32
<b>Tablo 3.1</b> Hayvan grupları ve deney modeli.....	43
<b>Tablo 4.1</b> Hayvanlarda vücut ve testis ağırlıkları.....	46
<b>Tablo 4.2</b> Deney gruplarında oksidatif stres durumu ve sitokin düzeyleri.....	48

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

CP	Siklofosfamid
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
NOD	Obez Olmayan Diyabetik
TNF- $\alpha$	Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$
IFN $\gamma$	İnterferon- $\gamma$
IL	İnterlökin
SLE	Sistemik Lupus Eritmatozus
CYP	Sitokrom P
NK	Öldürücü Hücreler
İ.V.	İntra Venöz
BOS	Beyin Omurilik Sıvısında
ALDH	Aldehitdehidrogenaz
GST	Glutatyon <i>S</i> transferaz
$\mu$ M	Mikro Molar
SJS	Stevens Johson Sendromu
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
PJP	<i>Pneumocytis Jirovecci</i> Pnömoni
MESNA	2-merkaptoetansülfonik asit
AP-1	Aktivatör protein
NF- $\kappa$ B	Nükleer Faktör Kappa B
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
SOD	Süperoksitdismutaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz

GSH	Glutatyon
CAT	Katalaz
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
µg	Mikro Gram
KBB	Kan-Beyin Bariyeri
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
NO	Nitrikoksit
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
GFAP	Glial Fibriller Asidik Protein
COX-2	Siklooksijenaz-2
IRS	İnsülin Reseptör Substrat
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
AMPK	Adenozin Monofosfat- Aktifleştirilmiş Protein Kinaz
PPAR $\gamma$	Peroksizom Proliferatör İle Aktifleştirilen Reseptör- $\gamma$
HIF-1- $\alpha$	Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1- $\alpha$
GSK - 3	Glikojen Sentaz Kinaz 3
MDA	Malondialdehit
MT	Metalotionin
P-gp	P-glikoprotein

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Siklofosfamid (CP) over, meme ve küçük hücreli akciğer karsinomları gibi çeşitli epitelyal tümörlerin yanı sıra bazı hematolojik malignitelerin tedavisinde (Emadi, Jones, Brodsky, 2009) ve ayrıca greft reddinin önlenmesi ile bazı kronik otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılan immun baskılayıcı bir ajandır (Ghobadi, Moloudizargari, Asghari & Abdollahi, 2017). Etkinlik göstermesi için enzimatik biyoaktivasyon gerektiren inaktif bir ön ilaç olan CP enzimatik reaksiyonlar sonucunda fosforamid hardalı ve akroleine dönüşerek etkinlik kazanır.

Siklofosfamidin aktif alkilasyon ajanı olan fosforamid hardalı, DNA'da guaninin azot ve oksijen atomlarına alkil gruplarının eklenmesine neden olmaktadır. Oluşan alkillenmiş guanin, sitozin için afinitesini yitirmekte ve DNA çapraz bağlanmasına yol açmaktadır. DNA ipliklerinin çapraz bağlanması hücre büyümesine, mitotik aktivitenin farklılaşmasına ve fonksiyonunun bozulmasına neden olmaktadır (Vernet, Aitken, Drevet, 2004; Ponticelli, Escoli, Moroni, 2018). Bu da DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda bozulmaya yol açmaktadır. CP'nin diğer aktif metaboliti olan akroleinin hemorajik sistite ve testiste apoptotik değişikliklerle birlikte insan fertilitesine olumsuz etkilerinin görüldüğü çalışmalar bulunmaktadır (Türk, Sakin, Sönmez, Ateşşahin, 2010; Drumond, Wang, Chiarini-Garcia, Eras-Garcia, Meistrich, 2011). Bunların haricinde CP uygulamasına bağlı olarak testis ağırlıklarında azalmaların olduğu çalışmalar da mevcuttur (Ghobadi, Moloudizargari, Asghari & Abdollahi, 2017). CP testisin germinal epitelinin aplazisini, sonuçta oligospermiyi ve hatta azospermiyi indükleyebilir (Latta, von Schnakenburg, Ehrich, 2001). Ayrıca CP maruziyetinden sonra sperm konsantrasyonunda ve hareketliliğinde belirgin bir azalma görülen çalışmalar da vardır (Ghobadi, Moloudizargari, Asghari & Abdollahi, 2017). Bunun mekanizmaları DNA hasarının indüksiyonunu, proteinlerde kritik tiyol gruplarının peroksidasyonunu, membran lipit peroksidasyonunu, mitokondride oksidatif stresi ve trikarboksilik asit döngüsünde yer alan enzimleri azaltmayı içermektedir (Selvakumar, Prahalathan, Mythili vd.,

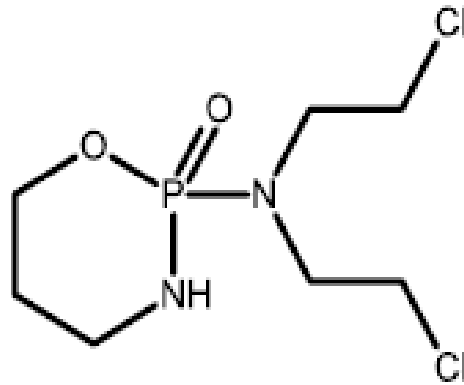
2005). Reaktif oksijen türlerine (ROS) maruz kalmanın ATP konsantrasyonunu ve sperm hareketliliğini azalttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (De Lamirande & Gagnon, 1992).

Obez olmayan diyabetik (NOD) farelerle yapılan bir çalışmada berberinin Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-6 (IL-6), interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) ve IL-17 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azalttığı, IL-10/IL-1 $\beta$ , IL-10/IL-6 ve IL-10/TNF- $\alpha$  gibi anti-inflamatuvar/proinflamatuvar sitokin oranlarını arttırdığı, bir başka çalışmada da antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Maritim, Sanders & Watkins III, 2003; Ceballos-Picot, Witko-Sarsat, Merad-Boudia vd., 1996; Cui, Qin, Zhang, Gong, Ge & Zang, 2009; Chueh & Lin, 2012). Tüm bu çalışmalar bize testis hasarında ve/veya önlenmesinde berberinin klinik açıdan etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bildiğimiz kadarıyla berberinin CP ile oluşturulan testis hasarı üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmadığından berberinin bu koşullarda etkisinin araştırılması bu çalışmayı değerli kılmaktadır. CP uygulamasına bağlı testis hasarının önlenmesinde ve/veya tedavi edilmesinde berberinin etkilerinin araştırılması çalışmamızın amacını oluşturmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Siklofosfamid

Hardal gazlarının periferik kan lenfositlerinde azalmaya neden olduğu gözlemi azot-hardal türevlerinin sitotoksik özelliklere sahip olduğunun keşfedilmesine yol açmıştır (Arnold, Bourseaux, Brock, 1958). 1958'de Norbert Brock tarafından sentezlenen, ilk kez de 1959 yılında kanser tedavisinde kullanılan ester yapısında olan (şekil 2.1) siklofosfamid (CP), hardal alkilleyici ajanların oksazafosfor ailesinin bir üyesidir (Brock & Wilmanns, 1958; Madondo, Quinn, Plebanski, 2016). Sitostatik aktiviteyi göstermek için enzimatik biyoaktivasyon gerektiren inaktif bir ön ilaç olan CP enzimatik reaksiyonlar sonucunda fosforamid hardalı ve akroleine dönüşerek etkinlik kazanır. Klinik kullanıma ilk giren antikanser ilaçlardan birisi olan CP antineoplastik ve immünoşüpresif etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılan aktif bir alkilleyici ajandır (Brock & Wilmanns, 1958; Ahmed & Hombal, 1984). CP geniş bir doz aralığında hem oral hem de parenteral yolla kullanılabilir. Veriliş yolu, doz ve süre genellikle hastalığa göre belirlenmektedir. Dozlar, 2-6 mg/kg (düşük doz) ile 145 mg/kg'dan (6000 mg/m<sup>2</sup>) daha büyük dozlara (yüksek doz) kadar değişen geniş bir aralıktadır (Ahmed & Hombal, 1984).



Şekil 2.1. Siklofosfamidin kimyasal yapısı

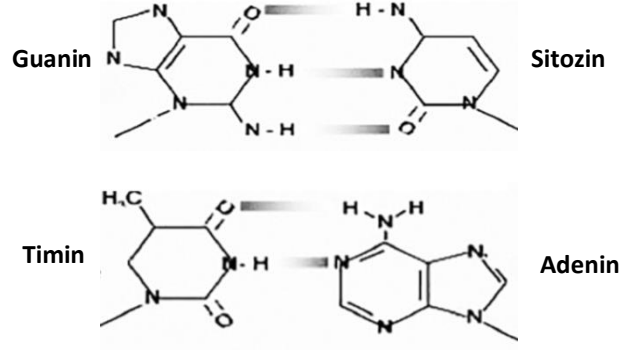
### ***2.1.1. Endikasyonları***

Siklofosamid over, meme ve küçük hücreli akciğer karsinomları gibi çeşitli epitelyal tümörlerin yanı sıra, malign lenfoma ve lösemi dahil olmak üzere hematolojik malignitelerin tedavisinde de oldukça etkili bir ilaçtır (Emadi, Jones & Brodsky, 2009). İmmünoşüpresif etkisi nedeniyle greft reddinin önlenmesi, romatoid artrit, myastenia gravis, multiple skleroz (MS) ve sistemik lupus eritmatozus (SLE) gibi kronik otoimmün hastalıkların tedavisinde de oral yoldan kullanılmaktadır (Ghobadi, Moloudizargari, Asghari & Abdollahi, 2017).

### ***2.1.2. Farmakodinami***

Alkilleyici ajanların temel farmakolojik aktivitesi, esas olarak DNA ipliklerini çapraz bağlayarak hücre büyümesinin, mitotik aktivitenin, farklılaşmanın ve fonksiyonunun bozulması üzerinedir (Vernet, Aitken, Drevet, 2004). CP'nin aktif alkilasyon ajanı, fosforamid hardalıdır (Ponticelli, Escoli, Moroni, 2018). Aktif metabolit olan fosforamid hardalı, DNA nükleotitlerini oluşturan dört azot bazından biri olan guaninin azot ve oksijen atomlarına alkil gruplarının (-CH<sub>3</sub>(metil), -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>(bütil) gibi fonksiyonel grup) eklenmesine neden olur. Alkillenmiş guanin, sitozine olan afinitesini yitirir ve timine bağlanır. Bunun sonucunda anormal çiftler oluşturarak DNA çapraz bağlanmasına yol açar, tek zincir kırılmasına neden olur; böylece DNA replikasyonunu önler ve hücre apoptozuna sebep olur (Ponticelli, Escoli, Moroni, 2018; şekil 2.2). Molekülde oluşan iki reaktif kısım nedeniyle, iplikçikler arası çapraz bağlar oluşur (Fleer & Brendel, 1981). Bu nedenle CP'nin etkileri hücre döngüsünden bağımsızdır. Bölünme evresindeki hücrelere karşı belirgin bir etki gösterir ve aynı zamanda hareketsiz hücreleri de alkilleyebilir. Bununla birlikte, çoğalma yapmayan hücrelerde alkilasyon sürecinde, DNA hasarı bir sonraki hücresel bölünmeden önce onarım sistemleri (anormal bazların çıkarılması ve değiştirilmesi dahil) ile düzeltilir.





Şekil 2.2. Siklofosfamidin etki mekanizması (Ponticelli vd., 2018)

Bağışıklık sistemi genellikle, kanser hücrelerini, hücre yüzeyindeki MHC proteinleri yoluyla “yabancı” olarak tanımlayarak kanseri önler ve doğal öldürücü hücreler (NK), sitotoksik T hücreleri ve diğerleri gibi immünokompetan hücreler tarafından saldırıya uğrar (Candeias & Gaip, 2016). Fakat hem T hem de B lenfositleri, CP'nin etkilerine duyarlıdır. İlaç özellikle B hücrelerinin sentezlediği antikor üretimini azaltmada etkilidir. Fosforamid hardalı sadece düşük düzeylerde aldehit dehidrojenaz içeren hücrelerde oluşturulduğundan T hücreleri aldehit dehidrojenazın farklı ekspresyonu ile ilişkili olarak CP'ye karşı farklı duyarlılık gösterebilir. Düzenleyici T hücreleri, artmış aldehit dehidrojenaz ekspresyonuna sahiptir ve fosforamide dirençli hale gelebilir (Ponticelli vd., 2018).

### 2.1.3. Farmakokinetik

Siklofosfamidin farmakokinetiği ile ilgili çok fazla veri yayınlanmıştır. Çalışmaların çoğu i.v. ya da oral yolla, monoterapi ya da kombinasyon tedavisi şeklinde uygulanan ana bileşik üzerine yoğunlaşmıştır.

Siklofosfamidin eliminasyon, yarılanma ömrü geniş bir konsantrasyon aralığında (5-9 saat arasında) değişmektedir. Plazma yarı ömrü çocuklarda ve genç erişkinlerde yetişkinlere göre artmış Sitokrom P (CYP) aktivitesinin bir sonucu olarak daha kısa bulunmuştur. CP'nin total sistemik klirensi, büyük kısmı nonrenal klirens olmak üzere 4-5 L/saattir. CP plazma proteinlerine düşük oranda bağlanmakta ve renal klirensinin düşük olması, tübüler reabsorpsiyonunun fazla olmasından kaynaklanabilmektedir (Jardine, Fenselau, Appler vd., 1978; Bagley, Bostick, DeVita, 1973; Jarman, Milsted,

Smyth vd., 1979; Edwards, Calvert, Crowther vd., 1980; Juma, Rogers, Trounce, 1979a; Juma, 1984). CP'nin renal klirensinin ise idrar miktarına bağlı olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla fazla hidrasyon renal klirensini artırabilmektedir (Busse, Busch, Bohnenstengel vd., 1997; Joqueviel, Martino, Gilard vd., 1998). Yirmidört saatlik idrar miktarı ile idrarda saptanan değişmemiş CP fraksiyonu arasında anlamlı bir ilişki rapor edilmiştir (Busse, Busch, Schweizer vd., 1999). CP'nin sanal dağılım hacmi total vücut sıvısına denk gelecek şekilde 30-50 L'dir.

En son çalışmalar CP'nin metabolitleri olan; 4-hidroksisiklofosfamid, fosforamid hardalı, 2-dikloroetilsiklofosfamid, 4-ketosiklofosfamid, alkofofosfamid ve karboksifosfamidin plazma farmakokinetiğinden bahsetmiştir:

### **2.1.3.1. Emilim**

Siklofosfamidin 5 dk-2 saat gibi kısa süreli i.v. infüzyonundan sonra, 4-hidroksisiklofosfamid, fosforamid hardalı, 2-dikloroetilsiklofosfamid ve alkofofosfamid sırasıyla 0,5-3 saat, 3-6 saat, 8-15 saat ve 4 saatte maksimum düzeye ulaşır. Oral yolla uygulandığında absorpsiyonu iyidir; 1-3 saatte maksimum düzeylere ulaşır ve oral biyoyararlanımı %85-100'dür (Bagley, Bostick, DeVita, 1973; Juma, Rogers, Trounce, 1979; D'Incalci, Bolis, Facchinetti vd., 1979; Gheuens, Slee, De Bruijn, 1990; Struck, Alberts, Hornevd, 1987; Wagner & Feneberg, 1984). Oral verilmesiyle oluşan metabolizma kalıbı, i.v. infüzyonla verilene benzer. Yapılan bir çalışmada CP aynı dozlarda oral ve i.v. yolla verildiğinde 4-hidroksisiklofosfamid ve fosforamid hardalının benzer maruziyetler gösterdiği sonucuna varılmıştır (Struck, Alberts, Horne vd., 1987).

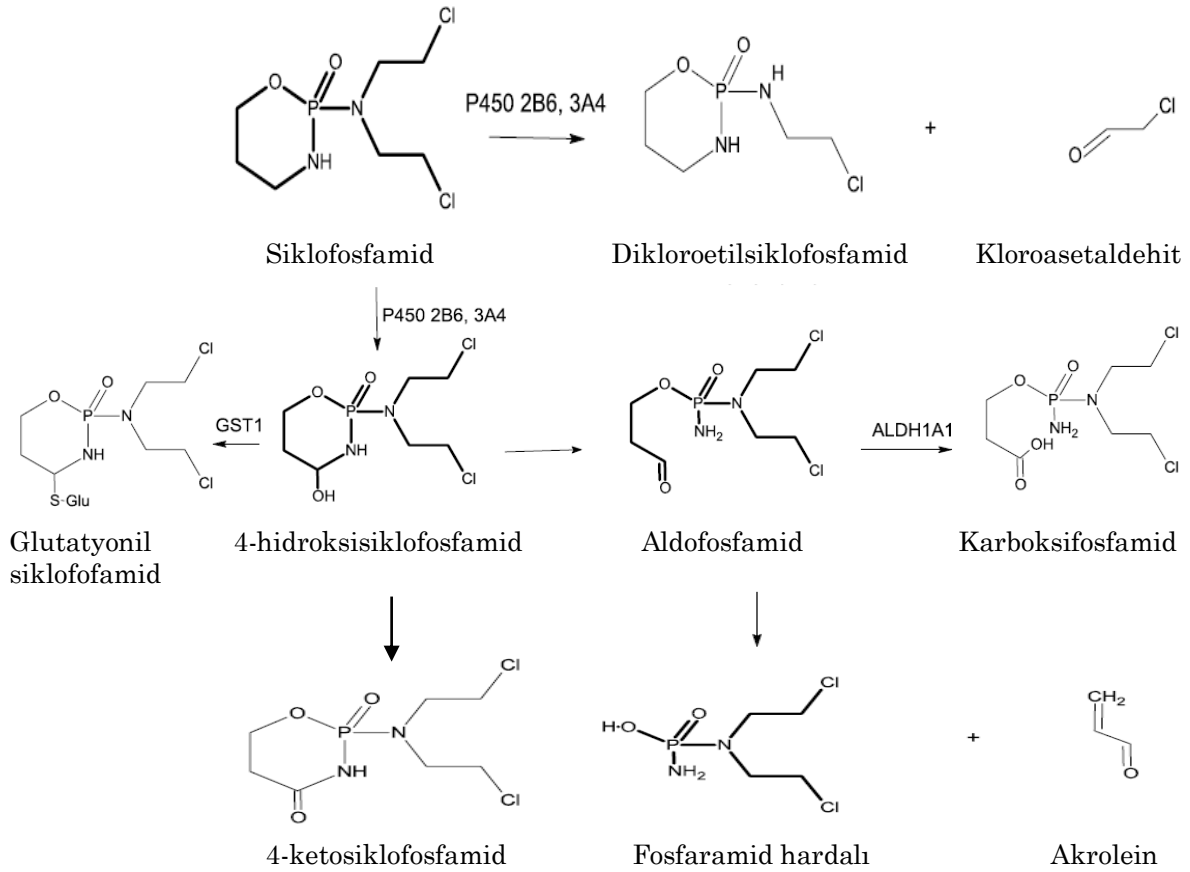
### **2.1.3.2. Dağılım**

Siklofosfamid ve metabolitlerinin vücut sıvılarına dağılımı sınırlıdır. Beyin omurilik sıvısında (BOS) fosforamid hardalı ve CP saptanırken, karboksifosfamid ve 2-dikloroetilsiklofosfamid bulunamamıştır (Jardine, Fenselau, Appler vd., 1978; Yule, Price, Pearson vd., 1997; Fuks, Egorin, Aisner vd., 1981). Tükürükteki CP konsantrasyonları plazmadaki serbest CP düzeyleri ile aynı bulunmuştur (Juma, Rogers, Trounce, 1979).

Siklofosfamid ve metabolitlerinin farmakokinetik profilleri yapılan çalışmalarda büyük farklılıklar göstermektedir. Hastalar arasındaki metabolik farklılıklar; 4-hidroksilasyon, N-deklorometilasyon ve CP'nin renal eliminasyonu arasındaki dengenin değişmesi yanında aldehid dehidrojenaz aktivitesindeki farklılıklar nedeniyle de olabilir.

### 2.1.3.3. Metabolizma

Siklofosfamid, yaygın olarak hem aktif hem de inaktif metabolitlerine dönüşebilen bir ön ilaçtır (Sladek, 1988). Metabolizması şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Siklofosfamidin metabolizması

### **2.1.3.3.1. Aktivasyon**

Siklofosfamidin oral uygulamadan sonra, absorpsiyon oranı çok yüksektir (Ahlmann & Hempel, 2016). Karaciğer CP aktivasyonunda en önemli organdır. Verilen CP dozunun yaklaşık %70-80'i hepatik mikrozomal oksidazlar (Sitokrom P450 enzim sistemi) tarafından açık halkalı tautomeri aldofosfamid ile denge halinde olan 4-hidroksisiklofosfamide dönüştürülür (Fenselau, Kan, Rao vd., 1977; Connors, Cox, Farmer vd., 1974). 4-hidroksisiklofosfamid ve aldofosfamid genel yöntemlerle ayırt edilemediğinden, 4-hidroksisiklofosfamid ismi hem 4-hidroksisiklofosfamid hem de aldofosfamidi belirtmek için kullanılmaktadır. İnsanlarda özellikle en yüksek hidroksilaz aktivitesi gösteren CYP2B6 olmak üzere CYP2A6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C18 ve CYP2C19 dahil çeşitli CYP izoenzimlerinin biyoaktivasyona katkıda buldukları gösterilmiştir (Chang, Weber, Crespi vd., 1993; Xie, Yasar, Lundgren vd., 2003).

4-hidroksisiklofosfamid kolaylıkla hücrelere diffüze olur ve sitotoksik değildir (Boyd, Robbins, Egan vd., 1986). Stabil olmadığından spontan olarak akroleinin  $\beta$ -eliminasyonu ile fosforamid hardalına ayrışır (Friedman, Wodinsky, Myles, 1976; Connors, Cox, Farmer vd., 1974; Völker, Dräger, Peter vd., 1974; Alarcon & Meienhofer, 1971). Bu dönüşüm kısmen albümin ve diğer proteinler tarafından katalize edilir (Voelker, Bielicki, Hohorst, 1981; Hohorst, Bielicki, Voelker, 1986). Fosforamid hardalı, bifonksiyonel DNA alkilleyici ajandır ve CP'nin alkilleyici etkisinden sorumlu olan nihai metabolit olduğu düşünülmektedir (Colvin, Brundrett, Kan vd., 1976; Sladek, 1988; Connors, Cox, Farmer vd., 1974; Struck, Kirk, Witt vd., 1975). Ancak, dolaşımdaki fosforamid hardalı fizyolojik pH'da büyük oranda iyonize olduğundan ve hücrelere giremediğinden sitotoksik etkiye katkısı yoktur (Boyd, Robbins, Egan vd., 1986). Fosforamid hardalının sadece hücre-içi fraksiyonunun sitotoksik olduğu düşünülmektedir. 4-hidroksisiklofosfamidin hücrelere kolayca geçmesi ve hücre içinde fosforamid hardalının kendiliğinden serbest kalmasından dolayı, hücrelere fosforamid hardalı veren bir taşıyıcı molekül olarak işlev görebilir. 4-hidroksisiklofosfamidin sistemik konsantrasyonları CP'nin intraselüler aktivasyon durumunu yansıtabilir (Sladek, 1988). Ancak,

CP'nin intratümoral aktivasyonunun intratümoral CYP enzimleri tarafından belirlenmesi muhtemeldir. Eritrositler içindeki yüksek 4-hidroksisiklofosfamid konsantrasyonları plazma ile karşılaştırılmıştır (Highley, Harper, Slee vd., 1996; Highley, Schrijvers, Van Oosterom vd., 1997). Eritrositlerin 4-hidroksisiklofosfamidin tümör dokusuna taşınmasında aracı oldukları düşünülmektedir. Eritrositlerde plazmadan daha yüksek düzeylerde CP konsantrasyonları rapor eden çalışmalara karşın, bazı araştırmacılar kan ve plazmada benzer CP düzeyleri bildirmişlerdir (Chen, Kennedy, Anderson vd., 1997; Anderson, Chen, Colvin vd., 1996).

Akrolein 4-hidroksisiklofosfamidin fosforamid hardalına ayrışması sırasında açığa çıkan yüksek oranda reaktif aldehiddir ve muhtemelen konjugasyon ile hücre sel glutatyon (GSH) tükenmesine yol açarak CP kaynaklı hücre hasarını artırır. Akrolein, idrarda 3-OH merkaptopürük asit olarak itrah edilir (Alarcon, 1976). GSH, reaktif elektrofillerin detoksifikasyonunda rol oynar ve 4-hidroksisiklofosfamidin fosforamid hardalına dönüşümünü sınırlayarak hücreleri toksik etkisinden korur. Hücre sel GSH'nin tükenmesiyle, akrolein CP sitotoksitesine katkıda bulunur (Crook, Souhami, Whyman vd., 1986; Gurtoo, Hipkens, Sharma, 1981; Lee, 1991). Diğer taraftan akrolein DNA'ya kovalent bağlanarak DNA iplikçikleri arasında ve DNA proteinleri arasında çapraz bağlar oluşturur (Crook, Souhami & McLean, 1986). Dahası akrolein, DNA sentezi, RNA transkripsiyonu, hücre membran bütünlüğü ve metabolizması için gerekli olan kritik proteinleri de inaktive eder (Gurtoo, Hipkens, Sharma, 1981). Örneğin, CP verilmesinden sonra akroleinin CYP enzim miktarını ve aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Marinello, Gurtoo, Struck vd., 1978).

#### **2.1.3.3.2. N-dekloroetilasyon**

Siklofosfamid yan zincir oksidasyonu ile doğrudan inaktif metaboliti 2-dikloroetilsiklofosfamide dönüşür. Bu reaksiyon, özellikle CYP3A4 tarafından katalize edilir ve kloroasetaldehit ile eşit molar miktarda dikloroetilsiklofosfamid oluşur (Connors, Cox, Farmer vd., 1974; Ren, Yang, Kalhorn vd., 1997; Huang, Roy, Waxman, 2000; Yu & Waxman, 1996;

Bohnenstengel, Hofmann, Eichelbaum vd., 1996). CP'nin %5'inden azı bu şekilde idrarla atılır (Boddy, Furtun, Sardas vd., 1992; Yule, Boddy, Cole vd., 1995). Ancak, dekloroetilasyon ve birlikte kloroasetaldehid oluşumu, CP'nin bir izomeri olan ifosfamidin eliminasyonunda önemli rol oynar. Kloroasetaldehidin direkt sitotoksik olduğu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (Borner, Kisro, Bruggemann vd., 2000; Bruggemann, Kisro & Wagner, 1997). Ayrıca, ifosfamid için gösterilenlerle benzer bir şekilde kloroasetaldehit, hücre içi GSH'nin tükenmesine bağlı olarak fosforamid hardalının sitotoksitesini artırabilmektedir (Lind, McGown, Hadfield vd., 1989).

### **2.1.3.3.3. Detoksifikasyon**

Hem 4-hidroksisiklofosfamid hem de aldofosfamid oksidatif reaksiyon ile geri-dönüşümsüz olarak 4-ketosiklofosfamid ve karboksifosfamide yıkılır (Struck, Kirk, Witt vd., 1975; Hohorst, Ziemann, Brock, 1971; Takamizawa, Tochino, Hamashima vd., 1972). Her iki metabolitin de alkilleyici özelliği yoktur ve toksisiteye katkıda bulunmazlar. Aldofosfamidden karboksifosfamid oluşumu CP'nin en önemli metabolik detoksifikasyon yoludur. Aldehid dehidrojenaz-1 enzimi aldofosfamidden karboksifosfamid oluşumunda önemli rol oynayan enzimlerden biridir (Hilton, 1984a; Kohn, Landkamer, Manthey, Ramsay, Sladek, 1987). En yüksek aldehid dehidrojenaz-1 düzeyleri karaciğerde bulunur; ancak, eritrositler gibi birçok dokuda da düşük düzeylerde mevcuttur. Aldehid dehidrojenazın katalize ettiği detoksifikasyon reaksiyonu aldofosfamidin fosforamid hardalına dönüşümünü sağlayan bir aktivasyon reaksiyonu ile yarışır. İlaça maruz kalma sırasında ortama aldehid dehidrojenaz inhibitörünün eklenmesi, hücrelerin CP'nin sitotoksik etkisine duyarlılığını artırabilir (Sladek, 1988; Cox, Phillips & Thomas, 1976; Hilton 1984a; Sladek & Landkamer, 1985). Ayrıca CP'nin sitotoksik etkisine dirençli tümörlerin sıklıkla aldehid dehidrojenaz-1A1'i ya da aldehid dehidrojenaz-3A1'i aşırı eksprese ettiği görülmektedir (Manthey & Sladek, 1989; Moreb, Schweder, Suresh vd., 1996; Sreerama & Sladek, 1993; Yoshida, Dave, Han vd., 1993; Hilton, 1984). CP verilmesini takiben aldofosfamidin karboksifosfamide dönüşüm hızında yavaşlama ile sonuçlanan aldehid

dehidrojenaz-1A1 aktivitesinde bir azalma olduğu gözlenmiştir (Ren, Kalhorn, McDonald vd., 1998). Bu, akrolein tarafından aldehid dehidrojenaz-1'in deaktivasyonuna bağlıdır (Ren, Kalhorn & Slattery, 1999).

Karboksifosfamidin oksidasyonu yanında, aldofosfamid bir aldoredüktaz ile alkokofosfamide indirgenir (Parekh & Sladek, 1993). Aldofosfamidin sadece küçük bir kısmının detoksifikasyonunu sağlayan bu reaksiyon geri-dönüşümlüdür (Dockham, Sreerama & Sladek, 1997). Alkol dehidrojenaz 4-hidroksisiklofosfamidin oksidasyonunda rol alır ve onun 4-ketosiklofosfamide dönüşümünü sağlar.

