

Erkek Sıçanlarda Diklofenak Kaynaklı Testis Hasarı Üzerine Krisin'in İyileştirici Etkileri

Healing Effects of Chrysin on Diclofenac-induced Testicular Damage in Male Rats

Cüneyt ÇAĞLAYAN¹

ÖZ

Diklofenak, insanlarda ve hayvanlarda farklı patolojik durumlarla ilişkili akut ve kronik ağrıyı tedavi etmek için kullanılan bir anti-inflamatuar ilaçtır. Aşırı doz ve uzun süreli kullanımı hem insanlarda hem de sıçanlarda erkek üreme organı üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Krisin; bal, propolis ve birçok bitki özünde yaygın olarak bulunan doğal bir fitokimyasaldır. Bu çalışma, erkek sıçanlarda diklofenak kaynaklı testis toksisitesine karşı krisinin koruyucu etkilerini araştırmak için yapıldı. Toplam 35 adet erkek sıçan sırasıyla i) kontrol, ii) krisin, iii) diklofenak, iv) diklofenak + krisin 25, v) diklofenak + krisin 50 grupları olmak üzere 5 gruba eşit olarak ayrıldı. Diklofenakın testis dokusunda kaspaz-3 ve Bcl-2 bağlı X proteini (Bax) gibi apoptotik parametrelerin mRNA transkript seviyelerini artırırken, B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) mRNA transkript seviyesini azaltarak apoptoza neden olduğu tespit edildi. Ayrıca nükleer faktör eritroid 2 (Nrf-2) ve hem oksijenaz-1 (HO-1) gibi oksidatif stresle ilişkili markırların mRNA transkript seviyelerini azalttı. Yine matriks metalloproteinazların bir üyesi olan matriks metalloproteinaz-2 (MMP2) mRNA transkript seviyeleri diklofenak tarafından arttı. Buna karşın tedavi amacıyla verilen krisin'in yukarıda bahsi geçen parametrelerin seviyeleri üzerine olumlu etki göstererek oksidatif stres ve apoptozu azalttığı belirlendi. Sonuç olarak, bu çalışma krisin'in oksidatif stresi ve apoptozu azaltarak diklofenak kaynaklı testis toksisitesini hafifletebileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Diklofenak, Krisin, Oksidatif stres, Testis toksisitesi

ABSTRACT

Diclofenac is an anti-inflammatory drug used to treat acute and chronic pain associated with different pathological conditions in humans and animals. Overdose and prolonged use cause adverse effects on the male reproductive organ in both humans and rats. Chrysin is a natural phytochemical commonly found in honey, propolis and many plant extracts. This study was conducted to investigate the protective effects of chrysin against diclofenac-induced testicular toxicity in male rats. A total of 35 male rats were divided equally into 5 groups as i) control, ii) chrysin, iii) diclofenac, iv) diclofenac + chrysin 25, v) diclofenac + chrysin 50 groups. It was determined that while diclofenac increased the mRNA transcript levels of apoptotic parameters such as caspase-3 and Bcl-2-associated X protein (Bax) in testis tissue, it caused apoptosis by decreasing the B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) mRNA transcript level. It also reduced the mRNA transcript levels of markers associated with oxidative stress such as nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2) and heme oxygenase-1 (HO-1). Matrix metalloproteinase-2 (MMP2) mRNA transcript levels, also a member of matrix metalloproteinases, were increased by diclofenac. On the other hand, it was determined that chrysin given for treatment had a positive effect on the levels of the above-mentioned parameters and reduced oxidative stress and apoptosis. In conclusion, this study showed that chrysin can alleviate diclofenac-induced testicular toxicity by reducing oxidative stress and apoptosis.

Keywords: Apoptosis, Chrysin, Diclofenac, Oxidative stress, Testis toxicity

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylandı (Karar No: 2022-53633).

