



**RATLARDA SİKLOFOSFAMİD KAYNAKLI
KARACİĞER HASARINA KARŞI
GLYCYRRHİZİNİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Okan ULUKAN

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Hikmet KELEŞ

Tez No: 2021- 008

Afyonkarahisar

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**RATLARDA SİKLOFOSFAMİD KAYNAKLI KARACİĞER
HASARINA KARŞI GLYCYRRHİZİNİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Okan ULUKAN**

**Danışman
Prof. Dr. Hikmet KELEŞ**

AFYONKARAHİSAR

2021

KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Patoloji Anabilim Dalı'nda** Okan ULUKAN tarafından hazırlanan “Ratlarda Siklofosfamid Kaynaklı Karaciğer Hasarına Karşı Glycyrrhizinin Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 27/01/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği / oy çokluğu** ile **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir

Başkan

Prof. Dr. Mehmet HALIGÜR

Üye

Prof. Dr. Hikmet KELEŞ

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih BOZKURT

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

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

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

beyan ederim.

27/01/2021

Okan ULUKAN

ÖZET

RATLARDA SİKLOFOSFAMİD KAYNAKLI KARACİĞER HASARINA KARŞI GLYCYRRHİZİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Siklofosfamid (CP), çok çeşitli neoplastik ve non-neoplastik hastalığın tedavisinde oldukça yaygın olarak kullanılan sitotoksik özellikteki kemoterapötik bir ajandır. Terapötik kullanım sahası geniş olsa da etkenin toksisitesi ve yan etkileri bulunmaktadır. Karaciğer, CP ilişkili bu yan etkilerden en çok etkilenen organlardan biridir. Bu deneysel çalışmada, CP'nin hepatotoksik etkilere karşı glycyrrhizin'in (GLY) etkisi incelendi. Çalışmada, her grupta 7 adet hayvan olacak şekilde toplamda 28 adet erkek Sprague Dawley rat kullanıldı. Kontrol grubundaki hayvanlara gastrik gavaj (g.g.) yoluyla sadece fizyolojik tuzlu su verildi. CP grubundaki hayvanlara intraperitoneal (i.p.) yolla 150 mg/kg dozunda CP verildi. CP+GLY100 ve CP+GLY200 grubundaki ratlara ise i.p. yolla 150 mg/kg CP ve CP'den 20 dakika önce ve takip eden 4. ve 8. saatlerde ilk gruba 100 mg/kg ve ikinci gruba 200 mg/kg olmak üzere üç doz GLY uygulandı. Dokular hematoksilen-eozin boyama yöntemi ile histopatolojik açıdan caspase-3, TRPM2 ve Bcl-2 belirteçleri ile immunohistokimyasal olarak incelendi. CP grubunda meydana gelen hepatotoksikite bulgularının GLY uygulanan gruplarda azaldığı gözlemlendi. Histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler ışığında, 200 mg/kg dozda GLY uygulanan grupta karaciğer dokusunun 100 mg/kg dozda GLY uygulanan gruba kıyasla daha iyi bir şekilde korunmuş olduğu gözlemlendi. Bu doğrultuda, glycyrrhizinin CP ilişkili karaciğer hasarına karşı destekleyici olabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Glycyrrhizin, Karaciğer, Patoloji, Siklofosfamid

SUMMARY

INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF GLYCYRRHIZIN AGAINST CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED LIVER INJURY IN RATS

Cyclophosphamide is a cytotoxic chemotherapeutic agent that is widely used in the treatment of various neoplastic and non-neoplastic diseases. Although the therapeutic use of cyclophosphamide is widely, it has toxicity and side effects. The liver is one of the organs the most affected by these CP related side effects. In this experimental study, the effect of glycyrrhizin (GLY) had been examined against the side effects caused by CP. In this study, a total of 28 male Sprague Dawley rats had been used including 7 rats in each group. The rats in the control group were applied only physiological saline by gastric gavage (g.g.). The rats in the CP group were applied 150 mg/kg CP by intraperitoneal (i.p.) injection. In the CP+GLY100 and CP+GLY200 groups, three doses of GLY were applied by i.p. injection to 150 mg/kg CP and 20 minutes before CP and 100 mg/kg to the first group and 200 mg/kg to the second group at the 4th and 8th hours, had been applied. Tissues were examined histopathologically by hematoxylin-osin staining method, and immunohistochemically with caspase-3, TRPM2 and Bcl-2 markers. It was observed that hepatotoxicity findings occurring in the CP group decreased in the GLY groups. In this study, it was observed that histopathological and immunohistochemical examinations of the liver were better preserved in the groups treated with GLY compared to the CP group. This preservation is better in the CP+GLY200 group. Accordingly, it is thought that glycyrrhizin can be supportive against CP-related liver damage.

Keywords: Cyclophosphamide, Glycyrrhizin, Liver, Pathology

ÖNSÖZ

Modern tıbbın babası olarak bilinen Hipokrat “besinler ilacınız, ilacınız besinler olsun” sözüyle sağlık için kullanılacak ürünlerin organizmaya uygunluğunun önemini vurgulamıştır. Bilindiği üzere, hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar vücutta uzun ve kısa vadede yan etkilere sebep olmaktadır ve bu bağlamda kullanılan ilacın kıymeti yan etkilerinin azlığı nispetinde olmaktadır. “Doğal ürün ile daha az yan etki” ilkesi ile gittikçe artan etnofarmakolojik uygulamaların büyük çoğunluğunun akademik bir temele dayanmaması bu yöntemleri bilimsel bir zeminde inceleme zarureti doğurmaktadır.

Deryada bir katre mahiyetindeki bu çalışmamızda hem sofrada gıda halinde tüketilebilen hem de etnofarmakolojik gaye ile başvuru meyhan bitkisini, siklofosfamid ilişkili hepatotoksisiteye karşı muhtemel pozitif etkileri yönünden, hedefimize koymuş bulunmaktayız.

Yüksek lisans tez konusu seçiminde beni yönlendiren, eğitimi sürecimde bilgi ve deneyimlerini aktaran, bilimsel ve akademik her konuda sabrı ve anlayışıyla desteklerini esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Hikmet KELEŞ’e, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi M. Fatih BOZKURT’a; doktora öğrencisi Muhammad Nasir BHAYA’ya, manevi destekleri ile her zaman yanımda hissettiğim babam Galip ULUKAN’a, annem İsmihan ULUKAN’a, bana olan inancı ve destekleri için Bilgehan ALPERGUN ULUKAN’a eğitim sürecimde tecrübesi ve yardımseverliği ile yanımda olan saygı ile andığım Prof. Dr. Bayram TURGUT’a, hayatımın her anında sevgisini, sabrını, hoşgörüsünü, desteklerini, fikirlerini, varlığını eksik etmeyerek tez sürecinde de hayatımı kolaylaştıran Merve BAYRİ’ye ve hayatıma katkısı olan herkese en içten teşekkürlerimi, şükranlarımı ve saygılarımı sunarım.

Okan ULUKAN

Afyonkarahisar

2021

İÇİNDEKİLER

SAYFA

KABUL VE ONAY SAYFASI

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

ÖZET

i

SUMMARY

ii

ÖNSÖZ

iii

İÇİNDEKİLER

iv

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

vii

ŞEKİLLER

x

ÇİZELGELER

xi

1. GİRİŞ

1

1.1. Genel Bilgiler

1

1.2. Siklofosfamid Hakkında Genel Bilgiler

1

1.3. Siklofosfamid İlişkili Hepatotoksisite

2

1.4. Siklofosfamidin Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması

3

1.5. Siklofosfamide Karşı Direnç Gelişimi

4

1.6. Siklofosfamidin Yan Etkileri

4

1.7. *Glycyrrhiza glabra L.* (Meyan Bitkisi)

5

1.8. *Glycyrrhiza glabra L.*'nin Klasifikasyon

5

1.9. *Glycyrrhiza glabra L.*'nin Aktif Bileşenleri

6

1.10. *Glycyrrhiza glabra L.*'nin Kullanımı

6

1.11. *Glycyrrhiza glabra L.*'nin Farmakolojik Etkileri

8

1.11.1. <i>Glycyrrhiza glabra L.</i> 'nin Anti-İnflamatuvar Etkileri	8
1.11.2. <i>Glycyrrhiza glabra L.</i> 'nin Anti-Bakteriyel, Anti-Fungal ve Anti-Protozoal Etkileri	9
1.11.3. <i>Glycyrrhiza glabra L.</i> 'nin Anti-Oksidatif Etkileri	10
1.12. Transient Receptor Potential (Geçici reseptör potansiyeli-TRP)	11
1.13. Apoptozis; Caspase 3 ve Bcl-2	12
2. MATERYAL VE METOT	15
2.1. Gereç	15
2.1.1. Hayvan Materyali	15
2.1.2. Kullanılan Alet ve Malzemeler	15
2.1.3. Kimyasal Maddeler	15
2.2. Yöntem	16
2.2.1. Deneme Gruplarının Oluşturulması	16
2.2.2. Örneklerin Toplanması	16
2.2.3. Makroskopik Yöntem	17
2.2.4. Histopatolojik Yöntem	17
2.2.5. İmmunohistokimyasal Yöntem	17
2.3. İstatistiksel Yöntem	18
3. BULGULAR	19
3.1. Klinik Bulgular	19
3.2. Makroskopik Bulgular	19
3.3. Mikroskopik Bulgular	19
3.3.1. Konjesyon	20
3.3.2. Dejenerasyon ve Nekroz	21
3.3.3. Kupffer Hücreleri	21
3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	22
3.4.1. Caspase-3 Bulguları	22
3.4.2. TRPM2 Bulguları	23
3.4.3. Bcl-2 Bulguları	24
4. TARTIŞMA	25

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	33
6. KAYNAKLAR	34
7. EKLER	49
ÖZGEÇMİŞ	50



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
µm	: Mikrometre
°C	: Santigrat derece
AIDS	: Bağışıklık yetersizliği sendromu
ALP	: Alkelen fosfataz
ANOVA	: Analysis of variance
AST	: Aspartat aminotransferaz
Bad	: Bcl-2 ilişkili hücre ölümü agonisti
Bak	: Bcl-2 ilişkili kromozom 6 antagonist/killer protein
Bax	: Bcl-2 ilişkili tümör baskılayıcı proteinin kofaktörü
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
BclxL	: Ekstra büyük B hücreli lenfoma
BclxS	: Ekstra küçük B hücreli lenfoma
Bid	: Bcl-2 inaktivatörü
Bim	: Bcl-2 ilişkili hücre ölüm aracısı
<i>C. albicans</i>	: <i>Candida albicans</i>
Ca²⁺	: Kalsiyum
CAD	: Caspase activated DNAaz
CAT	: Katalaz
COX-2	: Cytochrome C oxidase subunit 2
CP	: Cyclophosphamide (Siklofosfamid)
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>G. glabra</i>	: <i>Glycyrrhiza glabra</i>
<i>G. radiks</i>	: <i>Glycyrrhiza radiks</i>
<i>G. uralensis</i>	: <i>Glycyrrhiza uralensis</i>
G.g.	: Gastrik gavaj
GLY	: Glycyrrhizin
Glycyrrhiza sp	: Glycyrrhiza türleri

Gr	: Gram
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H2O2	: Hidrojen peroksit
Hcl	: Hidrojen klorid
HE	: Hematoksilen-eozin
HIV	: Human immunodeficiency virus
ICAD	: Caspase aktiveleştirilen deoksiribonükleaz inhibitörü
IL-1β	: İnterlökin-1 beta
IL-6	: İnterlökin-6
iNOS	: Nitrik oksit sentezini indükleyici
İP	: İnterperitonel
Kg	: Kilogram
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPO	: Lipid peroksidasyon
M.Ö.	: Milattan önce
M.S.	: Milattan sonra
Mcl1	: İndüklenmiş miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Magnezyum
Mg	: Miligram
MgIG	: Magnezyum isoglycyrrhizinate
ml	: Mililitre
NF-Kβ	: Nükleer faktör kappa B
NO	: Nitrik oksit
Noxa	: DNA ilişkili apoptozisi indükleyebilir gen
Nrf2	: Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör
<i>P. falciparum</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i>
p	: Anlamlılık (önemlilik) testine ilişkin olasılık değeri
p53	: Bcl-2 ilişkili tümör baskılayıcı protein kofaktörü
PGE2	: Prostaglandin E2
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu gücü

Puma	: P53 upregulated modulator of apoptosis
RANKL	: NF- κ B bağı için reseptör aktivatörü
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süper oksit dismutaz
TLR	: Toll benzeri reseptör
TNF-A	: Tümör nekrozis faktör
TRP	: Transient receptor potential (geçici reseptör potansiyeli)
TRPA	: Transient receptor potential ankyrin
TRPC	: Transient receptor potential canonical
TRPM	: Transient receptor potential melastatin
TRPML	: Transient receptor potential mucolipin
TRPP	: Transient receptor potential polycystic
TRPV	: Transient receptor potential vanilloid
Vd	: ve diğerleri

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 1A: Kontrol grubu, karaciğerin histolojisi	20
Şekil 1B: CP grubu, karaciğerin histolojisi	20
Şekil 1C: CP+GLY100 grubu, karaciğerin histolojisi	20
Şekil 1D: CP+GLY200 grubu, karaciğerin histolojisi	20
Şekil 2A: Kontrol grubu, karaciğerde caspase-3 immunreaktivitesi	22
Şekil 2B: CP grubu, karaciğerde caspase-3 immunreaktivitesi	22
Şekil 2C: CP+GLY100 grubu, karaciğerde caspase-3 immunreaktivitesi	23
Şekil 2D: CP+GLY200 grubu, karaciğerde caspase-3 immunreaktivitesi	23
Şekil 3A: Kontrol grubu, karaciğerde TRPM2 immunreaktivitesi	24
Şekil 3B: CP grubu, karaciğerde TRPM2 immunreaktivitesi	24
Şekil 3C: CP+GLY100 grubu, karaciğerde TRPM2 immunreaktivitesi	24
Şekil 3D: CP+GLY200 grubu, karaciğerde TRPM2 immunreaktivitesi	24
Şekil 4A: Kontrol grubu, karaciğerde Bcl-2 immunreaktivitesi	25
Şekil 4B: CP grubu, karaciğerde Bcl-2 immunreaktivitesi	25
Şekil 4C: CP+GLY100 grubu, karaciğerde Bcl-2 immunreaktivitesi	25
Şekil 4D: CP+GLY200 grubu, karaciğerde Bcl-2 immunreaktivitesi	25

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 1.1. <i>Glycyrrhiza glabra L.</i> 'nin klasifikasyon	5
Çizelge 3.1. Histopatolojik parametrelerin istatistiksel analizi	21



1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Karaciğer, vücudun en önemli biyo-dönüşüm merkezidir. Karaciğer, safra üretimi ve salınımı, bilirubin, karbonhidrat, lipid, protein ve ksenobiyotik metabolizması ile üre döngüsü ve immun fonksiyonlar gibi sentetik, katabolik, detoksifiye, sekretorik ve ekskretorik faaliyetlerde bulunur (Zachary, 2017). Bağırsaklar tarafından emilen, diğer organlar tarafından sentezlenen/dönüştürülen substrat ve toksik maddelerin detoksifikasyonu yine karaciğer tarafından yapılan bir biyo-dönüşümdür (Kennedy vd., 2016). Karaciğerdeki bu biyo-dönüşüm sonucu vücuttan atılacak olan bu son ürünler çoğunlukla zararsızdır. Ancak zaman zaman toksik etkili de olabilir. Bu tür toksik son ürünlerin detoksifikasyonu esnasında karaciğer parankimi eş zamanlı olarak zarar görebilir (Liu vd., 2014).

Karaciğer sadece endojen substrat ve toksik metabolitlerden zarar görmez. Tedavi amacıyla kullanılan ilaçların oluşturduğu toksik etkiler karaciğer hasarının oluşmasında en sık karşılaşılan sebeplerdendir. Başlıca kemoterapötik ajanlar olmak üzere, tedavi amacıyla da olsa vücuda eksojen alınan antibiyotikler, analjezikler ve antiemetikler gibi maddeler de karaciğere zarar verebilir (Bénichou, 1990; Maria ve Victorino, 1997). Ancak, bu konuda neoplastik ve non-neoplastik birçok patolojide yaygın olarak kullanılmakta olan ve aralarında siklofosfamid (CP)'in de olduğu kemoterapötik ajanlar başat rol oynamaktadır (Potnuri vd., 2018; Stillwell ve Benson, 1988). Hal böyle olunca, kemoterapi kaynaklı karaciğer hasarını azaltmak ve tedavi etkinliğini güçlendirmek, çözüm bekleyen klinik bir gereklilik haline gelmiş ve son yıllarda yapılan çalışmalar da bu doğrultuda bir ivme kazanmıştır (Liu vd., 2014).

1.2. Siklofosfamid Hakkında Genel Bilgiler

Siklofosfamid, çeşitli neoplastik ve non-neoplastik hastalığın tedavisinde oldukça yaygın olarak kullanılan sitotoksik özellikteki bir kemoterapötik ajandır (Stillwell ve

Benson, 1988). İlk olarak 1958 yılında sentezlenen CP, Dünya Sağlık Örgütü'nün temel ilaçlar listesinde yer almaktadır (Arnold vd., 1958; İnt. Kay. 1). Antineoplastik etkisi sayesinde solid tümörler ve lenfomaların tedavisinde yaygın olarak tercih edilir (Uber vd., 2007). Siklofosfamid, antineoplastik özelliğinin yanı sıra bağışıklık sistemi üzerinde baskılayıcı bir etkiye de sahiptir (Jalali vd., 2012). Bu özelliğinden dolayı organ nakillerinde immunsupresif etki sağlamak için tercih edilir (Uber vd., 2007). Siklofosfamidin bu kullanımının yanı sıra romatoid artirit, sistemik lupus eritromatozus ve pulmoner fibrozis gibi kronik hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (Burke vd. 1982; Sinanoglu vd., 2012). Dünya Sağlık Örgütü'nün temel ilaçlar model listesinde 25-50 mg dozlarında CP; kronik lenfatik lösemi, diffuz büyük B hücreli lenfoma, erken dönem meme tümörü, gebelik trofoblastik neoplazi, Hodgkin lenfoma, folliküler lenfoma, rhabdomyosarkoma, Ewing sarkoma, akut lenfoblastik lösemi, Burkitt lenfoma, metastatik meme tümörü ve multiple myeloma'ya karşı listelenmiştir (İnt. Kay. 1). Siklofosfamidin terapötik kullanım sahası geniş olsa da etkenin toksisitesi ve yan etkileri nedeniyle kullanımı genelde kısıtlanır (Papaldo vd., 2005).