4-hidroksisiklofosfamid, fosforamid hardalı ve akroleinin detoksifikasyonu spontan gelişen ya da Glutatyon-S-transferaz (GST) enzimi aracılığı ile gerçekleşen intraselüler GSH konjugasyonu ile sağlanır (Crook, Souhami, Whyman vd., 1986; Richardson & Siemann, 1995; Dirven, Van Ommen, Van Bladeren 1994; Peters, Jollow & Stuart, 1991; Gamcsik, Dolan, Andersson vd., 1999; D'Incalci, Bonfanti, Pifferi vd., 1998; Tanner, Hengstler, Dietrich vd., 1997; Alarcon, 1976; Gurtoo, Hipkens & Sharma, 1981; Lee, 1991). Bununla birlikte, bir çalışmada detoksifikasyon derecesinin bir (kanser) hücrenin, GST ekspresyon seviyelerini arttırma ve kemoterapinin indüklediği strese bir cevap olarak hücrede GSH konsantrasyonlarını arttırma yeteneğine bağlı olduğu gösterilmiştir (Cheng, Kigawa, Minigawa vd., 1997). Azot hardalları, bu ilaçlara karşı direnç kazanmış hücrelerde sıklıkla aşırı eksprese edilen GST- $\alpha$  izoenzimler ailesi için iyi bilinen substratlardır (Tew, 1994).

#### **2.1.3.4. Eliminasyon**

Siklofosfamid ve metabolitleri üriner eliminasyon sonucunda tedavinin başlangıcından itibaren 24 saat içerisinde plazmadan tamamen atılmaktadır (Ponticelli vd., 2018). Verilen dozun %20'den azı idrarla değişmemiş olarak atılır. Total CP dozunun %30-60'ı CP ve metabolitleri şeklinde renal yolla elimine edilmektedir. İdrarda bulunan temel metaboliti karboksifosfamididir (Boddy, Furtun, Sardas vd., 1992; Busse, Busch, Bohnenstengel vd., 1997; Busse, Busch, Schweizer vd., 1999; Joqueviel, Martino, Gilard vd., 1998; Tasso, Boddy, Price vd., 1992; Yule, Boddy, Cole vd., 1995; Milsted & Jarman, 1982;

Hadidi, Coulter, Idle, 1988; Jarman, Milsted, Smyth vd., 1979). Bununla birlikte, bir çalışmada idrardaki temel metabolitin fosforamid hardalı olduğu da rapor edilmiştir (Chan, Hong, Tutsch vd., 1994). CP'nin çok az bir kısmı ise feçes ve solunum yoluyla atılır (Bagley, Bostick & DeVita, 1973).

Çalışmalar arasında karboksifosfamid ve fosforamid hardalının idrarda saptanmasındaki farklılıklar, bazı çalışmalarda numune işleme sırasında *ex vivo* olarak meydana gelen reaksiyonlardan kaynaklanabilir. Karboksifosfamid ve fosforamid hardalı idrarda asidik pH'da stabil değildir (Joqueviel, Martino, Gilard vd., 1998; Yule, Boddy, Cole vd., 1995; Jardine, Fenselau, Appler vd., 1978; Bagley, Bostick, DeVita, 1973; Baumann, Lorenz, Jaehde vd., 1999). Numune alma, depolama ve numune ön işlem sırasındaki bozulmalarını hesaba katmamak yanlış ölçümlere neden olabilir. Bu, kısmen karboksifosfamidin idrarla atılmasında görülen bireyler arası büyük değişkenliği de açıklayabilir (Boddy, Furtun, Sardas vd., 1992; Tasso, Boddy, Price vd., 1992; Yule, Boddy, Cole vd., 1995; Milsted & Jarman, 1982; Hadidi, Coulter & Idle, 1988). En son yapılan çalışmalarda idrarda metabolit yıkımını sınırlayan ve hatta bireysel metabolitlerin bozunma ürünlerini ölçen koşulları içeren sıkı analitik prosedürler kullanılmıştır (Busse, Busch, Bohnenstengel vd., 1997; Busse, Busch, Schweizer vd., 1999; Joqueviel, Martino, Gilard vd., 1998; Ren, Kalhorn, McDonald vd., 1998). Bu çalışmalarda gerçekten de metabolitlerin daha yüksek seviyeleri elde edilmiştir.

#### **2.1.4. Farmakogenetik**

Bir ön ilaç olması nedeniyle etkinliği için P450 enzimleri ile biyoaktivasyonu gereken CP'nin metabolizmasında rol oynayan enzimlerle ilgili birçok polimorfizm çalışması yapılmıştır (Pinto, Ludeman & Dolan, 2009). Bununla birlikte, CP'nin metabolizmasında birçok enzim türü rol aldığından, P450 enzimlerini kodlayan genlerdeki olası polimorfizmlerin etkilerinin fazla olması beklenmemektedir. GST'ler CP detoksifikasyonunda önemlidirler. GST-T1, GST-M1 ve GST-P1 polimorfizmlerinin, sağkalım veya nüks oranları üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Zhong vd., 2006). Yine aldehid dehidrojenaz enzimleri (ALDH-1A1 ve ALDH-3A1), 4-hidroksi-



siklofosfamidin hücre içi detoksifikasyonunda önemlidir ve yapılan farmakogenetik çalışmalar bu enzimlerdeki polimorfizmlerin CP toksisitesinde etkisi olduğunu göstermiştir. Halen CP tedavisinden önce genotipleme gerekliliği için net bir öneri bulunmamakla birlikte, GST'de ve aldehit dehidrojenaz genlerinde polimorfizm için genotiplemenin, CP'nin terapötik etkinliğini arttırmada yararlı olabileceği düşünülmektedir (Pinto, Ludeman & Dolan, 2009).

### **2.1.5. Yan etkileri**

Siklofosfamidin doza-bağlı olarak nefrotoksisite, hepatotoksisite, trombositopeni, anemi, mesane toksisitesi/hemorajik sistit ve testis hasarı gibi ciddi sonuçlar doğurabilen yan etkileri görülebilmektedir.

#### **2.1.5.1. DNA hasarı**

Akrolein ve fosforamid hardalı, CP'nin hücre sitotoksitesinden sorumlu olan aktif metabolitleridir. Her ikisi de sitotoksik alkilleyici ajanlar olmakla birlikte; fosforamid hardalı, hücre ölümüyle sonuçlanan DNA çapraz bağlanmasına neden olmaktadır. Çapraz bağlar, DNA iplikçikleri üzerindeki nütrofilik gruplarla ve fosforamid hardalının alkil grupları arasında kovalent bağlarla meydana gelmektedir (Springer, Colvin, Colvin, Ludeman, 1998). CP kaynaklı DNA hasarının bir sonucu olarak apoptozun başlangıcı, CP dozuna ve ilaca maruz kalma süresine bağlıdır. İnsanlar üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada insan lösemi hücrelerinin CP metabolitlerine 1 saat maruz kalması sonucunda DNA sarmalının çapraz bağlanması yavaş yavaş ortaya çıkarken, DNA proteinler arası çapraz bağlanma hemen meydana gelmiştir. Bu iki olay da maruz kalmadan 6 saat sonra maksimuma çıkmış ve tamir mekanizmalarının başlatılmasını takiben geriye dönmüştür. İplikçikler arası çapraz bağlanma oluşumunun 50 µM kadar olan CP konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise DNA iplikçiklerinin kopmaya başlamasıyla DNA çapraz bağlanması azalmıştır (Crook, Souhami & McLean, 1986). Sıçan lösemi hücreleri üzerinde CP ile yapılan *in vivo* bir çalışmada ise 50 mg/kg CP intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonundan sonraki 1-2 saat içerisinde meydana gelen ve 6-8 saat sonra

doruğa çıkan hem DNA proteinler arası çapraz bağlanma hem de DNA iplikçikleri arası çapraz bağlanma açısından benzer gözlemler elde edilmiştir (Wang, Prorok & Vaughan, 1993). Sıçanlar için minimal CP etkin dozu 25-150 mg/kg arasındadır, yine de 15-250 mg/kg arasında bir doz aralığında ve aynı zaman diliminde ne tek sarmal ne de çift sarmal kırılma meydana gelmemiştir (Wang, Prorok & Vaughan, 1993). Veriler, en azından *in vivo* olarak, CP'nin sitotoksitesinin esas olarak DNA çapraz bağlanmasından kaynaklandığını göstermektedir. DNA hasarını onarmak için hücre döngüsünün durdurulmasına neden olan en ölümcül unsur zincirler arası çapraz bağlanmadır. Bu çapraz bağlar kopmazsa, hücre döngüsünün farklı aşamalarında apoptoz veya nekroz meydana gelmektedir (Osawa, Davies & Hartley, 2011).

#### **2.1.5.2. Kemik iliği üzerine etkisi**

Hematopoyetik sistemin hücreleri özellikle CP'nin toksik etkilerine karşı duyarlıdır. Lökopeni, trombositopeni ve anemiye göre daha sık görülmektedir. İntravenöz olarak CP'nin yüksek doz uygulamasından sonra, genellikle lökosit sayısının en düşük olduğu düzeye 8-14 gün sonra ulaşılmakta, 18-25 gün sonra da iyileşme sağlanmaktadır. CP ve metabolitleri böbreklerden itrah edildiğinden, böbrek yetmezliği kemik iliği toksisitesi riskini artırabilmektedir (Ponticelli vd., 2018).

#### **2.1.5.3. Cilt ve saç üzerine etkileri**

Anagen effluvium hastaların %5-30'unda görülmekte ve alopesi kalıcı olabilmektedir (Bronner & Hood, 1983). Hiperpigmentasyon nadir olmakla beraber diş, cilt, mukoza ve tırnaklarda görülebilmektedir (High, 2013). Stevens-Johnson sendromu (SJS) dahil olmak üzere ciddi kutanöz ilaç reaksiyonlarının bildirildiği çalışmalar bulunmaktadır (Assier-Bonnet, Aractingi, Cadranel vd.,1996).

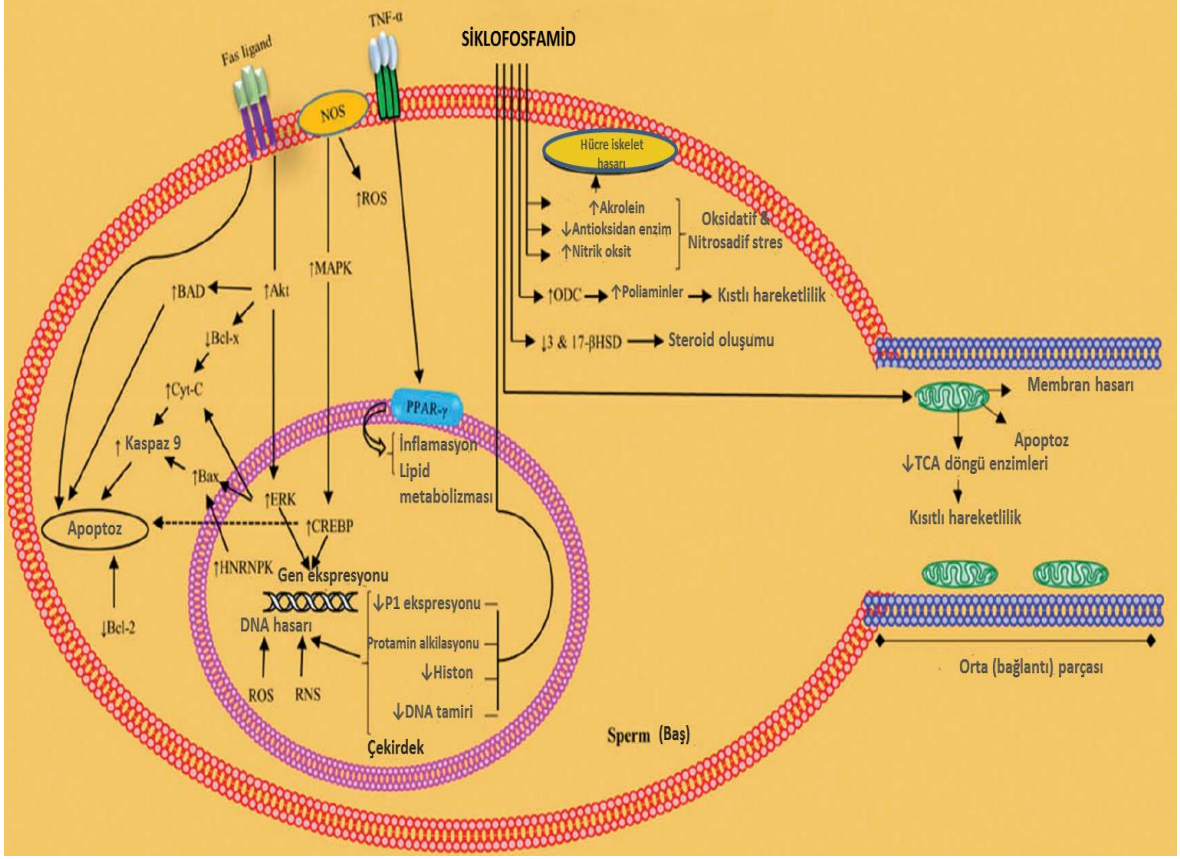
#### **2.1.5.4. Fertilite üzerine etkileri**

Erkeklerde, CP testisin germinal epitelinin aplazisini, sonuçta oligospermiyi ve hatta azospermiyi indükleyebilir. Bu komplikasyon doza, zamana ve yaşa bağlıdır. İdiyopatik nefrotik sendromlu çocuklarda yapılan bir

metaanaliz çalışmasında 250 mg/kg'ı geçmeyen kümülatif dozlarda azospermi riskinin düşük olduğu sonucuna varılmıştır (Latta, von Schnakenburg, Ehrich, 2001). Yetişkinlerde 168 mg/kg'dan yüksek kümülatif bir doz kullanılmaması önerilmiştir (KDIGO, 2012).

Kadınlarda CP kullanımı ile amenore ve ovaryum yetmezliği gelişebilir. Lupus nefritli kadınlarda kümülatif CP dozu menapoz öncesi amenore için önemli bir risk faktörüdür. Meme kanseri tedavisi için CP alan kadınlarla yapılan bir çalışmada amenoreye neden olan ortalama kümülatif CP dozu 40'lı yaşlardaki kadınlarda 5.2g ve 30'lu yaşlardaki kadınlarda 9.3g olarak rapor edilmiştir (Koyama, Wada, Nishizawa, Iwanaga, Aoki, 1977).

Siklofosamid maruziyetinden sonra sperm konsantrasyonunda ve hareketliliğinde belirgin bir azalma görülen çalışmalar vardır (Ghobadi vd., 2017). Olası mekanizmalar arasında DNA hasarının indüksiyonu, proteinlerde kritik tiyol gruplarının peroksidasyonu, membran lipid peroksidasyonu, mitokondride oksidatif stres ve trikarboksilik asit döngüsünde yer alan enzimlerde azalma bulunmaktadır (Selvakumar, Prahalathan, Mythili vd., 2005). Ayrıca, ROS'a maruz kalmanın ATP konsantrasyonunu düşürdüğü ve sperm hareketliliğini azalttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (De Lamirande & Gagnon, 1992).



Şekil 2.4. Sperm hücrelerinde siklofosfamid toksisitesinin mekanizması (Ghobadi vd., 2017)

### 2.1.5.5. Malign tümörler

Siklofosfamid kanserojen bir ilaçtır. Onkojenik risk, diğer immünsüpresif ajanların kullanımında olduğu gibi tedavinin yoğunluğu ve süresi ile ilişkilidir. En sık görülen maligniteler lösemi ve mesane kanseridir. Uzun süreli CP kullananlarda ve agranülositoz gelişenlerde hematolojik malignite riski daha yüksek görünmektedir. Mesane kanseri, muhtemelen kronik mukozal inflamasyon ve akroleinin neden olduğu tahrişten kaynaklanmaktadır. 293 vaskülitli hastanın dahil edildiği retrospektif bir çalışmada, CP uygulanmasından 7-18 yıl sonra tanı konmuş lösemi ve mesane kanseri riski, 36 g ve üzeri dozlarda tedavi edilen hastalarda artış gösterirken 36 g ve altında kümülatif CP doz uygulananlarda artış göstermemiştir (Faurshou vd., 2008). CP ile tedavi edilen hastalarda olgu sunumu şeklinde lösemi vakaları ve solid tümörler bildirilmiştir, ancak sistematik çalışmalar yoktur. Otoimmün glomerüler hastalığı olanları malignitelere karşı daha

duyarlı hale getirmesi mümkündür. Nitekim tedavi edilmeyen minimal değişikliği olan hastalarda Non-Hodgkin lenfoma ve membranöz nefropatili hastalarda da gizli maligniteler sık görülebilmektedir. Uzun süreli sitotoksik tedavi bu riski daha da artırabilir (Ponticelli vd., 2018).

#### **2.1.5.6. Enfeksiyon**

*Pneumocystis jirovecii* pnömonisi (PJP) dahil yaygın ve fırsatçı enfeksiyonlar değişken oranlarda ortaya çıkabilir. CP ile tedavi edilen sistemik otoimmün hastalığı olanlarla yapılan retrospektif iki çalışmada, herpes zosterli ve hastanede tedavi edilmek zorunda kalan ciddi enfeksiyon gelişen hastaların oranı %9 ve %15 olarak bildirilmiştir (Martin, Lauwerys, Lefebvre vd., 1997; Cavallasca, Costa, Maliandi vd., 2015). Enfeksiyonların erken dönemde etkin tedavisi ve PJP profilaksisi önerilmektedir (Langford, 2011; Kronbichler, Jayne & Mayer, 2015; Clowse & Stone, 2015).

#### **2.1.5.7. Hemorajik sistit**

Hemorajik sistit daha çok oral uygulamayla ilişkilidir (Monach, Arnold & Merkel, 2010). Renal yoldan itrah edilen bir metabolit olan akrolein, sistit ve hematüri ile sonuçlanan ürotelyal tahrişe neden olmaktadır. Komplikasyonlar arasında fibrozis, telanjiektazi, kronik irritatif işeme semptomları, küçük mesane kapasitesi ve tekrarlayan hematüri mevcuttur (Lawson, Vasilaras, De Vries vd., 2008). 36 g ve üzeri CP kullanan hastalarda mesane kanseri riskinin 3,6 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Faurshou vd., 2008). CP ile tedavi edilen 1018 hastanın değerlendirildiği retrospektif bir çalışmada, hastaların %2'sinden daha azında hemorajik sistit (ortanca süre 10 ay) ve %0,19'unda mesane kanseri (ortalama 8 yıl) gelişmiştir (Yılmaz vd., 2015). Son yapılan başka bir çalışmada, 30 aydan daha uzun süre 100 g ve üzeri oral kümülatif doz CP uygulanan Wegener granülomatozisli hastalarda %12-41 oranında hemorajik sistit görülmüştür. Buna karşılık, CP ile tedavi edilen çeşitli otoimmün hastalığı olan 471 hastanın üçünde hemorajik sistit bildirilmiştir. Hemorojik sistit gelişen bu üç hasta 30 g ve üzeri kümülatif CP dozuna maruz kalmıştır (Monach, Arnold & Merkel, 2010).

Oral CP ile tedavi edilen pemfiguslu hastaların olduğu bir çalışmada hemorajik sistit görülme sıklığı %8 olarak saptanmıştır (Olszewska, Kolacinska-Strasz, Sulej vd., 2007). CP'ye bağlı hemorojik sistit gelişimini önlemek için mümkün olan en düşük olan CP dozlarının uygulanması dışında, gece boyunca mesanenin akroleine maruz kalmasını engellemek için gece uygulanmasından kaçınmak, hiperhidrasyon ile zorlu diürez ve akroleini inaktive etmek için eşzamanlı 2-merkaptotanslfonik asit (Mesna) uygulanması önerilmektedir (Clowse & Stone, 2015). Mesna, sadece bazı onkolojik çalışmalarda profilaktik etkinlik göstermiştir. Bu nedenle Amerikan Klinik Onkoloji Derneği, yalnızca yüksek CP dozlarında (rneğin 50 mg/kg veya 2 g/m<sup>2</sup>) kullanılmasını önermektedir (Monach vd., 2010).

#### **2.1.5.8. Oksidatif stres**

Akciğer ve mesane hasarı, CP kullanımıyla birlikte görülen yan etkilerdendir. Her iki hasar da inflamasyonla karakterizedir. Hasarın DNA hasarını indüklediği bilinen akroleinin sitotoksik etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Madondo, Quinn & Plebanski, 2016).

Fakat bununla birlikte akciğer hasarında, sitotoksiteyi gösteren DNA hasarıyla ilgili bir kanıt yoktur (Horton, Mamiya & Kehrer, 1997). Düşük dozlarda akrolein sitotoksitesini, homeostatik redoks dengesini sağlamak için hayati öneme sahip bir antioksidan olan GSH'nin azalmasından ve/veya tükenmesinden kaynaklanmaktadır. Akrolein ve GSH stabil bir konjugat oluşturarak sitozoldeki serbest GSH miktarını azaltır. Çin hamsteri over hücrelerinin *in vitro* alışmasında akrolein, öldürücü dozdan yaklaşık 10 kat daha düşük bir dozda uygulandığında dahi hücre içi GSH'nin tükenmesine neden olmuştur. Pocernich ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada akrolein eklenmesinin ardından, oksidatif stresin göstergesi olan protein karbonil seviyelerinde önemli bir artış olduğu görülmüştür (Pocernich vd., 2001). GSH'nin tüketilmesiyle akrolein; redox dengesizliğini tetiklemekte ve inflamatuvar süreçlerini kontrol eden nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve aktive edici protein-1 (AP-1) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu düzenlemektedir (Kehrer & Biswal, 2000).

NF-κB'nin akrolein tarafından düzenlenmesi doz bağımlı ve hücreye özgüdür. Akroleinin tümör hücrelerinde NF-κB'yi inhibe ettiği, ancak düşük doz uygulandığında makrofajlarda NF-κB'yi aktive ettiği ve bunun reaktif oksijen türlerinde bir yükselme ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Horton, Biswal, Corrigan, Bratta, Kehrer, 1999; Sun, Ito, Nishio, Tanaka, Chen, Isobe, 2014). ROS, sitoplazmada NF-κB transkripsiyon faktörünü sekanslayan bir protein olan inhibitör-κB'nin (I-κB) parçalanmasını kolaylaştırır (Ghosh & Karin, 2002; Di Donato, Hayakawa, Rothwarf, Zandi, Karin, 1997; Morgan & Liu, 2011). I-κB bir kez bölündüğünde, NF-κB, proinflamatuvar sitokin olan TNF-α ve IL-1β'nin transkripsiyonunu aktive ettiği çekirdeğe geçer. Proinflamatuvar sitokinler, lipid peroksidasyonuna ve nekrozla sonuçlanan protein oksidasyonuna neden olan ONOO<sup>-</sup> gibi daha reaktif oksijen türlerinin oluşumunu kolaylaştırır (Korkmaz, Topal & Oter, 2007).

Reaktif oksijen türleri normal hücre metabolizmasının yan ürünlerinden biridir. Metabolizma sırasında oluşan en bol ROS O<sub>2</sub><sup>-</sup>'dir. Daha da yıkıcı bir ajan olan OH<sup>-</sup>'ye dönüştürülebilir (Ghobadi vd., 2017). Hücreler, üretilen ROS'un dejenerasyonu için çeşitli mekanizmalar kullanır. Ana antioksidanlar, GSH, E ve C vitaminleri, antioksidan protein olan tioredoksin, glutaredoksin, metalotioninler (MT'ler) ve albümin gibi moleküller ve süperoksitdismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyonperoksidaz (GSH-Px) gibi enzimatik antioksidanlardan oluşmaktadır (Ma, 2013). ROS'un ortadan kaldırılmasında rol oynayan ilk enzimatik reaksiyon, SOD ile O<sub>2</sub><sup>-</sup>'nin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüşümdür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> daha sonra iki mekanizma ile uzaklaştırılır. Serbest radikal O<sub>2</sub><sup>-</sup>, bir başka yüksek reaktif radikal olan peroksinitrit oluşturmak için nitrik oksitle (NO) reaksiyona girebilir. GSH disülfür, kofaktör olarak NADPH'yi kullanan GSH redüktaz ile GSH'ye geri indirgenir (Ghobadi vd., 2017).

Siklofosfamid, SOD, CAT seviyelerini, vitamin E ve C'yi azaltarak hücreyi oksidatif hasara karşı hassaslaştırır (Abd EI Tawab, Shahin, AbdelMohsen, 2014; Selvakumar, Prahalathan, Mythili vd., 2005). Bu etkiler lipid peroksidasyonunu göstergesi olan malondialdehit düzeylerinin artmasıyla sonuçlanır (Türk, Sakin, Sönmez, Ateşşahin, 2010).

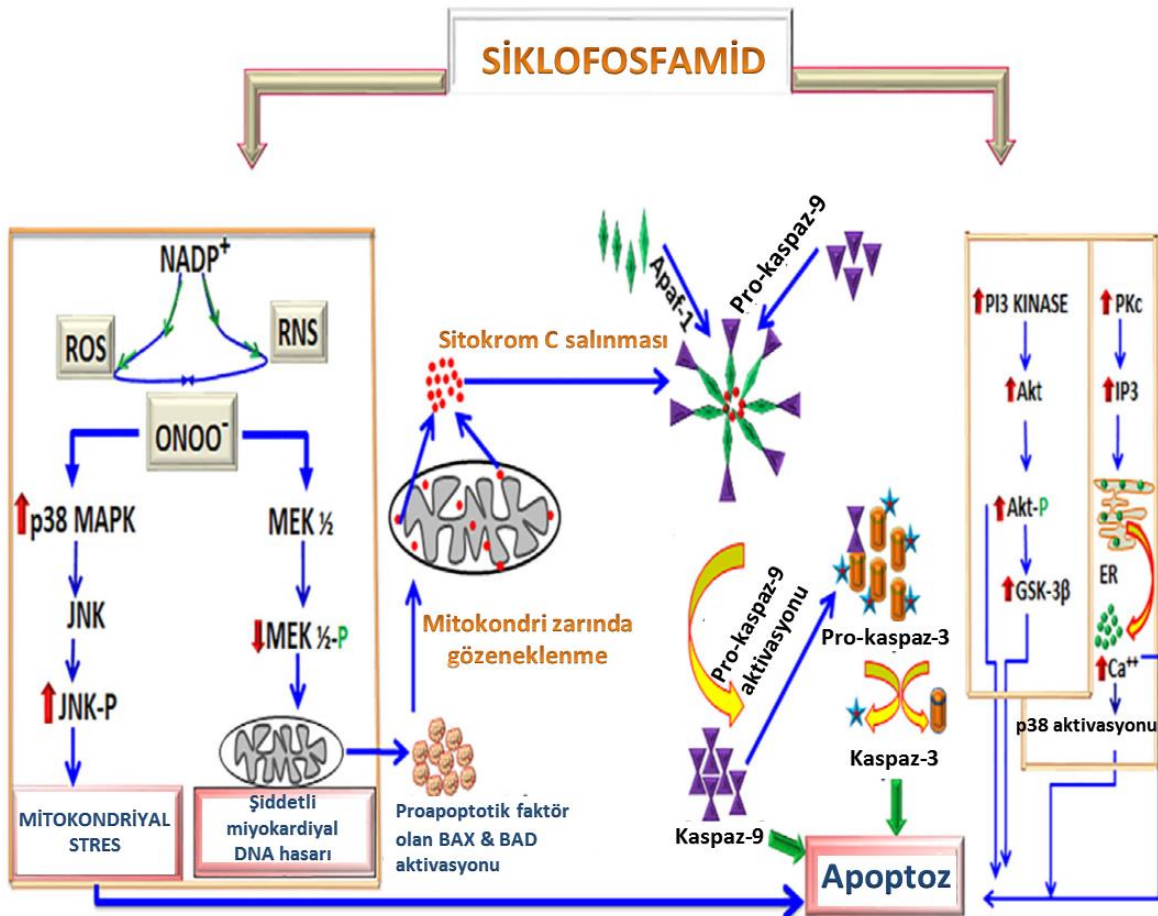
CP oksidatif stres altında hücre düzenlenmesi ve hayatta kalmasıyla ilgili antioksidanlar ve antiinflamatuvar ve detoksifikasyon proteinleri gibi çeşitli protein setlerinin önemli bir gen regülatörü olan Nrf2 seviyelerini düşürür (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015). CP'nin ana aktif metaboliti olan fosforamid hardalı, CP tarafından indüklenen oksidatif stresten kısmen sorumlu olabilir. CP metabolizması sırasında üretilebilecek bir madde olan azot hardalının oksidatif ve nitrozatif strese neden olduğu gösterilmiştir. Mekanizmalar, indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) indüklenmesini ve ardından NO ve peroksinitrit oluşumunu ve ayrıca GSH-Px aktivitesinin depresyonunu içerir (Ucar, Korkmaz & Reiter, 2007). CP'nin serumdaki NO konsantrasyonlarını arttırdığı gösterilen çalışmalarda mevcuttur (Motawi, Sadik & Refaat, 2010). Bahsedilen oksidatif stresten sorumlu olan diğer bileşen CP'nin sitokrom P450 enziminin izoenzimleri olan CYP3A4 ve CYP3A5 tarafından biyotransformasyonu ile oluşan metaboliti akroleindir (De Montellano, 2013). Akroleinin, muhtemelen GSH tükenmesi ve doğrudan radikal oluşumu ile lipid peroksidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Sertoli hücrelerinin akroleine maruz bırakılması, SOD, CAT ve GSH-Px'i önemli ölçüde azaltmıştır (James & Adams, 1993).