¹ Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ccaglayan007@gmail.com, ORCID: 0000-0001-5608-554X

İletişim / Corresponding Author: Cüneyt ÇAĞLAYAN
e-posta/e-mail: ccaglayan007@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 30.09.2022
Kabul Tarihi/Accepted: 18.12.2022

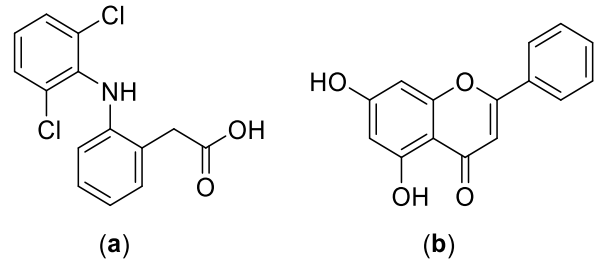
GİRİŞ

Steroid yapıda olmayan yangı giderici ilaçlar (NSAID), analjezik, antipiretik ve anti-inflamatuar etkilerinden dolayı çeşitli iltihaplanmalar ve ağrı kontrolü için sıklıkla kullanılırlar. Yararlı etki gösterdikleri sağlık sorunlarının çeşitliliği ve günümüzde ulaşılabilirliğinin kolay olması sebebiyle NSAID kullanımının tehlikeli boyutlara ulaştığı bildirilmiştir.¹ NSAID'lerin ateş düşürücü, ağrı kesici ve yangı giderici etkilerinin siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe ederek prostaglandin sentezini baskılamasıyla ortaya çıktığı bilinmektedir.²

Diklofenak, NSAID ilaçlar içerisinde en güçlü analjezik etkiye sahip olması ve etki süresinin kısa olması sebebiyle en çok kullanılan narkotik olmayan ağrı kesicilerden biridir. Ancak kontrolsüz diklofenak kullanımının karaciğer, mide, bağırsak, testis ve böbrek dokularında serbest radikaller olarak da bilinen reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu artırdığı, oksidan-antioksidan dengeyi oksidan tarafa kaydırıp doku ve hücre hasarına sebep olduğu bildirilmiştir.³⁻⁶

Flavonoidler sebze, meyve ve bitki köklerinde bulunan doğal fenolik bileşiklerdir. Kalp-damar hastalıkları, kanser,

nörodejeneratif hastalıklar, diyabet gibi birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde faydalı etkileri vardır.⁷ Krisin (5,7- dihidroksi flavon) bal ve propolis gibi doğal ürünlerde ve uçucu yağlarda bulunan güçlü bir flavonoid bileşimidir. Önceki araştırmalar krisinin antioksidan savunma sistemini desteklediği, çeşitli dokularda inflamasyon, apoptoz ve oksidatif strese karşı iyileştirici etkilerinin olduğunu göstermiştir.^{8,9} Krisin, yapısındaki hidroksil grupları sayesinde serbest radikal eliminasyon etkisi yaparak antioksidan özellik gösterir.¹⁰



Şekil 1. (a) Diklofenak'ın Açık Yapısı, (b) Krisin'in Açık Yapısı

Bu çalışma, erkek sıçanlarda diklofenak'ın neden olduğu testis toksisitesi üzerine krisin'in iyileştirici etkilerini araştırmak için tasarlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

İlaç ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan krisin (CAS no: 480-40-0, 25 gram) analitik saflıkta olup, Sigma-aldrich firmasından satın edilmiştir. Diklofenak (75 mg / 3 ml, dikloron) deva şirketinden satın alındı. Krisin ve diklofenak doz seçimleri önceki çalışmalar esas alınarak yapılmıştır.^{11,12}

Çalışmada Kullanılan Hayvanlar

Deneyde ağırlıkları 250-300 gr olan 35 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar 24-25 °C sabit sıcaklık ve onikişer (12 h) saatlik aydınlık-karanlık döngüsü sağlanarak deney için hazırlanmış uygun bir odada, plastik kafeslerde tutuldu. Hayvanların su ve standart yeme ulaşmaları

ad libitum sağlandı. Hayvanların ortama uyum sağlamaları için 1 hafta bekletildikten sonra deneylere başlandı.

