



**PRENATAL DÖNEMDE SİKLOFOSFAMİDE
MARUZ BIRAKILAN SIÇAN BEYİNCİĞİNDE
GİNKGO BİLOBANIN KORUYUCU ETKİSİNİN
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Sarmad Hayder Weli WELİ

**2021
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANATOMİ**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Ahmad YAHYAZADEH**

**PRENATAL DÖNEMDE SİKLOFOSFAMİDE MARUZ BIRAKILAN SIÇAN
BEYİNCİĞİNDE GİNKGO BİLOBANIN KORUYUCU ETKİSİNİN
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Sarmad Hayder Weli WELI

**T.C.
Karabük Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anatomi Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Ahmad YAHYAZADEH**

**KARABÜK
Aralık 2021**

Sarmad Hayder Weli WELI tarafından hazırlanan “PRENATAL DÖNEMDE SİKLOFOSFAMİDE MARUZ BIRAKILAN SIÇAN BEYİNCİĞİNDE GİNKGO BİLOBANIN KORUYUCU ETKİSİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Ahmad YAHYAZADEH
Tez Danışmanı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Anatomi Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)</u>	<u>İmzası</u>
Başkan: Doç. Dr. Zülal ÖNER (Bakırçay Üniversitesi)
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Şeyma TOY (KBÜ)
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ahmad YAHYAZADEH (KBÜ)

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Hasan SOLMAZ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Sarmad Hayder Weli WELI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PRENATAL DÖNEMDE SİKLOFOSFAMİDE MARUZ BIRAKILAN SIÇAN BEYİNCİĞİNDE GİNGKO BİLOBANIN KORUYUCU ETKİSİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Sarmad Hayder Weli WELI

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anatomi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Ahmad YAHYAZADEH

Aralık 2021, 58 sayfa

Bu çalışmada, siklofosfamid (SK) prenatal maruziyetin sıçan beyincik üzerindeki olumsuz etkilerinin araştırılması amaçlandı. Ayrıca ginkgo biloba'nın (GB) serebellar dokularda SK'nın neden olduğu olası biyolojik değişikliklere karşı koruyucu etkileri de değerlendirildi. Bu çalışmada 12 haftalık 230-280 gr ağırlığındaki 20 dişi sıçan 5 gruba ayrılmıştır: kontrol, sham, SK (20 mg/kg, intraperitoneal), GB (80 mg/kg/gün, oral) ve SK+GB (SK, 20 mg/kg; GB, 80 mg/kg/gün). Çiftleşmeden sonra hem SK hem de SK+GB grupları tek doz SK'ya maruz bırakıldı. Doğumdan sonra her gruptan rastgele 8 dişi sıçan seçildi ve 32 gün boyunca normal koşullarda standart yem ile beslendi. Deneme süresinin sonunda, sıçanlara anestezi altında kardiyak perfüzyon uygulandı. Sonrasında beyincikleri çıkarıldı ve mikroskop altında beyincikten elde edilen kesitler stereolojik ve histopatolojik olarak incelendi.

Stereolojik bulgular, SK grubunda toplam Purkinje hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığını göstermiştir ($p<0,05$). Ayrıca SK grubunda ortalama moleküler tabaka, granüler tabaka, ak madde ve beyincik hacimleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). Buna ek olarak, SK+GB grubunda toplam Purkinje hücre sayısı, ortalama moleküler tabaka, granüler tabaka, ak madde ve beyincik hacimleri SK grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Histopatolojik değerlendirme de beyincik dokularının yapılarında değişiklikler göstermiştir.

SK'ya prenatal maruziyet, sıçan beyinciklerinde yapısal değişikliğe neden olmuştur. Ayrıca GB uygulanmasının, SK'nın beyincik üzerindeki olumsuz etkilerini anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler : Siklofosfamid, Ginkgo biloba, Stereoloji, Histopatoloji,
Beyincik.

Bilim Kodu : 1005

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF GINKGO BILOBA ON THE RAT CEREBELLUM FOLLOWING PRENATAL EXPOSURE TO CYCLOPHOSPHAMIDE USING STEREOLOGICAL METHOD

Sarmad Hayder Weli WELI

Karabük University

Institute of Graduate Programs

Department of Anatomy

Thesis Advisor:

Assist. Prof. Dr. Ahmad YAHYAZADEH

Aralık 2021, 58 pages

This study aimed to investigate the negative effects of prenatal exposure to cyclophosphamide (SK) on the rat cerebellum. In addition, we evaluated the protective activity of ginkgo biloba (GB) against possible biological changes caused by SK in cerebellar tissues. In the present study, 20 adult female rats (12 weeks old, weighing 230-280 g) were divided into 5 groups: control, sham, SK (20 mg/kg, intraperitoneal), GB (80 mg/kg/day, orally), and SK+GB (SK, 20 mg/kg; GB, 80 mg/kg/day). After mating, both SK and SK+GB groups were exposed to SK. After parturition, 8 female rats were randomly selected from each group, maintained under normal conditions, and fed with standard chow for 32 days. At the end of the experimental period, rats underwent cardiac perfusion under anesthesia. The cerebella were immediately removed, and sections obtained from the cerebellum were examined at the light microscope stereologically and histopathologically.

Stereological findings showed that the total number of Purkinje cells in the SK group was significantly decreased compared to the control group ($p < 0.05$). In addition, the mean volumes of molecular layer, granular layer, white matter, and cerebellum were significantly decreased in the SK group compared to the control group ($p < 0.05$). In addition, total Purkinje cell number, mean molecular layer volume, granular layer volume, white matter volume and cerebellum volume were significantly increased in the SK+GB group compared to the SK group ($p < 0.05$). Histopathological evaluation also exhibited changes in the structures of the cerebellum tissues.

Our results showed that prenatal exposure to SK caused structural changes in rat cerebellum. It was also observed that GB significantly reduced the negative effects of SK on the cerebellum.

Key Word : Cyclophosphamide, Ginkgo biloba, Stereology, Histopathology, Cerebellum.

Science Code : 1005

TEŞEKKÜR

Karabük Üniversitesi Tıp Fakóltesi tüm hocalara ve Anatomi Anabilim Dalı başkanı Dr. Öğr. Üyesi Şeyma TOY'a,

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Ahmad YAHYAZADEH'a,

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca her türlü desteğini, emeğini ve bilgisini aktararak, bana yol gösteren değerli hocam Sayın Doç.Dr. Zülal ÖNER'e, tez çalışmam boyunca benimle bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Yusuf SEÇGİN, Arş. Gör. Rukiye Sümeyye BAKICI, Arş. Gör. Necati Emre ŞAHİN'e,

Hayatımın her alanında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen annem, babam, ablam ve dayılarıma: bunların dışında bana manevi desteklerini esirgemeyen zeyad ve omar arkadaşlarıma, sevdiklerime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	4
GENEL BİLGİLER	4
2.1. KEMOTERAPİ VE KEMOTERAPİDE KULLANILAN İLAÇLAR	4
2.1.1. Alkilleyici Ajanlar	5
2.1.2. Alkilleyici Ajanların Etki Mekanizmaları	5
2.1.3. Siklofosfamid.....	6
2.1.4. Siklofosfamidin Metabolize Edilmesi	6
2.1.5. Siklofosfamidin Etki Mekanizmaları.....	7
2.1.6. Siklofosfamidin Yan Etkileri.....	7
2.2. BEYİNCİK YAPISI	8
2.2.1. Beyinciğin Embriyolojisi.....	8
2.2.2. Beyinciğin Anatomisi	9
2.2.3. Beyinciğin Histolojisi	9
2.3. OKSİDATİF STRES ve ANTİOKSİDAN SİSTEM	10
2.4. GİNGKO BİLOBA’NIN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ.....	11
2.4.1. Ginkgo Biloba’nın Nöroprotektif Etkileri	11

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 3	15
MATERYAL VE METOT	15
3.2. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	16
3.3. DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI	20
3.3.1. Perfüzyon.....	20
3.3.2. Rutin Histolojik Doku Takip İşlemi	22
3.3.3. Kesit Alma Yöntemi	23
3.4.1. Purkinje Hücrelerinin Sayısal Yoğunluğu	26
3.4.2. Beyincik Hacmi	28
BÖLÜM 4	30
BULGULAR.....	30
4.1. STEREOLOJİK BULGULAR.....	30
4.1.1. Toplam Purkinje Hücre Sayısı.....	30
4.1.2. Ortalama Moleküler Tabaka Hacmi	31
4.1.3. Ortalama Granüler Tabaka Hacmi.....	32
4.1.4. Ortalama Ak Madde Hacmi.....	33
4.1.5. Ortalama Beyincik Hacmi	35
4.1.6. Ortalama Vücut Ağırlığı.....	36
4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR	37
4.2.1. Kontrol Grubunun Histolojik Bulguları	37
4.2.2. Sham Grubunun Histolojik Bulguları.....	38
4.2.3. SK Grubunun Histolojik Bulguları.....	38
4.2.4. GB Grubunun Histolojik Bulguları	39
4.2.5. SK+GB Grubunun Histolojik Bulguları.....	40
BÖLÜM 5	42
TARTIŞMA	42
BÖLÜM 6	48
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49

	<u>Sayfa</u>
EK AÇIKLAMALAR A. ETİK KURUL KARARI.....	56
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1.	Mevcut çalışmanın wistar albino sıçanları.....	15
Şekil 3.2.	Fizyolojik salin deney düzeneği.....	17
Şekil 3.3.	Siklofosfamide maruz kalma deney düzeneği.....	18
Şekil 3.4.	Ginkgo biloba maruz kalma deney düzeneği.....	19
Şekil 3.5.	Doku takibi sonrasında L demirine gömülmüş beyincik dokuları.....	23
Şekil 3.6.	Rotary mikrotom.....	24
Şekil 3.7.	Kresil viyole boyaması sonrası kesitlerin görünümü.....	25
Şekil 3.8.	Beyincik kesitlerinin görüntülü mikroskop altında incelenmesi.....	27
Şekil 3.9.	Fiziksel disektör (a ve b) yönteminin stereolojik prosedürü izlenmektedir. Kırmızı çizgiler; yasak kenarlar, yeşil çizgiler; dahil kenarlar, a; referans kesit görüntüsü, b; gözlem kesit görüntüsünü göstermektedir.....	28
Şekil 3.10.	Cavalieri yönteminin stereolojik prosedürü izlenmektedir.....	29
Şekil 4.1.	Toplam purkinje hücre sayı değerleri. *; SK ile kontrol grupları arasında ($p<0,01$), **; SK ile sham grupları arasında ($p<0,01$), +; SK ile GB grupları arasında ($p<0,01$), #; SK ile SK+GB grupları arasında ($p<0,05$). &; GB ile SK+GB grupları arasında ($p<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir.....	31
Şekil 4.2.	Ortalama moleküler tabaka hacim değerleri. *; SK ile kontrol grupları arasında ($p<0,01$), **; SK ile sham grupları arasında ($p<0,01$), +; SK ile GB grupları arasında ($p<0,01$), #; SK ile SK+GB grupları arasında ($p<0,05$). &; GB ile SK+GB grupları arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir.....	32
Şekil 4.3.	Ortalama granüler tabaka hacim değerleri. *; SK ile kontrol grupları arasında ($p<0,01$), **; SK ile sham grupları arasında ($p<0,01$), +; SK ile GB grupları arasında ($p<0,01$), #; SK ile SK+GB grupları arasında ($p<0,05$). &; GB ile SK+GB grupları arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir.....	33
Şekil 4.4.	Ortalama ak madde hacim değerleri. *; SK ile kontrol grupları arasında ($p<0,01$), **; SK ile sham grupları arasında ($p<0,01$), +; SK ile GB grupları arasında ($p<0,01$), #; SK ile SK+GB grupları arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir.....	34
Şekil 4.5.	Ortalama beyincik hacmi değerleri. *; SK ile kontrol grupları arasında ($p < 0,01$), **; SK ile sham grupları arasında ($p < 0,01$), +; SK ile GB grupları arasında ($p < 0,01$), #; SK ile SK+GB grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir.....	35

- Şekil 4.6. Ortalama vücut ağırlık değerleri. +; SK ile GB grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,01$). 36
- Şekil 4.7. Kontrol gruplarındaki beyincik dokularının ışık mikrografları izlenmektedir. Siyah oklar; sağlıklı Purkinje hücreleri, iki başlı ok; gri madde, daire; ak madde alanı göstermektedir. Ölçek çubukları: 50 μm . 37
- Şekil 4.8. Sham gruplarındaki beyincik dokularının ışık mikrografları izlenmektedir. Siyah oklar; sağlıklı Purkinje hücreleri, iki başlı ok; gri madde, daire; ak madde alanı göstermektedir. Ölçek çubukları: 50 μm . 38
- Şekil 4.9. Siklofosfamide gruplarındaki beyincik dokularının ışık mikrografları izlenmektedir. Siyah oklar; sağlıklı Purkinje hücreleri, beyaz ok; Purkinje hücrelerinin bulunmadığı bölgeleri, beyaz ok ucu; dejenere olan Purkinje hücreleri, çift siyah ok başı; Purkinje hücrelerinde büzülme göstermektedir. Ölçek çubukları: 50 μm 39
- Şekil 4.10. Ginkgo biloba gruplarındaki beyincik dokularının ışık mikrografları izlenmektedir. Siyah oklar; sağlıklı Purkinje hücreleri göstermektedir. Ölçek çubukları: 50 μm 40
- Şekil 4.11. SK+GB gruplarındaki beyincik dokularının ışık mikrografları izlenmektedir. Siyah oklar; sağlıklı Purkinje hücreleri, beyaz ok ucu; dejenere olan Purkinje hücreleri, çift siyah ok başı; Purkinje hücrelerinde büzülme göstermektedir. Ölçek çubukları: 50 μm 41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Gebe sıçanların çalışma ve kontrol gruplarının tanımlanması.....	20
Çizelge 3.2. Yavru sıçanların çalışma ve kontrol gruplarının tanımlanması.	20
Çizelge 3.3. Beyinciklerin doku takibinde kullanılan kimyasallar ve süreleri.	22
Çizelge 3.4. Kesitlerin boyanmasında kullanılan kimyasallar ve süreleri.	25
Çizelge 4.1. Toplam purkinje hücre sayı değerleri ($\times 10^2$) (Ortalama \pm SD).	30
Çizelge 4.2. Ortalama moleküler tabaka hacim değerleri (Ortlama \pm (SD).	32
Çizelge 4.3. Ortalama granüler tabaka hacim değerleri (Ortlama \pm SD).	33
Çizelge 4.4. Ortalama ak madde hacim değerleri (Ortlama \pm SD).	34
Çizelge 4.5. Ortalama beyincik hacim değerleri (Ortlama \pm SD).	35
Çizelge 4.6. Ortalama vücut ağırlık değerleri.	36

KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

- DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
SK : Siklofosfamid
SOD : Süperoksit Dismutaz
GB : Gingko Biloba
ROT : Reaktif Oksijen Türleri
GPx : Glutasyon Peroksidaz
KAT : Katalaz
GSH : Glutasyon
MDA : Malondialdehid
RNA : Ribonükleik Asid
SRÖ : Sistemik Rasgele Örnekleme
GST : Glutasyon S-transferaz
CAT : katalaz
iNOS : İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
GST : Glutasyon S-transferaz
TRX : Tioredoksin
PRX : Peroxiredoxins
GPx : Glutasyon Peroksidaz
GSH : Glutasyon
H₂O₂ : Hidrojen Peroksit
NFkB : Nuclear Factor Kappa B
JNK : Jun N-terminal Kinaz

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Yaklaşık yüzyıl önce kanser dünyada çok yaygın bir hastalık değildi ancak son yıllarda ülkemizde ve dünyada kansere yakalanan insanların sayısı sürekli artış göstermektedir. Dünyada yaklaşık 2018 yılında 11 milyon insana kanser teşhisi konuldu ve bu rakamın 2020 de 16 milyon olarak gerçekleşebileceği tahmin edilmektedir. Günümüzde kanser tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormon terapisi ve immünoterapi kullanılmaktadır [1].

Kemoterapinin amacı kanser hücrelerinin çoğalmasını ve tümörün büyümesini engellemektir. Böylece kanser hücrelerinin yayılımı ve metastazı engellenebilir. Kemoterapide kanser hücreleri için kullanılan toksik kimyasallar aynı zamanda sağlıklı hücrelere de zarar verir. Kemoterapik ajanlar DNA, RNA ve protein gibi makromoleküllerin sentezini engelleyerek neoplastik hücrelerin ölümüne neden olurlar. Kemoterapik ajanlar hücrelerin ya doğrudan ölümüne neden olurlar veya apoptosis mekanizmasını tetikleyerek hücreyi apoptoza yönlendirir. Sitotoksik ilaçların birçoğu S fazında DNA sentezini inhibe ederken, Vinca alkaloidleri ve Taxanlar M safhasında mitotik spindellarin oluşumunu engelleyerek hücre çoğalmasını durdururlar [2].

Kemoterapide kullanılan ilaçlar, alkilleyici ajanlar, sitotoksik ajanlar, antimetabolitler, biyolojik cevap modifikatörleri, histon deasetilaz inhibitörleri, hormonal ajanlar, monoklonal antikorlar, proteinkinaz inhibitörleri, taxanlar, topoizomeraaz inhibitörleri ve vinca alkaloidleri olmak üzere sınıflandırılır [3]. Kemoterapide kullanılan alkilleyici ajanlar DNA'da negatif yüklü gruplara kovalent olarak bağlanarak replikasyon ve transkripsiyon mekanizmalarını bozarlar [4]. Alkilleyici ajanlardan olan SK P450 enzim sistemleri tarafından 4-hidroksisiklofosfamide ve onun tautomeri olan aldofosfamide dönüştürülür.

Aldophosphamid hücre içersinde akrolein ve fosforamide dönüşür ki bu iki alkilleyici ajanda DNA'da kırılmalara ve hücrede nekroz veya apoptoza neden olur [5]. Akrolein aynı zamanda antioksidan sistemi engelleyerek memeli canlıların özellikle de oksidatif strese duyarlı olan beyinde, mutajenik olan serbest oksijen radikallerini üretimini artırır [6].