#### **2.1.5.9. Apoptoz**

Oksidatif stresin apoptoz kaskadını başlattığı genel bir fikirdir (Shaker, Abboud, Assad, Hadi, 2018). Miyokard infarktüsü, reperfüze kalp, diyabetik kardiyomiyopati ve sol ventrikül disfonksiyonu sıklıkla nekroz ile birlikte apoptoza yol açmaktadır (Xiao, Ke, Shi, Zeng, Cao, 2018; Ungvari, Gupte, Recchia, Bátkai, Pacher, 2005; Thandavarayan vd., 2009; Schiattarella vd., 2018). Deneysel veriler, ROS'un pro-apoptotik proteinleri aktive ettiğini ve voltaj kapılı anyon kanalları yoluyla sitokrom C'nin salınmasına neden olduğunu desteklemektedir. Sağlıklı ve normal bir hücrede, mitokondri, Bcl-2 gibi antiapoptotik genleri içerir. Bax veya BAD gibi mitokondriye göç eden proapoptotik proteinlerin bu genleri inhibe etmesi apoptoz ve kardiyotoksisiteye yol açabilir (Korsmeyer, Wei, Saito, Weiler, Oh, Schlesinger, 2000; Tanel & Averill-Bates, 2007). Pro-apoptotik proteinler ayrıca dış mitokondriyal zar da sitokrom C'nin mitokondri dışına göç



etmesine yol açan deliklere neden olur. Sitokrom C daha sonra ATP varlığında apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ile birleşir. Bu şekilde oluşturulan komplekse apoptozom denir (Green & Reed, 1998). Apoptozom prokaspaz-9 ile bağlanır ve kaspaz-9 formuna aktive eder. Bu aktif kaspaz-9 daha sonra kaspaz 3, 7 ve 12 diye takip eden kaspazın aktivasyonunu tetikler. Bu olay bir bütün olarak apoptozdan sorumludur (Şekil 2.5) (Li & Yuan, 2008). CP, murin modellerinde i.p. enjeksiyonla uygulandığında pro-apoptotik proteinlerde bir artışa ve anti-apoptotik proteinlerde azalmaya neden olmuştur (Asiri, 2010). CP kaynaklı apoptoz ve kalp hasarında rol oynayan sinyal iletim yolları PI3K/Akt/mTOR/p70S6K /4EBP1/NF-κB yolu, NF-κB/Nrf2-HO yolu, Akt/GSK3-β yolu, ERK1/2, p38 MAPK, JNK yolu ve TLR4/NF-κB yoludur. (Song vd., 2016; Fatani vd., 2010; Asiri, 2010; Park vd., 2014; El-Agamy, Elkablawy, Abo-Haded, 2017).



Şekil 2.5. Siklofosfamidin proapoptotik rolünün şematize görünümü (Iqubala vd., 2019)

#### **2.1.5.10. Testis hasarı**

Akciğer ve mesane hasarı dışında testis hasarı da CP kullanımı ile ortaya çıkan yan etkilerdendir. CP'nin hızla çoğalan tüm dokuları etkileme yeteneği, terapötik ve toksik etkilerinin esasını oluşturur. Üreme sistemi, hızla bölünen hücrelerin varlığı nedeniyle bu ilaca karşı oldukça hassastır (Aguilar-Mahecha, Hales, Robaire, 2001). Testis, ROS üreten sistemlerin (ksantinoksidaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz ve mitokondriyal elektron taşıma zinciri) bolluğundan ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) yüksek konsantrasyonundan dolayı oksidatif hasara karşı oldukça hassastır (Vernet, Aitken, Drevet, 2004; Aitken & Roman, 2008). Oksidatif stres testis disfonksiyonunun arkasındaki en önemli nedenlerden birisi olarak düşünülmektedir. Bu nedenle antioksidan sistem testis dokusunu oksidatif stresten korumada önemli bir rol oynamaktadır (Badade & Samant, 2011).

Siklofosfamid ile tedavi edilen erkek deneklerde oligospermi ve azospermi ile birlikte testis ve epididimde biyokimyasal ve histolojik değişikliklerin geliştiği bildirilmiştir (Trasler, Hales, Robaire, 1987; Trasler, Hermo, Robaire, 1988; Trasler & Robaire, 1988). CP tedavisi alan erkek hastalarda, gonadotropin salgılanmasında bozulma ve testis hasarına bağlı olarak düşük kan testosteron seviyeleri tespit edilmiştir (Hoorweg-Nijman vd., 1992). CP'nin yetişkin erkek sıçanlara kronik uygulanması testislerin ağırlığını ve serum testosteron seviyelerini azaltmakta ve kısırlığa yol açabilmektedir.

Testislerde CP toksisitesinde yer alan kesin mekanizmalar tam olarak anlaşılmamakla beraber çok sayıda çalışma CP'ye maruz kaldıktan sonra biyokimyasal ve genomik bozuklukları göstermiştir. CP metaboliti akrolein, lipid peroksidasyonunu artırmaktadır (Kehrer & Biswal, 2000; Roy, Palapati, Bettaieb vd., 2009; Adams & Klaidman, 1993). Ayrıca hücrede yapı anomalilerine neden olmakta ve sertoli hücrelerinin canlılığını azaltmaktadır (Vernet vd., 2004). PUFA'nın spermatozoada bol olması ve bu hücrelerin antioksidan içeriğinin düşük olması nedeniyle, oksidatif stresin ardından lipidlerin peroksidasyonunun ortaya çıkması daha olasıdır (Abd EI Tawab,

Shahin, AbdelMohsen, 2014). Kemoterapötik ajanların neden olduğu kısırlığın yaşam kalitesi üzerinde büyük etkisi vardır. Bu nedenle kemoterapi sırasında ve sonrasında germ hücrelerinin korunmasına özel dikkat gösterilmesi gerekmektedir (Connolly, Edelman, Cooke vd., 1992). Bazı çalışmalar hormonal tedavilerin erkek denekleri CP kaynaklı sperm hasarına karşı koruyabileceğini göstermiştir, ancak sonuçlar yetersizdir (Meistrich & Shetty, 2008).

Sentetik ve doğal olarak oluşan antioksidanların, spermlerin CP kaynaklı toksisiteden korunmasında etkili olabileceğini gösteren çok sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak, CP ile tedavi edilen denekler, testis ağırlığında ve üreme toksisitesinin kilit göstergeleri olan histopatolojik anormalliklerde önemli bir azalma göstermektedir (Ghobadi vd., 2017). Testis ağırlığındaki azalma, spermatojenik hücrelerde ve üreme özelliklerinde bir bozulmaya işaret etmektedir (Elangovan, Chiou, Tzeng vd., 2006). Bu azalmanın, spermatojenezin bozulmasına yol açan testosteron ve gonadotropin sekresyonunun bozulmasına bağlı olabileceği öne sürülmektedir (Hoorweg-Nijman vd., 1992; Abd El Tawab vd., 2014; Jana, Jana & Samanta, 2006).

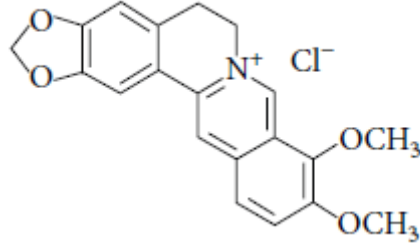
## 2.2. Berberin

Berberin, Ayurveda ve Çin tıbbında kanıtlanmış bir tıbbi geçmişi olan bazık olmayan, bitkisel bir kuaterner benzilzokinolin alkaloididir. Berberin, *Hydrastis Canadensis* (şekil 2.6), *Coptis Chinensis*, *Berberis Aquifolium*, *Berberis Vulgaris* ve hint türleri *Berberis Aristata* (Ağaç zerdeçal, fam. Berberidaceae) gibi tıbbi açıdan önemli birçok bitkinin kökü, rizomu ve kabuğunda aktif bir bileşen olarak bulunur. Himalaya bölgesinde ve güney Hindistan'da Nilgiri tepelerinde geniş bir dağılım gösteren 2000 ila 3000 m yükseklikte yetişen 3 m kadar boya ulaşan bir çalıktır (Komal, Ranjan, Neelam, Birendra, Kumar, 2011). Aktif bileşenleri berberin, berbamin ve palmatindir (Singh & Kakkar, 2009). Bununla birlikte, berberin (şekil 2.7) günümüzde kimyasal sentez ile de üretilmektedir. Berberinin klorür veya sülfat tuzu genellikle klinik amaçlar için kullanılmaktadır.



Şekil 2.6. *Hydrastis canadensis* bitkisi\*

\*[http://roanegrown.com/product\\_info.php/hydrastis-canadensis-p-716](http://roanegrown.com/product_info.php/hydrastis-canadensis-p-716)



**Şekil 2.7.** Berberinin kimyasal yapısı

Karakteristik bir alkaloidal acı tada sahip kokusuz, yoğun sarı bir tozdur. Suda ve etanolde çok az çözünür, metanolde ise az miktarda çözünür; ancak tuz formları diğer formlarına nispeten daha fazla çözünürdür (Battu vd., 2010). Doğal ürünler, genelde minimum yan etkiye sahip güçlü ajanlar olarak kabul edildiği için yıllar içerisinde alternatif ilaçların kaynağı olarak dikkat çekmeye başlamıştır.

Berberin, güçlü antimikrobiyal, antiprotozoal, antidiyareik etkisinden dolayı Ayurveda ve Çin tıbbı içerisinde en az 3000 yıllık bir kullanım geçmişine sahiptir (Birdsall & Kelly, 1997). Bununla birlikte, yıllar boyunca yapılan klinik araştırmalar berberinin geniş bir farmakolojik etki yelpazesine sahip olduğunu göstermiştir. Birçok çalışmada belirgin antihipertansif, antiaritmik, antihiperглиsemik, antikanser, antidepresan, anksiyolitik, nöroprotektif, antioksidan, anti-inflamatuar, analjezik, hipolipidemik aktivitesinin bulunduğu öne sürülmüştür (Battu vd., 2010; Bhutada vd., 2010; Kulkarni & Dhir, 2010).

Ayrıca berberinin nefroprotektif (Domitrovic vd, 2013), hepatoprotektif (Li vd., 2014a; Othman vd., 2014), kardiyoprotektif (Li vd., 2014b) ve serebroprotektif (Kulkarni & Dhir, 2010) etki potansiyeli çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

### **2.2.1. Farmakokinetik**

Berberin ve metabolitlerinin farmakokinetik profili, insanlar ve sıçanlar üzerinde oldukça kapsamlı şekilde çalışılmıştır (Baouxin vd., 1995; Kulkarni & Dhir, 2010; Zuo vd., 2006). Tek doz oral 300 mg berberin ile sağlıklı erkek insan gönüllülerde bazı farmakokinetik parametreler çalışılmış ve yarılanma

ömürleri  $t_{1/2}$  ( $k_a$ )  $0,87 \pm 0,03$  saat;  $t_{1/2}$  ( $k_e$ )  $2,94 \pm 0,14$  saat; maksimum konsantrasyonu ( $C_{maks}$ )  $394,7 \pm 155,4$   $\mu\text{g/L}$  ve eğri altında kalan alan (EAA)  $2799,0 \pm 1128,5$   $\mu\text{g/L/saat}$  olarak bildirilmiştir (Baoxin vd., 1995).

### **2.2.1.1. Emilim**

Berberinin dezavantajlarından biri, suda çözünürlüğü ve dissolüsyonunun zayıf olmasına bağlı olarak oral biyoyararlanımının düşük olmasıdır (Zhang vd., 2013). Berberin klorürün suda ve pH'a bağlı çözünürlüğü sıcaklıkla orantılıdır ve sıcaklık artınca artmaktadır (Battu vd., 2010). İlacın  $25^\circ\text{C}$  ve  $37^\circ\text{C}$ 'de suda çözünürlüğünün sırasıyla  $5,27 \pm 0,29$  ve  $8,50 \pm 0,40$  mM olduğu ve ilacın maksimum çözünürlüğünün fosfat tamponlu  $\text{pH}=7.0$ 'da  $25^\circ\text{C}$  ve  $37^\circ\text{C}$  de sırasıyla  $4,05 \pm 0,09$  ve  $9,69 \pm 0,37$  mM olduğu gözlenmiştir.

Bunun yanı sıra önceki çalışmalarda berberinin, klinikteki kullanımını sınırlayacak şekilde çoklu ilaç dışa-atım pompası (P-glikoprotein [P-gp]) için bir substrat görevi gördüğü gösterilmiştir (Maeng vd., 2002; Zhang vd., 2013). Verapamil, daunomisin ve rodamın gibi iyi bilinen P-gp substratları berberinin dışa-atılımını inhibe eder, bu da P-gp'nin berberinin taşıyıcı aracılı taşınmasında rol oynadığını göstermektedir. Bu nedenle, berberinin biyoyararlanımını arttırmayı amaçlayan çeşitli formülasyonlar geliştirilmiştir. Oral berberin yüklü bir mikro emülsiyonun, tablet süspansiyonlarından 6,47 kat daha fazla biyoyararlanıma sahip olduğu bildirilmiştir (Gui vd., 2008). Yağda su emülsiyonlarının liyofilizasyonu yoluyla hazırlanan anhidroz bir berberin misel sisteminde, daha iyi bir biyoyararlanım ve anti-diyabetik etkinlik gösterilmiştir (Wang vd., 2011).

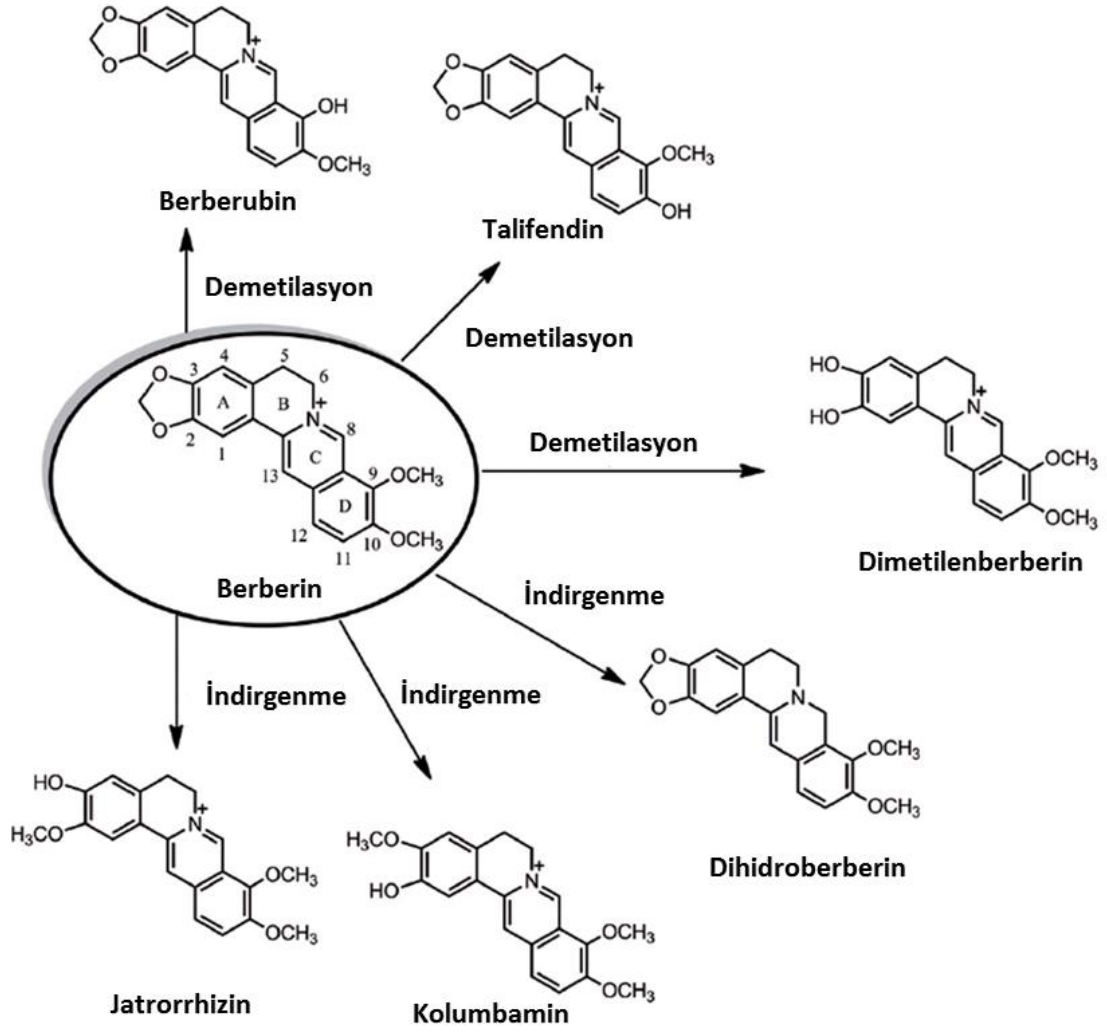
### **2.2.1.2. Dağılım**

Her ne kadar berberin kanda çok düşük bir seviyede mevcut olsa da (Hua vd., 2007) ve biyoyararlanımı %1'den düşük olarak bildirilmiş olsa da (Kheir vd., 2010; Liu vd., 2010) berberinin farmakolojik etkisi yüksek doku dağılımı ile bağıntılı olabilir. Daha önce, berberinin, i.v. uygulamadan sonra kan-beyin bariyerine (KBB) kolayca nüfuz edebildiği ve hipokampus bölgesinde hızlı bir birikimle birlikte ardından yavaşça ortamdan uzaklaştırıldığı bildirilmiştir (Wang vd., 2005). Ayrıca, berberin ve biyoaktif metabolitlerinin, oral

uygulamadan sonra kandaki konsantrasyonuna kıyasla organlardaki konsantrasyonunun daha yüksek olduğu bulunmuştur. Berberinin organlara dağılımı hızlı ve karaciğerde maksimum dağılım söz konusudur, bunu takiben böbrekler, kas, akciğerler, beyin, kalp, pankreas gelmektedir ve en az dağılım ise 48 saat boyunca nispeten sabit kaldığı yer olan yağ dokudur (Tan vd., 2013).

### **2.2.1.3. Metabolizma**

Berberin hem sıçanlarda hem de insanlarda karaciğerde metabolize edilir ve faz I de demetilasyona tabi tutulduktan sonra faz II metabolitlerini oluşturmak için glukuronik asit veya sulfirik asit ile konjuge edilir (Qiu vd., 2008). Oluşan sülfat veya glukuronid metabolitleri polar yapıdadır ve kolayca atılır. Berberin klorürün üç gün boyunca günde 0,9 g'lık bir dozda oral olarak verilmesiyle sağlıklı erkeklerin idrar numunelerinde üç sülfat metaboliti olan Jatrorrhizin-3-sülfat, talifendin-10-sülfat ve dimetilenberberin-2-sülfat saptanmıştır ki bunlardan sonuncusu majör metabolittir. Erkek sıçanların (100mg/kg, oral) 48 saat içerisinde toplanan ve insanların (300mg, oral) 0-72 saat arasında toplanan idrar numunelerinde altı yeni metabolit daha tanımlanmıştır. Bunlar jatrorrhizin-3-O-β-D-glukuronid; talifendin-10-O-β-D-glukuronid; berberubin-9-O-β-D-glukuronid; 3, 10-dimetilpalmatin-10-O-sülfat; kolumbamin-2-O-gl-D-glukuronid ve dimetilen berberin-2, 3-di-O-β-D-glukuroniddir (Qiu vd., 2008; şekil 2.8).



**Şekil 2.8.** Berberinin faz I metabolitleri (Wang, Feng, Chai, Cao & Qiu, 2017)

Erkek Sprague-Dawley sıçanlarla yapılan bir başka farmakokinetik çalışmada, talifendin, berberubin, dimetilenberberin, jatrorrhizin, palmatin, kolumbamin, 3,9-dimetil-palmatin, hidroksile berberin ve hidroksile edilmiş dimetilenberberin dahil olmak üzere faz I metabolitleri safra, idrar ve dışkıda tespit edilmiştir. Faz II metabolitleri ise glukuronik asitle konjüge olan talifendin, berberubin, jatrorrhizin ve dimetilenberberin metabolitleri; sülfatla konjüge edilmiş berberubin, talifendin ve diglukuronid ile konjüge edilmiş dimetilenberberindir (Ma vd., 2013b). Prelinik çalışmalarda metabolitlerin oral uygulama sonrasındaki berberinin *in-vivo* aktif formları olabileceği öne sürülmüştür (Cao vd., 2013; Zhou vd., 2014).



#### **2.2.1.4. Eliminasyon**

Sıçanlarda 200 mg/kg dozunda berberinin oral yoldan uygulandığı bir çalışmada berberin ve metabolitlerinin safra, idrar ve dışkı yoluyla atıldığı gözlenmiştir. Toplam berberin geri kazanım oranı %22,83 (prototipin %19,07'si ve metabolitinin %3,76'sı) ile  $9,2 \times 10^{-6}\%$  olarak safrada (24 saat), %0,0939 olarak idrarda (48 saat) ve %22,74 olarak dışkıda (48 saat) gerçekleşmiştir. Berberinin (%84) ve metabolitlerinin büyük bir bölümü dışkı ile atıldığı gözlenmiştir. Berberinin yaklaşık %83'ü safradan talifendin olarak atılmıştır. İdrarla atılan kısmının %78'inde de talifendin ve berberubin görülmüştür (Ma vd., 2013b).

#### **2.2.2. Farmakodinami**

Berberin, antioksidan etkiden nöro-transmitterlerin, enzimlerin, moleküler hedeflerin ve immünomodülasyonun etkilenmesine kadar değişen çok geniş spektrumlu bir farmakolojik etki profiline sahiptir.

Bazı çalışmalarda berberin uygulamasından (10-40 mg/kg) sonra Akt/GSK yolunun aktivasyonu ile KBB geçirgenliğinin arttığını ve KBB'nin endotel hücrelerinde bulunan sıkı bağlantıların bir bileşeni olan klauudin-5'in ekspresyonunda artış olduğu bildirilmiştir. Bu da berberinin nöroprotektif rolünü ve beyin iskemisinde kullanımını desteklemektedir (Zhang vd.,2012). Ayrıca, apoptozun baskılanmasına neden olan hipokampal CA1 nöronlarındaki potasyum kanallarını bloke ederek nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (Wang vd., 2004).

#### **2.2.3. Berberinin temel etkileri**

##### **2.2.3.1. Oksidatif stres belirteçlerinin modülasyonu**

Çeşitli klinik çalışmalar diyabetten, hiperkolesterolemiye, Alzheimer ve serebral iskemiyeye kadar değişen çeşitli hastalıklarda berberinin antioksidan etkisini en iyi şekilde ortaya koymuştur. Berberinin serbest radikal temizleme özelliği, DPPH (2,2-difenil 1-pikrilhidrazil), ABTS (2,2-azino bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)), nitrik oksit, süperoksit, vb. gibi bazı serbest radikallerin konsantrasyona bağlı bir şekilde temizlenmesi kabiliyeti ile

doğrulanmıştır (Shirwaikar, Rajendran, Punitha, 2006). SHSY5Y insan nöroblastoma hücrelerini kullanan *in vitro* çalışmalar, berberinin sitokrom-C salıverilmesini azaltarak yüksek glukoza bağlı reaktif oksijen türevlerinin üretimini azalttığını ve anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonu artırdığını göstermektedir ki bunlar apoptoz ve oksidatif hasarın önemli belirteçleridir. Ayrıca berberinin insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ekspresyonunu ve PI3k/Akt fosforilasyonunu azaltmış, Nrf2 ekspresyonunu arttırmıştır. Bu nedenle berberinin Nrf2'ye bağlı nörit büyümesini arttırdığı ve reaktif oksijen türlerinin üretimini önlediği gösterilmiştir (Hsu, Tseng, Lo, 2013). Serebral iskemi sıçan modelinde berberinin (5, 10 ve 20 mg/kg oral, 19 gün) uygulanmasından sonra, mitokondriyal kompleks (Kompleks I, II ve IV) aktivitesini iyileştirdiği de gözlenmiştir (Singh & Chopra, 2013). Berberinin (50 ve 100 mg/kg/gün, oral, 8 hafta) antioksidan etkisi, sıçanlarda STZ-diyabet modelinde oksidatif hasar sonucunda meydana gelen astrogliosisin önemli bir göstergesi olan Glial fibriller asidik protein (GFAP) artışının baskılanmasına yönelik etkisinin incelenmesiyle kanıtlanmıştır (Middeldorp & Hol, 2011; Moghaddam vd., 2014). Endojen antioksidanlar, GSH-Px ve SOD enzimi üzerine yapılan araştırmalar berberinin hem SOD hem de GSH-Px seviyelerini düzelttiğini, böylece STZ-diyabet modelinde ve siklofosfamide bağlı hepatotoksisitede (50 mg/kg, oral, 11gün) lipid peroksidasyon seviyelerini azalttığını göstermiştir (Lao-ong, Chatuphonprasert, Nemoto, Jarukamjorn, 2012; Germoush & Mahmoud, 2014). Berberinin antioksidan etkisi hepatoprotektif özelliğinden de sorumludur. Her ne kadar altta yatan mekanizmalar açıkça anlaşılmamış olsa da berberinin, hepatik hücre dizisinde apoptozla ilişkili bir protein olan sirtuin1 (SIRT1) seviyelerinin düzenlenmesi ile ilişkili olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı apoptoza karşı koruyucu bir etkisi olduğu gözlenmiştir (Zhu vd., 2013). Ayrıca, STZ diyabet modelinde sıçanların karaciğer dokularında, siklin-bağımlı kinaz 9, siklinT1 mRNA ve protein ekspresyonu seviyelerinin yükselmesinin yanı sıra CAT, SOD ve GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin seviyesinin de artmasına yol açtığı bildirilmiştir ki bu da berberinin antioksidan rolünü desteklemektedir (Zhou & Zhou, 2010).

Oral yoldan 2 gün boyunca (1, 2 ve 3 mg/kg dozunda) berberin uygulamasının ayrıca sisplatine bağı fare nefrotoksisite modelinde de oksidatif/nitrozatif stresi hafifleterek nefroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (Domitrovic vd., 2013).

Nrf2 ekspresyonunun artırılması ve iNOS'un baskılanması, berberinin (200 mg/kg/gün, i.p., 14 gün) sıçanlarda bleomisin kaynaklı akciğer hasarı ve fibrozise karşı antioksidan etkisine katkıda bulunur (Chitra, Saiprasad, Manikandan, Sudhandiran, 2013). Aterosklerotik renovasküler hastalığı bulunan sıçanlarda berberin tedavisinden sonra (150 mg/kg/gün, oral, 12 hafta) renal iNOS ekspresyonunda azalma ve SOD seviyelerinde düzelmeye olduğu bildirilmiştir (Wan vd., 2013). Berberinin anti-kanser etkisinde lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi engelleyici özelliği, fare deri karsinogenezi modelinde karsinom oluşumunun tamamen önlenmesi ile kanıtlanmıştır (Manoharan, Muneeswaran, Baskaran, 2010). Sıçanlarda alüminyum triklorürün neden olduğu kronik beyin hasarına karşı berberinin nöroprotektif etkisinin arkasında ise nöronal SOD seviyelerinin düzeltilmesi ve malondialdehit (MDA) içeriğinin azalması olduğu öne sürülmüştür (Zhang vd., 2009). Anti-diyabetik etkisi bile, alloksan kaynaklı diyabetik sıçanlarda serum MDA düzeyini düşürme ve SOD ve GSH-px seviyelerini artırma kabiliyetine bağlanabilir (Tang, Wei, Chen, Liu, 2006). Yukarıda belirtilen çalışmaların tümü, serbest radikalleri temizleme kabiliyetinden dolayı berberini güçlü bir antioksidan molekül sınıfına sokmaktadır.

### **2.2.3.2. Anti-inflamatuar etki**

Berberinin anti-inflamatuar aktivitesi hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda ve akut faz proteinlerinin yanı sıra proinflamatuar sitokinlerin azalması tablo 2.1'deki şekliyle de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** \* Sıçanlarda berberinin inflamasyon ve sitokinler üzerine etkileri

Hücre Tipi, Hayvan Modeli	BBR Uygulaması	İncelenen Örnek	BBR'nin Etkisi
3T3-L1 adipositler	18 saat/10µM	3T3-L1 adipositler	↓:TNF-α, IL-6,CRP, mRNAs
HepG2 hücreleri İnsülin dirençli-palmitat uygulanmış	24 saat/0.1-10µM	Kültür	↓:TNF-α,IL-6
KM fareleri, HFD ile beslenmiş obez ve insülin dirençli	2 hafta oral yol 50-150mg/kg/gün	Serum	↓:TNF-α,IL-6
NOD fareleri	2 hafta oral yol 200mg/kg/gün	Splensitlerin Supernatanları,	↓:TNF-α,IL-6, ↓:IL-17IFNγ,
NOD fareleri	14 hafta 50,150,500mg/kg/gün	Karaciğer ve Böbrek	↑:IL-10/ TNF-α ve IL-10/IL-6
Tek doz 50mg/kg Stz -Wistar sıçan	7 hafta 100mg/g/gün oral	Serum	↓:CRP

\*(Choi vd., 2006; Lou vd., 2011; Shang vd., 2010; Chen vd., 2011; Cui vd., 2009; Chueh& Lin 2012)

Çeşitli hücrelerin kültürlerinde berberin tedavisi TNF-α, IL-6, IL-1β, matrixmetaloproteaz 9 (MMP9), siklooksijenaz-2 üretimini (COX-2), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (İNOS), monositikkemoatraktan protein1 (MCP1) ve C-reaktif proteini (CRP) ve haptoglobini (HP) azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Choi vd., 2006; Lou vd., 2011; Jeong vd., 2009; Lin & Lin, 2011; Wang, 2013). İnsüline dirençli HepG2 hücrelerinde (Lou vd., 2011), berberinin anti-inflamatuar aktivitesi insülin duyarlılaştırıcı etkisi ile ilişkili bulunmuştur. Berberin uygulaması sitokin üretimini önemli ölçüde düşürmüştür ve serin fosforilasyonunu azaltmıştır, ancak palmitat ile tedavi edilen HepG2 hücrelerinde insülin aracılı IRS'nin tirozin fosforilasyonunu artırmıştır (Lou vd., 2011).

Ayrıca diyabetik hayvan modellerinde, berberinin anti-inflamatuar aktivitesi serum, karaciğer, yağ dokusu ve böbrek gibi farklı dokularda

gözlenmiş ve insülin direnci veya diabetes mellitusa karşı etkisi ile ilişkilendirilmiştir (Xie, Chang, Chen vd., 2013; Jeong vd., 2009; Shang vd., 2010; Chen vd., 2011; Xing vd., 2011).