1.3. Siklofosfamid İlişkili Hepatotoksisite

Siklofosfamid, karaciğer üzerine toksik etkisi yüksek kemoterapötik bir ajandır. Siklofosfamid'in 200 mg/kg gibi düşük dozlarda damar içi yavaş uygulanmasının ardından karaciğer hasarı oluşturduğu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Nitharwal vd., 2013; Zarei ve Shivanandappa, 2013).

Siklofosfamid, karaciğerde sitokrom p450 aracılığı ile biyotransformasyona uğrar. Metabolize olan CP, fosforamid mustarda ve akroleine dönüşür. Bu metabolitler oldukça toksiktir (Kern ve Kehrer, 2002). Burada oluşan fosforamid, antineoplastik ve immunsupresif etki gösterirken; akroleinin toksik etkili olduğu ileri sürülmektedir (Angulo vd., 2002; Kern ve Kehrer, 2002). Karaciğerde CP'nin normal metabolizasyonu ve detoksifikasyonu işlemleri esnasında reaktif oksijen türevleri (ROT) ortaya çıkar (Klaassen vd., 2008) ve ROT ilişkili oksidatif stresin, CP kaynaklı hepatotoksisitede önemli yer tuttuğu ileri sürülmektedir (Zarei ve Shivanandappa, 2013; Jnaneshwari vd., 2014; Li, vd., 2020). Siklofosfamid

maruziyetine ilişkin oksidatif stres hidrojen peroksit (H₂O₂) ile ilişkilendirilmiştir. Hidrojen peroksit, süper oksit'in süper oksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığı ile dismutasyonu sonucu meydana gelir. Siklofosfamid stimülasyonuna ilişkili olarak DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu hızlandığı deneysel olarak gösterilmiştir (Jiang vd., 2017). Akrolein, glutasyon (GSH) gibi hücresel antioksidan sistemlere bağlanır, antioksidan savunma sistemini tüketerek toksisiteye olanak verir ve lipid peroksidasyonunu (LPO) da başlatır (Adams ve Klaidman, 1993). Lipid yıkımının son ürünü olan malondialdehit (MDA) ve organizmanın antioksidan savunma sistemlerinden SOD, katalaz (CAT), GSH ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) seviyeleri hepatik oksidatif stresi ortaya koymada kullanılır (Barrera, 2012; Jiang vd., 2016). Siklofosfamidin neden olduğu karaciğer hasarının sonuçlarından/kanıtlarından biri de karaciğer hasarının belirteçleri olan aspartat aminotransferaz (AST) ve alkelen fosfataz (ALP) değerlerinin sistemik dolaşımdaki aktivitelerinin artmasıdır (Senthilkumar vd., 2006).

Geniş bir kullanım yelpazesi olan, CP'nin çeşitli organlarda inflamatuvar yanıt oluşturarak (Matar vd., 2002) TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi çeşitli pro-inflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimine neden olduğu bildirilmiştir (Zoheir vd., 2015). İnflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımı, karaciğer hasarının patogeneziyle ilişkili inflamatuvar süreci başlatmaya, hızlandırmaya ve sürdürmeye katkıda bulunur (Chen vd. 2015; Wang vd., 2015).

1.4. Siklofosfamidin Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması

Siklofosfamid, kimyasal olarak asit özellikte ve azotlu hardallar (nitrojen mustard) kategorisinde yer alan alkilleyici bir maddedir (Austin ve Klippel, 1986). Siklofosfamidin terapötik ve toksik etkileri, karaciğerde bulunan mikrozomal sitokrom P450 karışık bir oksidaz sistemi aracılı, fosforamid mustard ve akrolein metabolitleri üzerinden oluşur (Sladek, 1988). Fosforamid mustardın takip eden reaksiyonları sonucu oluşan ara ürünler su, aminoasit ve çeşitli proteinler gibi nükleofilik maddelerle geri dönüşümsüz kovalent bağlar kurar. Ancak en önemlisi bağlanma bölgesi DNA'dır. Bu bağlanma, DNA üzerinden hücre ölümünü

geçekleştirerek CP'nin anti-tümöral mekanizmasını gerçekleştirmiş olur (Moore, 1991).

Siklofosfamid ön ilaç durumundadır. Antineoplastik etki gösterebilmesi için DNA'yı alkillemesi gerekir. Neoplastik hücrelerde önce etilenimonium, sonra da pozitif yüklü karbonyum iyonuna dönüşerek DNA gibi negatif yüklü nükleik asitler ile geri dönüşümsüz olarak kovalent bağ kurarak alkillenme meydana getirir. Bu alkillenme DNA'nın kendisini eşleme mekanizmasını bozar. DNA üzerindeki etkisi radyasyona benzediği için radyomimetik ilaçlar olarak da adlandırılırlar (Kaya, 2013). Hücre siklusunun bulunduğu faz bakımından non-spesifik olan CP'nin sağaltıcı etkisi verilen doz ile ilişkilidir. Doz arttıkça ilacın sağaltım gücü de artmaktadır (Kayaalp, 2002).

1.5. Siklofosfamide Karşı Direnç Gelişimi

Klinik kullanım sırasında etkene karşı direnç gelişmesi sıklıkla görülen bir durumdur. Bu direnç tedavide başarısızlık oranını arttırırken, etkenin sitotoksik ve mutajenik yan etkilerini de azaltmaktadır. Oluşan direncin temel mekanizması hücrelerde üretilen nükleofilik maddelerin miktarının artarak, DNA'ya bağlanacak olan ajan ile yarışmaya girmesi şeklinde gerçekleşir (Susan ve Michael, 2002; Kaya 2013).

1.6. Siklofosfamidin Yan Etkileri

Siklofosfamidin klinikte neoplastik ve non-neoplastik hastalıklarda kullanım sahası bulurken, neden olduğu yan etkiler sağaltım dozunu ve kullanılabilceği alanları kısıtlamaktadır (Kalaycioglu vd., 1995; Potnuri vd., 2018). Siklofosfamidin, gözlenme sıklığına göre yan etkileri; hemorajik sistitis (Stillwell ve Benson, 1988; Kaya, 2013; Hamzeh vd., 2018), hepatotoksisite (El-Naggar vd., 2016), akciğer hasarı, böbrek toksisitesi (Said vd., 2016), testiküler toksisite (Ghobadi vd., 2017), kardiyomiyopatidir (Asiri, 2010). Ayrıca pankreasın adacık hücrelerinde de hasar görülmüştür (Sharma vd., 2016). Kemik iliği üzerinde oluşturduğu etki nedeniyle bağışıklık sistemini baskılaması (Kaya, 2013; Hamzeh vd., 2018), hızlı proliferasyon

gösteren testis hücreleri üzerinde sitotoksik etkisiyle oligospermi ve azospermi üzerinden fertilitiyi olumsuz yönde etkilemesi (Howell ve Shalet, 1998) CP ilişkili yan etkiler olarak rapor edilmiştir. Görüldüğü üzere, CP ilişkili yan etkilerden en çok etkilenen organların başında karaciğer de bulunmaktadır.

1.7. *Glycyrrhiza glabra L.* (Meyan Bitkisi)

Meyan bitkisi veya ülkemizdeki yaygın adı ile meyan kökü, *Glycyrrhiza glabra L.* olarak sistematize edilmektedir. Türkiye’de ağırlıkla Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde yetişir. Yaz mevsiminde sarı-maviden kahverengiye kadar değişen renkte buğday başağına benzer çiçek açan, boyu 2 metreye kadar uzayabilen çalı türünde bir bitkidir. Bitkinin kökleri yani meyan kökü olarak adlandırılan kısımları kurutulduktan sonra bu bölgeye özgü şerbet yapılarak değerlendirilmektedir. Meyan kökü, magnezyum ve silisyum bakımından zengin olup içeriğinde nişasta, şeker, zank ve reçine bulundururken, tıbbi olarak büyük önem arz eden etken maddesi glycyrrhizin de dâhil olmak üzere çokça etkin etken madde ihtiva eder (Asımgil, 1997; Baytop, 1999). Köklerinden izole edilen başlıca iki etken madde glycyrrhizin ve glycyrrhetic asittir. Bu etken maddelerden klinikte hiperlipidemi, arterosklerozis ve alerjik inflamasyonun tedavisinde yararlanır (Lin vd., 2005). Farmakolojik açıdan en önemli bileşen olan triterpenik saponozitler grubunda bulunan glisirizik asit sakarozdan 60 kat daha tatlı bir bileşiktir (Tanker vd., 1998). Bununla birlikte meyan bitkisinde az miktarda liquiritine ve glabrol gibi flavonoidler, glabrene ve glabridin gibi izoflavonoidler, liquoumarin gibi kumarinler, polisakkaritler ve esansiyel yağlar vardır (Evans, 1996).

1.8. *Glycyrrhiza glabra L.*’nin Klasifikasyon

Çizelge 1. 1: *Glycyrrhiza glabra L.*’nin klasifikasyon (İnt. Kay. 2) (*Classification / USDA PLANTS*)

Alem	Plantae – Plants
Alt Alem	Tracheobionta – Vascular plants
Üst Bölüm	Spermatophyta – Seed plants

Bölüm	Magnoliophyta – Flowering plants
Sınıf	Magnoliopsida – Dicotyledons
Alt sınıf	Rosidae
Takım	Fabales
Aile	Fabaceae/Leguminosae – Pea family
Genus	<i>Glycyrrhiza</i> L. – licorice
Tür	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. – cultivated licorice

Glycyrrhiza L. genusu'nun 30 tür içerdiği (Nomura vd. 2002), Türkiye'de ise bu türlerden *G. glabra* dahil 6 türün bulunduğu belirtilmiştir (Baytop, 1999).

1.9. *Glycyrrhiza glabra* L.'nin Aktif Bileşenleri

Meyan kökü; saponinler, flavanonlar, kalkonlar, flavonlar (flavonoller), izoflavanonlar, izoflavanlar, izoflavenler, kumarinler gibi çeşitli maddeler içerir (Zhang ve Ye, 2009; Qiao vd. 2014; Hosseinzadeh ve Nassiri-Asl, 2015). Hosseinzadeh ve Nassiri-Asl. (2015)'nin yaptıkları bir derleme çalışmasında, *G. glabra*'nın içerdiği saponinlerin: 18 β -glycyrrhetic asit (Xu vd., 2013; Qiao vd., 2014), glycyrrhizic asit (Xu vd., 2013), licorice-saponin A3 (Xu vd., 2013; Qiao vd., 2014), licorice-saponin G2 (Qiao vd., 2014), licorice-saponin E2; flavonların: liquiritigenin, liquiritin, liquiritin apioside (Xu vd., 2013); kalkonların: isoliquiritigenin, isoliquiritigenin apioside, isoliquiritin (Simmler vd. 2014), neoisoliquiritin, licochalcone A and B (Zhang ve Ye, 2009); flavonların (flavonoller): licoflavonol, isolicoflavonol (Zhang ve Ye, 2009; Qiao vd., 2014) izoflavanların: licoisoflavone, licoricone, gancaonin, angustone, isoangustone (Zhang ve Ye, 2009; Qiao vd., 2014;), glabrone (Zhang ve Ye, 2009); izoflavanların: glabridin, hispaglabridin A and B (Zhang ve Ye, 2009); izoflavenlerin: glabrene (Zhang ve Ye, 2009); kumarinlerin ise: glycy coumarin, licopyranocoumarin (Qiao vd., 2014), glycyrin ve glycyrol (Wang vd., 2015) olduğu belirtilmiştir.

1.10. *Glycyrrhiza glabra* L.'nin Kullanımı

Meyan bitkisinde bulunan etken maddeler, vücutta farklı terapötik etkiler gösterir. Geleneksel tıpta, meyan bitkisinin kökleri ve rizomları yüzyıllardır klinik

kullanımdadır. Köklerin anti-asidik, anti-ülseratif (Ambawade vd., 2002), anti-inflamatuvar, balgam söktürücü, idrar söktürücü, tonik, müshil ve yatıştırıcı özellikleri vardır (Wagner vd., 1989; Lakshmi ve Geetha, 2011). Meyan bitkisi bu etkileri ile eklem ve kas ağrıları ile romatizmaya karşı hazırlanan ilaçların terkinde yer alır (Ugulu ve Baslar, 2010). Gastrit, öksürük ve bronşit gibi rahatsızlıklar da meyan kökünün başlıca kullanım alanları arasındadır (Özgökçe ve Özçelik, 2004).

Meyan bitkisi içindeki bileşikler ayrıca anti-neoplastik etkinlik gösterir (Kumada, 2002). Meyan kökünden izole edilen fenolik bileşiklerin çoğu, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve kırmızı kan hücrelerini oksidatif hasardan korumaya da yardımcı olabilir (Vaya vd. 1997; Haraguchi vd. 1998). Meyan kökü ekstresinin karaciğer üzerinde terapötik etkinliği bilinmektedir. Meyan kökü ile yapılan çalışmalar serum aspartat aminotransferaz (AST)'da önemli bir azalma ve karaciğer histolojisinde önemli bir iyileşme göstermiştir. Bu bilgi ışığında, Japonya'da kronik hepatit tedavisinde rol alan önemli bir bitkidir (Gumpricht vd., 2005; Van Rossum vd., 1998).

Günlük güvenli doz olarak önerilen 5-15 gram meyan bitkisi, etken madde olarak 200-600 mg glycyhrrizine eş değerdir Bitkinin çayı olarak ifade edilebilecek infüzyon çözeltilisini hazırlamak için, her 150 ml su için 2-4 gram iri ya da ince kıyılmış bitki, kaynayan suya atılır ya da soğuk suya atıldıktan sonra kaynatılır. Takriben 10-15 dk demlendikten sonra süzülür ve genellikle yemeklerden sonra bir bardak içilir (Kraft ve Hobbs, 2004). Bu infüzyon çözeltilisi, anti-tüssif ve laksatif etkili olup ayrıca prostat patolojileri ile mide ağrıları ve ülseratif lezyonların sağaltımında kullanılır (Leporatti ve Ivancheva, 2003; Momeni vd., 2014). Bunların yanı sıra adrenal bozukluklar, ses kısıklığı, larinks iltihabı, astım ve pnömoni gibi patolojiler ile yağlı cilt problemlerine karşı tıbbi etkisinden yararlanılmaktadır (Xie vd., 2009; Karousou ve Deirmentzoglou, 2011). Tüberküloz tedavisi ve hepatotoksisiteye karşı kullanıldığı bildirilirken (Cao vd., 2019; Viswanathan vd., 2019; WHO, 1998), meyan bitkisinin balgam ve idrar söktürücü özelliklerine de değinilmektedir (Baytop, 1999). Meyan balı ise; solunum sistemi rahatsızlıkları için 0,5-1 gram, ülseratif rahatsızlıklar için 1,5-3 gram dozunda kullanımı önerilmektedir (Kraft ve Hobbs, 2004).

Farklı coğrafi bölgelerde ve farklı zamanlarda şifa amacıyla yaygın olarak kullanıldığı kaydedilen (Armanini vd., 2002) meyan kökü kullanımına ait ilk belgeler, antik çağlarda Asur, Mısır, Çin ve Hint kültürlerine ait tarihsel kayıtlara kadar dayanmakta (Thompson, 1930; Chopra, 1958) ve hatta M.Ö. 2800’li yıllara kadar uzanmaktadır (Van Marle vd., 1981). Meyan bitkisi kullanımına ilişkin ilk askeri kayıtlar, günümüze kadar ulaşan Büyük İskender (III. Alexandros) dönemine aittir (Oğuz, 1987). Miladi takvimden sonra da meyan bitkisinin etkileri ve kullanımına ilişkin kayıtlara ulaşmak mümkündür. Milattan sonra (M.S.) 1.yüzyılda Dioscorides’e ait *Materia Medica* kitabı, Theophraste’e ait *Enquiry Into Plants* eseri tarihsel bir kayıt olarak gösterilebilir (Erdemir, 2001). Ancak Romalı hekim Alexander, bitkinin tıbbi tedavi amacıyla 6. yüzyılda kullanıldığını savunmaktadır (Van Marle vd., 1981).

Meyan bitkisi, modern tıpta da önemli bir kullanım sahasına sahiptir. Bitkinin ekstraktları, farmosötik alanda ilaçların istenmeyen tatlarını maskeleyerek tatlandırıcı ajan olarak ve soğuk algınlığı gibi solunum sistemini etkileyerek öksürüğe sebep olan hastalıklarda öksürüğün rahatlatılması amacıyla kullanılmaktadır (Takahara vd., 1994). Ülkemizde hemoroid, karın ağrısı gibi rahatsızlıklarda bitki demlenerek çay şeklinde tüketilir (Sezik vd., 2001). Japonya’da kronik hepatitis, AIDS ve Herpes virüs-ilişkili patolojilerde 60 yıldır kullanıldığı bilinmektedir (Takahara vd., 1994).

1.11. *Glycyrrhiza glabra L.*’nin Farmakolojik Etkileri

1.11.1. *Glycyrrhiza glabra L.*’nin Anti-İnflamatuvar Etkileri

Meyan bitkisinin anti-inflamatuvar etki mekanizması ile ilgili çalışmada, *G. glabra*’da bulunan etkin etken maddelerden glabridin, glycyrrhizin ve isoliquiritigenin kombinasyonunun yangının patogenezinde yer alan lökotrien B ve prostaglandin E2’nin sentezini önemli derecede inhibe ettiği ortaya konulmuş olup, bu inhibisyonun, siklooksijenaz ve lipooksijenaz üretimi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Chandrasekaran vd., 2011). Glycyrrhizin, nötrofiller tarafından üretilen ROT’yi doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaltmış, bu aşamada hücre-ilişkisz

ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile nötrofil kemotaksisi ve fagositoz üzerine olumsuz etkmeden anti-inflamatuar etki göstermiştir (Akamatsu vd., 1991).