SK'nın hayvanlarda çok sayıda doku ve organ üzerinde olumsuz etkilere neden olurken, ratların beyinde malondialdehit seviyesinin artırdığı ve serumlarında bilirubinin ve glutamat oxaloasetat transaminaz, glutamat piruvat transaminaz, alkalın fosfataz ve serumların aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve alkalın fosfataz gibi enzimlerin aktivitelerinin arttığı bilinmektedir. Ayrıca SK hayvanlarda beyinde ak madde de sinir hücreleri ve liflerinde boşlukların artmasına ve beyin korteksinde mikroglia hücrelerinin büyüklük ve sayılarının artmasına neden olur [6].

Hücrelerde artan reaktif oksijen türleri oksidatif strese neden olurlar ve başta DNA olmak üzere, proteinler, lipidler ve karbonhidratlara bağlanarak onların yapılarında değişikliklere neden olurlar. Özellikle DNA'da meydana gelen mutasyonlar ve lipidlerin yıkımı ile meydana gelen lipid peroksidasyonu hücrelere zarar verir. Hücre içinde ve hücreler arası sıvıda bulunan antioksidan sistem elemanları, enzimler, vitaminler ve birçok antioksidan özelliğe sahip biyomoleküller reaktif oksijen türlerini daha az zararlı türlere çevirerek veya onların reaktivitelerini nötralize ederek oksidatif strese karşı hücreleri korurlar [7].

Antioksidant ve nöroprotektif özelliklerinden dolayı ginkgo biloba (GB) M.Ö. 2800 yılından beri Çinliler tarafından kültüre edilmekte ve kullanılmaktadır. Özellikle Alzheimer başta olmak üzere sinir sistemi ve sinir sistemi ilişkili hastalıkların, beyne giden damarlarda meydana gelen hastalıkların, çevresel dolaşım sistemi hastalıklarının tedavisinde etkili olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir [8]. Ayrıca bitkinin ekstraktlarının antioksidan özelliğine sahip olmasına bağlı olarak karaciğer hasarına karşı koruyucu özelliğine de sahip olduğu bulunmuştur [9]. Günümüzde Avrupa ve Amerika'da birçok klinik uygulamalarda GB ekstraktları hafıza kayıpları, Alzheimer, periferal damar rahatsızlıkları, kulak çınlaması, baş dönmesi, beyin

kanamasının neden olduğu nörolojik semptomların tedavisinde kullanılmıştır [10, 11].

Bu çalışmanın amacı, SK'nın sıçanların beyinciklerinde oluşturduğu hasar üzerinde GB'nin koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. KEMOTERAPİ VE KEMOTERAPİDE KULLANILAN İLAÇLAR

Kanserin tedavisinde kullanılan kemoterapide temel amaç; kanser hastasının sağlıklı hücrelerine hasar vermeden tümörün büyümesini ve kanserli hücrelerin bölünmesini engellemek veya yok etmektir. Kemoterapide bu yüzden hücre çoğalmasını inhibe eden ajanlar sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlar kanser hücreleri gibi hızla bölünen hücrelerin yanı sıra bağırsak epitel hücreleri, kemik iliğinde hematopoietik kök hücreler ve saç kökü foliküllerinin çoğalmasını engeller. Kemoterapi ilaçları sadece kanserli hücreleri seçici olarak inhibe etmezler, bu nedenle hastalarda birçok yan etkiye neden olurlar [2, 12]. Bunlar genel olarak mide bulantısı, kusma, halsizlik ve yorgunluk, yeme isteğinde azalma, kemik iliğinde bulunan hemapoietik hücrelerin olumsuz etkilenmesine bağlı olarak anemi, lökopeni, trombositopeni, saçlarda dökülme, mukozit, cilt problemleri, uykusuzluk, psikolojik problemler ve üreme bozuluklukları şeklinde belirtilebilir [13].

Kemoterapide yaygın olarak kullanılan ilaçlar aşağıda verilmiştir [3, 4]:

1. Alkilleyici ajanlar: Altretamine, Bendamustine, Busulfan, Carmustine, Chlorambucil, Cyclophosphamide, Dacarbazine, Ifosfamide, Lomustine, Mechlorethamine, Melphalan, Procarbazine, Streptozocin, Temozolomide.
2. Antibiyotikler ve Sitotoksik İlaçlar: Bleomycin, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitomycin, Mitoxantrone, Plicamycin, Valrubicin.
3. Antimetabolitler: Antifolatlar (Methotrexate, Pemetrexed, Pralatrexate, Trimetrexate), Pürin analogları (Azathioprine, Cladribine, Fludarabine, Mercaptopurine, Thioguanine), Pirimidine Analogları (Azacitidine,

Capecitabine, Cytarabine, Decitabine, Floxuridine, Fluorouracil, Gemcitabine, Trifluridine/Tipracil.

4. Biyolojik cevabı modifiye edenler: Aldesleukin (IL-2), Denileukin Diftitox, Interferon Gamma.
5. Histon deasetilaz inhibitörleri: Belinostat, Panobinostat, Romidepsin, Vorinostat.
6. Hormonal ajanlar: Anti-androjenler (Abiraterone, Apalutamide, Bicalutamide, Cyproterone, Enzalutamide, Flutamide, Nilutamide), Anti-östrojenler (Anastrozole, Exemestane, Fulvestrant, Letrozole, Raloxifene, Tamoxifen, Toremifene), Gonadotropin Releasing Hormon Analogları (Degarelix, Goserelin, Histrelin, Leuprolide, Triptorelin).
7. Peptid Hormonlar: Lanreotide, Octreotide, Pasireotide.
8. Monoklonal Antikorlar: Alemtuzumab, Atezolizumab, Avelumab, vd.
9. Protein Kinaz İnhibitörleri: Abemaciclib, Acalabrutinib, Afatinib, vd.
10. Taxanlar: Cabazitaxel, Docetaxel, Paclitaxel.
11. Topoisomerez İnhibitörleri: Etoposide, Irinotecan, Teniposide, Topotecan.
12. Vinca Alkaloidleri: Vinblastine, Vincristine, Vinorelbine.
13. Diğer: Asparaginaz (Pegaspargase), Bexarotene, Eribulin, Everolimus.

2.1.1. Alkilleyici Ajanlar

Alkilleyici ajanlar, DNA ve protein gibi biyolojik moleküllere bağlanarak yapılarının ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olan kimyasallardır. Özellikle bu ajanlar DNA'ya kovalent olarak bağlandıklarında DNA'yı metilleyerek replikasyon hatalarına neden olurlar. Ayrıca hücre bölünmesinin önlenmesinde ve kanser tedavilerinde düşük dozlarda kullanılmaktadır. Bu maddelerin kullanılması mitozda anormalliklere, kromozom kırılmalarına ve mutasyonlara neden olduğu bildirilmiştir [4].

2.1.2. Alkilleyici Ajanların Etki Mekanizmaları

Alkilleyici ajanlar nükleik asitler ve proteinlerdeki amin, karboksil, sülfidril veya imidazol yapıları gibi nükleofilik gruplara kovalent olarak bağlanarak yapılarında

değişikliklere neden olurlar. Alkilleyici ilaçların büyük bir kısmı temozolomid, N-metil-N -nitro-N-nitrosoguanidine ve dakarbazin gibi tek fonksiyonlu metilleyici ajanlar, bazıları nitrojen mustardlar (örneğin chlorambucil ve SK gibi) ve kloroetilasyon ajanlar gibi (örneğin nimustin, carmustin, lomustin, ve fotemustin) iki fonksiyonlu alkilleyicilerdir. Tekli metilleyici ajanlar DNA'daki bazların N- ve O-atomlarına bağlanırlar. Metilasyona uğrayan bazların %80'i azot (N) atomunun metilasyonu ile ortaya çıkar. Metillenen DNA'daki bazların stabilitesi birbirinden farklılık gösterir. Genel olarak oksijen atomunun metillenmesi ile oluşan DNA hasarları (örneğin O⁶alkylG ve O⁴alkylT) yüksek oranda mutajenik ve toksiktir. Oysa N atomunun alkillenmesi ile oluşan hasarlar daha çok sitotoksik ve daha az mutajeniktir [14].

2.1.3. Siklofosfamid

SK, hardal alkilleyici ajanlar ailesi olan oksazafosforin'in bir üyesidir (Şekil 2.1.). 1958 yılında keşfedildiğinden beri malignan tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Molekül ağırlığı 261.08 g/mol olan SK başta lösemi, lenfoma ve meme kanseri olmak üzere günümüzde birçok kanserin tedavisinde kullanılmaktadır [5].

SK yüksek dozlarda kullanıldığı zaman alkilleyici özelliğinden dolayı DNA hasarına neden olarak sitotoksik etki gösterir. Ancak düşük dozlarda immünomodülatör etkileri vardır. Klinik çalışmalarda yüksek ve düşük doz standardize olmamasına rağmen düşük dozlarda tek doz olarak SK 1-3mg/kg olarak uygulanırken, yüksek dozlarda 120 mg/kg'dan 1-2 g/kg olarak uygulanır [5].

2.1.4. Siklofosfamidin Metabolize Edilmesi

Siklofosfamidin kendisi ilaç öncülüdür ve karaciğerde P450 enzim sistemleri tarafından 4-hidroksisiklofosfamide ve onun tautomeri olan aldofosfamide metabolize edilir ki bu metabolitler pasif taşıma ile veya P-glikoproteinler aracılığı ile aktif olarak hücre içine alınır. Sitoplazmada aktif ürünler olan akrolein ve fosfamide dönüştürülür. Akrolein ve fosfamid DNA'ya kovalent olarak bağlanarak

DNA kırıklarına neden olur. Fosfamid mustarları hücreyi apoptoz ve nekroza yönlendiren DNA çapraz bağlanmalarına da neden olur. Aldehit dehidrogenaz enzimi aldofosfamidi toksik olmayan karboksifosfamide dönüştürken 4-OH-siklofosfoamid enzimatik olarak 4-ketosiklofosfamide dönüştür. Karboksifosfamid antioksidan molekül olan glutatyon ile stabilize edilir [4, 5, 15]. Campagne ve arkadaşlarının (2020) yaptığı bir çalışmaya göre SK ile tedavi edilen hastaların kan plazmalarında 4-hidroksisiklofosfamid ve karboksietilfosfamid miktarının arttığı gözlemlenmiştir [16].

2.1.5. Siklofosfamidin Etki Mekanizmaları

SK'nın metabolize edilmesi ile oluşan fosfamid ve akrolein aktif metabolitler olup DNA'nın alkillenmesine neden olur. Alkilenmiş DNA hemen onarılır; bu mümkün değilse, hücre döngüsünü durduran ve DNA onarımı için zaman sağlayan p53 tümör baskılayıcı protein etkinleştirilir. Eğer DNA'nın tamiri mümkün olmazsa anti-apoptotik proteinler Bcl-2 ve Bcl-X1, ayrıca NFkB proteinin aktivasyonu inhibe edilerek hücre apoptoza neden olabilir. Ayrıca aldofosfamit mitojen ile aktifleşen protein kinaz (MAPK), JNK ve p38 fosforilasyonunu artırarak hücre ölümünü hızlandırır [17].

2.1.6. Siklofosfamidin Yan Etkileri

SK'nın kanser tedavisinde kullanılmasının yanı sıra birçok yan etkisi de gözlemlenmiştir. SK tedavisinin DNA hasarına neden olmasının yanı sıra birçok bağışıklık sisteminde önemli rol oynayan dendritik hücreler, efektör T hücreleri ve NK hücrelerinin fonksiyonlarını da etkilediği tesbit edilmiştir [5]. Ayrıca hastalara SK uygulamasının kemik iliği hücrelerini baskıladığı ve böbreklerin iltihaplanmasının yanı sıra sinüs biyokardisi, perikard ve miyokard gibi kalp rahatsızlıklarına neden olduğu gösterilmiştir [18, 19, 20].

Çalışmalar, SK'nın teratojenik etkileri olduğunu ve uzun süreli uygulamasının mesane, yemek borusu ve akciğer kanserine neden olduğunu bildirmişlerdir [18]. SK'nın bilinen en önemli etkisi DNA'da çapraz bağlar oluşturarak DNA'ya zarar

vermesidir. Tedavi sırasında sadece kanserli hücreleri değil sağlıklı hücreleri de etkilediği için birçok organda hasarlara neden olabilir [5].

SK, beyinde lipid peroksidasyonunun ürünü olan Malondialdehid seviyesini artırır [21, 22, 23]. SK, yalnızca TNF alfa ve IL6 salgısını artırmakla kalmaz, aynı zamanda COX2, iNOS, NfκB ve p38-MAPK üretimini de artırır [24]. Özellikle COX2 ve iNOS aktivitesinin artması oksidatif strese artışa neden olarak DNA'da oksidatif hasara neden olur. Ayrıca SK'nın beyin, kalp ve akciğerlerde katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitesini ve plazmanın antioksidan kapasitesini azalttığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, SK uygulanmasının glutatyon seviyesinde de azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [22, 25].

2.2. BEYİNCİK YAPISI

Serebellum, arka beynin en büyük parçası olup, 4. ventrikül, medulla oblongata ve pons'un arkasında bulunur. Beyincik, lobus anterior, lobus medius ve lobus flocculonodularis olmak üzere 3 ana loba ayrılır. Lobus anterior, serebellumun üst yüzeyinden görülebilir ve lobus medius'tan fissura prima denilen "V" şeklinde bir yarık ile ayrılmıştır. Lobus flocculonodularis, fissura uvulonodularis'in arkasında bulunur. Beyincik kenarı boyunca uzanan fissura horizontalis isimli derin yarık, organın alt ve üst yüzünü birbirinden ayırır. İnsan serebellum'ında yaklaşık 50 milyar nöron bulunur [26, 27].

2.2.1. Beyinciğin Embriyolojisi

Serebellum'ın metensefalonun lamina alarislerinin dorsal bölümlerinden beyin gelişiminin 40-45. günlerinde gelişmeye başlar. Lamina alarislerinin dorsal kısımları içeri doğru kıvrılarak labium rombensefalikumları oluşturur. Labium rombensefalikumlar ise lamina cerebellisleri meydana getirirler. Embriyonik gelişimin 5. ayına doğru beyincikte fissuraeler ve folialar ortaya çıkar [28, 29].

Stratum endymole, stratum palliale ve stratum marginale tabakaları primordium cerebellare yapısını oluşturur. Embriyonik gelişimin ileri dönemlerinde serebral

plağın üstünde corticalis superficialis tabakasını meydana getirirler. Bu sırada oluşan bazı epitel hücreler Purkinje hücrelerine dönüşür. Embriyonik gelişimin 6. ayında lamina corticalis superficialis'te granuler, basket, stellat ve golgi hücreleri ortaya çıkar. Oluşan bu hücreler daha sonra Purkinje tabakasında dışarı doğru hareket ederek beyinciğin korteks kısmını meydana getiriler. Bu oluşum doğumdan sonar devam eder ve yaklaşık 1.5 yaşında tamamlanır [28, 29].

2.2.2. Beyinciğin Anatomisi

Beyincik cortex cerebelli adı verilen bir dış kısım örtüsü ile içte yer alan beyaz cevher kısımlarından meydana gelir. Korteksin gri cevheri üç tabakaya ayrılabilir: 1) moleküler tabaka (dış tabaka), 2) Purkinje tabaka (orta tabaka), 3) granüler tabaka (iç tabaka). Beyaz cevher kısmı ise küçük boyutludur ve ağacın dallarına benzer. Bu yüzden arbor vitae olarak adlandırılır. Beyaz cevherde üç farklı liften bulunmaktadır: 1) instrinsik 2) afferent, 3) efferent [26].

Beyincik korteks, kaslar, tendonlar ve eklemlerden istemli hareketlerle ilgili bilgileri alır. Ayrıca vestibüler sinirden denge ve traktus tectocerebellaris'ten görme hakkında bilgileri alır. Özetle beyincik istemli hareketler ve postürün kontrolünde çok önemli rol oynar. Bilincimiz dışında istemli kasların kasılmaları üzerinde etkili olduğu saptanmıştır [26].

2.2.3. Beyinciğin Histolojisi

Beyinciğin dış kısmı (korteks) gri maddeden ve iç kısmı beyaz maddeden meydana gelir. Korteks, dışarıda moleküler tabaka, ortada Purkinje hücrelerinin bulunduğu kısım ve içeride granüler tabakadan oluşmaktadır. Moleküler ve granüler tabaka arasında Purkinje hücreleri bulunur ve her Purkinje hücresinin dendritleri moleküler tabakaya doğru dallanma gösterir. Purkinje hücrelerinin aksonları ise bilgileri cerebellum'dan dışarıya doğru çıkarır. Moleküler tabakanın dış kısmı yoğun nörofil networku ve küçük nöronları barındırmaktadır. Granüler tabaka, aksonlarını moleküler katmana gönderen granüler hücreler içermektedir. Granüler hücre aksonlar Purkinje ve Basket hücreleri ile sinaps yaparlar [30].

2.3. OKSİDATİF STRES ve ANTİOKSİDAN SİSTEM

Serbest radikaller son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron bulundurlar. Bu yüzden kararsız moleküllerdir ve diğer moleküllere bağlanarak kararlı hale geçmeye çalışırlar. Hücrelerde özellikle bağlandıkları DNA, protein, yağ ve karbonhidratların yapılarında değişiklik ve hasara neden olurlar. Hücrelerde en yaygın üretilen radikaller reaktif oksijen türleridir. Hücrelerdeki ROT'lerin kaynağı mitokondrideki elektron taşıma zinciri, doymamış yağ asitlerinin ve katekolaminlerin oksidasyonu ile NADPH bağımlı oksidazlardır. Bunların dışında zararlı gazlar, radyasyon, ilaçlar, alkol ve patojenler de ROT üretimini arttırlar [31, 32, 33].

Süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, singlet oksijen, peroksil ve alkoksil radikalleri en önemli ROT'lardır [31, 34, 35].

2.3.1. Antioksidan Sistemler

Antioksidanlar serbest radikal oluşumunu engelleyen veya onları nötralize eden moleküller olarak tanımlanmaktadır. Antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olmak üzere ikiye ayrılır.

Hücre içi antioksidan sistem, enzimatik (SOD, CAT, GST, TRX, PRX ve GPx) ve enzimatik olmayan elemanlara (GSH, α - tokoferol ve β -karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir) sahiptir. Hücrelerde ayrıca antioksidan sisteminin önemli elemanları olarak metallothionein gibi serbest radikal yok ediciler ile Zn gibi iz elementlerde sayılabilir [31, 32, 36].

DNA, protein, lipit ve karbonhidrat gibi hücrelerde oksitlenebilecek maddeler canlı yaşamı için hayati öneme sahiptir ve bu moleküllerin oksidasyonu hücrede mutasyon ve hasarlara neden olur. Antioksidan sistem bu molekülleri oksidatif stresin yıkıcı etkisine karşı korur. Antioksidan enzimlerin ekspresyon seviyeleri ve hücrelerde buldukları kısımlar birbirinden farklıdır. Ayrıca enzimatik olmayan antioksidanlar ya enzimler ile birlikte çalışarak yada doğrudan ROT ile tepkimeye girerek oksidatif stresi azaltır [36]. Enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz, glutatyon

peroksidaz, ve katalaz enzimleri ayırt edilebilir. Bunların yanında enzimatik olmayan antioksidanlara glutatyon ve thioeredoksin örnek gösterilebilir [32, 35].

2.4. GİNKGO BİLOBA’NIN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ

GB’nin yapraklarının tedavide kullanılması hakkında ilk yazılı metin 16. yüzyıl da çinli yazar Liu Wen Tai tarafından kaleme alınmıştır. Bu yaprakların ekstraktları, sinirsel hastalıklar için kullanılan en popüler bitki ekstraktlarından biridir. Ancak bu ekstraktların etki mekanizmaları kısmen anlaşılmıştır [37].

GB’nin ekstraktları hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar Yoshikava ve arkadaşları (1999) tarafından özetlenmiştir. Yapılan araştırmalar, GB ekstrelerinin unutkanlık ve demansa karşı olumlu etkilerinin olduğunu, kardiyopulmoner baypas ameliyatları sonrası hastalarda oksidatif stresi ve miyogloblin sızıntısını azalttığını göstermiştir. Bununla birlikte periferik damar hastalıkları, Alzheimer ve serebral ve okuler kan akışının azalması gibi kronik vasküler yetmezlikleri olan hastalıkların tedavisinde de olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir [10]. Ayrıca nöroprotektif etkilerinin olduğu birçok çalışmada gösteriliş olmasına rağmen mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. GB’nin koryucu etkileri muhtemelen oksidatif stresin azaltmasından kaynaklanmaktadır [11]. GB flavonoidler, terpen trilaktonlar, proantosiyanidinler, ginkgolik asitler, biflavonlar, poliflavonlar ve ginkgotoksinler gibi birçok bileşen içerir. İçerik analizlerindeki farklılıklar bitkinin toplandığı döneme, ortamın kurak veya nemli olmasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. GB’nin standartlaştırılmış iki ürünü (EGb761 ve LI 1370) büyük oranda iki önemli molekülün varlığını göstermektedir: terpen trilaktonlar (ginkgolide A (GKA), B (GKB), C (GKC), J (GKJ) ve bilobalide [38]. Ude ve ark. (2013) yazmış oldukları derleme çalışmalarında GB’nin içerik analizleri ile ilgili birçok farklı araştırmaların sonuçları karşılaştırılmıştır [38].

2.4.1. Ginkgo Biloba’nın Nöroprotektif Etkileri

GB verilen hayvanlarda GB’nin nörotoksisite ve parkinson hastalığına karşı önleyici etkisi olduğu belirlenmiştir [39]. Diğer bir çalışmada, monoamin oksidazların stresle

inhibe edilmesine karşı kotuyucu rol oynadığı saptanmıştır. GB'nin Alzheimer hastalığına karşı koruyucu etkisinin yanı sıra hafızayı güçlendirdiği ve zihinsel problemlere karşı positif etkileri olduğu rapor edilmiştir. GB'nin anti-anksiyete ve orta düzeyde anti-depresyon özelliklerinin monoamin oksidaz-A ve monoamin oksidaz-B enzimlerinin geri dönüşümlü inhibisyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir [8, 40].

Ayrıca GB'nin beyinde meydana gelen hasarların tedavisinde kullanılan ilaçların etkilerini güçlendirildiği gösterilmiştir. GB'nin içerisinde bulunan alkaloid ketonlar, aminoasitler, siyanojenik glikosidler ve fenollerin beyinde kan dolaşımını artırarak anksiyete, şizofreni ve depresyonun neden olduğu problemlerin azalmasına sebep olmuştur [8].

Birçok klinik çalışmada, GB hafıza kayıpları, Alzheimer, periferik damar rahatsızlıkları, kulak çınlaması, baş dönmesi, beyin kanamasının neden olduğu nörolojik semptomların tedavisinde kullanılmıştır. Bu maddenin klinik kullanımları ve problemleri Yoshikava ve arkadaşları (1999) ile Ponto ve Schultz (2003) tarafından detaylı olarak tartışılmıştır [10, 11].

2.4.2. Ginkgo Biloba'nın Antioksidan Etkileri

GB, temizleyici etkisi ile H₂O₂ kaynaklı ve demir iyonlarına bağlı lipid peroksidasyonunu, hidroksil ve süperoksit radikallerini azaltır. Ayrıca bu antioksidan H₂O₂ nin neden olduğu apoptozisi inhibe ettiğini ve oksidatif strese bağlı yaşlanmayı geciktirdiğini gösterilmiştir. H₂O₂ miktarındaki artışa bağlı olarak sinir hücrelerinde apoptozis artar. GB içerdikleri antioksidant moleküller nedeniyle H₂O₂'nin bu olumsuz etkisine karşı sinir hücrelerini koruduğu ve bu nedenle nöroprotektif özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir [41, 42].

GB ekstraktının serbest radikal temizleyici etkisinden dolayı Na-K-ATPaz hasarı ve lipid peroksidasyonunun neden olduğu beyin felcine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [11, 42].

2.4.3. Ginkgo Biloba'nın Anti-İnflamatuvar Etkileri

Yapılan çalışmalara göre GB'nın anti-inflamatuvar etkileri açıklanmıştır. Cheng ve ark. RAW264.7 murine makrofaj hücre hatlarında GB'den izole ettikleri ve nadir olarak bulunan interlökin (IL)-6, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksigenazın mRNA seviyelerini azaltarak anti-inflamatuvar etkiler gösterdiklerini bildirmişlerdir [43]. Ayrıca arsenik zehirlenmesine maruz kalan 81 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada GB grubunda bu zehirlenmeye bağlı artan IL-17A ve IL-6 düzeylerinin azaldığı belirlendi [44].

2.4.4. Ginkgo Biloba'nın Östrojenik and Anti-Östrojenik Etkileri

Östrojenin karaciğer, kemikler, beyin, kan damarları ve yağ doku gibi birçok doku ve organ üzerinde etkileri vardır. Östrojen fazlalığı insanlarda meme, endometrium, yumurtalık ve prostat kanserlerine neden olmaktadır. Östrojenin yetersiz düzeyde bulunması ise menopozal septomlar ile osteoporoz ve kalp damar hastalıklarına neden olur. GB ekstraktları çok sayıda quersetin, kaemferol ve isorhamnetin gibi flavonoidleri içerir. Bu yüzden alternatif hormon tedavilerinde kullanılabileceği düşünülmüş ve Seung-Min ve arkadaşları tarafından (2004) araştırılmıştır. Yapılan çalışmaya göre GB ekstraktlarının ve içerisindeki önemli bileşenlerinin zayıf östrojenik aktiviteye neden oldukları belirlenmiştir [45].

Ayrıca aynı araştırma grubu tarafından yapılan diğer bir çalışmaya göre ise, GB ekstraktlarının östrojen reseptörlerinin aktivitesini ve sentezini engelleyerek anti-östrojenik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir [46].

2.4.5. Ginkgo Biloba'nın Anti-Kanserojenik Etkileri

GB, çeşitli kanser hücreleri üzerinde engelleyici etkilere sahiptir. Meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada GB ekstraktının insan meme kanser hücrelerinin çoğalmasını ve büyümesini engellediği belirlenmiştir [47]. Ayrıca GB den izole edilen Bilobetin ve isoginkgetin molekülleri, HeLa hücrelerinde G2/m fazında hücre bölünmesini inhibe ettiği ve pro-apoptotik protein Bax ve kaspas 3'ü

active ederek apoptoza neden olabilir. Arıştırmalar bilobetin antiapoptotik protein Bcl-2'yi inhibe ederek apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir [48]. GB ekstraktından elde edilen glikozidik flavonoidlerin, antioksidan özelliklerinden dolayı tümör oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Sarkoma 108 taşıyan farelerde ve lökemi-1210 hücre hatları üzerinde yapılan çalışmada, bu hücrelerde sitotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir [49].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. DENEY HAYVANLARI

Selçuk Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan 30.04.2021 tarihinde 2021/13 sayılı Etik Kurul onayı alındıktan sonra çalışmamız başlatılmış olup tüm çalışma süreci deney hayvanları çalışma etiğine uygun şekilde yürütüldü. Çalışmanın stereolojik ve histolojik uygulamaları Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmamızda 12 haftalık, ortalama 230-280 gram 20 gebe Wistar Albino sıçan (Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma merkezi) kullanıldı. Sıçanlar altları plastik, üstü tel olan özel kafeslere yerleştirildi. Çalışma boyunca sıçanlar oda ısısında ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), %20-30 nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan ortamda takip edildi. Sıçanlara yeteri kadar çeşme suyu ve standart sıçan pelet yemi verildi.



Şekil 3.1. Mevcut çalışmanın wistar albino sıçanları.

3.2. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Sıçanlar, rastgele örnekleme yöntemi ile seçilerek ve her grupta üç adet erkek sıçan, dört diőı sıçandan oluşan her bir çalışma grubunun kafesine konuldu. Bir gece uygun şartlar altında bekleyen sıçanlarda ertesi gün vajinal plak gözlenenler gebe kabul edildi ve o gün 0. gün olarak kaydedildi. Sıçanlar bunu takiben deney aşamasına alınarak gebelikleri süresince deney işlemlerine tabi tutuldular.

Her grupta 4 gebe sıçan olacak şekilde aşağıda belirtildiği gibi 5 gruba ayrıldılar:

- I. grup: Kontrol grubu (n:4)
- II. grup: Sham grubu (sham) (n:4)
- III. grup: Siklofosfamid (SK) grup (n: 4)
- IV. grup: Ginkgo biloba (GB) (n: 4)
- V. grup: Siklofosfamid + Ginkgo biloba (SK+GB) (n: 4)

Deneye başlamadan önce ağırlıkları 230-280 g arasında değişen her gruptaki sıçanlar ayrı ayrı çalışma grubu kafeslerine konuldu ve deneme işlemleri için hazır tutuldular. Doğumdan sonra yavrulara herhangi bir işlem yapılmadan 32 gün süresince uygun koşullarda yaşamaları sağlandı. Bu çalışmanın sonunda bir gruptaki her bir anne sıçanın iki diőı yavrusu alınarak sekiz hayvandan oluşan deney sonrası gruplar oluşturuldu. Daha sonra 32 günlük diőı sıçanlara anestezi altında kardiyak perfüzyon yapıldıktan sonra beyincikleri çıkarıldı.

I. Grup: Kontrol Grubu

Bu gruptaki sağlıklı deneylerden oluşan gebe sıçanlar üzerinde herhangi bir işlem yapılmadı. Doğum sonrası yavru sıçanlar anne sütü ve standart diyet (pelet yem) ile ortalama 32 gün boyunca beslendi. Diyet kısıtlaması yapılmadı ve içme suyu olarak musluk suyu verildi. Yavrular üzerinde herhangi bir işlem yapılmadı. Bu gruptaki yavru diőı sıçanlar 32 gün bekleme süresinden sonra kardiyak perfüzyon yapıp beyincik dokuları çıkarıldı.

II. Grup: Sham Grubu

Sterse maruz kalan deneylerden oluşan sıçanlar standart pelet diyet ile gebelikleri süresince ortalama 21 gün boyunca beslenendi. Sıçanların diğer gruplarda stres yaşayacakları düşünülerek, bu grup oluşturuldu. Sıçanlara gebeliğin 13. gününden itibaren ağızdan fizyolojik salin verildi. Bu gruptaki yavru dişi sıçanlar üzerinde herhangi bir işlem yapılmadı ve 32 günün sonunda kardiyak perfüzyon işlemleri yapıp beyincik dokuları çıkartıldı.



Şekil 3.2. Fizyolojik salin deney düzeneği.

III. Grup: Siklofosamid (SK)

Standart sıçan pelet yem ile gebelikleri süresince ortalama 21 gün beslendi ve içme suyu olarak musluk suyu verildi. Bu gruptaki her bir gebe sıçana 13. günden itibaren 20 mg/kg tek bir doz SK intraperitoneal olarak uygulandı. Bu grubun yavru dişi sıçanları üzerinde herhangi bir işlem yapılmadı ve 32 günün sonunda kardiyak perfüzyon işlemleri yapıp beyin dokuları çıkarıldı.



Şekil 3.3. Siklofosfamide maruz kalma deney düzeneği.

IV. Grup: Ginkgo Biloba (GB)

Bu gruptaki denekler standart sıçan pelet yem ile deney süresince ortalama 21 gün beslendi ve içme suyu olarak musluk suyu verildi. Her bir sıçana 13. gün itibari ile gebelikleri süresince her gün oral olarak 80 mg/kg GB verilmiştir. Bu gruptaki yavru dişi sıçanlar üzerinde herhangi bir işlem yapılmadı ve 32 günün sonunda her bir hayvana pasif sakinme testi uygulandı ve 2 günlük test süresinin ardından kardiyak perfüzyon işlemleri yapıp beyin dokuları çıkartıldı.



Şekil 3.4. Ginkgo biloba maruz kalma deney düzeneği.

V. Grup: Siklofosamid + Ginkgo biloba (SK+GB)

Bu gruptaki denekler standart sıçan pelet yem ile deney süresince ortalama 21 gün beslendi ve içme suyu olarak musluk suyu verildi. her bir gebe sıçana, 13. günde tek doz intraperitoneal olarak 20 mg/kg SK yanı sıra 13. gün itibari ile gebelikleri süresince oral olarak 80 mg/kg/gün GB verildi. Doğumdan sonra yavru dişi sıçanlar üzerinde herhangi bir işlem yapılmadı ve 32 günün sonunda kardiyak perfüzyon işlemleri yapıp beyincik dokuları çıkartıldı.

Çizelge 3.1. Gebe sıçanların çalışma ve kontrol gruplarının tanımlanması.

I. grup	4 adet dişi sıçan + 3 adet erkek sıçandan oluşur	Kontrol grup, sıçanlar üzerinde herhangi bir işlem yapılmadı
II. grup	4 adet dişi sıçan + 3 adet erkek sıçandan oluşur	Sham grup, sıçanlara fizyolojik salın verildi
III. grup	4 adet dişi sıçan + 3 adet erkek sıçandan oluşur	Siklofosfamid grup, sıçanlar siklofosfamide maruz bırakıldı
IV. grup	4 adet dişi sıçan + 3 adet erkek sıçandan oluşur	Ginkgo biloba grup, sıçanlara ginkgo biloba uygulandı
V. grup	4 adet dişi sıçan + 3 adet erkek sıçandan oluşur	Siklofosfamid + ginkgo biloba grup, sıçanlar siklofosfamid ve ginkgo bilobaya maruz bırakıldı

Çizelge 3.2. Yavru sıçanların çalışma ve kontrol gruplarının tanımlanması.

I. grup	8 dişi yavrudan oluşur	Kontrol grubu, sıçanlar herhangi bir uygulamaya tabi tutulmadı
II. grup	8 dişi yavrudan oluşur	Sham grubu, sıçanlar herhangi bir uygulamaya tabi tutulmadı
III. grup	8 dişi yavrudan oluşur	Siklofosfamid grup, sıçanlar herhangi bir uygulamaya tabi tutulmadı
IV. grup	8 dişi yavrudan oluşur	Ginkgo biloba grup, sıçanlar herhangi bir uygulamaya tabi tutulmadı
V. grup	8 dişi yavrudan oluşur	Siklofosfamid + ginkgo biloba grup, sıçanlar herhangi bir uygulamaya tabi tutulmadı

3.3. DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

3.3.1. Perfüzyon

Hayvanlar perfüzyon işlemine alınmadan önce tartıldı. Deney suresinin sonunda (32. gün), perfüze edilerek beyincik dokuları çıkarıldı. Hayvanlar, perfüzyona alınmadan 12 saat önce aç tutuldu ve perfüzyon işlemi için gerekli olan tüm solüsyonlar ve

maddeler bir gün önceden hazırlandı. Deney süresi sonunda tüm sıçanlara intramuscular (IM) ketamin (80-100 mg/kg vücut ağırlığına) ve xylazin (7-10 mg/kg vücut ağırlığına) uygulaması ile genel anestezi sağlandı. Derin anestezi altına alınan sıçanlar (alt ekstremite refleksi ile kontrol edildi) sırt üstü bir ızgara üzerine tespit edildikten sonra pens ve makas yardımıyla diyaframın altından, yukarı-sağa ve sola doğru ilerleyerek göğüs kafesi açıldı, kalp ortaya çıkarıldı.

Kalp çalışır vaziyetteyken perfüzyon setinin dokuya saplanacak olan plastik kanülü sol ventrikül apeksine yakın bir yerden girilerek kalbe yerleştirildi. Bu işlem ile ortak zamanlı olarak bir mikromakas yardımıyla sağ atriyumda küçük bir kesi yapıldı. Venöz kanın geldiği izlendi. Sağ atriumdan akan kanın rengi yaklaşık 1-1,5 dakika süresince berraklaşmaya kadar plastik kanül aracılığı ile intrakardiyak yoldan %0,9'luk serum fizyolojik uygulandı. Serum fizyolojik ile vücuttaki kan damarlarının lümenleri kandan temizlendikten sonra yine aynı yol kullanılarak yaklaşık 3-4 dakika zamanla tamponlanmış %10'luk nötral formalin verilerek tespit doğrulandı. Perfüzyon işlemi süresince sıçanlar izlendi ve formalin fiksasyonunun belirtisi olan ekstremitelere tetanik kasılmalar gözlemlendi. Beyincikler perfüzyonun bitiminden hemen sonra çıkarıldı.

Kafatasının beyincik ve kas kısmı uzaklaştırıldıktan sonra beyinciğin çıkartılması için kafatası kemikleri kemik makasıyla titizli bir şekilde kırıldı. Beyinciğin hasar görmemesine azami derecede dikkat edildi, beyincikleri tamamen çıkarıldı.

Disekte edilen beyincik dokuları %10'luk formol içeren özel şişelere konuldu ve bir hafta tespit solüsyonu içerisinde post fiksasyona tabi tutuldular. Bu arada tespit solüsyonu birkaç kez değiştirildi. Bir hafta fiksatif içerisinde bırakılan beyincikler histolojik takip işlemine alındı (Çizelge 3).

Çizelge 3.3. Beyinciklerin doku takibinde kullanılan kimyasallar ve süreleri.

Kimyasal Solüsyon	Süre
%70'lik alkol	1 gece
%80'lik alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
%100'lük alkol	1 saat
%100'lük alkol	1 saat
%100'lük alkol	1 saat
Ksilen + %100'lük alkol	25 dakika
Ksilen	35 dakika
Paraplast	1 saat (60 °C lik etüvde)
Paraplast	1 saat
Paraplast	1 saat

3.3.2. Rutin Histolojik Doku Takip İşlemi

Beyincikler %10'luk formol tespit solüsyonundan çıkarıldı ve bir gece akar suda yıkandı. Yıkama işleminin ardından çizelge 3'te gösterilen doku takibi prosedürlerine geçildi. Sıçanların beyincikleri histolojik doku takip işlemlerinden sonra 58°C sıcaklığındaki paraplast içine metal 'L' demiri destek ile gömüldüler (Çizelge 3, Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Doku takibi sonrasında L demirine gömülmüş beyincik dokuları.

3.3.3. Kesit Alma Yöntemi

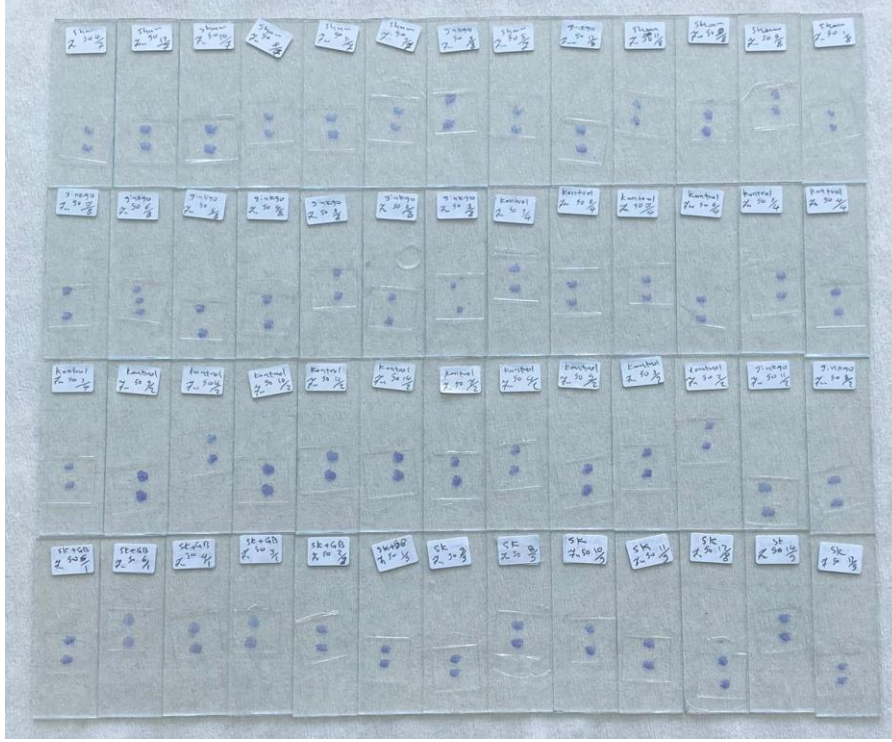
Çalışma için seçilen beyincik dokularından kesitlerin elde edilme aşamasına geçmeden önce bir ön çalışma yürütülerek çalışmanın stratejisi belirlendi. Ön çalışma ardında çalışmamız için sagittal düzlemde kesitlerin alınmasının uyumlu olduğuna karar verildi. Ardışık ilk disektor çift kesitinin rastgele seçilmesinden sonra kesitlere 1/50 oranında sistematik rasgele örnekleme (SRÖ) kuralı uygulandı. Hazırlanan bloklar, sagittal düzlemde, tek kullanımlık metal bıçaklar kullanılarak rotary mikrotomu ile 7 µm kalınlığında alındı (Şekil 3.6). Her 1/50 oranında 7 µm'lik ince kesitler alındı. Ayrıca histopatolojik inceleme için 5 µm kalınlığında doku kesitleri alındı. Her bloktaki beyincik horizontal düzlemde tümüyle kesildi. Kesit almaya başlamadan önce benmari içindeki su 45 °C'ye kadar ısıtıldı. Alınan kesitlerin bu havuzda tamamen açılması sağlandı. Boyama işlemine başlamadan önce bir gece etüvde bekletilen kesitlerin paraplasttan uzaklaştırılarak lama yapışması sağlanmış oldu. Bu örnekleme sonucunda her bir hayvandan ortalama 18 kesit elde edildi.



Şekil 3.6. Rotary mikrotom.

3.3.4. Boyama İşlemi

Doku kesitleri kresil viyole ile boyandı. Kresil viyole boyama çözeltisi, 0.1 g kresil viyole 100 ml distile su içinde çözülerek hazırlandı. Kesitlerin boyanması sırasında kullanılan boya ve solüsyonlar Çizelge 3.3'te belirtildiği gibi hazırlandı. Standart kresil viole boyama işlemleri yapılırken, doku özelliklerine göre boyada bekleme süresi, boyanın sıçan beyincik dokusuna penetrasyon süresi dikkate alınarak üç dakika olarak belirlendi. Boyama işlemi öncesinde, kresil viyole çözeltisi etüve konularak yaklaşık 58°C sıcaklığa kadar ısıtıldı. Daha sonra kesitlerinin boyanması için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı (Çizelge 3.4).



Şekil 3.7. Kresil viyole boyaması sonrası kesitlerin görünümü.

Çizelge 3.4. Kesitlerin boyanmasında kullanılan kimyasallar ve süreleri.

Kullanılan Solüsyonlar	Süreleri
Ksilen (×3)	30 dakika
%100'lük alkol	10 dakika
%96'lık alkol	10 dakika
%80'lik alkol	10 dakika
%70'lik alkol	10 dakika
Distile su	10 dakika
Kresil viyole	2 dakika
Distile su	5 dakika
%70'lik alkol	3 dakika
%80'lik alkol	3 dakika
%96'lık alkol	3 dakika
%100'lük alkol	10 dakika
Ksilen	30 dakika
Ksilen	30 dakika

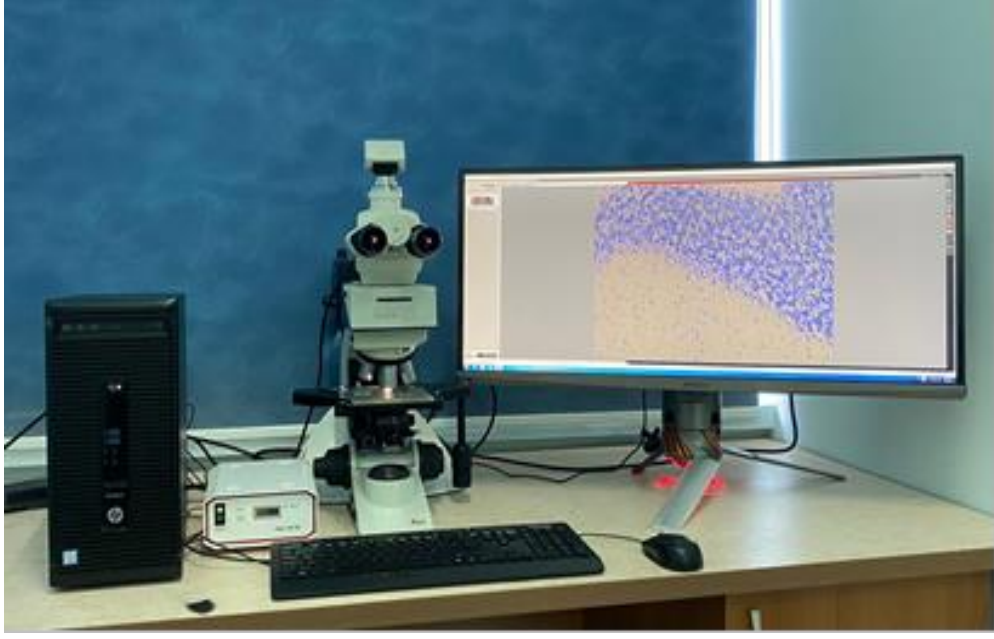
3.4. STEREOLOJİK ANALİZLER

3.4.1. Purkinje Hücrelerinin Sayısal Yoğunluğu

Toplam Purkinje hücre sayısının tahmini, tarafsız bir stereolojik yöntemi olan fiziksel disektör tekniği kullanılarak yapıldı [50]. Fiziksel disektör, "t" mesafesi ile ayrılmış iki fiziksel ardışık kesit tarafından oluşturulan sanal bir üç boyutlu hacimde mikroskopik parçacıkları tarafsız bir şekilde saymamıza izin veren bir yöntemdir. Bu metodun uygulanması için fiziksel olarak ayrı iki ardışık kesit gerekir. Bu iki kesit düzleminden biri "referans kesit", diğeri ise "gözlem kesit" olarak seçilmelidir. Ayırıcı ilkesinin temel kuralı, referans kesitinde görünen ancak gözlem kesitinde görünmeyen parçacık profillerini saymaktır. Böyle bir yaklaşım, örneklenen disektör çiftleri arasında yer alan parçacık uçlarının bulunmasını sağlar. Ayırıcı çiftleri oluşturan kesit düzlemleri birbirine paralel olmalıdır. Bu hizalama doğru bir şekilde sağlanmazsa, elde edilen disektör hacim tahmini ve dolayısıyla parçacık tahmininin sayısal yoğunluğu yanlış olacaktır.

Uygun kesit aralığını ve örneklenen kesit sayısını belirlemek için bir pilot çalışma yapılmıştır. Pilot çalışmada her sıçandan SRÖ yoluyla elde edilen on sekiz çift kesit Purkinje hücrelerinin sayısal yoğunluğunu tahmin etmek için kullanıldı. Çalışmamız için kesit aralık oranı 1/50 idi. Her bir sıçan için 18 disektör çifti elde etmek için her doku bloğundan 7 um kalınlığında ardışık iki kesit alındı.

Her ardışık disektör çiftinin dört farklı sayma alanı, bir ekranlı mikroskobu kullanılarak x20 büyütmede fotoğraflandı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Beyincik kesitlerinin görüntülü mikroskop altında incelenmesi.

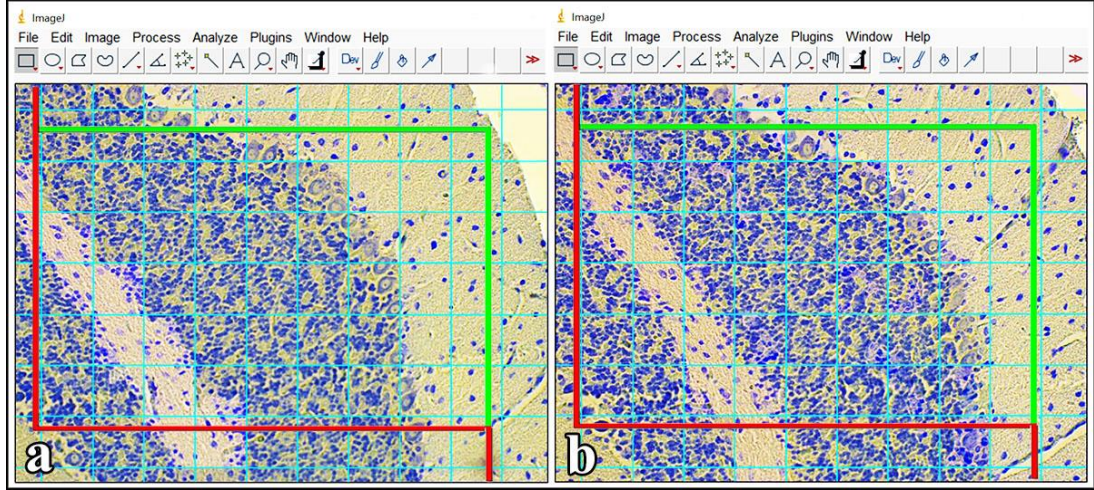
Görüntüler üzerinde tarafsız bir sayım çerçevesi kullanarak hücre sayımı yapılmıştır [51]. Tamamen sayım çerçevesi içinde bulunan ve dahil kenarlar (yeşil) üzerine isabet eden Purkinje hücre profilleri sayıldı; yasak (kırmızı) kenarlarına isabet eden izdüşmeler sayımdan çıkarıldı. Referans ve gözlem kesitlerinden elde edilen görüntüler ImageJ programı kullanılarak karşılaştırıldı (Şekil.3.10). Sayım çerçevesi kurallarına göre, referans kesitlerinde bulunan ancak gözlem kesitlerinde bulunmayan her Purkinje hücre profili sayıldı. Nöronların sayısal yoğunluğu şu şekilde hesaplandı [52]:

$$N_v = \frac{\sum Q -}{\sum v} \quad (3.1)$$

" $\sum Q$ ", disektör nöron sayısıdır ve " $\sum v$ ", sayım çerçevesinin toplam hacimleridir. Son olarak, toplam beyincik nöron sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı [52, 53]:

$$N \text{ (toplam Purkinje hücre sayısı)} = N_v \times V_{ref} \quad (3.2)$$

" N_v ", Purkinje hücrelerin sayısal yoğunluğu ve " V_{ref} ", ortalama beyincik hacmidir.



Şekil 3.9. Fiziksel disektör (a ve b) yönteminin stereolojik prosedürü izlenmektedir. Kırmızı çizgiler; yasak kenarlar, yeşil çizgiler; dahil kenarlar, a; referans kesit görüntüsü, b; gözlem kesit görüntüsünü göstermektedir.

3.4.2. Beyincik Hacmi

Her sıçanın beyinciğinin referans hacmi, Cavalieri metodu kullanılarak tahmin edildi [51, 52, 54]. Beyincik kesitlerinden fotoğraflanan görüntülere rastgele noktalı alan ölçüm cetveli yerleştirildi, ardından ilgili bölgelere isabet eden noktalar sayıldı. Bu işlem dokulardan örneklenen tüm kesitlerin ilgili bölgesinin alanı hesaplanırken yapılır. Sonrasında, beyincik kesitlerinin ilgili bölgesine isabet eden toplam nokta sayısı, nokta ile ilişkili alan ile çarpılması sonucunda yüzey alanı aşağıdaki şu şekilde hesaplandı:

$$\text{Alan } (A_1) = a(p) \times \sum p \quad (3.3)$$

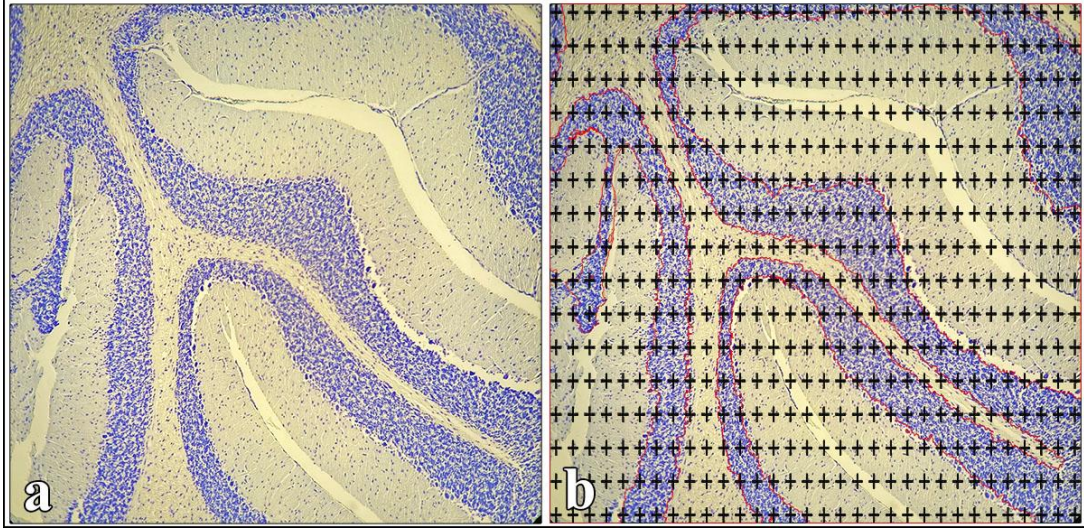
“a(p)”, kesit üzer isabet eden her bir noktanın alanını ve “ $\sum p$ ”, ilgilenilen bölgelere isabet eden toplam nokta sayısını belirlemektedir. Tüm kesitlerin toplam alan değeri aşağıdaki formül kullanılarak elde edildi:

$$\text{Alan } (A) = A_1 + A_2 + A_3 + \dots \quad (3.4)$$

Son olarak, beyinciklerin ilgi bölgelerinin hacimleri şu şekilde hesaplandı:

$$\text{Volume } (v) = \sum A \times t \quad (3.5)$$

"t", her kesitin ve kesit aralığının toplam kalınlığıdır ve " ΣA ", ilgili bölgelerin toplam alanıdır.



Şekil 3.10. Cavalieri yönteminin stereolojik prosedürü izlenmektedir.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz, IBM sürüm 25.0 SPSS yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Veriler normal olarak dağılmıştır, bu nedenle analiz için One-Way ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak ifade edildi. 0,05'ten küçük P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BÖLÜM 4

BULGULAR

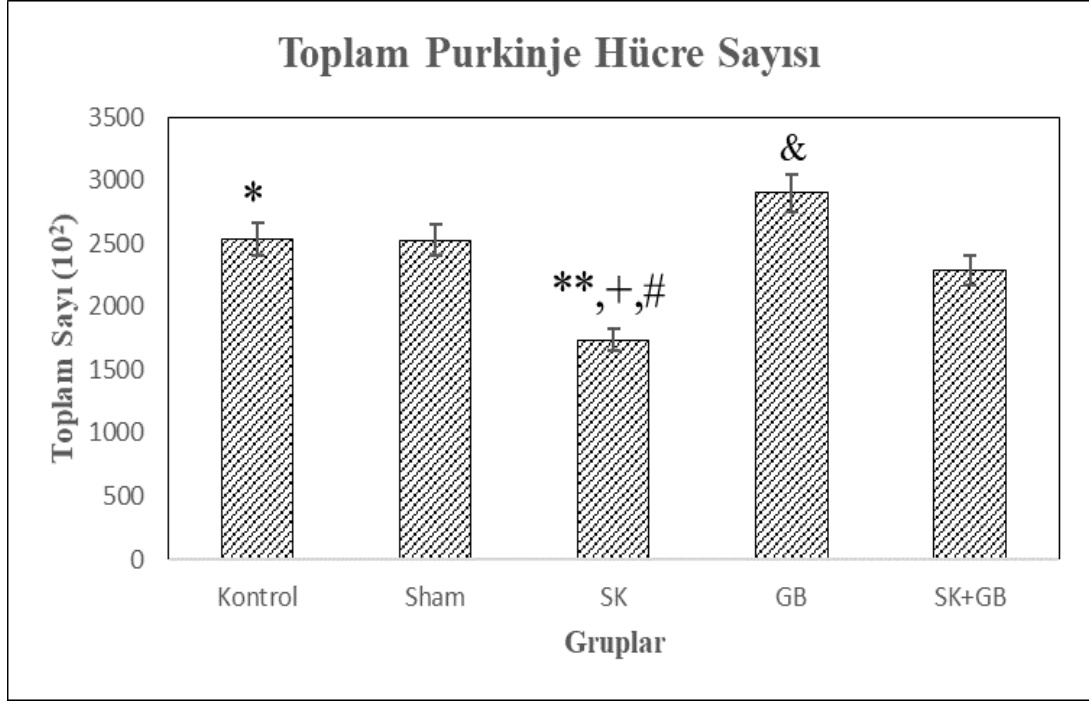
4.1. STEREOLOJİK BULGULAR

4.1.1. Toplam Purkinje Hücre Sayısı

Verilerin istatistiksel analizi, SK grubunda toplam Purkinje hücre sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalttığını göstermiştir ($p<0,01$). Sham, GB ve SK+GB ile kontrol gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. SK+GB grubundaki sıçanlara GB uygulanmasının SK grubuna göre toplam Purkinje hücre sayısında anlamlı bir artış saptlandı ($p<0,05$). Ayrıca SK ($p<0,01$) ve SK+GB ($p<0,01$) gruplarında toplam Purkinje hücre sayısı GB grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1.).

Çizelge 4.1. Toplam purkinje hücre sayı değerleri ($\times 10^2$) (Ortalama \pm SD).

Gruplar	Purkinje Hücre Sayıları
Kontrol	2536 \pm 115
Sham	2527 \pm 98
SK	1736 \pm 86
GB	2899 \pm 44
SK+GB	2285 \pm 12



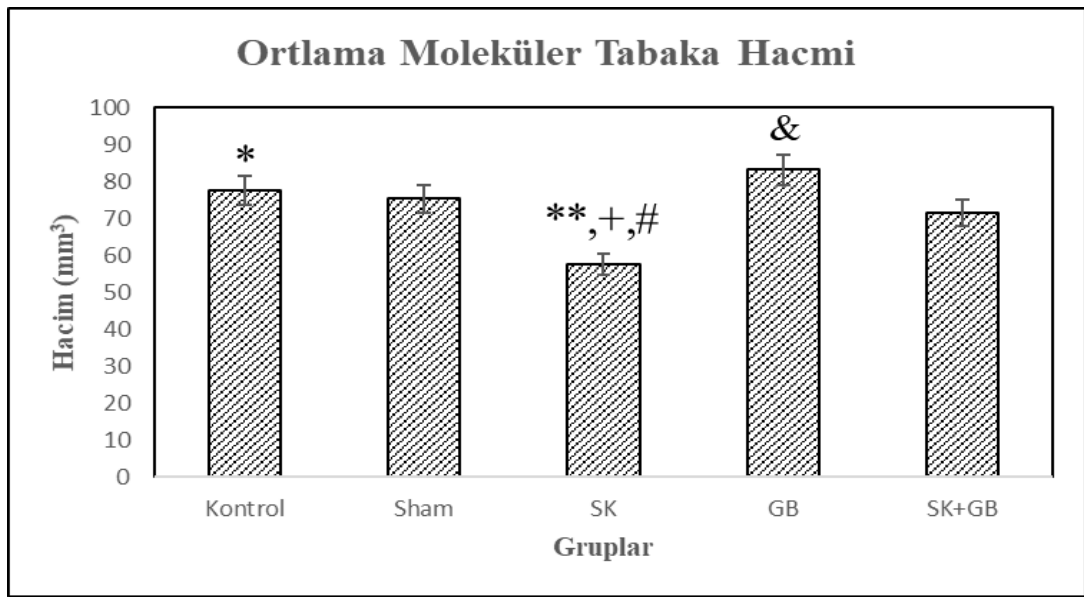
Şekil 4.1. Toplam purkinje hücre sayı değerleri. *; SK ile kontrol grupları arasında ($p<0,01$), **; SK ile sham grupları arasında ($p<0,01$), +; SK ile GB grupları arasında ($p<0,01$), #; SK ile SK+GB grupları arasında ($p<0,05$). &; GB ile SK+GB grupları arasında ($p<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir

4.1.2. Ortalama Moleküler Tabaka Hacmi

Bulgularımız, SK'nın ortalama moleküler tabaka hacmi üzerine olumsuz bir etkisi olduğunu gösterdi. SK grubunda ortalama moleküler tabaka hacmi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,01$). Aksine GB'nin SK+GB grubuna uygulanması, SK grubuna göre ortalama moleküler tabaka hacminde anlamlı bir artışla sonuçlandı ($p<0,01$). Sham, GB ve SK+GB ile kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Buna ek olarak, SK ($p<0,01$) ve SK+GB ($p<0,05$) gruplarında GB grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.2.).

Çizelge 4.2. Ortalama moleküler tabaka hacim değerleri (Ortlama ± (SD)).

Gruplar	Ortalama Moleküler Tabaka Hacmi
Kontrol	77,57 ± 3,72
Sham	75,26 ± 2,43
SK	57,55 ± 2,43
GB	83,21 ± 1,29
SK+GB	71,10 ± 3,46



Şekil 4.2. Ortalama moleküler tabaka hacim değerleri. *; SK ile kontrol grupları arasında ($p<0,01$), **; SK ile sham grupları arasında ($p<0,01$), +; SK ile GB grupları arasında ($p<0,01$), #; SK ile SK+GB grupları arasında ($p<0,05$). &; GB ile SK+GB grupları arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir.

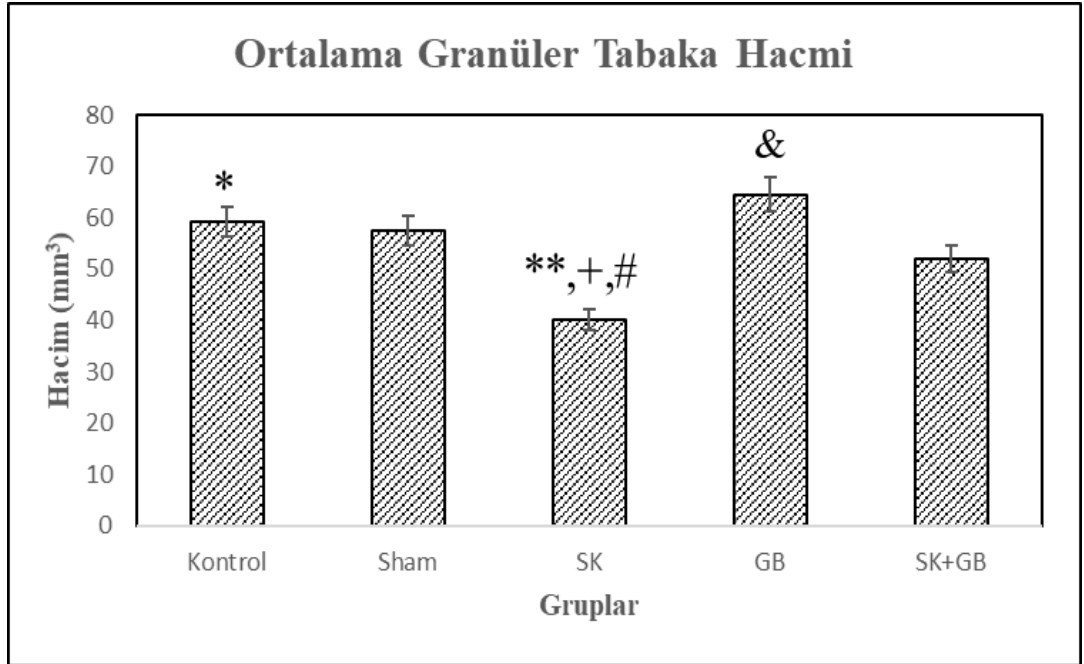
4.1.3. Ortalama Granüler Tabaka Hacmi

Verilerin istatistiksel analizi sonucunda, SK grubunda ortalama granüler tabaka hacmi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p<0,01$). Ayrıca SK+GB gruplarında SK grubuna göre anlamlı bir artış bulundu ($p<0,05$). Sham, GB ve SK+GB grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Bulgularımıza göre SK ($p<0,01$) ve SK+GB ($p<0,05$)

gruplarında GB grubuna göre anlamlı bir azalma tespit edildi (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.3.).

Çizelge 4.3. Ortalama granüler tabaka hacim değerleri (Ortlama \pm SD).

Gruplar	Ortalama Granüler Tabaka Hacmi
Kontrol	59,16 \pm 1,40
Sham	57,59 \pm 1,68
SK	40,18 \pm 2,89
GB	64,55 \pm 2,71
SK+GB	52,19 \pm 3,98



Şekil 4.3. Ortalama granüler tabaka hacim değerleri. *; SK ile kontrol grupları arasında ($p<0,01$), **; SK ile sham grupları arasında ($p<0,01$), +; SK ile GB grupları arasında ($p<0,01$), #; SK ile SK+GB grupları arasında ($p<0,05$). &; GB ile SK+GB grupları arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir.

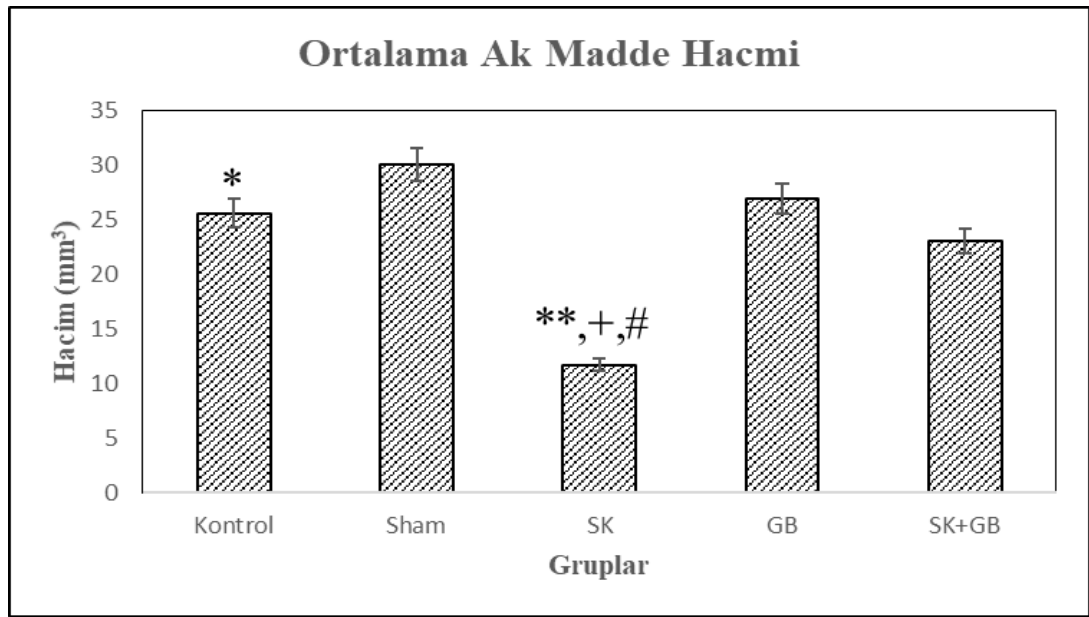
4.1.4. Ortalama Ak Madde Hacmi

SK grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında ak madde hacmi istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,01$). Yanısıra SK+GB gruplarındaki ak madde hacmi SK

grubuna göre artırmıştır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Buna ek olarak, SK ($p < 0,01$) grubunda GB grubuna göre anlamlı azalmıştır. Sham, GB ve SK+GB ile kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.3).

Çizelge 4.4. Ortalama ak madde hacim değerleri (Ortlama \pm SD).

Gruplar	Ortalama Ak Madde Hacmi
Kontrol	25,56 \pm 0,63
Sham	30,01 \pm 4,58
SK	11,66 \pm 2,42
GB	26,91 \pm 0,00
SK+GB	23,17 \pm 2,36



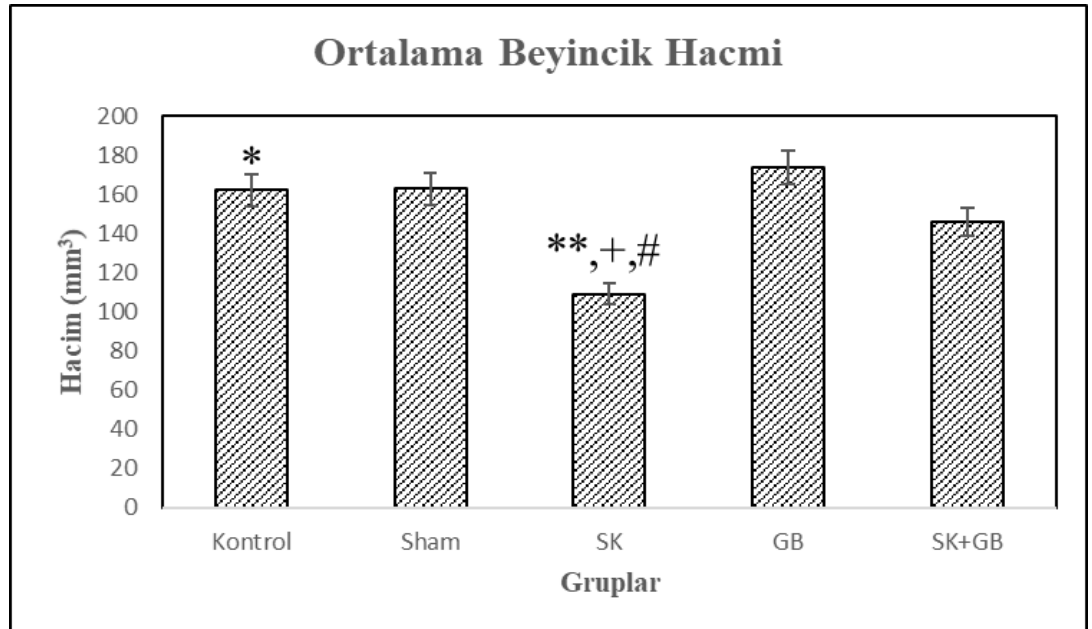
Şekil 4.4. Ortalama ak madde hacim değerleri. *; SK ile kontrol grupları arasında ($p < 0,01$), **; SK ile sham grupları arasında ($p < 0,01$), +; SK ile GB grupları arasında ($p < 0,01$), #; SK ile SK+GB grupları arasında ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir.

4.1.5. Ortalama Beyincik Hacmi

Stereolojik sonuçlar SK grubunda ortalama beyincik hacimde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gösterdi ($p < 0,01$). SK+GB grubundaki sıçanlara GB uygulanması, SK grubuna kıyasla ortalama beyin hacmini anlamlı olarak artırmıştır ($p < 0,05$). Buna ek olarak, sham ($p < 0,01$) ve GB ($p < 0,01$) gruplarında SK gruba göre anlamlı bir artış gözlemlendi. SK+GB, GB ve sham grupları ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Çizelge 4.5. ve Şekil 4.5.).

Çizelge 4.5. Ortalama beyincik hacim değerleri (Ortlama \pm SD).

Gruplar	Ortalama Beyincik Hacmi
Kontrol	162,31 \pm 4,83
Sham	162,87 \pm 5,21
SK	109,40 \pm 7,72
GB	174,68 \pm 5,51
SK+GB	146,46 \pm 9,53



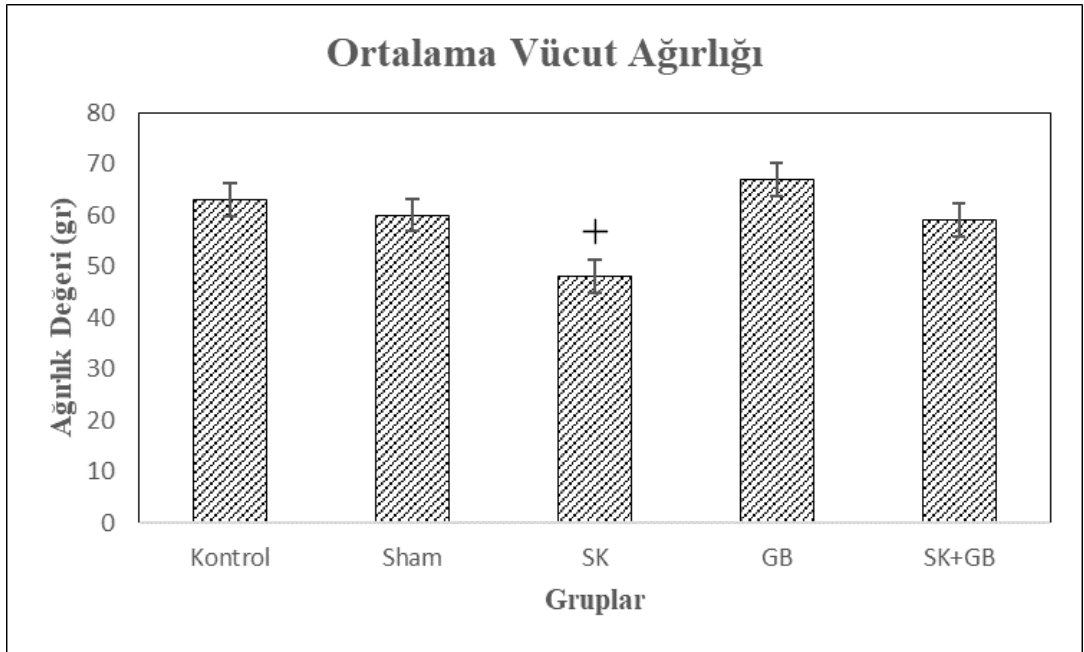
Şekil 4.5. Ortalama beyincik hacmi değerleri. *; SK ile kontrol grupları arasında ($p < 0,01$), **; SK ile sham grupları arasında ($p < 0,01$), +; SK ile GB grupları arasında ($p < 0,01$), #; SK ile SK+GB grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir.

4.1.6. Ortalama Vücut Ağırlığı

Verilerin istatistiksel analizi sonucunda, SK grubunda ortalama vücut ağırlığı kontrol grubuna göre azaldı ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. SK grubunda ortalama vücut ağırlığı GB grubuna göre anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,01$) (Çizelge 4.6. ve Şekil 4.6.).

Çizelge 4.6. Ortalama vücut ağırlık değerleri.

Gruplar	Ortalama Vücut Ağırlığı
Kontrol	62,500 ± 2,53
Sham	60,83 ± 1,99
SK	48,33 ± 5,85
GB	69,16 ± 3,58
SK+GB	61,00 ± 4,32



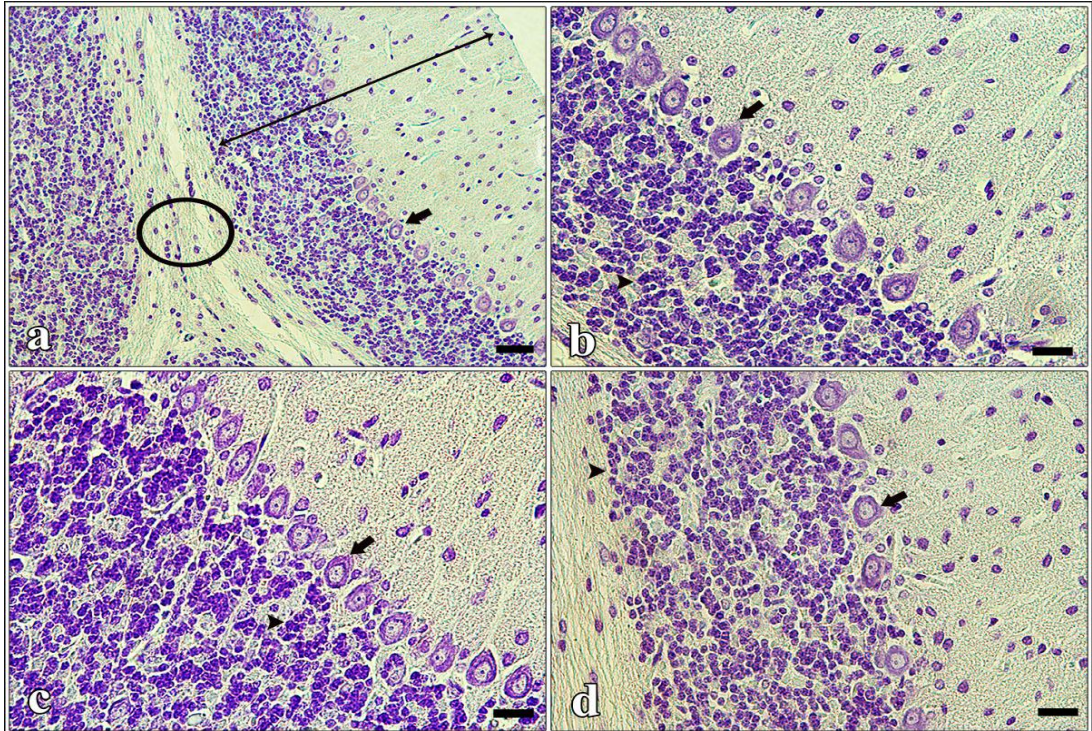
Şekil 4.6. Ortalama vücut ağırlık değerleri. +; SK ile GB grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,01$).

4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

Kontrol ve diğer deney gruplarına ait beyincik doku örneklerinin kresil vioyle ile boyanmış kesitlerinin ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda elde edilen histolojik ve histopatolojik sonuçlar aşağıdadır.

4.2.1. Kontrol Grubunun Histolojik Bulguları

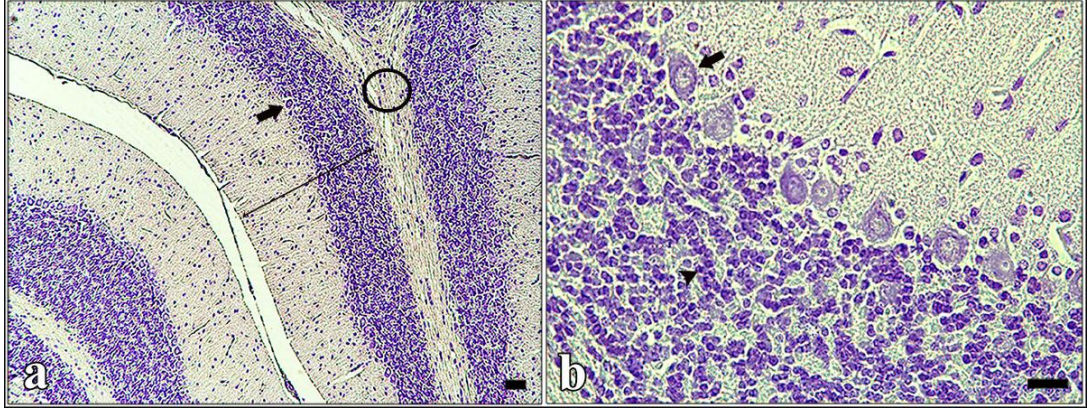
Kontrol grupuna ait deneklerin beyincik yapısında bulunan granüler tabaka, moleküler tabaka, ak madde ve Purkinje hücrelerinin histolojik olarak normal görünümde oldukları tespit edildi (Şekil 4.7). Histopatolojik incelemede nöronların sınırları düzgün ve nöronlar piramidal görünümdeydi. Ayrıca bu gruba ait hücrelerin çekirdekçikleri belirgin ve sağlıklı bir şekilde görüldü. Miyelinli sinir lifleri içeren beyaz madde beyaz, nöronların hücre gövdelerini içeren gri madde lacivert olarak gözlemlendi.



Şekil 4.7. Kontrol gruplarındaki beyincik dokularının ışık mikrografları izlenmektedir. Siyah oklar; sağlıklı Purkinje hücreleri, iki başlı ok; gri madde, daire; ak madde alanı göstermektedir. Ölçek çubukları: 50 µm.

4.2.2. Sham Grubunun Histolojik Bulguları

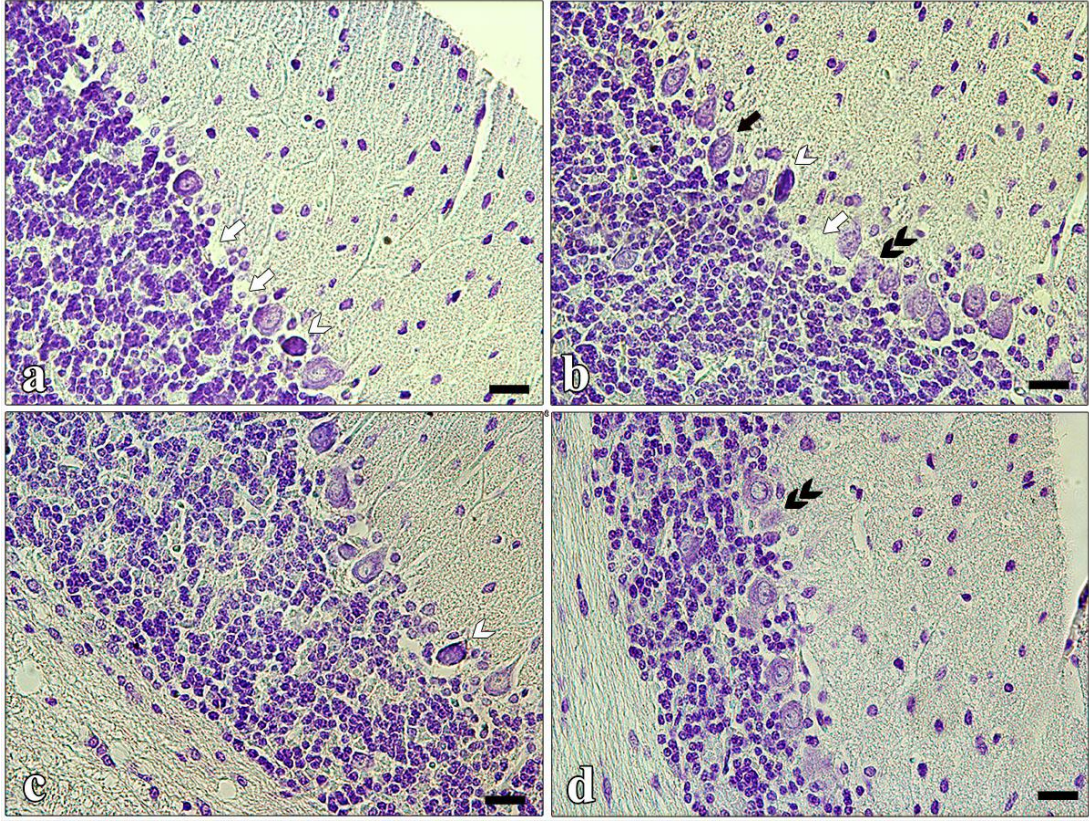
Fizyolojik salin verilen grubunun beyinciklerindeki yapısında bulunan granüler tabaka, moleküler tabaka, ak madde ve Purkinje hücrelerinin histolojik olarak kontrol grubuna göre benzer olduğu tespit edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Sham gruplarındaki beyincik dokularının ışık mikrografları izlenmektedir. Siyah oklar; sağlıklı Purkinje hücreleri, iki başlı ok; gri madde, daire; ak madde alanı göstermektedir. Ölçek çubukları: 50 µm.

4.2.3. SK Grubunun Histolojik Bulguları

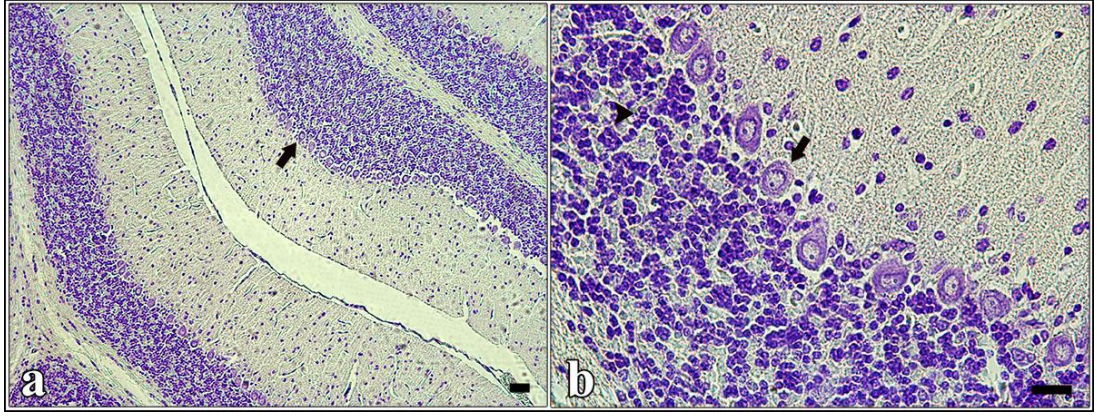
SK'ya maruz bırakılan grubun beyinciklerinde bulunan granüler tabaka, moleküler tabaka, ak madde ve Purkinje hücrelerinin histolojik olarak kontrol veya GB gruplarına göre yapısal değişiklikleri ayırt edildi. Beyincik Purkinje nöron dizilimin diğer gruplara kıyasla dağınık olduğu dikkat çekti. Beyinciklerin Purkinje nöron hücrelerinin düzensiz dizilimi izlendi. Yanı sıra, Purkinje hücrelerinin bazı bölgelerdeki büzülme, dejenerasyon ve kaybı diğer gruplara göre daha fazla dikkat çekti (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Siklofosfamide gruplarındaki beyincik dokularının ışık mikrografları izlenmektedir. Siyah oklar; sağlıklı Purkinje hücreleri, beyaz ok; Purkinje hücrelerinin bulunmadığı bölgeleri, beyaz ok ucu; dejenere olan Purkinje hücreleri, çift siyah ok başı; Purkinje hücrelerinde büzülme göstermektedir. Ölçek çubukları: 50 µm.

4.2.4. GB Grubunun Histolojik Bulguları

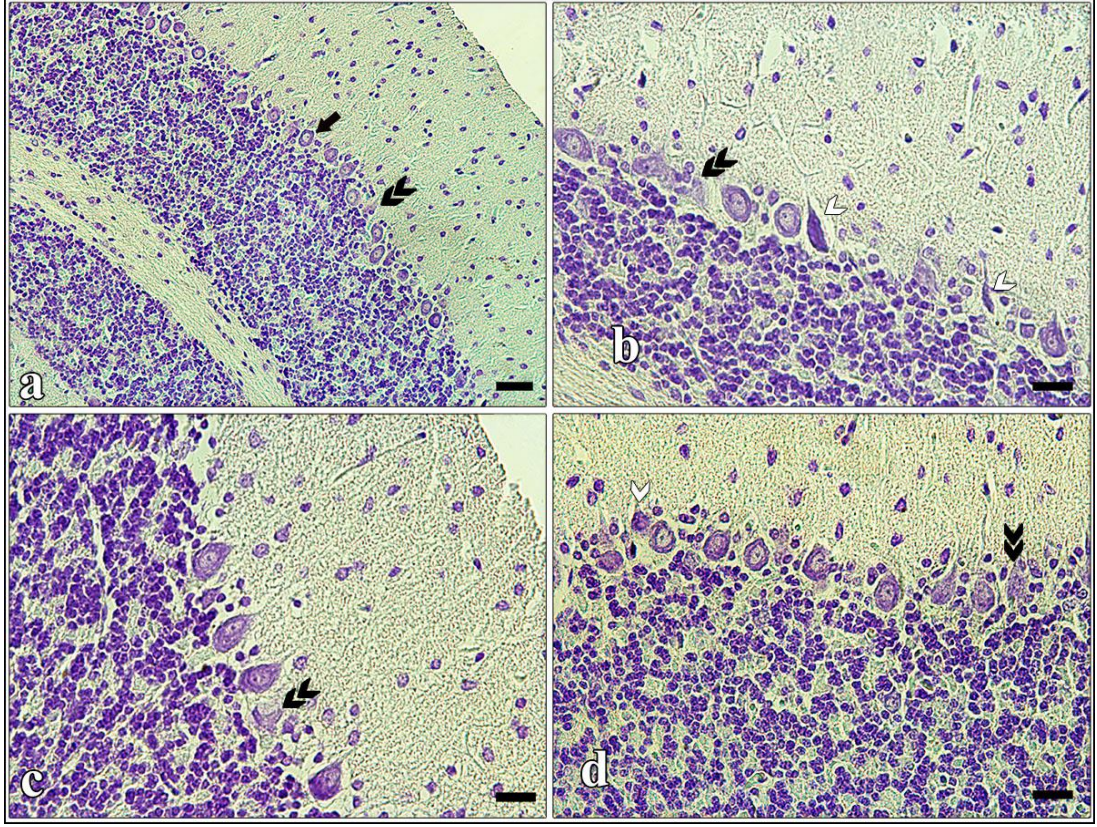
Bu gruba ait Purkinje hücrelerinin düzenli diziliş ve belirgin çekirdekçiklere sahip olduğu ve daha sağlam olduğu gözlemlendi. Beyincik yapısında bulunan granüler tabaka, moleküler tabaka ve ak madde histolojik olarak normal izlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Ginkgo biloba gruplarındaki beyincik dokularının ışık mikrografları izlenmektedir. Siyah oklar; sağlıklı Purkinje hücreleri göstermektedir. Ölçek çubukları: 50 µm.

4.2.5. SK+GB Grubunun Histolojik Bulguları

SK+GB grubuna ait beyinciklerin yapısında SK grubuna göre histolojik olarak fark olduğu gözlemlendi. SK+GB grubunun serebellum yapısında SK grubuna göre histolojik farklılık olduğu gözlemlendi. Bu grupta SK grubuna göre Purkinje hücrelerinin büzülmesi, dejenerasyonu ve kaybı daha az gözlemlenmiş, dizilimlerinin daha düzenli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. SK+GB gruplarındaki beyincik dokularının ışık mikrografları izlenmektedir. Siyah oklar; sağlıklı Purkinje hücreleri, beyaz ok ucu; dejenere olan Purkinje hücreleri, çift siyah ok başı; Purkinje hücrelerinde büzülme göstermektedir. Ölçek çubukları: 50 µm.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra insanların ölümüne neden olan en önemli hastalıktır. Günümüzde yaklaşık her dört kişiden bir kişi kansere yakalanma riski ile karşı karşıyadır [55]. Kanserler, kanserli dokunun cerrahi olarak uzaklaştırılması, kemoterapi ve radyoterapi ile tedavi edilebilirler. Çok nadir de olsa kendiliğinden ortadan kaybolurlar. Bu tedaviler içerisinde yaygın olarak kullanılan yöntem kemoterapik ajanlarla kanserli hücrelerin tüm vücutta azaltılması veya yok edilmesidir. Kemoterapide kullanılan ilaçlardan bir grup olan alkilleyici ajanlar, DNA'ya bağlanarak replikasyonu ve ardından kanserli hücrelerin çoğalmasını engellerler. Bu ajanlardan birisi olarak SK, kanser ve tümör hücrelerinin çocuk ve yetişkinlerde ortadan kaldırılmasında yaygın olarak kullanılır. Ancak bu alkilleyici ajanlar kanserli hücreleri seçici olarak öldürmedikleri için yan etkilere ve diğer doku ve organların fonksiyonlarının bozulmasına neden olurlar [12].

İnsanlarda beyincik, beynin diğer bölümlerinden farklı olarak, hamileliğin üçüncü trimesterinde embriyonun beyninin en gelişme gösteren kısmıdır. Beyincik, çocuklarda hasar görmeye en yatkın beyin bölümlerinden birisidir. Bu organın korteksi basit bir tabakadır ve doğumdan sonra, granül nöron progenitorleri gelişmekte olan dış granül tabakasında hızla çağılır. Bu granüler hücreler, gelişim döneminde çevresel faktörlere karşı çok hassas olurlar. Bu nedenle, SK bir kemoterapötik ilaç olarak, prenatal dönemde beyincik üzerinde toksik bir etkiye sahip olabilir [56].

Ayrıca SK, oksidatif stresi arttırarak toksik etkiye de neden olabilir. Bu antikanser ilaç, lipid peroksidasyonu artırır ve antioksidan sistemi baskılayarak oksidatif stresin artmasına neden olur. SK'nın beyin ve beyincikte lipid peroksidasyonuna bağlı olarak MDA (malon dialdehit) ve hidrojen peroksit seviyesini artırdığı belirlenmiştir

[6, 21, 57]. Ayrıca katalaz, SOD ve glutatyon S-transferaz enzim seviyelerini anlamlı derecede azalttığı da bildirilmiştir. Oyagbemi ve ark. yaptıkları çalışmada 100 mg/kg dozunda SK kullanımının merkezi sinir sistemi üzerindeki olumsuz etkilerini araştırmıştır [58]. Bulguları, SK uygulamasının sıçan beyinde hem beyincikte hem de beyincikte nörotoksisitelere katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bitkilerden elde edilen antioksidan özelliklere sahip moleküller, oksidatif stresi azaltarak SK'nın toksik etkisine karşı hücreleri korur [59].

Gruplara ait sıçanların beyinciklerindeki hücre sayısı ve katman hacimlerini ölçmek için tarafsız bir şekilde stereolojik yöntemler kullanıldı. Stereolojik presipler, kesitlerdeki doku yapısının nicel parametrelerinin belirlenmesi için verimli ve güvenilir araçlar sağlar. Çalışmada, fiziksel disektör ve cavalieri yöntemleri ışığında, sıçanların Purkinje nöronlarının sayısı ve beyinciklerin moleküler tabaka, granüler tabaka ve ak madde tabakası yanı sıra beyincik hacimleri tarafsız bir şekilde elde edilmesi sağlanmıştır.

Bu çalışma, 32 günlük Wistar albino sıçanlarda doğum öncesi SK'ya maruz kalmanın neden olduğu yapısal beyincik değişiklik üzerinde GB'nin koruyucu etkisini stereolojik yöntemlerle araştırdı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; SK grubundaki sıçanlara intraperitoneal olarak uygulanan SK, beyinciklerde moleküler tabaka, granüler tabaka ve ak maddenin ortalama hacmini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır. Ayrıca SK grubunda ortalama beyincik hacmi de kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Bu araştırma sonuçları, SK uygulamasının sıçan beyincik üzerinde zararlı etkiye neden olduğunu göstermiştir. Stereolojik bulgularımız, SK uygulaması ile purkinje hücresi sayısı arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. SK grubundaki sıçanlarda toplam purkinje hücre sayısı kontrol ya da GB grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır.

SK'nın hayvanlarda beyin ve beyincik üzerine olan etkilerini inceleyen çok sayıda çalışma yapılmıştır [21]. Aynı araştırmacıların yapmış oldukları ayrı bir çalışmada ise yine intraperitoneal olarak verilen SK'nın ratların beyinde MDA seviyesini artırdığı belirlenmiştir [21, 57]. Sprague-Dawley sıçanları ile yapılan çalışmada ise, 28 haftalık sıçanlara SK (100 mg/kg) ve Edaravone (10 mg/kg) verilmiş. Yapılan bir

çalışmada, 28 haftalık Sprague-Dawley sıçanlara 100 mg/kg SK verilmesi, CAT, SOD ve GPX antioksidan enzimlerinin aktivitelerinde anlamlı derecede azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. MDA'nın artışı ve hücrelerde antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen azalma, hücrelerde oksidatif hasarın artmasına ve DNA'da kırılmalara neden olmuştur. Artan DNA kırılmaları, hücrelerin apoptoza neden olarak organlardaki hücre sayısında azalmaya neden olur [21, 57]. SK'nın farelerin beyinlerinde oksidatif strese neden olduğunu gösteren diğer bir çalışmada ise tek doz SK verilen farelerin beyinlerinde malon dialdehit, dienler ve hidrojen peroksitin arttığı belirlenmiştir [60].

Tavuk embriyoları ile yapılan diğer bir çalışmada 6-19 günlük civcivlere 0,05 mg SK verilmesine bağlı olarak beyincikteki Purkinje hücrelerinde hasarlar ve beyinciğin toplam büyüklüğünde azalma belirlenmişti [61]. Ayrıca dış granüler tabakanın inceliğinde de bir artış olduğunu rapor etmişlerdir. Flanigan ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada C57BL/6J farelere 4 hafta boyunca SK (CYP) ve doxorubicin (DOX)+SK uygulamışlardır. Onuncu haftanın sonunda farelerin dentat girus morfolojisini ve hippokampus çıkıntılarının yoğunluğu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlar, SK ve DOX+SK verilen farelerin dentate gyrustaki çıkıntılarının yoğunluğunun önemli derecede azaldığı göstermiştir [62].

Tavuk embriyoları ile yapılan başka bir çalışmada, 0,5 mg SK enjekte edilen tavuk yumurtalarından elde edilen embriyoların beyinciklerindeki hücre sayısında ciddi azalma olduğu belirlendi. Hücre döngünün ve çoğalmasının engellenmesine bağlı olarak yapısal bozulmalar ve ölümler meydana gelmiştir. Histolojik değerlendirmelere bakıldığında ise beyinciğin bütün tabakalarındaki hücre sayısında çok yüksek oranda hücre hasarları ve kaybı izlenmiştir. Bunun nedeni olarak SK'nın hücre proliferasyonunu azalttığını ve apoptozu arttırdığını göstermişlerdir [63].

Lyons ve ark'ının başka bir çalışmada ratlara uygulanan SK'nın (30 mg/kg) 7. günün sonunda hipokampustaki sinir nöron hücrelerinde azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir [64].

Hippokampus üzerine SK'nın etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise 40 mg/kg verilen farelerde hippocampustaki nöron hücrelerinin oluşumunu etkilendiğinden dolayı hippocampusun fonksiyonları, öğrenme ve hafızanın etkilendiği gösterilmiştir SK'nın hipokampus üzerindeki etkilerini araştıran başka bir çalışmada, 40 mg/kg verilen farelerde hipokampustaki nöron hücrelerinin oluşumunu etkilediği için hipokampusun fonksiyonları, öğrenme ve hafızanın etkilendiği gösterilmiştir. Ayrıca immünokimyasal markerlar kullanılarak yapılan analizlerde 12. saatte hücre sayılarında azalma kanıtlanmıştır [65].

SK'nın sinir sistemi üzerindeki etkilerini araştıran başka bir çalışmada, 200-600 mg/kg SK'nın sıçanlara interperitoneal uygulanması, 8 günlük sıçanlarda serebral korteks, hipokampus dentat girustaki sinir hücrelerinin dendritlerinde ve aksonlarında değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Uzun süreli maruziyet nedeniyle sinir hücrelerinde dejenerasyon ve hücre ölümünde artışlar gözlenmiştir. İmmünokimyasal çalışmalar ile bu etkilerin kaspaz-3'ün artan aktivasyonuna bağlı olarak ortaya çıktığı belirlenmiştir [66].

Farelerin beyincik gelişimi üzerine SK uygulaması, granüler tabakadaki hücre sayısının azalmasına ve apoptozisinin artmasına neden olmuştur. Doğumdan 6 gün sonra farelere 50 mg/kg SK uygulanmıştır ve daha sonra beyin ve beyincikleri çıkarılarak beyincikteki granüler nöron progenitör hücreleri üzerine etkileri incelenmiştir. Sonuçlar, hücre sayısı ve beyincik hacminin azaldığını ve apoptozun arttırdığını göstermiştir. Diğer bir çalışmada ise 50 mg/kg/gün SK verilen sıçanların beyinciklerinin perivasküler bölgelerindeki glia ve astroglia hücrelerde büyük lezyonlar ortaya konulmuştur. Purkinje hücrelerinin nöronlara göre daha fazla etkilendiği belirlenmiştir [67].

Stereolojik sonuçlarımız, SK+GB gruptaki ortalama moleküler tabaka, granüler tabaka, ak maddenin ve beyincik hacimleri SK grubuna göre anlamlı olarak arttığını göstermiştir. Ayrıca SK+GB grubunda GB uygulaması, SK grubuna göre toplam Purkinje hücre sayısında anlamlı bir artışa neden olmuştur. Bu bulgulara göre, normal beyincik hacminde ve Purkinje hücre sayısında SK'nin neden olduğu azalmanın zararlı etkilerine karşı GB'nin güçlü bir antioksidan olduğu söylenebilir.

SK'nın olumsuz etkilerini gidermek için çok sayıda bitkisel ekstraktlar kullanılmaktadır. Bunların en önemlisi GB içeriğinde yer alan quercetindir. Sprague-Dawley sıçanlarıyla yapılan bir çalışmada, intraperiotal 200 mg/kg uygulanan SK verilmesi akciğer dokularında oksidatif stres parametrelerinde artışa neden olurken, quercetin oksidatif stresi azaltarak SK'nın olumsuz etkisine karşı hücreleri koruduğu bildirilmiştir [68].

GB'nin en önemli bileşenlerinden biri olan ve birçok koruyucu etkisinde rol oynayan isorhamnetinin, insanlarda amiloid β 'nin neden olduğu sitotoksik etkisine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir [69]. Ayrıca bu bileşen Alzheimer ve depresyon gibi nörodejenaratif hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [70].

GB'nin hücreleri reaktif oksijen türlerine karşı koruduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. GB'nin H₂O₂ kaynaklı ve demir iyonlarına bağlı lipid peroksidasyonunu, hidroksil ve süperoksit radikallerini azalttığı, böylece apoptozu önlediği ve oksidatif strese bağlı yaşlanmayı geciktirdiğini gösterilmiştir. Bu maddenin içerdiği antioksidan moleküllerin nöroprotektif özellikleri araştırmacıların birçok çalışmasında gösterilmiştir [41, 42]. Ayrıca GB ekstraktının lipid peroksidasyonunun artması sonucunda ortaya çıkan beyin felcine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür [11, 42].

Ayrıca GB elde edilen glikozidik flavonoidlerin antioksidan özelliklere sahip oldukları tespit edilmiştir. S180-bearing farelerin serumlarında, GB uygulanması GST, enzim aktivitelerinde artışa ve aksine lipit peroksidasyon seviyelerinde azalmaya neden olur. Bu etkiler GB'nin sahip olduğu moleküllerin antioksidan özelliklerinden kaynaklanmaktadır [49].

Oyama ve ark. hidrojen peroksitin neden olduğu oksidatif stresin DNA kırılmalarını ve apoptotik hücre sayısını arttırdığını bildirmişlerdir [71]. Literatürler incelendiğinde, GB uygulamasının sıçan beyincik hücrelerinde DNA kırılmasını ve apoptozu azaltmıştır. Bu etkilerin ortaya çıkmasında, GB bileşenlerinden flavonoidler ve terpenlerin etkisi olduğu ifade edilmiştir [72]. Bilobalid, GB'nin anti-apoptotik etkilerinin en önemli nedenlerinden biridir. Bu molekül, DNA kırılmalarını

ve p53 üzerinden hücre ölümünü azaltır [73]. Başka bir çalışmada, GB ekstraktlarının insan beyni nöron hücrelerinin hidrojen peroksidin neden olduğu oksidatif strese karşı canlılığını arttırdığı tesbit edilmiştir [71]. Ayrıca GB ekstraktlarının sıçanlarda nitrik oksidin oluşturduğu toksik etkiye karşı hipokampus hücrelerini koruduğu belirlendi [74].

Histolojik ve histopatolojik bulgularımız, kontrol, sham ve ginkgo biloba gruplarının serebellum yapılarında sağlıklı moleküler tabaka, granüler tabaka, beyaz cevher ve Purkinje hücreleri sergiledi. SK grubunda beyinciklerin Purkinje nöron hücrelerinin düzensiz dizilimi gözlemlendi. Ayrıca beyinciklerin bazı bölgelerindeki Purkinje hücrelerinin büzülmesi, dejenerasyonu ve kaybının diğer gruplara göre daha fazla olduğu dikkat çekmiştir. SK+GB grubunda ise beyincik yapılarında histopatolojik değişiklikleri tespit edildi ancak SK grubuna göre azalmıştır. Diğer sonuçlarımızla uyumlu olarak, bu bulgular GB'nin SK'nın olumsuz etkilerine karşı güçlü bir antioksidan olduğunu kanıtladı.

Rapin ve ark., GB'nin sıçan hipokampusundeki sinir hücreleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Oral olarak verilen GB'nin (50 mg/kg/gün) hücre canlılığını arttırdığını ve apoptozu anlamlı ölçüde azalttığını bildirmişlerdir [75]. Zuo ve ark. Tarafından GB ile ilgili yapılan başka bir çalışmada mitokondri aracılı kaspaz aktivitesini baskılayarak apoptozu engellediği belirtilmiştir [76]. Ayrıca SK'nın farelerin beyinciklerinin dış granüler tabakası üzerine etkileri, histopatolojik olarak analiz edilmiştir. Sinir sisteminin öncül hücrelerinde yüksek oranda ekspres olan bir transkripsiyon faktörü olan Math1+ hücrelerde önemli derecede azalmalar meydana geldiği belirlenmiştir [56].

Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, GB'nin prenatal olarak Sk'ya maruz kalan sıçan serebellaları üzerindeki koruyucu etkisini stereolojik yöntemle araştıran ilk çalışmadır. Ayrıca sunulan sonuçlar, SK'nın yan etkilerini gösteren önceki raporlarla uyumludur. Buna ek olarak, sıçanların beyincik yapılarının iyileşmesi muhtemelen GB ile ilişkilidir.

BÖLÜM 6

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Sıçanlara tek doz 20 mg/kg SK'nın intraperitoneal uygulanması, beyincikteki ortalama moleküler tabaka, granüler tabaka, ak madde ve beyincik hacimlerinin yanısıra toplam Purkinje hücrelerinin sayısını kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltmıştır.
2. SK+GB grubuna gebelik sırasında 80 mg/kg GB'nin oral yoldan verilmesi, sıçanları SK'nın olumsuz etkilerine karşı korumuştur SK+GB grubunda SK grubuna göre ortalama moleküler tabaka, granüler tabaka, beyincik ve ak madde hacimlerinin yanı sıra toplam Purkinje hücre sayısında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.
3. Histopatolojik bulgular kontrol grubuna göre SK grubunun serebellumunda yapısal değişiklikler göstermiştir. Bu histolojik değişiklikler SK+GB grubunda SK grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığından, GB bir onarıcı olarak düşünülmektedir. Kemoterapide SK kullanımına bağlı oluşan yan etkileri azaltmak için GB maddesinin kullanımının faydalı olacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Wang, J.-J., Lei, K.-F., and Han, F., 'Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments', *European Review For Medical And Pharmacological Sciences*, Vol. 22, No. 12, 2018.
2. Amjad, M. T., Chidharla, A., and Kasi, A., *StatPearls.*, 'Cancer Chemotherapy', 2021.
3. Wormington, A. M., María, M. de, Kurita, H. G., Bisesi, J. H., Denslow, N. D., and Martyniuk, C. J., 'Antineoplastic Agents: Environmental Prevalence and Adverse Outcomes in Aquatic Organisms', *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 39, No. 5, 2020.
4. Bignold, L. P., 'Alkylating agents and DNA polymerases', *Anticancer Research*, Vol. 26, 2B, 2006.
5. Swan, D., Gurney, M., Krawczyk, J., Ryan, A. E., and O'Dwyer, M., 'Beyond DNA Damage: Exploring the Immunomodulatory Effects of Cyclophosphamide in Multiple Myeloma', *HemaSphere*, Vol. 4, No. 2, 2020.
6. Oboh, G., and Ogunraku, O. O., 'Cyclophosphamide-induced oxidative stress in brain: Protective effect of hot short pepper (*Capsicum frutescens* L. var. abbreviatum)', *Experimental And Toxicologic Pathology*, Vol. 62, No. 3, 2010b.
7. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., and Abete, P., 'Oxidative stress, aging, and diseases', *Clinical Interventions In Aging*, Vol. 13, 2018.
8. Singh, S. K., Srivastav, S., Castellani, R. J., Plascencia-Villa, G., and Perry, G., 'Neuroprotective and Antioxidant Effect of Ginkgo biloba Extract Against AD and Other Neurological Disorders', *Neurotherapeutics : The Journal Of The American Society For Experimental Neurotherapeutics*, Vol. 16, No. 3, 2019a.
9. Sierpina, V. S., Wollschlaeger, B., and Blumenthal, M., 'Ginkgo biloba', *American Family Physician*, Vol. 68, No. 5, 2003.
10. Yoshikawa, T., Naito, Y., and Kondo, M., 'Ginkgo biloba leaf extract: review of biological actions and clinical applications', *Antioxidants & redox signaling*, Vol. 1, No. 4, 1999.
11. Ponto, L. L. B., and Schultz, S. K., 'Ginkgo biloba extract: review of CNS effects', *Annals Of Clinical Psychiatry : Official Journal Of The American Academy Of Clinical Psychiatrists*, Vol. 15, No. 2, 2003.