Özellikle, berberinin NOD farelerinde inflamasyonu inhibe ettiği ve tip 1 diabetes mellitus gelişimini hafiflettiği kanıtlanmıştır. Bu hayvan modelinde berberin, TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$  ve IL-17 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltmıştır. Ayrıca, berberin, IL-10/IL-1 $\beta$ , IL-10/IL-6 ve IL-10/TNF- $\alpha$  gibi anti-inflamatuar/pro-inflamatuar sitokin oranlarını arttırabilir. Berberinin anti-inflamatuar aktivitesi, NOD farelerinin splenositlerinde, böbreklerinde ve karaciğerinde gözlenmiştir (Cui vd., 2009; Chueh & Lin, 2012).

Hücre kültürü ve diyabetik hayvan modellerinden elde edilen verilerin yanı sıra, klinikte de berberinin anti-inflamatuar etkisi gösterilmiştir (Zhang vd., 2008). Üç ay boyunca 1 g/gün dozda berberin tedavisi, tip 2 diyabetli hastalarda serum IL-6 düzeyini anlamlı derecede azaltmıştır (Zhang vd., 2008).

Berberin, anti-inflamatuar etkisini kompleks mekanizmalar aracılığıyla meydana getirir. Berberinin kısmen antioksidan yollarla ortak olan anti-inflamatuar etkisinin hücresel yolları şekil 2.9'da özetlenmiştir.

Antioksidan aktiviteye ek olarak, adenosin monofosfat-aktifleştirilmiş protein kinaz (AMPK) yolu da berberinin anti-inflamatuar etkinliği için çok önemlidir. AMPK'nin bloke edilmesi, berberinin makrofajlarda iNOS ve COX2 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırabilir (Mo vd., 2013; Jeong vd., 2009; şekil2.9). Hücrelerdeki aşırı iNOS, gereğinden fazla nitrik oksit üretimine neden olabilir ve insülin direncinin gelişimi ile yakından ilişkili olabilir (Perreault & Marette, 2001). COX2, diabetes mellitus ve diyabetik nefropatinin patogenezi için önemli araçlar olan prostaglandinlerin sentezi için anahtar bir enzimdir (Mima, 2013; DuBois vd., 1998).

Berberinin anti-inflamatuar aktivitesinin inflamatuvar uyaranlarla aktive edilen mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolları üzerindeki

inhibe edici etkisi ile de ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Berberinin MAPK'ler üzerindeki inhibitör etkisi, makrofajlardaki AMPK aktivasyonuna bağlıdır. Berberinin MAPK sinyali üzerindeki düzenleyici etkisine ilişkin çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Bazı çalışmalar berberinin MAPK'leri inhibe ederek inflamasyonu baskıladığını öne sürse de diğerleri P38'in berberin tarafından aktive edildiğini göstermiştir ki bu da berberinin oksidatif stres ve inflamasyona karşı etkinliği açısından önemlidir (Jeong vd., 2009; Wang, 2013; Wang vd.,2012; Jia vd., 2012; Bae vd., 2013; Lee vd.,2013).

Önceki çalışmalarda, berberinin bazal P38 aktivitesine sahip uyarılmamış hücrelerde P38 fosforilasyonunu arttırabileceği görülmüştür, ancak MAPK'leri aktive edebilen lipopolisakkarit, serbest yağ asitleri ve TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar uyarıcılar uygulanmış hücrelerde MAPK fosforilasyonunu azalttığı görülmüştür (Jeong vd., 2009; Wang, 2013; Wang vd.,2012; Jia vd., 2012).

Antioksidan aktivitenin yanı sıra, Nrf2'nin transkripsiyon faktörü de berberinin anti-inflamatuvar aktivitesinde önemli bir rol oynamaktadır. Nrf2'nin bloke edilmesinin berberinin makrofajlardaki proinflamatuvar sitokinlerin üretimindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırdığı görülmüştür. Berberin tedavisi, AMPK ve P38'in aktivasyonunu uyarabilir ki bu da Nrf2'nin nükleer translokasyonuna ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibisyonuna neden olur (Mo vd., 2013, Lee vd., 2013).

Ekspresyonu Nrf2 ile sağlanan antioksidan bir enzim olan HO-1 de berberin tarafından uyarılabilir. Antioksidan aktivitenin yanı sıra, HO-1 ayrıca berberinin anti-inflamatuvar aktivitesinde de rol almaktadır, çünkü HO-1'in bloke edilmesi berberinin proinflamatuvar sitokinlerin üretimi üzerindeki inhibe edici etkisini azaltabilir (Mo vd., 2013; Hsu vd., 2012; Hsu vd., 2013; Bae vd., 2013; Lee vd., 2013). Son çalışmalar, HO-1'in insülin direnci, diabetes mellitus, oksidatif stres ve inflamasyona karşı faydalı etkileri olan çok önemli bir molekül olduğunu kanıtlamıştır (Ndisang, 1997).

NF-kB yolağı inflamasyonu kontrol etmede önemli bir rol oynar ve şekil 2.9'da da gösterildiği gibi berberinin anti-inflamatuvar aktivitesi gibi için de

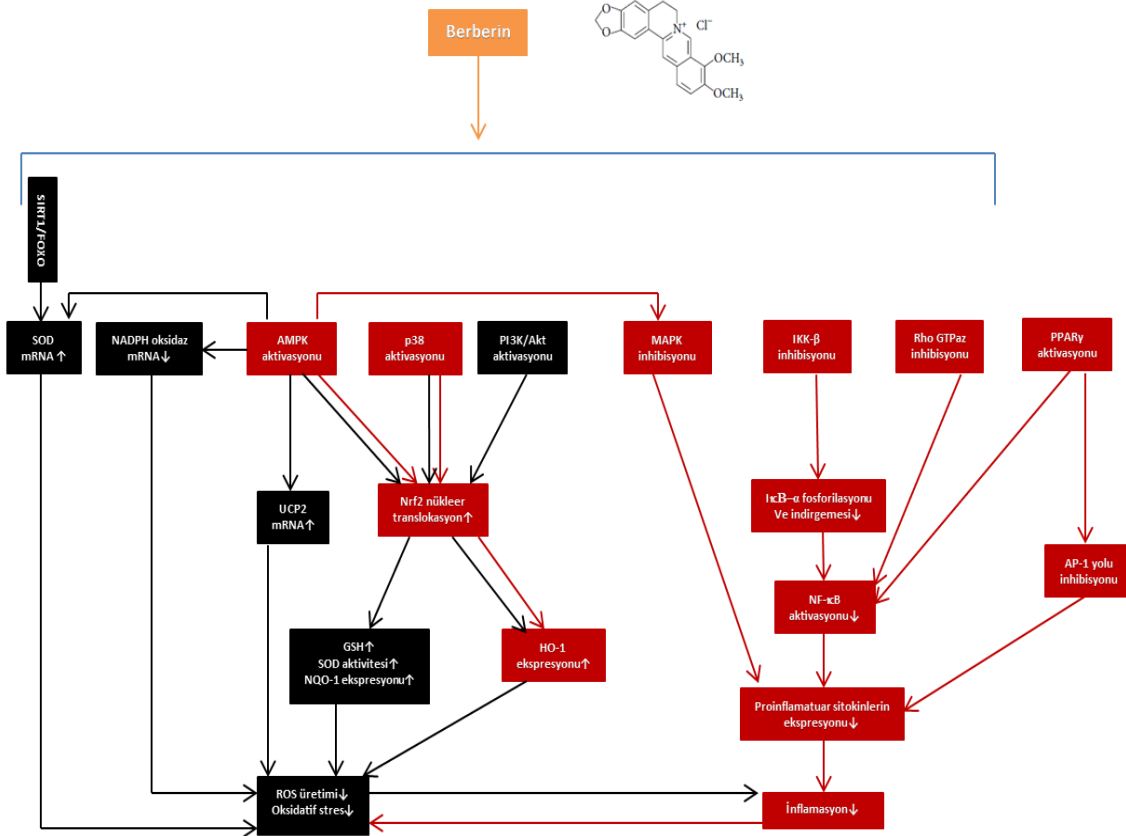
kritik bir hedefdir (Gratas-Delamarche vd., 2014). NF- $\kappa$ B sinyal yolağında, I $\kappa$ Bkinaz $\beta$  (IKK- $\beta$ ), TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar uyarılarla aktive edilebilir (Goldin, 2006; Gratas-Delamarche, 2014). IKK- $\beta$  aktivasyonu, 181(ser<sup>181</sup>) konumundaki serin kalıntısının fosforilasyonunu gerektirmektedir (Mercurio vd., 1997; Karin, 1999). Ek olarak, berberinin IKK- $\beta$  üzerindeki inhibitör etkisi, IKK- $\beta$ 'nin 179 pozisyonunda bir sistein kalıntısı da gerektirmektedir (Pandey vd., 2008).

İnhibitör  $\kappa$ B- $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ ), IKK $\beta$  ile fosforile edilip sonra da yıkıldığında (Mercurio vd., 1997; Karin, 1999) IKK- $\beta$ 'nin berberin tarafından inhibe edilmesi I $\kappa$ B- $\alpha$ 'nın dengelenmesine neden olur ki bu da NF- $\kappa$ B'nin nükleer translokasyonunu bloke eder (Wang, 2013; Yi vd., 2008; Jia vd., 2012; Lee vd., 2007; Jiang vd., 2011; Wan vd., 2013). Bir transkripsiyon faktörü olarak NF-  $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS ve COX2 gibi çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırır (Goldin vd., 2006; Gratas-Delamarche vd., 2014).

Yakın geçmişte yapılan bir çalışmada, berberin diyabetik sıçanlarda RhoGTPaz sinyal yolağını inhibe ederek böbrek inflamasyonunu azaltmıştır (Xie, Chang, Chen vd., 2013). RhoGTPaz, çoklu biyolojik fonksiyonları olan küçük GTP bağlayıcı proteinlerin üst ailesinin bir üyesidir ve diyabetik sıçanlarda NF- $\kappa$ B sinyal yolunu pozitif olarak düzenlediği kanıtlanmıştır (Xie, Peng, Chang vd., 2013; Shi & Wei, 2013). Bu nedenle klasik NF- $\kappa$ B sinyal yolağının düzenlenmesine ek olarak, berberin, RhoGTPaz'ı baskılayarak da NF- $\kappa$ B 'yi inhibe edebilir (Xie, Chang, Chen vd., 2013; Xie, Peng, Chang vd., 2013). Berberinin RhoGTPaz üzerindeki inhibitör etkisi, antioksidan aktivitesine de dayanmaktadır (Xie, Chang, Chen vd., 2013).

NF- $\kappa$ B'ye ek olarak, transkripsiyon faktörü AP-1 de berberinin anti-inflamatuvar aktivitesinde rol oynamaktadır (Remppis, Bea, Greten, 2010; Kuo, Chi & Liu, 2004). NF- $\kappa$ B gibi, AP-1 de inflamasyon gelişimi için önemlidir (Schonthaler, Guinea-Viniegra & Wagner, 2011). Berberinin makrofajlara ve epitel hücrelere uygulanması, AP-1'in DNA bağlama aktivitesini büyük ölçüde zayıflatmış ve MCP-1 ve COX2 gibi sitokinlerin üretimini azaltmıştır. (Remppis, Bea, Greten, 2010; Kuo, Chi & Liu, 2004). AP-1 ve NF- $\kappa$ B'nin

transkripsiyonu uyarıcı etkisinin peroksizom proliferatör ile aktifleştirilen reseptör- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) aktivasyonu ile inhibe edilebileceği de bildirilmiştir (Ricote vd., 1998; Delerive vd., 1999; Pasceri vd., 2000). Berberinin makrofaj ve barsakta kısmen PPAR $\gamma$  aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokin üretimini azalttığı bildirilmiştir (Chen, Yang, Liu vd., 2008; Feng, Gao, Zhou vd., 2012). PPAR $\gamma$  aktivasyonunun kısmen AP-1 ve NF- $\kappa$ B'nin berberin tarafından inhibe edilmesine katkıda bulunması olasıdır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Oksidatif stres ve inflamasyonda berberin mekanizması (Li, Geng, Jiang & Kong, 2014)

### 2.2.3.3. Antiapoptotik Etkisi

Berberin özellikle de nörodejeneratif hastalıklarda antiapoptotik etkiye sahip görünmektedir ve yapılan çalışmalarda hipokampal apoptoz ve nigrostriatal dopaminerjik nöron kaybını önleyerek hafıza bozukluğunun ve Parkinson hastalığındaki motor fonksiyon bozukluğunun hafifletilmesinde terapötik bir ajan olarak görev yapabileceği öne sürülmüştür (Kim vd., 2014).



Ayrıca berberinin Akt aktivasyonu aracılığıyla serebral iskemi-reperfüzyon hasarına karşı antiapoptotik aktiviteye sahip olduğu da saptanmıştır (Hu vd., 2012). Bu nedenle, PI3K/Akt yolu berberinin antiapoptotik mekanizmalarına dair ipuçları sağlar.

### **2.2.3.3.1. PI3K/AKT/Bcl-2 yolu**

Akt/PKB, apoptozun inhibisyonunu destekleyen bir dizi hücresel substratın fosforilasyonu yoluyla çeşitli görevler gerçekleştirmektedir (Sen, Mukherjee, Ray & Raha, 2003). Özellikle, Bcl-2 ekspresyonunun up-regülasyonu umut verici bir anti apoptotik yoldur (Pugazhenti vd., 2000). Bcl-2 ailesi proteinleri, mitokondriyal dış membran geçirgenliğini düzenleyerek mitokondriyal apoptoza aracılık eder, bu da kaspaz kaskadının aktivasyonu aracılığıyla apoptozu başlatır (Zheng, Viacava, Kriwacki & Moldoveanu, 2016). Bcl-2 ailesi, Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinleri, Bax gibi proapoptotik proteinleri ve kaspazlar olarak bilinen bir sistein proteaz sınıfını içerir. Bax/Bcl-2 oranının artışı sıklıkla apoptoz indüksiyonunu değerlendirmek için kullanılmaktadır (Cohen, 1997; Oltvai, Milliman, Korsmeyer, 1993).

Bcl-2'nin (Ser87) fosforile edilmesi, anti-hücre ölüm fonksiyonunu inhibe edebilir. Berberinin fare hippokampal dilim kültürlerinde iskemik hasara karşı Bcl-2'nin fosforilasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Cui vd, 2009). Bunun yanı sıra, NSC34 motor nöron benzeri hücrelerde, berberinin, antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi artırarak ve sitokrom C, Bax ve kaspazlar gibi apoptotik proteinleri azaltarak apoptozu önlediği de gösterilmiştir (Hsu, Chen, Wu, Wu, Jong & Lo, 2012).

Berberinin hipokampusta Parkinson hastalığı-kaynaklı apoptozu zayıflattığı da gösterilmiştir. Berberin tedavisi Bcl-2 ekspresyonunu artırıp ve Bax ekspresyonunu azalttığına kısa süreli hafıza bozulmasını da iyileştirmiştir (Kim vd., 2014).

Ayrıca berberin sitokrom C ekspresyonu ve Bcl-2/Bax ve Bcl-2/Bax oranlarını düzeltmek yoluyla Alzheimer hastalığı-kaynaklı apoptoza karşı koruyucu etki gösterebilir (Liang vd., 2017). Bunun yanı sıra, berberinin

serebral iskemi ve hipokside nöronal apoptozu inhibe ettiği bir çalışmada, hipoksiyle indüklenbilir faktör 1-alfanın (HIF-1 $\alpha$ ) rolünden de bahsedilmiştir. Orta serebral arter tıkanıklığı olan sıçan modelinde berberin ön uygulaması PC12 hücrelerinin hayatta kalmasında, azalmış HIF-1 $\alpha$ , kaspaz- 9, kaspaz- 3 ve artmış Bcl-2/Bax oranları sorumlu bulunmuştur (Zhang, Qian, Pan, Li, Zhu, 2012a).

Kısacası, berberin nöron apoptozuna karşı Bcl- 2 gibi antiapoptotik proteinlerin upregülasyonu ve Bax, kaspaz, sitokrom C, AIF ve HIF-1 $\alpha$  gibi proapoptotik faktörlerin downregülasyonu yoluyla koruma sağlar.

#### **2.2.3.3.2. PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ sinyal yolu ve Wnt/GSK3 $\beta$ yolu**

Glikojen sentazkinaz-3 (GSK-3), PI3K/Akt yolağı veya Wnt sinyalleriyle baskılanır. GSK-3'ün hedefleri, Bcl-2 ailesi proteinleri, NF - $\kappa$ B sinyali, Myc, siklin D, siklin E,  $\beta$ -katenindir ki bunlar apoptoz, hücre sağkalımı, hücre büyümesi, stres yanıtı ve proliferasyonda rol alır. (Maurer, Preiss, Brauns-Schubert, Schlicher, Charvet, 2014).

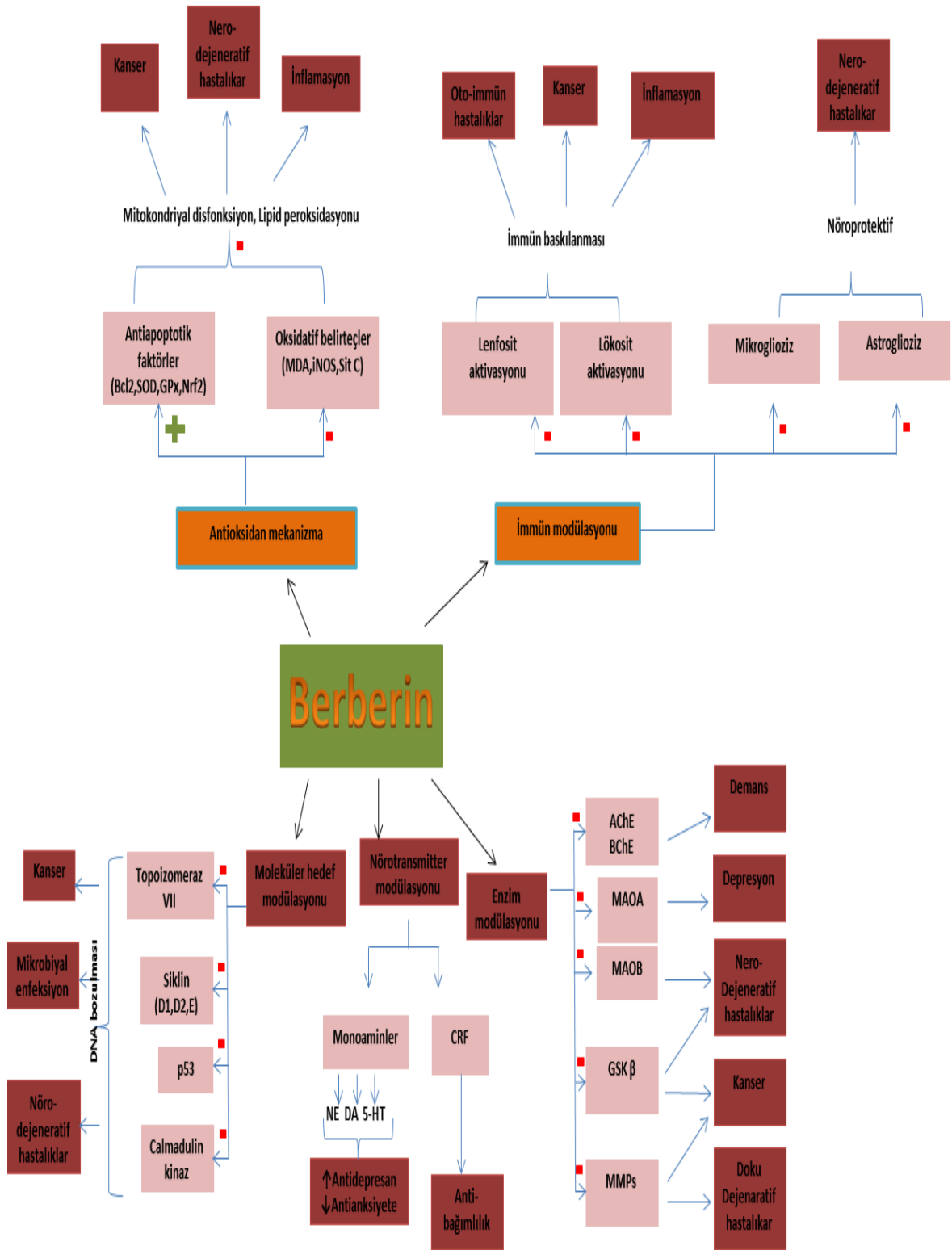
Berberinin Alzheimer hastalığını önlemek için GSK-3 $\beta$  aktivasyonunu tersine çevirdiği de bildirilmiştir (Yu vd., 2011).

PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  sinyal yolu aracılığıyla, berberin ayrıca AMPK yolunu da aktive edebilir ve amiloid öncü proteinin fosforilasyonunu engelleyebilir (Lu vd., 2015; Durairajan vd., 2012).

#### **2.2.3.3.3. AMPK yolu**

Bir hücrel enerji algılayıcısı olan AMPK'nin nörodejeneratif hastalıklarda aşırı aktif olduğu düşünülmektedir (Krishan, Richardson, Sahni, 2015) ve AMPK inhibisyonunun inmede nöroprotektif etkisi daha önceden bildirilmiştir (Li, Zeng, Viollet, Ronnett, McCullough, 2007; McCullough vd., 2005).

Mevcut çalışmalar göstermektedir ki berberin, inflamasyonu azaltmak için AMPK yolunu aktive etmekte veya hücrelerin farklı enerji durumuna göre apoptozla savaşmak için AMPK yolunu inhibe etmektedir (Xue vd., 2016; Shen, Jiang, Yang, Wang, Zhu, 2017; Lu vd., 2015; Chen vd., 2016).



Şekil 2.10. Berberinin çeşitli hastalıklara karşı etkisinin mekanizması (Kumar vd., 2015)

#### **2.2.3.3.4. Hücre döngüsüne etkisi**

Bildiğimiz üzere, hücre döngüsünün durması hücre ölümünü önlemek açısından etkili bir yoldur.

Berberinin poli (A) kuyruğuna etki ederek, retinoblastom 1'in mRNA'sının yarı ömrünü uzatabildiği bulunmuştur. Bu nedenle berberin, nöronların hücre döngüsünün durdurulmasını kolaylaştırır ve sonuçta iskemi/reperfüzyon modelinde apoptozu önler (Chai vd., 2014).

Ayrıca bir çalışmada berberinin hücreyi G0/G1 fazında tutmak için reperfüzyonun başlangıcında siklin D1 ve p53 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu şekilde, berberin nöronların apoptoza uğramasını önlemektedir (Chai vd., 2013).

#### **2.2.4. Güvenlik önlemleri ve ilaç etkileşimleri**

Berberin içeren bitkilerin etkinliği ve güvenliği, Ayurveda ve Çin tıbbında 3000 yıl öncesine kadar uzanır. Bununla birlikte, berberin içeren bitkilerin uterusu uyarıcı etkisi nedeniyle, hamilelikte kullanımı önerilmemektedir. Singapur'da berberin içeren iki Çin otunun (Rhizoma coptidis ve Cortex phellodendri) kullanımı, son 20 yılda, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz eksikliği olan yenidoğanlarda berberin sarhoşluğu ve kernikterusa yol açması nedeniyle yasaklanmıştır (Linn vd., 2012). Ayrıca plasentayı geçebildiği ve fetusa zarar verdiği de bildirilmiştir. Aynı zamanda anne sütü ile de aktarılabilen olduğundan emzirme döneminde berberin kullanımında dikkatli olunması gerekir. Ancak, terapötik berberin dozlarında genotoksik, sitotoksik ve/veya mutajenik etkiler bildirilmemiştir (Birdsall & Kelly, 1997).

Bu çalışmanın amacı, 200 mg/kg intraperitoneal siklofosfamid uygulaması ile sıçanlarda oluşturulan testis hasarı üzerine berberinin önleyici ve/veya tedavi edici etkisi olup olmadığını değerlendirmek ve eğer varsa bunun olası mekanizmalarını oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz düzeyinde değerlendirmektir.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Gereçler**

##### ***3.1.1. Kullanılan hayvanlar***

Deneylerde yaklaşık 200-300 g ağırlığında yetişkin Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar, çalışma ortamına uyum sağlamaları için deney başlangıcından bir hafta önce laboratuara alınarak 12 saat karanlık 12 saat aydınlık döngüsünde, 24±1 °C sıcaklıktaki iyi havalandırılan odalarda barındırılmıştır. Adaptasyon dönemi ve deney süresinde standart hayvan yemi ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlanmıştır. Tez çalışması süresince gerçekleştirilen tüm deneyler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Komisyonu'ndan onay alındıktan sonra yapılmıştır (Dosya Kayıt No.6582018).

##### ***3.1.2. Kullanılan Cihazlar***

Elisa okuyucu	BiotekPowerWave XS
Hassas Terazi	Ohaus
Homojenizatör	HeidolpSilentCrusher M;
İnkübatör	Lab. Companion S1-600
Makler kamerası	Sefi-MedicalInstruments,
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf (5810R)
Manyetik Karıştırıcı	DAIHAN
Vorteks	Heidolp REAX control
Pipet seti	Brand
Otomatik pipetör	Eppendorf
Işık Mikroskopu	Olympus BH-2

##### ***3.1.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve Kitler***

İnterlökin 2(IL-2) ELİSA KİT (Rat)	Shanghai Yl biotech, ÇİN
İnterlökin 6(IL-6) ELİSA KİT (Rat)	Shanghai Yl biotech, ÇİN

TAS	Rel Assay Diagnostic, Türkiye
TOS	Rel Assay Diagnostic, Türkiye
Berberine	Fluoro Chem, UK
Ketamin (Ketalar®)	Pfizer, Türkiye
Ksilazin (Rompun®)	Bayer, Türkiye
PBS tablet	BIOMATIK, Kanada

## **3.2. Yöntem**

### ***3.2.1. Deney protokolü***

Deney grupları her grupta 8 adet olmak üzere 5 grupta toplamda 40 adet erkek sıçandan oluşturulmuştur. Berberin gruplarına sırasıyla serum fizyolojik içinde hazırlanmış berberin 75 mg/kg, 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarda 14 gün süre ile oral olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna ve CP grubuna 14 gün süre ile serum fizyolojik oral olarak uygulanmıştır.

Grup 1; 7 gün oral olarak serum fizyolojik uygulanmış ve 8. Günde 200 mg/kg dozda intraperitoneal SF uygulanmış ve sonrasında 14. güne kadar oral olarak serum fizyolojik uygulanmış olan sıçanlar (n:8) (KONTROL)

Grup 2; 7 gün oral olarak serum fizyolojik uygulanmış, 8. günde 200 mg/kg dozda intraperitoneal CP uygulanmış ve sonrasında 14. güne kadar oral olarak serum fizyolojik uygulanmış olan sıçanlar (n:8) (CP)

Grup 3; 7 gün oral olarak 75 mg/kg dozda serum fizyolojik içinde çözdürülmüş berberin uygulanmış, 8. günde 200 mg/kg dozda intraperitoneal CP uygulanmış ve sonrasında 14. güne kadar oral berberin uygulanmış sıçanlar (n:8) (BER75)

Grup 4; 7 gün oral olarak 150 mg/kg dozda serum fizyolojik içinde çözdürülmüş berberin uygulanmış, 8. günde 200 mg/kg dozda intraperitoneal CP uygulanmış ve sonrasında 14. güne kadar oral berberin uygulanmış sıçanlar (n:8) (BER150)

Grup 5; 7 gün oral olarak 300 mg/kg dozda serum fizyolojik içinde çözdürülmüş berberin uygulanmış, 8. günde 200 mg/kg dozda intraperitoneal CP uygulanmış ve sonrasında 14. güne kadar oral berberin uygulanmış sıçanlar (n:8) (BER300)

**Tablo 3.1.** Hayvan grupları ve deney modeli

<b>Gün / Grup</b>	<b>Kontrol</b>	<b>CP</b>	<b>Ber75</b>	<b>Ber150</b>	<b>Ber300</b>
<b>1-7. gün</b>	SF (oral)	SF (oral)	Berberin 75 mg/kg (oral)	Berberin 150 mg/kg (oral)	Berberin 300 mg/kg (oral)
<b>8. gün</b>	SF 200mg/kg (ip)	CP 200mg/kg (ip)	CP 200mg/kg (ip)	CP 200mg/kg (ip)	CP 200mg/kg (ip)
<b>8-14. gün</b>	SF (oral)	SF (oral)	Berberin 75 mg/kg (oral)	Berberin 150 mg/kg (oral)	Berberin 300 mg/kg (oral)

14 günlük uygulama sonrasında son ilaç dozundan 24 saat sonra aşağıdaki protokole göre örnekleme yapılmıştır.

### **3.2.2. Örneklerin alınması**

1. Deney gruplarını oluşturan sıçanlara 14 günlük uygulama süresi sonunda intraperitoneal olarak 60 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin ile genel anestezi uygulanmış ve ardından servikal dislokasyon yoluyla ötenazi sağlanmıştır.

2. Hemen ardından sıçanların her iki testisi çıkarılmıştır. Testislerden biri fosfat tamponu çözeltisi (NaCl: 8 g, KCl: 0.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1.14 g tartılarak 1L distile su içinde) içeren kaplara konularak histolojik inceleme için ayrılmıştır.

3. Kan ve diğer kirliliklerden temizlenmesi sağlanan diğer testis ise belirli bir süre süzgeç kâğıdında bekletilip fazla nemi alındıktan sonra tartılarak testis ağırlığı belirlenmiş ve kaydedilmiştir.

4. Yine bu ikinci testisten alınan yaklaşık 100 mg'lık doku örneği 100 mg/ml (1:10 ağırlık/hacim) olacak şekilde içerisinde fosfat tamponu çözeltisi bulunan V-tabanlı kapaklı tüplere konularak -20°C'de testis homojenatı hazırlamak için kullanılabilecek şekilde saklanmıştır.

5. -20°C'den alınan numuneler oda ısısında çözülmesi sağlandıktan sonra yarı sıvı, yarı buz formdayken homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiş ve ardından soğutucu özellikli santrifüj cihazına konularak +4°C'de 15000rpm de 15 dk süre ile santrifüj edilmiştir.