G. glabra (glabridin, isoliquiritigenin), J774A.1 fare makrofajlarında NO, IL-1 β , ve IL-6 üretimini inhibe etmiştir (Thiyagarajan vd., 2011). *G. radiks*, fare periton makrofajlarında NF- κ B ve caspase-1 aktivasyonunu düzenleyici etkimiştir (Kim vd., 2014). *G. uralensis*'in, RAW 264.7 hücrelerinde NF- κ B aracılı inflammatuar yolağı inhibe eden aktif Nrf2 yollarını kullandığı ifade edilmiştir (Wu vd., 2011).

Glycyrrhizin, RAW 264.7 hücrelerinde TLR (Toll benzeri reseptör) 9 agonisti CpG-DNA tarafından indüklenen pro-inflamatuar araçları kuvvetli şekilde bloke eder (Schröfelbauer vd., 2009), NO üretimini ve iNOS ekspresyonunu baskılar (Uto vd., 2012). Glycyrrhizic asit ve 18 β -glycyrrhetic asit ile RAW 264.7 hücrelerinde NO, PGE2, TNF- α , IL-6, IL-1 β üretimini inhibe eder, ROT, iNOS ve COX-2 genlerinin ekspresyonunu azaltır ve NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder (Wang vd., 2011). 18 β -glycyrrhetic asit, RANKL ile uyarılan osteoklastogenezi ve sitokin üretimi inhibe eder (Sasaki vd., 2010).

1.11.2. Glycyrrhiza glabra L.'nin Anti-Bakteriyel, Anti-Fungal ve Anti-Protozoal Etkileri

G. glabra'nın farklı yöntemler ile hazırlanan formları, içerdikleri çeşitli bileşikler sayesinde, antimikrobiyal, antiviral, antifungal ve antiprotozoal etkinlikler göstermiştir.

Glycyrrhiza sp. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkili olmuştur (Badr vd., 2011). *G. glabra*, *Helicobacter pylori* üzerinde antibakteriyel etkinlik göstermiştir (Asha vd., 2013). Bitkinin yaprakları *S. aureus* (Irani vd., 2010), kökleri *S. aureus* (Snowden vd., 2014) ve *Campylobacter jejuni* (Bensch vd., 2011) üzerinde, glycyrrhizin *E. coli* (Chen vd., 2009) üzerine, 18 β -glycyrrhetic asit metisilin dirençli *S. aureus* (Long vd., 2013) üzerine, glycyrrhizinden arındırılmış *G. Glabra*'nın *Streptococcus mutans* UA159

(Ahn vd., 2012) üzerine antibakteriyel etkinliği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur.

G. uralensis'in Enterovirus type 71 (Kuo vd., 2009), rotavirus (Alfajaro vd., 2012) üzerine, *Glycyrrhiza sp.*'in *Varicella zoster virus* (Shebl vd., 2012), rotavirus (Kwon vd., 2010), insan respiratuar sinsitial virüs (Feng Yeh vd., 2013) ve Newcastle hastalığı virüsü (Omer vd., 2014) üzerine antiviral etkinlik gösterdiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Glycyrrhizin'in Influenza A virüs üzerine (Wolkerstorfer vd., 2009), glycyrrhizic asitin *Herpes simplex virüs tip 1* üzerine (Laconi vd., 2014), glycyrrhetic asitin *Human immunodeficiency virus* (HIV) üzerine (Song vd., 2014), 18β-glycyrrhetic asitin rotavirus üzerine (Hendricks vd., 2012) antiviral etkinlik gösterdiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

G. glabra'nın *Candida albicans* üzerine (Irani vd., 2010), glycyrrhizic asit ve 18β-glycyrrhetic asitin *C. albicans* üzerine (Messier ve Grenier, 2011; Pellati vd., 2009) antifungal etki gösterdiği ortaya konulmuştur.

G. glabra'nın kökleri *Plasmodium falciparum* üzerine (Sangian vd., 2013), bitkinin toprak üzerinde kalan bölümleri *P. falciparum* üzerine (Esmaili vd., 2009), glycyrrhetic asit filaria üzerine (Kalani vd., 2013), 18β-glycyrrhetic asit *Leishmania donovani* üzerine (Ukil vd., 2011) antiprotozoal etkinlik göstermektedir.

1.11.3. *Glycyrrhiza glabra L.*'nin Anti-Oksidatif Etkileri

Glycyrrhiza türlerinde bulunan ve bir izoflavon olan glabridin, özellikle düşük dansiteli lipoproteinleri (LDL) ve kırmızı kan hücrelerini oksidasyondan koruyan güçlü bir antioksidandır (Carmeli ve Fogelman, 2009; Haraguchi vd., 1998; Vaya vd., 1997). Meyan bitkisi ekstresinin karaciğer üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu da bilinmektedir. Hepatosit hücre kültürlerinde safra asidi ile indüklenen hasara karşı glycyrrhizin ve onu metaboliti olan 18-glycyrrhetic asidin koruyucu etkileri tanımlanmıştır (Gumprich vd., 2005). *G. uralensis*'in üç fenil flavonoidi olan dehidroglyasperin C (DGC), dehidroglyasperin D ve izoanguston A'nın karaciğerin yanı sıra böbrek ve beyin dokusunda da antioksidan etkinliği bilinmektedir (Kim vd.,

2012). Alkol ile oluşturulan yağlı karaciğer hastalığına karşı kullanılan ve glycyrrhizic asit, liquiritin ve liquiritigenin içeriği ortaya konmuş meyan ekstresinin serum alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, trigiliserit ve tümör nekrozis faktör (TNF)- α seviyelerini düzelttiği ve hepatositlerdeki lipid birikimini azalttığı ortaya konmuştur (Jung vd., 2016). İnsanlarda kronik hepatitis tedavisine yönelik yapılan araştırmaların derlendiği bir çalışmada, kronik hepatitis C tedavisine yönelik meyan bitkisinin olumlu etkilerinden bahsedilmiş, hatta düzenli kullanıldığı takdirde hepatoselüler karsinoma gibi olası neoplastik patolojileri önleyebileceği ileri sürülmüştür (Van Rossum vd., 1998). Aralarında *G. Glabra*'nın da olduğu 22 doğal ürün ile ilgili yapılan bir derleme çalışmada, bu ürünlerin kullanımına ilişkin hücrel kolesterol biyosentezinin inhibisyonu, total serum kolesterol, trigliserit seviyelerinin düşmesi, LDL oksidasyonunda azalma ve serbest radikallerin süpürülmesi gibi vücudun lehine bulgulardan bahsedilmiştir (Hasani-Ranjbar vd., 2010).

Meyan kökü hepatoprotektif etkileri üzerine yapılan çalışmalar, antioksidan ve antienflamatuar kapasiteyi arttırarak karaciğer hasarını azaltabileceğini düşündürmektedir (Chen vd., 2014; Fu vd., 2013). Öyle ki, meyan ekstresinin biyoaktif bileşenlerinin lipopolisakkaritler ile uyarılan mikroglia hücreleri ve tert-bütül hidroperoksit kaynaklı karaciğer hasarını önlediği ve iltihaplı karaciğer hastalıklarında tedavi amacıyla kullanılabilceği görülmüştür (Yu vd., 2015). Meyan bitkisinin biyoaktif bileşenleri, farklı mekanizmalar üzerinden hepatoprotektif etki oluştururlar. Glycyrrhizic asit, meydana gelen ROT miktarını ve hücre içi glutatyon tüketimini azaltır, mitokondri membranlarının depolarize olmasını inhibe eder (Hosseinzadeh ve Nassiri-Asl, 2015).

1.12. Transient Receptor Potential (Geçici reseptör potansiyeli-TRP)

Transient receptor potential kanalları (Geçici reseptör potansiyeli-TRP), membran potansiyeli veya hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) konsantrasyonunu değiştirerek sinyal dönüştürücü görev yapan katyonik iyon kanalı ailesidir. Bu süper aile, nematodlardan insanlara kadar çoğunlukla korunagelmiş çok sayıda değişiken modelli iyon kanalları grubunu ihtiva eder. Sekans homolojisine göre, memeli TRP

kanalı üst ailesi TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPA (Ankyrin), TRPML (Mucolipin), ve TRPP (Polycystic) olmak üzere altı alt aileye klasifiye edilir. İlk dört alt aile grup 1, son ikisi ise grup 2 olarak klasifiye edilir (Samanta vd., 2018). Birinci grupta yer alan transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2), ısıya duyarlı ve katyon akışına müdahale eden Ca^{+2} geçirgen bir kanaldır. Ayrıca vücuttaki birçok hücreden salınır (Clapham, 2003; Nilius vd., 2007). Karaciğer parankim hücreleri olan hepatositlerden de salınan TRPM2 (Rychkov ve Barritt, 2011) organda gerçekleşen glikoz, yağ asidi, aminoasit ve ksenobiyotik metabolizması ile safra asidi sekresyonu, protein sentezi, lizozom ve diğer veziküllerin hareketi ve üstelik hücrenin apoptozis ve nekrozuna kadar devam eden hücre döngüsü sürecinde Ca^{+2} iyonları değişimi ve düzenlenmesi üzerinden olmazsa olmaz vazife ifa edecektir (Boyer, 2002; Dixon vd., 2005; Enfissi vd., 2004; Leite ve Nathanson, 2001).

TRPM2 iyon kanalının birçok fizyolojik ve patolojik vakada hücrenin hayatta kalması ve ölümü ile ilgili önemli role sahip olabileceği ileri sürülmüştür (Miller ve Zhang, 2011). Oksidatif stres ve $TNF\alpha$, TRPM2'yi aktive ederek kalsiyum salınımını stimüle eder (Miller ve Zhang, 2011; Wilkinson vd., 2008). Aşırı miktarda hücre içi kalsiyum iyonu, mitokondriyal disfonksiyona ve devamındaki tahrip edici süreçlere zemin hazırlar (Bonaventura vd., 2016). Hücrelerde Ca^{+2} iyonunun yoğunluğunda meydana gelen kontrolsüz artış ve hücrede depo halinde bulunan Ca^{+2} serbest hale geçmesi pro-apoptotik faktör olarak değerlendirilir. Mitokondride Ca^{+2} iyonlarının aşırı artışı mitokondrinin hacimsel genişlemesine, bu olay ise hücrenin pro-apoptotik evreye gelmesinde önemli bir rol oynar. Mitokondrinin bütünlüğünü kaybetmesinin ardından caspase-ilişkili apoptozis süreci başlar (Giorgi vd., 2012). CP'ye maruz kalan hücrelerde meydana gelen apoptozisin TRPM kanallarının aktivasyonu üzerinden şekillendiği ileri sürülmüştür (Guler ve Ovey, 2020).

1.13. Apoptozis; Caspase 3 ve Bcl-2

Organizma gereksinim duyulmayan, hasarlı, transforme ya da ömrünü doldurmuş hücreleri programlı hücre ölümü diye de ifade edilen apoptozis ile bertaraf ederek homeostazisi sağlar (Cummings vd., 1997; Khan vd., 2008). Apoptozis, fizyolojik bir

süreç olup patolojik hücre ölümü olan nekrozdan farklı bir süreci takip eder (Bellamy vd., 1995). Hücre çekirdeği birden fazla parçaya bölünür yani kromatin kondansedir ve tipik apoptotik cisimcikler vardır. Apoptozis oluşumunda yangısal bir yanıt oluşmaz ki bu da apoptozise özel bir durumdur (Doonan ve Cotter, 2008; Tomatır, 2003). Apoptozisde hücreler morfolojik olarak sodyum kaybı nedeniyle büzüşmüş olarak görünürken, nekroze olan hücrelerde sodyum ve su artışı nedeniyle hücreler şişkin görülür (Yu, 2003).

Patolojik çerçevede tümör hücrelerinin (Baykal vd., 1998), akut yangıyı takiben nötrofillerin (Ocaña vd., 2008), viral hastalıklarda virüsten etkilenen hücrelerin yok edilmesi apoptozis üzerinden gerçekleşir (Lapierre vd., 2007). Radyasyon ve kemoterapötiklerin düşük dozda uygulanması sonucunda apoptozis oluşurken yüksek dozlarda uygulanması nekroz oluşumu ile sonuçlanabilmektedir (McConnell vd., 2007; Sungurlu vd., 1996).

Apoptozis gelişen hücrelerde, hücre içi kalsiyum (Ca) ve magnezyum (Mg) endonükleaz enzimini aktifleştirir, kromozomal DNA nükleozom denilen birimlere kadar parçalanır. Bu hücrelerin DNA'sı agaroz jel elektroforezde tipik merdiven basamağı (ladder formasyonu) görünümü verir (Bortner vd., 1995; Carson ve Ribeiro, 1993; Cohen, 1993; Elmore, 2007). Bu parçalama, apoptozis sinyalinin hücreye ulaşmasının ardından, hücrelerde bulunan ICAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease-caspase ile aktive olan deoksiribonükleaz inhibitörü-DNA fragmentasyon faktör 45) denilen inaktif bir enzimin, caspase-3 tarafından aktive edilerek, CAD (caspase activated DNaz, caspase ile-aktive olan deoksiribonükleaz-) aktif enzime dönüşmesi ile gerçekleşir. Bu aktif enzim çekirdek DNA'sını nükleozomal düzeyde 180-200 parçaya ayırır (Cohen, 1993; Pınarbaşı, 2007; Sakahira vd., 1998).

Apoptozis, organizmada proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki denge sayesinde düzenlenir (Adams ve Cory, 2001). Bcl-2 ve Bax gibi proapoptotik ve antiapoptotik regülatör proteinler arasındaki denge hücrenin geleceği açısından önem arz eder (Zheng vd., 2016). Bcl-2 proteini, p53 ve Bax gibi pro-apoptotik ve anti-apoptotik etkili bir gen ailesidir (Adams ve Cory, 2001). p53 mutasyonlu hücrelerde apoptozis kesintiye

uğrarken, Bcl-2'nin aşırı salınımı hücre proliferasyonu ve Bax'ın aşırı salınımı ise hücre ölümü ile sonuçlanır (Mader, 2007). Bcl-2 ailesine ait Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa proapoptotik proteinler iken, Bcl-2, BclxL ve Mcl1 antiapoptotik proteinlerdir. Proapoptotik proteinler apoptozisi indüklemek ile görevlidir. Bcl-2 ailesi proteinleri, proapoptotik etkisini caspase'ların öncü formları ve sitokrom-c salınımının engellenmesi üzerinden gösterirken, antiapoptotik etlerini iyon kanalları üzerinden gösterir (Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001; Ramdial vd., 2000).

Neoplastik hastalıklar, çağımız hastalık gruplarından biridir. Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan birçok kimyasalın kullanımı, hücre/doku/organlar üzerinde oluşturduğu yan etkiler nedeniyle kullanımı kısıtlanmaktadır. Hastanın sağlığı için bu yan etkileri azaltmak, en az ilacın etkinliği kadar önemlidir. Son zamanlarda, yan etkilerin azaltılmasında doğal ürünlerin kullanımının yaygınlaştığı göze çarpmaktadır. *G. glabra* (meyan) da antioksidan özelliği kanıtlanmış, kimyasalların hücre ve dokulardaki yıkımlayıcı etkisini azaltmak için kullanılan bir bitkidir. Meyan bitkisinin etkin etken maddelerinden glycyrrhizin'in kemoterapötiklerin oluşturduğu yan etkileri azalttığı, ayrıca neoplaziler üzerinde olumlu etkisinin olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Literatür incelemesi yaptığımızda, glycyrrhizinin CP ilişkili karaciğerden koruma ve tedavi araştırmalarında kullanıldığı herhangi bir deneysel veya saha çalışmasına rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, glycyrrhizinin CP'ye ilişkin hepatotoksisite olgularında doku ve/veya organ hasarına karşı koruyucu/önleyici etkilerinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan Materyali

Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütülen bu çalışma için AKÜHADYEK-477-15 referans numarasıyla izin alındı. Çalışmada, adı geçen birimden sağlanan 28 adet, 220-250 gr ağırlığında, erkek, Sprague Dawley ırkı rat kullanıldı. Çalışma, 4 gruplu ve her bir grup 7 hayvan içerir şekilde oluşturuldu. Hayvanlara deney süresince ad libitum standart rodent yemi ve çeşme suyu verildi. Deney hayvanları, oda sıcaklığında ($22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) ve uygun nem ortamında polikarbonat kafeslerin içinde 12 saat aydınlık/12 saat karanlık olacak şekilde barındırıldı ve 7 günlük uyum sürecinin sonunda deneye başlandı.

2.1.2. Kullanılan Alet ve Malzemeler

Dondurucu (Uğur UDF 7SL Vertical Frezer)

Hassas Terazı (Bel Engineering, Italy)

Kronometre (Isolab Laborgerate GmbH)

Cam jelli tüp

Mikro küvet

Distile su cihazı (Nüve ND8)

Doku takip cihazı (Leica TP 1020)

Mikrotom (Leica RM 2155)

Işık mikroskopu (Nikon Eclipse Ci)

Görüntüleme cihaz ve yazılımı (Kameram®, Mikrosistem)

2.1.3. Kimyasal Maddeler

Glycyrrhizic acid ammonium salt from glycyrrhiza root (licorice) (Sigma, Cas 53956-04-0)

Siklofosfamid (Endoxan®, 500 mg flakon, Eczacıbaşı-Baxter)

Ketamin HCl (Alfamın®, 100 mg flakon, EGE-VET)

Ksilazin HCl (Alfazyne®, 20 mg flakon, EGE-VET)

2.2. Yöntem

2.2.1. Deneme Gruplarının Oluşturulması

Deney hayvanı olarak kullanılan 28 rat, her grupta 7 rat bulunmak üzere 4 gruba ayrıldı. Çalışmanın bitimine kadar her kafeste 3 veya 4 rat barındırıldı. Çalışma gruplarına uygulanan yöntemler, gruplara göre ayrıntılı bir şekilde aşağıda ifade edildi.

