

Protective Effects of Naringin on Lung Toxicity Induced by 5-Fluorouracil in Rats

Semin GEDİKLİ*, Elif ERBAŞ¹

¹ Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, Erzurum, Turkey

ABSTRACT

The current study aims to investigate the protective effects of naringin, one of the natural flavonoids, against in the lungs damage caused by 5-FU, which is used chemotherapeutically. Thirty Sprague Dawley male rats weighing 200-250 g were used in the study. The rats were randomly selected and divided into the control group, the 5-FU group and the NA+5-FU group. It was observed that 5-FU caused interstitial fibrosis and congestion in the lung tissues, thickening due to inflammatory cell infiltration in the inter-alveolar septum, peribronchial lymphoid tissue hyperplasia and epithelial cell shedding in the bronchioles. It was observed that naringin application alleviated the histopathological findings in the lung and brought it closer to normal lung tissue histology. It was determined that 5-FU administration increased Bax immunopositivity in the lungs, decreased Bcl-2 immunopositivity, and naringin administration decreased Bax immunopositivity and increased Bcl-2 immunopositivity, similar to the control group. It was found that TBARS and NO levels increased significantly with 5-FU administration, GSH level decreased significantly in the lung tissues compared to the control group, and these parameters approached the levels in the control group in the naringin group. All these findings suggest that naringin administration may have beneficial effects on 5-FU-induced lung injury.

Keywords: 5-Fluorouracil, Lung, Naringin, Oxidative Stress.

Ratlarda 5-Fluorouracil ile İndüklenen Akciğer Toksisitesi Üzerine Naringinin Koruyucu Etkileri

ÖZ

Mevcut çalışmanın amacı; kemoterapötik olarak kullanılan 5-FU'nun akciğerlerde oluşturduğu hasara karşı doğal flavonoidlerden olan naringinin koruyucu etkilerini araştırmaktır. Çalışmada 200-250 g ağırlığında, 30 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar rastgele seçilerek Kontrol grubu, 5-FU grubu ve NA+5-FU grubu olarak ayrıldı. 5-Fluorouracilin akciğer dokularında interstisyel fibrozis ve konjesyona, alveoller arası septumda yangısal hücre infiltrasyonuna bağlı kalınlaşma, peribronşiyal lenfoid doku hiperplazisi ile birlikte bronşiyollerde epitelyal hücre dökülmelerine neden olduğu gözlemlendi. Naringin uygulamasının ise akciğerdeki histopatolojik bulguları hafiflettiği ve normal akciğer doku histolojisine yaklaştırdığı gözlemlendi. 5-Fluorouracil uygulamasının akciğerlerdeki Bax immünpozitifliğini artırırken, Bcl-2 immünpozitifliğini azalttığı, naringin uygulamasının ise kontrol grubuna benzer şekilde Bax immünpozitifliğini azaltıp, Bcl-2 immünpozitifliğini artırdığı belirlendi. Akciğer dokularında kontrole kıyasla TBARS ve NO düzeylerinin 5-FU uygulaması ile anlamlı şekilde arttığı, GSH düzeyinin ise anlamlı şekilde azaldığı, naringin uygulanan grupta ise bu parametrelerin kontrol grubundaki düzeylere yaklaştığı tespit edildi. Tüm bu bulgular naringin uygulamasının, 5-FU kaynaklı akciğer hasarında faydalı etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: 5-Fluorouracil, Akciğer, Naringin, Oksidatif Stres.

To cite this article: Gedikli S, Erbaş E. Protective Effects of Naringin on Lung Toxicity Induced by 5-Fluorouracil in Rats. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):16-25

Submission: 18.08.2020 Accepted: 04.12.2020 Published Online: 22.01.2021

ORCID ID; SG: 0000-0001-8238-7226, EE: 0000-0003-1750-3889

*Corresponding author e-mail: semingedikli@gmail.com

GİRİŞ

Kemoterapotikler, kanser tedavisinde gerek kombine gerekse tek olarak kullanılan ilaçlardır (El-Sayyad ve ark. 2009). 5-Fluorouracil (5-FU), pirimidin analogu antimetabolitler içinde yer almaktadır. Timidilat sentaz enzimini inhibe ederek DNA sentezinde azalmaya sebep olan aynı zamanda da RNA işleme ve protein sentezine de etki eden sitotoksik bir ajandır (Sobrero ve ark. 1997). 5-FU'nun meme kanseri, kolorektal kanser, pankreas kanseri, mide, baş, boyun karsinomlarının sağaltımında (Alvarez-Cabellós ve ark. 2007) ayrıca topikal olarak bazal hücreli karsinom ve aktinik keratozların tedavisinde (Love ve ark. 2009) ve oftalmik cerrahilerde (Wong ve ark. 1991) kullanılan terapötik bir ilaç olduğu bilinmektedir.

5-Fluorouracil, sitotoksik etkisini reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesiyle sonuçlanan apoptoz ve nekroz olayları ile gösterir (Lamberti ve ark. 2012). Aynı zamanda antioksidan savunma mekanizmalarında azalmaya sebep olmak suretiyle hücre hasara neden olmaktadır. Oksidatif stres mekanizması kemoterapi ve radyoterapide kullanılan önemli bir mekanizmadır (Juraneck ve Bezek 2005). 5-Fluorouracil metabolizması başlıca karaciğerde gerçekleşir ve sonuçta α -floro- β -alanin, karbondioksit, üre gibi bozunma ürünleri meydana gelir (Al-Hamdany ve Al-Hubaity 2014).

5-Fluorouracil uygulaması sonucunda metabolizmada hemolitik anemi, trombositopeni, lökopeni, stomatit, mukozit ve ishal gibi bazı olumsuz etkiler meydana gelir (Stein ve ark. 2010). 5-Fluorouracil uygulamalarının neden olduğu hepatotoksisite (Abdel-Hamid ve ark. 2011) kardiyotoksisite (Lamberti ve ark. 2012) ve nörotoksisite (Han ve ark. 2008) ile ilgili olarak çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak tek başına uygulanan 5-FU tedavisinin akciğer üzerindeki etkilerini ortaya koymak adına yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır (Al-Hamdany ve Al-Hubaity 2014).

Antikanser ilaçların organ ve dokular üzerindeki yan etkilerine engel olmak amacıyla doğal etken maddeler üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır (Şengül ve ark. 2017, Choi ve ark. 2011, Rašković ve ark. 2011, Matouk ve ark. 2013). Bu amaçla kullanılan doğal antioksidanlardan olan flavonoidler, meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunan kimyasallardır (Montanari ve ark. 1997). Flavonoidler, insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunan, bitkisel kökenli düşük molekül ağırlıklı doğal maddeler olarak tanımlanmışlardır (Sghaier ve ark. 2011, So ve ark. 1997). Bu doğal kimyasalların alınımının kanser gibi önemli hastalıkların gelişimini engellediği bilinmektedir (Serafini ve ark. 2006). Aynı zamanda antiviral, antimikrobiyal, antineoplastik, anti-inflamatuar, antiülserojenik, sitotoksik, mutajenik, antioksidan özelliklerinin de varlığı bildirilmiştir (Formica ve Regelson 1995). Hücrelerdeki antioksidan enzimleri aktive ederek veya hidrojen atomlarının transferi mekanizmasıyla reaktif oksijen türleri (ROS) ile reaksiyona giren flavonoidler

hastalıklara karşı koruyucu özellik gösterirler (Oršolić ve ark. 2011, Leopoldini ve ark. 2011).

Naringin, üzümde ve birçok turuncgillerde bulunan önemli ve aktif bir flavonoiddir ve dolayısıyla güçlü bir antioksidan ve serbest radikal süpürücü özelliğe sahip bir bileşiktir (Jung ve ark. 1983, Turgut ve ark. 2016). Naringin, lipofilik özellikte olduğu için hücre zarına kolayca bağlanarak serbest radikallerin oluşumunu en aza indirger ve bu sayede hücre zarını korur (Renugadevi ve Prabu 2009). Ayrıca toksikasyon çalışmalarında da naringinin koruyucu özellikler gösterdiği bilinmektedir (Chtourou ve ark. 2015, Lee ve ark. 2004, Hermenean ve ark. 2014, Singh ve ark. 2004). Kanser tedavisinde verilen ilaçların yanı sıra bitkisel kökenli terapötik moleküllerin de akciğer dahil çeşitli kanser türlerinde antikanser potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Bu moleküller arasında anjiyogenez ve tümör nekroz faktörünün inhibisyonu dahil olmak üzere farklı yollardan akciğer kanseri üzerine etki ettiği bilinen naringin de bulunmaktadır (Said-Elbahr ve ark. 2016). Naringinin hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda başka dokular üzerine (Adil ve ark. 2015, Kwatra ve ark. 2016) olan anti-inflamatuar özellikleri her ne kadar gösterilmiş olsa da akciğer hasarı üzerine olan etkisini araştıran çalışmalar sınırlıdır (Turgut ve ark. 2016). Bu nedenle yapmış olduğumuz bu çalışmada, sıçanlara intraperitoneal olarak uygulanan 5-Fluorouracilin akciğer üzerine toksik etkilerini ve bu toksik etkilere karşı naringinin koruyucu etkilerini histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal düzeylerde araştırmayı amaçladık.

MATERYAL ve METOT

Kullanılan Deneysel Hayvanları ve Deneysel Prosedürü

Çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen ortalama ağırlıkları 200-250 g olan, 30 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlara 14 günlük deney süresince 12 saat karanlık/aydınlatma uygulandı ve hayvanlar sıcaklığı $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ olarak ayarlanmış olan odalarda, ad-libitum olarak yem ve taze su bulunan kafeslerde barındırıldı. Ratlar her grupta 10 hayvan olacak şekilde rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı. Gruplar aşağıda belirtildiği gibi oluşturuldu (Gelen ve ark. 2018):

1. grup Kontrol grubu (10 rat): Bu gruptaki ratlara 14 gün boyunca intragastrik (i.g.) gavaj yoluyla 1 ml serum fizyolojik verildi.
2. grup 5-Fluorouracil (5-FU) grubu (10 rat): Bu gruptaki ratlara 14 gün boyunca 1 ml serum fizyolojik i.g. olarak verildi. Dokuzuncu günden itibaren ise deneklere 5 gün boyunca 20 mg/kg dozunda 5-FU intraperitoneal (ip.) olarak uygulandı.
3. grup Naringin+5-Fluorouracil (NA+5-FU) grubu (10 rat): Bu gruptaki ratlara 14 gün süreyle intragastrik gavaj yoluyla 100 mg/kg dozunda naringin verildi ve 9. günden itibaren 5 gün boyunca da 20 mg/kg

dozunda 5-FU ip. olarak uygulandı (Fouad ve ark. 2016).

Deneyel uygulamaların sonunda 15. gün ratlar intramüsküler olarak 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompu, Bayer, Türkiye) anestezi eşliğinde servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildiler. Ardından tüm sıçanların akciğer dokuları alındı ve dokuların bir kısmı histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için hemen %10'luk formaldehit solüsyonu içine konuldu. Dokuların geriye kalan kısmı ise serum fizyolojik ve deiyonize suyla yıkanıp derhal sıvı azota alındı ve biyokimyasal çalışmaların yapılması amacıyla -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildiler.

Histopatolojik Analizler

Alınan akciğer dokuları histopatolojik değerlendirmeler için 48 saatlik süreyle %10'luk formaldehit çözeltisi içinde tespit işlemine tabi tutuldu. Ardından akan su altında yıkamaya alınan dokular, dereceli alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan, Leica RM2125RT mikrotomu (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Histopatolojik incelemeler için hazırlanan preparatlar üçlü boyama (Crosman'ın Modifiye Ettiği Mallory'nin Üçlü Boyaması) yöntemi ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi (Nikon Eclipse i50, Tokyo, Japan) ve fotoğrafları çekildi.

İmmünohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal incelemeler için streptavidin-biotin kompleks metoduna göre uygulamalar yapıldı. Bu amaçla pozitif şarjlı lamlara, 5 µm kalınlığında alınan kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirildi ve distile su ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için kesitler %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika tutuldu. Daha sonra dokular 2 defa 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Ardından dokular antijen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda (pH:6) mikrodalga fırında (500W) 3x5 dakika kaynatıldı. İki kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitlerin üzerine protein bloklama solüsyonu eklendi ve oda ısısında 10 dakika bekletildi. Protein blok solüsyonu kesitlerden uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkanan dokular, antikör dilüsyon buffer ile sulandırılan anti-Bax (katalog no.sc-7480, dilution 1/100; Santa Cruz, USA) ve anti-Bcl2 (katalog no.sc-7382, dilution 1/100; Santa Cruz, USA) antikörleri ile 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 2x5 dk. PBS ile yıkanan dokularda sekonder kit olarak Expose Mouse and Rabbit Specific HRP/DAP Detection IHC Kit (Abcam, Katalog no. ab80436) kullanıldı. Kromojen olarak 3,3-diaminobenzidine (DAB) ile muamele edilen kesitler, önce çeşme suyu ile yıkandı, ardından Mayer's hematoksilen ile 45 saniye süreyle boyama işlemi gerçekleştirildi. Alkol ve ksilol serileri sonrasında kesitler lamel ile kapatılarak ışık

mikroskobu ile incelendi (Nikon Eclipse i50, Tokyo, Japan) ve fotoğrafları çekildi. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. İmmün boyanmanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı. İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi 0 (yok), +1 (az), +2 (orta), +3 (şiddetli) olarak değerlendirildi (Küçükler ve ark. 2020).

Biyokimyasal Analizler

Deney sonunda alınan akciğer dokuları TissueLyzer II® (Qiagen, Germantown, USA) ile homojenize edildi. 10.000 g'de 20 dakika boyunca santrifüj edilen homojenatlardan, süpernatantlar elde edildi. Oksidan ve antioksidan parametreler olan Glutatyon (GSH), Nitrik oksit (NO) ve Tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) seviyeleri spektrofotometrik yöntem aracılığıyla belirlendi.

İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS 22.00 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi ve verilerin tanımlayıcı istatistikleri, normal dağılım gösteren değişkenler için ortalama±SD olarak belirtildi. Biyokimyasal verilerin karşılaştırılması için One-way ANOVA-Tukey testi kullanıldı. İmmünohistokimyasal verilerin analizi için de Kruskal Wallis testi kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı fark bulunduğu, ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı. p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait akciğer kesitlerinin histopatolojik incelemesinde, hafif alveolar hipereminin dışında bronş, bronşiyol ve pulmoner interstisyum yapılarının normal görünümde olduğu tespit edildi (Şekil 1A). 5-Fluorouracil uygulanan gruba ait akciğer kesitlerinde ise interstisyel fibrozis ve konjesyon, alveoller arası septumda yangısal hücre infiltrasyonuna bağlı kalınlaşma, peribronşiyal lenfoid doku hiperplazisi ile birlikte bronşiyollerde epitelyal hücre dökülmeleri gözlemlendi (Şekil 1B). NA+5-FU grubuna ait akciğer kesitlerinde ise naringin uygulamasının akciğerdeki histopatolojik bulguları hafiflettiği ve görüntünün kontrol grubundaki görüntüye yakın bir halde olduğu görüldü (Şekil 1C).

İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal boyamada Bax ve Bcl-2 antikörleri ile reaktivite gösteren pozitif hücreler kahverengi olarak gözlenmektedir. Kontrol grubuna ait ratların akciğer kesitlerinde Bax immünopozitifliğine rastlanmazken, 5-FU grubuna ait kesitlerde alveollerde ve interstisyel alanlarda yoğun Bax immünopozitifliği tespit edildi. NA+5-FU grubunda

ise naringin uygulaması ile kontrole yakın Bax immünpozitifliğinin olduğu tespit edildi ($p<0,05$, Tablo 1, Şekil 2). Anti-apoptotik proteinler ailesinden olan Bcl-2 immünpozitifliği bakımından kesitler değerlendirildiğinde ise kontrol grubunda alveollerde ve interstisyel alanlardaki yoğun pozitifliğin 5-FU grubuna kıyasla önemli ölçüde fazla olduğu, naringin uygulanan gruptaki immünpozitifliğin ise 5-FU grubuna kıyasla fazla, kontrol grubuna kıyasla da az olduğu tespit edildi ($p<0,05$, Tablo 1, Şekil 2).

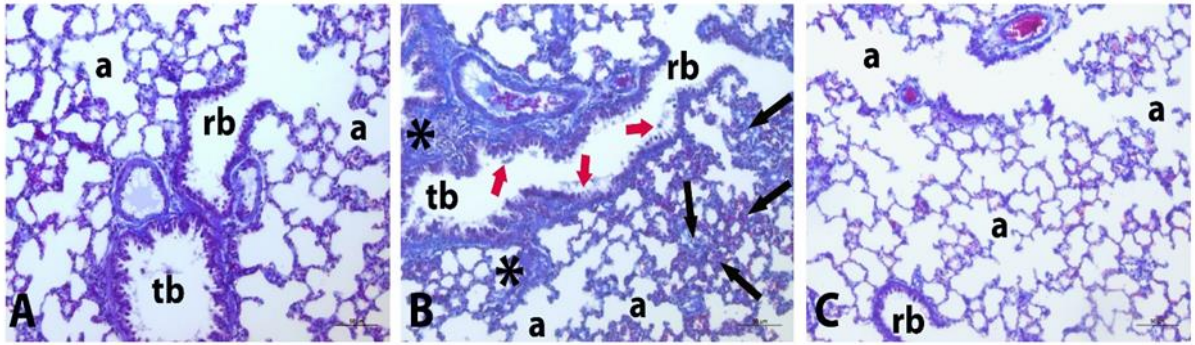
Biyokimyasal Bulgular

5-Fluorouracil uygulanan ratlara ait akciğer dokusundaki GSH seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü ($p<0,0001$), naringin uygulanan grupta ise sadece 5-

FU verilen gruba kıyasla anlamlı şekilde arttığı ($p<0,0001$) tespit edildi (Şekil 3).

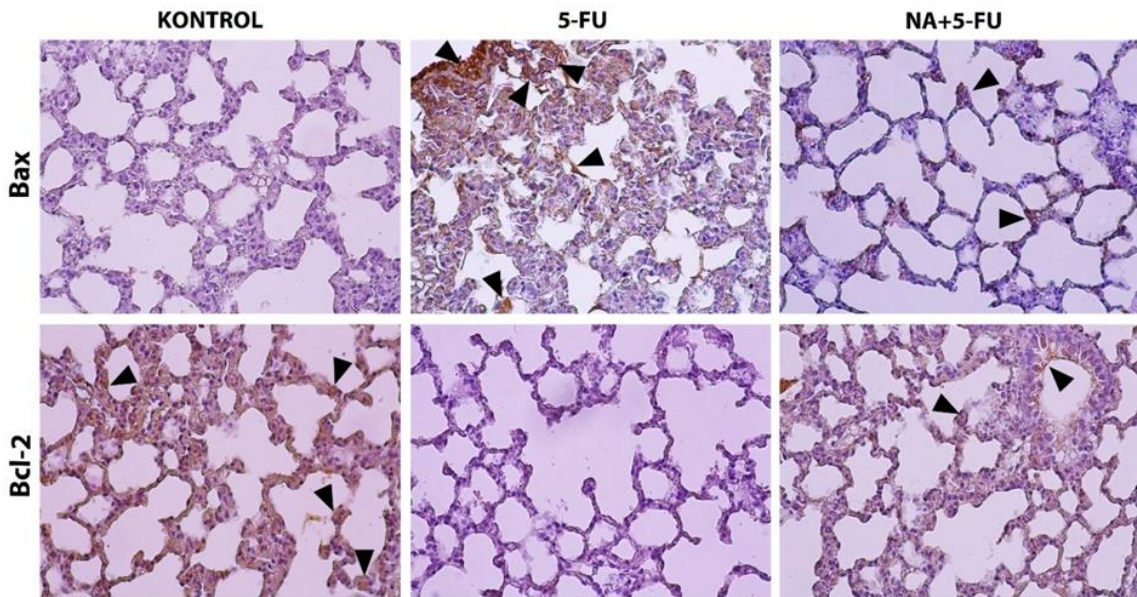
5-Fluorouracil uygulanan ratlara ait akciğer dokularındaki NO seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı ($p<0,001$), naringin ile birlikte 5-FU uygulanan sıçanlarda ise istatistiksel açıdan önemli derecede azalmanın ($p<0,001$) olduğu tespit edildi (Şekil 4).

5-Fluorouracil uygulanan ratlara ait akciğer doku örneklerindeki TBARS seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0,0001$), naringin ile birlikte 5-FU uygulanan sıçanlarda ise önemli derecede azalma ($p<0,0001$) olduğu tespit edildi (Şekil 5).



Şekil 1: Kontrol (A), 5-FU (B) ve NA+5-FU (C) gruplarına ait akciğer dokularının ışık mikroskopik görüntüsü. a: alveol, tb: terminal bronşiyol, rb: respiratuar bronşiyol, yıldız: peribronşiyal lenfoid doku hiperplazisi ve alveoller arası septumda yangısal hücre infiltrasyonuna bağlı kalınlaşma, siyah ok: interstisyel fibrozis ve konjesyon, kırmızı ok: epitelyal hücre dökülmeleri. Boya: Crossman'ın Üçlü Boyaması. X200.

Figure 1: Light microscopic image of lung tissues belonging to Control (a), 5-FU (B) and NA+5-FU (C) groups. a: alveolus, tb: terminal bronchioles, rb: respiratory bronchioles, star: hyperplasia in the peribronchiolar lymphoid tissue and thickening due to inflammatory cell infiltration in the septum between the alveoli, black arrow: interstitial fibrosis and congestion, red arrow: exfoliated epithelial cells. Stain: Crossman's Triple Stain. X200.



Şekil 2: Kontrol, 5-FU ve NA+5-FU gruplarındaki sıçanlara ait akciğer dokusunda Bax ve Bcl-2 ekspresyonunu gösteren immunohistokimyasal boyama. Ok başı: İmmünpozitif hücreler. Boya: Streptavidin-Biotin Kompleks. X200.

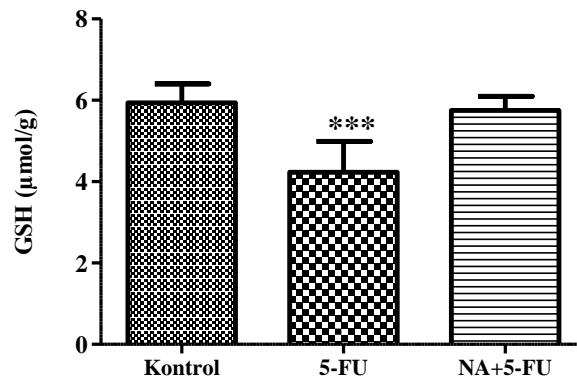
Figure 2: Immunohistochemical staining showing Bax and Bcl-2 expression in lung tissue belonging to rats in the Control, 5-FU and NA+5-FU groups. Arrowhead: Immunopositive cells. Stain: Streptavidin-Biotin Complex. X200.

Tablo 1. Akciğerlerde anti-Bax ve anti-Bcl-2 antikollarına ait immünopozitiflik skorları.

Table 1. Immunopositivity scores of anti-Bax and anti-Bcl-2 antibodies in the lungs.

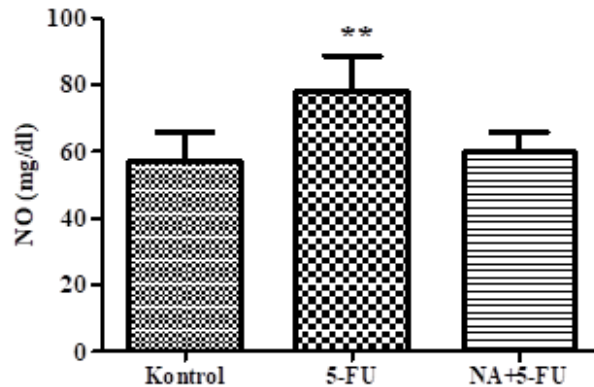
Gruplar	Anti-Bax	Anti-Bcl-2
Kontrol	0,81±0,09 ^a	2,58±0,31 ^a
5-FU	2,71±0,22 ^b	0,56±0,13 ^b
NA+5-FU	1,29±0,06 ^c	2,01±0,19 ^c

Sonuçlar ortalama±SD olarak ifade edilmiştir. ^{abc}Aynı sütundaki farklı harfler istatistik farklılığı ifade etmektedir (p<0,05).



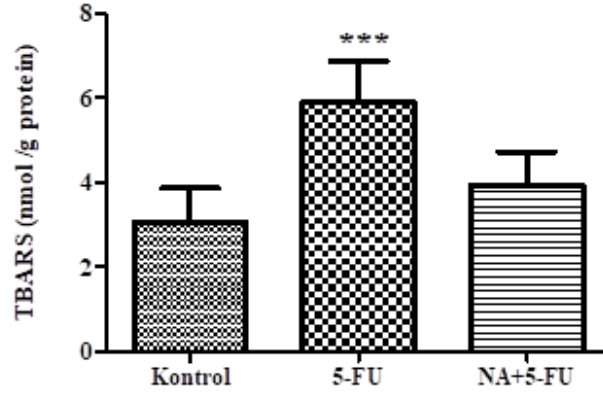
Şekil 3: Bütün gruplardaki ratların akciğer dokularına ait GSH seviyelerini gösteren grafik. (***:p<0,0001, n=10. Sonuçlar ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Figure 3: For all groups, illustration of levels of GSH in the lung tissues. (***:p<0,0001, n=10, the results were expressed as mean±SD. Error bars indicate standard deviation.)



Şekil 4: Bütün gruplardaki ratların akciğer dokularına ait NO seviyelerini gösteren grafik. (**:p<0,001, n=10. Sonuçlar ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Figure 4: For all groups, illustration of levels of NO in the lung tissues. (**:p<0,001, n=10, the results were expressed as mean±SD. Error bars indicate standard deviation.)



Şekil 5: Bütün gruplardaki ratların akciğer dokularına ait TBARS seviyelerini gösteren grafik. (***: $p < 0,0001$, $n = 10$. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Figure 5: For all groups, illustration of levels of TBARS in the lung tissues. (***: $p < 0,0001$, $n = 10$, the results were expressed as mean \pm SD. Error bars indicate standard deviation.)

TARTIŞMA

Kemoterapi kanser hastaları için başlıca tedavi yolu olsa da çok ciddi yan etkilere sebep olması nedeniyle terapötik amaçla kullanımı sınırlıdır (Ramadori ve Cameron 2010, Naidu ve ark. 2004). Şiddetli organ toksisiteleri tedavinin etkinliğini bozarak sağ kalımı olumsuz etkileyebilmektedir (Eren ve ark. 2018). Önemli bir kemoterapötik ajan olan 5-FU'nun da toksik etkileri kullanımını sınırlandırmaktadır (Gawish ve ark. 2013). 5-Fluorouracilin toksik etkilerine karşı koruyucu özellikte olabilecek doğal maddeler ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Ali 2012, Gelen ve ark. 2017, Famurewa ve ark. 2019). Yaptığımız literatür taraması ile 5-FU kullanımının hepatotoksositeye (Abdel-Hamid ve ark. 2011), kardiyotoksositeye ve nörotoksositeye (Lamberti ve ark. 2012, Han ve ark. 2008) yol açtığını gösteren çalışmalar olduğunu gördük. Ancak 5-FU'nun akciğer dokusunun histolojisi üzerinde ne gibi etkileri olduğunu gösteren sınırlı sayıda bilgiye ulaşabildik. Biz de bu amaçla 5-FU uygulaması ile akciğer toksisitesi oluşturmayı ve naringinin bu durum üzerindeki koruyucu etkilerini gözlemleyebilmeyi hedefledik.

Akciğer kesitlerinin histopatolojik incelemesinde 5-FU uygulanan grupta interstisyel fibrozis ve konjesyon, alveoller arası dokuda hücrel infiltrasyona bağlı artış, peribronşiyal lenfoid doku hiperplazisi ile birlikte bronşiyollerde epitelyal hücre dökülmeleri gözlemledik. 5-Fluorouracilin akciğer dokusunda neden olduğu yapısal değişiklikler arasında amfizem olgusunun geliştiğini, mononükleer hücre infiltrasyonu ve interstisyel fibrozisin meydana geldiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Al-Hamdany ve Al-Hubaity 2014a, Al-Hamdany ve Al-Hubaity 2014b). Farklı bir çalışmada 5-FU verilen farelere ait akciğerlerde konjesyon, kanama ve mononükleer hücre infiltrasyonu nedeniyle interalveolar septada kalınlaşma olduğu gösterilmiştir (Al-Jawaly ve Al-Sadi

2017). 5-Fluorouracil grubunda gözlemlediğimiz terminal bronşiyollerin etrafındaki inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve bronşların etrafındaki bağ dokusu artışı bleomisin gibi başka kanser ilaçlarıyla yapılan çalışmalarda da görülmüştür (Grande ve ark. 1998, Hay ve ark. 1991). Bu durum verilen ilaç nedeniyle dokuda bozulmaların başladığını ve dolayısıyla ortamdaki inflamatuvar hücre infiltrasyonunun artışı açıklamaktadır. Akciğer fibrozisinin patofizyolojisinde ve patogenezinde rol oynayan ana nedenlerin başında reaktif oksijen türevleri gelmektedir (Dani ve ark. 2004, Bhandari ve Bhandari 2007). Fibroblastların, ekstrasellüler matriks ve kollajen lif sentezinden ve salgılanmasından sorumlu olduğu da bilinmektedir (Gien ve Kinsella 2011). Görüşümüze göre, 5-FU tarafından indüklenen ROS, fibroblastların aktivitesinde artışa; dolayısıyla da interstisyel boşluklarda daha sonra fibröz dokuya dönüşecek olan kollajen lif ve ekstrasellüler matriks artışına yol açmış olabilir.

Naringin+5-Fluorouracil grubuna ait akciğer kesitlerinde ise naringin uygulamasının akciğerdeki histopatolojik bulguları hafiflettiği ve görüntünün kontrol grubundaki görüntüye yakın bir hale geldiği görüldü. Turgut ve ark.'nın ratlarda bleomisin kaynaklı akciğer hasarına karşı naringinin koruyucu etkilerini araştırdıkları doza bağımlı bir çalışmada, naringin uygulaması ile akciğer dokusunda inflamasyon bulgularının azaldığını göstermişlerdir (Turgut ve ark. 2016). Chen ve arkadaşlarının farelerde paraquat kaynaklı akut akciğer hasarı üzerine yapmış oldukları çalışmada da naringin uygulamasının akciğerde meydana gelen hasarlara karşı koruyucu nitelikte olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark. 2013). Liu ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı çalışmada, LPS uygulaması nedeniyle meydana gelen akut akciğer hasarına bağlı histopatolojik bulguların naringin uygulaması ile önemli ölçüde iyileştiği gösterilmiştir (Liu ve ark. 2011). 5-Fluorouracil uygulaması ile

süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türevlerinin arttığı dolayısıyla akciğerde fibrozisin geliştiği bildirilmektedir. Bu durum toksik etkileri sebebiyle 5-FU'nun sitokin düzensizliği ve inflamasyona neden olması, fibroblastların aktivasyonu ile kollajen üretiminin artması ile açıklanabilir (Dani ve ark. 2004). Çalışmamızda 5-FU grubunda gözlemlediğimiz interstisyel fibrozisin naringin uygulaması ile önemli ölçüde azaldığını gördük. Bu durum naringinin, akciğerlerde inflamatuvar hücre birikimini ve dolayısıyla fibrozisi engellenmesi gibi olası mekanizmalarla açıklanabilir.

Apoptoz, aşırı ROS seviyesinden kaynaklanan ve hücrede inflamatuvar fazın proliferatif faza aniden değiştiğini gösteren bir belirteçtir. Apoptoz sürecinde kaspaz ailesi proteinlerinden olan Bax ve Bcl-2 proteinlerinin miktarlarında değişimler meydana gelir (Cui ve ark. 2018). Bax proapoptotik bir protein iken Bcl-2 antiapoptotik özelliktedir (Coşkun ve Özgür 2011). Çalışmamızda 5-FU grubuna ait kesitlerde yoğun Bax immünpozitifliği tespit edilirken, NA+5-FU grubunda ise Bax immünpozitifliğinin çok düşük olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bcl-2 immünpozitifliği bakımından kesitler değerlendirildiğinde ise kontrole göre 5-FU grubunda immünpozitifliğin önemli ölçüde az olduğu, naringin uygulanan gruptaki immünpozitifliğin ise 5-FU grubuna kıyasla fazla, kontrol grubuna kıyasla da az olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Gelen ve arkadaşlarının yaptığı, 5-FU uygulamasının rat karaciğerinde meydana getirdiği hepatotoksosite ile ilgili çalışmada antiapoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonunun, 5-FU uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha düşük yoğunlukta olduğu gösterilmiştir (Gelen ve ark. 2017). Rashid ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yapmış olduğu 5-FU kullanımına bağlı böbrek toksisitesi ile ilgili çalışmada da, 5-FU uygulanan gruptaki böbrek kesitlerinde Bcl-2 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı, Bax immünpozitifliğinin ise önemli düzeyde arttığı gösterilmiştir (Rashid ve ark. 2014). Gan ve arkadaşları 5-FU uygulaması ile bağırsak mukoza iltihabı oluşturdukları rat modelinde, Bax ve Bcl-2 mRNA ekspresyonunu analiz etmiş ve 5-FU grubunda Bax mRNA ifadesinin önemli düzeyde arttığını, Bcl-2 mRNA ifadesinin ise önemli düzeyde düştüğünü göstermişlerdir (Gan ve ark. 2020). Bu sonuçlar, naringinin histopatolojik yönden gösterilmiş olan koruyucu etkisini, iltihaplanma ve apoptozun ortadan kaldırılması üzerine de oldukça etkili olduğunu immünohistokimyasal açıdan da göstermektedir.

Organizmada var olan antioksidan savunma sistemi, vücudu ROS kaynaklı hücre hasarına karşı koruyan önemli bir sistemdir (Gelen ve ark. 2017). Oksidatif stres, artan ROS üretiminin veya antioksidan savunmanın azalmasının bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. 5-Fluorouracil uygulaması ile karaciğer ve böbreklerde ROS artışının ve önemli antioksidan enzimlerden olan GSH aktivitesinde azalmanın meydana geldiği bildirilmektedir (Gelen ve ark. 2018).

Ayrıca 5-FU uygulaması ile akciğerlerde reaktif oksijen türevlerinin arttığı ve oksidatif stres kaynaklı hasarın geliştiği (Al-Hamdany ve Al-Hubaity 2014a) ve bu durumun akciğerlerde, antioksidan savunma mekanizmasını inaktive ederek oksijene duyarlı hücrelerin ölümüne ve tipik bir alveolar hücre hasarına neden olabileceği gösterilmiştir (Teixeira ve ark. 2008). Yapılan çalışmalarda antiviral, antikanserojen, hepatoprotektif, kardiyoprotektif ve nöroprotektif etkileri olduğu gösterilmiş olan naringinin ise sıçan akciğerlerinde antioksidan seviyeyi artırarak doksorubisin kaynaklı oksidatif stresi durdurduğu bildirilmiştir (Jagetia ve ark. 2018).

Glutasyonun akciğerin antioksidan savunmasında kritik bir öneme sahip olduğu ve bilhassa solunum yolu epitelinin oksidatif hasardan ve inflamasyondan korunmasında vazgeçilmez bir yeri olduğu gösterilmiştir. Glutasyon seviyesindeki dengesizlikler, inflamatuvar akciğer hastalıklarında proinflamatuvar genlerin transkripsiyonuna yol açmaktadır (Özyurt ve ark. 2007). Mevcut çalışmamızda 5-FU uygulanan sıçanlara ait akciğer dokularında GSH seviyesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalmanın olduğunu, naringin uygulamasıyla ise GSH seviyesinde artışın meydana geldiğini tespit ettik. Bu durum 5-FU uygulanan sıçan akciğerlerinde hasar meydana geldiğini, naringinin de bu durum üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Serbest radikal türevlerinden biri olan nitrik oksit, organizmada aynı zamanda peroksinitrit anyonu ve hidroksil radikali gibi çok etkin başka radikallerin de üretilmesine neden olur. Bu radikaller dokulara zarar vermektedir ve doğrudan doğruya mitokondriyal solunum zincirini de inhibe etmektedirler (Yılmaz ve Fatmagül 2010). Giri ve ark. yapmış oldukları çalışmada bleomisin kaynaklı akciğer fibrozisinin patogenezisinde nitrik oksit üretiminin rol oynadığını tespit etmişlerdir (Giri ve ark. 2002). Yapılan başka çalışmalarda da 5-FU'nun endojen nitrik oksit oluşumu üzerindeki indükleyici etkisi tespit edilmiştir (Yin ve ark. 2007, Leitão ve ark. 2007). Çalışmamızda 5-FU grubunda kontrol grubuna kıyasla arttığını tespit ettiğimiz nitrik oksit seviyesi, 5-FU uygulaması ile histopatolojik olarak da tespit ettiğimiz akciğer hasarını ve oksidatif stresin oluştuğunu biyokimyasal olarak da göstermiş oldu. Bununla birlikte, 5-FU ile birlikte naringin uygulamasının akciğer dokularındaki nitrik oksit seviyesinde önemli ölçüde düşüşe sebep olduğunu tespit ettik. Bu durum da bize naringinin 5-FU kaynaklı akciğer hasarına karşı antifibrotik etkilerinin yanı sıra serbest radikallerin neden olduğu hasarı, oksidatif stresi hafifleterek ve inflamasyonu iyileştirerek gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonu genellikle ROS oluşumunun ve oksidatif stresin sonuçlarından biridir (Eskandari ve ark. 2015). 5-FU uygulamasından sonra gözlenen oksidatif stres, lipid peroksidasyonunda artışa neden olmaktadır (Santandreu ve ark. 2011). 5-FU uygulanan ratlara ait kalp dokusunda (Eskandari ve ark. 2015),

hamsterlarda 5-FU ile indüklenen oral mukozit olgusunda (Yoshino ve ark. 2013) ve yine ratlara verilen 5-FU ile karaciğer ve böbreklerde lipid peroksidasyonunda artış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Gelen ve ark. 2018). Biz de çalışmamızda lipid peroksidasyonunu göstermek amacıyla akciğerlerde TBARS seviyesinin ölçümünü gerçekleştirdik. TBARS seviyesi 5-FU grubunda diğer gruplara oranla oldukça yüksekti. Bu durum da yine bize 5-FU'nun akciğerlerde antioksidan savunma sisteminde hasara ve lipid peroksidasyonunda artışa neden olduğunu gösterdi. Naringin uygulanan grupta TBARS seviyesinde meydana gelen anlamlı düzeydeki azalma naringinin oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermekteydi.

Mevcut çalışmamız, histopatolojik, immünohistokimyasal değerlendirmeler ve biyokimyasal testler sonucunda, sıçanlarda 5-FU ile indüklenen akciğer hasarına karşı naringinin koruyucu etkilerini göstermektedir.

Sonuç olarak 5-FU'nun akciğer dokusunda oksidan antioksidan dengesi bozarak hasara neden olduğu, inflamasyonu artırdığı gözlenmiş, naringinin ise antioksidan ve anti-inflamatuar etki göstererek 5-FU kaynaklı bu hasarı azalttığı tespit edilmiştir. Konu ile ilgili yapılacak ileri düzey çalışmalar ile 5-FU kaynaklı akciğer hasarını azaltmada ya da engellemede naringinin alternatif tedavi yöntemi olarak yerini alacağı ve konuyla ilgili farklı çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (AÜHADYEK) 26/12/2019 tarihli, Karar No:2019/16-248 sayılı onayıyla etik kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abdel-Hamid NM, Fawzy MA, El-Moselhy MA.** Evaluation of hepatoprotective and anticancer properties of aqueous olive leaf extract in chemically induced hepatocellular carcinoma in rats. *Am. J. Med. Med. Sci.* 2011; 1(1):15–22.
- Adil M, Kandhare AD, Visnagri A, Bodhankar SL.** Naringin ameliorates sodium arsenite-induced renal and hepatic toxicity in rats: decisive role of KIM-1, Caspase-3, TGF- β , and TNF- α . *Ren Fail.* 2015; 37(8): 1396-1407.
- Al-Hamdany MZ, Al-Hubaity AY.** Protective effects of N-acetylcysteine against 5-fluorouracil-induced pulmonary toxicity in albino rats. *Iraqi J. Med. Sci.* 2014a; 12(2):139–149.
- Al-Hamdany MZ, Al-Hubaity AY.** The structural changes of the rat's lung induced by intraperitoneal injection of 5-fluorouracil. *J Pak Med Assoc.* 2014b; 64:734–738.
- Al-Jawaly NK, Al-Sadi H.** Histopathological Study of Lung, Testis, and Urinary Bladder of Mice Treated with 5-Fluorouracil. *Rafidain J. Sci.* 2017; 26(1):9–16.

- Alvarez-Cabellos R, Garcia-Carbonero R, Garcia-Lacalle C, Gomez P, Tercero A, Sanchez D, Paz-Ares L.** Fluorouracil-based chemotherapy in patients with gastrointestinal malignancies: influence of nutritional folate status on toxicity. *J. Chemother.* 2007; 19(6):744–749.
- Bhandari A, Bhandari V.** Bronchopulmonary dysplasia: an update. *Indian J. Pediatr.* 2007; 74(1):73–77.
- Chen Y, Nie Y, Luo Y, Lin F, Zheng Y, Cheng G, Wu H, Zhang K, Su W, Shen J.** Protective effects of naringin against paraquat-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 58:133–140.
- Choi J-S, Piao Y-J, Kang KW.** Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. *Arch. Pharm. Res.* 2011; 34(4):607–613.
- Chtourou Y, Slima A Ben, Makni M, Gdoura R, Fetoui H.** Naringenin protects cardiac hypercholesterolemia-induced oxidative stress and subsequent necroptosis in rats. *Pharmacol. Reports.* 2015; 67(6):1090–1097.
- Coşkun G, Özgür H.** Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Derg.* 2011; 20(3):45–58.
- Cui J, Wang G, Kandhare AD, Mukherjee-Kandhare AA, Bodhankar SL.** Neuroprotective effect of naringin, a flavone glycoside in quinolinic acid-induced neurotoxicity: possible role of PPAR- γ , Bax/Bcl-2, and caspase-3. *Food Chem. Toxicol.* 2018; 121:95–108.
- Dani C, Cecchi A, Bertini G.** Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant. *Minerva Pediatr.* 2004; 56(4):381–94.
- El-Sayyad HI, Ismail MF, Shalaby FM, Abou-El-Magd RF, Gaur RL, Fernando A, Raj MHG, Ouhit A.** Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *Int. J. Biol. Sci.* 2009; 5(5):466.
- Eren H, Aydin HR, Tumkaya L, Kazaz IO, Kalkan Y, Kazaz SN, Mercantepe T, Horsanali MO, Yilmaz A.** Whortleberry protects kidney against the cisplatin-induced nephrotoxicity: an experimental study. *Ren. Fail.* 2018; 40(1):466–474.
- Eskandari MR, Moghaddam F, Shahraki J, Pourahmad J.** A comparison of cardiomyocyte cytotoxic mechanisms for 5-fluorouracil and its pro-drug capecitabine. *Xenobiotica.* 2015; 45(1):79–87.
- Famurewa AC, Asogwa NT, Aja PM, Akunna GG, Awoke JN, Ekeleme-Egedigwe CA, Maduagwuna EK, Folawiyo AM, Besong EE, Ekpono EU.** Moringa oleifera seed oil modulates redox imbalance and iNOS/NF- κ B/caspase-3 signaling pathway to exert antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic mechanisms against anticancer drug 5-fluorouracil-induced nephrotoxicity in rats. *South African J. Bot.* 2019; 127:96–103.
- Formica J V, Regelson W.** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 1995; 33(12):1061–1080.
- Fouad AA, Albuali WH, Jresat I.** Protective Effect of Naringenin against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Pharmacology.* 2016; 97:224-232.
- Gan Y, Ai G, Wu J, Luo H, Chen L, Huang Q, Wu X, Xu N, Li M, Su Z.** Patchouli oil ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats via protecting intestinal barrier and regulating water transport. *J. Ethnopharmacol.* 2020; 250:112519.
- Gawish S, Omar N, Sarhan N.** Histological and ultrastructural study of 5-fluorouracil induced small intestinal mucosal damage in rats. *Asian J Cell Biol.* 2013; 8(1):1–21.

- Gelen V, Şengül E, Gedikli S, Atila G, Uslu H, Makav M.** The protective effect of rutin and quercetin on 5-FU-induced hepatotoxicity in rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2017; 7(7):647-653.
- Gelen V, Şengül E, Yıldırım S, Atila G.** The protective effects of naringin against 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2018; 21(4):404-410.
- Gien J, Kinsella JP.** Pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia. *Curr. Opin. Pediatr.* 2011; 23(3):305-313.
- Giri SN, Biring I, Nguyen T, Wang Q, Hyde DM.** Abrogation of bleomycin-induced lung fibrosis by nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine in mice. *Nitric Oxide.* 2002; 7(2):109-118.
- Grande NR, Peão MND, de Sá CM, Águas AP.** Lung fibrosis induced by bleomycin: structural changes and overview of recent advances. *Scanning Microsc.* 1998; 12(3):487-494.
- Han R, Yang YM, Dietrich J, Luebke A, Mayer-Pröschel M, Noble M.** Systemic 5-fluorouracil treatment causes a syndrome of delayed myelin destruction in the central nervous system. *J. Biol.* 2008; 7(4):12.
- Hay J, Shahzeidi S, Laurent G.** Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Arch. Toxicol.* 1991; 65(2):81-94.
- Hermenean A, Ardelean A, Stan M, Hadaruga N, Mihali C-V, Costache M, Dinischiotu A.** Antioxidant and hepatoprotective effects of naringenin and its β -cyclodextrin formulation in mice intoxicated with carbon tetrachloride: a comparative study. *J. Med. Food.* 2014; 17(6):670-677.
- Jagetia GC, Lalrinpuii T.** Naringin protects rat lung against the doxorubicin-induced biochemical injury. *MOJ Anat & Physiol.* 2018; 5(2):134-140.
- Jung G, Hennings G, Pfeifer M, Bessler WG.** Interaction of metal-complexing compounds with lymphocytes and lymphoid cell lines. *Mol. Pharmacol.* 1983; 23(3):698-702.
- Juranek I, Bezek S.** Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species-cause or consequence of tissue injury? *Gen. Physiol. Biophys.* 2005; 24(3):263-278.
- Küçükler S, Özdemir S, Çomaklı S, Kandemir F.** Ratlarda İzoniazid Kaynaklı Akciğer Hasarına Karşı Krisinin Etkileri. *Kocatepe Vet. Derg.* 2020; 13(2):161-171.
- Kwatra M, Kumar V, Jangra A, Mishra M, Ahmed S, Ghosh P, Vohora D, Khanam R.** Ameliorative effect of naringin against doxorubicin-induced acute cardiac toxicity in rats. *Pharm Biol.* 2016; 54(4):637-647.
- Lamberti M, Porto S, Marra M, Zappavigna S, Grimaldi A, Feola D, Pesce D, Naviglio S, Spina A, Sannolo N.** 5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. *J. Exp. Cancer Res.* 2012; 31(1):60.
- Lee M-H, Yoon S, Moon J-O.** The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27(1):72-76.
- Leitão RFC, Ribeiro RA, Bellaguarda EAL, Macedo FDB, Silva LR, Oriá RB, Vale ML, Cunha FQ, Brito GAC.** Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007; 59(5):603-12.
- Leopoldini M, Russo N, Toscano M.** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* 2011; 125(2):288-306.
- Liu Y, Wu H, Nie Y, Chen J, Su W, Li P.** Naringin attenuates acute lung injury in LPS-treated mice by inhibiting NF- κ B pathway. *Int. Immunopharmacol.* 2011; 11(10):1606-1612.
- Love WE, Bernhard JD, Bordeaux JS.** Topical imiquimod or fluorouracil therapy for basal and squamous cell carcinoma: a systematic review. *Arch. Dermatol.* 2009; 145(12):1431-1438.
- Matouk AI, Taye A, Heeba GH, El-Moselhy MA.** Quercetin augments the protective effect of losartan against chronic doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013; 36(2):443-450.
- Montanari A, Widmer W, Nagy S.** Health promoting phytochemicals in citrus fruit and juice products. *Funct. Food Phytochem.* Springer; 1997. p. 31-52.
- Naidu MUR, Ramana GV, Rani PU, Suman A, Roy P.** Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis-complicating the treatment of cancer. *Neoplasia.* 2004; 6(5):423-431.
- Nora El-hoseany M.** Protective Effect of Captopril against 5-Fluorouracil-Induced Hepato and Nephrotoxicity in Male Albino Rats. *J. Am. Sci.* 2012; 8(2):680-685.
- Oršolić N, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Đikić D, Prskalo ZŠ, Sirovina D.** DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2011; 656(1-3):110-118.
- Özyurt H, Özyurt B, Söğüt S, Şahin Ş, Temel İ, Akyol Ö.** Bleomisin ile Olusturulan Akciğer Fibrozisinde Pürin Katabolizması Enzim Aktiviteleri Üzerine CAPE nin Etkisi. *Fırat Tıp Derg.* 2007; 12(3):168-172.
- Ramadori G, Cameron S.** Effects of systemic chemotherapy on the liver. *Ann. Hepatol.* 2010; 9(2):133-143.
- Rashid S, Ali N, Nafees S, Hasan SK, Sultana S.** Mitigation of 5-Fluorouracil induced renal toxicity by chrysin via targeting oxidative stress and apoptosis in wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* 2014; 66:185-193.
- Rašković A, Stilić N, Kolarović J, Vasović V, Vukmirović S, Mikov M.** The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Molecules.* 2011; 16(10):8601-8613.
- Renugadevi J, Prabu SM.** Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicolog.* 2009; 256(1-2):128-134.
- Said-Elbahr R, Nasr M, Alhnan MA, Taha I, Sammour O.** Nebulizable colloidal nanoparticles co-encapsulating a COX-2 inhibitor and a herbal compound for treatment of lung cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016; 103:1-12.
- Santandreu FM, Valle A, Oliver J, Roca P.** Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2011; 28(2):219-228.
- Şengül E, Gelen V, Gedikli S, Özkanlar S, Gür C, Çelebi F, Çınar A.** The protective effect of quercetin on cyclophosphamide-Induced lung toxicity in rats. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 92:303-307.
- Serafini M, Villano D, Spera G, Pellegrini N.** Redox molecules and cancer prevention: the importance of understanding the role of the antioxidant network. *Nutr. Cancer.* 2006; 56(2):232-240.
- Sghaier M Ben, Skandrani I, Nasr N, Franca M-GD, Chekir-Ghedira L, Ghedira K.** Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure-activity relationship study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2011; 32(3):336-48.
- Singh D, Chander V, Chopra K.** Protective effect of naringin, a bioflavonoid on ferric nitrilotriacetate-induced oxidative renal damage in rat kidney. *Toxicology.* 2004; 201(1-3):1-8.
- So F V, Guthrie N, Chambers AF, Carroll KK.** Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and

absence of excess estrogen. *Cancer Lett.* 1997; 112(2):127–133.

- Sobrero AF, Aschele C, Bertino JR.** Fluorouracil in colorectal cancer--a tale of two drugs: implications for biochemical modulation. *J. Clin. Oncol.* 1997; 15(1):368–381.
- Stein A, Voigt W, Jordan K.** Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2010; 2(1):51–63.
- Teixeira KC, Soares FS, Rocha LGC, Silveira PCL, Silva LA, Valença SS, Dal Pizzol F, Streck EL, Pinho RA.** Attenuation of bleomycin-induced lung injury and oxidative stress by N-acetylcysteine plus deferoxamine. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2008; 21(2):309–316.
- Turgut NH, Kara H, Elagoz S, Deveci K, Gungor H, Arslanbas E.** The protective effect of naringin against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in Wistar rats. *Pulm. Med.* 2016;2016.
- Wong VKW, Shapourifar-Tehrani S, Kitada S, Choo PH, lee DA.** Inhibition of rabbit ocular fibroblast proliferation by 5-fluorouracil and cytosine arabinoside. *J. Ocul. Pharmacol.* 1991; 7(1):27–39.
- Yılmaz AB, Yur F.** Ratlarda deneysel akciğer fibrozisinde nitrik oksit oksidasyon ürünleri ve kan gazları düzeylerinin araştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.* 2010; 21(3):135–139.
- Yin X-Y, Jiang J-M, Liu J-Y, Zhu J-R.** Effects of endogenous nitric oxide induced by 5-fluorouracil and L-Arg on liver carcinoma in nude mice. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(46):6249.
- Yoshino F, Yoshida A, Nakajima A, Wada-Takahashi S, Takahashi S, Lee MC.** Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *PLoS One.* 2013; 8(12):e82834.