6. Santrifüj edildikten sonra numunelerin supernatantları pipet yardımıyla alınarak başka bir V-tabanlı kapaklı tüpe aktarılmıştır. Sitokin ve oksidatif stres değerlendirmeleri yapılabilecek şekilde +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

### ***3.2.3. Biyokimyasal analizler***

#### ***3.2.3.1. Oksidatif stres değerlendirmesi***

1. Total Antioksidan Seviye ölçümü: Örneklerin total antioksidan status düzeyi (TAS), Rel Assay marka ticari kitler (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçülmüştür. E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kalibratör olarak kullanılmıştır.

2. Total Oksidan Seviye ölçümü: Örneklerin total oksidanstatus (TOS) düzeyi Rel Assay marka ticari kitler (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçülmüştür. Hidrojen peroksid kalibratör olarak kullanılmıştır. Sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv/lt şeklinde ifade edilmiştir.

Oksidatif Stres İndeksi: TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen OSI hesaplanırken, aşağıdaki formülden yararlanıldı ve sonuçlar "arbitraryunit" (AU) olarak ifade edilmiştir (Erel 2005).

$$OSI = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv./lt}}{\text{TAS, mmol Trolox equiv./lt} \times 10}$$



### ***3.2.3.2. Sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi***

Testis dokusundan elde edilen homojenatlarda sitokin düzeylerini değerlendirebilmek için IL-2 (Shanghai Yl biotechCo. Ltd. Rat Interleukin 2 ELISA Kit, ÇİN) ve IL-6 (Shanghai Yl biotech Co. Ltd. Rat Interleukin6 ELISA Kit, ÇİN) ELISA kitleri kullanılmış ve üreticisi tarafından belirlenen deney prosedürüne göre çalışılmıştır.

### ***3.2.3.3. Histolojik değerlendirme***

Çıkarılan testisler %10'luk nötral tamponlu formaldehit içerisine alınarak 24 saat süreyle tutuldular. Daha sonra testisler enine dilimlere ayrılarak ilave bir 24 saat süre ile tespote devam edildi. Testisin üst, orta ve alt kısmından alınan dilim örnekleri çeşme suyu ile yıkandıktan sonra sırasıyla %70, %80, %90 ve %96'lık etanol serisinden geçirilerek dehidrate edildiler. Işık geçirgen hale getirmek için iki kez ksilolde tutuldu. Sıvı parafin serisinden geçirildikten sonra parafin bloklar elde edildi. Mikrotomla 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak genel histopatolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin boyama tekniği, apoptoz durumunu değerlendirmek için kaspaz 3 ve Bcl-2 immünohistokimyası uygulandı. Binoküler mikroskop altında yapılan incelemede saptanan bulguları temsil eden görüntüler dijital kamera ile alındı.

### ***3.2.3.4. İstatistiksel analiz***

Tüm veriler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Bağımsız gruplardan oluşan ve normal dağılım gösteren değişkenlere **OneWay Analysis of Variance** testi uygulanmış olup, normal dağılım göstermeyen değişkenlere ise **Kruskal-Wallis OneWay Analysis of Variance on Ranks** test ile analiz edilmiştir.  $p<0.05$  olasılık değerleri önemli olarak kabul edilmiştir. Tüm veri analizleri SPSS 21.0 paket programları ile yapılmıştır.

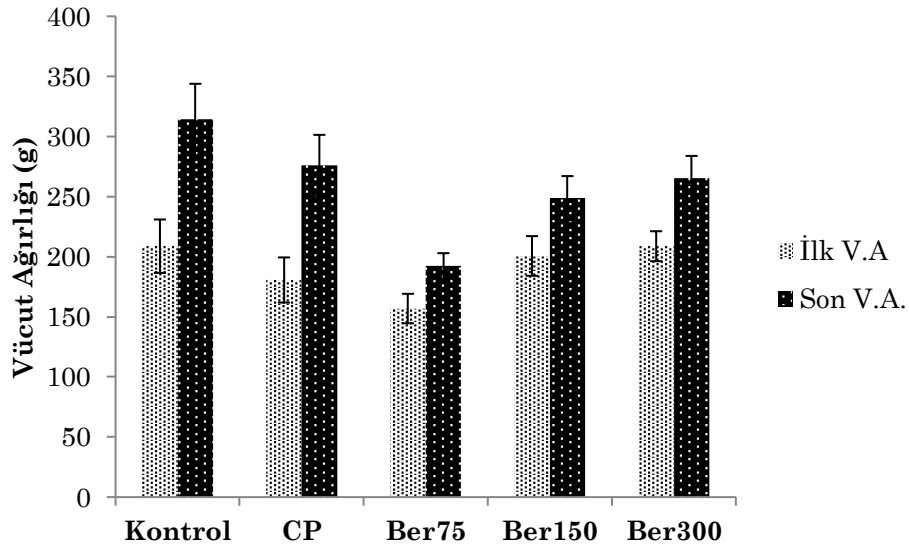
## 4. BULGULAR

### 4.1. Morfometrik Bulgular

Hayvanlarda 14 günlük deney prosedürünün başında ve bitiminde ölçülen vücut ve testis ağırlık değerleri Tablo 4.1'dedir.

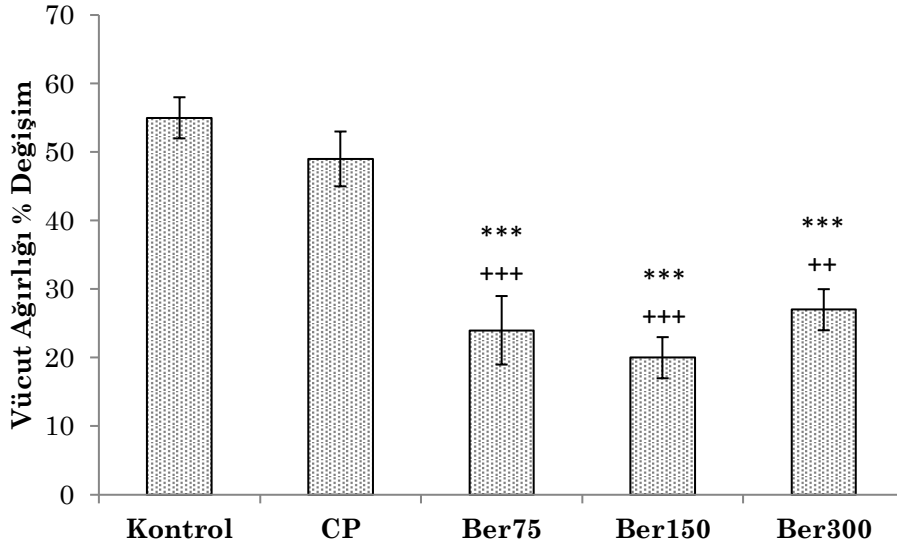
**Tablo 4.1.** Hayvanlarda vücut ve testis ağırlıkları (<sup>a</sup> kontrole göre ve <sup>b</sup> CP grubuna göre; \*p<0,05 ve \*\*\*p<0,001)

	Kontrol	CP	CP+Ber75	CP+Ber150	CP+Ber300
<b>İlk vücut ağırlığı (g)</b>	208,75 ± 22,24	180,63 ± 18,77	156,88 ± 12,25	200,63 ± 16,51	208,75 ± 12,46
<b>Son vücut ağırlığı (g)</b>	314,13 ± 29,72	275,88 ± 25,51	192,25 ± 10,7	248,71 ± 18,35	265,50 ± 18,34
<b>Testis ağırlığı (mg)</b>	1538,75 ± 66,33	1520,75 ± 66,15	1351,63 ± 27,23	1592,43 ± 63,04	1594,88±67,49
<b>Testis ağırlığı / V(son)ağırlığı</b>	5,24 ± 0,30	5,26 ± 0,20	7,14 ± 0,29 <sup>a,b***</sup>	6,53 ± 0,33 <sup>a,b*</sup>	6,10 ± 0,23



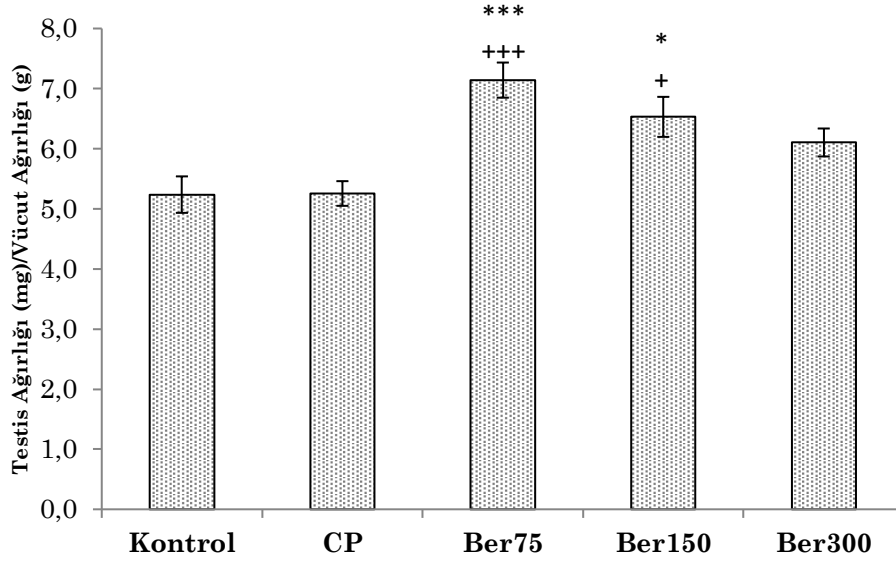
**Şekil 4.1.** Deney prosedürün başlangıcında (ilk V.A.) ve bitiminde (son V.A.) ölçülen vücut ağırlıkları (g)

Hayvanlarda 14 günlük deney prosedürün başlangıcında (ilk V.A) ve bitiminde (son V.A) ölçülen vücut ağırlıkları Şekil 4.1’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. İlk VA ve son VA açısından gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.2. Deney prosedürünün bitiminde vücu ağırlığında gözlenen yüzde değişim (VA%)  
(\*\*\* $p<0,001$  kontrole göre; ++ $p<0,01$  CP grubuna göre, +++ $p<0,001$  CP grubuna göre)

14 günlük deney prosedürünün bitiminde CP verilen hayvanlarda vücut ağırlığında gözlenen yüzde değişim kontrol grubuna göre bir miktar azalmış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Ancak CP sonrasında 75 mg/kg, 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozunda berberin ile tedavi sonrasında hem kontrol grubuna göre hem de CP grubuna göre vücut ağırlığı yüzde değişimi anlamlı derecede azalmıştır (kontrol grubuna göre sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p<0,001$  ve  $p<0,001$ ; CP grubuna göre sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p<0,001$  ve  $p<0,01$ ).



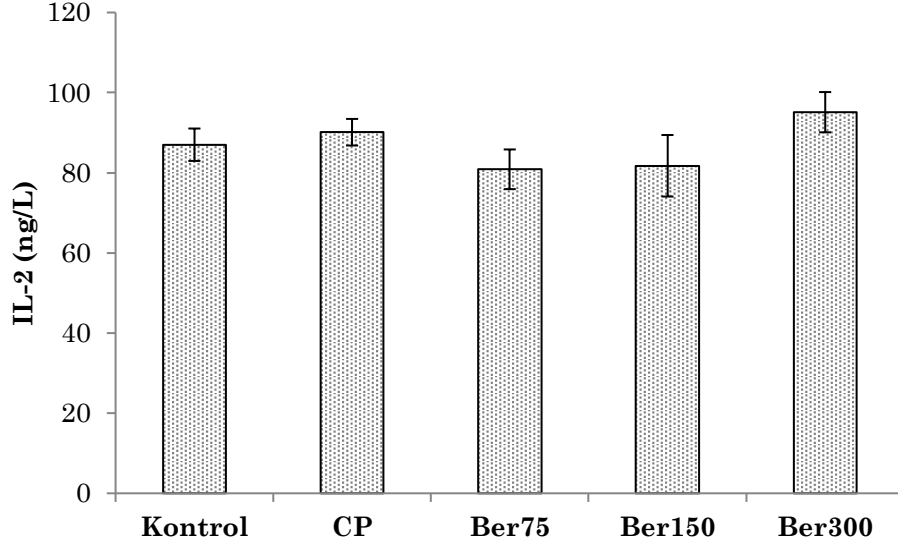
**Şekil 4.3.** Deney prosedürünün bitiminde testis ağırlığının vücut ağırlığına oranı (TA/VA) (mg/g) (\*p<0,05 ve \*\*\*p<0,001 kontrole göre; +p<0,05 ve +++p<0,001 CP grubuna göre)

Testis ağırlığının vücut ağırlığına oranına bakıldığında CP grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0,05). 300 mg/kg berberin ile tedavi de TA/VA oranında anlamlı bir değişikliğe neden olmazken hem kontrol grubuna göre hem de CP grubuna göre TA/VA oranı Ber75 grubunda ve Ber150 grubunda anlamlı derecede daha yüksekti (kontrol grubuna göre sırasıyla p<0,001 ve p<0,05; CP grubuna göre p<0,001 ve p<0,05).

## 4.2. Biyokimyasal Bulgular

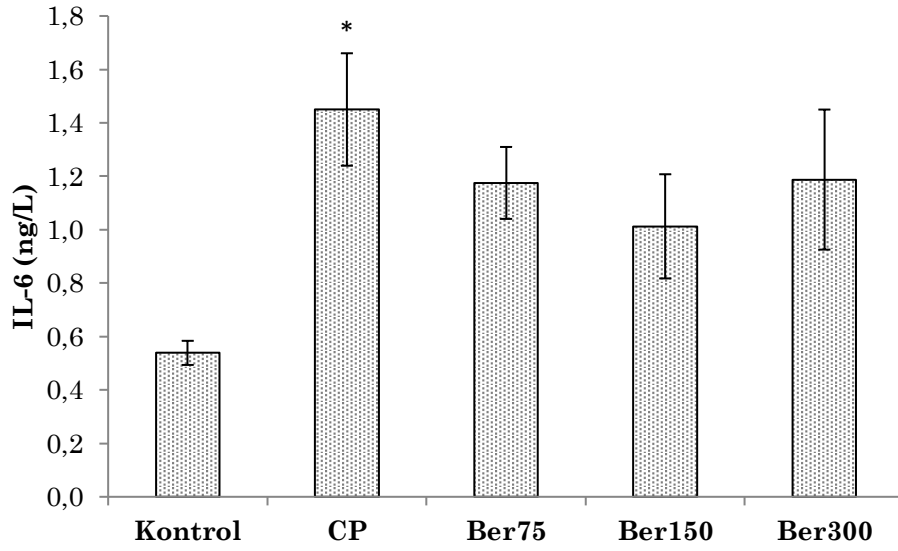
**Tablo 4.2.** Deney gruplarında oksidatif stres durumu ve sitokin düzeyleri (akontrolle göre;\*p<0,05).

	Kontrol	CP	CP+Ber75	CP+Ber150	CP+Ber300
<b>OSI (AU)</b>	1,34 ± 0,29	2,26 ± 0,26	1,94 ± 0,34	1,03 ± 0,33	1,43 ± 0,37
<b>IL-2 (ng/L)</b>	87 ± 4,04	90,13 ± 3,31	80,88 ± 4,95	81,75 ± 7,68	95,13 ± 5,02
<b>IL-6 (ng/L)</b>	0,54 ± 0,05	1,45 ± 0,21 <sup>a*</sup>	1,18 ± 0,13	1,01 ± 0,19	1,19 ± 0,26



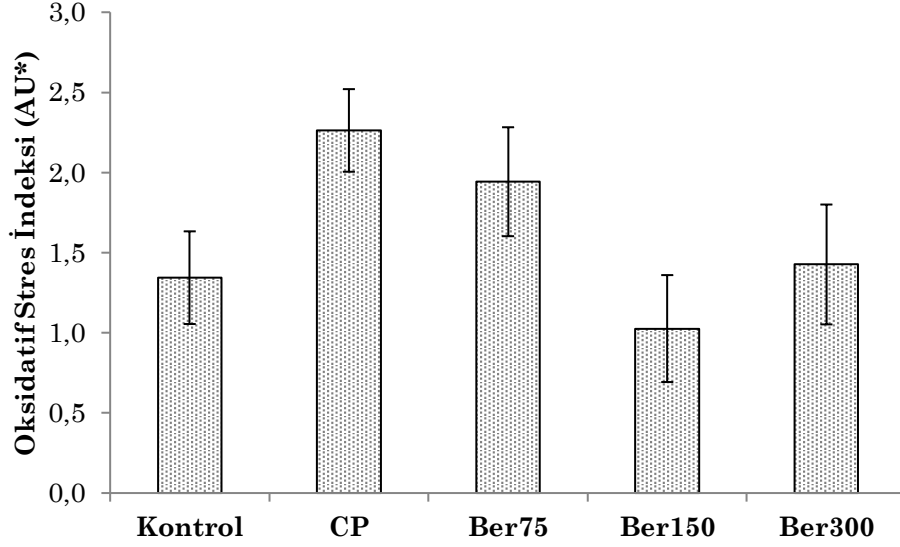
**Şekil 4.4.** Testis homojenatlarında ölçülen IL-2 düzeyleri (ng/L)

Testis örneklerinden elde edilen homojenatlarda ELISA yöntemiyle ölçülen IL-2 düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.5.** Testis homojenatlarında ölçülen IL-6 düzeyleri (ng/L)

Testis homojenatlarında ELISA yöntemiyle ölçülen IL-6 düzeyleri kontrol grubuna göre CP grubunda anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Berberin tedavisi sonrasında IL-6 düzeylerinde CP grubuna göre bir miktar azalma saptanmış olsa da bu farklılık istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştır ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.6. Testis homojenatlarında oksidatif stres indeksi (OSI) (AU\*: arbitrary unit)

Testis dokusunda oksidatif ve antioksidatif sistemlerin durumunu gösteren OSI değeri CP grubunda kontrol grubuna göre bir miktar yüksek ve berberin ile tedavi edilen üç grupta da CP grubuna göre bir miktar azalmış bulunmakla birlikte bu farkların hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0,05$ ).

### 4.3. Histolojik Bulgular

#### 4.3.1. Genel histopatolojik değerlendirme

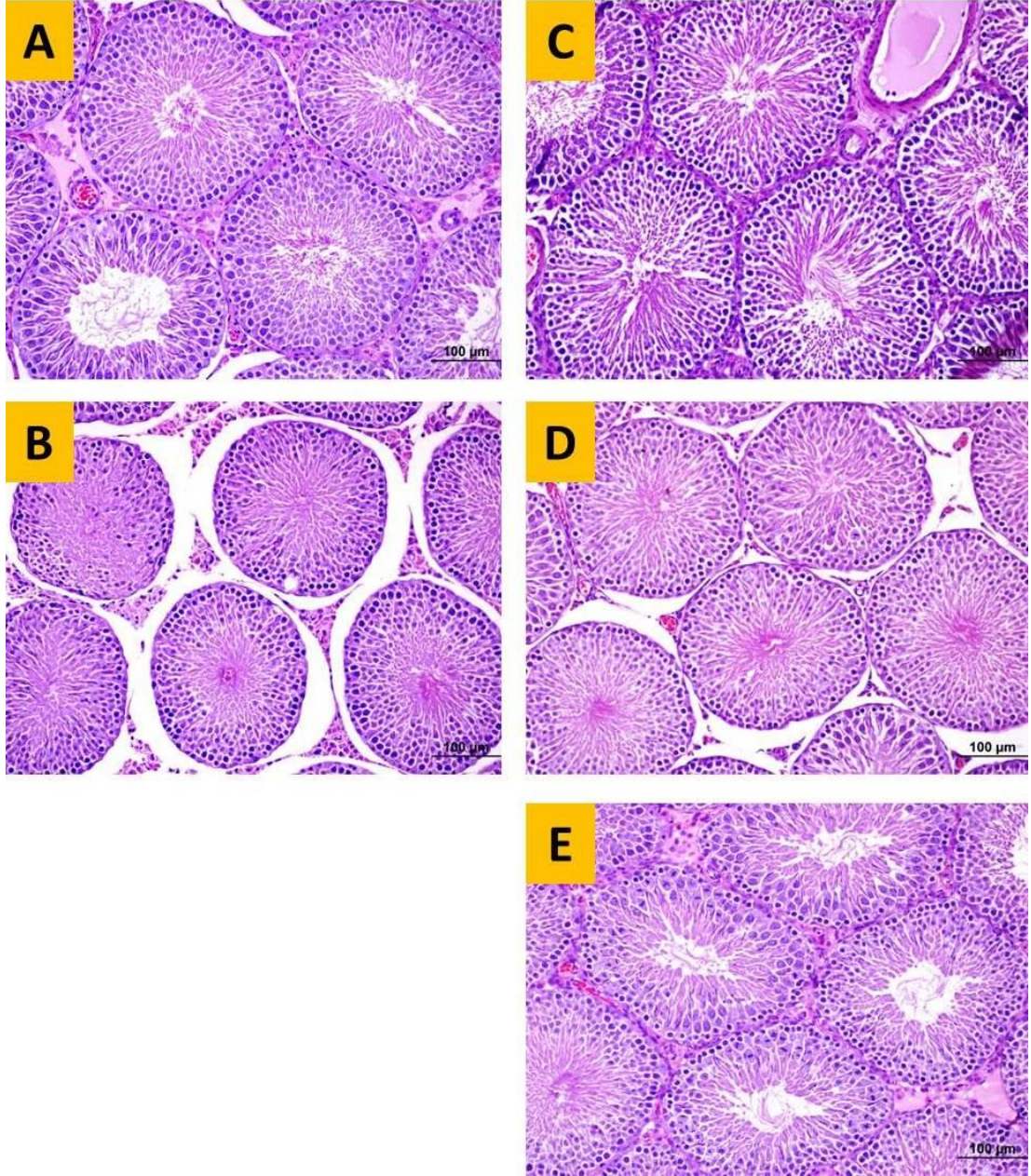
Hematoksilin-eozin ile boyanan testis kesitlerinden deney gruplarını temsil eden görüntüler şekil 4.7 ve şekil 4.8'de görülmektedir. Kontrol grubunda testisler tipik histolojik görünüm sergilediler ve seminifer tübüller ile interstisyel alan yapıları normal görünümdeydi. Siklofosfamid verilen grupta ise seminifer tübüllerin düzensiz şekiller aldığı ve spermatogenetik hücrelerin tübül duvarında disorganize bir şekilde bulunduğu dikkati çekti. Bazı tübüllerin lümeninde dökülmüş spermatogenetik hücreler görülürken bazı tübüllerde de hücre kaybı nedeniyle tübül çapının azaldığı ve tübül lümeninin kaybolduğu saptandı. Siklofosfamid+berberin verilen gruplarda genel olarak berberinin siklofosfamidin testiste hasar yapıcı etkilerini azalttığı veya düzelttiği görüldü. Berberin 75 mg/kg dozunda uygulandığında

siklofosfamidin etkileri azalsa da bazı tübüllerde bozulmaların devam ettiği gözlendi. 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarında verilen berberinin ise testislerde belirgin bir iyileşme sağladığı ve kontrole yakın bir histolojik yapı sergilediği saptandı.

#### ***4.3.2. Apoptoz değerlendirmesi***

Apoptoz belirteçlerinden birisi olan kaspaz 3 ile immünohistokimyasal olarak boyanan preparatlar incelendiğinde (Şekil 4.9) spermatogenetik hücrelerin hişbir grupta belirgin olarak apoptoz sergilemediği, ancak interstisyel alanda yerleşmiş olan Leydig hücrelerinin gruplara göre farklı düzeyde kaspaz 3 reaksiyonu gösterdiği belirlendi. Leydig hücreleri kontrol grubunda pozitif reaksiyon göstermez iken siklofosfamid grubunda en fazla sayı ve yoğunlukta pozitif reaksiyon gözlendi. Siklofosfamid+berberin gruplarında berberin dozu arttıkça pozitif boyanan Leydig hücrelerinin sayı ve yoğunluğunun azaldığı saptandı.

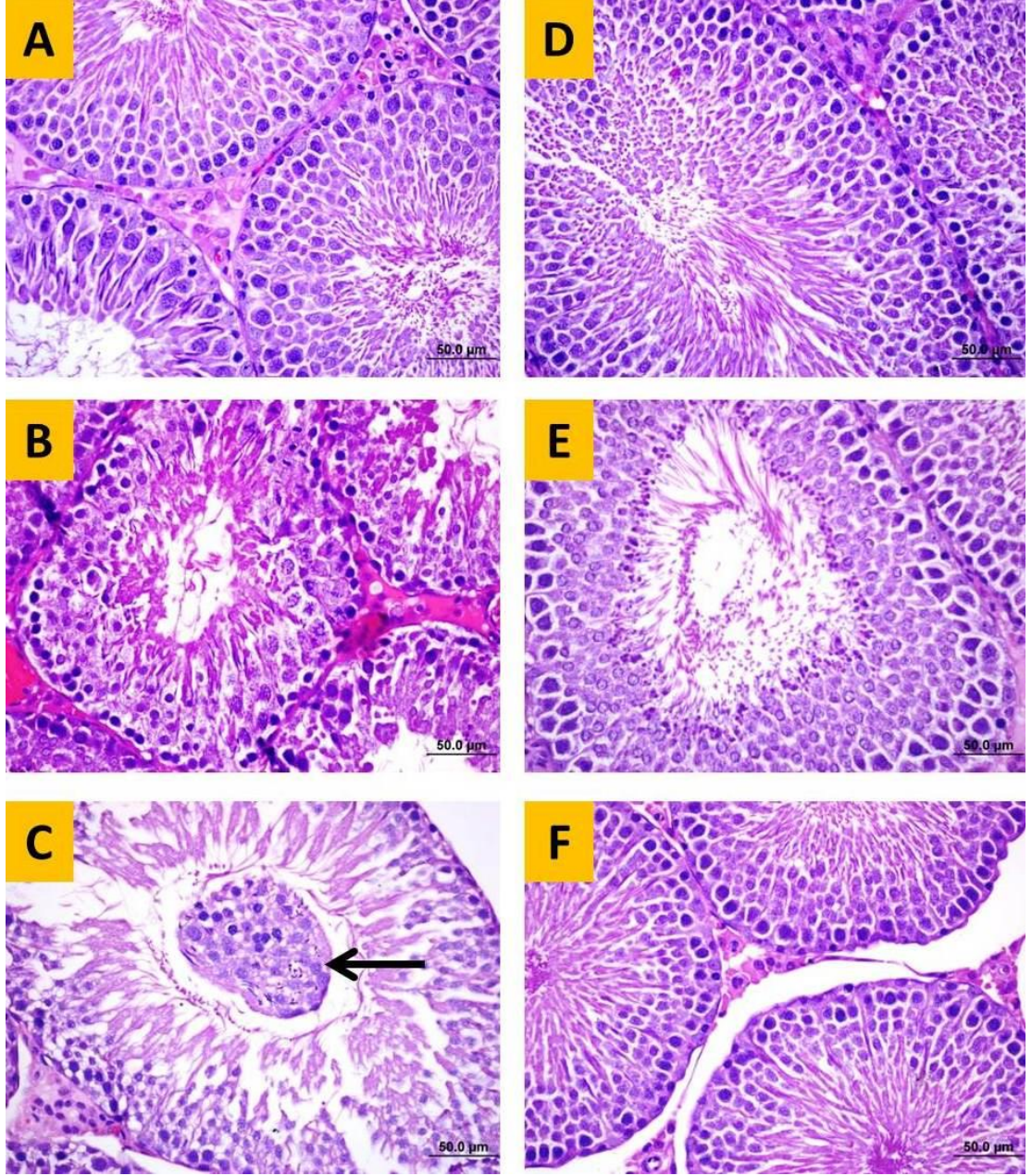
Antiapoptotik bir protein olan Bcl-2 ile işaretlenen testis kesitleri incelendiğinde (Şekil 4.10) seminifer tübüllerde bulunan spermatogenetik hücrelerin kontrol grubunda belirgin bir pozitif boyanma sergilediği, siklofosfamid grubunda ise negatif veya zayıf pozitif boyanmanın olduğu gözlendi. Siklofosfamid+berberin verilen gruplarda berberin dozu arttıkça spermatogenetik hücrelerdeki pozitif boyanmanın arttığı dikkati çekti. 75 mg/kg berberin verilen grupta zayıf Bcl-2 boyanması görülür iken 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarında uygulanan berberinin kontrol grubuna benzer şekilde bir pozitif boyanmaya neden olduğu görüldü.



**Şekil 4.7.** Deney gruplarına ait sıçan testis kesitleri  
\*Objektif büyütme (x20)

- A: Kontrol grubunda normal histolojik yapıya sahip seminifer tübüller ve intersisyel alan yapıları.
- B: Siklofosfamid grubunda seminifer tübül lümenlerinin kaybolduğu ve tübül çaplarının azaldığı dikkati çekmektedir.
- C: Siklofosfamid+75 mg/kg berberin uygulanan grupta seminifer tübüllerde spermatogenetik hücrelerde kısmi disorganizasyonun olduğu,
- D: Siklofosfamid+150 mg/kg berberin uygulanan grupta seminifer tübüllerin kontrole yakın bir görünüm sergilediği ve
- E: Siklofosfamid+300 mg/kg berberin uygulanan grupta tamamen kontrole benzer bir histolojik yapı olduğu görülmektedir. Hematoksilin-eozin, barlar 100 µm.