Kontrol Grubu: Bu grubundaki hayvanlara gastrik gavaj (g.g.) ile sadece fizyolojik tuzlu su verildi. Totalde 48 saat sonra diğer hayvanlarla beraber ötenazi edildi.

CP Grubu: Deneyin başında bu gruptaki hayvanlara intraperitoneal (i.p.) yolla 150 mg/kg CP uygulandı. Başka bir işlem uygulanmayan hayvanlar 48 saatin ardından ötenazi edildi.

CP+GLY100 Grubu: Deneyin başında bu gruptaki hayvanlara g.g. yolla 100 mg/kg glycyrrhizin (GLY) uygulandı. Sonraki 20. dakikada i.p. yolla 150 mg/kg CP enjekte edildi. CP uygulamasından sonra ise 4. ve 8. saatlerde 100 mg/kg dozunda 2 kez daha g.g. yolla GLY verildi. Totalde 48 saat sonra hayvanlar ötenazi edildi.

CP+GLY200 Grubu: Deneyin başında bu gruptaki hayvanlara g.g. yolla 200 mg/kg GLY uygulandı. Sonraki 20. dakikada i.p. yolla 150 mg/kg CP enjekte edildi. CP uygulamasından sonra ise 4. ve 8. saatlerde 200 mg/kg dozunda 2 kez daha g.g. yolla GLY verildi. Totalde 48 saat sonra hayvanlar ötenazi edildi.

2.2.2. Örneklerin Toplanması

Deney bitiminde 5 mg/kg ksilazin HCl ve 50 mg/kg ketamin HCl ile anesteziye alınan hayvanlarda anestezi derinliği kısıtirma, kas tonusları ve palpepral refleksler gözlenerek takip edildi.

2.2.3. Makroskopik Yöntem

Ratların karın boşluğu, bilimsel nekropsi yöntemleri uygulanarak açıldı. Cerrahi koşullara uygun olarak karaciğerler disseke edilerek çıkarıldı. Karaciğerin hem dış yüzü hem de kesit yüzü olası lezyonlar açısından makroskopik muayeneye tabi tutuldu. Makroskopik muayenenin ardından safra kanallarına dik olacak şekilde kesiler yapılarak trimlenen uygun büyüklükte parçaları %10'luk tamponlu nötral formalinde tespit edildi.

2.2.4. Histopatolojik Yöntem

Formalin tespitinden sonra uygun büyüklükte küçültülen doku örnekleri takip kasetlerine alındı. Bir gece boyunca çeşme suyu altında yıkanan dokular otomatik doku takip cihazında (Leica TP 1020) düşükten-yüksek dereceli alkole doğru (50, 70, 80, 96'lık ve absolut alkol) dehidre edildi ve ksilol ile şeffaflaştırıldı. Ksilollü parafin ve 56-58°C'de erimiş parafinde ikişer saat tutulan dokulardan parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklar rotary mikrotom (Leica RM 2155) ile kesildi ve alınan 5 mikrometre (μm) kalınlığındaki kesitler su banyosu içerisinde lamlara transfer edildi. Etüvde kurutulan kesitler ksilol serileri ile absolut, 96, 80, 70 ve 50'lik alkollerden geçirilerek hematoksilin-eozin (HE) ile boyanıp (Luna, 1968) entallen yardımıyla lamelle kapatıldı.

Süreç sonunda elde edilen preparatlar ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse Ci) olası lezyonlar yönünden değerlendirilerek 0'dan 6'ya kadar skorlamaya gidildi. Bulgu yokluğu 0, varlığı ise hafiften şiddetliye 1-6 arasında değerlendirildi. Tespit edilen histopatolojik bulgular mikroskoba bağlı dijital kamera (Kameram®, Mikrosistem) ile makroskopik olarak görüntülendi.

2.2.5. İmmunohistokimyasal Yöntem

Parafin bloklardan Poly-L-lysine ile kaplanmış lamlara 4-6 μm kalınlığında alınan kesitler deparafinize ve rehidre edildi. 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda tutularak endojen peroksidaz aktivitesi giderildi. Mikrodalga uyumlu

basıncılı tencerede pH 6.0 sitrat tamponuna konarak 800 watt güçte, 20 dakika antijen-geri kazanım uygulaması yapıldı. Daha sonra 15 dakika serum bloklaması uygulandı ve primer antikör olan TRPM2 (1/50 sulandırma, bs-2888R, Bioss, Inc. USA), Bcl-2 (1/50 sulandırma, Santa Cruz Biotechnology (N-19): sc-492) ve cleaved-caspase-3 (1/50 sulandırma, Abcam, ab4051) antikörleri damlatıldı ve oda ısısında 2 saat inkübe edildi. Daha sonra biotinli Anti-Rabbit IgG (Vector, BA-1100, 1/200 dilüsyon) damlatıldı ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Bu aşamadan sonra Avidin Biotin peroksidaz kiti (Vector Inc, Vectastain Elite ABC Kit, PK-6100) damlatıldı ve 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Bağlantıları renklendirmek için peroksidaz substratı olan 3-amino-9- ethyl carbazol (AEC, Vector Inc, ImmPACT AMEC Red, SK-4285) damlatıldı. Zemin, Gill's (I) hematoksilin ile boyandı. Aköz yapıştırıcı ile yapıştırılarak ışık mikroskopunda (Zeiss AxioLab.A1) incelendi ve mikroskop kamerasında (Kameram®, Mikrosistem) fotoğraflandı. Boyamada immunoreaktivitenin yaygınlığı ve şiddeti (0: yok, 1: az, 2: orta, 3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu.

2.3. İstatistiksel Yöntem

Elde edilen verilerin istatistiksel olarak incelenmesinde; çalışmadan elde edilen verilerin değerlendirilmesi Shapiro ve Wilk (1965) tarafından geliştirilen ve bu çalışmadaki örneklem boyutu ve ölçüm sayısı için uygun olan Shapiro-Wilk testi gerçekleştirildi. İki den fazla grup ortalamasının karşılaştırılmasında ve fark bulunan değişkenlerde alt grupların arasındaki farkların yorumlanması için “Tek yönlü Varyans analizi” (One-Way ANOVA) ve Post-hoc Bonferroni, LSD testleri veya normal dağılım koşulu sağlanmıyorsa; Kurskal Wallis, Post-hoc test olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

İstatistiksel anlamlılık varyans analizi için $p < 0,05$ kabul edilirken, tip I hatayı önlemek için yapılan Bonferroni düzeltmesi sonucunda Mann-Whitney U testiyle yapılan ikili karşılaştırmalar için istatistiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0,0083$ olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Klinik Bulgular

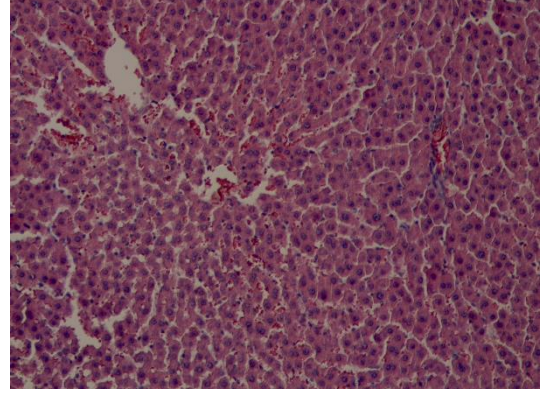
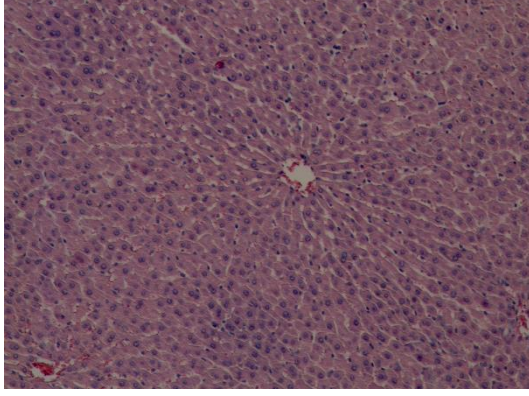
Materyal ve metot bölümünde belirtilen uygulamaların akabinde ratların kafes köşelerinde barınmayı tercih ettiği ve nispeten daha kısıtlı hareket ettiği gözlemlendi. Adaptasyon sürecinin ardından nispi olarak yem tüketiminin azaldığı su tüketiminin ise artış gösterdiği dikkat çekti.

3.2. Makroskopik Bulgular

Çalışmada, gastrik gavaj yöntemi ile yalnızca serum fizyolojik verilen kontrol grubu hayvanların karaciğerleri makroskopik olarak normal görünümdeydi. CP grubundaki hayvanların karaciğerleri hafif büyümüş, kenarları kütleşmiş, kıvamı hafif gevrek ve koyu renkte olup kesit yüzünde az miktarda koyu renkli kan sızılmaktaydı. CP grubuyla karşılaştırıldığında, CP+GLY100 ve CP+GLY200 gruplarının karaciğer makroskopik bulguları iyi görülmeyle birlikte, bu iyileşmenin CP+GLY200 grubunda daha fazla olduğu görülmektedir.

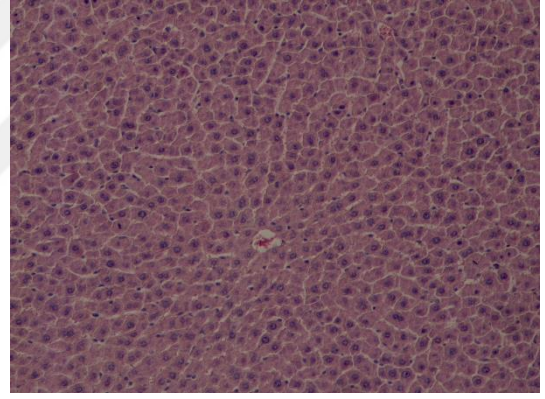
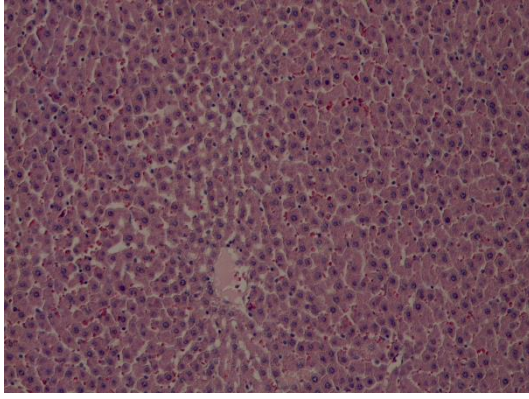
3.3. Mikroskopik Bulgular

Yapılan çalışmada incelenen karaciğer dokularında değişen şiddette konjesyon, dejeneratif-nekrobiyotik değişiklikler ve Kuppfer hücre aktivasyonları gözlemlendi. Deneysel gruplarının karaciğer dokuları, histopatolojik açıdan değerlendirilirken, grupların lezyon temelli değerlendirilmesi tercih edilerek bulgular aşağıda sunuldu. Hematoksilen-eozin ile boyanmış olan resimlerin orijinal büyütme oranları x20'dir (Şekil 1A-1D).



Şekil 1A: Kontrol grubu, karaciğerin histolojisi

Şekil 1B: CP grubu, karaciğerin histolojisi



Şekil 1C: CP+GLY100 grubu, karaciğerin histolojisi

Şekil 1D: CP+GLY200 grubu, karaciğerin histolojisi

3.3.1. Konjesyon

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, CP uygulanan grupta istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek konjesyon gözlemlendi. Ancak glycyrrhizin uygulanan gruplarda, bu lezyonun CP grubuna kıyasla daha az olduğu görüldü. Kontrol grubu ile CP+GLY100 ve CP+GLY200 grupları arasında istatistik açısından anlamlı bir fark görülmezken, CP+GLY200 grubu kontrol grubuna daha yakın sonuçlar gösterdi.

Konjesyon derecesi incelendiğinde, CP grubu ile CP+GLY100 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak, CP grubu ile CP+GLY200 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edildi. CP+GLY100 ile CP+GLY200 grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Tablo 2).

3.3.2. Dejenerasyon ve Nekroz

CP uygulanan grupta, vena sentralis çevresindeki hepatositlerde yoğunlaşan dejeneratif ve nekrobiyotik bulgular diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede fazlaydı. CP grubu ile CP+GLY100 ve CP+GLY200 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı. CP+GLY100 grubunda verilen 100 mg/kg dozda glychrrhizin'in CP'in neden olduğu dejeneratif ve nekrobiyotik bulguları azalttığı, ancak CP+GLY200 grubunda 200 mg/kg dozda verilen glychrrhizininin nispeten daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlendi. CP+GLY100 ile CP+GLY200 grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 2).

3.3.3. Kupffer Hücreleri

Karaciğer dokusunda kupffer hücre aktivasyonu bakımından kontrol grubu ile CP grubu arasında anlamlı derecede fark vardı. Kontrol grubu ile CP+GLY100 ve GLY200 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken, kontrol grubu ile CP+GLY200 grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak iki grup birbirine benzerlik göstermekteydi (p: 1.000). Bu durum, iyileşmenin neredeyse kontrol grubuna yakın olduğunu göstermiştir. CP grubu ile CP+GLY100 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken, CP grubu ile CP+GLY200 grubu arasında anlamlı bir fark vardı (Tablo 2).

Çizelge 3.1: Histopatolojik parametrelerin istatistiksel analizi

Gruplar	Konjesyon	Dejenerasyon	Kupffer Hücre Aktivasyonu
Kontrol-CP	0,001*	0,001*	0,003*

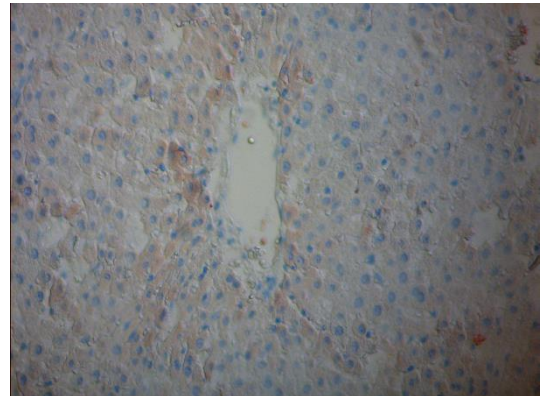
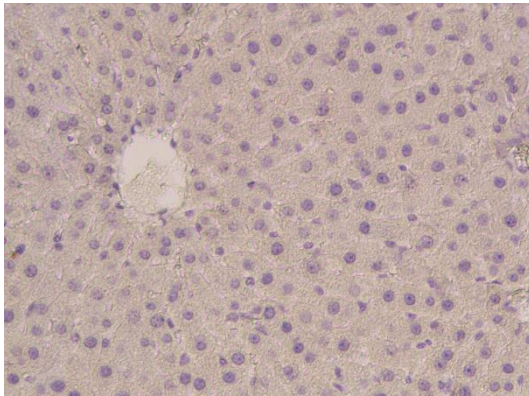
Kontrol-CP+GLY100	0,578	0,003*	0,009
Kontrol-CP+GLY200	0,591	0,007*	1,000
CP-CP+GLY100	0,011	0,005*	0,061
CP-CP+GLY200	0,005*	0,002*	0,003*
CP+GLY100-CP+GLY200	0,233	0,074	0,009

*İstatistiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0,0083$ olarak kabul edilmiştir.

3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

3.4.1. Caspase-3 Bulguları

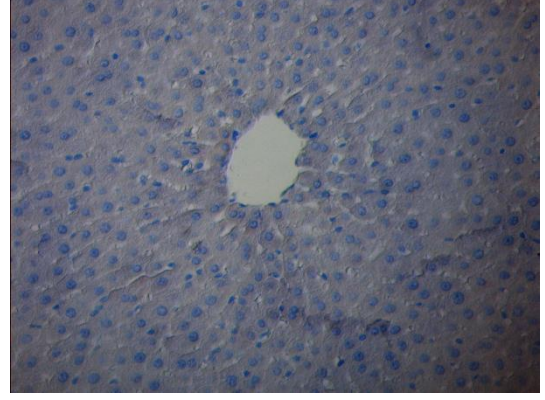
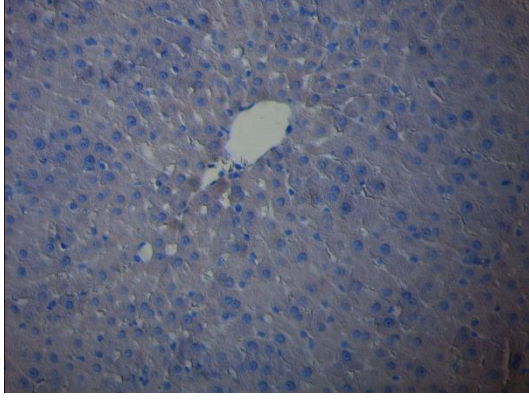
Karaciğerde CP uygulamasına bağlı olarak artan apoptozis üzerinde glycyrrhizinin etkisinin değerlendirilmesi için caspase-3 antikoruna bütün gruplar için belirteç olarak kullanıldı (Şekil 2A-2D). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CP uygulanan grupta caspase-3 immunoreaktivitesi anlamlı şekilde artmıştı. Ancak, CP grubunun aksine caspase-3 immunoreaktivitesi CP+GLY100 ve CP+GLY200 gruplarında anlamlı şekilde azalmıştı. Bu sonuçlar glycyrrhizinin her iki dozda da karaciğer dokusunda CP'nin apoptotik etkisini önemli ölçüde azalttığını açıkça doğruladı.



Şekil 2A: Kontrol grubu, karaciğerde **Şekil 2B:** CP grubu, karaciğerde caspase-3

caspase-3 immunreaktivitesi

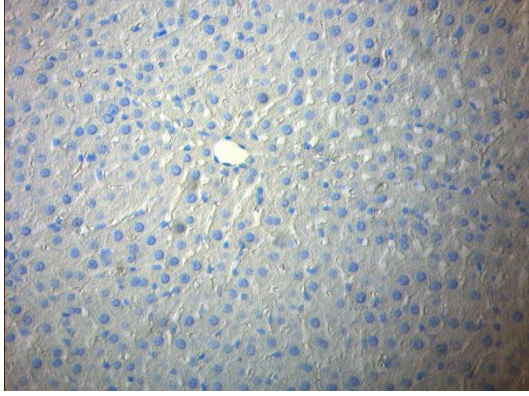
immunreaktivitesi



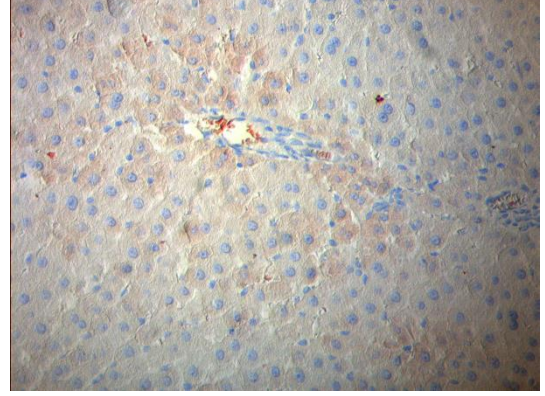
Şekil 2C: CP+GLY100 grubu, **Şekil 2D:** CP+GLY200 grubu,
karaciğerde caspase-3 immunreaktivitesi karaciğerde caspase-3 immunreaktivitesi

3.4.2. TRPM2 Bulguları

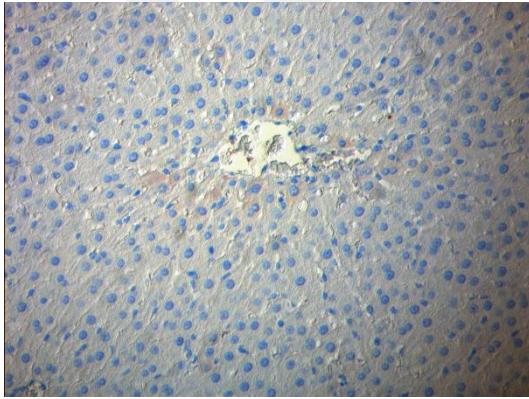
Deney gruplarında, karaciğer dokusunda transient receptor potential kanal aktivasyonunu saptamak için tüm gruplara TRPM2 belirteci uygulandı (Şekil 3A-3D). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CP uygulanan grupta TRPM2 immunoreaktivitesi anlamlı şekilde artmıştı. CP grubunda meydana gelen immunoreaktivitenin CP+GLY100 ve CP+GLY200 gruplarında azaldığı gözlemlendi. Glycyrrhizinin her iki dozda da hepatositlerde transient receptor potential kanal aktivasyonunu azalttığı gözlemlendi.



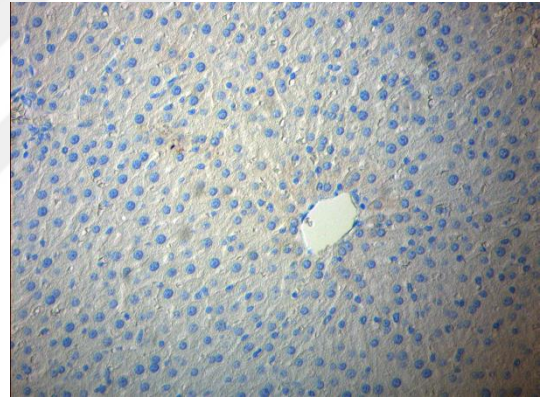
Şekil 3A: Kontrol grubu, karaciğerde TRPM2 immunreaktivitesi



Şekil 3B: CP grubu, karaciğerde TRPM2 immunreaktivitesi



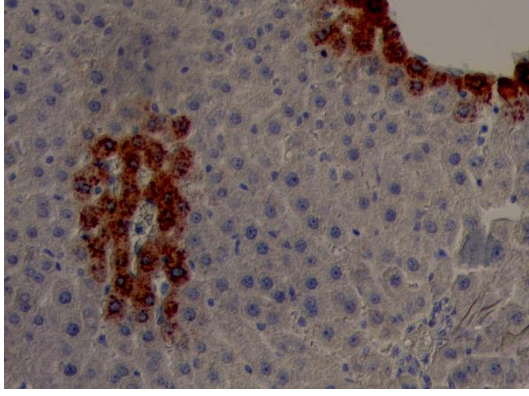
Şekil 3C: CP+GLY100 grubu, karaciğerde TRPM2 immunreaktivitesi



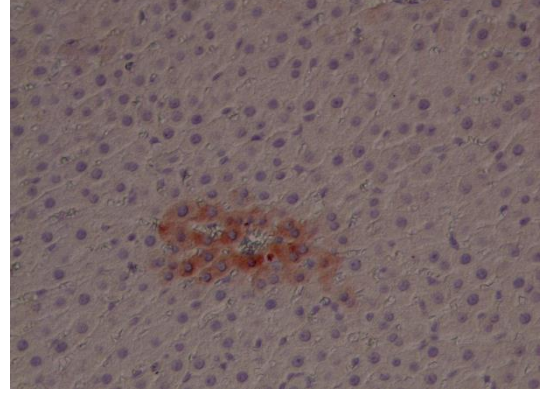
Şekil 3D: CP+GLY200 grubu, karaciğerde TRPM2 immunreaktivitesi

3.4.3. Bcl-2 Bulguları

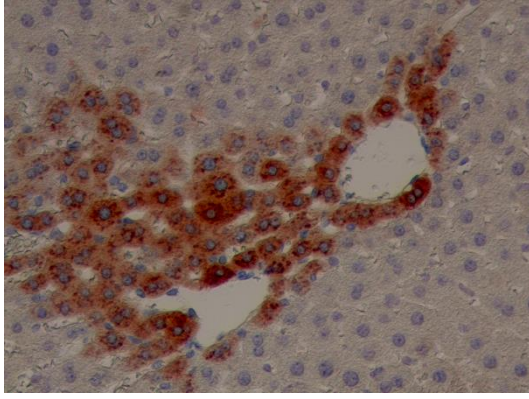
Deney gruplarında, karaciğer dokusunda anti-apoptotik aktivasyonun saptanması için, kesitlere anti-apoptotik protein ailesinin bir üyesi olan Bcl-2 uygulandı. Kesitler immunpozitiflik bakımından değerlendirildiğinde, kontrol grubundaki pozitif hücrelerin başta CP grubu olmak üzere diğer tüm deney gruplarından fazla olduğu tespit edildi (Şekil 4A-4D).



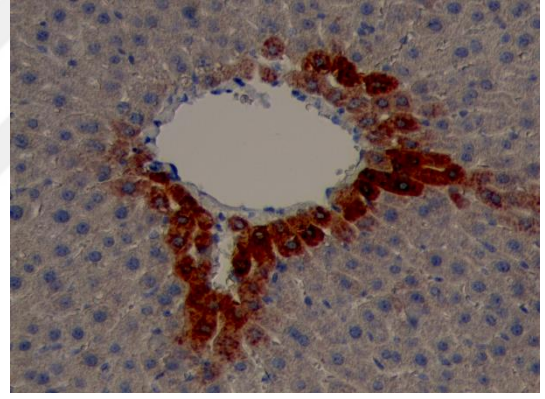
Şekil 4A: Kontrol grubu, karaciğerde Bcl-2 immunreaktivitesi



Şekil 4B: CP grubu, karaciğerde Bcl-2 immunreaktivitesi



Şekil 4C: CP+GLY100 grubu, karaciğerde Bcl-2 immunreaktivitesi



Şekil 4D: CP+GLY200 grubu, karaciğerde Bcl-2 immunreaktivitesi

4. TARTIŞMA

İdeal bir kemoterapötik ajan, neoplastik hücreleri doğrudan yok etmeli, normal hücrelere hiç zarar vermemeli veya çok az zarar vermelidir. Ancak, henüz böyle bir ajan mevcut olmayıp hali hazırda neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan ajanlar genellikle sağaltım oluştururken, dokular üzerinde birçok yan etkiye de neden olmaktadır.

Siklofosfamid, çeşitli neoplastik ve non-neoplastik hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve birçok yan etkisi bulunan kemoterapötik bir ajandır (Stillwell ve Benson, 1988). Sahip olduğu düşük seçicilik nedeniyle diğer kemoterapötik ajanlarda görüldüğü üzere CP’de neoplastik hücreleri yok ederken, normal hücrelere zarar verebilmekte (Ghobadi vd., 2017; Papaldo vd., 2005; Said vd., 2016) ve dolayısıyla doku ve organlarda çok çeşitli yan etkiler oluşturmaktadır. Bu yan etkilerin en çok bilinenleri; hemorajik sistitis (Hamzeh vd., 2018), hepatotoksisite (El-Naggar vd., 2016), akciğer hasarı, böbrek toksisitesi (Said vd., 2016), testiküler toksisite (Ghobadi vd., 2017), kardiyomiyopati (Asiri, 2010) ve ayrıca pankreasın adacık hücrelerinde hasar (Sharma vd., 2016) olarak sıralanabilir.

Siklofosfamidin neden olduğu toksik etkiden en çok etkilenen organlardan biri karaciğerdir ve bilindiği üzere karaciğer vücudun en önemli metabolik ve katabolik organıdır. Bu fonksiyonu nedeniyle de karaciğerde oluşan hasar, metabolizma ile ilişkili önemli fonksiyonel bozukluklara da neden olacaktır (Campbell, 2006; El-Naggar vd., 2016). Karaciğerde CP maruziyetine bağlı olarak gelişen hepatotoksisitenin oluşumunda farklı birçok teoriye ek olarak, CP’nin normal metabolizasyonu ve detoksifikasyon işlemleri sırasında oluşan ROT (Klaassen vd., 2008) ve ROT ilişkili oksidatif stresin etkili olduğu da ileri sürülmektedir (Jnaneshwari vd., 2014; Li vd., 2019; Zarei ve Shivanandappa, 2013). CP’nin karaciğerde metabolizasyonunu takiben sitotoksik bir metabolit olan akroleinin oluşumu, eş zamanlı olarak reaktif oksijen türlerinde ve lipid peroksidasyonda artış oksidatif stres ile ilişkilendirilir (Mohammad vd., 2012; Ray vd., 2011). Oksidatif stres uyarıldığında, homeostazisin devamı için kritik olan pro-oksidasyon ile anti-oksidasyon arasındaki denge pro-oksidasyon lehine dönerek toksisiteye ve dolayısıyla doku ve hücre hasarı neden olur (Inafuku vd., 2013).

Genel olarak kemoterapötik ajanlara maruz kalan hücrelerde serbest oksijen radikalleri ile hücre içi Ca^{+2} seviyesinde artış ile oksidatif stres oluştuğu gözlemlenmiştir (Fels vd., 2018). CP uygulanması sonucunda hücrelerde; hücre içi Ca^{+2} seviyeleri, hücre içi ROT, mitokondriyal depolarizasyon ve buna bağlı olarak caspase-3 seviyelerinde artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Guler ve Ovey, 2020). Serbest radikaller hücre membranında doymamış yağ asitlerinin proteine oranında

dengelessizliğe neden olarak lipid peroksidasyona yol açar (Edson ve Rettie, 2013). Bu etkileşim aynı zamanda hücre ve hücreye ait organel zarlarının akışkanlığını ve geçirgenliğini etkileyerek işlevini engeller. CP'nin apoptotik etki yolu hücrelerde bulunan TRPM2 ile doğrudan ilişkilidir (Guler ve Ovey, 2020). Bu durum, sitoplazmada Ca^{+2} konsantrasyonunun artması ve buna bağlı olarak hücrenin aşırı şişmesine neden olur (Nakayama vd., 2007). Yükselen ROT seviyesi mitokondriyal membran tarafından tetiklenen oksidatif strese neden olarak Ca^{+2} miktarında artışa neden olur. Bu olay, depolarizasyona ve caspase aktivasyonuna neden olarak apoptozis ile sonuçlanır (Uğuz vd., 2009). TRP kanallarının uyarılmasının iyonik hemostazı bozduğu ve hücre içine kalsiyum girişine neden olarak hücre ölümüne yol açtığı rapor edilmiş (Boonstra vd., 2016). Apoptozisin engellenmesi de yine bu kanalın fonksiyonlarının etkilenmesi ile mümkündür (Guler ve Ovey, 2020).

Son yıllarda kemoterapötiklerin yan etkilerine karşı oksidan-antioksidan dengesini koruyan ve oksidatif stresin oluşmasını önleyerek dokularda oluşabilecek hasarları en aza indirerek (Keles vd., 2014; Vieira vd., 2004), hastaların tedavi sürecini sağlıklı kılacak uygulamalar hedeflenmektedir. Vücudun farklı doku ve organlarında CP ilişkili yan etkileri önleyebilen *Alpinia oppicinarrum* (Matsuda vd., 2006), *Vitis vinifera* (Bagchi vd., 1999; Zhao vd., 1999) ve *Timus vulgaris* (Lee vd., 2005) gibi bitkilerin yanı sıra *Curcuma longa* (Arafa, 2009) ve *Phyllanthus niruri* (Boeira vd., 2011) gibi bitkilerin de yüksek antioksidatif ve antiinflamatuvar etkileri ortaya konmuştur. Hakeza, antioksidan özelliği çok iyi bilenen *G. glabra*'nın farklı etyolojili hastalıklar ile neoplazilerde tedavi edici etkilerinin kanıtlandığı çalışmalar da mevcuttur (Asl ve Hosseinzadeh, 2008; Ito vd., 1988; Kim vd., 2012; Lin vd., 1999; Park vd., 2014; Ram vd., 2006; Shiota vd., 1999; Sohn vd., 2003). *G. glabra*'nın etkin etken maddelerinden biri olan glycyrrhizinin farklı etyolojili hastalıklar ile neoplazilerde antiviral, antiinflamatuvar, antitümöral, hepatoprotektif gibi pozitif etkilerinin yanı sıra ilaç moleküllerinin terapötik etkisini arttırdığı yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Asl ve Hosseinzadeh, 2008; Ito vd., 1988; Kim vd., 2012; Lin vd., 1999; Park vd., 2014; Ram vd., 2006; Selyutina ve Polyakov, 2019; Shiota vd., 1999; Sohn vd., 2003). Glycyrrhizinin kardiyoprotektif etkilerinin (Xu vd., 2018) yanısıra karaciğerde CCl4-ilişkili apoptozisi önlediği (Liang vd., 2015) ve

en önemlisi de siklofosfamid, vinkristin, doksorubisin ve prednizon tedavisi alan hastalarda karaciğer toksisitesini azalttığı bilinmektedir (Gao vd., 2015; Matsuo vd., 2001).

G. glabra'nın miyokard dokusunda ve serumda antioksidan parametreleri artırdığı, oksidan parametreleri azalttığı ve ayrıca kalp dokusundaki kalsiyum konsantrasyonunu düşürdüğü bildirilmiştir (Adams ve Beam, 1991; Zhao vd., 2020). Bu çerçevede *G. glabra*'nın etkin etken maddelerinden olan glycyrrhetic acid ile yapılan bir çalışmada, antifibrotik etkinliği sayesinde TRPA1 kanal aktivasyonunu gerçekleştirdiği ortaya konulmuş (Kurahara vd., 2017), başka bir çalışmada ise *G. glabra*'nın TRPC3'ü inaktive ederek hücre içi kalsiyum miktarını düşürdüğü bildirilmiş (Li, vd., 2019).

G. glabra'nın hepatoprotektif etkinliğini ortaya koyan çalışmalarda mevcuttur. Huo vd. (2011), wistar ratlarda yaptıkları çalışmada; hepatotoksositeye yol açan bir molekül olan CCl4 uygulamasına karşı *G. glabra* ekstraktı uygulamışlar ve çalışma sonunda *G. glabra*'nın serbest radikalleri temizleyerek, antioksidan enzimlerin aktivitelerini uyararak ve inflamatuvar sitokin üretimini durdurarak karaciğeri koruyabilecek bir mekanizma ile hepatoprotektif etki gösterdiğini ve bu özelliği ile tedavide önemli bir rol oynayabileceğini belirtmişlerdir.

Cao vd. (2019), 20 mg/kg dozda metotreksat ile indükledikleri karaciğer hasarına karşı, *G. glabra*'nın bir bileşeni olan magnezyum isoglycyrrhizinate'ı (MgIG) 9 ve 18 mg/kg/gün dozlarında wistar ratlara vererek bitkinin hepatoprotektif etkinliğini izlenmişler. 7 gün süren bu çalışmada, caspase-3 immun pozitifliği üzerinden MgIG'nin hepatotoksositeyi ve apoptozisi inhibe ettiğini ve bu etkinin 18 mg/kg/gün dozunda daha iyi olduğunu gözlemlemişlerdir.

Asetaminofen'in 350 mg/kg dozu ile ratlarda oluşturulan karaciğer hasarını önlemek amacıyla yapılan çalışmada (Yang vd., 2017), 100 mg/kg dozunda verilen glycyrrhetic asidin asetaminofen kaynaklı caspase-3 aktivasyonunu ve dolayısıyla hepatoselüler apoptozisi önemli derecede azalttığı gösterilmiştir.

CP maruziyeti ile oluşan karaciğer hasarını önlemek amacıyla yapılan bir çalışmada (Stojiljković vd., 2019), 200 mg/kg CP verilen erkek wistar ratlara 5 gün boyunca nanolipozomlar ile kapsülendirilerek antioksidatif etkinliği güçlendirilmiş 10 mg/kg dozunda ellajik asit uygulanmış ve bu uygulamanın lipid peroksidasyon seviyesini düşürdüğü, CP kaynaklı vakuoler dejenerasyon, ödem, sentral konjesyon ve Remak kordonlarında düzensizlik gibi lezyonları belirgin düzeyde azalttığı ve caspase-3 ve Bcl-2 sonuçlarına göre fokal apoptozisi azaltarak karaciğer hasarını önlediği ortaya koymuştur.

Aynı hedef ile yapılan başka bir çalışmada (Abdelfattah-Hassan vd., 2019), 14 gün boyunca günde 20 mg/kg CP uygulanan ratlara aynı zamanda günlük 100 mg/kg E vitamini veya 100 mg/kg dozda panax ginseng verilmiştir. Her iki maddede CP ilişkili hepatotoksisiteye karşı hepatoprotektif etkinlik göstermiştir. Ancak, panax ginsengin hepatoprotektif etkinliğinin E vitamininden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar kronik karakterli bu çalışmada, CP gruplarında mononükleer hücreler ve hatta lökositlerin yaygın olarak görüldüğünü, lokal koagülasyon nekrozları ile Kupffer hücre aktivasyonu ve fibröz bağ dokusunun da şekillendiğini, CP uygulaması ile artan caspase-3 seviyelerinin E vitamini ve panax ginseng uygulanan gruplarda düştüğünü ifade etmişlerdir.

Çağlayan vd. (2018), 200 mg/kg dozda CP verilen ratlarda naringinin 50 mg/kg dozunun caspase-3 immün pozitifliği azalttığını, ancak 100 mg/kg dozda daha etkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Çağlayan vd., 2018). Bu çalışmada, CP grubunda karaciğerin portal bölgesinde mononükleer hücre infiltrasyonu, konjesyon, hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve koagülasyon nekrozu kaydedilmiştir. Naringin etken maddesinin 50 mg/kg verildiği grupta hiperemi ve konjesyon azalırken sentral bölgede hidropik dejenerasyon ve nadiren nekroze olan hepatositlere de rastlanmıştır. Naringin etken maddesinin 100 mg/kg dozda verildiği grupta ise bulgular oldukça azalmış olup hafif hiperemi ve hidropik dejenerasyona rastlanırken nekroz kaydedilmiştir.

Singh vd., (2018) tarafından yapılan bir çalışmada. 200 mg/kg CP vererek Swiss-albino farelerde şekillendirdikleri hepatotoksisiteye karşı, anti-oksidadatif özellikleri

bilinen *Premna integrifolia*'nın etil asetat ekstresinin olumlu etkilerini göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, 400-600 mg/kg dozlarda *Premna integrifolia*'nın etil asetat ekstralarının hepatotoksisiteyi önlediği, ancak 600 mg/kg dozun daha etkili olduğu ortaya koyulmuştur. Yine bu çalışmada, karaciğerde CP ilişkili apoptozis caspase-3 ve Bcl-2 immün pozitiflik üzerinden takip edilmiş, CP grubunda yüksek seviyedeki caspase-3 immün pozitifliğinin *Premna integrifolia*'nın etil asetat ekstresinin 400-600 mg/kg dozda uygulandığı gruplarında normale dönme eğilimi gösterdiği ve bu etkinin 600 mg/kg dozunda yüksek olduğu kaydedilmiştir. Çalışmanın histopatolojik bakışında, CP grubunun karaciğer dokusunda hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz, hemoraji, sinüzoidal boşluklar ile sentral venlerde genişleme gözlenmiş, ancak *Premna integrifolia*'nın etil asetat ekstresinin hepatositlerdeki hasarı azalttığı ve yüksek dozda etkinin daha olumlu olduğu ifade edilmiştir.

Temel vd. (2020) tarafından Wistar-albino ratlara 200 mg/kg dozda verilen CP-ilişkili hepatotoksisiteye karşı, bal-propolis ve bitkilerde doğal olarak bulunan chrysin 25 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarında verilerek hepatoprotektif etkinliği incelenmiş ve bu maddenin apoptozis ve hepatotoksisite üzerine inhibe edici etkilerinin 50 mg/kg dozunda daha iyi olduğu gözlenmiştir. Yine bu çalışmada, CP'e maruz kalan ratların karaciğer dokusunda hepatositlerde hidropik dejenerasyon, koagülasyon nekrozu, sinüzoidlerde orta şiddette stenoz ve damarlarda hiperemi tarif edilmiştir. Özellikle 50 mg/kg dozda verilen chrysin'in, CP ve CP + 25 mg/kg chrysin uygulanan gruplara kıyasla patolojik değişikliklerin azalttığı ve bu grupta hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve hipereminin oldukça sınırlı olduğu ifade edilmiştir. Araştırmacılar apoptozisi Bcl-2 immün pozitifliği ile gözlemişler ve CP grubunda görülen immün pozitiflik, CP+25 mg/kg chrysin ve CP+50 mg/kg chrysin gruplarında daha yüksek düzeyde olduğu kaydedilmiştir.

Çalışmamızda, ratlara 150 mg/kg dozunda CP uygulanmış ve bu uygulamalar klinik protokoller doğrultusunda i.p. yolla verilmiş, aynı zamanda klinik uygulama dozu dikkate alınmıştır. Siklofosfamidin neden olduğu yan etkileri görebilmek, dokularda oluşan bu yan etkilere karşı glycyrrhizinin etkisini kanıtlayabilmek için bu çalışma planlanmıştır. Kontrol grubu deney hayvanlarında, gastrik gavaj yolu ile sadece

fizyolojik tuzlu su uygulanmış, makroskopik ve mikroskopik olarak herhangi bir bulguya rastlanılmamıştır. CP grubuna i.p. yolla sadece CP uygulanmış hayvanlarda ise karaciğer hepatotoksitesine ilişkin bulgular belirgin şekilde izlenmiştir.

CP'nin karaciğerdeki istenmeyen etkilerini gözlemleyen araştırmacıların (Abdelfattah-Hassan vd., 2019; Caglayan vd., 2018; Singh vd., 2018; Stojiljković vd., 2019; Temel vd., 2020; Yalçın vd., 2020) çalışmalarına paralel olarak, bizim çalışmamızda da CP'ye maruz kalan hayvanların karaciğerinde belirgin olarak konjesyon, dejenerasyon ve nekroz gözlenmiş olup, bu tür değişikliklerin glycyrrhizin uygulamalarına olumlu yönde cevap verdiği ve bu pozitif etkinin doz artışına paralel seyrettiği gözlenmiştir.

Apoptozis, CP'nin neden olduğu hepatotoksitenin patogenezinde önemli bir role sahiptir (Caglayan vd., 2018; Fouad vd., 2016; Li vd., 2015). Bu çalışmada CP uygulamasının karaciğer dokusunda caspase-3 ekspresyonunu artırdığı gözlenmiş olup, bu bulgunun daha önceki yayınlarla (Abdelfattah-Hassan vd., 2019; Caglayan vd., 2018; Li vd., 2015; Sarker ve Oba, 2019; Singh vd., 2018; Stojiljković vd., 2019; Yalçın vd., 2020) paralel bulunmuştur. Glycyrrhizin uygulamalarında apoptozisin doz artışına ters orantılı olarak azalması şeklindeki bulgumuz farklı çalışmalarla (Cao vd., 2019; Huo vd., 2011; Yang vd., 2017) ortaya konmuş olan glycyrrhizinin antiapoptik etkisi ile uyumlu bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda da caspase-3 ve Bcl-2 sonuçları bu sonuçlara benzer olarak izlenmiş olup ek olarak uygulamış olduğumuz Trmp-2 sonuçları glycyrrhizinin CP ilişkili karaciğer hasarını 100 mg/kg dozda önleyebileceğini, 200 mg/kg dozda daha etkili olduğunu göstermiştir.

Konu ile alakalı yapılan çalışmaların büyük bir kısmında (Caglayan vd., 2018; Cao vd., 2019; Singh vd., 2018) karaciğerde gözlenen histopatolojik bulgular bizim çalışmamızla benzer doğrultuda bulgular bildirmişken; Stojiljković vd. (2019) portal alan sınırlarında rejeneratif hücre aktivasyonu gösteren hepatositler olarak tarif ettikleri bulguya bizim çalışmamızda rastlanılmamıştır. Aynı şekilde Abdelfattah-Hassan vd. (2019) bizim bulgularımızdan farklı olarak portal alanda fibröz bağ doku

proliferasyonu bildirmeleri de vakidir. Çalışmaların geneline bakıldığında; gerek bizim çalışmamızla diğer çalışmalar arasında, gerekse de diğer çalışmaların kendi aralarında gözlenen kısmi farklılıkların çalışmalarda tercih edilen hayvan türüne, hayvanın cinsine, hayvanın yaşına, çalışmanın süresine ve uygulanan dozlara ilişkin olabileceği düşünölmüştür.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Neoplastik ve non neoplastik hastalıklarda kullanılan siklofosfaidin, hayati bir organ olan karaciğerde oluşturduğu hepatotoksisite, ilacın etkin kullanımını sınırlayan ve tedavi sürecini zorlaştıran en önemli unsurdur. Anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal, anti-oksidatif, hepatoprotektif gibi çok geniş bir etki yelpazesi olduğu bilinen meyan bitkisinin (*G. glabra*) etkin etken maddelerinden biri olan glycyrrhizinin'in CP'nin oluşturduğu hepatotoksisiteyi önleyebileceği düşünülmüştür.

Literatür incelemesi yaptığımızda, glycyrrhizinin CP ilişkili karaciğerden koruma ve tedavi araştırmalarında kullanıldığı herhangi bir deneysel veya saha çalışmasına rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, glycyrrhizinin CP'ye ilişkin hepatotoksisite olgularında doku ve/veya organ hasarına karşı koruyucu/önleyici etkileri patolojik olarak araştırılmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, glycyrrhizinin CP'nin neden olduğu hepatotoksisiteyi önleyebileceği yönündedir. 100 mg/kg dozda uygulanan glycyrrhizin hepatotoksisiteyi önlediği ancak 200 mg/kg dozda hepatotoksisiteye ilişkin makroskopik, histopatolojik (konjesyon, dejenerasyon-nekrobiyoz, kupffer hücre aktivasyonu), immünohistokimyasal (caspase-3, Bcl-2, TRPM-2), bulguların çok daha azaldığı görülmüş, istatistiksel analizler ile de desteklenmiştir.

Ülkemizde yetişen kolaylıkla ulaşılabilen *G. glabra* ve bitkiden elde edilen etkin etken maddelerin CP'nin kullanımını kısıtlayan yan etkilerini azaltılabileceği, tedavide CP'nin daha etkin kullanımına fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Elde ettiğimiz bulguların, kemoterapi kullanılan hastaların zorlu tedavi sürecine yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdelfattah-Hassan, A., Shalaby, S.I., Khater, S.I., El-Shetry, E.S., Abd El Fadil, H., Elsayed, S.A. (2019). Panax ginseng is superior to vitamin E as a hepatoprotector against cyclophosphamide-induced liver damage. *Complement Ther. Med.*, 46, 95-102.
- Adams, B.A., Beam, K.G. (1991). Contractions of dysgenic skeletal muscle triggered by a potentiated, endogenous calcium current. *J. Gen. Physiol.*, 97(4), 687-696.
- Adams, J.D., Klaidman, L.K. (1993). Acrolein-induced oxygen radical formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(2), 187-193.
- Adams, J.M., Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*, 26(1), 61-66.
- Adrain, C., Martin, S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, 26(6), 390-397.
- Ahn, S.J., Cho, E.J., Kim, H.J., Park, S.N., Lim, Y.K., Kook, J.K. (2012). The antimicrobial effects of deglycyrrhizinated licorice root extract on *Streptococcus mutans* UA159 in both planktonic and biofilm cultures. *Anaerobe*, 18(6), 590-596.
- Akamatsu, H., Komura, J., Asada, Y., Niwa, K. (1991). Mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhizin: Effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation. *Planta Med.* 57, 119-121.
- Alfajaro, M.M., Kim, H.J., Park, J.G., Ryu, E.H., Kim, J.Y., Jeong, Y.J., Kim, D.S., Hosmillo, M., Son, K.Y., Lee, J.H., Kwon, H.J., Ryu, Y.B., Park, S.J., Park, S.I., Lee, W.S., Cho, K.O. (2012). Anti-rotaviral effects of *Glycyrrhiza uralensis* extract in piglets with rotavirus diarrhea. *Virology J.*, 9, 310.
- Ambawade, S.D., Kasture, V.S., Kasture, S.B. (2002). Anticonvulsant Activity Of Roots And Rhizomes Of *Glycyrrhiza Glabra*. *Indian Journal of Pharmacology* 6(34), 251-255.
- Angulo, I., Jiménez-Díaz, M.B., García-Bustos, J.F., Gargallo, D., de las Heras, F.G., Muñoz-Fernández, M.A., Fresno, M. (2002). *Candida albicans* infection enhances immunosuppression induced by cyclophosphamide by selective priming of suppressive myeloid progenitors for NO production. *Cell. Immunol.*, 218(1-2), 46-58.
- Arafa, H. M. M. (2009). Uroprotective effects of curcumin in cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis paradigm. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 104(5), 393-399.
- Armanini, D., Fiore, C., Mattarello, M.J., Bielenberg, J., Palermo, M. (2002). History of the endocrine effects of licorice. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 110(6), 257-261.
- Arnold, H., Bourseaux, F., Brock, N. (1958). Chemotherapeutic Action of a Cyclic Nitrogen Mustard Phosphamide Ester (B 518-ASTA) in Experimental Tumours of the Rat. *Nature*, 181(4613), 931-931.

- Asha, M.K., Debraj, D., Prashanth, D., Edwin, J.R., Srikanth, H.S., Muruganatham, N., Dethé, S.M., Anirban, B., Jaya, B., Deepak, M., Agarwal, A. (2013). In vitro anti-Helicobacter pylori activity of a flavonoid rich extract of Glycyrrhiza glabra and its probable mechanisms of action. *J Ethnopharmacol*, 145(2), 581-586.
- Asımgil, A. (1997). *Şifalı Bitkiler*. Timaş Yayınları.
- Asiri, Y.A. (2010). Probucol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative apoptosis, p53 and Bax signal expression in rat cardiac tissues. *Oxid Med Cell Longev*, 3(5), 308-316.
- Asl, M.N., Hosseinzadeh, H. (2008). Review of Pharmacological Effects of Glycyrrhiza sp. And its Bioactive Compounds. *Phytother Res*, 22(6), 709-724.
- Austin, H.A., Klippel, J.H. (1986). Therapy of lupus nephritis. Controlled trial of prednisone and cytotoxic drugs. *N Engl J Med*, 314, 614-619.
- Badr, A.E., Omar, N., Badria, F.A. (2011). A laboratory evaluation of the antibacterial and cytotoxic effect of Liquorice when used as root canal medicament. *Int Endod J*, 44(1), 51-58.
- Bagchi, M., Balmoori, J., Bagchi, D., Ray, S.D., Kuszynski, C., Stohs, S.J. (1999). Smokeless tobacco, oxidative stress, apoptosis, and antioxidants in human oral keratinocytes. *Free Radic Biol Med*, 26(7-8), 992-1000.
- Barrera, G. (2012). Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncol*, 137289.
- Baykal, Y., Özet, G., Kocabalkan, F. (1998). *Apoptozis ve İmmun Sistem*. *Türkiye Klinikleri J Med Sc*, 18(1), 11.
- Baytop, T. (1999). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün 480(2).
- Bellamy, C.O., Malcomson, R.D., Harrison, D.J., Wyllie, A.H. (1995). Cell death in health and disease: The biology and regulation of apoptosis. *Seminars in Cancer Biology*, 6(1), 3-16.
- Bénichou, C. (1990). Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *Journal of Hepatology*, 11(2), 272-276. [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(90\)90124-a](https://doi.org/10.1016/0168-8278(90)90124-a)
- Bensch, K., Tiralongo, J., Schmidt, K., Matthias, A., Bone, K.M., Lehmann, R., Tiralongo, E. (2011). Investigations into the antiadhesive activity of herbal extracts against Campylobacter jejuni. *Phytother Res*, 25(8), 1125-1132.
- Boeira, V.T., Leite, C.E., Santos, A.A., Edelweiss, M.I., Calixto, J.B., Campos, M.M., Morrone, F.B. (2011). Effects of the hydroalcoholic extract of Phyllanthus niruri and its isolated compounds on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mouse. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 384(3), 265-275.
- Bonaventura, A., Liberale, L., Vecchié, A., Casula, M., Carbone, F., Dallegri F., Montecucco, F. (2016). Update on Inflammatory Biomarkers and Treatments in Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci*, 17(12).

- Boonstra, M.C., de Geus, S.W. L., Prevoo, H.A.J.M., Hawinkels, L. J.A.C., van de Velde, C.J.H., Kuppen, P.J.K., Vahrmeijer, A.L., Sier, C.F.M. (2016). Selecting Targets for Tumor Imaging: An Overview of Cancer-Associated Membrane Proteins. *Biomarkers Cancer*, 8, 119-133.
- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., Cidlowski, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 5(1), 21-26.
- Boyer, J.L. (2002). Bile formation and cholestasis. Schiff's diseases of the liver. *Lippincott, Wiley-Blackwell*, 9, 135-165.
- Burke, D.A., Stoddart, J.C., Ward, M.K., Simpson, C.G. (1982). Fatal pulmonary fibrosis occurring during treatment with cyclophosphamide. *BMJ*, 285(6343), 696-696.
- Caglayan, C., Temel, Y., Kandemir, F.M., Yildirim, S., Kucukler, S. (2018). Naringin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and DNA damage. *Environ Sci Pollut Res Int*, 25(21), 20968-20984.
- Campbell, L. (2006). Liver: Metabolic functions. *Anaesthesia Intensive Care Medicine* 1, 51-54.
- Cao, Y., Shi, H., Sun, Z., Wu, J., Xia, Y., Wang, Y., Wu, Y., Li, X., Chen, W., Wang, A., Lu, Y. (2019). Protective Effects of Magnesium Glycyrrhizinate on Methotrexate-Induced Hepatotoxicity and Intestinal Toxicity May Be by Reducing COX-2. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 119.
- Carmeli, E., Fogelman, Y. (2009). Antioxidant effect of polyphenolic glabridin on LDL oxidation. *Toxicol Ind Health*, 25(4-5), 321-324.
- Carson, D. A., Ribeiro, J.M. (1993). Apoptosis and disease. *Lancet*, 341(8855), 1251-1254.
- Chandrasekaran, C.V., Deepak, H.B., Thiagarajan, P., Kathiresan, S., Sangli, G.K., Deepak, M., Agarwal, A. (2011). Dual inhibitory effect of Glycyrrhiza glabra (GutGard™) on COX and LOX products. *Phytomedicine* 18(4), 278-284.
- Chen, H.J., Kang, S.P., Lee, I.J., Lin, Y.L. (2014). Glycyrrhetic acid suppressed NF- κ B activation in TNF- α -induced hepatocytes. *J. Agric. Food Chem*, 62(3), 618-625.
- Chen, J.C., Ho, T.Y., Chang, Y.S., Wu, S.L., Li, C.C., Hsiang, C.Y. (2009). Identification of Escherichia coli enterotoxin inhibitors from traditional medicinal herbs by in silico, in vitro, and in vivo analyses. *J Ethnopharmacol*, 121(3), 372-378.
- Chen, T., Gao, J., Xiang, P., Chen, Y., Ji, J., Xie, P., Wu, H., Xiao, W., Wei, Y., Wang, S., Lan, L., Ji, H., Yan, T. (2015). Protective effect of platycodin D on liver injury in alloxan-induced diabetic mice via regulation of Treg/Th17 balance. *Int Immunopharmacol*, 26(2), 338-348.
- Chopra, R.N. (1958). Chopra's indigenous drugs of India. *Calcutta, Dhur*. 2 816.
- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), 517-524.

- Cohen, J.J. (1993). Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *Chest*, 103(2), 99-101.
- Cummings, M.C., Winterford, C.M., Walker, N.I. (1997). Apoptosis. *The American Journal of Surgical Pathology*, 21(1), 88-101.
- Dixon, C.J., White, P.J., Hall, J.F., Kingston, S., Boarder, M.R. (2005). Regulation of human hepatocytes by P2Y receptors: Control of glycogen phosphorylase, Ca²⁺, and mitogen-activated protein kinases. *J Pharmacol Exp Ther*. 313(3), 1305-1313.
- Doonan, F., Cotter, T.G. (2008). Morphological assessment of apoptosis. *Methods*. 44(3), 200.
- Edson, K.Z., Rettie, A.E. (2013). CYP4 Enzymes as potential drug targets: Focus on enzyme multiplicity, inducers and inhibitors, and therapeutic modulation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) synthase and fatty acid ω-hydroxylase activities. *Curr Top Med Chem*, 13(12), 1429-1440.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- El-Naggar, S.A., Abdel-Farid, I.B., Germoush, M.O., Elgebaly, H.A., Alm-Eldeen, A.A. (2016). Efficacy of Rosmarinus officinalis leaves extract against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity. *Pharm Bioly*, 54(10), 2007-2016.
- Enfissi, A., Prigent, S., Colosetti, P., Capiod, T. (2004). The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells. *Cell Calcium*, 36(6), 459-467.
- Erdemir, A.D. (2001). *Şifalı Bitkiler Doğal İlaçlarla Geleneksel Tedaviler*. Alfa yayıncılık, İstanbul.
- Esmaeili, S., Naghibi, F., Mosaddegh, M., Sahranavard, S., Ghafari, S., Abdullah, N.R. (2009). Screening of antiplasmodial properties among some traditionally used Iranian plants. *J Ethnopharmacol*, 121(3), 400-404.
- Evans, W.C. (1996). Licorice root. Trease and Evans' Pharmacognosy. 14. ed. W.B. Saunders.
- Fels, B., Bulk, E., Pethő, Z., Schwab, A. (2018). The Role of TRP Channels in the Metastatic Cascade. *Pharmaceuticals*, 11(2).
- Feng Yeh, C., Wang, K.C., Chiang, L.C., Shieh, D.E., Yen, M.H., San Chang, J. (2013). Water extract of licorice had anti-viral activity against human respiratory syncytial virus in human respiratory tract cell lines. *J Ethnopharmacol*, 148(2), 466-473.
- Fouad, A.A., Qutub, H.O., Al-Melhim, W.N. (2016). Punicalagin alleviates hepatotoxicity in rats challenged with cyclophosphamide. *Environmental Toxicology Pharmacol*, 45, 158-162.

- Fu, Y., Chen, J., Li, Y.J., Zheng, Y.F., Li, P. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. *Food Chemistry*, 141(2), 1063-1071.
- Gao, L., Tang, H., He, H., Liu, J., Mao, J., Ji, H., Lin, H., Wu, T. (2015). Glycyrrhizic acid alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Front Pharmacol*, 6, 215.
- Ghobadi, E., Moloudizargari, M., Asghari, M.H., Abdollahi, M. (2017). The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 13(5), 525-536.
- Giorgi, C., Baldassari, F., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J.M., Wieckowski, M.R., Pinton, P. (2012). Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis. *Cell Calcium*, 52(1), 36-43.
- Guler, Y., Ovey, I.S. (2020). LLLT enhance cyclophosphamide induced TRPM2 channel activation in human colon cancer cells. *Bratislavske Lekarske Listy*, 1(5), 334-338.
- Gumprich, E., Dahl, R., Devereaux, M.W., Sokol, R.J. (2005). Licorice compounds glycyrrhizin and 18beta-glycyrrhetic acid are potent modulators of bile acid-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 280(11), 10556-10563.
- Hamzeh, M., Hosseinimehr, S., Khalatbary, A., Mohammadi, H., Dashti, A., Amiri, F. (2018). Atorvastatin mitigates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity via suppression of oxidative stress and apoptosis in rat model. *Res Pharma Sci*, 13(5), 440.
- Haraguchi, H., Ishikawa, H., Mizutani, K., Tamura, Y., Kinoshita, T. (1998). Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. *Bioorg. Med. Chem.*, 6(3), 339-347.
- Hasani-Ranjbar, S., Nayebi, N., Moradi, L., Mehri, A., Larijani, B., Abdollahi, M. (2010). The efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of hyperlipidemia; a systematic review. *Curr. Pharm. Des.*, 16(26), 2935-2947.
- Hendricks, J.M., Hoffman, C., Pascual, D.W., Hardy, M.E. (2012). 18β-glycyrrhetic acid delivered orally induces isolated lymphoid follicle maturation at the intestinal mucosa and attenuates rotavirus shedding. *PLoS One*, 7(11), e49491.
- Hosseinzadeh, H., Nassiri-Asl, M. (2015). Pharmacological Effects of *Glycyrrhiza* spp. and Its Bioactive Constituents: Update and Review. *Phytother Res*, 29(12), 1868-1886.
- Howell, S., Shalet, S. (1998). Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 27 ed., 927-943, America.
- Huo, H.Z., Wang, B., Liang, Y.K., Bao, Y.Y., Gu, Y. (2011). Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Int J Mol Sci*, 12(10), 6529-6543.
- Int. Kay. 1, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1>.
- Int. Kay. 2, <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=GLGL>

- Inafuku, H., Kuniyoshi, Y., Yamashiro, S., Arakaki, K., Nagano, T., Morishima, Y., Kise, Y. (2013). Determination of oxidative stress and cardiac dysfunction after ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 19(3), 186-194.
- Irani, M., Sarmadi, M., Bernard, F., Ebrahimi Pour, G.H., Shaker Bazarnov, H. (2010). Leaves Antimicrobial Activity of Glycyrrhiza glabra L. *Iranian J Pharm Res*, 9(4), 425-428.
- Ito, M., Sato, A., Hirabayashi, K., Tanabe, F., Shigeta, S., Baba, M., De Clercq, E., Nakashima, H., Yamamoto, N. (1988). Mechanism of inhibitory effect of glycyrrhizin on replication of human immunodeficiency virus (HIV). *Antiviral Res*, 10(6), 289-298.
- Jalali, A.S., Hasanzadeh, S., Malekinejad, H. (2012). Crataegus monogyna aqueous extract ameliorates cyclophosphamide-induced toxicity in rat testis: Stereological evidences. *Acta Med Iran*, 50(1), 1-8.
- Jiang, W., Liu, J., Li, P., Lu, Q., Pei, X., Sun, Y., Wang, G., Hao, K. (2017). Magnesium isoglycyrrhizinate shows hepatoprotective effects in a cyclophosphamide-induced model of hepatic injury. *Oncotarget*, 8(20).
- Jiang, W., Zhou, R., Li, P., Sun, Y., Lu, Q., Qiu, Y., Wang, J., Liu, J., Hao, K., Ding, X. (2016). Protective effect of chrysophanol on LPS/D-GalN-induced hepatic injury through the RIP140/NF- κ B pathway. *RSC Adv*, 6(44), 38192-38200.
- Jnaneshwari, S., Hemshekhar, M., Thushara, R.M., Sundaram, M.S., Santhosh, M.S., Sunitha, K., Shankar, R.L., Kemparaju, K., Girish, K.S. (2014). Sesamol ameliorates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress and inflammatory mediators. *Anticancer Agents Med Chem*, 14(7), 975-983.
- Jung, J.C., Lee, Y.H., Kim, S.H., Kim, K.J., Kim, K.M., Oh, S., Jung, Y.S. (2016). Hepatoprotective effect of licorice, the root of Glycyrrhiza uralensis Fischer, in alcohol-induced fatty liver disease. *BMC Complement Altern Med*, 16.
- Kalani, K., Kushwaha, V., Verma, R., Murthy, P.K., Srivastava, S.K. (2013). Glycyrrhetic acid and its analogs: A new class of antifilarial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23(9), 2566-2570.
- Kalaycioglu, M.E., Lichtin, A.E., Andresen, S.W., Tuason, L., Bolwell, B.J. (1995). High-dose busulfan and cyclophosphamide followed by autologous bone marrow transplantation and/or peripheral blood progenitor cell rescue for metastatic breast cancer. *Am. J. Clin. Oncol.*, 18(6), 491-494.
- Karousou, R., Deirmentzoglou, S. (2011). The herbal market of Cyprus: Traditional links and cultural exchanges. *J Ethnopharmacol*, 133(1), 191-203.
- Kaya, S. (2013). *Veteriner Farmakoloji* 5. ed., 2. Medisan yayınları. Ankara.
- Kayaalp, O. (2002). *Rasyonel Tedaviler Yönünden Tıbbi Farmakoloji* 10 ed., Pelikan yayınları, Ankara.

- Keles, I., Bozkurt, M.F., Cemek, M., Karalar, M., Hazini, A., Alpdagtas, S., Keles, H., Yildiz, T., Ceylan, C., Buyukokuroglu, M.E. (2014). Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by resveratrol: A comparative experimental study with mesna. *Int Urol Nephrol*, 46(12), 2301-2310.
- Kennedy, P. C., Jubb, K. V.F., Palmer's, N. (2016). Liver and biliary system. İçinde *Pathology of Domestic Animals* 6. ed., 2: 258-352. Elsevier.
- Kern, J.C., Kehrer, J.P. (2002). Acrolein-induced cell death: A caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. *Chem. Biol. Interact.*, 139(1), 79-95.
- Khan, N., Adhami, V.M., Mukhtar, H. (2008). Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochemical pharmacol*, 76(11), 1333-1339.
- Kim, H.J., Seo, J.Y., Suh, H.J., Lim, S.S., Kim, J.S. (2012). Antioxidant activities of licorice-derived prenylflavonoids. *Nutr Res Pract*, 6(6), 491-498.
- Kim, S.J., Shin, H.J., Lee, B.J., Kim, D.S., Lee, J.H., Jeong, M.Y., Kim, H.L., Park, J., Lim, H., Kim, S.H., Hong, S.H., Hwang, M.W., Um, J.Y. (2014). The antiinflammatory mechanism of Igongsan in mouse peritoneal macrophages via suppression of NF- κ B/Caspase-1 activation. *Phytother Res*, 28(5), 736-744.
- Klaassen, C.D., Casarett, L.J., Doull, J. (2008). Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 7 ed., McGraw-Hill.
- Kraft, K., Hobbs, C. (2004). Medical Plants from A to Z. İçinde *Pocket Guide to Herbal Medicine* 1 ed., p: 86. Thieme.
- Kumada, H. (2002). Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin [stronger neo-minophagen C (SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 1ed., p: 94-100.
- Kuo, K.K., Chang, J.S., Wang, K.C., Chiang, L.C. (2009). Water extract of Glycyrrhiza uralensis inhibited enterovirus 71 in a human foreskin fibroblast cell line. *Am. J. Chin. Med.*, 37(2), 383-394.
- Kurahara, L.H., Hiraishi, K., Hu, Y., Koga, K., Onitsuka, M., Doi, M., Aoyagi, K., Takedatsu, H., Kojima, D., Fujihara, Y., Jian, Y., Inoue, R. (2017). Activation of Myofibroblast TRPA1 by Steroids and Pirfenidone Ameliorates Fibrosis in Experimental Crohn's Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 5(3), 299-318.
- Kwon, H.J., Kim, H.H., Ryu, Y.B., Kim, J.H., Jeong, H.J., Lee, S.W., Chang, J.S., Cho, K.O., Rho, M.C., Park, S.J., Lee, W.S. (2010). In vitro anti-rotavirus activity of polyphenol compounds isolated from the roots of Glycyrrhiza uralensis. *Bioorg. Med. Chem.*, 18(21), 7668-7674.
- Laconi, S., Madeddu, M.A., Pompei, R. (2014). Autophagy activation and antiviral activity by a licorice triterpene. *Phytother Res*, 28(12), 1890-1892.
- Lakshmi, T., Geetha, R. (2011). Glycyrrhiza Glabra Linn. Commonly Known As Licorice, 3(4), 20-25.

- Lapierre, P., Béland, K., Alvarez, F. (2007). Pathogenesis of autoimmune hepatitis: From break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Transl Res*, 149(3), 107-113.
- Lee, S.J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K.G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131-137.
- Leite, M.F., Nathanson, M.H. (2001). The liver biology and pathobiology. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia p: 537-554.
- Leporatti, M.L., Ivancheva, S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J Ethnopharmacol*, 87(2-3), 123-142.
- Li, B., Li, W., Tian, Y., Guo, S., Qian, L., Xu, D., Cao, N. (2020). Selenium-Alleviated Hepatocyte Necrosis and DNA Damage in Cyclophosphamide-Treated Geese by Mitigating Oxidative Stress. *Biol Trace Elem Res*, 193(2), 508-516.
- Li, X., Li, B., Jia, Y. (2015). The Hepatoprotective Effect of Haoqin Qingdan Decoction against Liver Injury Induced by a Chemotherapeutic Drug Cyclophosphamide. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 978219.
- Li, Z.Y., Tung, Y.T., Chen, S.Y., Yen, G.C. (2019). Novel findings of 18 β -glycyrrhetic acid on sRAGE secretion through inhibition of transient receptor potential canonical channels in high-glucose environment. *BioFactors*, 45(4), 607-615.
- Liang, B., Guo, X.L., Jin, J., Ma, Y.C., Feng, Z.Q. (2015). Glycyrrhizic acid inhibits apoptosis and fibrosis in carbon-tetrachloride-induced rat liver injury. *World J Gastroenterol*, 21(17), 5271-5280.
- Lin, G., Nnane, I.P., Cheng, T.Y. (1999). The effects of pretreatment with glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on the retrorsine-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol*, 37(9), 1259-1270.
- Lin, Z., Qiu, S., Wufuer, A., Shum, L. (2005). Simultaneous determination of glycyrrhizin, a marker component in radix *Glycyrrhizae*, and its major metabolite glycyrrhetic acid in human plasma by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 814(2), 201-207.
- Liu, W., Gao, F.F., Li, Q., Lv, J.W., Wang, Y., Hu, P.C., Xiang, Q.M., Wei, L. (2014). Protective effect of astragalus polysaccharides on liver injury induced by several different chemotherapeutics in mice. *Asian Pacific J of Cancer Prev*, 15(23), 10413-10420.
- Long, D.R., Mead, J., Hendricks, J.M., Hardy, M.E., Voyich, J.M. (2013). 18 β -Glycyrrhetic acid inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survival and attenuates virulence gene expression. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57(1), 241-247.
- Luna, L.G. (1968). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. *Blakiston Division, McGraw-Hill* 3(3), 249.
- Mader, C. (2007). The Biology of Cancer. *Yale J Biol Med*, 80(2), 91.

- Maria, V.A., Victorino, R.M. (1997). Development and validation of a clinical scale for the diagnosis of drug-induced hepatitis. *Hepatology*, 26(3), 664-669.
- Matar, P., Rozados, V., Gervasoni, S., Scharovsky, G. (2002). Th2/Th1 switch induced by a single low dose of cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 50(11), 588-596.
- Matsuda, H., Ando, S., Kato, T., Morikawa, T., Yoshikawa, M. (2006). Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 14(1), 138-142.
- Matsuo, K., Takenaka, K., Shimomura, H., Fujii, N., Shinagawa, K., Kiura, K., Harada, M. (2001). Lamivudine and glycyrrhizin for treatment of chemotherapy-induced hepatitis B virus (HBV) hepatitis in a chronic HBV carrier with non-Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma*, 41(1-2), 191-195.
- McConnell, K.W., Muenzer, J.T., Chang, K.C., Davis, C.G., McDunn, J.E., Coopersmith, C.M., Hilliard, C.A., Hotchkiss, R.S., Grigsby, P.W., Hunt, C.R. (2007). Anti-apoptotic peptides protect against radiation-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 355(2), 501-507.
- Messier, C., Grenier, D. (2011). Effect of licorice compounds licochalcone A, glabridin and glycyrrhizic acid on growth and virulence properties of *Candida albicans*. *Mycoses*, 54(6), 801-806.
- Miller, B.A., Zhang, W. (2011). TRP channels as mediators of oxidative stress. *Adv Exp Med Biol*, 704, 531-544.
- Mohammad, M.K., Avila, D., Zhang, J., Barve, S., Arteel, G., McClain, C., Joshi-Barve, S. (2012). Acrolein cytotoxicity in hepatocytes involves endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*, 265(1), 73-82.
- Momeni, A., Rahimian, G., Kiasi, A., Amiri, M., Kheiri, S. (2014). Effect of licorice versus bismuth on eradication of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer disease. *Pharmacognosy Res*, 6(4), 341-344.
- Moore, M.J. (1991). Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics* Alis 20, p: 194-208.
- Nakayama, H., Chen, X., Baines, C.P., Klevitsky, R., Zhang, X., Zhang, H., Jaleel, N., Chua, B.H.L., Hewett, T.E., Robbins, J., Houser, S.R., Molkenin, J.D. (2007). Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest*, 117(9), 2431-2444.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., Peters, J.A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev*, 87(1), 165-217.
- Nitharwal, R.K., Patel, H., Karchuli, M.S., Ugale, R.R. (2013). Chemoprotective potential of *Coccinia indica* against cyclophosphamide-induced toxicity. *Indian J Pharmacol*, 45(5), 502-507.

- Nomura, T., Fukai, T., Akiyama, T. (2002). Chemistry of phenolic compounds of licorice (*Glycyrrhiza* species) and their estrogenic and cytotoxic activities. *Pure Appl Chem*, 74(7), 1199-1206.
- Ocaña, M.G., Asensi, V., Montes, A.H., Meana, A., Celada, A., Valle-Garay, E. (2008). Autoregulation mechanism of human neutrophil apoptosis during bacterial infection. *Mol Immunol*, 45(7), 2087-2096.
- Oğuz, G. (1987). Meyan Kökü ve Önemi. *Fırat Üniv. Basın Bül.* 2(33), 3.
- Omer, M.O., Almalki, W.H., Shahid, I., Khuram, S., Altaf, I., Imran, S. (2014). Comparative study to evaluate the anti-viral efficacy of *Glycyrrhiza glabra* extract and ribavirin against the Newcastle disease virus. *Pharmacognosy Res*, 6(1), 6-11.
- Özgökçe, F., Özçelik, H. (2004). Ethnobotanical aspects of some taxa in east Anatolia, Turkey. *Econ Bot*, 58(4), 697-704.
- Papaldo, P., Lopez, M., Marolla, P., Cortesi, E., Antimi, M., Terzoli, E., Vici, P., Barone, C., Ferretti, G., Di Cosimo, S., Carlini, P., Nisticò, C., Conti, F., Di Lauro, L., Botti, C., Di Filippo, F., Fabi, A., Giannarelli, D., Calabresi, F. (2005). Impact of Five Prophylactic Filgrastim Schedules on Hematologic Toxicity in Early Breast Cancer Patients Treated With Epirubicin and Cyclophosphamide. *JCO*, 23(28), 6908-6918.
- Park, S.Y., Kim, E.J., Choi, H.J., Seon, M.R., Lim, S.S., Kang, Y.H., Choi, M.S., Lee, K.W., Yoon Park, J.H. (2014). Anti-carcinogenic effects of non-polar components containing licochalcone A in roasted licorice root. *Nutr Res Pract*, 8(3), 257-266.
- Pellati, D., Fiore, C., Armanini, D., Rassu, M., Bertoloni, G. (2009). In vitro effects of glycyrrhetic acid on the growth of clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytother Res*, 23(4), 572-574.
- Pınarbaşı, E. (2007). Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü). B. Tanyolaç Ed., *Moleküler Biyoloji* ss: 423-468. Nobel yayın.
- Potnuri, A.G., Allakonda, L., Lahkar, M. (2018). Crocin attenuates cyclophosphamide induced testicular toxicity by preserving glutathione redox system. *Biomed. Pharmacother.*, 101, 174-180.
- Qiao, X., Ji, S., Yu, S.-W., Lin, X.H., Jin, H.-W., Duan, Y.K., Zhang, L.R., Guo, D.A., Ye, M. (2014). Identification of key licorice constituents which interact with cytochrome P450: Evaluation by LC/MS/MS cocktail assay and metabolic profiling. *AAPS J*, 16(1), 101-113.
- Ram, A., Mabalirajan, U., Das, M., Bhattacharya, I., Dinda, A.K., Gangal, S.V., Ghosh, B. (2006). Glycyrrhizin alleviates experimental allergic asthma in mice. *Int Immunopharmacol*, 6(9), 1468-1477.
- Ramdiyal, P.K., Madaree, A., Reddy, R., Chetty, R. (2000). Bcl-2 protein expression in aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol*, 27(6), 283-291.

- Ray, S., Pandit, B., Das, S., Chakraborty, S. (2011). Cyclophosphamide-Induced Lipid Peroxidation and Changes in Cholesterol Content: Protective Role of Reduced Glutathione. *Iranian J Pharm Sci*, 7(4), 255-267.
- Rychkov, G.Y., Barritt, G.J. (2011). Expression and function of TRP channels in liver cells. *Adv Exp Med Biol*, 704, 667-686.
- Said, E., Elkashef, W.F., Abdelaziz, R.R. (2016). Tranilast ameliorates cyclophosphamide-induced lung injury and nephrotoxicity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 94(4), 347-358.
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391(6662), 96-99.
- Samanta, A., Hughes, T.E.T., Moiseenkova-Bell, V.Y. (2018). Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem*, 87, 141-165.
- Sangian, H., Faramarzi, H., Yazdinezhad, A., Mousavi, S.J., Zamani, Z., Noubarani, M., Ramazani, A. (2013). Antiplasmodial activity of ethanolic extracts of some selected medicinal plants from the northwest of Iran. *Parasitol Res*, 112(11), 3697-3701.
- Sarker, U., Oba, S. (2019). Antioxidant constituents of three selected red and green color Amaranthus leafy vegetable. *Scientific Reports*, 9.
- Sasaki, H., Suzuki, N., Alshwaimi, E., Xu, Y., Battaglino, R., Morse, L., Stashenko, P. (2010). 18 β -glycyrrhetic acid inhibits periodontitis via glucocorticoid-independent nuclear factor- κ B inactivation in interleukin-10-deficient mice. *J. Periodont. Res.*, 45(6), 757-763.
- Schröfelbauer, B., Raffetseder, J., Hauner, M., Wolkerstorfer, A., Ernst, W., Szolar, O.H.J. (2009). Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signalling. *Biochem. J.*, 421(3), 473-482.
- Selyutina, O. Yu., Polyakov, N.E. (2019). Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier – From physicochemical properties to biomedical applications: A modern insight on the ancient drug. *Int J Pharm*, 559, 271-279.
- Senthilkumar, S., Devaki, T., Manohar, B.M., Babu, M.S. (2006). Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clin. Chim. Acta*, 364(1-2), 335-342.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2-3), 95-115.
- Sharma, P.K., Misra, A.K., Singh, V., Gupta, A., Saroha, S., Singh, S. (2016). Cyclophosphamide and epirubicin-induced diabetes mellitus in breast cancer: A rare occurrence. *J Pharmacol Pharmacother*, 7(3), 146-148.
- Shebl, R.I., Amin, M.A., Emad-Eldin, A., Bin Dajem, S.M., Mostafa, A.S., Ibrahim, E.H., Mohamed, A.F. (2012). Antiviral activity of liquorice powder extract against varicella zoster virus isolated from Egyptian patients. *Chang Gung Med J*, 35(3), 231-239.

- Shiota, G., Harada, K., Ishida, M., Tomie, Y., Okubo, M., Katayama, S., Ito, H., Kawasaki, H. (1999). Inhibition of hepatocellular carcinoma by glycyrrhizin in diethylnitrosamine-treated mice. *Carcinogenesis*, 20(1), 59-63.
- Simmler, C., Jones, T., Anderson, J.R., Nikolić, D.C., van Breemen, R.B., Soejarto, D.D., Chen, S.N., Pauli, G.F. (2014). Species-specific Standardisation of Licorice by Metabolomic Profiling of Flavanones and Chalcones. *Phytochem Anal*, 25(4), 378-388.
- Sinanoglu, O., Yener, A.N., Ekici, S., Midi, A., Aksungar, F.B. (2012). The Protective Effects of Spirulina in Cyclophosphamide Induced Nephrotoxicity and Urotoxicity in Rats. *Urology*, 80(6), 1392.
- Singh, C., Prakash, C., Tiwari, K.N., Mishra, S.K., Kumar, V. (2018). Premna integrifolia ameliorates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by modulation of oxidative stress and apoptosis. *Biomed Pharmacother*, 107, 634-643.
- Sladek, N.E. (1988). Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacology Therapeutics*, 37(3), 301-355.
- Snowden, R., Harrington, H., Morrill, K., Jeane, L., Garrity, J., Orian, M., Lopez, E., Rezaie, S., Hassberger, K., Familoni, D., Moore, J., Virdee, K., Albornoz-Sanchez, L., Walker, M., Cavins, J., Russell, T., Guse, E., Reker, M., Tschudy, O., Langland, J. (2014). A comparison of the anti-Staphylococcus aureus activity of extracts from commonly used medicinal plants. *J Altern Complement Med*, 20(5), 375-382.
- Sohn, E.J., Kang, D.G., Lee, H.S. (2003). Protective effects of glycyrrhizin on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Pharmacol Toxicol*, 93(3), 116-122.
- Song, W., Si, L., Ji, S., Wang, H., Fang, X., Yu, L., Li, R., Liang, L., Zhou, D., Ye, M. (2014). Uralsaponins M-Y, antiviral triterpenoid saponins from the roots of Glycyrrhiza uralensis. *J. Nat. Prod.*, 77(7), 1632-1643.
- Stillwell, T.J., Benson, R.C. (1988). Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis: A review of 100 patients. *Cancer*, 61(3), 451-457.
- Stojiljković, N., Ilić, S., Stojanović, N., Janković-Veličković, L., Stojnev, S., Kocić, G., Radenković, G., Arsić, I., Stojanović, M., Petković, M. (2019). Nanoliposome-encapsulated ellagic acid prevents cyclophosphamide-induced rat liver damage. *Mol Cell Biochem*, 458(1-2), 185-195.
- Sungurlu, A., Erdemli, E., Tekelioğlu, M. (1996). Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptozis. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*. 16(5), 333-337.
- Susan, M.L., Michael, P.G. (2002). Mechanisms of resistance against cyclophosphamide and ifosfamide: can they be overcome without sacrificing selectivity *Clinically Relevant Resistance in Cancer Chemotherapy*. Springer Science, New York. p: 177-197.
- Takahara, T., Watanabe, A., Shiraki, K. (1994). Effects of glycyrrhizin on hepatitis B surface antigen: A biochemical and morphological study. *J Hepatol*, 21(4), 601-609.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M. (1998). *Farmasötik Botanik*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.

- Temel, Y., Kucukler, S., Yıldırım, S., Caglayan, C., Kandemir, F.M. (2020). Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 393(3), 325-337.
- Thiyagarajan, P., Chandrasekaran, C.V., Deepak, H.B., Agarwal, A. (2011). Modulation of lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory mediators by an extract of *Glycyrrhiza glabra* and its phytoconstituents. *Inflammopharmacology*, 19(4), 235-241.
- Thompson, R.C. (1930). Assyrian Prescriptions for Treating Bruises or Swellings. *The American Journal of Semitic Languages and Literatures*, 47(1), 1-25.
- Tomatır, A.G. (2003). Programlanmış Hücre Ölümleri: Apoptozis. *Türkiye Klinikleri J Med Sc* 23(6), 499-508.
- Uber, W.E., Self, S.E., Van Bakel, A.B., Pereira, N.L. (2007). Acute Antibody-Mediated Rejection Following Heart Transplantation. *Am J Transplant*, 7(9), 2064-2074.
- Ugulu, İ., Baslar, S. (2010). *The determination and fidelity level of medicinal plants used to make traditional Turkish salves*. 16, 313-322.
- Uğuz, A.C., Nazıroğlu, M., Espino, J., Bejarano, I., González, D., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A. (2009). Selenium Modulates Oxidative Stress-Induced Cell Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells Through Regulation of Calcium Release and Caspase-3 and -9 Activities. *J Membrane Biol*, 232(1), 15.
- Ukil, A., Kar, S., Srivastav, S., Ghosh, K., Das, P.K. (2011). Curative effect of 18 β -glycyrrhetic acid in experimental visceral leishmaniasis depends on phosphatase-dependent modulation of cellular MAP kinases. *PloS One*, 6(12), 29062.
- Uto, T., Morinaga, O., Tanaka, H., Shoyama, Y. (2012). Analysis of the synergistic effect of glycyrrhizin and other constituents in licorice extract on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production using knock-out extract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 417(1), 473-478.
- Van Marle, J., Aarsen, P.N., Lind, A., Van Weeren-Kramer, J. (1981). Deglycyrrhizinised liquorice (DGL) and the renewal of rat stomach epithelium. *J. Pharmacol.* 72, 219-225.
- Van Rossum, T.G., Vulto, A.G., de Man, R.A., Brouwer, J.T., Schalm, S. W. (1998). Review article: Glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 12(3), 199-205.
- Vaya, J., Belinky, P.A., Aviram, M. (1997). Antioxidant constituents from licorice roots: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 23(2), 302-313.
- Vieira, M.M., Macêdo, F.Y.B., Filho, J.N.B., Costa, A.C.L.V., Cunha, A.N., Silveira, E.R., Brito, G.A.C., Ribeiro, R.A. (2004). Ternatin, a flavonoid, prevents cyclophosphamide and ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Phytother Res*, 18(2), 135-141.

- Viswanathan, V., Pharande, R., Bannalikal, A., Gupta, P., Gupta, U., Mukne, A. (2019). Inhalable liposomes of Glycyrrhiza glabra extract for use in tuberculosis: Formulation, in vitro characterization, in vivo lung deposition, and in vivo pharmacodynamic studies. *Drug Dev Ind Pharm*, 45(1), 11-20.
- Wagner, H., Hikino, H., Farnsworth, N. (1989). Recent Research on Oriental Medicinal Plants. Economic and Medicinal Plant Research. Academic, London. Press p:53.
- Wang, C.Y., Kao, T.C., Lo, W.H., Yen, G.C. (2011). Glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid modulate lipopolysaccharide-induced inflammatory response by suppression of NF- κ B through PI3K p110 δ and p110 γ inhibitions. *J. Agric. Food Chem.*, 59(14), 7726-7733.
- Wang, Q., Wen, R., Lin, Q., Wang, N., Lu, P., Zhu, X. (2015). Wogonoside Shows Antifibrotic Effects in an Experimental Regression Model of Hepatic Fibrosis. *Dig Dis Sci*, 60(11), 3329-3339.
- Wilkinson, J.A., Scragg, J.L., Boyle, J.P., Nilius, B., Peers, C. (2008). H₂O₂-stimulated Ca²⁺ influx via TRPM2 is not the sole determinant of subsequent cell death. *Pflugers Arch*, 455(6), 1141-1151.
- Wolkerstorfer, A., Kurz, H., Bachhofner, N., Szolar, O.H.J. (2009). Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antiviral Res.*, 83(2), 171-178.
- World Health Organization. (1998). *The World Health Report 1998: Life in the 21st century*. WHO.
- Wu, T.Y., Khor, T.O., Saw, C.L.L., Loh, S.C., Chen, A.I., Lim, S.S., Park, J.H.Y., Cai, L., Kong, A.N.T. (2011). Anti-inflammatory/Anti-oxidative stress activities and differential regulation of Nrf2-mediated genes by non-polar fractions of tea *Chrysanthemum zawadskii* and licorice *Glycyrrhiza uralensis*. *AAPS J*, 13(1), 1-13.
- Xie, Y.C., Dong, X.W., Wu, X.M., Yan, X.F., Xie, Q.M. (2009). Inhibitory effects of flavonoids extracted from licorice on lipopolysaccharide-induced acute pulmonary inflammation in mice. *Int Immunopharmacol*, 9(2), 194-200.
- Xu, C., Liang, C., Sun, W., Chen, J., Chen, X. (2018). Glycyrrhizic acid ameliorates myocardial ischemic injury by the regulation of inflammation and oxidative state. *Drug Des Devel Ther*, 12, 1311-1319.
- Xu, J., Luo, J., Kong, L. (2013). Simultaneous separation of triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by pH-zone-refining counter-current chromatography. *J Sep Sci*, 36(19), 3295-3301.
- Yalçın, A., Keleş, H., Kahraman, T., Bozkurt, M.F., Aydın, H. (2020). Protective Effects of Ellagic Acid Against Chemotherapy-Induced Hepatotoxicity. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 22(2), 124-130.
- Yang, G., Zhang, L., Ma, L., Jiang, R., Kuang, G., Li, K., Tie, H., Wang, B., Chen, X., Xie, T., Gong, X., Wan, J. (2017). Glycyrrhetic acid prevents acetaminophen-induced acute liver injury via the inhibition of CYP2E1 expression and HMGB1-TLR4 signal activation in mice. *Int Immunopharmacol*, 50, 186-193.

- Yu, J.Y., Ha, J.Y., Kim, K.M., Jung, Y.S., Jung, J.C., Oh, S. (2015). Anti-Inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver. *Molecules*, 20(7), 13041-13054.
- Yu, S.P. (2003). Na(+), K(+)-ATPase: The new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1601-1609.
- Zachary, J.F. (2017). Hepatobiliary system and exocrine pancreas. Pathologic basis of veterinary disease, 1(6), 412-470.
- Zarei, M., Shivanandappa, T. (2013). Amelioration of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by the root extract of *Decalepis hamiltonii* in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 179-184.
- Zhang, Q., Ye, M. (2009). Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). *J Chromatogr A*, 1216(11), 1954-1969.
- Zhao, J., Wang, J., Chen, Y., Agarwal, R. (1999). Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis*, 20(9), 1737-1745.
- Zhao, Z., Liu, M., Zhang, Y., Liang, Y., Ma, D., Wang, H., Ma, Z., Guan, S., Wu, Z., Chu, X., Lin, Y., Chu, L. (2020). Cardioprotective Effect of Monoammonium Glycyrrhizinate Injection Against Myocardial Ischemic Injury in vivo and in vitro: Involvement of Inhibiting Oxidative Stress and Regulating Ca²⁺ Homeostasis by L-Type Calcium Channels. *Drug Des, Devel Ther*, 14, 331-346.
- Zheng, J.H., Viacava Follis, A., Kriwacki, R.W., Moldoveanu, T. (2016). Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis. *FEBS J*, 283(14), 2690-2700.
- Zoheir, K.M.A., Harisa, G.I., Abo-Salem, O.M., Ahmad, S.F. (2015). Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice. *Pak J Pharm Sci*, 28(3), 973-981.

7. EKLER

Ek 7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı



ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Eskişehir’de doğmuşum. İlköğretim ve liseyi Eskişehir’de okudum. 2011 yılında başladığım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2016 yılında mezun oldum. Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Patoloji Anabilim Dalı’nda 2018 yılında Yüksek Lisans eğitimime başladım. 2017 yılından beri kendi kliniğimde veteriner hekim olarak çalışmaktayım.