Bu çalışmada erkek sıçanlar rastgele her grupta 7 sıçan olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

1. Grup (Kontrol); 5 gün intraperitoneal (i.p.) yoldan 0.5 ml serum fizyolojik verildi.

2. Grup (Krisin); 50 mg/kg/gün dozunda krisin oral yoldan gavaj kullanılarak 5 gün süre ile verildi.¹¹

3. Grup (Diklofenak); 4 ve 5. günler 50 mg/kg/vücut ağırlığı i.p. diklofenak uygulandı.¹²

4. Grup (Diklofenak + krisin 25 mg/kg); 25 mg/kg/gün krisin oral yoldan 5 gün süre ile verildi, sonrasında 4 ve 5. günler 50

mg/kg/vücut ağırlığı i.p. diklofenak uygulandı.

5. Grup (Diklofenak + krisin 50 mg/kg); 50 mg/kg/gün krisin oral yoldan 5 gün süre ile verildi, sonrasında 4 ve 5. günler 50 mg/kg/vücut ağırlığı i.p. diklofenak uygulandı.

Numunelerin Alınması

Çalışma süresinin bitiminde (son diklofenak ve krisin uygulamasından 24 saat sonra) hayvanlar hafif sevofloran anestezisi altında dekapite edilerek testis doku örnekleri alındı. Testis dokuları biyokimyasal analizler için alınarak analizler yapıncaya kadar -20 °C’de saklandı.

Real-Time PCR Analizleri

Sıçanlardan alınan testis dokuları bir doku parçalayıcı cihazı kullanılarak sıvı azot içerisinde toz hale getirildi. Daha sonra dokulardan QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Cat: 79306, Germany) ile üreticinin talimatlarına uyularak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA’lardan ise iScript™ cDNA Synthesis Kit’i (BIO-RAD, United States) vasıtasıyla üreticinin talimatları bire bir takip edilerek cDNA sentez edildi. Sonrasında cDNA’lar kaspaz-3 (F: ACTGGAATGTCAGCTCGCAA, R: GCAGTAGTCGCTCTGAAGA), Bax (F: TTTCATCCAGGATCGAGCAG, R: AATCATCCTCTGCAGCTCCA), Bcl-2 (F: GACTTTGCAGAGATGTCCAG, R:

TCAGGTACTCAGTCATCCAC), Nrf2 (F: TTTGTAGATGACCATGAGTCGC, R: TCCTGCCAACTTGCTCCAT), HO-1 (F: ATGTCCCAGGATTTGTCCGA, R: ATGGTACAAGGAGGCCATCA) ve MMP2 (F: CTCTAGGAGAAGGACAAGTG, R: CTCAAAGTTGTACGTGGTGG) primerleri ve iTaq Universal SYBR Green Supermix (BIORAD) ile mix hazırlandıktan sonra ROTOR-GENE Q (Qiagen, Germany) cihazında mRNA transkript seviyeleri analiz edildi. Housekeeping gen olarak β -actin (F: CAGCCTTCCTTCTTGGGTATG, R: AGCTCAGTAACAGTCCGCCT) kullanıldı. Göreli mRNA transkript seviyeleri ise Liwak ve Schmittgen (2002) metoduna göre hesaplandı.¹³

İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 20.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası farklılıklar One-way ANOVA post hoc Tukey testi ile belirlendi. P<0.05 seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edilirken tüm değerler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi.

Araştırmanın Etik Yönü

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylandı (Karar No: 2022-53633).

BULGULAR VE TARTIŞMA

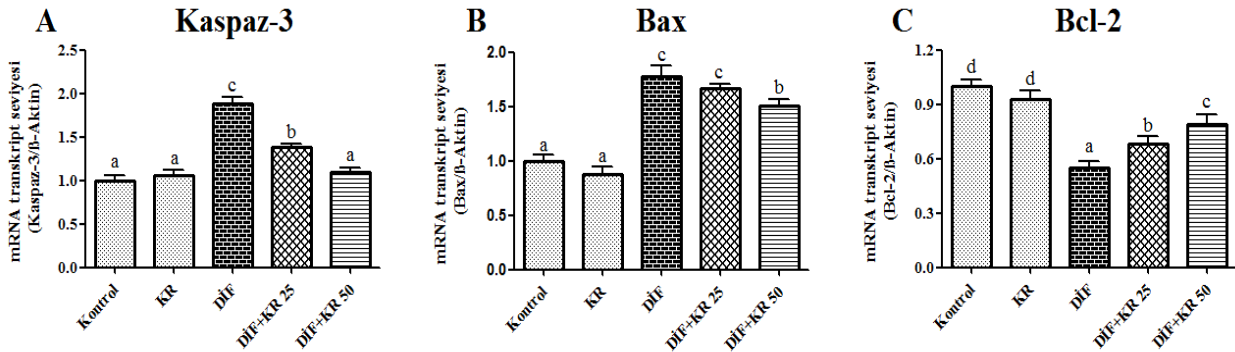
Dünya genelinde yaygın olarak kullanılan diklofenak, insan sağlığı ve refahı için ağrı, inflamasyon, ateş gibi istenmeyen durumlara karşı sıklıkla kullanılmaktadır. Çeşitli sağlık sorunlarına çözüm olması amacıyla kullanılırken, kontrolsüz ve aşırı kullanımı oksidatif strese yol açabilmekte ve çeşitli doku ve organlara zarar verebilmektedir.¹⁴ Oksidan türlerine düşük konsantrasyonlarda normal sinyal iletimi için ihtiyaç duyulsa da yüksek konsantrasyonlarının birçok patolojik duruma sebebiyet verdiği bildirilmiştir.¹⁵ NSAID’lerin farklı organ ve sistemler üzerine olumsuz etkileri çeşitli çalışmalarla saptanmış olup, diklofenak kaynaklı bir ROS

artışı görüldüğü, buna bağlı olarak gelişen hücre hasarlarını takiben nefrotoksisite, hepatotoksite, nörotoksisite, genotoksisite gibi farklı organ hasarları geliştiği rapor edilmiştir.¹⁶⁻¹⁹ Günümüzde toksik ajanlara karşı antioksidan maddelerin kullanımıyla sıklıkla karşılaşmakta ve özellikle krisin, hesperidin, morin ve rutin gibi flavonoid grubu antioksidanların doku ve organ hasarlarına karşı iyileştirici etkilerinin olduğu çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir.²⁰⁻²³

Apoptoz, çeşitli patolojik ve fizyolojik uyaranlar tarafından yönlendirilen, normal ve programlı hücre ölümünün ana tiplerinden biridir.²⁴ Temel apoptotik yol, mitokondriden

sitokrom c'nin salınması ile başlar ve bu yol, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinler ve Bax gibi apoptotik proteinler tarafından kontrol edilir. Bcl-2 apoptoz inhibitörü (anti-apoptotik) olarak görev yaparken Bax ise apoptozu uyaran bir rol üstlenmiştir.²⁵ Kaspaz-3 proteini, CASP3 geni tarafından kodlanan, memelilerde 14 farklı çeşidi olan kaspaz ailesinin bir üyesi olup, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ile etkileşime giren önemli bir apoptotik markıdır.²⁶ Benzer çalışmalarda elde edilen sonuçlar, programlı hücre ölümüne giden yolda kaspaz-3 mRNA transkript seviyelerinin belirlenmesinin, hücre ölümü ve doku hasarı hakkında önemli bilgiler sunduğunu göstermiştir.^{24, 25} Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri mitokondri zarının iyon geçirgenliğini azaltır ve bu zar değişimleri sonucu mitokondri zarı içerisinde yer alan

sitokrom-c ve Apoptosis Inducing Factor (AIF) gibi apoptotik faktörler sitoplazmaya geçer. AIF doğrudan çekirdeğe yönelirken sitokrom-c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder. Prokaspaz-9 bir takım apoptotik yolağı uyarır ve çeşitli kaspaz aktivasyonlarını başlatır. Bu uyarımlar sonucu kaspaz-3 aktive olur.²⁷ Bax/Bcl-2 genleri ve kaspaz-3 proteinleri apoptozun tespiti ve doku hasarının belirlenmesinde önem arz eden yolaklardır. Sunulan çalışmada diklofenak enjekte edilen sıçanların testis dokularında kaspaz-3 ve Bax mRNA transkript seviyeleri artarken, Bcl-2 mRNA transkript seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Tedavi amacıyla verilen 25 ve 50 mg/kg dozlarındaki krisin'in Bax ve kaspaz-3 seviyelerini azalttığı, Bcl-2 seviyesini ise artırdığı tespit edilmiştir (p<0.05).

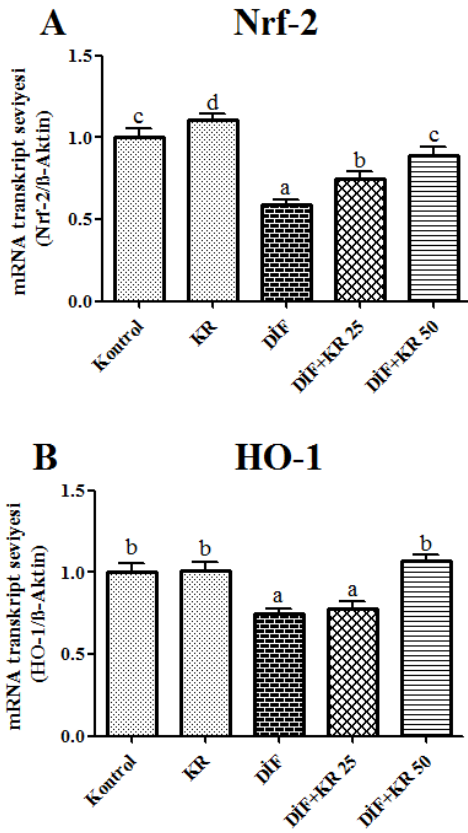


Şekil 2. Deneysel Gruplardaki Sıçanların Testis Dokularında (A) Kaspaz-3, (B) Bax ve (C) Bcl-2 Genlerine Ait mRNA Transkript Seviyeleri. Farklı Harfler (a, b, c ve d) Gruplar Arası Farklılığı İfade Eder (p<0.05)

Hem oksijenaz (HO), yüksek derecede zararlı serbest hemi azaltabilen ve antioksidanlar, anti-inflamatuarlar ve proliferasyon modülatörleri üreterek patolojik koşullar altında homeostazi sürdürebilen strese duyarlı bir enzimdir. Memelilerde HO-1 ve HO-2 olmak üzere 2 izoformu vardır ve bunlardan HO-1 oksidatif hasara karşı savunma rollerinden birini oluşturur.²⁸ Nrf-2, Faz II detoksifikasyonun indüksiyonunu veya antioksidan enzimleri (HO-1, SOD, KAT ve GPx) düzenleyerek, oksidatif stresin sebep olabileceği sitotoksositeye karşı hücre savunmasında rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür.²⁹

Normal fizyolojik süreçte, Nrf-2 ve kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (Keap1) hücrede heterodimer formunda kalır. İnflamasyon, toksisite ve hasar gibi hücreye dışarıdan bir uyarı gelmesi durumunda Nrf-2 ve Keap1 birbirinden ayrılarak hücre içindeki denge bozulur. Daha sonra Nrf-2 hücre çekirdeğine girer ve HO-1, KAT, SOD ve GPx gibi antioksidan enzimleri kodlayan genleri aktive ederek hücre oksidatif hasarı azaltır.²⁰ Çalışmamızdan elde edilen testis dokularına ait mRNA transkript seviyeleri değerlendirildiğinde, krisin uygulamasının Nrf-2 ekspresyonunu aktive ederek antioksidan enzim olan HO-1 sinyal

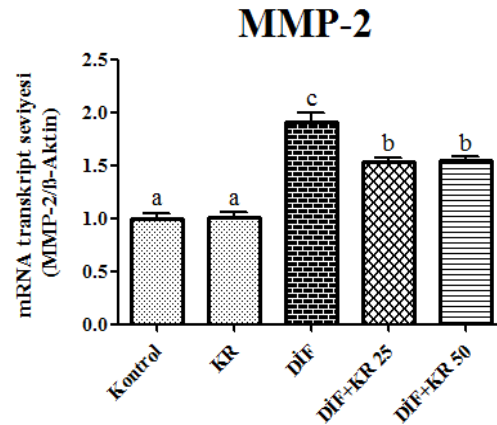
yolunu tetiklediği, oksidatif stresi azaltarak inflamasyonu iyileştirici etkiler gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 3. Deneysel Gruplardaki Sıçanların Testis Dokularında (A) Nrf-2 ve (B) HO-1 Genlerine Ait mRNA Transkript Seviyeleri. Farklı Harfler (a, b, c ve d) Gruplar Arası Farklılığı İfade Eder ($p<0.05$)

Matriks metalloproteinaz-2 canlılarda MMP-2 geni tarafından kodlanan, normal hücre gelişimi ve fizyolojide hücre dışı matriks proteinlerini parçalayarak inflamatuvar yanıtta kilit rol oynayan endopeptidazlar ailesine ait bir enzimdir.³⁰ Testiste MMP-2 aktivasyonu, sertoli hücreleri ve germ hücreleri arasındaki

bağlantıları değiştirerek sertoli hücrelerinin azalmış destek kapasitesine katkıda bulunur ve bu tür bozulmalar, germ hücre dekolmanının başlamasına neden olur.³¹ Yapılan bir *in vivo* çalışmada, bir MMP-2 inhibitörü ile ön tedavinin MMP-2 ile indüklenen germ hücre dekolmanı inhibe ettiği rapor edilmiştir.³² Bir diğer çalışmada ise doksorubisin kaynaklı testis hasarında kurkumin ve kafeik asit fenetil ester tedavilerinin testis dokusu homojenatlarında MMP-2, -3, -8 ve -13 seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir.³³ Bu çalışmada, RT-PCR sonuçları, diklofenakın sıçan testis dokusunda MMP-2'nin mRNA transkript düzeylerini arttırdığını göstermiştir. Terapötik olarak uygulanan krisinin, MMP-2'nin transkripsiyon seviyelerini azalttığı bulunmuştur.



Şekil 4. Deneysel Gruplardaki Sıçanların Testis Dokularında MMP-2 Genine Ait mRNA Transkript Seviyeleri. Farklı Harfler (a, b, c ve d) Gruplar Arası Farklılığı İfade Eder ($p<0.05$)

SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde edilen veriler doğrultusunda, sıçan testis dokularında diklofenak ile indüklenen oksidatif stres ve apoptoza karşı krisin'in iyileştirici etkileri olduğu tespit edilmiştir. Krisin doğada bol bulunan ve geniş farmakolojik özellikler gösteren bir fenolik bileşiktir. Dolayısıyla, diklofenak kaynaklı

testiküler toksisite tedavisi için krisin umut verici bir ajan olabilir veya adjuvan olarak kullanılabilirliğe sahiptir. Fakat bu konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmaların yapılması krisinin terapötik etkinliğinin ortaya konmasında önem kazanacaktır.

KAYNAKLAR

1. Soleimanpour, M, Imani, F, Safari, S, Sanaie, S, Soleimanpour, H, Ameli, H. and Alavian, S.M. (2016). "The Role of Non-steroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs) in the Treatment of Patients with Hepatic Disease: A Review Article". *Anesthesiology and Pain Medicine*, 6 (4), e37822.
2. Walter, H.H. (2010). "Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and the Kidney". *Pharmaceuticals*, 3 (7), 2291-2321.
3. Adeyemi, W.J. and Olayaki, L.A. (2018). "Diclofenac-Induced Hepatotoxicity: Low Dose of Omega-3 Fatty Acids Have More Protective Effects". *Toxicology Reports*, 5, 90-95.
4. Simon, J.P. and Evan Prince, S. (2021). "Ameliorative Activity of Aqueous Leaf Extract From Madhuca Longifolia Against Diclofenac-Administered Toxicity on Rat Stomach and Intestine". *Journal of Histotechnology*, 44 (3), 114-126.
5. Owumi, S.E, Aliyu-Banjo, N.O. and Odunola, O.A. (2020). "Selenium Attenuates Diclofenac-Induced Testicular and Epididymal Toxicity in Rats". *Andrologia*, 52 (9), e13669.
6. Abiola, T.S, Adebayo, O.C. and Babalola, O.O. (2019). "Diclofenac-Induced Kidney Damage in Wistar Rats: Involvement of Antioxidant Mechanism". *Journal of Biosciences and Medicines*, 7 (12), 96832.
7. Benzer, F, Kandemir, F.M, Ozkaraca, M, Kucukler, S. and Caglayan, C. (2018). "Curcumin Ameliorates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity By Abrogation of Inflammation, Apoptosis, Oxidative DNA Damage, and Protein Oxidation in Rats". *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32 (2), e22030.
8. Kandemir, F.M, Kucukler, S, Eldutar, E, Caglayan, C. and Gülçin, İ. (2017). "Chrysin Protects Rat Kidney From Paracetamol-Induced Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, and Autophagy: A Multi-Biomarker Approach". *Scientia Pharmaceutica*, 85 (1), 4.
9. Temel, Y, Kucukler, S, Yıldırım, S, Caglayan, C. and Kandemir, F.M. (2020). "Protective Effect of Chrysin on Cyclophosphamide-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity via The Inhibition of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis". *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393 (3), 325-337.
10. Kucukler, S, Benzer, F, Yıldırım, S, Gur, C, Kandemir, F.M, Bengu, A.S, Ayna, A, Caglayan, C. and Dortbudak, M.B. (2021). "Protective Effects of Chrysin Against Oxidative Stress and Inflammation Induced By Lead Acetate in Rat Kidneys: A Biochemical and Histopathological Approach". *Biological Trace Element Research*, 199 (4), 1501-1514.
11. Eldutar, E, Kandemir, F.M, Kucukler, S. and Caglayan, C. (2017). "Restorative Effects of Chrysin Pretreatment on Oxidant-Antioxidant Status, Inflammatory Cytokine Production, and Apoptotic and Autophagic Markers in Acute Paracetamol-Induced Hepatotoxicity in Rats: An Experimental and Biochemical Study". *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31 (11), e21960.
12. Prince, S.E. (2018). "Diclofenac-Induced Renal Toxicity in Female Wistar Albino Rats is Protected By The Pre-Treatment of Aqueous Leaves Extract of Madhuca Longifolia Through Suppression of Inflammation, Oxidative Stress and Cytokine Formation". *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 98, 45-51.
13. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). "Analysis Of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and The $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method". *Methods*, 25, 402-408.
14. Elder, D.J, Halton, D.E, Hague, A. and Paraskeva, C. (1997). "Induction of Apoptotic Cell Death in Human Colorectal Carcinoma Cell Lines By A Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Selective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug: Independence From COX-2 Protein Expression". *Clinical Cancer Research*, 3 (10), 1679-1683.
15. Özdemir, S, Kucukler, S, Çomaklı, S. and Kandemir, F.M. (2020). "The Protective Effect of Morin Against Ifosfamide-Induced Acute Liver Injury in Rats Associated with The Inhibition of DNA Damage and Apoptosis". *Drug and Chemical Toxicology*, 45 (3), 1308-1317.
16. Famurewa, A.C, Akunna, G.G, Nwafor, J, Chukwu, O.C, Egedigwe, C.A.E. and Oluniran, J.N. (2019). "Nephroprotective Activity of Virgin Coconut Oil on Diclofenac-Induced Oxidative Nephrotoxicity is Associated With Antioxidant and Antiinflammatory Effects in Rats". *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 10 (3), 316-324.
17. Adeyemi, W.J. and Olayaki, L.A. (2018). "Diclofenac-Induced Hepatotoxicity: Low Dose of Omega-3 Fatty Acids Have More Protective Effects". *Toxicology Reports*, 5, 90-95.
18. Motawi, T.K, Ahmed, S.A, El-Boghdady, N.A, Metwally, N.S, and Nasr, N.N. (2019). "Protective Effects of Betanin Against Paracetamol and Diclofenac Induced Neurotoxicity and Endocrine Disruption in Rats". *Biomarkers*, 24 (7), 645-651.
19. Mogilner, J.G, Lurie, M, Coran, A.G, Nativ, O, Shiloni, E. and Sukhotnik, I. (2006). "Effect of Diclofenac on Germ Cell Apoptosis Following Testicular Ischemia-Reperfusion Injury in A Rat". *Pediatric Surgery International*, 22 (1), 99-105.
20. Çelik, H, Kucukler, S, Çomaklı, S, Caglayan, C, Özdemir, S, Yardım, A, Karaman, M. and Kandemir, F.M. (2020). "Neuroprotective Effect of Chrysin on Isoniazid-Induced Neurotoxicity via Suppression of Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Rats". *Neurotoxicology*, 81, 197-208.
21. Caglayan, C, Kandemir, F.M, Darendelioglu, E, Küçükler, S. and Ayna, A. (2021). "Hesperidin Protects Liver and Kidney Against Sodium Fluoride-Induced Toxicity Through Anti-Apoptotic and Anti-Autophagic Mechanisms". *Life Sciences*, 281, 119730.
22. Kucukler, S, Caglayan, C, Darendelioglu, E. and Kandemir, F.M. (2020). "Morin Attenuates Acrylamide-Induced Testicular Toxicity in Rats By Regulating the NF-κB, Bax/Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways". *Life Sciences*, 261, 118301.
23. Caglayan, C, Kandemir, F.M, Darendelioglu, E, Yıldırım, S, Kucukler, S. and Dortbudak, M.B. (2019). "Rutin Ameliorates Mercuric Chloride-Induced Hepatotoxicity in Rats Via Interfering With Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 56, 60-68.
24. Küçükler, S, Kandemir, F.M, Özdemir, S, Çomaklı, S. and Caglayan C. (2021). "Protective Effects of Rutin Against Deltamethrin-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Rats via Regulation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis". *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 62975-62990.
25. Kandemir, F.M, Yıldırım, S, Kucukler, S, Caglayan, C, Darendelioglu, E. and Dortbudak, M.B. (2020). "Protective Effects of Morin Against Acrylamide-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity: A Multi-Biomarker Approach". *Food and Chemical Toxicology*, 138, 111190.
26. Porter, A.G. and Jänicke, R.U. (1999). "Emerging Roles of Caspase-3 in Apoptosis". *Cell Death and Differentiation*, 6 (2), 99-104.

27. Atagün, G, Zafer, E. ve Gürkanlı, İ. (2011). "Apoptoziste Mitokondrinin Rolü". Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 4 (2), 49-53.
28. Kim, H.P, Wang, X, Lee, S.J, Huang, M.H, Wan, Y, Ryter, S.W. and Choi, A.M. (2008). "Autophagic Proteins Regulate Cigarette Smoke Induced Apoptosis: Protective Role of Heme Oxygenase-1". Autophagy, 4 (7), 887-895.
29. Çelik, H, Kandemir, F.M, Çağlayan, C, Özdemir, S, Çomaklı, S, Kucukler, S. and Yardım, A. (2020). "Neuroprotective Effect of Rutin Against Colistin-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Rat Brain Associated With The CREB/BDNF Expressions". Molecular Biology Reports, 47 (3), 2023-2034.
30. Park, K.S, Kim, S.J, Kim, K.H. and Kim, J.C. (2011). "Clinical Characteristics of TIMP2, MMP2, and MMP9 Gene Polymorphisms in Colorectal Cancer". Journal of Gastroenterology and Hepatology, 26 (2), 391-397.
31. Yalcın, A. (2019). "The Effects of N-Acetylcysteine on MMP-2 and MMP-9 Immune Activities in Testicular Tissue of Streptozotocin Induced Diabetic Rats". Sakarya Tıp Dergisi, 9 (1), 59-67.
32. Yao, P.L, Lin, Y.C. and Richburg, J.H. (2009). "TNF Alpha-Mediated Disruption of Spermatogenesis in Response to Sertoli Cell Injury in Rodents is Partially Regulated By MMP2". Biology of Reproduction, 80 (3), 581-589.
33. Huyut, Z, Alp, H.H, Yaman, T, Keleş, Ö.F, Yener, Z, Türkan, F. and Ayengin, K. (2021). "Comparison of The Protective Effects of Curcumin and Caffeic Acid Phenethyl Ester Against Doxorubicin-induced Testicular Toxicity. Andrologia, 53 (2), e13919.