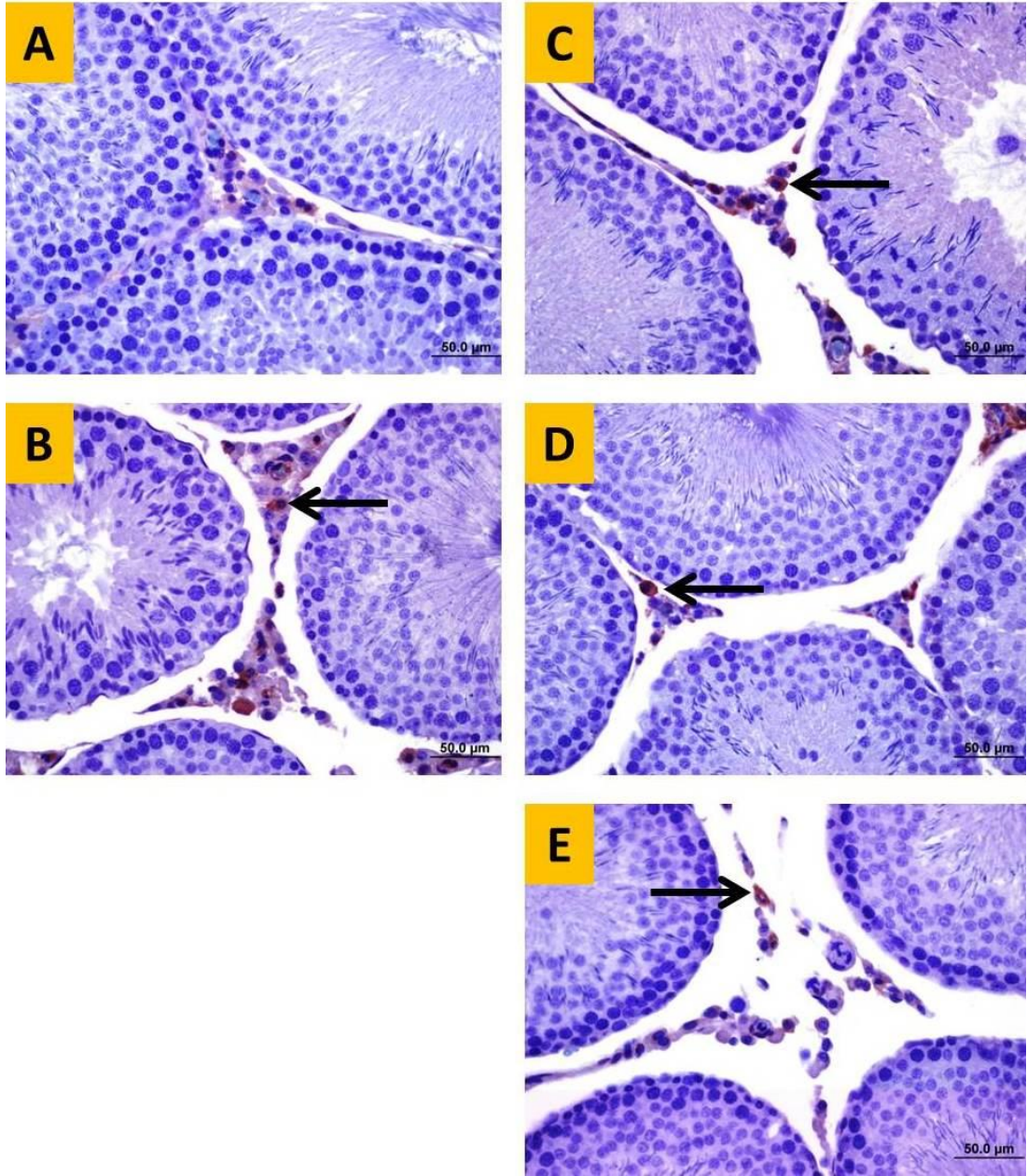




**Şekil 4.8.** Deney gruplarına ait sıçan testis kesitleri

\*Objektif büyütme (x40)

- A: Kontrol grubunda normal histolojik yapıya sahip seminifer tübüller ve intersisyel alan yapıları.  
 B: Siklofosfamid grubunda seminifer tübüllerin düzensiz hale geldikleri,  
 C: Siklofosfamid grubunda seminifer tübül lümeninde dökülmüş hücreler ve tübül duvarında spermatogenetik hücrelerde disorganizasyonun olduğu dikkati çekmektedir.  
 D: Siklofosfamid+75 mg/kg berberin uygulanan grupta,  
 E: Siklofosfamid+150 mg/kg berberin uygulanan grupta ve  
 F: Siklofosfamid+300 mg/kg berberin uygulanan grupta kontrole benzer histolojik görünümlerin olduğu görülmektedir. Hematoksilin-eozin, barlar 50 µm.



**Şekil 4.9.** Deney gruplarına ait sıçan testis kesitlerinin kaspaz 3 immünoreaksiyonu

\*→: Leydig hücrelerini gösteren oklar, \*Objektif büyütme (x40)

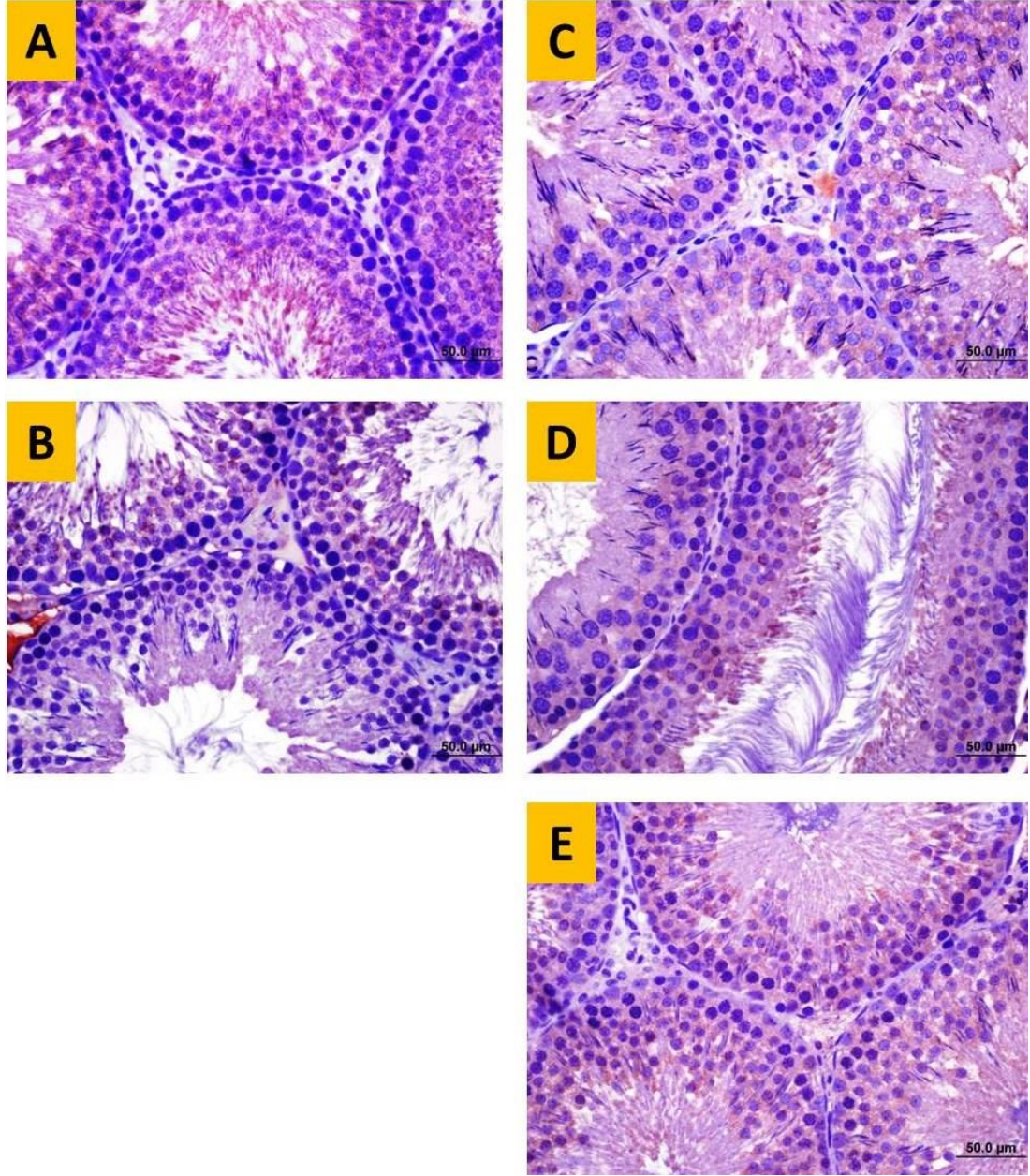
A: Kontrol grubunda seminifer tübüller ve intersiyel alan yapılarında negatif reaksiyon.

B: Siklofosfamid grubunda

C: Siklofosfamid+75 mg/kg berberin uygulanan grupta,

D: Siklofosfamid+150 mg/kg berberin uygulanan grupta ve

E: Siklofosfamid+300 mg/kg berberin uygulanan grupta pozitif reaksiyon gösteren Leydig hücreleri. Barlar 50 µm.



**Şekil 4.10.** Deney gruplarına ait sıçan testis kesitlerinin Bcl-2 immünoreaksiyonu  
\*Objektif büyütme (x40)

Spermatogenetik hücrelerin

A: Kontrol grubunda belirgin olarak pozitif reaksiyon gösterdiği,

B: Siklofosfamid grubunda reaksiyonun negatif veya zayıf olduğu,

C: Siklofosfamid+75 mg/kg berberin uygulanan grupta,

D: Siklofosfamid+150 mg/kg berberin uygulanan grupta ve

E: Siklofosfamid+300 mg/kg berberin uygulanan grupta berberin dozunun artmasına paralel olarak pozitif reaksiyonun arttığı görülmektedir. Barlar 50 µm.

## 5. TARTIŞMA

Erişkin erkek sıçanlarda yaptığımız bu deneysel çalışmada 200 mg/kg dozunda CP'nin intraperitoneal enjeksiyonla uygulanması öncesi ve sonrasında 7'şer gün 75 mg/kg, 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarında oral berberin uygulamasının testis dokusunda CP'ye bağlı olumsuz etkilere karşı koruyucu ve/veya tedavi edici etkisi olup olmadığını değerlendirdik. Bu deneylerin sonucunda CP ile testiste histolojik olarak dejeneratif değişiklikler saptanmış ve berberin tedavisiyle doza bağımlı olmak üzere bu dejenerasyonlarda iyileşmeler saptanmıştır. Testiste görülen bu dejenerasyonlarda oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozun rolü değerlendirilmiş ve testis homojenatlarında ölçülen oksidatif stres belirteçleri ve sitokin düzeyleri açısından anlamlı bir bulgu elde edilememiş olmakla birlikte immunohistokimyasal olarak CP verilen hayvanlarda testis dokusunda apoptoz geliştiği ve berberin tedavisi ile doz arttıkça daha fazla oranda antiapoptotik etki elde edildiği saptanmıştır.

Hayvanlarda deney prosedürünün başlangıcında (ilk VA) ve bitiminde (son VA) ölçülen vücut ağırlıkları gruplar arasında bir fark göstermiyordu. Ancak deney prosedürünün bitiminde vücut ağırlığında gözlenen yüzde değişim (VA%) CP grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark göstermezken CP ile birlikte 75 mg/kg, 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozunda berberin ile tedavi sonrasında hem kontrol grubuna göre hem de CP grubuna göre vücut ağırlığı yüzde değişimi anlamlı derecede azalmıştır (kontrol grubuna göre sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p<0,001$  ve  $p<0,001$ ; CP grubuna göre sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p<0,001$  ve  $p<0,01$ ). Yapılan önceki çalışmaların çoğunda CP uygulaması hayvanların vücut ağırlığında anlamlı düzeylerde azalmaya yol açmıştır (Abd El Tawab, Shahin, AbdelMohsen, 2014; Motawi, Sadik, Refaat, 2010; Selvakumar, Prahalathan, Mythili, Varalakshmi, 2004; Salimnejad, Rad, Nejad, Roshangar, 2018; Xie vd., 2018). Biz çalışmamızda tek doz 200 mg/kg CP uyguladık ve 7 gün sonra da vücut ağırlıklarını ölçtük. Yukarıdaki çalışmalarda kullanılan CP dozları daha yüksek veya deney süresi daha uzun tutulmuştu. Bu nedenle CP maruziyeti daha fazla olmuştur. Bizim

sonuçlarımızla bu çalışmaların sonuçlarının farklı olması bundan kaynaklanabilir. Ayrıca deney bitiminde ölçülen vücut ağırlıklarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmasa da CP uygulanan hayvanlardaki vücut ağırlığı kontrol grubundakilere göre daha düşük olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).

Vücut ağırlığının azalması diğer birçok kanser ilacında olduğu gibi CP uygulaması ile de sık görülen bir yan etkidir. Bunun için öne sürülen olası mekanizmalar enerji metabolizması üzerine direkt bir etkisinin bulunması veya adiposit öncülleri üzerine antiproliferatif etkilerinin bulunmasıdır (Myers vd., 2017). Ayrıca, Xie ve arkadaşları (2018) da erişkin sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada özellikle de CP uygulaması sonrasındaki ilk haftada hayvanlarda genel hareketlilikte ve iştahta azalma olduğunu saptamışlardır (Xie vd., 2018).

Siklofosfamidin aksine 3 farklı dozda (75, 150 ve 300 mg/kg) uygulanan berberin hayvanların vücut ağırlığında hem kontrole hem de CP grubuna göre anlamlı bir azalmaya yol açmıştır (kontrol grubuna göre sırasıyla  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  ve  $p < 0,001$ ; CP grubuna göre sırasıyla  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  ve  $p < 0,01$ ). Berberinin bu etkisinin daha önceden üzerinde çok çalışılmış olan antidiyabetik etkisine bağlı olduğu düşünülebilir. Daha önce yapılan insan ve hayvan çalışmalarında da berberin tedavisi ile vücut ağırlığında anlamlı bir azalma gözlenmiş ve bunun enerji tüketimini kontrol eden bazı genlerin ekspresyonunda değişiklik olmasına (Hu vd., 2014) veya yağ akümülyasyonunu azaltmasına (Lee vd., 2006) bağlı olabileceği öne sürülmüştür. Berberinin bu etkilerine ilave olarak diüretik etkisi de vücut ağırlığında azalmaya neden olmuş olabilir. Bashir ve Gilani'nin (2011) yapmış olduğu çalışmada berberinin doz bağımlı olarak diüretik etkisi gösterilmiştir (Bashir & Gilani, 2011).

Vücut ağırlığında CP uygulaması ile görülen değişikliği değerlendirmek yoluyla bu ajanın genel toksisitesini belirlemeyi amaçlamanın yanı sıra hedef organ olarak testisteki toksisitesini değerlendirmek için de mutlak ve rölatif testis ağırlıkları da ölçülmüştür. Buna göre TA/VA oranı CP grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark göstermemiştir ( $p > 0,05$ ). Bununla birlikte, 300

mg/kg berberin ile tedavi de TA/VA oranında anlamlı bir değişikliğe neden olmazken hem kontrol grubuna göre hem de CP grubuna göre TA/VA oranı Ber75 grubunda ve Ber150 grubunda anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (kontrol grubuna göre sırasıyla  $p < 0,001$  ve  $p < 0,05$ ; CP grubuna göre  $p < 0,001$  ve  $p < 0,05$ ). Literatürde çeşitli doz ve sürelerde uygulanan CP sonrasında mutlak ve rölatif testis ağırlıklarında azalma (Abd EI Tawab, Shahin, AbdelMohsen, 2014; Selvakumar, Prahalathan, Mythili, Varalakshmi, 2004; Salimnejad, Rad, Nejad, Roshangar, 2018) veya artma (Motawi, Sadik, Refaat, 2010) görülen ya da anlamlı bir değişiklik görülmeyen (Oyagbemi vd., 2016; Xie vd., 2018) çalışmalar bulunmaktadır. Mutlak ve/veya rölatif testis ağırlığında görülen azalmaların sperm üretiminde azalmaya ve apoptoz, dejenerasyon ve parankimal atrofi gibi histolojik değişikliklere bağlı olabileceği öne sürülmüştür (Abd EI Tawab, Shahin, AbdelMohsen, 2014; Selvakumar, Prahalathan, Mythili, Varalakshmi, 2004; Salimnejad, Rad, Nejad, Roshangar, 2018).

Bizim çalışmamızda da yapılan histolojik incelemelerde CP verilen grupta seminifer tübüllerde düzensizlik ve spermatogenetik hücrelerde disorganizasyon gözlenmiştir. Ayrıca tübül lümenine dökülmüş spermatogenetik hücreler ve tübül çapında azalma da gözlenmiştir. Berberin tedavisi ile artan dozlarla birlikte histolojik yapının kontrol grubundaki yapıya yaklaşacak şekilde iyileştiği gözlenmiştir. Bu dejeneratif ve parankimal değişikliklerin yanı sıra apoptozun değerlendirilmesi için yapılan kaspaz-3 ve Bcl-2 immunohistokimyasal boyamalarında da CP uygulaması ile testiste apoptotik değişiklikler saptanırken berberin doz bağımlı olarak antiapoptotik etkiler göstermiştir (şekil 4.7-10). Yukarıda da belirtildiği üzere, bu histolojik değişikliklerin testis ağırlığında da azalma ile sonuçlanması beklenebilir, ancak bizim çalışmamızda ne mutlak ne de rölatif testis ağırlığında CP ile anlamlı bir değişiklik olmaması CP'nin etkisini akut olarak değerlendirmiş olmamıza bağlı olabilir. Nitekim mutlak ve/veya rölatif testis ağırlığında azalma gözlenen çalışmaların çoğunda CP maruziyeti düşük dozda olsa da 5-10 haftaya kadar uzamıştır ki bu da mikroskobik bulguların makroskobik etkiler oluşturabilmesine yetecek zamanı sağlamış olabilir.

Oksidatif stres ile ilgili ortak bir kanı apoptoz kaskadını başlattığıdır (Shaker, Abboud, Assad, Hadi, 2018). ROS pro-apoptotik proteinleri aktive etmekte ve voltaj kapılı anyon kanalları yoluyla sitokrom C'nin salınmasına neden olmaktadır (Korsmeyer, Wei, Saito, Weiler, Oh, Schlesinger, 2000). Sağlıklı ve normal bir hücrede, mitokondri, Bcl-2 gibi antiapoptotik genleri içerir. Mitokondriye göç edebilen proapoptotik proteinlerden biri olan Bax, antiapoptotik Bcl-2 genini inhibe etmesi ile testiste hasara yol açabilmektedir (Abd EI Tawab, Shahin, AbdelMohsen, 2014; Schwartz & Waxman, 2001). Pro-apoptotik proteinler ayrıca dış mitokondriyal zar da sitokrom C'nin mitokondri dışına göç etmesine ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ile birleşmesine yol açar ve apoptozom adı verilen kompleks oluşur (Green & Reed,1998). Apoptozom prokaspaz-9 ile bağlanır ve kaspaz-9 formuna aktive eder. Bu aktif kaspaz daha sonra kaspaz 3, 7 ve 12 diye takip eden kaspazın aktivasyonunu tetikler (Li & Yuan, 2008). Kaspaz-3 aracılı yolların aktivasyonu da üreme (germ) hücre apoptozuna neden olmaktadır (Ryan, O'Callaghan, O'Brien, 2004; Kim, Ghosh, Weil, Zirkin, 2001; Potnuri, Allakonda, Lahkar, 2018).

Berberinle yapılan bir çalışmada antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi artırarak ve sitokrom C, Bax ve kaspazlar gibi apoptotik proteinleri azaltarak apoptozu önlediği gösterilmiştir (Hsu, Chen, Wu, Wu, Jong & Lo, 2012). Ayrıca berberinin Alzheimer hastalığını önlemek için Bcl-2 proteinini hedef alan GSK - 3 $\beta$  aktivasyonunu tersine çevirdiğini gösteren bir çalışma da mevcuttur (Yu vd., 2011). Berberinle yapılan bu çalışmalardan yola çıkarak testiste CP kaynaklı apoptozda berberinin antioksidan ve antiapoptotik etkilerinden dolayı koruyucu etkisinin olabileceğini düşünmekteyiz. CP uygulanan sıçanlara berberin uygulanması sonucu elde edilen histolojik sonuçlar da bize berberinin belki de doza-bağımlı olarak koruyucu bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

Daha önce yapılmış olan çalışmada (Motawi, Sadik, Refaat, 2010) CP ile tedavi edilmiş sıçanların testislerinde, TAS'ın azalmasını takip eden GSH-Px ve G6PD'nin azalması ile antioksidan koruma sisteminin etkinliğinin azalması ve artmış lipid peroksidasyon durumuyla oksidatif stresin arttığı

gösterilmiştir (Abd EI Tawab, Shahin, AbdelMohsen, 2014). Oksidatif stres ROS üretimi ve hücre içinde ROS'un eliminasyonu ile denge halindedir. Bu dengenin bozulması hücrede hasara neden olmaktadır (Vladimir-Knezevic, Blazekovic, Kindl, Vladic, Lower-Nedza, Brantner, 2014). CP ile yapılmış benzer (Abd EI Tawab, Shahin, AbdelMohsen, 2014; Motawi, Sadik, Refaat, 2010; Oyagbemi vd., 2016) ya da farklı doz ve/veya süreli (Salimnejad, Rad, Nejad, Roshangar, 2018; Onaolapo, Oladipo, Onaolapo, 2017; Anan, Zidan, Abd EL-Baset, Ali, 2018) çalışmalarda testiste ROS ve oksidatif stres sonrası oluşan ürünlerin (MDA gibi) seviyelerinde anlamlı artışlar olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda (Abd EI Tawab, Shahin, AbdelMohsen, 2014; Motawi, Sadik, Refaat, 2010; Oyagbemi vd., 2016) ROS'un artmış olmasına rağmen ölçülen TAS seviyelerinde ise anlamlı derecede azalmalar görülmüştür. Çalışmamızda da yukarıdaki çalışmalara benzer nitelikte oksidatif ve antioksidatif sistemlerin durumunu gösteren OSI (TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi) değeri CP grubunda kontrol grubuna göre bir miktar yüksek çıkmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Farklı ajanlar uygulanarak testiste oluşturulan oksidatif strese zengin içerikte berberin fraksiyonu uygulamasına (100 mg/kg) bağlı olarak oksidatif stres belirteçlerinde (TBARS) azalma gözlenmiştir. Berberin ekstraktının TBARS ve NO seviyelerini azaltarak ve düşmüş GSH miktarını yükselterek hücreyi ROS hasarına karşı koruyabileceği gösterilmiştir (Li, Geng, Jiang & Kong, 2014). Araştırmacılar buldukları bu sonuçların berberin fraksiyonunun güçlü antioksidan etki kapasitesi olduğunu gösteren önceki çalışmalarla uyumlu olduğunu gözlemlemişlerdir (Abd EI-Wahab, Ghareeb, Sarhan, Abu-Serie & El Demellawy, 2013; Laamech, el-Hilaly, Fetoui vd., 2017; Pongkittiphan, Chavasiri & Subabphol, 2015).

Bizim çalışmamızda da OSI değeri berberin ile tedavi edilen üç grupta CP grubuna göre yukarıdaki çalışmalara benzer olarak azalmıştır. Ancak bu azalmaların hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Yukarıda araştırmacıların bulmuş olduğu sonuçlarla bizimkilerin farklı olmasının nedeni kullanılan berberin kaynaklı olabilir. Biz saf berberin



kullanırken bu araştırcılar bir berberin ekstraktı kullanmışlardır. Berberin ekstraktı içerisinde berberin dışında berberubin, columbamin, bermamin, palmatin, jatrorrhizin gibi alkaloidler de bulunmaktadır (Rafiee, Nejati, Heidari, Ashraf, 2016). Dolayısıyla araştırcıların bulduğu antioksidan etkide berberin dışında ekstrakta bulunan diğer alkaloidlerin katkısı da olabilir.

Siklofosamid enjeksiyonunun hayvanlarda farklı modellerde ve farklı mekanizmalarla inflamatuvar reaksiyonu tetiklediği bilinmektedir. Bu proinflamatuvar olaylarda özellikle de sitokinlerin rol aldığı dşunlmektedir (Yigitaslan, Ozatik, Ozatik, Erol, Sirmagul, Baseskioglu, 2014; Arafa, 2009; Sakura, Masuda, Matsuoka, Yokoyama, Kawakami, Kihara, 2009; Hamsa & Kuttan, 2011). Bunun yanı sıra PPARγ yolağı üzerinden de inflamasyona katkıda bulunduğu da dşunlmektedir (Korkmaz, Topal, Oter, 2007).

Berberin anti-inflamatuvar etkisini MAPK yolunun inhibisyonu, NF-κB yolunun inhibisyonu RhoGTPaz inhibisyonu ve PPARg aktivasyonu ile gerçekleştirebilir (Li, Geng, Jiang & Kong, 2014).

Çeşitli hücrelerin kültürlerinde berberin tedavisinin TNF-α ve IL-6'yı azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Choi vd., 2006; Lou vd., 2011; Shang vd., 2010; Chen vd., 2011). Berberin, IL-10/IL-1β, IL-10/IL-6 ve IL-10/TNF-α gibi anti-inflamatuvar/pro-inflamatuvar sitokin oranlarını arttırabilir. Berberinin anti-inflamatuvar aktivitesi, NOD farelerinin splenositlerinde, böbreklerinde ve karaciğerinde gözlenmiştir (Cui vd., 2009; Chueh & Lin, 2012).

Ayrıca Nrf2'nin transkripsiyonu berberinin anti-inflamatuvar aktivitesinde önemli bir rol oynamaktadır. Nrf2'nin bloke edilmesinin berberinin makrofajlardaki proinflamatuvar sitokinlerin üretimindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırdığı görülmüştür. Berberin tedavisi, AMPK ve P38'in aktivasyonunu uyarabilir ki bu da Nrf2'nin nükleer translokasyonuna ve proinflamatuvar sitokinlerin retimininin inhibisyonuna neden olur (Mo vd., 2013; Lee vd., 2013).

Bizim alışmamızda da yukarıdaki çalışmalara (Choi vd., 2006; Lou vd., 2011; Shang vd., 2010; Chen vd., 2011) benzer sonuçlar gözlenmiştir. Ancak

berberin tedavisi sonrasında IL-6 düzeylerinde CP grubuna göre bir miktar azalma saptanmış olsa da bu farklılık istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştır ( $p>0,05$ ). Sonuçlardaki bu farklılık çalışmaların *in vivo* ya da *in vitro* olmasından kaynaklanabilir. Bizim *in vivo* yapıdaki çalışmamızda sitokin düzeyleri testiste anlamlı bir değişikliği yansıtacak düzeye erişememiş olabilir. Yine berberin çalışmalarının birçoğu diyabetik modeller üzerinde gerçekleştirildiğinden diyabette de ön planda olan inflamasyon bu şekilde açığa çıkmış olabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deneylerin sonucunda CP ile testiste histolojik olarak dejeneratif değişiklikler saptanmış ve berberin tedavisiyle doza bağımlı olmak üzere bu dejenerasyonlarda iyileşmeler saptanmıştır. Testiste görülen bu dejenerasyonlarda oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozun rolü değerlendirilmiş ve testis homojenatlarında ölçülen oksidatif stres belirteçleri ve sitokin düzeyleri açısından anlamlı bir bulgu elde edilememiş olmakla birlikte immunohistokimyasal olarak CP verilen hayvanlarda testis dokusunda apoptoz geliştiği ve berberin tedavisi ile doz bağımlı olarak antiapoptotik etki görülmüştür. Vücut ağırlıklarının değerlendirmesinde CP ve berberin gruplarında kontrol ile kıyaslandığında vücut ağırlığında bir azalma olduğu saptanmıştır. Ancak bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunamamıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlar CP'ye bağlı testis hasarının önlenmesinde berberinin yararlı etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Hayvanlarda oluşan etkilerin insanlarda da benzer etkiler göstermesi muhtemeldir. Bu nedenle klinik çalışmaların yapılmasının uygun olabileceği kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abd EI Tawab, A. M., Shahin, N. N., Abdel Mohsen, M. M. (2014). Protective effect of *Satureja montana* extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Chem Biol Interact.* 224:196–205. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.11.001.
- Abd EI-Wahab, A. E., Ghareeb, D. A., Sarhan, E. E., Abu-Serie, M. M. and El Demellawy, M. A. (2013). In vitro biological assessment of berberis vulgaris and its active constituent, berberine: antioxidant, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* vol. 13, no1, p218.
- Adams, J. D., Klaidman, L. K. (1993). Acrolein-induced oxygen radical formation. *Free Radic Biol Med.* 15: 187–193.
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C. et al. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health.* 32:1-17. DOI:10.5534/wjmh.2014.32.1.1
- Aguilar-Mahecha, A., Hales, B. F., Robaire, B. (2001). Acute cyclophosphamide exposure has germ cell specific effects on the expression of stress response genes during rat spermatogenesis. *Mol Reprod Dev.* 60: 302–311.
- Ahlmann, M., Hempel, G. (2016). The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*78:661–671. DOI: 10.1007/s00280-016-3152-1
- Ahmed, A. R., Hombal, S. M. (1984). Cyclophosphamide (Cytosan) : a review on relevant pharmacology and clinical uses. *J Am Acad Dermatol.* 11:1115–1126.
- Aitken, R. J., Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev.* 1: 15–24.
- Alarcon, R. A. (1976). Studies on the in vivo formation of acrolein: 3-hydroxypropylmercapturic acid as an index of cyclophosphamide (NSC-26271) activation. *Cancer Treat Rep* 60: 327-35.
- Alarcon, R. A., Meienhofer, J. (1971). Formation of the cytotoxic aldehyde acrolein during in vitro degradation of cyclophosphamide. *Nat New Biol*233: 250-2.
- Anan, H. H., Zidan, R. A., Abd EL-Baset, S. A., Ali, M. M. (2018). Ameliorative effect of zinc oxide nanoparticles on cyclophosphamide induced testicular injury in adult rat. *Tissue and Cell* 54:80–93. DOI:10.1016 /j.tice. 08.006.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Anderson, L. W., Chen, T. L., Colvin, O. M. et al. (1996). Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide/aldophosphamide kinetics in patients receiving high dose chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2: 1481-7.
- Arafa, H. M. (2009). Uroprotective effects of curcumin in cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis paradigm. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 104: 393–399.
- Arnold, H., Bourseaux, F., Brock, N. (1958). Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518-ASTA) in experimental tumours in rats. *Nature*; 181: 931.
- Assier-Bonnet, H., Aractingi, S., Cadranel, J. et al. (1996). Stevens–Johnson syndrome induced by cyclophosphamide: report of two cases. *Br. J. Dermatol.* 135: 864–6.
- Asiri, Y. A. (2010). Probucol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative apoptosis, p53 and Bax signal expression in rat cardiac tissues. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 3 :308–316.
- Badade, Z. G., Samant, P. M. (2011). Role of oxidative stress in male infertility. *J Biomed Sci Res.* 3: 385–391.
- Bae, J., Lee, D., Kim, K., Gil, M., Lee, J. Y. and Lee, K. J. (2013). Berberine protects 6-hydroxydopamine-induced human dopaminergic neuronal cell death through the induction of heme oxygenase-1. *Molecules and Cells*, vol. 35, no. 2, pp. 151–157. DOI: 10.1007/s10059-013-2298-5
- Bagley, C. M., Bostick, F. W., DeVita, V. T. (1973). Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Res* 33: 226-33.
- Baoxin, L., Mingshi, Z., Lihua, B. (1995). Study on the pharmacokinetics of berberine after oral administration in human being. *J. HarbinMed. Univ.* 29 (5), 382–385.
- Bashir, S., Gilani, A. H. (2011). Antiuro lithic effect of berberine is mediated through multiple pathways. *European Journal of Pharmacology* 651:168–175. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.10.076.
- Battu, S. K., Repka, M. A., Maddineni, S., Chittiboyina, A.G., Avery, M.A., et al. (2010). Physicochemical characterization of berberine chloride: a perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery. *AAPS PharmSciTech* 11 (3), 1466–1475. DOI: 10.1208/s12249-010-9520-y
- Baumann, F., Lorenz, C., Jaehde, U., et al. (1999). Determination of cyclophosphamide and its metabolites in human plasma by high-

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 729: 297-305

Baxter Oncology. (2015). German Product Summary Endoxan®  
<http://www.fachinfo.de/suche/fi/000728>. Accessed Jan.