12. King, J., and Robins, M. V., *Cancer Biology*, King's College London, 2006.
13. Miller, M., and Kearney, N., 'Oral care for patients with cancer: a review of the literature', *Cancer Nursing*, Vol. 24, No. 4, 2001.
14. Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K., and Ohnishi, T., 'DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways', *Journal Of Nucleic Acids*, Vol. 2010, 2010.
15. Iqbal, A., Iqbal, M. K., Sharma, S., Ansari, M. A., Najmi, A. K., Ali, S. M., Ali, J., and Haque, S. E., 'Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision', *Life Sciences*, Vol. 218, 2019.
16. Campagne, O., Zhong, B., Nair, S., Lin, T., Huang, J., Onar-Thomas, A., Robinson, G., Gajjar, A., and Stewart, C. F., 'Exposure-Toxicity Association of Cyclophosphamide and Its Metabolites in Infants and Young Children with Primary Brain Tumors: Implications for Dosing', *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research*, Vol. 26, No. 7, 2020.
17. Voelcker, G., 'The Mechanism of Action of Cyclophosphamide and Its Consequences for the Development of a New Generation of Oxazaphosphorine Cytostatics' *Scientia Pharmaceutica*, Vol. 88, No. 4, 2020.
18. Furst, D. E., Tseng, C.-H., Clements, P. J., Strange, C., Tashkin, D. P., Roth, M. D., Khanna, D., Li, N., Elashoff, R., and Schraufnagel, D. E., 'Adverse events during the Scleroderma Lung Study', *The American Journal Of Medicine*, Vol. 124, No. 5, 2011.
19. Lotan, E., Leader, A., Lishner, M., Gottfried, M., and Pereg, D., 'Unrecognized renal insufficiency and chemotherapy-associated adverse effects among breast cancer patients', *Anti-Cancer Drugs*, Vol. 23, No. 9, 2012.
20. Wadia, S., 'Acute Cyclophosphamide Hemorrhagic Myopericarditis: Dilemma Case Report, Literature Review and Proposed Diagnostic Criteria', *Journal Of Clinical And Diagnostic Research : JCDR*, Vol. 9, No. 11, 2015.
21. Oboh, G., Akomolafe, T. L., Adefegha, S. A., and Adetuyi, A. O., 'Inhibition of cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat brain by polar and non-polar extracts of Annatto (*Bixa orellana*) seeds', *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal Of The Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, Vol. 63, No. 3, 2011.
22. Doğan , Z, Kocahan, S., Erdemli, E., Köse, E., Yılmaz, I., Ekincioglu, Z., Ekinci, N., Turkoz, Y. 'Effect of chemo. prior to pregnancy on fetal brain tissue and the potential protective role of quercetin', *Cytotechnology*, 67(6):1031-1038, 2015.

23. Gaman, A. M., Uzoni, A., Popa-Wagner, A., Andrei, A., and Petcu, E.-B., 'The Role of Oxidative Stress in Etiopathogenesis of Chemotherapy Induced Cognitive Impairment (CICI)-"Chemobrain"', *Aging and Disease*, Vol. 7, No. 3, 2016.
24. Nafees, S., Rashid, S., Ali, N., Hasan, S. K., and Sultana, S., 'Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NF κ B/MAPK pathway', *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 231, 2015.
25. Ince, S., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., Acaroz, D. A., Akbel, E., and Cigerci, I. H., 'Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats', *Chemosphere*, Vol. 108, 2014.
26. Snell, R. S., *Snell Klinik Nöroanatomi*, Nobel Kitapevi, 2020.
27. Miquel, M., Toledo, R., García, L. I., Coria-Avila, G. A., and Manzo, J., 'Why should we keep the cerebellum in mind when thinking about addiction?' *Current Drug Research Reviews*, 2, Vol. 1, 2009.
28. Altman, J., and Bayer, S. A., 'Embryonic development of the rat cerebellum. II. Translocation and regional distribution of the deep neurons', *The Journal Of Comparative Neurology*, Vol. 231, No. 1, 1985.
29. Sadler, T., *Medical Embriyoloji-Langmann.*, Palme, 2011.
30. Pawlina, W., and Ross, M., *Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology.*, Wolters Kluwer Health, 2016.
31. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M., 'Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer', *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 160, No. 1, 2006.
32. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O., 'Oxidative stress and antioxidant defense', *The World Allergy Organization journal*, Vol. 5, No. 1, 2012.
33. Pisoschi, A. M., and Pop, A., 'The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review', *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 97, 2015.
34. Halliwell, B., 'Methods in Biological Oxidative Stress: K. Hensley and R.A. Floyd (Eds), 2003. Humana Press, New Jersey', *Free Radical Research*, Vol. 37, No. 10, 2003.
35. Halliwell, B., 'Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls', *Biomedical Journal*, Vol. 37, No. 3, 2014.
36. Cadenas, E., and Packer, L., *The Handbook of Antioxidants*, 2002.

37. Di Renzo, G., 'Ginkgo biloba and the central nervous system', *Fitoterapia*, 71 Suppl 1, 2000.
38. Ude, C., Schubert-Zsilavecz, M., and Wurglics, M., 'Ginkgo biloba extracts: a review of the pharmacokinetics of the active ingredients', *Clinical Pharmacokinetics*, Vol. 52, No. 9, 2013.
39. Winter, J. C., and Timineri, D., 'The discriminative stimulus properties of EGb 761, an extract of Ginkgo biloba', *Pharmacology, Biochemistry, And Behavior*, Vol. 62, No. 3, 1999.
40. Yin, Y., Ren, Y., Wu, W., Wang, Y., Cao, M., Zhu, Z., Wang, M., and Li, W., 'Protective effects of bilobalide on A β (25-35) induced learning and memory impairments in male rats', *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, Vol. 106, 2013.
41. Pierre, S., Jamme, I., Droy-Lefaix, M. T., Nouvelot, A., and Maixent, J. M., 'Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects Na, K-ATPase activity during cerebral ischemia in mice', *Neuroreport*, Vol. 10, No. 1, 1999.
42. Wei, Z., Peng, Q., Lau, B. H., and Shah, V., 'Ginkgo biloba inhibits hydrogen peroxide-induced activation of nuclear factor kappa B in vascular endothelial cells', *General Pharmacology*, Vol. 33, No. 5, 1999.
43. Cheng, J.-T., Guo, C., Cui, W.-J., Zhang, Q., Wang, S.-H., Zhao, Q.-H., Liu, D.-W., Zhang, J., Chen, S., Chen, C., Liu, Y., Pan, Z.-H., and an Liu, 'Isolation of two rare N-glycosides from Ginkgo biloba and their anti-inflammatory activities', *Scientific Reports*, Vol. 10, No. 1, 2020.
44. Xia, S., Sun, Q., Zou, Z., Liu, Y., Fang, X., Sun, B., Wei, S., Wang, D., Zhang, A., and Liu, Q., 'Ginkgo biloba extract attenuates the disruption of pro-and anti-inflammatory T-cell balance in peripheral blood of arsenicosis patients', *International Journal of Biological Sciences*, Vol. 16, No. 3, 2020.
45. Oh, S.-M., and Chung, K.-H., 'Estrogenic activities of Ginkgo biloba extracts', *Life Sciences*, Vol. 74, No. 11, 2004
46. Oh, S. M., and Chung, K. H., 'Anti-estrogenic activities of Ginkgo biloba extracts', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 100, 4-5, 2006.
47. Zhao, X. D., Dong, N., Man, H. T., Fu, Z. L., Zhang, M. H., Kou, S., and Liang, S., 'Antiproliferative effect of the Ginkgo biloba extract is associated with the enhancement of cytochrome P450 1B1 expression in estrogen receptor negative breast cancer cells' *Biomedical Reports*, 1, Vol. 5, 2013
48. Li, M., Li, B., Xia, Z.-M., Tian, Y., Zhang, D., Rui, W.-J., Dong, J.-X., and Xiao, F.-J., 'Anticancer Effects of Five Biflavonoids from Ginkgo Biloba L. Male Flowers In Vitro', *Molecules (Basel, Switzerland)*, Vol. 24, No. 8, 2019.

49. Feng, X., Zhang, L., and Zhu, H., 'Comparative Anticancer and Antioxidant Activities of Different Ingredients of Ginkgo biloba Extract (EGb 761)', *Planta Medica*, Vol. 75, No. 8, 2009.
50. Sterio, D. C., 'The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector', *Journal of Microscopy*, Vol. 134, MAY, 1984.
51. Gundersen, H. J., 'Notes On Estimation of Numerical Density of Arbitrary Profiles - Edge Effect', *Journal of Microscopy*, Vol. 111, Nov, 1977.
52. Gundersen, H. J., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., and Pakkenberg, B., 'The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis', *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, Vol. 96, No. 10, 1988.
53. Idrus, N.M., Napper, R.M., 'Acute and long-term Purkinje cell loss following a single ethanol binge during the early third trimester equivalent in the rat', *Alcohol Clin Exp Res.*, 36(8):1365-1373. 2012
54. Kristiansen, S.L., Nyengaard, J.R., 'Digital stereology in neuropathology', *APMIS*, 120(4):327-40, 2012.
55. Roy, P.S., Saikia, BçJ. 'Cancer and cure: A critical analysis', *Indian J Cancer*. 53(3):441-442, 2016.
56. Zhang, Y., Li, Y., Luo, W., Tang, Y., Wang, J., Yang, R., and Gao, W.-Q., 'Histological, cellular and behavioural analyses of effects of chemotherapeutic agent cyclophosphamide in the developing cerebellum', *Cell proliferation*, Vol. 52, No. 3, 2019.
57. Oboh, G., Akomolafe, T. L., and Adetuyi, A. O., 'Inhibition of cyclophosphamide-induced oxidative stress in brain by dietary inclusion of red dye extracts from sorghum (*Sorghum bicolor*) stem', *Journal Of Medicinal Food*, Vol. 13, No. 5, 2010.
58. Oyagbemi, A.A., Omobowale, T.O., Saba, A.B., Olowu, E.R., Dada, R.O., 'Akinrinde AS. Gallic Acid Ameliorates Cyclophosphamide-Induced Neurotoxicity in Wistar Rats Through Free Radical Scavenging Activity and Improvement in Antioxidant Defense System', *J Diet Suppl.*, 13(4):402-19, 2016.
59. Yahyazadeh, A., 'Effect of curcumin on rat sublingual gland exposed to cyclophosphamide', *Cukurova Med J*, 46(3):897-903, 2021.
60. Bhatia, A.L., Manda, K., Patni, S. and Sharma, A.L., Prophylactic Action of Linseed (*Linum usitatissimum*) Oil Against Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress in Mouse Brain, *Journal of Medicinal Food* , 9(2), 2006.

61. Singh, S., Sanyal, A. K., and Kar, A. K., 'The effect of cyclophosphamide on the morphogenesis of the cerebellum in chick embryos', *The Anatomical Record*, Vol. 178, No. 1, 1974.
62. Flanigan, T. J., Anderson, J. E., Elayan, I., Allen, A. R., and Ferguson, S. A., 'Effects of Cyclophosphamide and/or Doxorubicin in a Murine Model of Postchemotherapy Cognitive Impairment', *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, Vol. 162, No. 2, 2018.
63. Sultana, S., Doshi, M.A., Jayasree, N., Chandrupatla, M., 'Comparative study of drug damage caused on Cerebellum in Chick Embryos administered with Drugs - Cyclophosphamide and Sodium Valproate', *Pharm. Sci. & Res.* Vol. 11(7), 2774-2777, 2019.
64. Lyons, L., Elbeltagy, Mç, Bennett, G., Wigmore, P., 'The effects of cyclophosphamide on hippocampal cell proliferation and spatial working memory in rat', *PLoS One.*, 6(6):21445, 2011.
65. Yang, M., Kim, J., Song, M., Kim, S., Kang, S. S., Bae, C., Kim, J., Wang, H., Shin, T., Moon, C., 'Cyclophosphamide impairs hippocampus-dependent learning and memory in adult mice: Possible involvement of hippocampal neurogenesis in chemotherapy-induced memory deficits', *Neurobiology of Learning and Memory*, 93 (4), 487-494, 2010.
66. Rzeski, W., Pruskil, S., Macke, A., Felderhoff-Mueser, U., Reiher, A. K., Hoerster, F., Jansma, C., Jarosz, B., Stefovskaja, V., Bittigau, P., Ikonomidou, C., 'Anticancer agents are potent neurotoxins in vitro and in vivo', *Annals of Neurology*, 56 (3), 351-360, 2004.
67. Maślińska, D., 'Effect of alkylating drugs on rat cerebellum', *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, Vol. 24, No. 1, 1986.
68. Şengül, E., Gelen, V., Gedikli, S., Özkanlar, S., Gür, C., Çelebi, F., and Çınar, A., 'The protective effect of quercetin on Cyclophosphamide-Induced lung toxicity in rats', *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, Vol. 92, 2017.
69. Iida, A., Usui, T., Zar Kalai, F., Han, J., Isoda, H., and Nagumo, Y., 'Protective effects of Nitraria retusa extract and its constituent isorhamnetin against amyloid β -induced cytotoxicity and amyloid β aggregation', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 79, No. 9, 2015.
70. Xu, S. L., Choi, R. C. Y., Zhu, K. Y., Leung, K.-W., Guo, A. J. Y., Bi, D., Xu, H., Lau, D. T. W., Dong, T. T. X., Tsim, K. W. K., and Ip, P. S.-P., 'Isorhamnetin, A Flavonol Aglycone from *Ginkgo biloba* L., Induces Neuronal Differentiation of Cultured PC12 Cells: Potentiating the Effect of Nerve Growth Factor', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2012, 2012.

71. Oyama, Y., Ueha, T., Hayashi, A., Chikahisa, L., Noda, K., 'Flow cytometric estimation of the effect of Ginkgo biloba extract on the content of hydrogen peroxide in dissociated mammalian brain neurons', *Jpn. J. Pharmacol.*, 60 (4), 385–388, 1992.
72. Chen, C., 'Wei, T., Gao, Z., Zhao, B., Hou, J., Xu, H., Xin, W., Packer, L., Different effects of the constituents of EGb-761 on apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals', *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47 (3), 397–405, 1999.
73. Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., 'Neuroprotective effects of the Ginkgo biloba extract. In: Lawson, L.D., Bauer, R. Eds., *Phytomedicine of Europe: Chemistry and Biological activity*. ACS Symposium Series 691, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 210–220, 1998.
74. Bastianetto, S., Zheng, W.-H., Quirion, R., The Ginkgo biloba extract (EGb-761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *J. Neurochem.* 74 (6), 2268–2277, 2000.
75. Rapin, J.R., Zaibi, M., Drieu, K., 'In vitro and in vivo effects of an extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761), ginkgolide B, and bilobalide on apoptosis in primary cultures of rat hippocampal neurons', *Drug Development Research*, 45:23–29, 1998.
76. Zuo, W., Yan, F., Zhang, B., Li, J., and Mei, D., 'Advances in the Studies of Ginkgo Biloba Leaves Extract on Aging-Related Diseases', *Aging and disease*, 8(6), 812–826, 2017.

EK AÇIKLAMALAR A.

ETİK KURUL KARARI

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL TIP UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 2021-13

Toplantı Tarihi: 30.04.2021

Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Ahmad YAHYAZADEH ve Sarmad Hayder Weli WELI tarafından sunulan "**Prenatal Dönemde Siklofosfamide Maruz Bırakılan Sıçan Beyincığında Ginkgo Bilobanın Koruyucu Etkisinin Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması**" başlıklı yüksek lisans tez projesi kurul tarafından değerlendirildi.

Projede belirtilen anesteziik maddenin (Ketamin 80-100 mg/kg ve Xylazine 7-10 mg/kg) kullanılması uygun görülmüştür. Projede belirtilen ve istatistiksel olarak en güvenilir sonuç elde edilebilecek asgari sayıda kullanılacak olan (20 adet sıçan) hayvan sayısı uygun görülmüştür.

Projenin hayvan deneylerine ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde belirtilen "Etik Kurallar" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde yer alan kurallar ve belirtilen "Hayvan Deneyleri İle İlgili Etik İlkeler" saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna", çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına" sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "**uygun**" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK
Başkan (Katıldı)

Doç. Dr. Hasan KARA
Başkan v.(Katıldı)

Prof. Dr. Nimet ÜNLÜ
Üye (Katılmadı)

Prof. Dr. Kamil ÜNEY
Üye (Katıldı)

Prof. Dr. Ayşegül BAYIR
Üye (Katıldı)

Doç. Dr. Zafer SAYIN
Üye (Katıldı)

Doç. Dr. İlhan ECE
Üye (Katıldı)

Doç. Dr. Mehmet SARGIN
Üye (Katıldı)

Dr. Öğr. Üyesi Nejat ÜNLÜKAL
Üye (Katıldı)

Dr. Öğr. Üyesi Aytaç ÖRHAN
Üye (Katıldı)

Vet. Hekim S. Metin GÖKYAPRAK
Üye (Katıldı)

Burhan YILMAZ
Üye (Katıldı)

İlhan ALDORA
Üye (Katıldı)

ÖZGEÇMİŞ

Sarmad Hayder Weli WELI ilk ve orta öğretimini Kerkük'te tamamladı. Kerkük İbn Haldun Lisesi'nden mezun olduktan sonra Tikrit Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girdi ve 2016'da mezun oldu. 2019 yılında Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına öğrenci olarak kabul edildi.