T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ORAL KAPESİTABİN UYGULANAN SIÇANLARDA ß-GLUKAN ve C VİTAMİNİNİN İMMUNOLOJİK ve ANTİOKSİDAN SERUM PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

DUYGU KAVADARLI

DANIŞMAN
Prof. Dr. AYŞEN ALTINER

Biyokimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Ekim, 2022

TEZ KABUL VE ONAYI

DUYGU KAVADARLI tarafından, **Prof. Dr. AYŞEN ALTINER** danışmanlığında hazırlanan **"ORAL KAPESİTABİN UYGULANAN SIÇANLARDA ß-GLUKAN ve C VİTAMİNİNİN İMMUNOLOJİK ve ANTİOKSİDAN SERUM PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **18/10/2022** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Ayşen ALTINER Biyokimya Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Tanay BİLAL İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Atila ATEŞ İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Biyokimya Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Gülipek GÜNDOĞAN İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Sevda MERT İstanbul Okan Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü		☐ Kabul ☐ Ret

Aileme, Eşim Gökhan GÜN'e ve Kedilerim Sarı ve Küçük'e ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

ORAL KAPESİTABİN UYGULANAN SIÇANLARDA ß-GLUKAN ve C VİTAMİNİNİN İMMUNOLOJİK ve ANTİOKSİDAN SERUM PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: TSA-2018-28455.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın tüm aşamalarını titizlikle takip eden, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ayşen ALTINER'e teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmamda emeği geçen Prof. Dr. Tanay BİLAL, Dr. Necla BİRGÜL ve Araş. Gör. Gizem ATMACA'ya, ayrıca Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine teşekkür ederim.

Mesleki bilgi ve tecrübelerini ve manevi desteğini esirgemeyen eşim Dr. Gökhan GÜN'e, çalışmalarım boyunca desteklerini sürdüren ve hep arkamda olduklarını hissettiğim aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ekim 2022 Duygu KAVADARLI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **ii**
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **iv**
TEŞEKKÜR ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **ix**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **x**
ÖZET ..... **xii**
ABSTRACT ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **2**
2.1. Bağışıklık 2
2.2. Oksidatif Stres 2
2.3. Bağışıklık ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişkiler 3
2.4. Kemoterapi 4
2.4.1. Kemoterapinin Bağışıklık Baskılayıcı Etkileri 5
2.4.2. Kapesitabin 6
2.5. β-Glukan 10
2.6. C vitamini 13
2.7. İmmun ve Antioksidan Parametreler 16
2.7.1. İmmunglobulin G 16
2.7.2. İnterlökin-1β 17
2.7.3. Tümör Nekroz Faktör-α 18
2.7.4. Glutatyon Peroksidaz 19
2.7.5. Süperoksit Dismutaz 20
2.7.6. Katalaz 21
2.8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay 21
3. YÖNTEM **24**

3.1.1. Sıçanların Gruplara Ayrılması 24
3.1.2. Kapesitabin, β-Glukan ve C Vitamininin Hazırlanıp Sıçanlara Verilmesi 25
3.1.3. Kan Alımı 25
3.1.4. Kan Serumu Eldesi 25
3.2. Analiz Periyodu 25
3.2.1. Immunglobulin G ve İnterlökin-1β Tayinleri 26
3.2.2. Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutatyon Peroksidaz Tayinleri 28
3.2.3. Tümör Nekroz Faktör-α Tayini 29
3.3. İstatistiki Değerlendirme 31
4. BULGULAR 32
4.1. İmmunglobulin G 32
4.2. İnterlökin-1β 34
4.3. Süperoksit Dismutaz 35
4.4. Katalaz 36
4.5. Glutatyon Peroksidaz 38
4.6. Tümör Nekroz Faktör-α 39
5. TARTIŞMA 41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 46
KAYNAKLAR 47
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2-1: Öncü ilaç kapesitabinin kimyasal yapısı 6

Şekil 2-2: Aktif ilaç florourasilin kimyasal yapısı 7

Şekil 2-3: Kapesitabinin florourasile 3 adımlı metabolik dönüşümü 8

Şekil 2-4: β-Glukanın yapısı 11

Şekil 2-5: β-Glukanlar tarafından indüklenen immun aktivasyonu..... 12

Şekil 2-6: C vitamini..... 13

Şekil 2-7: Sandviç ELISA tekniğinin şematik gösterimi..... 23

Şekil 4-1: Serum immunglobulin G (IgG) konsantrasyonları yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması 33

Şekil 4-2: Serum interlökin-1β (IL-1β) konsantrasyonları yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması..... 34

Şekil 4-3: Serum süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması..... 35

Şekil 4-4: Serum katalaz (CAT) aktiviteleri yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması..... 37

Şekil 4-5: Serum glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması..... 38

Şekil 4-6: Serum tümör nekroz faktör-α (TNF-α) konsantrasyonları yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması 39

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3-1: Deneme grupları.....24

Tablo 4-1: Grupların açıklaması.....32

Tablo 4-2: Serum immunglobulin G konsantrasyonları (ng/ml) yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması.....33

Tablo 4-3: Serum interlökin-1β konsantrasyonları (pg/ml) yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması. 35

Tablo 4-4: Serum süperoksit dismutaz aktiviteleri (ng/ml) yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması. 36

Tablo 4-5: Serum katalaz aktiviteleri (ng/ml) yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması.....37

Tablo 4-6: Serum glutatyon peroksidaz aktiviteleri (ng/ml) yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması. 39

Tablo 4-7: Serum tümör nekroz faktör-α (pg/ml) konsantrasyonları yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması. 40

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	**Açıklama**
β	: Beta
α	: Alfa

Kısaltmalar	**Açıklama**
5'-DFCR	: 5'-deoksi-5-florositidin
5-DFUR	: 5'-deoksi-5-floroüridin
5-FU	: 5-Florourasil
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
IgG	: İmmunglobulin G
SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
IL-1β	: İnterlökin-1β
GPx	: Glutatyon peroksidaz
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-α
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TRAIL	: TNF ile ilgili apoptozu teşvik eden ligand
DNA	: Deoksiribonükleik asit
mRNA	: m-Ribonükleik asit
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
OD	: Optik dansite
HRP	: Horseradish peroksidaz
ANOVA	: Varyans analizi

MTX : Metotreksat

TAM : Tamoksifen

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ORAL KAPASİTABİN UYGULANAN SIÇANLARDA β-GLUKAN ve C VİTAMİNİNİN İMMUNOLOJİK ve ANTİOKSİDAN SERUM PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Duygu KAVADARLI

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman : Prof. Dr. Ayşen ALTINER

Bu çalışmada, kanser hastalarının tedavisinde kullanılan kemoterapi ilacı olan kapesitabinin neden olacağı bağışıklık yetersizliğinin ve oksidatif stresin, bağışıklık arttırıcı ve antioksidan özelliklere sahip β-glukan ve/veya C vitamini tarafından ne şekilde etkilendiği incelenmiştir. 35 adet Sprague Dawley ırkı sıçan yedişerli 5 gruba ayrılmıştır. 14 gün boyunca oral olarak mide sondası ile birinci gruba (Grup I) tween 20 (5 ml/kg.vüc.ağ./gün), ikinci gruba (Grup II) 359 mg/kg.vüc.ağ./gün kapesitabin, üçüncü gruba (Grup III) kapesitabine ilave olarak 100 mg/kg.vüc.ağ/gün β-glukan, dördüncü gruba (Grup IV) kapesitabine ilave olarak 100 mg/kg.vüc.ağ./gün C vitamini, beşinci gruba (Grup V) ise kapesitabin'in yanında β-glukan ve C vitamini beraber verilmiştir. Denemenin 14. ve 21. günlerinde sıçanlardan alınan kanlar +4 C°'de 16-18 saat pıhtılaşmaları için bekletildikten sonra 2000 rpm'de 10-15 dakika arası santrifüj yapılarak serumlar elde edilmiştir ve -80 C°'de saklanmıştır. Uygulama sonunda kan serumundaki immunglobulin G (IgG), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), interlökin-1β (IL-1β) ve tümör nekroz faktör-α (TNF-α) analizleri,

Mikroelisa cihazında ELISA kitleri kullanılarak yapılmıştır. Serum IgG konsantrasyonları 14. kan alım gününde kapesitabin verilen Grup II'de diğer gruplardan anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur. 21. günde Grup IV ve Grup V'deki IL-1β düzeyleri, Grup I ve II'den anlamlı ölçüde yüksek bulunurken, Grup I, II ve III arasındaki IL-1β düzeyleri, anlamlı ölçüde farklı bulunamamıştır. 14. kan alım gününde, Grup III, IV ve V'deki SOD aktiviteleri, Grup I ve II'den anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır. Çalışmanın 14. gününde serum CAT aktiviteleri, kapesitabin verilen Grup II'de Grup IV ve V'den anlamlı ölçüde daha düşük saptanırken, Grup IV'deki düzeyler, kontrol grubundan (Grup I) anlamlı ölçüde yüksek saptanmıştır. Yine çalışmanın 14. günündeki kan alımında kontrol grubu (44.3 ± 2.64 ng/ml) ile Grup III (28.7 ± 11.34 ng/ml) arasında serum GPx aktivitelerinde istatistiki açıdan anlamlı farklılık saptanmıştır. Çalışmanın 14. ve 21. günlerinde TNF-α konsantrasyonları, kontrol grubunda (Grup I) diğer gruplardan anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır. Sonuç olarak, pek çok yapılan çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da kemoterapinin immun baskılayıcı özelliği, antioksidan enzimlerin seviyelerinde beklenildiği gibi belirli düşüşlere sebep olmuştur. Görünen o ki kemoterapi, antioksidan enzimlerin hepsinin üretimini baskılarken, bu durum bazı sitokinler ve antikorlar için farklı olmuştur. β-glukan, C vitamini ve her ikisinin kombinasyonuyla yapılan terapinin de, her parametre için farklı etkiler gösterdiği ya da belirli bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Ekim 2022 , 77. sayfa.

Anahtar kelimeler: Kapesitabin, İmmunolojik parametreler, Antioksidan parametreler, β-glukan, C vitamini

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

EFFECTS of β-GLUCAN and VITAMIN C on IMMUNOLOGICAL and ANTIOXIDANT SERUM PARAMETERS in RATS ADMINISTERED ORAL CAPECITABINE

Duygu KAVADARLI

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Biochemistry

Programme of Biochemistry

Supervisor : Prof. Dr. Ayşen ALTINER

In present thesis work, effects of β-glucan and/or vitamin C, which have immune-enhancing and antioxidant properties, on immunodeficiency and oxidative stress caused by capecitabine, the chemotherapy drug used in the treatment of cancer patients, has been studied. 35 Sprague Dawley rats were divided into 5 groups of seven. Tween 20 (5 ml/ kgbodyweight/day) was administered to Group I, 359 mg/kgbodyweight/day of capecitabine was administered to Group II, 100 mg/kgbodyweight/day of β-glucan in addition to capecitabine was administered to Group III, 100 mg/kgbodyweight/day of vitamin C was administered to Group IV, besides capecitabine, β-glucan and vitamin C were administered together to Group V orally by gastric tube for 14 days. The rats were bled on days 14 and 21 of the trial. The blood taken was kept at + 4˚C for 16-18 hours to coagulate. After that sera were obtained by centrifugating at 2000 rpm for 10-15 minutes and were stored in deep freezer at -80˚C. Immunglobulin G (IgG), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), interleukin-1β (IL-1β) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) analyzes were performed on Microelisa device by using

ELISA kits. Serum IgG concentrations were significantly higher in Group II given capecitabine on Day 14 of blood collection than in other groups. On the 21st day, IL-1β levels in Group IV and Group V were found to be significantly higher than Groups I and II, while IL-1β levels between Groups I, II and III were not found to be significantly different. On the 14th day of blood collection, SOD activities in Groups III, IV and V were found to be significantly lower than Groups I and II. On the 14th day of the study, serum CAT activities were found to be significantly lower in Group II, which was given capecitabine, than Group IV and V, while the levels in Group IV were found to be significantly higher than the control group (Group I). Again, on the 14th day of the study, a statistically significant difference was found in serum GPx activities between the control group (44.3 ± 2.64 ng/ml) and Group III (28.7 ± 11.34 ng/ml). On the 14th and 21st days of the study, TNF-α concentrations were found to be significantly lower in the control group (Group I) than in the other groups. As a result, as in many studies, the immunosuppressive feature of chemotherapy in this study caused certain decreases in the levels of antioxidant enzymes, as expected. It seems that while chemotherapy suppresses the production of all antioxidant enzymes, this was different for some cytokines and antibodies. It was observed that therapy with β-glucan, vitamin C and a combination of both showed different effects for each parameter or did not have a specific effect.

October 2022, 77. pages.

Keywords: Capecitabine, Immunological parameters, Antioxidant parameters, β-Glucan, Vitamin C.

1. GİRİŞ

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanserden her yıl milyonlarca hayvan ve insan ölmektedir. Bu hastalığın tedavisinde birçok kemoterapi ilacı veya moleküler hedeflere yönelik geliştirilmiş ilaçlar kullanılmaktadır. Kapesitabin, yüksek tümör seçiciliğine sahip 5-florourasil (5-FU)'in prekürsörü olan bir kemoterapi ilacıdır. Pek çok kemoterapi ilacı gibi kapesitabinin kanser hastalarında immunsupresyona neden olduğu bildirilmiştir. Zayıflayan bağışıklık sistemi kanser hastalarının enfeksiyonlara yakalanma riskini arttırır. Ayrıca sağlıklı insanlar için önemsiz görülen enfeksiyonlar, baskılanmış bağışıklık sistemi sebebiyle kanser hastalarında çok ağır seyreder. Bu nedenle son zamanlarda yapılan kemoterapi çalışmalarının yanı sıra bağışıklık sistemini güçlendirmeye yönelik ek tedavi çalışmalarına yönelinmiştir.

Uzun yıllardır kemoterapinin yanında askorbik asit (C vitamini) zaten bağışıklık destekleyici olarak kullanılmaktaydı. Son yıllarda ise glukanların bağışıklık sistemi üzerindeki olumlu etkileri keşfedilmeye başlandıkça kanser tedavilerinde ek veya alternatif tedavi olabileceği doğrultusunda pek çok çalışma yapılmıştır. Birçok toksinin reaktif toksik metabolitlerinin detoksifiye edilmesinde kesin rol oynayan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) antioksidan enzimlerinin seviyeleri, kemoterapiden kaynaklı azalmaktadır. Karboksimetil pachyman gibi antioksidan özelliği olan moleküllerle birlikte 5-FU kombine tedavileri ile yapılan çalışmalarda, azalan antioksidan enzimlerinin seviyelerinin önemli ölçüde geri kazanıldığı görülmüştür (Wang ve ark., 2017). Medikal mantarlardan biri olan ve % 90 β-glukan içeren Poria cocos mantarlarıyla sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışma sonunda, hem tümör büyüklüğünün küçüldüğü hem de antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı saptanmıştır (RuiDian ve ark., 2010).

Kanserin ve kemoterapinin bağışıklık üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmaya yönelik yapılan sayısız çalışmalara istinaden bu çalışmada da, bağışıklık arttırıcı ve antioksidan özelliklere sahip β-glukan ve C vitamininin kapesitabin verilen sıçanlarda baskılanmış bağışıklığa nasıl etki ettiklerini görmek üzere, serumdaki antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GPx, bir antikor olan immunglobulin G (IgG) ve önemli sitokinler olan interlökin-1β (IL-1β) ve tümör nekroz faktör-α (TNF-α) konsantrasyonlarındaki değişiklikler incelenmiştir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Bağışıklık

Bağışıklık sisteminin hücreleri, ortaya çıktıkları ve olgunlaştıkları birincil lenfoid organlar (kemik iliği ve timus) ile olgun bağışıklık hücrelerinin antijenlerle karşılaştığı ve bunlara tepki verdiği ikincil lenfoid organlar (lenf düğümleri, dalak ve bağırsakla ilişkili lenfoid doku) olarak sınıflandırılan ayrı lenfoid organlar halinde düzenlenirler. Bağışıklık sisteminin doğuştan ve edinilmiş olmak üzere iki işlevsel bölümü vardır (Calder, 2013). Deri ve mukoza epitelyumu gibi mekanik bariyerleri ve makrofajlar ve nötrofiller gibi hücresel bileşenleri içeren doğal mekanizmalar, konakçı organizmanın enfeksiyöz maddeye maruziyetinden bağımsız olarak işlev görürler (Wolowczuk ve ark., 2008). Bağışıklık sistemindeki dokuların gelişiminin çoğu, gebeliğin sonlarında ve yaşamın erken dönemlerinde ortaya çıkar (Korver ve Klasing, 2001). Doğuştan gelen bağışıklık zaten mevcutken yaralar, dehidrasyon, beslenme durumu, genetik ve hatta stres gibi birçok faktör tarafından ayarlanabilir, güçlendirilebilir veya zayıflatılabilir (Carroll ve Forsberg, 2007). Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aksine, edinilmiş bağışıklığın hücresel (B ve T lenfositleri gibi) ve adaptif mekanizmalarının moleküler temeli, istilacı ajanın spesifik olarak tanınmasına dayanır ve bir immun hafızanın oluşmasına yol açar. Bu, bir bireyin bir antijenle ilk temastan sonra aynı antijene yeniden maruz kaldığında daha iyi ve daha hızlı tepki verme kapasitesi kazandığı bir özelliktir (Wolowczuk ve ark., 2008). İyi işleyen bir bağışıklık sistemi, patojenik organizmalara karşı iyi bir savunma sağlamanın yanısıra tehdit edici olmayan organizmalara, besin bileşenlerine ve kendine tolerans sağlar. İmmun tepkinin aktivasyonu immunglobulinler, sitokinler, sitokin reseptörleri, yapışma molekülleri ve akut faz proteinleri gibi proteinlerin ve prostaglandinler ile lökotrienler gibi lipitten türeyen aracıların üretimini tetikler (Calder, 2013).

2.2. Oksidatif Stres

Serbest radikal, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren herhangi bir tür olarak tanımlanır. Reaktif oksijen türleri (ROS) ise süperoksit, hidroksil, peroksil ve hidroperoksil radikalleri gibi oksijen radikalleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit ve ozon gibi kolayca radikallere dönüştürülebilir bazı radikal olmayan oksitleyici maddelerin her ikisini de içeren toplu bir terimdir. ROS, sepsis patogenezinde rol oynamaktadır. ROS ayrıca, enzimatik reaksiyonlarda yer alan mitokondriyal elektron taşınması, nükleer transkripsiyon faktörlerinin

aktivasyonu, gen ekspresyonu ve makrofajlar ile nötrofillerin antimikrobiyal etkisi gibi normal metabolizma sırasında da üretilirler (Bayır, 2005).

Serbest radikallerin ve diğer oksidanların aşırı üretiminin neden olduğu oksidatif stres, hayvan ve bitkilerin hücrelerine zarar verir (Carroll ve Forsberg, 2007). Oksidatif stres lipid peroksidasyonunda artış, glutatyonun redoks durumunda değişiklik veya antioksidan enzim seviyelerinde azalma olarak ortaya çıkabilir (Webb ve Falkowski, 2009). Glutatyondaki değişiklikler veya antioksidan enzim seviyelerinde azalma, hayvanların potansiyel olarak zararlı serbest radikalleri metabolize etme veya ortadan kaldırma yeteneğini azaltabilir ve deoksiribonükleik aside zarar vererek, hücre zarları boyunca iyon hareketini değiştirerek, hücre zarının bütünlüğünü bozarak, hücresel işlevlerin azalmasına ve kaybına yol açarak konakçı hücrelere zarar verebilir (Carroll ve Forsberg, 2007).

Genel olarak hücreler içindeki indirgeyici ortam, serbest radikallerin sebep olacağı hasarı önlemeye yardımcı olur (Bayır, 2005). ROS'nin enzimatik olarak uzaklaştırılmasında bireysel yollar tek başına yetersizdir. Bu durum çeşitli antioksidan enzim sistemlerinin koordineli yanıtlarını gerektirir. Anahtar sistemler süperoksit anyonunu H_2O_2'e dönüştüren SOD, lipid peroksitlerin oluşumunu yatıştıran ve H_2O_2'i suya dönüştüren CAT ile GPx, indirgenmiş glutatyonu yeniden üreten ve onu reaktif bileşiklere konjuge eden glutatyon redüktaz ile glutatyon transferaz enzimlerini içerir (Blondet ve ark., 2018).

2.3. Bağışıklık ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişkiler

Bağışıklık sistemi hücreleri, iki nedenden dolayı özellikle oksidatif strese duyarlıdırlar: Birincisi, bağışıklık sistemi hücrelerinde büyük miktarlarda ROS'nin üretildiği oksidatif patlama adı verilen oksidatif ve bakterisidal mekanizma yoluyla patojenlerin fagosite edilmesi ve öldürülmesi; ikincisi, bağışıklık hücrelerinin sitoplazma zarlarında oldukça fazla doymamış yağ asitleri bulunması (Meydani ve ark., 1995). Oksidatif patlama, bağışıklık tepkisinin önemli bir bileşenidir. Bu sırada süperoksit anyon radikalleri, glikozun oksidasyonuna bağlı bir reaksiyonla oksijenden üretilirler (Calder, 2013). Nötrofiller, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bileşenleridirler ve oksidatif stresteki artış, nötrofillerin bakteriyel patojenlerden kurtulma yeteneğini azaltarak kronik veya tekrarlayan enfeksiyonlara neden olabilir (Webb ve Falkowski, 2009). Oksidatif stres, nötrofillerin ömrünü etkileyebilir. Diabetes mellituslu hastalarda fagositik hücre işlevi, oksidatif stresten olumsuz etkilenebilir. Bu durum, nötrofillerin enfeksiyonu önleme veya ortadan kaldırma kabiliyetinde azalmaya neden olur

(Watson, 2002). Lenfositler ayrıca, normal hücresel aktivitelerinin bir parçası olarak sürekli olarak ROS üreten oldukça aktif hücrelerdir (Carroll ve Forsberg, 2007).

Bağışıklık hücreleri, ROS'nin aracılık ettiği hücre ve zar hasarından korunmak için yüksek düzeyde antioksidanlara ihtiyaç duyarlar. Bu antioksidanlar arasında belirli vitaminler (C ve E vitaminleri), glutatyon, antioksidan enzimler (CAT ve SOD) ve glutatyonun geri dönüşüm enzimi olan GPx bulunur (Carroll ve Forsberg, 2007). Antioksidan enzimlerin hepsinin aktif bölgelerinde metal iyonları (çinko, manganez, demir, selenyum ve bakır) bulunur (Calder, 2013). Vücut ROS'ne karşı savunma mekanizması olarak bir dizi endojen antioksidan üretmesine rağmen, bu endojen antioksidanların ROS'ni yok etme kapasiteleri, yüksek oksidatif stres koşulları altında yetersiz olabilir (Carroll ve Forsberg, 2007). Bu gibi durumlarda C vitamini, E vitamini, karotenoidler, selenyum ve çinko gibi antioksidan içeren besinler, zararlı ROS'ni ortadan kaldırarak normal hücresel fonksiyonlar ve sağlığın korunması için çok faydalı olabilirler (Chew ve Park, 2004).

2.4. Kemoterapi

Hücrelerin anormal şekilde kontrolsüz gelişmesi sonucu oluşan, tümör olarak da adlandırılan kanser dünyanın en çok savaşılan hastalıklarından biridir. 100'den fazla çeşidi olan kanser ile mücadele için pek çok tedavi yöntemi ve ilaç geliştirilmiştir (Walko ve Lindley, 2005).

Kemoterapi, kanser tedavisi için yaygın olarak kullanılan müdahalelerden biridir (El-Gerbed, 2015). Yeni kemoterapötik ilaçların mevcudiyetine ve radyasyon terapisindeki ilerlemelere rağmen, geleneksel kanser tedavisi genellikle tümörün ilerlemesini kontrol etmekte başarısız olmaktadır (Ramakrishnan ve ark., 2010). Bazı durumlarda kemoterapi ilaçları, kanser hastalarında ilaç direncinin gelişmesi ve tümöre geçen ilacın yetersiz konsantrasyonu gibi farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri nedeniyle başarılı olamayabilirler (Galmarini ve Galmarini, 2003). Kanser kemoterapisinin sitotoksik etkisi, kanser hücreleri için seçici olmayıp normal dokuları da etkiler (El-Gerbed, 2015). Sağlıklı dokulara verilen kemoterapi hasarının miktarı ve şiddeti kullanılan ilacın türüne, miktarına ve süresine bağlıdır (Minami ve ark., 2010). Kemoterapi ilaçları çalışma şekilleri, kimyasal yapıları ve diğer ilaçlarla etkileşimleri gibi faktörlere göre birkaç kategoriye ayrılabilir (El-Gerbed, 2015). En önemli kategoriler alkilleyici ajanlar (siklofosfamid, ifosfamid, melfalan, busulfan gibi), antimetabolitler (5-FU, kapesitabin, metotreksat (MTX), gemsitabin gibi), antitümör antibiyotikler (daunorubisin, doksorubisin, epirubisin gibi), topoizomeraz inhibitörleri (topotekan, irinotekan, etoposit,

teniposit gibi) ve mitotik inhibitörlerdir (paklitaksel, dosetaksel, vinblastin, vinkristin gibi) (Wu, 2006).

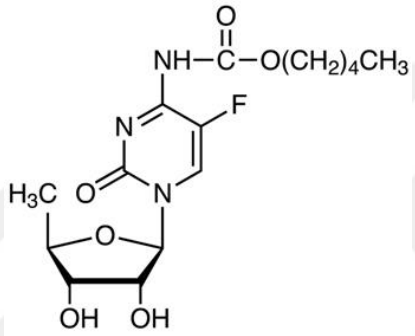
Tüm kemoterapötik ajanlar, hedef hücreler üzerinde toksik etkiye sahiptir (Ramakrishnan ve ark., 2010). Birçok kemoterapötik ilaç hücre döngüsünü hedefleyerek normal hücrelerden çok, hücre bölünmesinin yaygın olduğu kanser klonlarını etkiler. Bu süreç sırasında yavaş büyüyen kanser klonları, canlı kalır ve yeni hızlı büyüyen suşlar haline gelir (El-Gerbed, 2015). Kemoterapi en hassas tümör hücrelerini öldürür ve hastayı, tümör daha agresif bir organizma olarak yeniden ortaya çıktıktan sonra haftalar ve aylar boyunca remisyonda tutmayı başarır (Harless ve Qiu, 2006). Birçok antikanser ilaç, kanser hücrelerinde apoptozu teşvik etmek amacıyla deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına neden olur (Yokomichi ve ark., 2013). Apoptozun, antikanser ilaçların doğrudan veya dolaylı olarak oluşturduğu ROS tarafından uyarıldığını gösteren birçok çalışma vardır (Murata ve ark., 2004). Apoptozu teşvik ettiği bilinen ölüm faktörleri TNF-α, fas ligandı, lenfotoksin-α, TNF ile ilgili apoptozu teşvik eden ligand (TRAIL)/Apo2 ligandı ve Apo3 ligandıdır. Kemokinler, bu ölüm faktörlerini sentezleyen kan hücrelerinde pozitif kemotaksiyi teşvik eder. Örneğin fas ligandını üreten nötrofiller, keratinositler tarafından üretilen kemokinlere yanıt olarak dermise göç eder. Bu nötrofiller ROS'ne yanıt olarak apoptoza uğrarlar. Aynı zamanda nötrofillerdeki kaspaz-1 enzimi aktive olur ve nötrofillerden IL-1β salınır. Apoptoza maruz kalan hücreler, iltihaplanmaya yol açmazlar ve fagositler veya çevreleyen hücreler tarafından emilirler (Yokomichi ve ark., 2013).

2.4.1. Kemoterapinin Bağışıklık Baskılayıcı Etkileri

Birçok çalışma, kemoterapi ilaçlarının farklı bağışıklık bastırıcı etkilere sahip olabileceğini ve özellikle lenfositler ve lökositler olmak üzere beyaz kan hücrelerinin sayısını azaltabileceğini bildirmektedir (El-Gerbed, 2015; Ramakrishnan ve ark., 2010; Polansky ve Dafni, 2010). Bir çalışmada (Tolaney ve ark., 2008), 258 meme kanseri hastasında 5. kemoterapi döngüsünden sonra 3. veya 4. derece lenfopeni gözlenmiştir. Başka bir çalışmada (Nilsson ve ark., 2002) yoğun kemoterapi alan çoçuklarda kızamık ve kızamıkçık hastalığına karşı oluşan antikorların kaybolduğu görülmüştür. Yine kemoterapi, kombine tedavi gören hastalarda yapılan kanser aşılarından kaynaklanan antijene özgü T lenfosit hücrelerini inhibe etmiştir (Antonia ve ark., 2006). Başka bir çalışmada meme kanserli 34 hastanın kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinden sonra T lenfosit sayıları, önemli ölçüde azalmıştır (Solomayer ve ark., 2003).

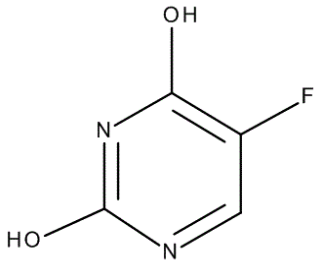
2.4.2. Kapesitabin

Kapesitabin (N4-pentiloksikarbonil-5'-dezoksi-5-florositidin) meme kanseri ve kolorektal, mide ve pankreas kanserleri gibi mide-bağırsak kanserlerinin tedavisinde etkili, iyi tolere edilen yeni bir kemoterapi ajanıdır (Şekil 2-1) (Polansky ve Dafni, 2010). Kapesitabin tümörde aktive olan ve tümöre selektif sitotoksik bir antimetabolit olarak tasarlanan floroprimidinin karbamat türevidir (Ajani, 2006). Vücut kapesitabini aldıktan sonra, timidin fosforilaz öncülüğündeki bir takım enzimatik reaksiyonlarla 5-FU olarak isimlendirilen genel bir kemoterapi ilacına dönüştürür (Walko ve Lindley, 2005).



Şekil 2-1: Öncü ilaç kapesitabinin kimyasal yapısı.

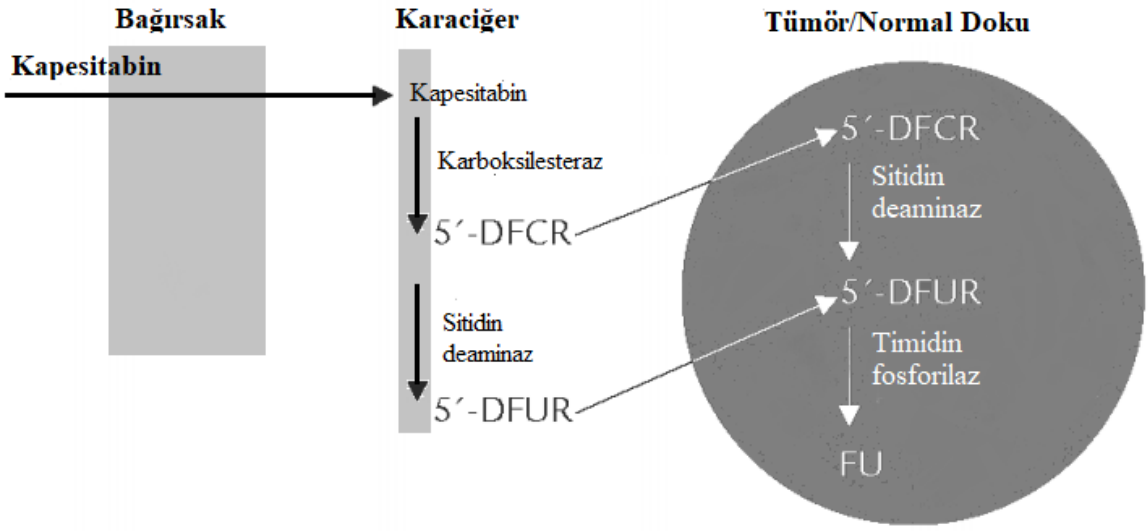
FU genellikle baş, boyun, meme, prostat, pankreas, karaciğer, sindirim sistemi, genital ve üriner sistemde bulunan çeşitli katı tümörlerde kemoterapötik ajan olarak kullanılan bir antimetabolittir (Şekil 2-2). Antimetabolitler hücrelerde DNA yapılanmasını ve yenilenmesini durdururlar. FU, urasilin florlanmış türevidir ve 1957 yılında sentezlenmiştir (Walko ve Lindley, 2005). Bu ilacın DNA sentezine ve m-ribonükleik asit (mRNA) translasyonuna karışan kompleks moleküler bir aktivitesi vardır. Bir dizi reaksiyon sonucu, ya DNA sentezini bloke ederek hücre ölümüne yol açar ya da anlamsız DNA zincirleri oluşmasına sebep olarak mRNA translasyonunu engeller (Koukourakis ve ark., 2008). 5-FU'in sindirim sistemi tarafından çok yüksek emilim ve hızlı parçalanma özelliğinden dolayı, damar içine uygulanması zorunludur. Bu nedenle, ilacın oral yolla uygulanmasını sağlayacak ve tümör hücrelerini hedef alarak seçiciliği arttıracak ön ilaçları geliştirilmiştir (Walko ve Lindley, 2005).



Şekil 2-2: Aktif ilaç florourasilin kimyasal yapısı.

Kapesitabin güvenilirliği yüksek olan FU'in öncü ilaçlarından biridir. Moleküler ağırlığı 359.35'tir. Suda yüksek çözünürlüğe sahiptir ve tablet formunda en az 9 ay stabil kalabilmektedir. Kapesitabin, inaktif formda sindirim sisteminden güvenilir bir şekilde emilir ve 3 adımlı enzimatik bir reaksiyonla 5-FU'e dönüştürülür. Bu reaksiyon dizisinin üçüncü adımı, timidin fosforilazı içerir. Bu enzim, normal dokulara kıyasla tümörde yaklaşık 127 kat daha fazla bulunur (Mikhail ve ark., 2010). Bu durum, ilacın seçiciliğini arttırır. Kapesitabinin geliştirilmesindeki amaç da spesifik olarak tümörlü bölgede çalışacak, aynı zamanda antitümör aktiviteyi maksimize edecek ve daha az sistemik toksisiteye sebep olacak bir ajan yaratmaktır (Walko ve Lindley, 2005).

Kapesitabin oral uygulamadan sonra, gastrointestinal bariyeri bozulmadan geçerek hızla ve tamamen emilir. Böylece FU'in yan etkilerinden biri olan ishal durumu, hastalarda daha az görülür (Malet-Martino ve Martino, 2002). İnce bağırsaklardan emilen bileşik, karaciğere gelir. İlk adımda karaciğerdeki karboksil esteraz enzimi, kapesitabini 5′-deoksi-5-florositidin (5'-DFCR)'e dönüştürür. İkinci adımda 5′-DFCR, sitidin deaminaz ezimi tarafından 5′-deoksi-5-floroüridin (5'-DFUR) molekülüne çevrilir. Bu adım normal dokulara oranla, karaciğer ve tümörde yüksek miktarda gerçekleşir. Son olarak tümörde yüksek aktiviteye sahip timidin fosforilaz enzimi, 5′-DFUR molekülünü asıl etken madde olan 5-FU'e dönüştürür. Böylelikle tümörlü dokular diğer dokulara oranla 5-FU'e çok daha fazla maruz kalırlar (Malet-Martino ve Martino, 2002).



Şekil 2-3: Kapesitabinin florourasile 3 adımlı metabolik dönüşümü (Walko ve Lindley, 2005).

5-FU hücre içine nüfuz ettikten sonra, birbiriyle yarışmalı iki yöne doğru metabolize olur. Ya aktif metabolitleri veren anabolik yola ya da 5-FU'i inaktif yapıp ilacın organizmadan atılmasını sağlayan katabolik yola yönelir. Molekülün % 80'den fazlası, dihidropirimidin dehidrojenaz enzimi önderliğinde katabolik yola devam eder ve bir dizi reaksiyon sonucu zararsız forma dönüştürülerek vücuttan atılır (Malet-Martino ve Martino, 2002).

5-FU'in anabolizması ise bir çok paralel reaksiyondan oluşan kompleks bir yoldur. Başlangıçta molekül 3 yola gidebilir. Birinci yolda timidin fosforilaz ve timidin kinaz enzimleri tarafından 5-floro-2′-deoksiüridin-5′-monofosfat formuna dönüştürülür. Bu yapı bir antimetabolittir. Antimetabolitler, DNA ve RNA'nın yapısında kullanılan moleküllere yapısal olarak benzerlik gösterirler. Ancak aynı işlevi görmezler. Ya yapıya katılarak hücre ölümünü indüklerler ya da nükleik asit üretiminden sorumlu enzimleri inhibe ederler. 5-floro-2′-deoksiüridin-5′-monofosfat molekülü, timidilat sentaz enzimi üzerine inhibitör etki gösterir. Enzim inaktif olduğunda, nükleotid havuzunda DNA replikasyonu ve tamiri için gerekli olan timin nükleotidi yetersiz kalır. Timidilat sentaz inhibisyonundan kaynaklı genotoksis stres, programlı hücre ölümünü aktive eder. Anabolizmadaki diğer iki yolun sonunda ise, 5-floroüridin-5′-trifosfat ve 5-floro-2′-deoksiüridin-5′-trifosfat oluşur. Bunlar pirimidin bazlarına benzerlik gösteren antimetabolitlerdir. Ancak buradaki pirimidin bazı halkası, beşinci karbonunda florid atomu içerdiği için, karbon atomu zincire doğru bağlanamaz. Böylece yapısı bozuk DNA ve RNA zincirleri oluşur. Fonksiyonel olarak da hatalı olacakları için hücre,

zorunlu apoptoza yani programlı hücre ölümüne yönelir (Malet-Martino ve Martino, 2002). Kanser hücreleri de, çoğu normal doku hücresinden daha hızlı gelişirler ve DNA ile RNA sentezinin öncü molekülleri olan nükleotidlere daha fazla ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden oluşan antimetabolitlere daha duyarlıdırlar.

2.4.2.1. Kapesitabinin Bağışıklık Baskılayıcı Etkileri

Güncel kanser tedavi yöntemlerinin temel handikaplarından biri, tedavi yöntemlerinin olası yan etkileridir (El-Gerbed, 2015). Kapesitabin genellikle iyi tolere edilen bir kemoterapötiktir. Kapesitabinin en yaygın doz sınırlayıcı yan etkileri ishal, hiperbilirubinemi ve palmar-plantar eritrodizestezi olarak da adlandırılan el-ayak sendromudur (Milano ve ark., 2008). Kapesitabin tedavisi sonucunda oluşan ROS nedeniyle keratinositler, kan hücreleri ve fibroblastlar vazodilatasyona, cilt kızarıklığına, ateşe, damar geçirgenliğinin artmasına ve şişmeye, yani el-ayak sendromuna neden olan IL-1β gibi inflamatuvar sitokinler üretirler (Yokomichi ve ark., 2013, Liao ve ark., 2020). Klinik meme ve kolorektal kanser çalışmalarında kapesitabin ile gözlenen genel el-ayak sendromu insidansı, % 50 civarında bulunmuştur. Bunun % 17'si, ciddi formu olan 3. dereceyi gösteren hastalardır (Walko ve Lindley, 2005). Yapılan bir çalışmada 5-FU/lökovorin karışımına kıyasla kapesitabin, daha fazla el-ayak sendromuna ve daha az stomatit, alopesi, ishal, mide bulantısı ve nötropeniye neden olmuştur (Cassidy ve ark., 2002).

Kapesitabinin kendisi toksik değildir, ancak tümör hücrelerinde FU'e dönüştürüldükten sonra toksik etki göstermeye başlar (El-Gerbed, 2015). Karaciğerde 5-FU'i katabolize etmekten sorumlu olan dihidropirimidin dehidrojenaz enzimindeki eksiklikler de, toksisitenin artmasına neden olmaktadır (Al-Dasooqi ve ark., 2013). Kapesitabin ile tedavi edilen sıçanlar çalışmalarda, değişen derecelerde klinik bulgular göstermişlerdir. Bu bulgular hayvanların biraraya toplanması, konjektivit, hafif titreme, piloereksiyon ve miyelosupresyon şeklinde olmuştur (El-Gerbed, 2015). Diğer yaygın yan etkiler arasında yorgunluk, halsizlik, karın ağrısı ve mide bulantısı/kusma, stomatit/mukozit ve ishal gibi mide-bağırsak bozuklukları bulunur (Milano ve ark., 2008). Kapesitabinin bağırsakta sitotoksik bir ajan olan 5′-DFCR'e dönüştürülmesi, gastrointestinal yan etkilerden sorumlu olabilir (El-Gerbed, 2015). Olayinka ve ark. (2017), kapesitabinin karaciğer hasarına neden olduğunu bildirmiştir. Ayrıca çalışmada, karaciğer ve vücut ağırlığı kaybı da gerçekleşmiştir. Azalan vücut ağırlığı, azalan iskelet kası ve yağ dokusundan kaynaklanabilir. Ayrıca hayvanların vücut ağırlığındaki azalma, yem tüketimindeki azalmaya da bağlı olabilir (El-Gerbed, 2015).

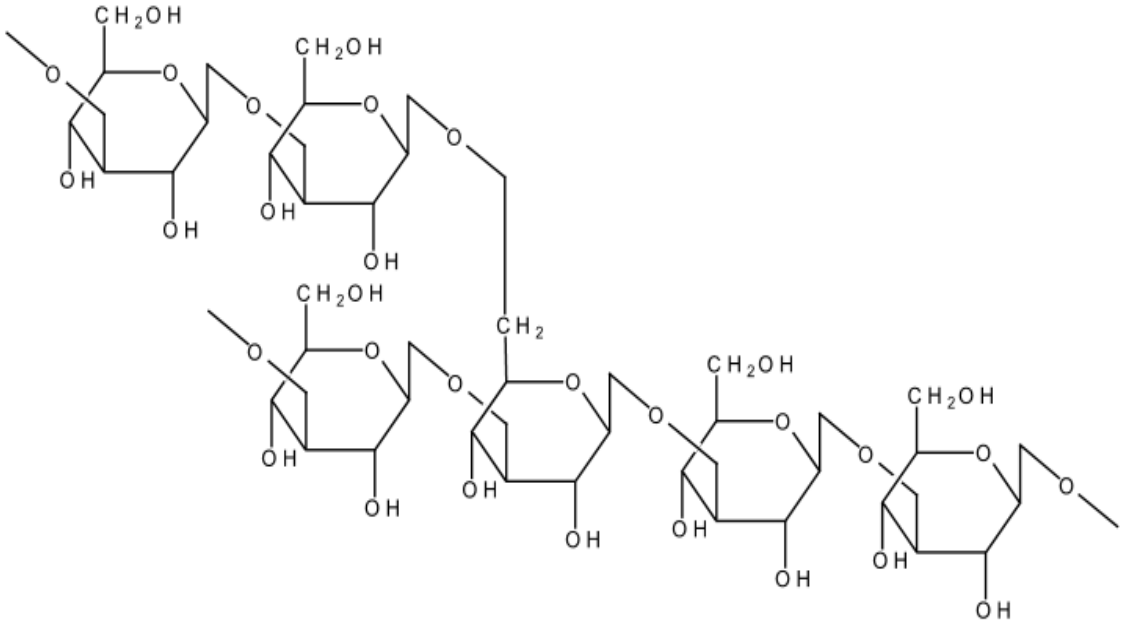
Diğer kemoterapötiklere benzer şekilde kapesitabin, aşırı ROS'nin oluşmasına ve plazma antioksidan seviyelerinde düşüşe neden olur. Bu düşüş, antioksidan savunma mekanizmasının oksidatif hasara karşı yetersizliğini yansıtır (El-Gerbed, 2015). Yapılan bir çalışmada 5-FU, miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücrelerin yüzdesini önemli ölçüde azaltmıştır (Annels ve ark., 2014). Klinik öncesi veriler, miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücrelerin azaltılmasının, kanser immunoterapisinin etkinliğini arttırdığını kanıtlamıştır (Mata ve ark., 2001). 5-FU'in tümör büyümesini baskılayan etkisi, T lenfosit hücrelerinin varlığına bağlıdır (Annels ve ark., 2014).

Kapesitabinin kanser hastalarında, immun baskılamaya ve lenfopeniye neden olduğu da bildirilmiştir (Polansky ve Dafni, 2010). Yapılan bir çalışmada kapesitabin tedavisini takiben ilerlemiş metastatik kolorektal kanserli hastalarda, % 30.5 düzeyinde lenfositopeni gözlenmiştir (Sakamoto ve ark., 2004). Başka bir çalışmada (Chan ve ark., 2009b) kapesitabin-dosetakselin kombine tedavisini takiben, metastatik meme kanseri olan hastaların % 66'sında 3. ve 4. derece lökopeni saptanmıştır. İleri pankreas kanseri olan hastalara uygulanan bevasizumab, kapesitabin ve gemsitabinin kombine tedavisinin, hastaların % 22'sinde 3. derece nötropeniye neden olduğu bildirilmiştir (Javle ve ark., 2009). Metastatik meme kanserli hastalara oral olarak vinorelbin ve kapesitabinin uygulandığı başka bir çalışmada, hastaların % 49'unda 3. ve 4. derece nötropeni gelişmiştir (Tubiana-Mathieu ve ark., 2009). Düşük doz kapesitabine interferon-α'nın eklenmesi, inflamasyon kontrolü sağlayarak hayatta kalma oranlarını arttırmıştır (Walter ve ark., 2012). Fujimoto-Ouchi ve ark. (2007), kapesitabinin kaşektik kanserli hastalarda plazma IL-6 seviyelerini düşürdüğünü kanıtlamıştır.

2.5. β-Glukan

β-Glukanlar, doğal olarak oluşan polisakkaritlerdir. Mantar, maya ve bazı bakteriler ile arpa, yulaf gibi tahılların hücre duvarlarının ana yapısal bileşenleridirler. Yapısal olarak tüm β-glukanlar, uzunlukları ve dallanma konfigürasyonları birbirinden farklı olan, 1→3 doğrusal β-glikozidik zincir çekirdeği ile birbirine bağlı olan glikoz polimerleridirler. Glikozidik zincir çekirdeğinden türetilen dallar, kaynağa bağlı olarak değişkenlik gösteren 1→4 veya 1→6 glikozidik zincirlerdir (Murphy ve ark., 2010) (Şekil 2-4). β-Glukanların bağıl moleküler ağırlık aralığı çok geniştir ve orijinine bağlı olarak 10 kilodaltondan binlerce kilodaltona kadar dalgalanma gösterir. Sudaki çözünürlükleri de yapılarına bağlıdır ve kökenleriyle ilişkilidir. Bu çeşitlilikleri, her birinin immun sistem üzerindeki etkilerinde farklılık yaratır. Son çalışmalar özellikle maya hücre duvarında bulunan β-1,3-glukanların, immun sistem üzerinde daha fazla

pozitif etki yarattığını göstermektedir (Rop ve ark., 2009). Genel olarak omurgalılarda ilk olarak tanımlanan 4 tane β-glukan reseptörü mevcuttur. Bunlar komplement reseptör 3, laktosilseramid, dectin-1 ve seçilmiş scavenger reseptörleridir (Akramienė ve ark., 2007).



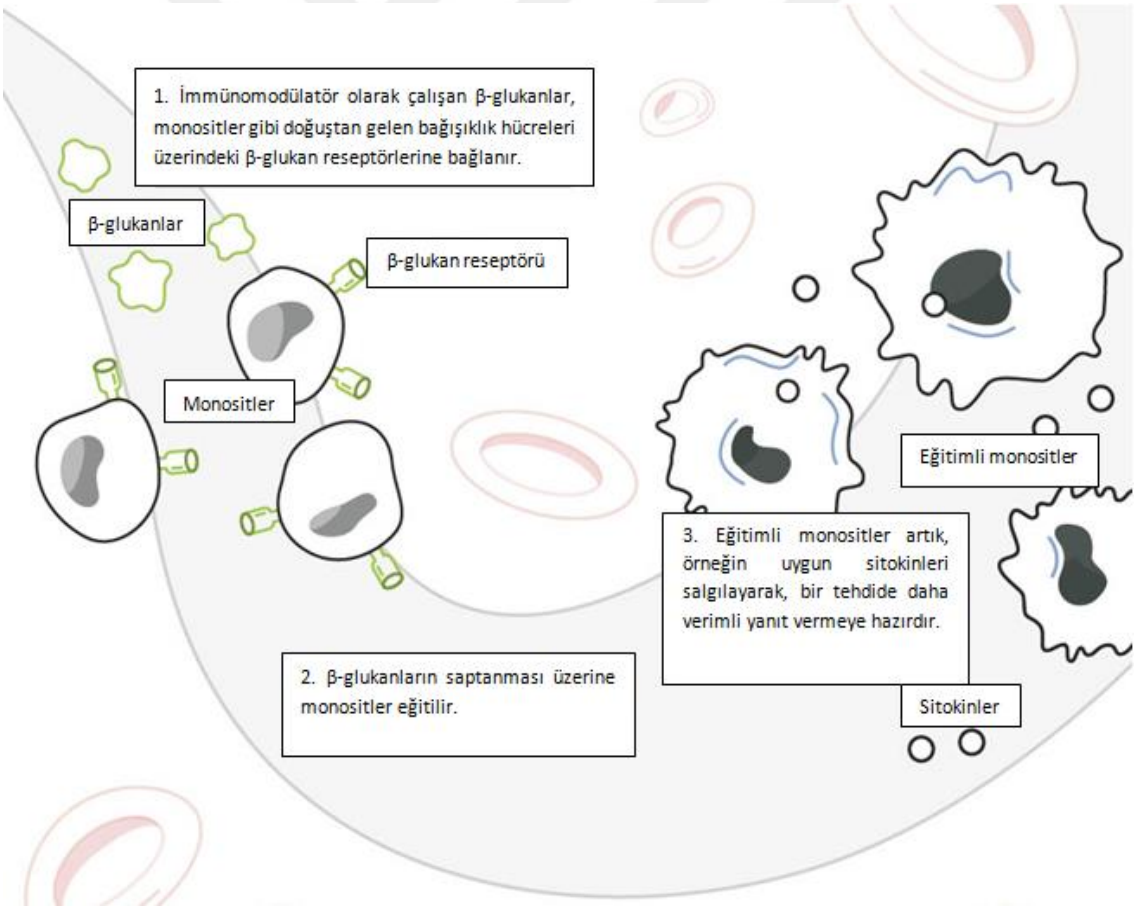
Şekil 2-4: β-Glukanın yapısı.

β-glukanlar, bağışıklık sistemini stimule etme ve çeşitli viral, bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarına karşı direnci güçlendirmenin yanı sıra, anti-tümör aktiviteyi teşvik etme yetenekleriyle de bilinirler (Murphy ve ark., 2010). β-glukanların makrofajlar, doğal öldürücü hücreler, dendritik hücreler, T hücreleri ve B hücreleri gibi birçok immunolojik olarak önemli hücre tipi üzerinde, kayda değer biyolojik ve fonksiyonel etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Sze ve Chan, 2012). Farklı kaynaklardan elde edilen β-glukanların her biri, immun sistem üzerindeki etkilerinde farklılık gösterir. Son çalışmalar özellikle maya hücre duvarında bulunan β-1,3-glukanların, immun sistem üzerinde diğerlerine göre daha fazla pozitif etki yarattığını göstermektedir (Rop ve ark., 2009).

β-glukanların makrofajlar, nötrofiller ve doğal öldürücü hücrelerin membran reseptörleri ile etkileşimleri sayesinde immun sistemi uyardıkları düşünülmektedir. β-glukanlar tarafından indüklenen immunomodülatör fonksiyonlar, hem doğuştan gelen hem de edinilmiş bağışıklık yanıtını içerirler. β-glukanlar ayrıca, opsonik ve opsonik olmayan fagositozu arttırırlar ve TNF-α ile çeşitli IL türleri gibi sitokinlerin salınımını tetiklerler (Şekil 2-5) (Chan ve ark., 2009a). Bunların dışında, kandaki LDL-kolesterolü düşürürler ve insan vücudundaki

karbonhidrat ile lipit metabolizmasını da pozitif yönde etkilerler (Rop ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda mantarlardan elde edilen β-glukanın makrofajlarda nitrik oksit ve IL-1 üretimini arttırdığı, zymosandan saflaştırılan β-glukanın da doza bağlı bir şekilde IL-10, ROS ve TNF üretimini arttırdığı gözlenmiştir (Murphy ve ark., 2010).

Masuda ve ark. (2009)'nın yaptığı bir çalışmada Maitake mantarından elde edilen β-glukanın kemik iliğini koruyucu etkisinin olduğu ve bunun makrofajlar, dendiritik hücreler ile doğal öldürücü hücrelerin artışına yansıdığı saptanmıştır. Böylece Maitake mantarının β-glukanı, kemoterapi kaynaklı lökopeniyi azaltabilir (Sze ve Chan, 2012). β-glukanların, bağışıklık sisteminin bütününü uyararak hareket ettikleri anlaşılmış ve kemoterapinin yan etkilerini azaltmasının yanında antitümör aktiviteyi de destekledikleri görülmüştür. Ayrıca enfeksiyonlara ve kansere karşı güvenli ve etkili bir beslenme stratejisidir (Murphy ve ark., 2010).

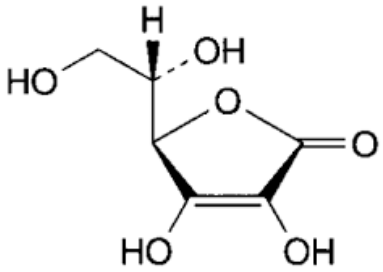


Şekil 2-5: β-Glukanlar tarafından indüklenen immun aktivasyonu.

2.6. C vitamini

Vitamin eksiklikleri yüzlerce yıldır bağışıklık sistemi bozuklukları ve hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir. Bağışıklık sisteminin hemen hemen her yönünün doğru gelişimi ve işlevi, vitaminlerin yeterli düzeylerine bağlıdır. Vitaminler hematopoezde, lenfositlerin, doğal öldürücü hücrelerin ve nötrofillerin bakım ve işlevlerinde ve hatta antikor üretiminde bile önemli rol oynarlar. Antioksidan vitaminler hücresel membranları, proteinleri ve nükleik asitleri yok edebilen ve normal hücresel aktivite yoluyla üretilen oksijen iyonları, serbest radikaller ve peroksitler gibi zararlı ROS'nin inaktive edilmesinde görev alırlar (Aggarwal ve Upadhyay, 2013).

C vitamini diğer bir adıyla L-askorbik asit, 1912 yılında kesfedilmiş ve 1928 yılında izole edilmiştir (Şekil 2-6). 1933 yılında kimyasal olarak üretilen ilk vitamin olma özelliğini taşımaktadır (Squires, 2011). C vitamini pek çok gıdada bulunur, ayrıca gıda takviyesi olarak da satılmaktadır. Çoğu hayvan ve bitki C vitaminini glikozdan üretebilirken insan, maymun, kobay ve bazı kuş türleri bu bileşiği üretemezler; bu nedenle onlar için C vitamini gıdalarla alınmak zorunda olunan esansiyel bir maddedir (Bendich ve ark., 1986). Bu canlılarda L-gulonolaktonun askorbik asite dönüşümünü kataliz eden laktonaz enzimi yoktur. C vitamini, suda çok kolay çözündüğünden ve vücutta depolanamadığından, esansiyel olduğu canlılar tarafından sebze, meyve ve hayvansal gıdalarla düzenli olarak alınmalıdır. C vitamini, kırmızı ve yeşil sebzeler ile turunçgillerde bol miktarda bulunur (Sözbilir ve Bayşu, 2008).



Şekil 2-6: C vitamini.

C vitamininin kolajen, karnitin, nörotransmiter ve nöropeptid hormonların sentezinin yanı sıra, epigenetik ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesindeki kofaktör rolü de dahil olmak üzere çok sayıda işlevi vardır. Bu işlevlerin çoğu, yaşam kalitesini ve yorgunluğu potansiyel olarak etkiler (Carr ve ark., 2014a). C vitamini eksikliği, kan damarı kırılganlığına yol açan patolojik bir durum olan skorbüt hastalığına neden olur. Bu durumu bağ dokusu hasarı,

aşırı yorgunluk ve sonunda da ölüm takip eder. Yaklaşık olarak günlük 10 mg C vitamini alımı, skorbüt hastalığını önlemek için yeterlidir (Grosso ve ark., 2013).

C vitamini, hücre dışı sıvılardaki en önemli serbest radikal temizleyicidir. Normal metabolizma sırasında da meydana gelebilen ve toksinler ile kanserojenlerin neden olduğu serbest radikalleri yakalayarak, biyolojik zarları peroksidatif hasardan korur (El-Gendy ve ark., 2010). C vitamini, elektronlarını kolayca bağışlayabilmesi sebebiyle oldukça etkili bir antioksidandır (Carr ve Maggini, 2017). Enzimatik olmayan antioksidan özelliklere sahip iyi bilinen bir kenetleme maddesi olan C vitamini, lipid peroksidasyonunu azaltarak, antioksidan savunma sistemini değiştirerek, elektronları serbest radikallere göstererek ve serbest radikallerin reaktivitesini söndürerek oksidatif hasarı onarır (El-Gendy ve ark., 2010)

C vitamininin antioksidan özelliği, ROS'nin zararlı etkilerini azaltmaktan ileri gelmekte ve bunu da, rezonans stabil ve daha kararlı formu olan askorbat serbest radikalini elektron vericisi olarak kullanarak gerçekleştirmektedir. Askorbat serbest radikali, NADH- ve NADPH-bağımlı redüktazlar tarafından hücre içinde askorbata geri indirgenir. Askorbat serbest radikali, bu enzimlerin ulaşamadığı alanlarda veya kapasitelerini aştığı durumlarda önemli ölçüde birikir. Bu durumda iki askorbat serbest radikal molekülü, askorbat ve dehidroaskorbattan birer molekül oluşturmak üzere parçalanırlar (Grosso ve ark., 2013). C vitamininin bu özelliklerinin organ hasarına karşı çok faydalı etkiler sağladığı düşünülmektedir. Örneğin, C vitamininin karaciğer hasarını iyileştirmek için yararlı olduğu bulunmuştur (El-Gerbed, 2015). Glutatyon, hücre içi serbest radikal temizleyici görevi görür ve hücreleri, serbest radikallerin aracılık ettiği lipid peroksidasyonuna karşı korur. C vitamini farelerde kimyasal olarak indüklenen hepatotoksisitede, hepatik glutatyonun tükenmesini önlemiştir (Cuddihy ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada C vitamini, oksidatif stresin neden olduğu böbrek yetmezliğini azaltmıştır (Ferretti ve ark., 2008).

Yarım asırdan uzun süredir yapılan çalışmalar, C vitamininin bağışıklık sisteminin çeşitli yönlerinde, özellikle bağışıklık hücrelerinin fonksiyonlarında çok önemli rolü olduğunu göstermiştir. C vitamini bağışıklık düzenleyici etkilere katkıda bulunabilecek bir dizi aktiviteye sahiptir (Carr ve Maggini, 2017). C vitamini lökosit fonksiyonlarını uyarır ve hücreleri inflamatuvar yanıt sırasında oluşturulan ROS'nden korur. C vitamininin oldukça etkili yapısı sayesinde, vücutta metabolik süreç ve bağışıklık hücrelerinin aktivitesi nedeniyle oluşan serbest radikallerin ve ROS'nin neden olduğu hasarlardan proteinleri, lipidleri, karbonhidratları, DNA ve RNA'yı koruması için oldukça küçük miktarları gereklidir (Carroll ve Forsberg, 2007). C

vitamininin fareler, kobaylar, insanlar ve tavşanlar gibi çeşitli türlerde doğuştan gelen ve sonradan edinilmiş bağışıklığı uyardığı ve makrofajların *in vitro* fagositozunu, kimyasal çekimini ve hücreye yapışmasını arttırdığı bildirilmiştir (Del Rio ve ark., 1998). C vitamini, E vitamini gibi antioksidanları yeniden üretir ve böbreküstü bezi ile bağışıklık sistemi hücreleri gibi bazı dokularda birikir. Adrenal medullada üretilen ve beyin fonksiyonu ile vücudun strese tepkisi açısından önemli bir nörotransmiter olan noradrenalinin sentezinde rol oynar (Carroll ve Forsberg, 2007).

Schwager ve Schulze (1998) C vitamininin, domuzlarda lenfositlerin mitojenlere karşı proliferatif yanıtını değiştirdiğini ve T ile B lenfositlerin sayılarında geçici değişikliklere neden olduğunu saptamışlardır. Araştırıcılar aynı zamanda C vitamininin, IL'in gen regülasyonu ve IL-2'nin metabolizması üzerindeki etkilerini göstermişler ve immun dengenin korunmasındaki rolünü kanıtlamışlardır. Yaşlı atların C vitamini sentezleme yeteneğinin azalmış olabileceği ve yaşlı veya enfeksiyon belirtileri gösteren atların C vitamini takviyelerinden yararlanabilecekleri bildirilmiştir (Thunes, 2017).

C vitamini, inflamatuvar aracılar olan sitokinler üzerine de etki eder. Sitokinler, enfeksiyon ve iltihaplanmaya yanıt olarak hem doğuştan hem de edinilmiş bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan önemli hücre sinyal molekülleridirler. Kemokinleri, interferonları, IL'leri, lenfokinleri ve TNF'ü kapsayan geniş bir molekül yelpazesini içerirler. C vitamininin, sistemik ve lökosit kaynaklı sitokinleri karmaşık bir şekilde modüle ettiği görülmektedir. Periferik kan lenfositleri ile C vitamininin inkübasyonu, IL-1β seviyesine etki etmezken anti-inflamatuvar IL-10 üretimini arttırır, proinflamatuvar sitokinler olan TNF-α ve interferon-γ üretimiyle uyarılmış lipopolisakkariti azaltır. Pnömoni hastalarından izole edilen periferik kan monositlerine *in vitro* C vitamininin ilavesi, proinflamatuvar sitokinler olan TNF-α ve IL-6 oluşumunu azaltır. Sağlıklı insan gönüllülere günde 1 gr C vitamini takviyesinin, periferik kan mononükleer hücre kaynaklı IL-10, IL-1 ve TNF-α'yı arttırdığı gösterilmiştir. Böylece C vitamininin sitokin üretimi üzerindeki etkisinin, hücre tipine veya inflamatuvar uyarana bağlı olduğu ortaya çıkmaktadır (Carr ve Maggini, 2017).

Yüksek doz intravenöz C vitamini, onlarca yıldır kanser hastaları için tamamlayıcı ve alternatif bir tedavi olarak uygulanmaktadır. Yorgunluk, kanser hastaları tarafından bildirilen en yaygın semptomdur ve yaşam kalitesini ağrıdan daha çok etkilemektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla C vitamininin hem kemoterapi hem de radyoterapi varlığında ya da yokluğunda, kanser hastalarının yaşam kalitesini iyileştirebileceğini gösteren kanıtlar

birikmektedir. Kemoterapi tedavisi gören meme kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada, C vitamini takviyesi alan gruplarda kontrol grubuna göre yorgunluk, uyku bozukluğu, baş dönmesi, bulantı ve iştah kaybında önemli ölçüde azalmalar görülmüştür. Oksidatif stres, kanserin gelişimi ve ilerlemesinde ana etiyolojik faktördür. Ayrıca radyoterapi ve bazı kemoterapötik ajanlar, serbest radikal üretiminin artmasında rol oynarlar. Oksidatif stresin, kemoterapi kaynaklı halsizlik ve yorgunluğa katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu nedenle C vitamini, adjuvan tedavinin hedef dışına çıkan oksidan aracılı toksisitesini azaltabilmektedir. Ön çalışmalar, kanser hastalarına yapılan yüksek doz C vitamini takviyesinin C-reaktif protein, TNF, interferon-γ ve IL'ler gibi inflamasyonun biyolojik belirteçlerini azalttığını göstermiştir. Ayrıca iyi tasarlanmış plasebo kontrollü ek çalışmalar, C vitamininin kanser hastalarının yaşam kalitesi üzerindeki etkilerini garantili şekilde ortaya çıkarmaktadır (Carr ve ark., 2014b). Bütün bunların yanı sıra, kontrollü olarak yüksek dozlarda bile C vitamini takviyesinde herhangi bir yan etki gözlenmemiştir (Bendich ve Langseth, 1995).

C vitamini ilavesi, farelerde sisplatinin neden olduğu akut böbrek yetmezliğini iyileştirmiş ve hücreleri, serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna karşı korumuştur (Cuddihy ve ark., 2008). Atasayar ve ark. (2009) sisplatin ile C ve E vitaminlerinin kombine tedavisinin, tek akut toksik doz sisplatin (7.5 mg/kg) ile tedavi edilen gruba kıyasla, böbrekte sisplatinin neden olduğu histopatolojik değişiklikleri iyileştirebileceğini bildirmişlerdir. C vitamini iyi bir antioksidan olduğu için kapesitabinin neden olduğu karaciğer hasarı gibi istenmeyen yan etkilere karşı fayda sağlayabilir.

2.7. İmmun ve Antioksidan Parametreler

2.7.1. İmmunglobulin G

Ig molekülleri heterodimer yapıdadır. Zincirler arası disülfür köprüleriyle bağlı dört polipeptit zincirinden oluşurlar. Yaklaşık 50-60 kDa büyüklüğünde iki özdeş ağır (H) zincir ve yaklaşık 23 kDa büyüklüğünde iki hafif (L) zincirden meydana gelmektedirler. Rodney Porter tarafından ilk olarak 1962 yılında önerilen bu prototip yapı, tüm monomerik Ig molekülleri için ortaktır. Ig molekülleri glikoproteindirler ve genellikle ağır zincirlere bağlı iki veya daha fazla karbonhidrat zinciri içerirler (Nezlin, 1998). Ig'ler fonksiyonel olarak, komplement aktivasyonu veya Fc reseptörlerine bağlanma gibi efektör fonksiyonları belirleyen sabit domainlere ve antijenlere bağlanan değişken domainlere göre ayrılabilirler. Ig'ler özellikle iki amaca hizmet ederler. Hücre sinyalleşmesine ve hücre aktivasyonuna izin veren antijenler için hücre yüzeyi reseptörü olarak, ya da antijenlere belirli bir mesafeden bağlanarak onları nötralize

edebilen çözünür efektör moleküller olarak görev alırlar (Schroeder Jr ve Cavacini, 2010). İnsanlarda ve kemirgenlerde IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE olmak üzere 5 ana Ig sınıfı saptanmıştır (Waldmann ve ark., 1971). Ig'ler birincil yapıları, karbonhidrat içerikleri ve ağır zincirlerinin antijenik özellikleri bakımından farklılıklar gösterirler (Nezlin, 1998).

IgG, Ig'lerin ana sınıfını oluşturur. Serumdaki Ig'lerin % 75'i bu sınıfa aittir. IgG, serumda en uzun yarı ömrü olan izotiptir. Ayrıca en kapsamlı olarak çalışılan Ig sınıfıdır (Schroeder Jr ve Cavacini, 2010). IgG molekülünde iki özdeş antijen birleşme bölgesi vardır. Her IgG molekülü % 3 karbonhidrat içerirken, diğer Ig'ler genellikle çok daha yüksek düzeyde karbonhidrat içermektedirler. IgG'lerin IgG_1, IgG_2, IgG_3 ve IgG_4 olmak üzere 4 ayrı alt sınıfı vardır. İmmun cevabın ikinci kez ortaya çıkması durumunda B lenfositler, ağırlıklı olarak IgG molekülleri salgılarlar. Diğer Ig'lerin aksine IgG, plasenta bariyerini geçebilir ve ekstravasküler alanlara girebilir. IgG molekülleri, makrojafların ve diğer bazı hücrelerin yüzeyinde bulunan Fc reseptörleri ile reaksiyona girebilirler. Fc reseptörleri ile etkileşim, çeşitli efektör reaksiyonları başlatır. Bu durum özellikle IgG antikorları tarafından tanınan, potansiyel olarak zararlı mikropların yok edilmesini kolaylaştırır. IgG molekülleri, klasik yolakta da komplement sistemini aktive ederler (Nezlin, 1998). Ayrıca IgG antikorları, toksinlerin ve virüslerin nötralizasyonunu sağlayarak, immun cevaba doğrudan katkıda bulunurlar (Schroeder Jr ve Cavacini, 2010).

2.7.2. İnterlökin-1β

Sitokinler, inflamasyon ve bağışıklığın neredeyse tüm evrelerinde çok önemli rol oynayan, hücreler arası iletişimi sağlayan ve geniş bir hücre yelpazesinden salınan, küçük protein veya glikoprotein molekülleridirler. IL terimi hücre proliferasyonu, olgunlaşması, göçü ve adhezyonu da dahil olmak üzere karmaşık immunmodülatör fonksiyonlara sahip bir grup sitokini tanımlamak için kullanılmıştır. Bu sitokinler ayrıca, bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasında ve aktivasyonunda önemli rol oynarlar (Brocker ve ark., 2010). IL'lerin ilk keşfinden bu yana 60'tan fazla sitokin, IL olarak belirlenmiştir (IL-1, IL-2 vb.). IL-1, 1977 yılında keşfedildiğinden beri kendisi hakkında binlerce makale yayınlanmıştır (Akdis ve ark., 2016). IL-1, prototipik proinflamatuvar bir sitokindir. Kendisi, tanımlanan ilk IL'dir ve geniş IL ailesinin çok ötesine uzanan etkileri ile çığır açan bir molekül olarak iş görmektedir. Her biri farklı bir gen tarafından kodlanan IL-1 ailesine ait 11 üye vardır (Garlanda ve ark., 2013). Bunlar IL-1α, IL-1β, IL-1RA, IL-18, IL-33, IL-36α, IL-36β, IL-36γ, IL-36RA, IL-37 ve IL-38 olarak bilinmektedir (Brocker ve ark., 2010). Bunlardan IL-1α ve IL-1β, en çok incelenen

üyelerdir. Bu iki proteinin, minimal sekans homolojisine sahip olmakla birlikte, benzer biyolojik özelliklere sahip oldukları düşünülmüştür. Ancak lokalizasyonda, olgunlaşmada ve salgılanmada temel farklılıklar vardır. Örneğin IL-1α, biyolojik olarak sürekli aktif halde bulunurken IL-1β, inflamazom ve kaspaz-1'in aktivasyonu ile işlenene kadar, biyolojik aktiviteye sahip değildir (Akdis ve ark., 2016).

IL-1β, inflamatuvar sinyallere yanıt olarak çok sayıda farklı immun ve immun olmayan hücre tipi tarafından üretilir ve salınır. IL-1β, bağışıklık reaksiyonlarının amplifikatörü olarak işlev görür. Çok uzun yıllar süresince IL-1'in, akut iltihaplanmaları gidermek için doğuştan gelen bağışıklığın etkin bir şekilde başlaması ve edinilmiş bağışıklığın yanıtlarının şekillendirilmesi için gerekli olduğu, yaygın olarak kabul edilmiştir. Ancak IL-1β'nın yararlı bir bağışıklık düzenleyici olduğu görüşü, aşırı IL-1β salgılanmasının otoinflamatuvar hastalıklara neden olduğunun saptanmasıyla, sorgulanmaya başlanmıştır. Buna ek olarak kronik inflamasyon durumunda sürekli IL-1β salınımının, hem tümör indüksiyonunu hem de farklı mekanizmalarla tümör yayılmasını teşvik ettiği görülmüştür. IL-1β'nın salgılanması ve işlenmesi, çok sayıda kemoterapötik ilaç tarafından indüklenir ve bu durumun, miyeloid hücrelerde IL-1β'nın gen ifadesini veya inflamasyon aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Bent ve ark., 2018).

2.7.3. Tümör Nekroz Faktör-α

TNF, hem fizyolojik hem de patolojik süreçlere katkıda bulunan kritik bir sitokindir. Keşfinden bu yana normal fizyoloji, akut ve kronik inflamasyon, otoimmun hastalıklar ve kanserle ilişkili inflamasyondaki rolleri nedeniyle pek çok çalışmanın merkezinde olmuştur. TNF ailesi TNF-α, TNF-β, CD40 ligandı, Fas ligandı, TRAIL ve LIGHT gibi, sistematik inflamasyonda, tümör lizisinde, apoptozda ve akut faz reaksiyonlarının başlatılmasında görev alan en önemli sitokinlerin bazılarını içerir (Chu, 2013). TNF üreten asıl hücreler, makrofajlar ya da monositlerdir; ancak B hücreleri, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler, Kupffer hücreleri, glial hücreler ve adipositler de dahil olmak üzere diğer hücrelerde de üretimi görülmektedir (Tracey ve Cerami, 1993).

Makrofajlarda ya da monositlerde üretilen TNF miktarı, hücrenin aktivasyon durumuna ve onu tetikleyen uyarana bağlıdır. Lipopolisakkaritler, makrofajlarda TNF üretimi için güçlü bir uyarandır (Papadakis ve Targan, 2000). TNF, nükleer faktör-KB aktivasyonu yoluyla kendi transkripsiyonunu indükler, ancak aynı zamanda kendi üretimi üzerinde sıkı bir kontrol sağlamak amacıyla spesifik negatif düzenleyici unsurları da indükler (Carballo ve ark., 1998).

TNF-α, sadece kendi salgılanmasını indüklemekle kalmaz, aynı zamanda diğer inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini de uyarır.

TNF-α ve TNF-β, aynı reseptörlerle iletişime girerek çeşitli yanıtlar ortaya çıkarırlar ve hastalıkların patojenik aracıları olarak görülürler. TNF-α ateş, şok, doku zedelenmesi, tümör nekrozu, anoreksi, diğer sitokinlerin ve immunregülatör moleküllerin indüksiyonu, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz dahil olmak üzere geniş bir yelpazede hücresel yanıtlar ortaya çıkarır (Liu ve ark., 1996). TNF-α'nın patojenik rolü, birçok insan hastalığını içine almaktadır. Septik şoktaki iyi bilinen rolüne ek olarak otoimmunite, graft-versus-host hastalığı, romatoid artrit, Crohn hastalığı, kansere eşlik eden kaşeksi ve edinilmiş immun yetmezlik sendromu gibi kronik süreçlerin patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. TNF-α ayrıca insülin direnci, konjestif kalp yetmezliği, ateroskleroz, pankreatit ve alkole bağlı karaciğer hasarı ile de ilişkilendirilmiştir.

TNF-α, endotoksin kaynaklı ve geç evre akciğer kanseri hastalarında kemoterapiye bağlı septik şokta hayati bir oyuncudur. Tümörijenez, tümör ilerlemesi, invazyon ve metastaz için önemli bir risk faktörü olarak ortaya çıkmaktadır. Kanserle ilişkili kronik inflamasyonun da önemli bir aracıdır. Yapılan deneysel sıçan kanseri modellerinde TNF-α'nın, erken evre karaciğer ve cilt kanserini teşvik ettiği ve akciğerlere kolon kanseri metastazını arttırdığı gösterilmiştir (Chu, 2013).

2.7.4. Glutatyon Peroksidaz

GPx, antioksidan sistemin enzimatik bileşenlerine aittir. Substrat olarak indirgenmiş glutatyon kullanarak, organik ve inorganik peroksitlerin serbest radikal oluşturmadan detoksifikasyonunu kataliz eder (Shulgin ve ark., 2008). Hemoglobini ve membran lipidlerini oksidan strese karşı korumak için, redükte glutatyonu yükseltgerken H_2O_2'in de suya dönüşmesini sağlar (Memişoğulları, 2005).

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

Lipid peroksitlerin ve H_2O_2'in detoksifikasyonundan sorumlu GPx, oksidatif stres ve lipid peroksidasyondan korunmada önemli bir rol oynamaktadır (Galazyn-Sidorczuk ve ark., 2012). İki ana tip GPx bulunmuştur. Tiplerden biri, aktif bölgesinde kovalent bağlı selenosistein formunda selenyum içermesiyle ayırt edilir. Bu selenyuma bağımlı enzim, hem organik hidroperoksitler hem de H_2O_2 varlığında aktiftir. İkinci tip GPx ise, kataliz için selenyuma

bağımlı olmayan ve H_2O_2 üzerinde ihmal edilebilir aktiviteye sahip proteinlerden oluşur (Mannervik, 1985). Selenyuma bağımlı GPx'ın bitkilerde, bakterilerde ve basit böceklerde bulunmadığı, ancak tüm balıklarda, solucanlarda ve memeli türlerinde mevcut olduğu gösterilmiştir (Shulgin ve ark., 2008).

Memeli dokularında 4 ana selenyuma bağımlı GPx izoenzimi vardır. Bunlar; kırmızı hücreler, karaciğer, akciğer ve böbrekte bulunan klasik GPx (GPx-1), mide ve bağırsağa ait GPx (GPx-2), kalp, kas, böbrek, akciğer, plasenta, sperma kesesi gibi farklı organlarda yer alan plazma GPx (GPx-3) ve fosfolipid GPx (GPx-4) olmak üzere farklı dokulara geniş bir şekilde dağılmışlardır. GPx-1, GPx-2 ve GPx-3 homotetramer olarak hareket ederken, GPx-4 monomer olarak fonksiyoneldir (Margis ve ark., 2008).

2.7.5. Süperoksit Dismutaz

İlk keşfedilen antioksidan enzim olan SOD'ın, süperoksit radikalinin H_2O_2 ve oksijene hızlı bir şekilde parçalanmasını kataliz ettiği reaksiyon, 1969 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. (Nozik-Grayck ve ark., 2005). Enzim daha önceleri, hemokuprein ya da eritrokuprein olarak bilinmekteydi. Moleküler ağırlığı yaklaşık 33.000 kDa'dur ve kovalent olmayan iki eşit alt birimden oluşur. 2 Cu ve 2 Zn atomuna sahiptir (CuZn-SOD). (Marklund, 1984). Memelilerde SOD'ın 3 izoformu olduğu belirlenmiştir (Nozik-Grayck ve ark., 2005). Mn-SOD tipi, ilk olarak prokaryotlarda keşfedilmiş, tavuk ve memeli dokularında da görülmüştür. Moleküler ağırlığı 80.000 kDa'dur ve kovalent bağlı olmayan 4 eşit alt birimden oluşur. Bu iki SOD tipinin (CuZn-SOD ve Mn-SOD) protein yapısı benzerlik göstermez. Daha sonraları ise üçüncü bir memeli SOD'ı olan hücre dışı SOD (EC-SOD), insan akciğerlerinden izole edilip kısmen karakterize edilmiştir. EC-SOD, heparine afinitesi olan, kısmen hidrofobik bir glikoproteindir ve yaklaşık 135.000 kDa moleküler ağırlığına sahiptir. Kovalent bağlı olmayan 4 eşit alt birimden oluşur ve süperoksit radikaliyle yüksek bir reaktiviteye sahiptir. 4 Cu ve 4 Zn atomu içermektedir. Memelilerde ilk keşfedilen CuZn-SOD ile EC-SOD, benzer prostetik metallere sahip olmalarına rağmen, amino asit kompozisyonları, antijenik özellikleri ve kromozomal yerleri birbirlerinden tamamen farklıdır. CuZn-SOD ve Mn-SOD, birincil olarak hücre içi enzimler iken EC-SOD, hücre dışı boşlukta baskın olarak görülmektedir (Marklund, 1984).

EC-SOD, süperoksidi özellikle hücre dışı alandan temizleyen tek antioksidan enzimdir. Oksidan hasarın, inflamasyonun ve fibrozun modüle ettiği bir dizi akciğer hastalığında önemli bir role sahiptir. Hiperoksik akciğer hasarında EC-SOD ifadesi ve aktivitesi bozulur. Bu durum

potansiyel olarak, oksidan hasarına ve inflamasyona katkıda bulunur (Nozik-Grayck ve ark., 2005). Ayrıca Ookawara ve ark. (2002), EC-SOD'ın heparin bağlayıcı domaininin, belirli hücre tiplerinde nükleer lokalizasyon sinyali olarak hareket edebildiğini göstermiş, Kwon ve ark. (2012), EC-SOD'ın sadece bir antioksidan olarak değil aynı zamanda sinyal yayılımının kontrolörü olarak da hareket edebileceğini bildirmişlerdir.

2.7.6. Katalaz

CAT en çok çalışılan enzim sınıflarından biridir. Oksijene maruz kalan hemen hemen bütün canlı organizmalarda yaygın olarak bulunan bir enzimdir. CAT'lar tarafından kataliz edilen genel reaksiyon, iki H_2O_2 molekülünün suya ve oksijene indirgenmesidir (Chelikani ve ark., 2004). Bu reaksiyon, H_2O_2'in hidroksil radikaline ve daha toksik ROS'ne dönüşümünü engeller. Enzim organizmada sürekli vardır ancak H_2O_2 varlığında aktif hale gelir (Blondet ve ark., 2018).

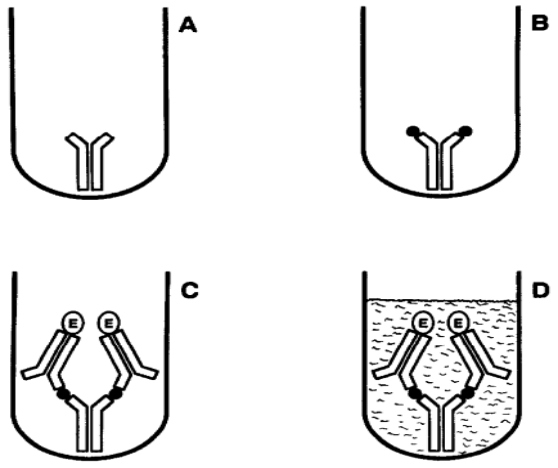
Elde edilen mevcut sekans sayısının artmasıyla farklı homolojiler tespit edilmiş ve CAT'lar, yapılarına ve fonksiyonlarına göre üç grupta sınıflandırılmaya başlanmıştır. Birinci ve ikinci grup, hem içeren enzimler olan tipik veya gerçek CAT'lar ve CAT peroksidazlardır. Üçüncü grup ise hem içermeyen Mn-CAT'lardır. Mn-CAT'lar sadece bakterilerde bulunurken, CAT peroksidazlar mantarlarda, bakterilerde ve arkeobakterilerde bulunmaktadır. Tipik veya gerçek CAT'lar olarak isimlendirilen birinci grup enzimler, aerobik olarak solunum yapan organizmalarda bulunur. Bu CAT'ların çoğu homotetramerdirler, 4 prostetik kümeden oluşurlar ve 200-340 kDa boyutlarındadırlar (Glorieux ve Calderon, 2017).

2.8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Antikorlara bağlı enzim-substrat kombinasyonları, belirli analitleri tespit etmek amacıyla geliştirilmiştir. 1971 yılında Avrupadaki iki bağımsiz araştırma grubu, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)'in adım adım sürecini açıklayan bir makale yayınlamıştır (Shah ve Maghsoudlou, 2016). ELISA tekniği basit, hassas, hızlı, güvenilir ve antijenlerin ve antikorların kantitasyonu için çok yönlü bir test sistemidir (Reen, 1994). ELISA klasik çökeltiye dayalı yöntemlerden farklıdır. Spesifik antijen-antikor etkileşimleri, genellikle antikor olan bir reaktant ile konjuge bir enzim etiketi test edilerek tanınır. Enzim markörlerinin uygun bir substrat ile reaksiyona girerek tespit edebildiği hassasiyet nedeniyle ELISA, çökelme testlerinden birkaç yüz kat daha fazla hassasiyet sunar (Clark ve ark., 1986). Antikorların aşırı ayırt etme gücü sayesinde, neredeyse sonsuz bir dizi antijenik yapıyı tanır.

ELISA'ler, testin özel uygulamasına bağlı olarak birçok konfigürasyonda geliştirilmiştir. Pratikte ELISA, bir katı faz tekniği olarak iki ana türe ayrılabilir. Birinci tür, bir antijen-enzim eşleniği veya bir antikor-enzim eşleniği kullanan rekabetçi testlerdir. Diğer tür ise, ikinci antikorun kendisine konjuge edilmiş bir indikatör enzime sahip olduğu bir çift antikor "sandviç" tekniği kullanan, rekabetçi olmayan testlerdir. Katı faz ELISA'de immünoreaktanlardan biri (antikor veya antijen), kovalent olmayan etkileşimler yoluyla adsorblanarak bir katı destek (mikrotitre plakası) üzerine immobilize edilir (Reen, 1994). Reaksiyonlar, bileşenlerin sırayla sunulduğu ve ardışık olarak bağlandığı katı bir fazda gerçekleşir. Her adımdan sonra ilgisiz, reaksiyona girmeyen ve muhtemelen inhibe edici bileşenler yıkanır (Clark ve ark., 1986). ELISA, bir kromojenik substratın hidrolizini takiben enzim etiketli bir antikor veya antijen tarafından üretilen renk üretimine dayanır (Şekil 2-7) (Reen, 1994).

Sandviç ELISA ile çok karmaşık solüsyonlar analiz edilebilir. Testin adı, iki antikor arasında bir antijeni "sandviçleyebilme" prensibinden kaynaklanmaktadır. Bir yakalama antikoru içeren kaplama tamponu çözeltisi bir "well plate"'e eklenir ve yapışmasına izin verilir. İnkübasyonun ardından, plate yıkanır ve kuyular içerisinde kalan bağlanma yerlerini bloke etmek için blokaj tamponu eklenir. Daha sonra numuneler her kuyuya eklenir ve belirli bir süre boyunca inkübe edilir. Sonuçların doğruluğunu sağlamak için, her plate ile birlikte standart bir örnek (pozitif kontrol) ve boş bir örnek (negatif kontrol) çalışılmak zorundadır. Daha sonra her kuyuya bir saptama antikoru, ardından konjuge ikincil antikor ve bloke edici tampon eklenir. Her adım arasında plate, fosfat tamponlu salin ile yıkanır. Son olarak renk değişimi için bir substrat solüsyonu eklenir ve sonuçları tespit etmek için mikroplate okuyucu kullanılır (Shah ve Maghsoudlou, 2016).



Şekil 2-7: Sandviç ELISA tekniğinin şematik gösterimi.

(A) Mikroplak üzerinde katı-faz adsorbe edilmiş antikor, (B) Antijen-antikor kompleksinin oluşumu, (C) Enzim etiketli ikinci antikorun birleşerek "sandviç" oluşturması, (D) Renk gelişimine sebep olan substratın eklenmesi (Reen, 1994).

ELISA bir dizi numuneden analitleri tespit etmek için kullanılan bir teşhis testidir. Biyolojik prosesleri tespit edip ölçebilir ve hızlı bir şekilde doğru sonuçlar verir. Teknolojinin gelişmesiyle giderek daha uygun maliyetli bir hale gelmektedir (Shah ve Maghsoudlou, 2016). Bu çalışmada da daha hassas ve doğru sonuçlar elde etmek amacıyla immunolojik ve antioksidan serum parametrelerinin tayininde "sandviç" ELISA yönteminden yararlanılmıştır.

3. YÖNTEM

3.1. Hayvanlar ve Deneme Periyodu

Çalışmada İstanbul Üniversitesi'nden Deney Hayvanları Etik Kurul Onayı alınan (No: 2017-22467), 9-15 aylık, 35 adet dişi/erkek Sprague Dawley ırkı sıçan kullanılmıştır. Araştırmanın deneysel kısmı Boğaziçi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi, Deneysel Hayvan Üretimi ve Bakım Birimi'nde yürütülmüştür. Sıçanların bakım ve beslenmeleri de aynı merkezde yapılmıştır. Sıçanlar 21 ˚C'de, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusunda, standart ticari sıçan yemi ve su ile *ad libitum* beslenmişlerdir.

3.1.1. Sıçanların Gruplara Ayrılması

Sıçanlar etiketlenmiş ve tesadüfi olarak yedişerli 5 gruba ayrılmışlardır. Biri kontrol olmak üzere diğer 4 gruba kapesitabin, β-glukan ve C vitamininin farklı kombinasyonları oral yöntemle verilmiştir. Tablo 3-1'de deneme grupları ve doz miktarları verilmektedir.

Tablo 3-1: Deneme grupları.

	Grup 1	**Grup 2**	**Grup 3**	**Grup 4**	**Grup 5**
Tween 20 (%10) (5 ml/kg/gün)	✓				
Kapesitabin (359 mg/kg/gün)		✓	✓	✓	✓
β-Glukan (100 mg/kg/gün)			✓		✓
C vitamini (100 mg/kg/gün)				✓	✓

3.1.2. Kapesitabin, β-Glukan ve C Vitamininin Hazırlanıp Sıçanlara Verilmesi

Tüm kimyasallar, % 10'luk Tween 20 (Sigma-Aldrich) çözeltisiyle birlikte sıçanlara gavaj yoluyla uygulanmıştır. Öncelikle her bir hayvanın tartımı yapılmıştır. Hayvanların ağırlıklarına göre, bireysel olarak verilecek doz miktarları belirlenmiştir. Kapesitabin (Xeltabin 500 mg film kaplı tablet, TEVA, Hindistan) havanda dövüldükten sonra, β-glukan (İmuneks 50 mg kapsül, Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş., İstanbul) kapsüllerinden çıkartıldıktan sonra, C vitamini (L-askorbik asit, Sigma-Aldrich, Almanya) ise olduğu gibi kullanılarak, hassas tartıda her bir bireyin günlük alacağı miktarlar tartılmış, etiketlenen tüplere konulmuş ve uygulamaya hazır hale getirilmiştir.

3.1.3. Kan Alımı

Tablo 3-1'de belirtildiği gibi gruplara kapesitabin, β-glukan ve C vitamini, 14 gün boyunca uygulanmıştır. 14. gün son dozlar da verildikten sonra, gün sonunda sıçanlardan kan alınmıştır. Kan alımı, sıçanlara anestezi uygulanmadan juguler venden kanatma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar, 21. gün sonuna kadar herhangi bir kimyasal verilmeksizin normal ortamlarında bakılmışlardır. 21. gün sonunda sıçanlar, isofluran verilerek uyutulmuştur. Kalpten kan alma yöntemi kullanılmış, tüm sıçanlar sakrifiye edilmiş ve çalışmanın deneme aşamasına son verilmiştir.

3.1.4. Kan Serumu Eldesi

Denemenin 14. ve 21. günlerinde kanlar alındıktan sonra, +4 ˚C'de buzdolabında 16 saat pıhtılaşmaları için bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda 2000 rpm'de 15 dakika süresince santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonunda kanların pelet kısmı dibe çökmüştür. Tüplerde şeffaf görünen supernatant kısım olan serumlar, mikropipet yardımıyla dikkatli bir şekilde pelet kısımla karışmadan, önceden etiketlenmiş ependorf serum saklama tüplerine alınmıştır. Farklı günlerde tekrar çalışılacağı ve dondur-çöz yapmamak için elde edilen serumlar, küçük miktarlara bölünerek saklama tüplerine paylaştırılmıştır. Hazırlanan serum örnekleri, kitlerle çalışılacağı güne kadar -80 C˚'de muhafaza edilmişlerdir.

3.2. Analiz Periyodu

Serumlar elde edildikten sonra, immunolojik ve antioksidan serum parametrelerindeki değişiklikleri gözlemlemek amacıyla, sırasıyla ELISA kitleri ile çalışılmıştır. Her uygulamanın sonunda analiz işlemleri, mikroplate okuyucu (Moleculer Devices, San Jose, CA) ile 450 nm'de optik dansite (OD) değerleri ölçülerek tamamlanmıştır.

3.2.1. Immunglobulin G ve İnterlökin-1β Tayinleri

Serumlarda IgG antikoru ve IL-1β sitokini tayinleri, Elabscience (Wuhan, China) firmasına ait Rat IgG ELISA (Kat. No: E-EL-R0518) ve Rat IL-1β ELISA (Kat. No: E-EL-R0012) kitleri kullanılarak yapılmıştır. Her iki kitin de çalışması Sandviç-ELISA prensibine dayanmaktadır. Antikor analizinde kullanılan plağın yüzeyi, sıçan serumunda tayin edilecek parametreye spesifik antikor ile kaplıdır. Standartlar veya numuneler mikroELISA plak kuyucuklarına eklenir ve spesifik antikor ile birleştirilir. Daha sonra sıçan serumunda tayin edilecek parametre ve Avidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikoru, her bir mikro plak kuyucuğuna art arda eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanır ve ardından substrat çözeltisi her bir kuyucuğa eklenir. Bu işlem sonunda sadece enzim-substrat reaksiyonunu içeren kuyucuklar mavi renkte görünür. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonu eklenerek sonlandırılır ve mavi renk sarıya dönüşür. OD, 450 nm'de spektrofotometrik yöntem ile ölçülür.

IgG ve IL-1β tayininde kullanılan kitlerin her biri, 96 kuyucuklu plak (1 adet), referans standart (2 adet), 100x konsantre biyotinlenmiş saptama solüsyonu (1x120 µl), 100x HRP konjugatı (1x120 µl), referans standart ve örnek sulandırma çözeltisi (1x20 ml), biyotinlenmiş saptama solüsyonu sulandırma çözeltisi (1x14 ml), HRP konjugatı sulandırma çözeltisi (1x14 ml), 25x yıkama tamponu (1x30 ml), substrat reaktifi (1x10 ml), stop solüsyonu (1x10 ml) içermektedir.

Test Prosedürü

1. Çalışmaya başlamadan 20 dakika önce kit, buzdolabından çıkartılarak bileşenlerin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır.

2. Aynı şekilde örnekler de oda sıcaklığına getirilmiş ve köpük olmaksızın iyice karıştırılmıştır.

3. Stok standart çözeltisi seyreltilerek, farklı konsantrasyonlarda standartlar hazırlanmıştır. Stok standart solüsyonundan seyreltme yapılarak;

    a. IgG için 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 ve 0 ng/ml olmak üzere 8 adet standart,

   b. IL-1β için 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ve 0 pg/ml olmak üzere 8 adet standart elde edilmiştir.

4. Kit'in analiz aralığı dışına çıkmamak için, literatürdeki bilgilerden yararlanılarak kullanılacak serumlara;

   a. IgG için 1:33 seyreltme,

   b. IL-1β için, 1:10 seyreltme uygulanmıştır.

5. Kit içerisindeki tüm solüsyonlara gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra hazırlanan standartlar, kör (standart ve örnek seyreltme solüsyonu) ve örnekler, 96'lık plak kuyucuklarına 100 µl olacak şekilde yüklenmiştir.

6. Plak, 37 C°'de 90 dakika süreyle inkübe edilmiştir.

7. İnkübasyon sonunda kuyucuklardan sıvılar çekilmiş ve 100 µl biotinlenmiş saptama solüsyonu eklenerek 37 C°'de 1 saat inkübe edilmiştir.

8. Sonraki aşamada plak kuyucukları aspire edilmiş ve yıkama tamponu ile 3 kere yıkanmıştır.

9. Plak kuyucuklarına 100 µl HRP konjugatı eklenmiş ve 30 dakika boyunca 37 C°'de inkübasyona bırakılmıştır.

10. Sonrasında kuyucuklar boşaltılmış ve yıkama tamponu ile 5 kere yıkanmıştır.

11. Yıkama sonrası kuyucuklara 90 µl substrat reaktifi eklenmiş ve 37 C°'de 15 dakika inkübe edilmiştir.

12. Son olarak plak kuyucuklarına 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulmuştur.

13. Zaman kaybetmeden kuyucukların 450 nm'de OD değeri ölçülmüştür.

3.2.2. Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutatyon Peroksidaz Tayinleri

Serumlarda CAT, SOD ve GPx antioksidan enzimlerinin tayinleri, SunRed (Shanghai,China) firmasına ait Rat CAT ELISA (Kat. No: 201-11-5106), Rat SOD ELISA (Kat. No: 201-11-0169) ve Rat GPx ELISA (Kat. No: 201-11-1705) kitleri kullanılarak yapılmıştır. Bu kitlerin her birinin çalışması, sandviç ELISA prensibine dayanmaktadır. Analizde kullanılacak plağın yüzeyi, sıçan serumunda tayin edilecek antikor enzimin monoklonal antikoru ile kaplıdır. Standartlar ve örnekler, mikroELISA plak kuyucuklarına eklenir ve inkübe edilir. Sonrasında bağışıklık kompleksi oluşturmak için, Streptavidin-HRP ile birleştirilmiş ve biotin ile etiketlenmis antioksidan enzim antikorları eklenir. İnkübasyon ve ardından birleşmemiş enzimleri ortadan kaldırmak için yıkama işlemi uygulanır. Kromojen çözeltileri A ve B'nin eklenmesiyle, sadece enzim-substrat reaksiyonu içeren kuyucukların rengi maviye dönüşür. Asidik stop solüsyonunun eklenmesiyle reaksiyon durdurulur ve mavi renk sarıya dönüşür. OD, 450 nm'de spektrofotometrik yöntem ile ölçülür.

CAT, SOD ve GPx antioksidan enzimlerinin tayininde kullanılan kitlerin her biri 96 kuyucuklu plak (1 adet), referans standart (1 adet), standart sulandırma çözeltisi (3 ml), Str-HRP-konjugat reaktifi (6 ml), 30x yıkama tamponu (20 ml), biotin işaretli antikor (1 ml), kromojen A solüsyonu (6 ml), kromojen B solüsyonu (6 ml) ve stop solüsyonu (6 ml) içermektedir.

Test Prosedürü

1. Çalışmaya başlamadan 30 dakika önce, kit buzdolabından çıkartılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır.

2. Aynı şekilde örnekler de oda sıcaklığına getirilmiş ve köpük yapmadan karıştırılmıştır.

3. Stok standart çözeltisi seyreltilerek, farklı konsantrasyonlarda standartlar hazırlanmıştır. Stok standart solüsyonundan seyreltme yapılarak;

    a. CAT için 320, 160, 80, 40, 20, 10 ve 0 ng/ml olmak üzere 7 adet standart,

    b. SOD için 128, 64, 32, 16, 8, 4 ve 0 ng/ml olmak üzere 7 adet standart,

c. GPx için 240, 120, 60, 30, 15, 7.5 ve 0 ng/ml olmak üzere 7 adet standart hazırlanmıştır.

4. Kit'in analiz aralığı dışına çıkmamak için literatürdeki bilgilerden yararlanılarak kullanılacak serumlara;

   a. CAT için 1:8 seyreltme,

   b. SOD için 1:500 seyreltme,

   c. GPx için 1:5.7 seyreltme uygulanmıştır.

5. Seyreltme işlemleri tamamlandıktan sonra standart kuyucuklarına 50 µl standart ve 50 µl Streptavidin-HRP eklenmiştir. Kör kuyucuğuna sadece 100 µl standart seyreltme çözeltisi eklenmiştir. Test kuyucuklarına ise 40 µl seyreltilmiş örnek, 10 µl enzim etiketli antikor ve 50 µl Streptavidin-HRP eklenmiştir. Böylece her kuyucukta 100 µl solüsyon olmuştur.

6. Plak, 37 C°'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

7. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki sıvılar boşaltılmış ve yıkama tamponu ile 5 kere yıkanmıştır.

8. Yıkama sonrası 50 µl kromojen A solüsyonu ve 50 µl kromojen B solüsyonu kör dahil her bir kuyucuğa eklenmiştir.

9. Plak, karanlık bir ortamda 37 C°'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

10. Ardından her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Bu aşamada mavi renk hızlıca sarıya dönüşmüştür.

11. OD değerleri, zaman kaybetmeden 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.2.3. Tümör Nekroz Faktör-α Tayini

Serumda TNF-α sitokini tayini için Affymetrix eBioscience (Vienna, Austria) firmasına ait Rat TNF alpha Platinum ELISA Kit'i (Kat. No: BMS622) kullanılmıştır. Bu kit, sandviç ELISA prensibine dayanmaktadır. Analizde kullanılacak 96'lık plağın kuyucukları, anti-sıçan TNF-α antikoru ile kaplıdır. Kuyucuklara yüklenen örneklerde ve standartlarda bulunan TNF-

α, kuyucuklardaki antikorlara bağlanır. Ardından kuyucuklara biyotin etiketli anti-sıçan TNF-α antikoru eklenir ve ilk antikor tarafından yakalanan TNF-α'ya bağlanır. İnkübasyon sonrası yıkama işlemi ile, bağlanmayan biyotin etiketli anti-sıçan TNF-α antikorları uzaklaştırılır. Reaksiyona eklenen Streptavidin-HRP, biyotin etiketli anti-sıçan TNF-α antikorlarına bağlanır. Bağlanmayan Streptavidin-HRP, yıkama ile kuyucuklardan uzaklaştırılır. HRP ile reaktif substrat çözeltisi kuyucuklara eklenir. Kuyucuklardaki TNF-α miktarı ile orantılı olarak, renkli bir ürün oluşur. Ortama asit eklenmesiyle reaksiyon durdurulur ve OD, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik yöntem ile ölçülür.

TNF-α sitokini tayininde kullanılan kit, 96 kuyucuklu antikor kaplı plak (1 adet), biotin işaretli anti-sıçan TNF-α poliklonal antikor (70 µl), Streptavidin-HRP (150 µl), liyofilize standart (2 şişe), örnek sulandırma çözeltisi (12 ml), 20x tahlil tamponu (5 ml), 20x yıkama tamponu (50 ml), substrat solüsyonu (15 ml) ve stop solüsyonu (15 ml) içermektedir.

Test Prosedürü

1. Örnekler ve standartlar kuyucuklara yüklenmeden önce kullanılacak tüm kuyucuklar, 400 µl yıkama tamponu ile iki kez yıkanmıştır.

2. Stok standart solüsyonundan seyreltme gradyanı yapılarak, 2500, 1250, 635, 312.5, 156.3, 78.1 ve 39.1 pg/ml olmak üzere 7 adet standart hazırlanmıştır ve kuyucuklara yüklenmiştir.

3. Kör kuyucuğuna 100 µl, serum koyulacak kuyulara ise 50 µl örnek sulandırma çözeltisi eklenmiştir.

4. Test kuyucuklarına her bir serum örneğinden 50 µl eklenmiştir.

5. Sonrasında bütün kuyucuklara 50 µl biyotin konjugatı eklenmiştir ve oda sıcaklığında 400 rpm'de mikroplak çalkalayıcısında 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

6. İnkübasyonun ardından yıkama tamponu ile 4 kere yıkama yapılmıştır.

7. Yıkama aşamasının ardından her bir kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP eklenerek, oda sıcaklığında 400 rpm'de mikroplak çalkalayıcısında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

8. İnkübasyon sonunda yıkama tamponu ile 4 kere yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

9. Tüm kuyucuklara 100 µl substrat solüsyonu eklenmiştir ve plağın yoğun ışığa direk maruz kalması engellenerek, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.

10. Reaksiyonu durdurmak için stop solüsyonu eklenerek, mikroplak okuyucuda 450 nm dalga boyunda OD değerleri ölçülmüştür.

450 nm dalga boyunda ölçülen OD'ler, her bir kitin standartlarına göre konsantrasyon değerlerine çevrilmiştir. Daha sonra bu değerler, her bir kit için kullanılan seyreltme faktörleri ile çarpılarak serumdaki gerçek konsantrasyonlara ulaşılmıştır.

3.3. İstatistiki Değerlendirme

ELISA sonucu elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadıklarını incelemek amacıyla, her bir immunolojik ve antioksidan serum parametresine ayrı ayrı istatistiki testler uygulanmıştır. Öncelikle her bir parametreye One-way varyans analizi (ANOVA) testi uygulanmıştır. Tek yönlü varyans analizi olarak da bilinen bu test, bağımsız grupların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığının test edilmesinde kullanılan bir araçtır (Sthle ve Wold, 1989). Bu test sonucunda, her bir parametrenin grupları arasında anlamlı farklılıklara bakılmıştır. Daha sonra 14. ve 21. günde gruplardan elde edilen veriler, her haftanın kendi grupları arasında çoklu karşılaştırma testi olan Tukey testi ile istatistiki olarak incelenmiştir. Değerler, birbirleri arasında anlamlı veya anlamsız farklılıklarına göre harflendirilerek, uygun istatistiki tablolar hazırlanmıştır. Son olarak, Student'ın t testinden yararlanılarak her iki hafta birbiriyle karşılaştırılmış ve istatistiki açıdan incelenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmadaki her bir parametre için elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmaktadır. Tüm grafikler, her bir grup içinde 2 ayrı kan alımının Student'ın t testi yoluyla istatistiki olarak birbiri ile karşılaştırılmasını göstermektedir. Grafiklerde 14. günün verileri koyu renkli sütun ile, 21. günün verileri açık renkli sütun ile gösterilmiştir. Ayrıca ortalamaların standart hataları da grafikler üzerinde belirtilmiştir.

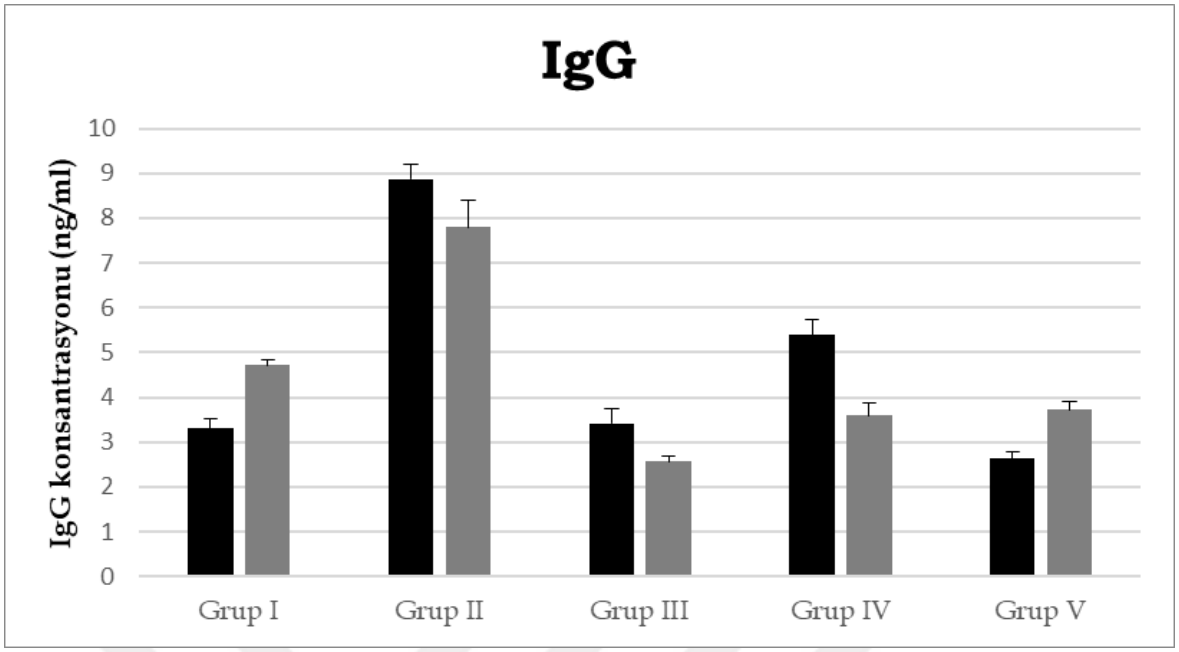
Her bir kan alım gününde 5 grubun birbiri ile one-way ANOVA testi yoluyla istatistiki olarak karşılaştırılması, tablolar halinde sunulmaktadır. Grupların açıklamaları Tablo 4-1'de verilmektedir.

Tablo 4-1: Grupların açıklaması.

Grup I	Kontrol grubu.
Grup II	Kapesitabin verilen sıçanlar.
Grup III	Kapesitabin ve β-glukan verilen sıçanlar.
Grup IV	Kapesitabin ve C vitamini verilen sıçanlar.
Grup V	Kapesitabin, β-glukan ve C vitamini verilen sıçanlar.

4.1. İmmunglobulin G

Serum IgG konsantrasyonları yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması Şekil 4-1'de gösterilmektedir. 5 grupta da iki kan alımı arasında IgG düzeylerinde anlamlı değişiklikler saptanmamıştır.



Şekil 4-1: Serum immunglobulin G (IgG) konsantrasyonları yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması.

Serum IgG konsantrasyonları yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması Tablo 4-2'de gösterilmektedir. Serum IgG konsantrasyonları 14. kan alım gününde kapesitabin verilen Grup II'de diğer gruplardan anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur. 21. günde ise konsantrasyonlar kapesitabin verilen Grup II'de kontrol grubu hariç diğer 3 gruptan anlamlı ölçüde daha yüksek saptanmıştır. 21. günde kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunamamıştır.

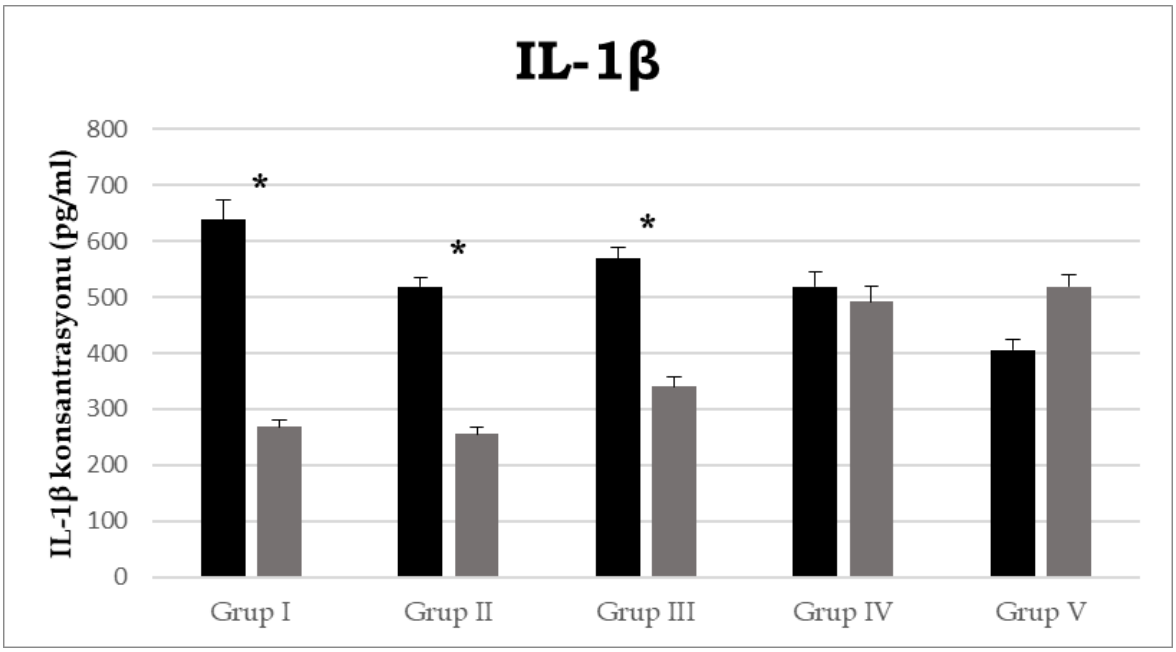
Tablo 4-2: Serum immunglobulin G konsantrasyonları (ng/ml) yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması (n=7).

Gün/Grup	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
14. gün	3.30 ± 1.32^{a}	8.87 ± 2.27^{b}	3.42 ± 1.86^{a}	5.39 ± 1.75^{a}	2.63 ± 1.14^{a}
21. gün	4.71 ± 0.53^{ab}	7.80 ± 3.56^{a}	2.56 ± 0.94^{b}	3.59 ± 2.11^{b}	3.73 ± 1.39^{b}

Ortalama ± Standart sapma.
Aynı satırdaki farklı harfler (a,b), gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

4.2. İnterlökin-1β

Serum IL-1β konsantrasyonları yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması Şekil 4-2'de gösterilmektedir. Kontrol, Grup II ve Grup III'de 14. günün serum IL-1β konsantrasyonları, 21. günden anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 4-2: Serum interlökin-1β (IL-1β) konsantrasyonları yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması.

Serum IL-1β konsantrasyonları yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması Tablo 4-3'de gösterilmektedir. Kemoterapinin 14. gününde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptanamamıştır. 21. günde Grup IV ve Grup V'deki IL-1β düzeyleri, Grup I ve II'den anlamlı ölçüde yüksek bulunurken, Grup I, II ve III arasındaki IL-1β düzeyleri, anlamlı ölçüde farklı bulunamamıştır.

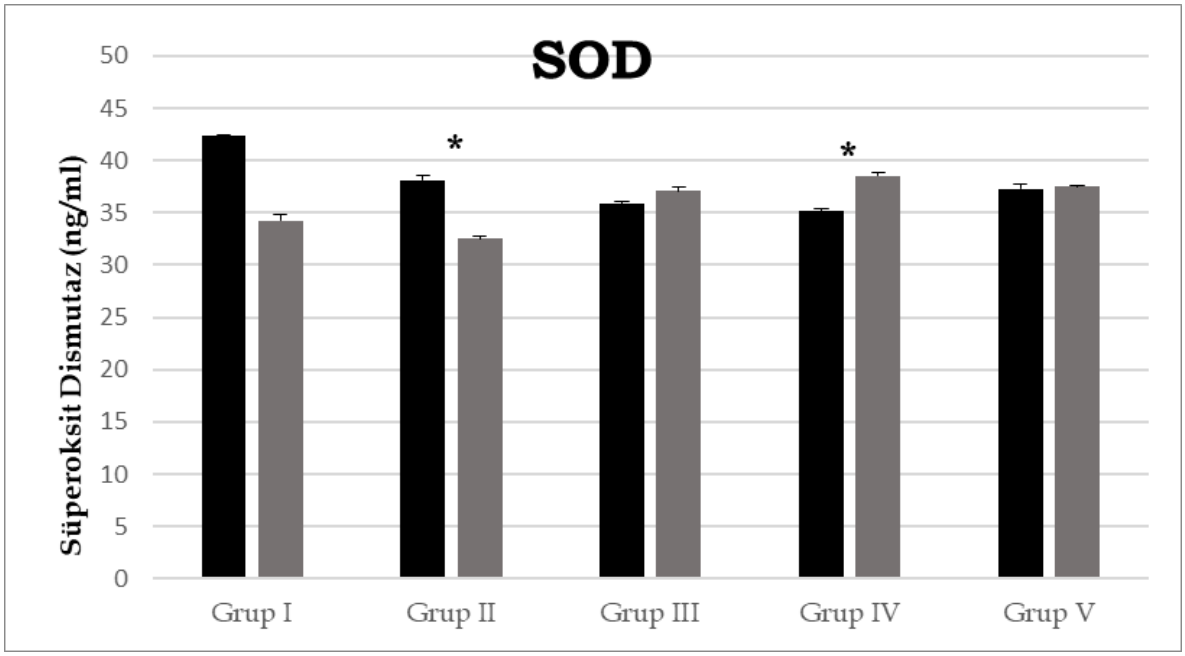
Tablo 4-3: Serum interlökin-1β konsantrasyonları (pg/ml) yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması (n=7).

Gün/Grup	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
14. gün	638 ± 181.0	518 ± 82.3	568 ± 103.4	518 ± 136.5	405 ± 95.27
21. gün	268 ± 66.4[a]	255 ± 58.5[a]	340 ± 89.7[ac]	491 ± 135.9[bc]	518 ± 122.8[b]

Ortalama ± Standart sapma.
Aynı satırdaki farklı harfler (a,b,c), gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

4.3. Süperoksit Dismutaz

Serum SOD aktiviteleri yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması Şekil 4-3'de gösterilmektedir. Grup II'de 14. günün, Grup IV'de ise 21. günün SOD aktiviteleri, diğer kan alımından anlamlı derecede daha yüksek saptanmıştır.



Şekil 4-3: Serum süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması.

Serum SOD aktiviteleri yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması Tablo 4-4'de gösterilmektedir. 14. kan alım gününde, Grup III, IV ve V'deki SOD aktiviteleri, Grup I ve II'den anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır. 21. günde ise, sadece kapesitabin verilen Grup II'deki düzeyler, kontrol grubu hariç diğer gruplardan anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır.

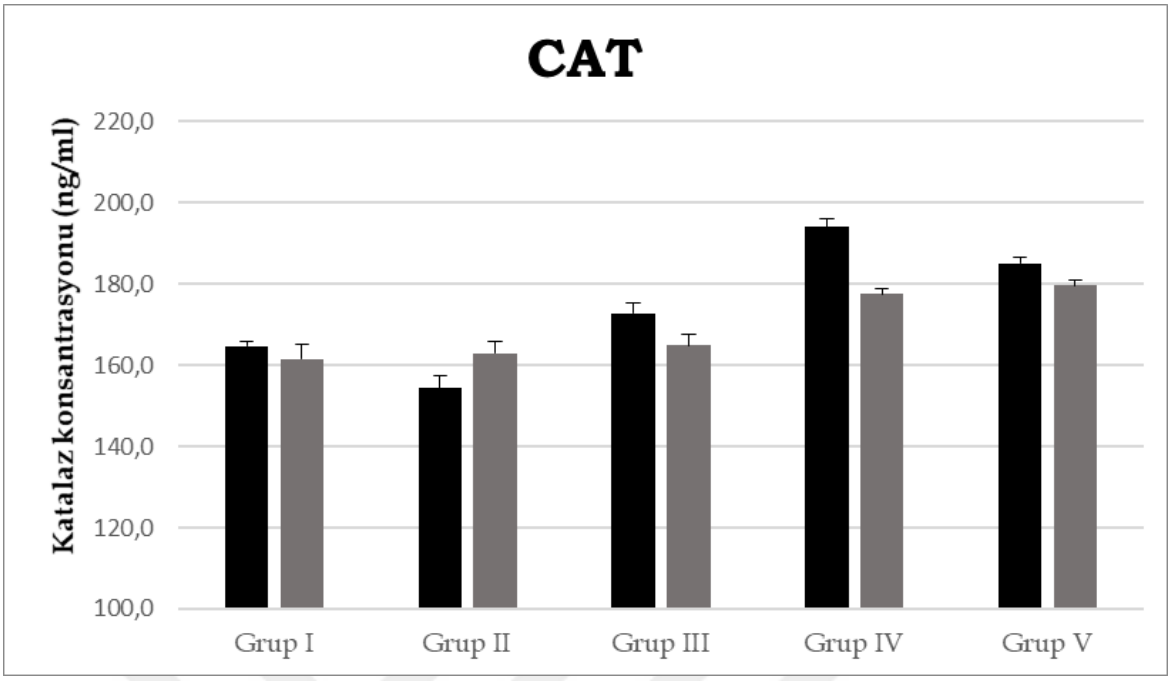
Tablo 4-4: Serum süperoksit dismutaz aktiviteleri (ng/ml) yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması (n=7).

Gün/Grup	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
14. gün	42.3 ± 1.33^{a}	38.1 ± 3.58^{ab}	35.8 ± 2.39^{b}	35.1 ± 2.18^{b}	37.3 ± 4.70^{b}
21. gün	34.2 ± 4.16^{ab}	32.5 ± 2.22^{a}	37.0 ± 3.36^{b}	38.5 ± 1.90^{b}	37.4 ± 1.51^{b}

Ortalama ± Standart sapma.
Aynı satırdaki farklı harfler (a,b), gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

4.4. Katalaz

Serum CAT aktiviteleri yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması Şekil 4-4'de gösterilmektedir. Gruplardaki 14. ve 21. gün arası CAT aktivitelerindeki karşılaştırılmaların istatistiksel olarak anlam taşımadığı saptanmıştır.



Şekil 4-4: Serum katalaz (CAT) aktiviteleri yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması.

Serum CAT aktiviteleri yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması Tablo 4-5'de gösterilmektedir. Çalışmanın 14. gününde serum CAT aktiviteleri, kapesitabin verilen Grup II'de Grup IV ve V'den anlamlı ölçüde daha düşük saptanırken, Grup IV'deki düzeyler, kontrol grubundan (Grup I) anlamlı ölçüde yüksek saptanmıştır. 21. gün ise gruplar arasındaki CAT aktiviteleri, anlamlı ölçüde farklı bulunamamıştır.

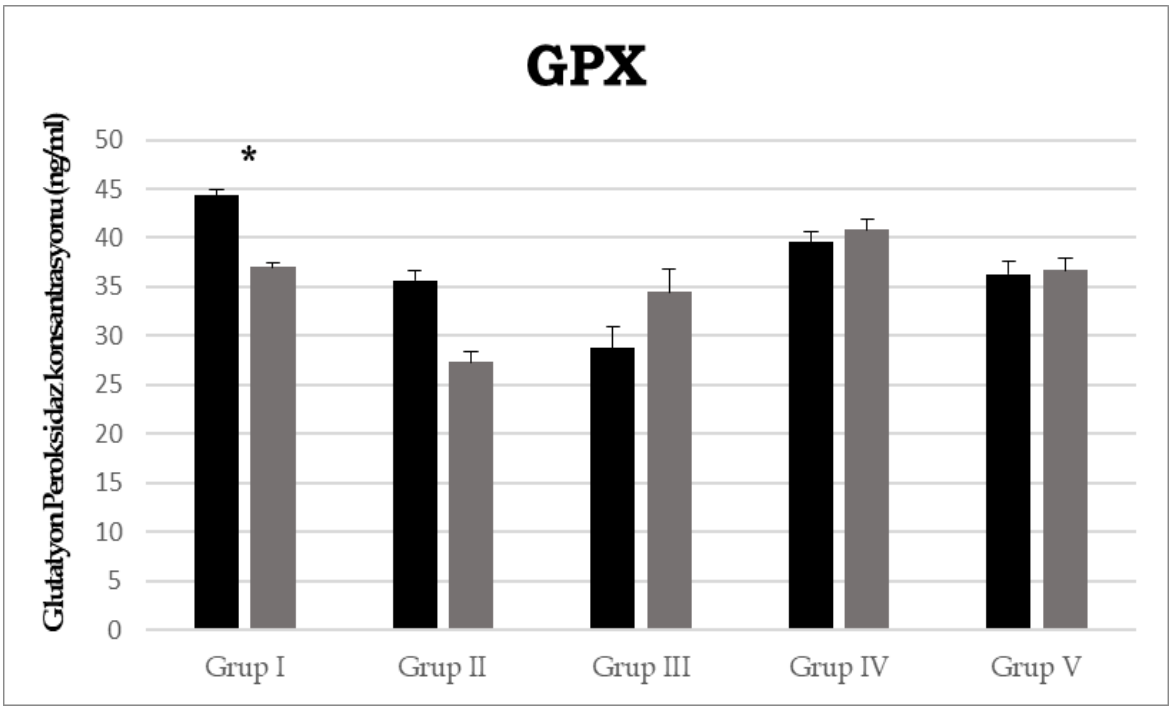
Tablo 4-5: Serum katalaz aktiviteleri (ng/ml) yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması (n=7).

Gün/Grup	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
14. gün	164.7 ± 6.2^{bc}	154.3 ± 20.2^{c}	$172,8 \pm 14.9^{ac}$	194.0 ± 16.5^{a}	185.0 ± 14.4^{ab}
21. gün	161.6 ± 28.2	163.0 ± 22.9	164.9 ± 20.3	177.5 ± 10.3	179.6 ± 14.5

Ortalama ± Standart sapma.
Aynı satırdaki farklı harfler (a,b,c), gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

4.5. Glutatyon Peroksidaz

Serum GPx aktiviteleri yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması Şekil 4-5'de gösterilmektedir. Sadece kontrol grubu olan Grup I'de 14. gündeki serum GPx aktiviteleri, 21. gündeki düzeylerden anlamlı ölçüde daha yüksektir.



Şekil 4-5: Serum glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması.

Serum GPx aktiviteleri yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması Tablo 4-6'da gösterilmektedir. Çalışmanın 14. günündeki kan alımında kontrol grubu (44.3 ± 2.64 ng/ml) ile Grup III (28.7 ± 11.34 ng/ml) arasında serum GPx aktivitelerinde istatistiki açıdan anlamlı farklılık saptanmıştır. Diğer gruplar arasında ise anlamlı farklılıklar bulunamamıştır. Benzer şekilde 21. günkü kan alımında da gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılıklar saptanamamıştır.

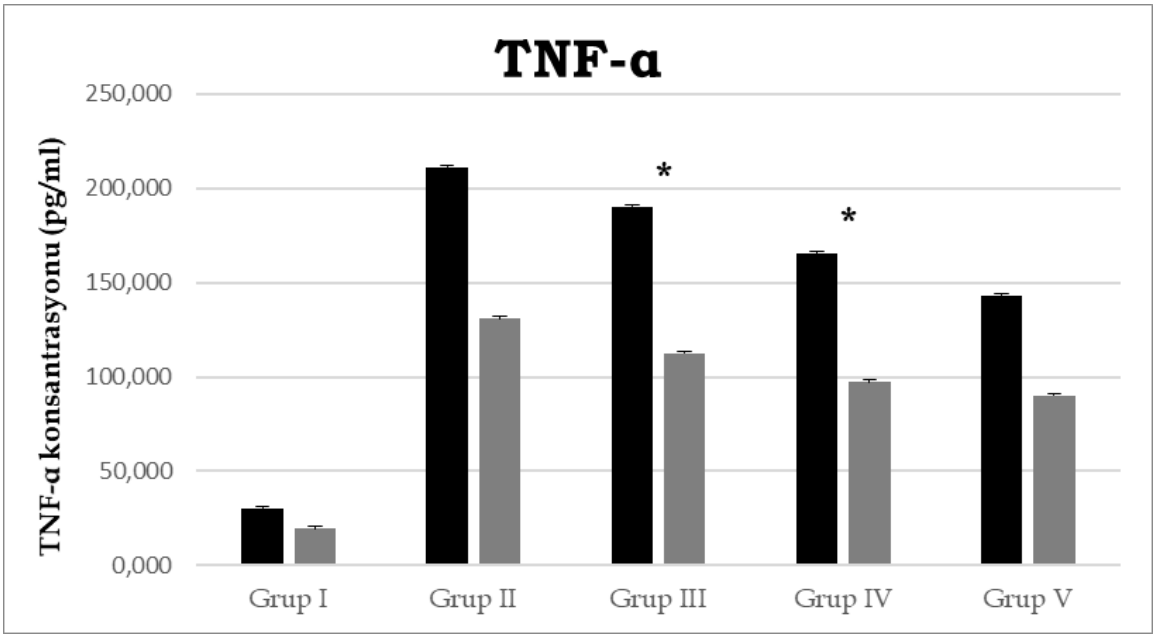
Tablo 4-6: Serum glutatyon peroksidaz aktiviteleri (ng/ml) yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması (n=7).

Gün/Grup	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
14. gün	44.3 ± 2.64[a]	35.6 ± 5.18[ab]	28.7 ± 11.34[b]	39.5 ± 5.37[ab]	36.3 ± 6.21[ab]
21. gün	37.0 ± 6.38	27.2 ± 16.35	34.4 ± 9.51	40.8 ± 9.37	36.7 ± 10.12

Ortalama ± Standart sapma.
Aynı satırdaki farklı harfler (a,b), gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

4.6. Tümör Nekroz Faktör-α

Serum TNF-α konsantrasyonları yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması Şekil 4-6'da gösterilmektedir. Grup III ve Grup IV'ün 14. gündeki serum TNF- α aktiviteleri, 21. gündekinden anlamlı derecede daha yüksek saptanmıştır.



Şekil 4-6: Serum tümör nekroz faktör-α (TNF-α) konsantrasyonları yönünden her bir grup içinde 2 kan alım gününün birbiri ile karşılaştırılması.

Serum TNF-α konsantrasyonları yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması Tablo 4-7'de gösterilmektedir. Çalışmanın 14. ve 21. günlerinde TNF-α konsantrasyonları, kontrol grubunda (Grup I) diğer gruplardan anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır. Diğer gruplar arasında ise anlamlı farklılıklar saptanamamıştır.

Tablo 4-7: Serum tümör nekroz faktör-α (pg/ml) konsantrasyonları yönünden her bir kan alımı içinde 5 grubun birbiri ile karşılaştırılması (n=7).

Gün/Grup	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
14. gün	30.2 ± 13.6^{a}	211.2 ± 64.8^{b}	190.0 ± 30.6^{b}	165.1 ± 42.4^{b}	143.2 ± 47.7^{b}
21. gün	19.6 ± 12.0^{a}	130.8 ± 37.7^{b}	112.5 ± 43.6^{b}	97.2 ± 24.0^{b}	90.1 ± 16.9^{b}

Ortalama ± Standart sapma.
Aynı satırdaki farklı harfler (a,b), gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA

En etkili kanser tedavilerinden biri olan kemoterapinin immun baskılayıcı özelliği bilinmektedir. Bu nedenle kemoterapinin yanında bağışıklık sistemini destekleyecek ek tedavi yöntemlerine başvurulmaktadır. Serbest radikaller, DNA ve kromozomların parçalanmasına sebep oldukları gibi aynı zamanda istenilmeyen onkogen aktivasyonuna da katkıda bulunabilirler. Kapesitabin gibi pek çok kemoterapi ilacı, metabolik aktiviteleri sonucu ortama serbest radikaller vermektedirler. Bağışıklık sisteminin ROS'ne karşı savunma mekanizmasının ikincil savunması, varolan ROS'un taşınmasını ve devre dışı bırakılmasını içerir. SOD, CAT, GPx gibi enzimler, antioksidan enzimler olarak bilinir ve ROS'lara karşı ikincil savunmanın içinde yer alırlar (Kaya ve ark., 2005).

Yapılan bir çalışmada kemoterapi uygulanan sıçanlarda SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinde önemli derecede azalma gözlenirken kapesitabin (500 mg/kg oral yolla) uygulanan yetişkin erkek wistar sıçanlarda bu antioksidan enzimlerin aktivitesinde daha da azalma meydana gelmiştir (Rtibi ve ark., 2018). Bir başka çalışmada ise Wistar cinsi sıçanlarında 30 mg/kg kapesitabinin oral yolla uygulanması ile SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde (sırasıyla % 46.46, % 44.67 ve % 28.16) azalma meydana gelirken, antioksidan kullanımı sonucunda kapesitabinin antioksidan enzim aktivitesi üzerinde neden olduğu negatif etki azaltılmıştır (Olayinka ve ark., 2017). Benzer biçimde başka bir antikanser ilacı olan cisplatin uygulanması nedeniyle meydana gelen SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerindeki azalma, C vitamini takviyesi ile yükseltilmeye çalışılmıştır. Erkek Swiss Albino farelerinde 250 mg/kg C vitamini uygulanması ile bu enzimlerin aktivitelerinde herhangi bir değişim gözlenmezken, 500 mg/kg olarak uygulanan C vitamini ve cisplatin kombinasyonu ile her enzimin aktivitesinde artış meydana gelmiştir (Ajith ve ark., 2007).

Bu çalışmada C vitamini takviyesi alan gruplarda CAT ve GPx konsantrasyonları, diğer kapesitabin alan gruplara göre daha yüksek ölçülmüştür. Bir antioksidan olan C vitamininin, kemoterapiye rağmen bu enzimlerin üretimi üzerinde pozitif etkisi olduğu görülmektedir. C vitamini kadar olmasa da β-glukan takviyesi alan grupta CAT konsantrasyonu, negatif kontrol olan sadece kapesitabin alan gruba göre daha yüksek saptanmıştır. Ancak GPx üzerinde aynı etki görülememiştir. Bu çalışmada immun destekleyici β-glukan ve C vitamininin, SOD

üzerinde 14. günde herhangi bir olumlu ya da olumsuz etkisi gözlenmemiştir. Ancak kemoterapi ve takviyelerin kesilmesinden bir hafta sonra takviye alan grupların SOD düzeyleri, sadece kapesitabin alan gruba göre anlamlı şekilde yüksek ölçülmüştür. Görülüyor ki β-glukan ve C vitamini takviyesinin kapesitabinin kesilmesinden sonra sıçanların normal SOD düzeylerine ulaşmasında önemli bir etkisi vardır.

Yapılan bir çalışmada yüksek doz C vitamininin (1.25-20 mM) kanser önleyici maddelerle (eribulin mesilat, tamoksifen (TAM), fulvestrant veya trastuzumab) proapoptotik etkileri, çeşitli meme kanseri hücre hatlarının (MCF-7, SK-BR3 ve MDA-MB-231) yanı sıra normal meme epitel hücreleri (MCF10A) üzerinde incelenmiştir. Yüksek doz C vitamini (≥10 mM), tüm meme kanseri hücre hatlarında, özellikle MCF-7 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır. MCF-7 ve MDA-MD-231 hücrelerinin CAT aktiviteleri ise, MCF10A hücrelerininkinden daha düşük olmuştur. Ayrıca yüksek doz C vitamini ve eribulin mesilat birleştirildiğinde, hem MCF-7 hem de MDA-MD-231 hücrelerinin hücre canlılığı daha da azalmıştır. Aynı şekilde C vitamini TAM veya fulvestrant ile birleştirildiğinde, yine MCF-7 hücrelerinin canlılığında azalma görülmüştür. SK-BR3 hücreleri üzerinde ise, yüksek doz C vitamini ile trastuzumab kombinasyonu etkili olmuştur (Lee ve ark., 2019). Bu nedenle yüksek doz C vitamini ile konvansiyonel anti-kanser ilaçları kombinasyonunun, meme kanseri hücrelerine karşı terapötik avantajları olacağı düşünülmektedir.

Bir diğer anti-kanser ilacı olan MTX, kanser tedavilerinde kullanıldığında karaciğer ve böbrek hasarlarına neden olmaktadır. MTX'ın indüklediği sitotoksisite ise, oksidatif stresin ve kaspaz aktivasyonunun artması ile ilişkilidir. MTX uygulanması ile artan H_2O_2 ve kaspaz-9/-3 aktivasyonu, hepatoselüler karsinoma Hep3B hücrelerinde hücre ölümüne neden olmaktadır. Çalışmada 0.01 μM MTX ile kombine edilen 5 μM C vitamini sitotoksik etkiyi arttırırken, 10 μM MTX uygulanan hücrelerdeki sitotoksisite üzerinde C vitamininin hiç bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Yiang ve ark., 2014). Bu da C vitamininin, sadece düşük dozda uygulanan antikanser ilaçları üzerinde etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer yandan β-glukanın antikanser ilaçları ile birlikte kullanımı, antitümör ve antimetastazik etkiye neden olabilmektedir. Sisplatin ile tedavi edilen farelerde vücut ağırlığı, dalak ağırlığı ve makrofajlar ile doğal öldürücü hücreler gibi immunkompetan hücrelerin sayısındaki azalmaların, β-glukan kombinasyonu (8.0 mg/kg/gün, intraperitoneal) ile önüne geçildiği görülmüştür. β-glukan ayrıca splenositler tarafından IL-12p70 üretimini indükleyerek,

sisplatin ile tedavi edilen farelerde NK hücre aktivitesinin artmasına neden olmuştur. Splenositlerde GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IFN-y ve IL-12, p40'ın mRNA ifadesini önemli ölçüde arttırarak etkisini göstermiştir. Ayrıca β-glukan ile tedavi renal tubuler hücrelerin, serum kreatinin düzeyinde, nekrozda ve apoptozda artışların eşlik ettiği sisplatin kaynaklı nefrotoksisitesini önemli ölçüde azaltmıştır (Masuda ve ark., 2009). Sıçanlarda bortezomibin karaciğer parametreleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi amacıyla β-glukan ile birlikte kullanımı (75 mg/kg, intraperitoneal), endojen SOD aktivitesinin aşırı uyarılması ile sonuçlanırken, lipid peroksidasyon düzeyindeki değişikliğin normalizasyonuna neden olmuştur. Ayrıca β-glukanın NF-kB yoluyla Kupffer hücre aktivasyonunu ve non-spesifik reaktif hepatitit gelişimini regüle ederek, sıçan karaciğerinde bortezomibin neden olduğu geri döndürülebilir doku hasarında etkili olduğu görülmüştür (Keleş ve ark., 2014).

Önemli ve en çok çalışılan antikorlardan biri olan IgG konsantrasyonları incelendiğinde, kemoterapi sonunda sadece kapesitabin verilen Grup II'de en yüksek konsantrasyon saptanmıştır. Kemoterapinin belirgin şekilde etkisi görülmektedir. β-glukan ve C vitamini takviyesi alan gruplarda ise, kontrol grubuna çok yakın değerler elde edilmiştir. Kanser hastalarıyla yapılan bazı çalışmalarda kemoterapi sırasında ve kemoterapiden bir hafta sonrasında, IgG konsantrasyonlarında düşüşler görülmüştür (Cui ve ark., 2020).

Literatürdeki çalışmaların aksine bu çalışmada sadece kapesitabin alan grupta yüksek IgG konsantrasyonu gözlenirken, kontrol grubu ve diğer gruplarda daha düşük IgG konsantrasyonları saptanmıştır. Bunun sebebi bizce, literatürdeki çalışmaların çok büyük kısmının zaten tümörle savaşan denekler üzerinde yapılmasına karşın, bu çalışmanın deney düzeneğinin sağlıklı sıçanlar üzerine kurulmasıdır. Sağlıklı bireylerde de bir antikor olan IgG'nin zaten düşük olması beklenmektedir. Ancak kemoterapinin yan etkilerinden olan diare, iştah kaybından kaynaklı besin yetersizliği ve karaciğer hasarı, IgG konsantrasyonlarının vücutta artmasına sebep olur (Fischbach ve Dunning, 2009). Kemoterapiden kaynaklı baskılama olmasına rağmen, Grup II'de kontrol gruplarından yüksek serum IgG seviyelerinin saptanması beklenen bir sonuçtur. Ancak kapesitabinin yanında β-glukan ve C vitamini takviyesi alan gruplarda kontrol grubuna çok yakın değerler gözlenmiştir. Bunun sebebi Grup III, IV ve V'in, sadece kemoterapi tedavisi alan Grup II'ye göre çalışmayı daha sağlıklı tamamlamış olmaları olabilir. Bu gruplardakiler, kemoterapiden kaynaklı yan etkileri bertaraf etmiş olabilirler. Bu sebeple IgG seviyelerinde yükselme gözlenmemiş olabilir.

Çalışmada IL-1β ve TNF-α sitokinlerinin konsantrasyonları incelendiğinde, her iki sitokinde de farklı sonuçlar elde edilmiştir. Kemoterapi sonrası IL-1β konsantrasyonları kontrol grubuna göre daha düşük gözlenirken, TNF-α değerinde ise belirgin şekilde yüksek konsantrasyon gözlenmiştir. Sitokinlerin cevapları zamana ve doza bağımlı olduğundan, farklılık gösterebilirler. Topuz ve ark. (2008)'ın yaptığı çalışmada olduğu gibi IL-1β ve TNF-α konsantrasyonlarındaki değişiklikler birbirleriyle uyumlu olmayabilir.

IL-1β, inflamatuvar sinyallere yanıt olarak çok sayıda farklı immun ve immun olmayan hücre tipi tarafından üretilir ve salınır. Ayrıca yaygın olarak ateş, titreme, miyalji ve baş ağrısına neden olduğu gösterilmiştir. Pek çok çalışmada kemoterapi ile birlikte serum sitokinlerinin yükseldiği gözlenmiştir. Ancak bu çalışmada, diğer çalışmaların aksine kapesitabin alan gruplarda IL-1β konsantrasyonları kontrol grubuna göre bir miktar daha düşük gözlenmiştir. Bu durum Pusztai ve ark. (2004)'ın bulduğu sonuçlarla uyumludur. Pusztai ve ark. (2004)'ın yaptığı çalışmada, kemoterapi sonrası her bir sitokin kendine özgü değişiklikler göstermiştir. Araştırıcılar, sitokinlerin indüksiyon kinetiklerinin farklı olmasından kaynaklı 5-FU ile pik değişikliklerin, görülenden daha erken veya daha geç meydana gelebileceğini, bu yüzden optimum örnekleme zamanının her sitokin için farklı olabileceğini savunmuşlardır.

Elde edilen verilerden, ayrı ayrı β-glukan ve C vitamini takviyesi alan gruplarda baskılamanın önüne geçilemediği sonucuna varılmıştır. Kemoterapiden bir hafta sonra ise, IL-1β konsantrasyonlarının kontrol grubunda, sadece kapesitabin alan grupta ve kapesitabin yanında β-glukan takviyesi alan grupta düştüğü gözlenmektedir. Kontrol grubundaki ilk iki haftalık yükselişin sebebi, herhangi bir takviye almasalar da gavajdan kaynaklı strese bağlı olabilir. Sonraki haftada, sıçanlar normal yaşamlarına devam ettikleri ve herhangi bir strese maruz kalmadıkları için, sitokin değerleri normal seviyeye düşmüş olabilir. Ancak beklenenin ötesinde, sadece C vitamini ve hem β-glukan hem de C vitamini takviyesi alan gruplarda kemoterapi sonrası dinlenme döneminde, IL-1β düzeylerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Bunun sebebi, verilen takviyelerin IL-1β salınımını indüklemesi ve bir süre bu etkinin vücutta devam etmesinden kaynaklı olabilir. Bunun yanı sıra, farklı sitokin salınımlarının yaş, cinsiyet gibi bireysel farklılıklardan da kaynaklanmış olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Kanser gibi pek çok hastalıktan kaynaklanan kronik inflamasyonlarda önemli bir role sahip sitokinlerden biri de TNF-α'dır. Bu çalışmada beklenildiği gibi, sağlıklı kabul edilen

kontrol grubunda anlamlı şekilde diğer gruplara kıyasla oldukça düşük TNF-α konsantrasyonları elde edilmiştir. Kontrol grubunda 14. günde saptanan 30.23 ± 13.64 pg/ml değeri ise, gavaj kaynaklı stres ile oluşmuş olabilir. Diğer gruplarda kapesitabinden kaynaklanan inflamasyon sebebiyle, yüksek TNF-α konsantrasyonlarına ulaşılmıştır. Ancak, kapesitabin yanında β-glukan ve C vitamini takviyesi verilen gruplar ile sadece kapesitabin alan grup arasında anlamlı bir farklılığa ulaşılamamıştır. 21. gün ölçümleri, 14. gün kapesitabin ve takviyelerin verilmesinin kesilmesinin ardından, inflamasyon ve stresin azalması ile tüm gruplarda TNF-α konsantrasyonlarının beklenildiği gibi düştüğünü göstermektedir. Fakat 21. gün verilerinde de β-glukan ve C vitamini takviyelerinin, TNF-α konsantrasyonu düşüşlerinde anlamlı bir etki yarattığı sonucuna ulaşılamamıştır.

Farklı dozlarda C vitamininin TNF-α üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, MCF-7 insan meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Çalışmada meme kanserinde kullanılan seçici östrojen reseptör modülatörü olan TAM, MCF-7 hücrelerine ve sağlıklı hücrelere verilmiş ve sonrasında, 50 μM ve 500 μM C vitamini takviyesi yapılarak hücrelerdeki TNF-α mRNA ifadeleri incelenmiştir. TAM verilen hücreler ile kontrol hücreleri karşılaştırıldığında, TNF-α'nın mRNA ifadelerinin TAM verilen hücrelerde önemli derecede arttığı görülmüştür. Kontrol hücrelerine göre TAM verilen hücrelerde TNF-α'nın mRNA ifadesi, 351 kat artmıştır. Araştırmada C vitamininin TNF-α'nın mRNA ifadesi üzerindeki etkisini incelemek için hücreler, 30 dak. süreyle C vitamini ile inkübe edilmiş, sonrasında TAM verilmiş ve 24 saat sonra TNF-α'nın mRNA ifadesi seviyelerine bakılmıştır. C vitamini ile inkübasyon yapılan hücrelerde TNF-α'nın mRNA ifadeleri, diğer hücrelere göre düşük saptanmıştır. Bu düşüş 50 μM C vitamini ile inkübe edilen hücrelerde çok açık olmasa da, 500 μM C vitamini ile ön inkübasyon yapılan hücrelerde % 67.5 oranında çok net şekilde TNF-α'nın mRNA ifadesinin düştüğü gözlenmiştir. Kemoterapinin yanında tamamlayıcı olarak kullanılan C vitamininin dozunun arttırılmasıyla, kemoterapi kaynaklı yan etkilerin önüne geçilebileceği sonucuna varılmıştır (Subramani ve ark., 2014).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, pek çok yapılan çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da kemoterapinin immun baskılayıcı özelliği, antioksidan enzimlerin seviyelerinde beklenildiği gibi belirli düşüşlere sebep olmuştur. Kemoterapinin başlangıcından 14 gün sonra sadece kapesitabin alan grupların enzim konsantrasyonları, konrol gruplarına kıyasla daha düşük saptanmıştır. Görünen o ki kemoterapi, antioksidan enzimlerin hepsinin üretimini baskılarken, bu durum bazı sitokinler ve antikorlar için farklı olmuştur. β-glukan, C vitamini ve her ikisinin kombinasyonuyla yapılan terapinin de, her parametre için farklı etkiler gösterdiği ya da belirli bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

Aggarwal, A., & Upadhyay, R. (2013). Heat stress and immune function. Chapter in *Heat Stress and Animal Productivity* (pp. 113-136). Springer, India.

Ajani, J. (2006). Review of capecitabine as oral treatment of gastric, gastroesophageal, and esophageal cancers. *Cancer, 107*(2), 221-231.

Ajith, T. A., Usha, S., & Nivitha, V. (2007). Ascorbic acid and α-tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. *Clinica Chimica Acta, 375*(1-2), 82-86.

Akdis, M., Aab, A., Altunbulakli, C., Azkur, K., Costa, R. A., Crameri, R., ... & Akdis, C. A. (2016). Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β, and TNF-α: receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 138*(4), 984-1010.

Akramienė, D., Kondrotas, A., Didžiapetrienė, J., & Kėvelaitis, E. (2007). Effects of ß-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas), 43*(8), 597-606.

Al-Dasooqi, N., Sonis, S. T., Bowen, J. M., Bateman, E., Blijlevens, N., Gibson, R. J., ... & Lalla, R. V. (2013). Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Supportive Care in Cancer, 21*(7), 2075-2083.

Annels, N. E., Shaw, V. E., Gabitass, R. F., Billingham, L., Corrie, P., Eatock, M., ... & Middleton, G. (2014). The effects of gemcitabine and capecitabine combination chemotherapy and of low-dose adjuvant GM-CSF on the levels of myeloid-derived suppressor cells in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 63(2), 175-183.

Antonia, S. J., Mirza, N., Fricke, I., Chiappori, A., Thompson, P., Williams, N., ... & Gabrilovich, D. I. (2006). Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research, 12*(3), 878-887.

Atasayar, S., Gürer-Orhan, H., Orhan, H., Gürel, B., Girgin, G., & Özgüneş, H. (2009). Preventive effect of aminoguanidine compared to vitamin E and C on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology, 61*(1), 23-32.

Bayır, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine, 33*(12 Suppl), S498-S501.

Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O., Burton, G. W., & Wayner, D. D. M. (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine, 2*(2), 419-444.

Bendich, A., & Langseth, L. (1995). The health effects of vitamin C supplementation: a review. *Journal of American College of Nutrition, 14*(2), 124-136.

Bent, R., Moll, L., Grabbe, S., & Bros, M. (2018). Interleukin-1beta-a friend or foe in malignancies? *International Journal of Molecular Sciences, 19*(8), 2155.

Blondet, N. M., Messner, D. J., Kowdley, K. V., & Murray, K. F. (2018). Mechanisms of hepatocyte detoxification. Chapter 43 in *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Sixth Ed., Ed. H. M. Said) (pp. 981-1001). Academic Press.

Brocker, C., Thompson, D., Matsumoto, A., Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2010). Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Human Genomics, 5*(1), 30-55.

Calder, P. C. (2013). Feeding the immune system. *Proceedings of Nutrition Society, 72*(3), 299-309.

Carballo, E., Lai, W. S., & Blackshear, P. J. (1998). Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-α production by tristetraprolin. *Science, 281*(5379), 1001-1005.

Carr, A. C., Vissers, M. C. M., & Cook, J. (2014a). Relief from cancer chemotherapy side effects with pharmacologic vitamin C. *New Zealand Medical Journal, 127*(1388), 66-70.

Carr, A. C., Vissers, M. C. M., & Cook, J. S. (2014b). The effect of intravenous vitamin C on cancer- and chemotherapy-related fatigue and quality of life. *Frontiers in Oncology, 4*, 283.

Carr, A. C., & Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients, 9*(11), 1211.

Carroll, J. A., & Forsberg, N. E. (2007). Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 23*(1), 105-149.

Cassidy, J., Twelves, C., Van Cutsem, E., Hoff, P., Bajetta, E., Boyer, M., ... & Schilsky, R. L. (2002). First-line oral capecitabine therapy in metastatic colorectal cancer: a favorable safety profile compared with intravenous 5-fluorouracil/leucovorin. *Annals of Oncology, 13*(4), 566-575.

Chan, G. C. F., Chan, W. K., & Sze, D. M. Y. (2009a). The effects of β-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology, 2*, 25.

Chan, S., Romieu, G., Huober, J., Delozier, T., Tubiana-Hulin, M., Schneeweiss, A., ... & Fumoleau, P. (2009b). Phase III study of gemcitabine plus docetaxel compared with capecitabine plus docetaxel for anthracycline-pretreated patients with metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology, 27*(11), 1753-1760.

Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences, 61*(2), 192-208.

Chew, B. P., & Park, J. S. (2004). Carotenoid action on the immune response. *Journal of Nutrition, 134*(1), 257S-261S.

Chu, W. M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Letters, 328*(2), 222-225.

Clark, M. F., Lister, R. M., & Bar-Joseph, M. (1986). ELISA techniques. *Methods in Enzymology, 118*, 742-766.

Cuddihy, S. L., Parker, A., Harwood, D. T., Vissers, M. C. M., & Winterbourn, C. C. (2008). Ascorbate interacts with reduced glutathione to scavenge phenoxyl radicals in HL60 cells. *Free Radical Biology and Medicine, 44*(8), 1637-1644.

Cui, Z., Zhang, J., Zhang, J., & Xu, L. (2020). Evaluation of IgG, IgM, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells during neoadjuvant chemotherapy with Tezio and Apatinib in gastric cancer patients. *Cellular and Molecular Biology ((Noisy-le-grand), 66*(3), 113-118.

Del Rio, M., Ruedas, G., Medina, S., Victor, V. M., & De la Fuente, M. (1998). Improvement by several antioxidants of macrophage function *in vitro*. *Life Sciences, 63*(10), 871-881.

El-Gendy, K. S., Aly, N. M., Mahmoud, F. H., Kenawy, A., & El-Sebae, A. K. H. (2010). The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(1), 215-221.

El-Gerbed, M. S. A. (2015). Hepatoprotective effect of vitamin C on capecitabine-induced liver injury in rats. *Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology), 11*(1), 61-69.

Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S., & Pallotta, G. (2008). Lipid peroxidation in hemodialysis patients: effect of vitamin C supplementation. *Clinical Biochemistry, 41*(6), 381-386.

Fischbach, F., & Dunning, M. B. (2009). A manual of laboratory and diagnostic tests. (9th ed.) Lippincott Williams & Wilkins.

Fujimoto-Ouchi, K., Onuma, E., Shirane, M., Mori, K., & Tanaka, Y. (2007). Capecitabine improves cancer cachexia and normalizes IL-6 and PTHrP levels in mouse cancer cachexia models. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 59*(6), 807-815.

Galażyn-Sidorczuk, M., Brzóska, M. M., Rogalska, J., Roszczenko, A., & Jurczuk, M. (2012). Effect of zinc supplementation on glutathione peroxidase activity and selenium concentration in the serum, liver and kidney of rats chronically exposed to cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *26*(1), 46-52.

Galmarini, C. M., & Galmarini, F. C. (2003). Multidrug resistance in cancer therapy: role of the microenvironment. *Current Opinion in Investigational Drugs, 4*(12), 1416-1421.

Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity, 39*(6), 1003-1018.

Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry, 398*(10), 1095-1108.

Grosso, G., Bei, R., Mistretta, A., Marventano, S., Calabrese, G., Masuelli, L., ... & Gazzolo, D. (2013). Effects of vitamin C on health: a review of evidence. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 18(3), 1017-1029.

Harless, W., & Qiu, Y. (2006). Cancer: a medical emergency. *Medical Hypotheses, 67*(5), 1054-1059.

Javle, M., Yu, J., Garrett, C., Pande, A., Kuvshinoff, B., Litwin, A., ... & Iyer, R. (2009). Bevacizumab combined with gemcitabine and capecitabine for advanced pancreatic cancer: a phase II study. *British Journal of Cancer, 100*(12), 1842-1845.

Kaya, E., Keskin, L., Aydogdu, I., Kuku, I., Bayraktar, N., & Erkut, M. A. (2005). Oxidant/antioxidant parameters and their relationship with chemotherapy in Hodgkin's lymphoma. *Journal of International Medical Research, 33*(6), 687-692.

Keleş, O. N., Can, S., Cigsar, G., Colak, S., Erol, H. S., Akaras, N., ... & Halici, M. B. (2014). Hepatoprotective effects of B-1,3-(D)-glucan on bortezomib-induced liver damage in rats. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, *20*(6). 929-938.

Korver, D., & Klasing, K. (2001). Influence of nutrition on immune status of the bird. *Proceedings of the 24th Technical Turkey Conference, 25-27 April, Leyburn, England* (p. 43).

Koukourakis, G. V., Kouloulias, V., Koukourakis, M. J., Zacharias, G. A., Zabatis, H., & Kouvaris, J. (2008). Efficacy of the oral fluorouracil pro-drug capecitabine in cancer treatment: a review. *Molecules*, *13*(8), 1897-1922.

Kwon, M. J., Kim, B. H., Lee, Y. S., & Kim, T. Y. (2012). Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation. *Journal of Dermatological Science, 67*(2), 81-87.

Lee, S. J., Jeong, J. H., Lee, I. H., Lee, J., Jung, J. H., Park, H. Y., ... & Chae, Y. S. (2019). Effect of high-dose vitamin C combined with anti-cancer treatment on breast cancer cells. *Anticancer Research, 39*(2), 751-758.

Liao, X., Huang, L., Yu, Q., He, S., Li, Q., Huang, C., & Yuan, X. (2020). SNPs in the COX-2/PGES/EP signaling pathway are associated with risk of severe capecitabine-induced hand-foot syndrome. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 85*(4), 785-792.

Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V., & Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-κB activation prevents cell death. *Cell, 87*, 565-576.

Malet-Martino, M., & Martino, R. (2002). Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review. *Oncologist, 7*(4), 288-323.

Mannervik, B. (1985). Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology, 113,* 490-495.

Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family–an evolutionary overview. *FEBS Journal, 275*(15), 3959-3970.

Marklund, S. L. (1984). Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochemical Journal, 220*(1), 269-272.

Masuda, Y., Inoue, M., Miyata, A., Mizuno, S., & Nanba, H. (2009). Maitake β-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosupression and nephrotoxicity of cisplatin in mice. *International Immunopharmacology, 9*(5), 620-626.

Mata, J. F., García-Manteiga, J. M., Lostao, M. P., Fernández-Veledo, S., Guillén-Gómez, E., Larrayoz, I. M., ... & Pastor-Anglada, M. (2001). Role of the human concentrative nucleoside transporter (hCNT1) in the cytotoxic action of 5 [Prime]-deoxy-5-fluorouridine, an active intermediate metabolite of capecitabine, a novel oral anticancer drug. *Molecular Pharmacology, 59*(6), 1542-1548.

Memişoğulları, R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 3*, 30-39.

Meydani, S. N., Wu, D., Santos, M. S., & Hayek, M. G. (1995). Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *American Journal of Clinical Nutrition, 62*(6 Suppl), 1462S-1476S.

Milano, G., Etienne-Grimaldi, M. C., Mari, M., Lassalle, S., Formento, J. L., Francoual, M., ... & Hofman, P. (2008). Candidate mechanisms for capecitabine-related hand–foot syndrome. *British Journal of Clinical Pharmacology, 66*(1), 88-95.

Minami, M., Matsumoto, S., & Horiuchi, H. (2010). Cardiovascular side-effects of modern cancer therapy. *Circulation Journal, 74*(9), 1779-1786.

Murata, M., Suzuki, T., Midorikawa, K., Oikawa, S., & Kawanishi, S. (2004). Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radical Biology and Medicine, 37*(6), 793-802.

Murphy, E. A., Davis, J. M., & Carmichael, M. D. (2010). Immune modulating effects of β-glucan. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 13*(6), 656-661.

Nezlin, R. (1998). General characteristics of immunoglobulin molecules. The immunoglobulins: structure and function. In *the Immunoglobulins : Structure and Function* (Ed: R. Nezlin). Academic Press, San Diego, 3-73.

Nilsson, A., De Milito, A., Engström, P., Nordin, M., Narita, M., Grillner, L., ... & Björk, O. (2002). Current chemotherapy protocols for childhood acute lymphoblastic leukemia induce loss of humoral immunity to viral vaccination antigens. *Pediatrics, 109*(6), e91.

Nozik-Grayck, E., Suliman, H. B., & Piantadosi, C. A. (2005). Extracellular superoxide dismutase. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 37*(12), 2466-2471.

Olayinka, E. T., Ola, O. S., Ore, A., & Adeyemo, O. A. (2017). Ameliorative effect of caffeic acid on capecitabine-induced hepatic and renal dysfunction: Involvement of the antioxidant defence system. *Medicines (Basel), 4*(4), 78.

Ookawara, T., Kizaki, T., Takayama, E., Imazeki, N., Matsubara, O., Ikeda, Y., ... & Ohno, H. (2002). Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 296*(1), 54-61.

Papadakis, K. A., & Targan, S. R. (2000). Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology, 119*(4), 1148-1157.

Polansky, H., & Dafni, I. (2010). Gene-Eden, a broad range, natural antiviral supplement, may shrink tumors and strengthen the immune system. *Acta Oncologica, 49*(3), 397-399.

Pusztai, L., Mendoza, T. R., Reuben, J. M., Martinez, M. M., Willey, J. S., Lara, J., ... & Hortobagyi, G. N. (2004). Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy. *Cytokine, 25*(3), 94-102.

Ramakrishnan, R., Assudani, D., Nagaraj, S., Hunter, T., Cho, H. I., Antonia, S., ... & Gabrilovich, D. I. (2010). Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *Journal of Clinical Investigation, 120*(4), 1111-1124.

Reen, D. J. (1994). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Methods in Molecular Biology, 32*. 461-466.

Rop, O., Mlcek, J., & Jurikova, T. (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews, 67*(11), 624-631.

Rtibi, K., Selmi, S., Grami, D., Amri, M., Sebai, H., & Marzouki, L. (2018). Contribution of oxidative stress in acute intestinal mucositis induced by 5 fluorouracil (5-FU) and its pro-drug capecitabine in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods, 28*(4), 262-267.

RuiDian, K., ShunFa, L., Yi, C., ChuRong, J., & QiaGuang, S. (2010). Analysis of chemical composition of polysaccharides from Poria cocos Wolf and its anti-tumor activity by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers, 80*(1), 31-34.

Sakamoto, J., Kondo, Y., Takemiya, S., Sakamoto, N., & Nishisho, I. (2004). A phase II Japanese study of a modified capecitabine regimen for advanced or metastatic colorectal cancer. *Anticancer Drugs, 15*(2), 137-143.

Schroeder Jr, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125*(202), S41-S52.

Schwager, J., & Schulze, J. (1998). Modulation of interleukin production by ascorbic acid. *Veterinary Immunology and Immunopathology, 64*(1), 45-57.

Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine, 77*(7), C98-101.

Shul'gim, K. K., Popova, T. N., & Rakhmanova, T. I. (2008). Isolation and purification of glutathione peroxidase. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya, 44*(3), 276-280.

Solomayer, E. F., Feuerer, M., Bai, L., Umansky, V., Beckhove, P., Meyberg, G. C., ... & Diel, I. J. (2003). Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system

analysed in the bone marrow of patients with breast cancer. *Clinical Cancer Research, 9*(1), 174-180.

Sözbilir, N. B., & Bayşu, N. (2008). *Biyokimya*. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.

Squires, V. R. (2011). *The Role of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries in Human Nutrition*. (Ed. V. R. Squires, 2nd Edition) Eolss Publishers Company Limited, Oxford, United Kingdom.

Sthle, L., & Wold, S. (1989). Analysis of variance (ANOVA). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 6*(4), 259-272.

Subramani, T., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Ho, C. L., Omar, A. R., Aziz, S. A., ... & Alitheen, N. B. (2014). Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifen. *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 18*(2), 305-313.

Sze, D. M. Y., & Chan, G. C. F. (2012). Effects of beta-glucans on different immune cell populations and cancers. *Advances in Botanical Research, 62,* 179-196.

Thunes C. (2017). Nutrition and immunity in the equine. *Innovative Veterinary Care.*

Tolaney, S. M., Najita, J., Winer, E. P., & Burstein, H. J. (2008). Lymphopenia associated with adjuvant anthracycline/taxane regimens. *Clinical Breast Cancer, 8*(4), 352-356.

Topuz, E., Derin, D., Can, G., Kürklü, E., Çınar, S., Aykan, F., ... & Aydıner, A. (2008). Effect of oral administration of kefir on serum proinflammatory cytokines on 5-FU induced oral mucositis in patients with colorectal cancer. *Investigational New Drugs, 26*(6), 567-572.

Tracey, K. J., & Cerami, A. (1993). Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annual Review of Cell Biology, 9,* 317-343.

Tubiana-Mathieu, N., Bougnoux, P., Becquart, D., Chan, A., Conte, P. F., Majois, F., ... & Villanova, G. (2009). All-oral combination of oral vinorelbine and capecitabine as first-line chemotherapy in HER2-negative metastatic breast cancer: an International Phase II Trial. *British Journal of Cancer, 101*(2), 232-237.

Waldmann, T. A., Strober, W., & Blaese, R. M. (1971). Metabolism of immunoglobulins. *Progress in Immunology,* 891-903.

Walko, C. M., & Lindley, C. (2005). Capecitabine: a review. *Clinical Therapeutics*, *27*(1), 23-44.

Walter, B., Schrettenbrunner, I., Vogelhuber, M., Grassinger, J., Bross, K., Wilke, J., ... & Reichle, A. (2012). Pioglitazone, etoricoxib, interferon-α, and metronomic capecitabine for metastatic renal cell carcinoma: final results of a prospective phase II trial. *Medical Oncology*, *29*(2), 799-805.

Wang, C., Huo, X., Gao, L., Sun, G., & Li, C. (2017). Hepatoprotective effect of carboxymethyl pachyman in fluorouracil-treated CT26-bearing mice. *Molecules*, *22*, 756.

Watson, R. W. G. (2002). Redox regulation of neutrophil apoptosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, *4*(1), 97-104.

Webb, C. B., & Falkowski, L. (2009). Oxidative stress and innate immunity in feline patients with diabetes mellitus: the role of nutrition. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *11*(4), 271-276.

Wolowczuk, I., Verwaerde, C., Viltart, O., Delanoye, A., Delacre, M., Pot, B., & Grangette, C. (2008). Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clinical and Developmental Immunology*, 639803.

Wu, X. Z. (2006). A new classification system of anticancer drugs-based on cell biological mechanisms. *Medical Hypotheses, 66*(5), 883-887.

Yiang, G. T., Chou, P. L., Hung, Y. T., Chen, J. N., Chang, W. J., Yu, Y. L., & Wei, C. W. (2014). Vitamin C enhances anticancer activity in methotrexate-treated Hep3B hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Reports*, *32*(3), 1057-1063.

Yokomichi, N., Nagasawa, T., Coler-Reilly, A., Suzuki, H., Kubota, Y., Yoshioka, R., ... & Yamaguchi, Y. (2013). Pathogenesis of hand-foot syndrome induced by PEG-modified liposomal doxorubicin. *Human Cell, 26*(1).

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ORAL KAPESİTABİN UYGULANAN SIÇANLARDA ß-GLUKAN VE C VİTAMİNİNİN İMMUNOLOJİK VE ANTİOKSİDAN SERUM PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%11	%9	%3	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	%2
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
5	Submitted to Ataturk Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to Gazi University Öğrenci Ödevi	<%1
8	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1