Bhutada, P., Mundhada, Y., Bansoda, K., Dixit, P., Umathec, S., et al. (2010). Anticonvulsant activity of berberine, an isoquinoline alkaloid in mice. *Epilepsy Behav.* 18 (3), 207–210. DOI: 10.1016/j.yebeh.2010.03.007

Birdsall, T.C., Kelly, G.S. (1997). Berberine: therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Altern. Med. Rev.* 2 (2), 94–103.

Boddy, A. V., Furtun, Y., Sardas, S. et al. (1992). Individual variation in the activation and inactivation of metabolic pathways of cyclophosphamide. *J Natl Cancer Inst* 84: 1744-8.

Bohnenstengel, F., Hofmann, U., Eichelbaum, M. et al. (1996). Characterization of the cytochrome P450 involved in side-chain oxidation of cyclophosphamide in humans. *Eur J Clin Pharmacol* 51: 297-301.

Borner, K., Kisro, J., Bruggemann, S. K. et al. (2000). Metabolism of ifosfamide to chloroacetaldehyde contributes to antitumor activity in vivo. *Drug Metab Dispos* 28: 573-6.

Boyd, V. L., Robbins, J. D., Egan, W. et al. (1986). <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopic observation of the intracellular transformations of oncostatic cyclophosphamide metabolites. *J Med Chem* 29: 1206-10.

Brock, N., Wilmanns, H. (1958). Effect of a cyclic nitrogen mustard-phosphamid ester on experimentally induced tumors in rats; chemotherapeutic effect and pharmacological properties of B518 ASTA [German]. *Dtsch Med Wochenschr* 83:453–458.

Bronner, A. K., Hood, A. F. (1983). Cutaneous complications of chemotherapeutic agents. *J. Am. Acad. Dermatol.* 9: 645–63.

Bruggemann, S., K., Kisro, J., Wagner, T. (1997). Ifosfamide cytotoxicity on human tumor and renal cells: a role of chloroacetaldehyde in comparison to 4-hydroxyifosfamide. *Cancer Res* 57: 2676-80.

Busse, D., Busch, F. W., Bohnenstengel, F., et al. (1997). Dose escalation of cyclophosphamide in patients with breast cancer: consequences for pharmacokinetics and metabolism. *J Clin Oncol* 15: 1885-96.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Busse, D., Busch, F. W., Schweizer, E. et al. (1999). Fractionated administration of high-dose cyclophosphamide: influence on dose dependent changes in pharmacokinetics and metabolism. *Cancer Chemother Pharmacol* 43: 263-8.
- Candeias, S. M., Gaipl, U. S. (2016). The immune system in cancer prevention, development and therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 16:101–107.
- Cao, S., Zhou, Y., Xu, P., Wang, Y., Yan, J., et al. (2013). Berberine metabolites exhibit triglyceride-lowering effects via activation of AMP-activated protein kinase in Hep G2 cells. *J. Ethnopharmacol.* 149 (2), 576–582. DOI: 10.1016/j.jep.2013.07.025
- Cavallasca, J. A., Costa, C. A., Maliandi, M. D. et al. (2015). Severe infections in patients with autoimmune diseases treated with cyclophosphamide. *Reumatol. Clin.* 11: 221–3.
- Ceballos-Picot, I., Witko-Sarsat, V., Merad-Boudia, M. et al. (1996). “Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 21, no. 6, pp. 845–853.
- Chai, Y. S., Hu, J., Lei, F., Wang, Y. G., Yuan, Z. Y., Lu, X., Du, L. J. (2013). Effect of berberine on cell cycle arrest and cell survival during cerebral ischemia and reperfusion and correlations with p53/cyclin D1 and PI3K/Akt. *European Journal of Pharmacology*, 708(1-3), 44-55.
- Chai, Y. S., Yuan, Z. Y., Lei, F., Wang, Y. G., Hu, J., Du, F., Du, L. J. (2014). Inhibition of retinoblastoma mRNA degradation through Poly (A) involved in the neuroprotective effect of berberine against cerebral ischemia. *PLoS One*, 9(6), e90850. DOI: 10.1371/journal.pone.0090850
- Chan, K. K., Hong, P. S., Tutsch, K. et al. (1994). Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide and metabolites with and without SR 2508. *Cancer Res* 54: 6421-9.
- Chang, T. K. H., Weber, G. F., Crespi, C. L. et al. (1993). Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res* 53: 5629-37.
- Chen, T. L., Kennedy, M. J., Anderson, L. W. et al. 1997. Nonlinear pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide/aldophosphamide in patients with metastatic Breast cancer receiving high-dose chemotherapy followed by autologous bone-marrow transplantation. *Drug Metab Dispos* 25: 544-51.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Chen, W., Wei, S., Yu, Y., Xue, H., Yao, F., Zhang, M., Chen, L. (2016). Pretreatment of rats with increased bioavailable berberine attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury via down regulation of adenosine-5' monophosphate kinase activity. *European Journal of Pharmacology*, 779, 80-90.DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.03.015.
- Chen, Y., Wang, Y., Zhang, J., Sun, C. and Lopez, A. (2011). Berberine improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic rats in association with multiple factors of insulin resistance. *ISRN Endocrinology*, vol. 2011, Article ID 519371.
- Chen, F. L., Yang, Z. H., Liu, Y., et al. (2008). Berberine inhibits the expression of TNF alpha, MCP-1, and IL-6 in AcLDL-stimulated macrophages through PPAR gamma pathway. *Endocrine*, vol. 33, no. 3, pp. 331–337.
- Cheng, X., Kigawa J., Minigawa, Y., et al. (1997). Glutathione-S-transferase-pi expression and glutathione concentration in ovarian carcinoma before and after chemotherapy. *Cancer* 79: 521-7.
- Chitra, P., Saiprasad, G., Manikandan, R., Sudhandiran, G. (2013). Berberine attenuates bleomycin induced pulmonary toxicity and fibrosis via suppressing NF-κB dependant TGF-β activation: abiphasic experimental study. *Toxicol. Lett.* 219 (2), 178–193.DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.03.009
- Choi, B.-H., Ahn, I.-S., Kim, Y.-H., et al. (2006). Berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3-L1 adipocyte. *Experimental andMolecularMedicine*, vol. 38, no. 6, pp. 599–605.
- Chueh, W.-H. and Lin, J.-Y. (2012). Protective effect of isoquinoline alkaloid berberine on spontaneous inflammation in the spleen, liver and kidney of non-obese diabetic mice through downregulating gene expression ratios of pro-/anti- inflammatory and Th1/Th2 cytokines. *Food Chemistry*, vol. 131, no. 4, pp. 1263– 1271.
- Clowse, M., Stone, J. (2015). General toxicity of cyclophosphamide in inflammatory diseases. In: Furst D, editor. *UpToDate*.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: The executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*, 326(Pt 1), 1-16.
- Colvin, M., Brundrett, R. B., Kan, M. N. N., et al. (1976). Alkylating properties of phosphoramidate mustard. *Cancer Res* 36: 1121-6.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Connolly, K. J., Edelman, R. J., Cooke, I. D., et al. (1992). The impact of infertility on psychological functioning. *J Psychosom Res.* 36: 459–468.
- Connors, T. A., Cox, P. J., Farmer, P. B, et al. (1974). Some studies on the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. *Biochem Pharmacol* 23: 115-29.
- Cox, P. J., Phillips, B. J., Thomas, P. (1976). Studies on the selective action of cyclophosphamide (NSC-26271): inactivation of the hydroxylated metabolite by tissue-soluble enzymes. *Cancer Treat Rep* 60: 321-6.
- Crook, T. R., Souhami, R. L., McLean, A. E. (1986). Cytotoxicity, DNA cross-linking, and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells. *Cancer Res* 46(10):5029–34.
- Crook, T. R., Souhami, R. L., Whyman, G. D., et al. (1986). Glutathione depletion as a determinant of sensitivity of human leukaemia cells to cyclophosphamide. *Cancer Res* 46: 5035-8.
- Cui, H. S., Matsumoto, K., Murakami, Y., Hori, H., Zhao, Q., & Obi, R. (2009). Berberine exerts neuroprotective actions against in vitro ischemia induced neuronal cell damage in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of B cell lymphoma 2 phosphorylation suppression. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(1), 79-85.
- Cui, G., Qin, X., Zhang, Y., Gong, Z., Ge, B. and Zang, Y. Q. (2009). Berberine differentially modulates the activities of ERK, p38 MAPK, and JNK to suppress Th17 and Th1 T cell differentiation in type 1 diabetic mice. *Journal of Biological chemistry*, vol. 284, no. 41, pp. 28420–28429.
- D’Incalci M., Bolis G., Facchinetti T., et al. (1979). Decreased half life of cyclophosphamide in patients under continual treatment. *Eur J Cancer* 15: 7-10.
- D’Incalci, M., Bonfanti, M., Pifferi, A., et al. (1998). The antitumour activity of alkylating agents is not correlated with the levels of glutathione, glutathione transferase and O6-alkylguanine DNA-alkyltransferase of human tumour xenografts. *Eur J Cancer* 34: 1749-55.
- De Lamirande, E., Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl.* 13:379–386.
- De Montellano, P. R. (2013). Cytochrome P450-activated prodrugs. *Future Med Chem.* 5:213–228.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Delerive, P., Martin-Nizard, F., Chinetti, G., et al. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circulation Research*, vol. 85, no. 5, pp. 394–402.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., Karin, M. A. (1997). Cytokine responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 388(6642):548–54.
- Dinkova-Kostova, A. T., Abramov, A. Y. (2015). The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med*. 88: 179–188.
- Dirven, H. A., Van Ommen, B., Van Bladeren, P. J. (1994). Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. *Cancer Res* 54: 6215-20.
- Dockham, P. A., Sreerama, L., Sladek, N. E. (1997). Relative contribution of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase to the systemic detoxification of oxazaphosphorines. *Drug Metab Dispos* 25: 1436-41.
- Domitrovic, R., Cvijanović, O., Pernjak-Pugel, E., Škoda, M., Mikelić, L., et al. (2013). Berberine exerts nephroprotective effect against cisplatin-induced kidney damage through inhibition of oxidative/nitrosative stress, inflammation, autophagy and apoptosis. *FoodChem. Toxicol*. 62, 397–406.
- Drumond AL, W. C., Wang, G., Chiarini-Garcia, H., Eras-Garcia, L., Meistrich, M.L. (2011). Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. *Reprod Toxicol* Dec;32(4): 395-406.
- DuBois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., et al. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*, vol. 12, no. 12, pp. 1063–1073.
- Durairajan, S. S., Liu, L. F., Lu, J. H., Chen, L. L., Yuan, Q., Chung, S. K., Li, M. (2012). Berberine ameliorates beta - amyloid pathology, gliosis, and cognitive impairment in an Alzheimer's disease transgenic Mouse model. *Neurobiology of Aging*, 33(12), 2903-2919.
- Edwards G., Calvert R. T., Crowther D., et al. 1(980). Repeated investigations of cyclophosphamide disposition in myeloma patients receiving intermittent chemotherapy. *Br J Clin Pharmacol* 10: 281-5.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- El-Agamy, D. S., Elkablawy, M. A., Abo-Haded, H.M. (2017). Modulation of cyclophosphamide-induced cardiotoxicity by methyl palmitate. *Cancer Chemother.Pharmacol.*79: 399-409.DOI: 10.1007/s00280-016-3233-1
- Elangovan, N., Chiou, T-J., Tzeng, W-F., et al. (2006). Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology.* 222: 60–70.
- Emadi, A., Jones, R. J., Brodsky, R. A., (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol*6:638–647.
- Erel, O. A. (2005). New automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 38(12): 1103-11.
- Fatani, A. G., Darweesh, A. Q., Rizwan, L., Aleisa, A. M., Al-Shabanah, O. A., Sayed-Ahmed, M.M. (2010). Carnitine deficiency aggravates cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. *Chemotherapy*56 :71–81.DOI: 10.1159/000298822
- Faurschou, M., Sorensen, I. J., Mellekjær, L., Loft A. G., Thomsen, B. S., Tvede, N., et al. (2008). Malignancies in Wegener's granulomatosis: incidence and relation to cyclophosphamide therapy in a cohort of 293 patients. *J. Rheumatol.*35:100–5.
- Feng, A.-W., Gao, W., Zhou, G.-R., et al. (2012). Berberine ameliorates COX-2 expression in rat small intestinal mucosa partially through PPAR $\gamma$  pathway during acute endotoxemia. *International Immunopharmacology*, vol. 12, no. 1, pp. 182–188.DOI: 10.1016/j.intimp.2011.11.009
- Fenselau, C., Kan, M. N. N., Rao, S. S., et al. (1977). Identification of aldophosphamide as a metabolite of cyclophosphamide in vitro and in vivo in humans. *Cancer Res* 37: 2538-43.
- Fleer, R., Brendel, M. (1981). Toxicity, interstrand cross-links and DNA fragmentation induced by 'activated' cyclophosphamide in yeast. *Chem Biol Interact*37:123–140.
- Friedman, O. M., Wodinsky, I., Myles A. (1976). Cyclophosphamide (NSC-26271)-related phosphoramidate mustards: recent advances and historical perspective. *Cancer Treat Rep* 60: 337-46.
- Fuks, J. Z., Egorin, M. J., Aisner, J., et al. (1981). Cyclophosphamide of dimethylsulfoxide in the treatment of squamous carcinoma of the lung. *Cancer Chemother Pharmacol* 6: 117-20.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Gamsik, M. P., Dolan, M. E., Andersson, B. S., et al. (1999). Mechanisms of resistance to the toxicity of cyclophosphamide. *Curr Pharm Des* 5: 587-605.
- Germoush, M.O., Mahmoud, A.M. (2014). Berberine mitigates cyclophosphamide- induced hepatotoxicity by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. *J. CancerRes. Clin. Oncol.* 140 (7), 1103–1109.DOI: 10.1007/s00432-014-1665-8.
- Green, D. R, Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 1309–1312.
- Gheuens, E., Slee, P. H., De Bruijn, E. A. (1990). Bioavailability of cyclophosphamide in the CMF regimen. *Onkologie* 13: 203-6.
- Ghobadi, E., Moloudizargari, M., Asghari, M. H. & Abdollahi, M. (2017). The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*13: 5, 525–536.
- Ghosh, S., Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109(Suppl.): S81–96.
- Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M. and Creager, M. A., (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, vol. 114, no. 6, pp. 597– 605.
- Gratas-Delamarche, A., Derbr'e, F., Vincent, S., Cillardand J. (2014). Physical inactivity, insulin resistance, and the oxidative inflammatory loop. *Free Radical Research*, vol. 48, no. 1, pp. 93–108.DOI: 10.3109/10715762.2013.847528
- Gui, S.Y., Wu, L., Peng, D.Y., Liu, Q.Y., Yin, B. P., etal. (2008). Preparation and evaluation of a micro emulsion for oral delivery of berberine. *Pharmazie* 63 (7), 516– 519.
- Gurtoo, H. L., Hipkens, J. H., Sharma, S. D. (1981). Role of glutathione in the metabolism-dependent toxicity and chemotherapy of cyclophosphamide. *Cancer Res* 41: 3584-91.
- Hadidi, A. H. F. A., Coulter, C. E. A., Idle, J. R. (1988). Phenotypically deficient urinary elimination of carboxyphoshamide after cyclophosphamide administration to cancer patients. *Cancer Res* 48: 5167-71.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Hamsa, T. P., Kuttan, G. (2011). Protective role of *Ipomoea obscura* (L.) on cyclophosphamide-induced uro- and nephrotoxicities by modulating antioxidant status and pro-inflammatory cytokine levels. *Inflammopharmacology*. 19: 155–167.
- High, W., (2013). Cytotoxic agents. In: Wolverton SE (ed.). *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy*, 3rd edn. Amsterdam: Elsevier, 212–27.
- Highley, M. S., Schrijvers, D., Van Oosterom, A. T., et al. (1997). Activated oxazaphosphorines are transported predominantly by erythrocytes. *Ann Oncol* 8: 1139-44.
- Highley, M. S., Harper, P. G., Slee, P. H., et al., 1996. Preferential location of circulating activated cyclophosphamide within the erythrocyte. *Int J Cancer* 65: 711-2.
- Hilton, J. (1984). Deoxyribo nucleic acid crosslinking by 4-hydroxyperoxycyclophosphamide-sensitive and resistant L1210 cells. *Biochem Pharmacol* 33: 1867-72.
- Hilton, J. (1984a). Role of aldehyde dehydrogenase in cyclophosphamide-resistant L1210 leukemia. *Cancer Res* 44(11):5156–60.
- Hohorst, H. J., Bielicki, L., Voelcker, G. (1986). The enzymatic basis of cyclophosphamide specificity. *Adv Enzyme Regul* 25: 99-122.
- Hohorst, H. J., Ziemann, A., Brock, N. (1971). 4-Ketocyclophosphamide, a metabolite of cyclophosphamide: formation, chemical and biological properties. *Arzneimittelforschung* 21: 1254-7.
- Hoorweg-Nijman, J. J., Delemarre-Van De Waal, H. A., De Waal, F. C., et al. (1992). Cyclophosphamide-induced disturbance of gonadotropin secretion manifesting testicular damage. *Acta Endocrinol.* 126:143–148.
- Horton, N. D., Biswal, S. S., Corrigan, L. L., Bratta J., Kehrer, J. P. (1999). Acrolein causes inhibitor kappaB-independent decreases in nuclear factor kappaB activation in human lung adenocarcinoma (A549) cells. *J Biol Chem* 274(14):9200–6.
- Horton, N. D., Mamiya, B. M., Kehrer, J. P. (1997). Relationships between cell density, glutathione and proliferation of A549 human lung adeno carcinoma cellstreated with acrolein. *Toxicology* 122(1–2):111–22.
- Hsu, Y. Y., Tseng, Y. T. and Lo, Y. C. (2013). Berberine, a natural antidiabetes drug, attenuates glucose neurotoxicity and promotes Nrf2-related neurite

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- out growth. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 272, no. 3, pp. 787–796. DOI: 10.1016/j.taap.2013.08.008
- Hsu, Y.-Y., Chen, C.-S., Wu, S.-N., Jong, Y.-J. and Lo, Y.-C. (2012). Berberine activates Nrf2 nuclear translocation and protects against oxidative damage via a phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt-dependent mechanism in NSC34 motor neuron- like cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 46, no. 5, pp. 415–425. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.03.004.
- Hu, J., Chai, Y., Wang, Y., Kheir, M. M., Li, H., Yuan, Z., Du, L. (2012). PI3K p55 gamma promoter activity enhancement is involved in the anti - apoptotic effect of berberine against cerebral ischemiare perfusion. *European Journal of Pharmacology*, 674(2-3), 132-142. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.11.014
- Hua, W., Ding, L., Chen, Y., Gong, B., He, J., etal. (2007). Determination of berberine in human plasma by liquid chromatography– electrosprayionization-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44,931–937.
- Hu, Y., Young, A. J., Ehli, E. A., Nowotny, D., Davies, P. S., Droke, E. A. et al. (2014). Metforminand berberine prevent olanzapine-induced weight gain in rats. *PLoS One*.9(3): e93310
- Huang, Z., Roy P., Waxman, D. J. (2000). Role of liver microsomal CYP 3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochem Pharmacol* 59: 961-72.
- Iqubala, A., Iqubalb, M. K., Sharmaa, S., Ansaria, M. A., Najmia, A. K., Alic, S. M., Alib, J., Haquea, S. E. (2019). Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-inducedcardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sciences* 218:112–131.
- James, D., Adams, J. (1993). Acrolein-induced oxigen radical formation. *Free Radic Biol Med.* 15: 187–193.
- Jana, K., Jana, S., Samanta, P. K, (2006). Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol*.4: 9.
- Jardine, I., Fenselau, C., Appler, M., et al. (1978). Quantitation by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry of cyclophosphamide, phosphoramidate mustard, and nornitrogen mustard in the plasma and urine of patients receiving cyclophosphamide therapy. *Cancer Res* 38: 408-15.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Jarman, M., Milsted, R. A. V., Smyth, J. F., et al. (1979). Comparative metabolism of 2-[bis(2-chloroethyl)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine-2-oxide (cyclophosphamide) and its enantiomers in humans. *Cancer Res* 39: 2762-7.
- Jeong, H. W., Hsu, K. C., Lee, J.-W., et al. (2009). Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, vol. 296, no. 4, pp. E955– E964.
- Jia, L., Liu, J., Song, Z., et al. (2012). Berberine suppresses amyloid beta-induced inflammatory response in microglia by inhibiting nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 64, no. 10, pp. 1510–1521.
- Jiang, Q., Liu, P., Wu, X., et al. (2011). Berberine attenuates lipopolysaccharide-induced extracellular matrix accumulation and inflammation in rat mesangial cells: involvement of NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 331, no. 1, pp. 34–40.
- Joqueviel, C., Martino, R., Gilard, V., et al. (1998). Urinary excretion of cyclophosphamide in humans, determined by phosphorous-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Drug Metab Dispos* 26: 418-28.
- Juma, F. D. (1984). Effect of liver failure on the pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Eur J Clin Pharmacol* 26: 591-3.
- Juma, F. D., Rogers, H. J., Trounce, J. R. (1979a). Pharmacokinetics of cyclophosphamide and alkylating activity in man after intravenous and oral administration. *Br J Clin Pharmacol* 8: 209-17.
- Juma, F. D., Rogers, H. J., Trounce, J. R. (1979). The kinetics of salivary elimination of cyclophosphamide in man. *Br J Clin Pharmacol* 8: 455-8.
- Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of I $\kappa$ B kinase activity through IKK $\beta$  subunit phosphorylation. *Science*, vol.284, no. 5412, pp. 309–313.
- Kehrer, J. P., Biswal, S. S. (2000). The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci* 57(1):6–15.
- Kheir, M.M., Wang, Y., Hua, L., Hu, J., Li, L. et al. (2010). Acute toxicity of berberine and its correlation with the blood concentration in mice. *FoodChem.Toxicol.* 48 (4),1105– 1110.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO). (2012). KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2(Suppl. 2):1–216.
- Kim, J. M., Ghosh, S. R., Weil, A. C., Zirkin, B. R. (2001). Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone, *Endocrinology* 142:3809–3816.
- Kim, M., Cho, K. H., Shin, M. S., Lee, J. M., Cho, H. S., Kim, C. J., ... Yang, H.J. (2014). Berberine prevents nigrostriatal dopaminergic neuronal loss and suppresses hippocampal apoptosis in mice with Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 33(4), 870-878.DOI: 10.3892/ijmm.2014.1656
- Kohn, F. R., Landkamer, G. J., Manthey, C. L., Ramsay, N. K., Sladek, NE. (1987). Effect of aldehyde dehydrogenase inhibitors on the ex vivo sensitivity of human multipotent and committed hematopoietic progenitor cells and malignant blood cells to oxazaphosphorines. *Cancer Res* 47(12):3180–5.
- Komal, S., Ranjan, B., Neelam, C., Birendra, S., Kumar, N. (2011). Berberis Aristata: a review. *Int.J. Res. Ayurveda Pharm.* 2 (2), 383–388.
- Korkmaz, A., Topal, T., Oter, S. (2007). Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol Toxicol* 23 (5):303–12.
- Korsmeyer, S., Wei, M., Saito, M., Weiler, S., Oh, K., Schlesinger, P. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 7:1166.
- Koyama, H., Wada, T., Nishizawa, Y., Iwanaga, T., Aoki, Y. (1977). Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. *Cancer* 39(4):1403–9.
- Krishan, S., Richardson, D. R., & Sahni, S. (2015). Adenosine monophosphate activated kinase and its key role in catabolism: Structure, regulation, biological activity, and pharmacological activation. *Molecular Pharmacology*, 87(3), 363-377.DOI: 10.1124/mol.114.095810
- Kronbichler, A., Jayne, D. R., Mayer, G. (2015). Frequency, risk factors and prophylaxis of infection in ANCA-associated vasculitis. *Eur. J.Clin. Invest.* 45: 346–68.DOI: 10.1111/eci.12410
- Kulkarni, S. K., Dhir, A. (2010). Berberine: a plant alkaloid with therapeutic



## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- potential for central nervous system disorders. *Phytother. Res.* 24 (3), 317–324.
- Kuo, C.-L., Chi, C.-W. and Liu, T.-Y. (2004). The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, vol. 203, no. 2, pp. 127–137.
- Laamech, J., el-Hilaly, J., Fetoui H. et al. (2017). Berberis vulgaris L., effects on oxidative stress and liver injury in lead-intoxicated mice. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*.14:1.
- Langford, C. A. (2011). Cyclophosphamide as induction therapy for Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Clin. Exp. Immunol.* 164: 31–4.
- Lao-ong, T., Chatuphonprasert, W., Nemoto, N., Jarukamjorn, K. (2012). Alteration of hepatic glutathione peroxidase and superoxide dismutase expression in streptozotocin-induced diabetic mice by berberine. *Pharm.Biol.* 50 (8), 1007–1012.DOI: 10.3109/13880209.2012.655377
- Latta, K., von Schnakenburg, C., Ehrich, J. H. (2001). A meta-analysis of cytotoxic treatment for frequently relapsing nephrotic syndrome in children. *Pediatr. Nephrol.*16:271–82.
- Lawson, M., Vasilaras, A., De Vries, A., et al. (2008). Urological implications of cyclophosphamide and ifosfamide. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 42: 309–17.
- Lee, F. Y. F. (1991). Glutathione diminishes the anti-tumour activity of 4-hydroxyperoxycyclophosphamide by stabilizing its spontaneous breakdown to alkylating metabolites. *Br J Cancer* 63: 45-50.
- Lee, C.-H., Chen, J.-C., Hsiang, C.-Y., Wu, S.-L., Wu, H.-C. and Ho, T.-Y. (2007). Berberine suppresses inflammatory agents-induced interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  productions via the inhibition of I $\kappa$ B degradation in human lung cells. *Pharmacological Research*, vol. 56, no. 3, pp. 193–201.
- Lee, D., Bae, J., Kim, Y. K., et al. (2013). Inhibitory effects of berberine on lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and the high-mobility group box 1 release in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 431, no. 3, pp. 506–511.DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.143.
- Lee, Y. S., Kim, W. S., Kim, K. H., Yoon, M. J., Cho, H. J., Shen, Y., Ye, J., Lee, C. H. et.al. (2006). Berberine, a Natural Plant Product, Activates AMP-Activated Protein Kinase With Beneficial Metabolic Effects in Diabetic

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- and Insulin-Resistant States. American Diabetes Association. 55:2256–2264. DOI: 10.2337/db06-0006
- Li, J., Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*27:6194.
- Li, J., Pan, Y., Kan, M., Xiao, X., Wang, Y., et al. (2014a). Hepatoprotective effects of berberine on liver fibrosis via activation of AMPK-activated protein kinase. *Life Sci.* 98, 24–30.
- Li, J., Zeng, Z., Viollet, B., Ronnett, G. V., & McCullough, L. D. (2007). Neuroprotective effects of adenosine monophosphate - activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke. *Stroke*, 38(11), 2992-2999.
- Li, M. H., Zhang, Y. J., Yu, Y. H., Yang, S. H., Iqbal, J., et al. (2014b). Berberine improves pressure overload-induced cardiac hypertrophy and dysfunction through enhanced autophagy. *Eur. J. Pharmacol.* 728, 67–76. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.01.061
- Li, Z, Geng, Y. N., Jiang, J. G. & Kong, W. J. (2014). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Berberine in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/289264>
- Liang, Y., Huang, M., Jiang, X., Liu, Q., Chang, X., & Guo, Y. (2017). The neuroprotective effects of Berberine against amyloid beta protein induced apoptosis in primary cultured hippocampal neurons via mitochondria related caspase pathway. *Neuroscience Letters*, 655, 46-53. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.06.048
- Lin, W.-C. and Lin, J.-Y. (2011). Five bitter compounds display different anti-inflammatory effects through modulating cytokine secretion using Mouse primary splenocytes in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 1, pp. 184–192.
- Lind, M. J., McGown, A. T., Hadfield, J. A., et al. (1989). The effect of ifosfamide and its metabolites on intracellular glutathione levels in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 38: 1835-40.
- Linn, Y. C., Lu, J., Lim, L. C., Sun, H., Sun, J. et al. (2012). Berberine-induced haemolysis revisited: safety of *Rhizoma coptidis* and *Cortex phellodendri* in chronic haematological diseases. *Phytother. Res.* 26(5), 682–686. DOI: 10.1002/ptr.3617

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Liu, Y.T., Hao, H.P., Xie, H.G., Lai, L., Wang, Q., et al. (2010). Extensive intestinal first- pass elimination and predominant hepatic distribution of berberine explain its low plasma levels in rats. *Drug Metab. Dispos.* 38, 1779–1784.
- Lou, T., Zhang, Z., Xi, Z., et al. (2011). Berberine inhibits inflammatory response and ameliorates insulin resistance in hepatocytes. *Inflammation*, vol. 34, no. 6, pp. 659–667.
- Lu, J., Cao, Y., Cheng, K., Xu, B., Wang, T., Yang, Q., ... Xia, Q. (2015). Berberine regulates neurite outgrowth through AMPK - dependent pathways by lowering energy status. *Experimental Cell Research*, 334(2), 194-206.DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.04.006
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 53: 401–426.
- Ma, J.Y., Feng, R., Tan, X.S., Ma, C., Shou, J.W., et al. (2013b). Excretion of berberine and its metabolites in oral administration in rats. *J. Pharm. Sci.* 102 (11), 4181–4192.DOI: 10.1002/jps.23718
- Madondo, M.T., Quinn, M., Plebanski, M. (2016). Anti-Tumour TreatmentLow dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treatment Reviews. Elsevier* 42: 3–9.DOI: 10.1016/j.ctrv.2015.11.005
- Maeng, H.J., Yoo, H.J., Kim, I.W., Song, I.S., Chung, S.J., et al. (2002). P-glycoprotein- mediated transport of berberine across Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Sci.* 91 (12), 2614–2621.
- Manoharan, S., Muneeswaran, M., Baskaran, N. (2010). Chemo preventive efficacy of berberine in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Int. J. Res. Pharm. Sci.*1 (4),521–529. DOI: 10.1080/01635581.2012.718032
- Manthey, C. L., Sladek, N. E. (1989). Aldehyde dehydrogenase-catalyzed bioinactivation of cyclophosphamide. *Prog Clin Biol Res* 290: 49-63.
- Marinello, A. J., Gurtoo, H. L., Struck, R. F., et al. (1978). Denaturation of cytochrome P-450 by cyclophosphamide metabolites. *Biochem Biophys Res Commun* 83: 1347-53.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., and Watkins III, J. B. (2003). “Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review,” *Journal of Biochemicaland Molecular Toxicology*, vol. 17, no. 1, pp. 24–38.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Martin, F., Lauwerys, B., Lefebvre, C. et al. (1997). Side effects of intravenous cyclophosphamide pulse therapy. *Lupus*; 6: 254–7.
- Maurer, U., Preiss, F., Brauns - Schubert, P., Schlicher, L., & Charvet, C. (2014). GSK - 3-At the crossroads of cell death and survival. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 7), 1369-1378.
- McCullough, L. D., Zeng, Z., Li, H., Landree, L. E., McFadden, J., & Ronnett, G. V. (2005). Pharmacological inhibition of AMP - activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20493-20502.
- Meistrich, M. L., Shetty, G. (2008). Hormonal suppression for fertility preservation in males and females. *Reproduction*. 136: 691–701.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., et al. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation. *Science*, vol. 278, no. 5339, pp. 860–866.
- Middeldorp, J., Hol, E.M. (2011). GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* 93 (3), 421–443.
- Milsted, R. A. V., Jarman, M. (1982). Metabolism of high doses of cyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol* 8: 311-3.
- Mima, A., (2013). Inflammation and oxidative stress in diabetic nephropathy: new insights on its inhibition as new therapeutic targets. *Journal of Diabetes Research*, vol. 2013, Article ID 248563, 8 pages.
- Mo, C., Wang, L., Zhang J., et al. (2013). The cross talk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin- shocked mice. *Antioxidants & Redox Signaling*. DOI: 10.1089/ars.2012.5116
- Moghaddam, K., Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., Khaksari, M., Norouzi, P., et al. (2014). Berberine ameliorate oxidative stress and astrogliosis in the hippocampus of STZ-induced diabetic rats. *Mol. Neurobiol.* 49 (2), 820–826.
- Monach, P. A., Arnold, L. M., Merkel, P. A. (2010). Incidence and prevention of bladder toxicity from cyclophosphamide in the treatment of rheumatic diseases: a data-driven review. *Arthritis Rheum.* 62: 9–21.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Moreb, J., Schweder, M., Suresh, A., et al. (1996). Overexpression of the human aldehyde dehydrogenase class I results in increased resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Cancer Gene Ther* 3: 24-30.
- Morgan, M. J., Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* 21(1):103–15.
- Motawi, T. M. K., Sadik, N. A. H., Refaat, A. (2010). Cyto protective effects of DLalpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: an experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder. *Food Chem Toxicol.* 48: 2326–2336.
- Myers, C. E., Hoelzinger, D. B., Truong, T. N., Chew, L. A., Myles, A., Chaudhuri, L., Cohen, P. A. et. al. (2017). Chemotherapy can induce weight normalization of morbidly obese mice despite undiminished ingestion of high fat diet. *Oncotarget*, 8, 5426–5438.
- Ndisang, J. F. (1997). Role of heme oxygenase in inflammation, insulin-signalling, diabetes and obesity. *Mediators of Inflammation*, vol. 2010, Article ID 359732, 2010.
- Olszewska, M., Kolacinska-Strasz, Z., Sulej, J., et al. (2007). Efficacy and safety of cyclophosphamide, azathioprine and cyclosporine as adjuvant drugs in pemphigus vulgaris. *Am. J. Clin. Dermatol.* 8: 85–92.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl - 2 hetero dimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(4), 609-619.
- Onaolapo, A. Y., Oladipo, B. P., Onaolapo, O. J. (2017). Cyclophosphamide-induced male subfertility in mice: An assessment of the potential benefits of Maca supplement. *Andrologia*. e12911. DOI: 10.1111/and.12911.
- Osawa, T., Davies, D., Hartley, J. A. (2011). Mechanism of cell death resulting from DNA interstrand cross-linking in mammalian cells. *Cell Death Dis* 2:e187.
- Othman, M., Safwat, G., Aboulkhair, M., AbdelMoneim, A.E. (2014). The potential effect of berberine inmercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *Food Chem.Toxicol.* 69C, 175–181.
- Oyagbemi, A. A., Omobowale, T. O., Saba, A. B., Adedara, I. A., Olowu, E. R., Akinrinde, A. S., Dada, R. O. (2016). Gallic acid protects against cyclophosphamide-induced toxicity in testis and epididymis of rats. *Andrologia* 48, 393–401. DOI: 10.1111/and.12459.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Pandey, M. K., Sung, B., Kunnumakkara, A. B., Sethi, G., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. (2008). Berberine modifies cysteine 179 of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase, suppresses nuclear factor- $\kappa$ B-regulated antiapoptotic gene products, and potentiates apoptosis. *Cancer Research*, vol. 68, no. 13, pp. 5370–5379.
- Parekh, H. K., Sladek, N. E. (1993). NADPH-dependent enzyme-catalyzed reduction of aldophosphamide, the pivotal metabolite of cyclophosphamide. *Biochem Pharmacol* 46: 1043-52.
- Park, E.-S., Kang, J. C., Jang, Y. C., Park, J. S., Jang, S. Y., Kim, D.-E., Kim, B., Shin, H.-S. (2014). Cardio protective effects of rhamnetin in H9c2 cardio myoblast cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis. *J. Ethnopharmacol.* 153:552–560.
- Pasceri, V., Wu, H. D., Willerson, J. T. and Yeh, E. T. H. (2000). Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activators. *Circulation*, vol. 101, no. 3, pp. 235–238.
- Perreault, M. and Marette, A. (2001). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nature Medicine*, vol. 7, no. 10, pp. 1138– 1143.
- Peters, R. H., Jollow, D. J., Stuart, R. K. (1991). Role of glutathione in the in vitro synergism between 4-hydroperoxy-cyclophosphamide and cisplatin in leukemia cell lines. *Cancer Res* 51: 2536-41.
- Pinto, N., Ludeman, S. M., Dolan, M. E. (2009). Drug focus: pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy. *Pharmacogenomics* 10:1897–1903.
- Pocernich, C. B., Cardin, A. L., Racine, C. L., Lauderback, C. M., Butterfield, D. A. (2001). Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease. *Neurochem Int* 39(2):141–9.
- Pongkittiphan, V., Chavasiri, W. and Subabphol, R. (2015). Antioxidant effect of berberine and its phenolic derivatives against human fibrosarcoma cells. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevantion.* 16:13,5371-5376.
- Ponticelli, C., Escoli, R., Moroni, G., (2018). Review; Does cyclophosphamide still play a role in glomerular diseases? *Autoimmunity Reviews* 17: 1022–1027.DOI: 10.1016/j.autrev.2018.04.007

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Potnuri, A. G., Allakonda, L., Lahkar, M. (2018). Crocin attenuates cyclophosphamide induced testicular toxicity by preserving glutathione redox system. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 101:174–180. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.068>
- Pugazhenthii, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K. A., Boxer, L. M., Heasley, L. E. & Reusch, J. E. (2000). Akt/protein kinase B up - regulates Bcl - 2 expression through cAMP - response element - binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 10761-10766.
- Qiu, F., Zhu, Z., Kang, N., Piao, S., Qin, G., et al. (2008). Isolation and identification of urinary metabolites of berberine in rats and humans. *DrugMetab. Dispos.* 36 (11), 2159–2165.
- Rafiee, F., Nejati, V., Heidari, R., Ashraf, H. (2016). Protective effect of methanolic extract of *Berberis integerrima* Bunge. Root on carbon tetrachloride-induced testicular injury in Wistar rats. *Int J Reprod BioMed Vol.* 14. No. 2. pp: 133-140.
- Remppis, A., Bea, F., Greten, H. J., et al. (2010). Rhizoma coptidis inhibits LPS- induced MCP-1/CCL2 production in murine macrophages via an AP-1 and NF B- dependent pathway. *Mediators of Inflammation*, vol. 2010, Article ID194896, 8 pages.DOI: 10.1155/2010/194896
- Ren, S., Kalthorn, T. F., McDonald, G. B., et al. (1998). Pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites in bone marrow transplantation patients. *Clin Pharmacol Ther* 64: 289-301.
- Ren, S., Kalthorn, T. F., Slattery, J. T. (1999). Inhibition of human aldehyde dehydrogenase 1 by the 4-hydroxycyclophosphamide degradation product acrolein. *Drug Metab Dispos* 27: 133-7.
- Ren, S., Yang, J. S., Kalthorn, T. F., et al. (1997). Oxidation of cyclophosphamide to 4-hydroxycyclophosphamide and deschloroethyl cyclophosphamide in human liver microsomes. *Cancer Res* 57: 4229-35.
- Richardson, M. E., Siemann, D. W. (1995). DNA damage in cyclophosphamide-resistant tumor cells: the role of glutathione. *Cancer Res* 55: 1691-5.
- Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. and Glass, C. K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, vol. 391, no. 6662, pp. 79–82.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Roy, J., Palapati, P., Bettaieb, A., et al. (2009). Acrolein induces a cellular stress response and triggers mitochondrial apoptosis in A549 cells. *ChemBiol Interact.* 181:154–167.
- Ryan, L., O’Callaghan, Y. C., O’Brien, N. M. (2004). Generation of an oxidative stress precedes caspase activation during 7beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis in U937 cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 18:50–59.
- Sakura, M., Masuda, H., Matsuoka, Y., Yokoyama, M., Kawakami, S., Kihara, K. (2009). Rolipram, a specific type-4 phosphodiesterase inhibitor, inhibits cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in rats. *BJU Int* 103: 264–269.
- Salimnejad, R., Rad, J. S., Nejad, D. M., Roshangar, L. (2018). Effect of ghrelin on total antioxidant capacity, lipidperoxidation, sperm parameters and fertility in mice against oxidative damage caused by cyclophosphamide. *Andrologia.* 50: e12883. DOI: 10.1111/and.12883.
- Salimnejad, R., Sazegar, G., Saeedi Borujeni, M. J., Mousavi, S. M., Salehi, F., & Ghorbani, F. (2017). Protective effect of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* on diabetes-induced testicular damage and serum testosterone concentration. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 15(4), 195–202.
- Schiattarella, G.G., Boccella, N., Paolillo, R., Cattaneo, F., Trimarco, V., Franzone, A., D’Apice, S., Giugliano, L., Borzacchiello Rinaldi, D. (2018). Loss of akap1 exacerbates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and failure. *Front. Physiol.* 9:558.
- Schonthaler, H. B., Guinea-Viniegra, J. and Wagner, E. F. (2011). Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 70, no. 1, pp. i109–i112.
- Schwartz, P.S., Waxman, D.J. (2001). Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. *Mol. Pharmacol.* 60:1268–1279.
- Selvakumar, E., Prahalathan, C., Mythili, Y., Varalakshmi, P. (2004). Protective effect of dl- $\alpha$ -lipoic acid in cyclophosphamide induced oxidative injury in rat testis. *Reproductive Toxicology* 19:163–167.
- Selvakumar, E., Prahalathan C., Mythili Y., et al. (2005). Beneficial effects of dl- $\alpha$ -lipoic acid on cyclophosphamide-induced oxidative stress in mitochondrial fractions of rat testis. *Chem Biol Interact.* 152:59–66.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Sen, P., Mukherjee, S., Ray, D., & Raha, S. (2003). Involvement of the Akt/PKB signaling pathway with disease processes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 253(1-2), 241-246.
- Shaker, R. A., Abboud, S. H., Assad, H. C., Hadi, N. (2018). Enoxaparin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 19:3.
- Shang, W., Liu, J., Yu, X. and Zhao, J. (2010). Effects of berberine on serum levels of inflammatory factors and inflammatory signaling pathway in obese mice induced by high fat diet. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, vol. 35, no. 11, pp. 1474–1477.
- Shen, C. Y., Jiang, J. G., Yang, L., Wang, D. W., & Zhu, W. (2017). Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: Pharmacological mechanisms and implications for drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1395-1425.DOI: 10.1111/bph.13631
- Shi, J. and Wei, L. (2013). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology: the effect of fasudil. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, vol. 62, no. 4, pp. 341–354.DOI: 10.1097/FJC.0b013e3182a3718f
- Shirwaikar, A., Rajendran, K., Punitha, I.S. (2006). In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (9), 1906–1910.
- Singh, D.P., Chopra, K. (2013). Verapamil augments the neuroprotectant action of berberine in rat model of transient global cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* 720 (1–3), 98–106.DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.10.043
- Singh, J., Kakkar, P. (2009). Anti hyperglycemic and antioxidant effect of *Berberis aristata* root extract and its role in regulating carbohydrate metabolism in diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 123 (1), 22–26.
- Sladek, N. E. (1988). Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacol Ther* 37: 301-55.
- Sladek, N. E., Landkamer, G. J. (1985). Restoration of sensitivity to oxazaphosphorines by inhibitors of aldehyde dehydrogenase activity in cultured oxazaphosphorine-resistant L1210 and crosslinking agent resistant P388 cell lines. *Cancer Res* 45: 1549-55.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Song, Y., Zhang, C., Wang, C., Zhao, L., Wang, Z., Dai, Z., Lin, S., Kang, H., Ma, X. (2016). Ferulic acid against cyclophosphamide-induced heart toxicity in mice by inhibiting NF- $\kappa$ B pathway. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*
- Springer, J. B., Colvin, M. E., Colvin, O. M., Ludeman, S. M. (1998). Isophosphoramidate mustard and its mechanism of bisalkylation. *J Org Chem* 63(21):7218–22.
- Sreerama, L., Sladek, N. E. (1993). Identification and characterization of a novel class 3 aldehyde dehydrogenase overexpressed in a human breast adeno carcinoma cell line exhibiting oxazaphosphorine-specific acquired resistance. *Biochem Pharmacol* 45: 2487-505.
- Struck, R. F., Alberts, D. S., Horne, K, et al. (1987). Plasma pharmacokinetics of cyclophosphamide and its cytotoxic metabolites after intravenous versus oral administration in a randomized, crossover trial. *Cancer Res* 47: 2723-6.
- Struck, R. F., Kirk, M. C., Witt, M. H., et al. (1975). Isolation and mass spectral identification of blood metabolites of cyclophosphamide: evidence for phosphoramidate mustard as the biologically active metabolite. *Biomed Environ Mass Spectrom* 2: 46-52.
- Sun, Y., Ito, S., Nishio, N., Tanaka, Y., Chen, N., Isobe, K. (2014). Acrolein induced both pulmonary inflammation and the death of lung epithelial cells. *Toxicol Lett* 229(2):384–92.DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.06.021
- Takamizawa, A., Tochino, Y., Hamashima, Y., et al. (1972). Studies on cyclophosphamide metabolites and their related compounds: I. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 20: 1612-6.
- Tan, X.S., Ma, J.Y., Feng, R., Ma, C., Chen, W.J., et al. (2013). Tissue distribution of berberine and its metabolites after oral administration in rats. *PLoS One* 8 (10), e77969.
- Tanel, A., Averill-Bates, D. A. (2007). Inhibition of acrolein-induced apoptosis by the antioxidant N-acetylcysteine. *J Pharmacol Experiment Ther* 321 (1):73–83.
- Tang, Q.L., Wei, W., Chen, L., Liu, S. (2006). Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats. *J. Ethnopharmacol.* 108 (1), 109–115.
- Tanner, B., Hengstler, J. G., Dietrich, B., et al. (1997). Glutathione, glutathione S-transferase alpha and pi, and aldehyde dehydrogenase

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- content in relationship to drug resistance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 65: 54-62.
- Tasso, M. J., Boddy, A. V., Price, L., et al. (1992). Pharmacokinetics and metabolism of cyclophosphamide in paediatric patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 30: 207-11.
- Tew, K. D. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 54: 4313-20.
- Thandavarayan, R.A., Watanabe, K., Ma, M., Gurusamy, N., Veeraveedu, P.T., Konishi, T., Zhang, S., Muslin, A.J., Kodama, M., Aizawa, Y. (2009). Dominant-negative p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase prevents cardiac apoptosis and remodeling after streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Am. J. Phys. Heart Circ. Phys.* 297:H911–H919.
- Trasler, J. M., Hales, B., Robaire, B. (1987). A time-course study of chronicpaternal cyclophosphamide treatment in rats: effects on pregnancy outcome and the male reproductive and hematologic systems. *BiolReprod.* 37: 317–326.
- Trasler, J. M., Hermo, L., Robaire, B. (1988). Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. *Biol Reprod.* 38: 463–479.
- Trasler, J. M., Robaire, B. (1988). Effects of cyclophosphamide on selected cytosolic and mitochondrial enzymes in the epididymis of the rat. *J Androl.* 9: 142–152.
- Türk, G, C. A., Sakin, F, Sönmez, M, Ateşşahin, A. (2010). Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 22(4): 587-596,
- Ucar, M., Korkmaz, A., Reiter, R. J. (2007). Melatonin alleviates lung damage induced by the chemical warfare agent nitrogen mustard. *Toxicol Lett.* 173:124–131.
- Ungvari, Z., Gupte, S.A., Recchia, F.A., Bátkai, S., Pacher, P. (2005). Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 3 :221–229.
- Vernet, P., Aitken, R., Drevet, J. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol.* 216:31–39.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Vladimir-Knezevic, S., Blazekovic, B., Kindl, M., Vladic, J., Lower-Nedza, A. D., Brantner, A. H. (2014). Acetylcholin esterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules*. 19:767–782.
- Voelker, G., Bielicki, L., Hohorst, H. J. (1981). Evidence for enzymatic toxification of activated cyclophosphamide (4-hydroxycyclophosphamide). *J Cancer Res Clin Oncol* 99: A58-9.
- Völker, G., Dräger, U., Peter, G., et al. (1974). Studien zum spontanzerfall von 4-hydroxycyclophosphamid und 4-hydroxyperoxycyclophosphamid mit hilfe der dünnenschichtschromatographie. *Arzneimittelforschung* 24: 1172-6.
- Wagner, T., Feneberg, K. (1984). Pharmacokinetics and bioavailability of cyclophosphamide from oral formulations. *Arzneimittel for Cheschung* 34: 313-6.
- Wan, X., Chen, X., Liu, L., et al. (2013). Berberine ameliorates chronic kidney injury caused by atherosclerotic renovascular disease through the suppression of NFκB signaling pathway in rats. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 3. Article ID e59794. DOI: 10.1371/journal.pone.0059794
- Wan, X., Chen, X., Liu, L., Zhao, Y., Huang, W.J., et al. (2013). Berberine ameliorates chronic kidney injury caused by atherosclerotic renovascular disease through the suppression of NFκB signaling pathway in rats. *PLoSOne* 8 (3), e59794.
- Wang, J. Y., Prorok, G., Vaughan, W.P. (1993). Cytotoxicity, DNA cross-linking, and DNA single-strand breaks induced by cyclophosphamide in a rat leukemia in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 31(5):381–6.
- Wang, F., Zhao, G., Cheng, L., Zhou, H.Y., Fu, L.Y., et al. (2004). Effects of berberine on potassium currents in acutely isolated CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. *BrainRes.* 999, 91–97.
- Wang, K., Feng, X., Chai, L., Cao S. & Qiu, F. (2017). The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. *Drug Metabolism. Reviews.* 49:2, 139-157, DOI: 10.1080/03602532.2017.1306544
- Wang, Q., Qi, J., Hu, R., Chen, Y., Kijlstra, A. And Yang, P. (2012). Effect of berberine on proinflammatory cytokine production by ARPE-19 cells following stimulation with tumor necrosis factor-α. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 53, no. 4, pp.2395–2402.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Wang, T., Wang, N., Song, H., Xi, X., Wang, J., et al. (2011). Preparation of an anhydrous reverse micelle delivery system to enhance oral bioavailability and antidiabetic efficacy of berberine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 44, 127–135.
- Wang, X., Wang, R., Xing, D., Su, H., Ma, C., et al. (2005). Kinetic difference of berberine between hippocampus and plasma in rat after intravenous administration of *Coptidis rhizoma* extract. *LifeSci.* 77 (24), 3058–3067.
- Wang, Y. (2013). Attenuation of berberine on lipopolysaccharide induced inflammatory and apoptosis responses in  $\beta$ -cells via TLR4-independent JNK/NF- $\kappa$ B pathway. *Pharmaceutical Biology.*
- Xie, H. J., Yasar, U., Lundgren, S., et al. (2003). Role of polymorphic CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J* 3: 53-61.
- Xie, X., Chang, X., Chen, L., et al. (2013). Berberine ameliorates experimental diabetes-induced renal inflammation and fibronectin by inhibiting the activation of RhoA/ROCK signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 381, pp. 56–65. DOI: 10.1016/j.mce.2013.07.019
- Xie, X., Peng, J., Chang, X., et al. (2013). Activation of RhoA/ROCK regulates NF- $\kappa$ B signaling pathway in experimental diabetic nephropathy. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 369, no. 1-2, pp. 86–97. DOI: 10.1016/j.mce.2013.01.007.
- Xie, R., Chen, L., Wu, H., Chen, T., Wang, F., Chen, X., Sun, H. and Li, X. (2018). GnRH Antagonist Improves Pubertal Cyclophosphamide-Induced Long-Term Testicular Injury in Adult Rats. *International Journal of Endocrinology*. 4272575, 7
- Xing, L.-J., Zhang, L., Liu, T., Hua, Y.-Q., Zheng, P.-Y. and Ji, G. (2011). Berberine reducing insulin resistance by up-regulating IRS-2 mRNA expression in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) rat liver. *European Journal of Pharmacology*, vol. 668, no. 3, pp.467–471. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.07.036
- Xiao, J., Ke, Z. P., Shi, Y., Zeng, Q., Cao, Z. (2018). The cardioprotective effect of thymoquinone on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart via regulation of apoptosis and autophagy. *J. Cell. Biochem.* 119 :7212–7217. DOI: 10.1002/jcb.26878
- Yi, P., Lu, F.-E., Xu, L.-J., Chen, G., Dong, H., and Wang, K.-F. (2008). Berberine reverses free-fatty-acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through targeting IKK $\beta$ . *World Journal of Gastroenterology*, vol. 14, no. 6, pp. 876– 883.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Yigitaslan, S., Ozatik, O., Ozatik F. Y., Erol, K., Sirmagul, B., Baseskioglu, A. B. (2014). Effects of tadalafil on hemorrhagic cystitis and testicular dysfunction induced by cyclophosphamide in rats. *Urol Int.* 93(1):55-62. doi: 10.1159/000352095.
- Yilmaz, N., Emmungil, H., Gucenmez, S., Ozen, G., Yildiz, F., Balkarli, A., et al. (2015). Incidence of Cyclophosphamide-induced Urotoxicity and Protective Effect of Mesna in Rheumatic Diseases. *J. Rheumatol.* 42:1664–6. DOI: 10.3899/jrheum.150065
- Yoshida, A., Dave, V., Han, H., et al. (1993). Enhanced transcription of the cytosolic ALDH gene in cyclophosphamide resistant human carcinoma cells. *Adv Exp Med Biol* 328: 63-72.
- Yu, L., Waxman, D. J. (1996). Role of cytochrome P450 in oxazaphosphorine metabolism: deactivation via N-dechloroethylation and activation via 4-hydroxylation catalyzed by distinct subsets of rat liver cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 24: 1254-62.
- Yu, G., Li, Y., Tian, Q., Liu, R., Wang, Q., Wang, J. Z., & Wang, X. (2011). Berberine attenuates calyculin A - induced cytotoxicity and Tau hyperphosphorylation in HEK293 cells. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24(3), 525-535. DOI: 10.3233/JAD-2011-101779
- Yule, S. M., Boddy, A. V., Cole, M., et al. (1995). Cyclophosphamide metabolism in children. *Cancer Res* 55: 803-9.
- Yule, S. M., Price, L., Pearson, A. D. J., et al. (1997). Cyclophosphamide and ifosfamide metabolites in the cerebrospinal fluid in children. *Clin Cancer Res* 3: 1985-92.
- Zhang, J., Yang, J.Q., He, B.C., Zhou, Q.X., Yu, H.R., et al. (2009). Berberine and total base from rhizoma *Coptis chinensis* attenuate brain injury in an aluminum- induced rat model of neuro degenerative disease. *Saudi Med. J.* 30 (6), 760–766.
- Zhang, Q., Qian, Z., Pan, L., Li, H., & Zhu, H. (2012a). Hypoxia - inducible factor 1 mediates the anti - apoptosis of berberine in neurons during hypoxia/ischemia. *Acta Physiologica Hungarica*, 99(3), 311-323. DOI: 10.1556/APhysiol.99.2012.3.8
- Zhang, X., Zhang, X., Wang, C., Li, Y., Dong, L., et al. (2012). Neuroprotection of early and short-time applying berberine in the acute phase of cerebral ischemia: up- regulated pAkt, pGSK and pCREB, down-regulated NF-κB

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- expression, ameliorated BBB permeability. *BrainRes.* 1459 (6), 1–70.DOI: 10.1016/j.brainres.2012.03.065
- Zhang, Y., Cui, Y.L., Gao, L.N., Jiang, H.L. (2013). Effects of  $\beta$ -cyclodextrin on the intestinal absorption of berberine hydrochloride, a P-glycoprotein substrate. *Int. J. Biol. Macromol.* 59, 363–371.DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.074
- Zhang, Y., Li, X., Zou, D., et al. (2008). Treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 93, no. 7, pp. 2559–2565.
- Zheng, J. H., Viacava, F. A., Kriwacki, R. W., & Moldoveanu, T. (2016). Discoveries and controversies in BCL - 2 protein - mediated apoptosis. *The FEBS Journal*, 283(14), 2690-2700.DOI: 10.1111/febs.13527
- Zhou, J., Zhou, S. (2010). Protective effect of berberine on antioxidant enzymes and positive transcription elongation factor b expression in diabetic rat liver. *Fitoterapia* 82 (2), 184–189.
- Zhou, Y., Cao, S., Wang, Y., Xu, P., Yan, J., et al. (2014). Berberine metabolites could induce low density lipoprotein receptor up-regulation to exert lipid-lowering effects in human hepatoma cells. *Fitoterapia* 92, 230–237.DOI: 10.1016/j.fitote.2013.11.010
- Zhu, X., Guo, X., Mao, G., Gao, Z., Wang, H., et al., (2013). Hepatoprotection of berberine against hydrogen peroxide-induced apoptosis by up regulation of Sirtuin 1. *Phytother. Res.* 27 (3),417–421.DOI: 10.1002/ptr.4728
- Zuo, F., Nakamura, N., Akao, T., Hattori, M. (2006). Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *DrugMetab. Dispos.* 34 (12), 2064–2072.

*EK- 4*

## **ÖZGEÇMİŞ**

### **Bireysel Bilgiler**

Adı-Soyadı : Hakan ALTUNTAŞ  
Doğum tarihi ve yeri : 24.07.1989 / Eskişehir  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Bekar  
İletişim adresleri : Yeşiltepe Mahallesi Mete Sokak No:22 / Eskişehir

### **Eğitim Durumu**

(Tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru ilköğretim, lise, üniversite, yabancı dil /diller)

İlkokul : Sinan Alağaç İ.Ö.O.  
Lise : Tayfur Bayar Lisesi (Y.D.A.)  
Üniversite : Anadolu Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi  
Yabancı Dil : İngilizce (orta)  
**Mesleki Deneyim** : As Ecza Deposu – Mesul Müdür

### **Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:**

**Yayımlar** :

(Makale, Sözlü Bildiri, Poster Bildiri, Kitap, Kitap Bölümü vd.)

### **Bilimsel Etkinlikler**

Burslar :

Ödüller :

Projeler :

Sözlü Konferans veya Seminerler:

Kurslar ve Eğitim Programları: