

1. GİRİŞ

1.1. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Kanserli hastaların kemoterapisi sırasında görülen yan etkiler klinik uygulamalarda halen önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu yan etkilerden biri olan gastrointestinal toksisite, kemoterapiyi reddeden hastaların başlıca sebeplerinden biridir.

Kanser kemoterapisi yanı sıra psöriyazis, romatoid artrit ve birçok enflamatuar hastalıkta geniş bir kullanım alanı olan metotreksat (MTX) intestinal mukozal harabiyete sebebiyet verebilen bir antimetabolittir (1,2). DNA sentezi ve hücre bölünmesi için gerekli olan dihidrofolate redüktaz (DHFR) enzimini ihibe eder (3). Gastrointestinal kanal mukozası gibi hızlı bölünen hücrelerin bulunduğu yerler önemli derecede etkilenir(3). MTX'in neden olduğu mukozal hücre yapı değişiklikleri stomatitis, mukositis, kusma, diyare gibi birçok gastrointestinal yan etkilerle sonuçlanır.

Son zamanlarda çalışmalar, MTX'in normal dokulardaki istenmeyen etkilerini önleyebilecek maddeler üzerinde yoğunlaşmıştır. MTX ile beraber folik asit (4), A vitamini (5,6,7), soya unu (8), sarımsak ekstresi (9) gibi maddelerin verilmesinin, barsak üzerindeki olumsuz etkileri azaltacağını bildiren çalışmalar yayınlanmıştır. Bu maddelerin önemli bir kısmında antioksidan etkinin önemi vurgulanmaktadır. Bu tez çalışmasında kuvvetli bir antioksidan olan E vitamininin, MTX'e bağlı ince barsak mukozası hasarı üzerine etkisi araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNCE BARSAK

İnce barsak; sindirimin, emilimin ve endokrin sekresyonunun yapıldığı, mide ve kalın barsak arasında uzanan, sindirim sisteminin en uzun bölümüdür (yaklaşık 5 m) ve üç kısımdan oluşur.

1. Duodenum: İnce barsağın en kısa parçasıdır. (25-30cm) karaciğer (ve safra kanalı yoluyla) pankreastan gelen salgılar buraya dökülür.

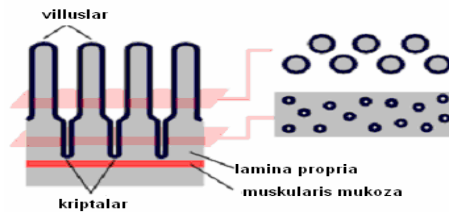
2. Jejunum: Barsağın insanlarda yaklaşık %40'lık kısmını oluşturur, hayvanlarda ise %90'lık kısmıdır.

3. İleum: Kalın barsağa boşalan ince barsağın son kısmıdır.

Her üç bölümünde histolojik tabakaları aynıdır.

İnce barsak mukozası luminal yüzey alanını artıran değişik yapılar içerir. Bunlardan plika sirkularisler (kerckring valfleri) mukoza ve submukozayı kapsayan, makroskopik olarak görülebilen, çok sayıda yarım ay şeklinde katlanmalardır. En çok jejunumda gelişmiştir.

İnce barsak mukozası epitel ve lamina propriayı içeren villus denilen parmaklı çıkıntılar yapar. Villuslar yüzeyi 10 kat artıran, yaklaşık 1 mm uzunluğunda yapılardır. Villus yüzeyini döşeyen tek katlı prizmatik epitel hücreleri çok sayıda mikrovillus bulundurur. Yaklaşık 1µm uzunluğunda ve 0.1 µm genişliğindeki mikrovilluslar barsağın emilim yüzeyini 20 kat artırır.



Şekil 2.1. : İnce Barsak Villus ve Kriptalar Şematik Görünümü

İnce barsak epitel tabakasında iki tip hücre vardır:

1. Silindirik mikrovilluslu epitel hücresi: Esas olarak emilimle görevli bu hücrelerin apikal kısımlarında 300 civarında mikrovillus bulunur. Mikrovilluslar ince barsak epitelinin çizgili kenarlı görünmesine sebep olur. Emilim dışında sindirime yardımcı olan bazı enzimler de salgırlar.
2. Goblet hücresi: Diğer hücrelerin arasına tek tek serpiştirilmiş mukus salgılayan hücrelerdir. Sayıları kalın barsağa doğru gittikçe artar.

İnce barsak epiteli altında bulunan lamina propria gevşek bağ dokusu özelliğindedir. Lamina propria içinde yer yer lenfatik nodüller vardır. İnce barsak bezleri (lieberkühn kriptaları) buraya yerleşmişlerdir.

İnce barsak bezleri muskularis mukozaya kadar uzanan basit tübüler bezlerdir. Salgılarını küçük bir delikle villuslar arasına boşaltırlar.

İnce barsak bezlerinde altı tip hücre vardır:

1. İndiferansiye epitel hücreleri: Mitozlarla çoğalarak absorptif hücrelere veya goblet hücrelerine dönüşürler. Vücudun en hızlı çoğalan hücrelerindendir. Prolifere olup yukarı göçleri ile villus yüzey epiteli 2-4 günde bir yenilenir. Bu hücreler hızlı yenilediğinden antimitotik ilaçlardan oldukça fazla etkilenir.
2. Absorbtif hücreler: Villus yüzeyindeki epitel hücrelerine benzerler. Ancak mikrovillusları daha kısa ve daha azdır.
3. Goblet hücreleri: Bezin daha çok orta kısımlarında bulunurlar. Duodenumda sayıları azdır. İleuma doğru gittikçe sayıları artar.
4. Paneth hücreleri: Bezlerin bazalinde yerleşmiş piramidal seröz hücrelerdir. Salgı granüllerinde antibakteriyal bir enzim olan lizozim bulunur. Lizozimin belli bir grup bakteriye karşı fonksiyon göstermesinin ince barsak florasının düzenlenmesinde önemlidir. Ömürleri ortalama 30 gündür. Mitozla çoğalmazlar. İndeferenziye hücrelerin çoğalmasıyla oluşurlar.
5. Enteroendokrin hücreler: Tüm gastrointestinal kanala yayılmış, diffus nöroendokrin sistem özelliklerini taşıyan bir kısım hücredir. İnce

barsaklarda özellikle kriptaların alt bölümünde bulunurlar. Salgılarını bez hücrelerine değil kan damarlarına verirler. Sindirm sisteminin fizyolojisinin düzenlenmesinde önemlidirler.

6. M (mikrofold) hücreler: Peyer plaklarının ve diğer büyük lenfatik nodüllerinin üzerini örten özelleşmiş epitel hücrelerdir. Bazalindeki membran invajinasyonları ile oluşmuş çukurcuklara lenfositler yerleşir. Apikal kutuplarında ise mikrovillus yerine mikrokıvrımlar (microfold) vardır. Lümen içindeki makro molekülleri endositozla alıp altındaki lenfoid hücrelere tanıtır. böylece barsak içindeki antijenlere karşı immun yanıtın oluşmasına katkıda bulunurlar.

Lamina propria ile submukozayı birbirinden ayıran muskularis mukozanın içte sirküler dışta longitudinal seyreden iki tabakası vardır. Buradan ayrılan bazı kas fibrilleri villus boyunca uzanırlar .

Submukoza sıkı bağ dokusu özelliğindedir. Sadece duodenumda bezler (Brunner bezleri) içerir. Brunner bezlerinin salgısı müközdür ve bikarbonat iyonlarından dolayı alkalidir (pH 7-8). Bikarbonat; Brunner bezlerinin salgısı kimusun asiditesini nötralize ederek proksimal ince barsak mukozasını korur.

2.1.1.Histofizyolojisi

Plika, villus ve mikrovilluslar emilim yüzeyini artıran önemli yapılardır. Sindirim ince barsakta tamamlanır ve emilim ince barsakta gerçekleşir. Lipit sindirimi başlıca pankreatik lipaz ve safranin etkisiyle olur. Lipid emilimi ise duodenumda ve jejunum üst bölümünde olur. Protein ve karbonhidratların sindirimi sonucu meydana gelen aminoasitler ve monosakkaritler epitel hücreleri tarafından aktif transport yoluyla emilir.

Villusların yaptığı ritmik hareketler intestinal fonksiyon için önemlidir. Bu hareket muskularis mukoza ve villusun ucu arasında vertikal olarak seyreden düz kas hücrelerinin kontraksiyonu sonucu gelişir. Bu kontraksiyonlar ile villuslar üzerinde pompalayıcı bir etki oluşur ve lenf sıvısı mezenterik lenfatiklere doğru itilir (10).

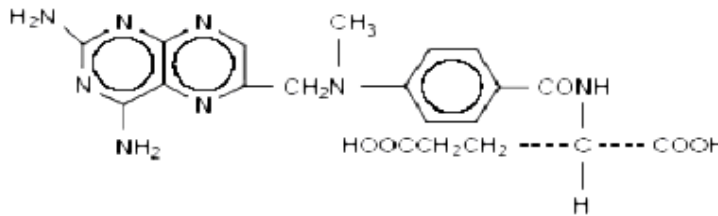
2.2. METHOTREXATE

Özellikle neoplazmlarda kullanılan bir folik asid antimetabolitidir ve yapısı folik asite benzer.

Antimetabolitler, DNA, RNA, proteinler ve diğer temel hücre komponentlerinin sentez zincirinin değişik basamaklarında substrat veya koenzim olarak rol oynayan çeşitli doğal metabolitlerin analoglarıdır. Antimetabolitler, çoğu kez çoğalma fraksiyonu yüksek tipteki tümörlere etkili olmaktadır. En önemli toksik etkileri kemik iliği ve barsak mukozası epiteli üzerindedir. Fetüse, gebeliğin bütün dönemlerinde zarar verebilir (11).

Folik asit antagonistlerinin ilk defa Farber ve ark. Tarafından 1948'de tanımlanmasıyla kanser kemoterapisinde yeni bir dönem açılmıştır. Klinikte şimdiye kadar birçok folat analogu kullanılmıştır ancak Metotreksat en yaygın kullanılanıdır ve metotreksat sodyum, metotreksat LPF, rheumatrex, amethopterin ve NSC-740 olarak da bilinir (12).

Kimyasal olarak folik asitin 4-amino,N¹⁰-metil analogudur. Kimyasal metotreksat N-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridinyl)methylamino]benzoyl]-L-glutamic acid'dir.



Şekil 2.2.: Methotrexat'ın Yapısal Formülü

2.2.1.Kullanım Şekli ve Dozu

Metotreksat üç ana yolla kullanılır:

1. Oral veya parenteral olarak verilen standart dozlarda
2. İntratekal uygulama ile
3. Lökovorin takibi ile çok yüksek dozlarda

1. Standart doz tedavisi: Standart dozdaki sistemik metotreksat akut lösemi, gebelik trofoplastik neoplazisi, mikozis fungoides, meme kanseri, baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılır. Akut lenfositik löseminin idame tedavisinde düşük dozda ($5-25 \text{ mg/m}^2$) oral verilir. Haftada 2 kez 25 mg/m^2 i.m veya i.v. enjeksiyon suretiyle de verilebilir; aynı amaçla ayda 1-2 gün $175-525 \text{ mg/m}^2$ dozunda i.m. verilebilir. Ağır psöriyaziste immünosüpresif olarak haftada 5 gün ağızdan günde toplam 2.5 mg gibi düşük dozda veya haftada bir $10-25 \text{ mg}$ i.v. verilir. Koryokarsinomaya karşı gün aşırı 1 mg/kg i.m. dört doz enjekte edilir ve bu uygulama 3 haftada bir tekrarlanır. Ayrıca romatizmanın şiddetini azaltmak için bu doz uygulanır.(13)
2. İntratekal Tedavi: Metotreksat menenjiyal lösemi veya lenfomaların profilaksisi ve tedavisi, menenjiyal karsinomatozisin tedavisi için 12 mg/m^2 (maksimum 15 mg) intratekal enjekte edilir. Uygulama BOS'ta tümör hücresi kayıp olana kadar 2-5 günde bir tekrarlanır ve BOS tümörden temizlendiğinde de iki doz pekiştirme uygulaması yapılır (12).
3. Yüksek doz kullanımı: Osteosarkom, çocukluk çağı lösemileri, Hodgkin-dışı lenfomalar gibi neoplazmlarda kalsiyum folinatla birlikte yüksek dozlarda kullanılır. Bu uygulamada $100-12.000 \text{ mg/m}^2$ dozunda, 10-60 dakika süren i.v. infüzyonla, 3 haftada bir verilir. İnfüzyonun sona ermesinden sonra 15 mg/m^2 kalsiyum folinat ağızdan 6 saatte bir 8 veya 10 kez verilir. Yüksek doz metotreksat ciddi nefrotoksit etki gösterdiği için uygulamadan önce hasta hidrate edilmeli ve idrar alkalileştirilmelidir. Kalsiyum folinat daha küçük dozda (gün aşırı 0.1 mg/kg i.m gibi)

metotreksatın düşük dozları ile yapılan uygulamalarda da toksisiteyi azaltmak için kullanılabilir (12).

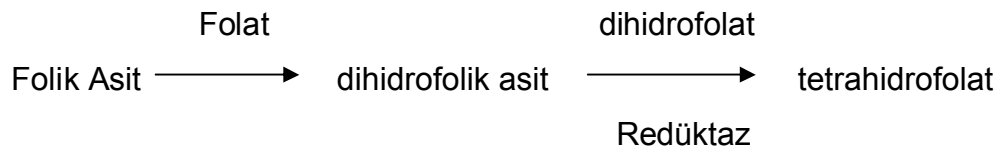
2.2.2. Emilim ve Dağılım

Metotreksat ağız yolundan mutad dozda (10 mg/m²) verildiğinde tama yakın bir oranda absorbe edilir. Plazma proteinlerine nispeten düşük bir oranda (%50) ve zayıf bir şekilde bağlanır. Sulfonamidler ve salisilatlar birlikte verilirlerse bağlanma oranını azaltırlar ve metotreksatın toksisitesini artırabilirler. Metotreksat tümör hücrelerinde, hepatositlerde ve böbrek hücrelerinde uzun süre bağlı kalır. Tümör hücrelerindeki bu durumun tedavi yönünden değeri vardır. Antimetabolitler istirahat halindeki hücrelerde sitotoksik etki yapmazlar. Fakat bu durumdaki hücrede uzun süre kalan metotreksatın, latent sitotoksik etkisi vardır. Hücre bölünmeye başladığı zaman bu etki belirgin hale geçer ve hücreyi öldürür. Standart doz uygulamalarında sinir sistemine ve BOS' a giremez. Meninjeal tutulum yapan tümörlerde tedavi için intratekal verilmesi gerekir. Böbreklerden itrah suretiyle elimine edilir; eliminasyon yarılanma ömrü 8 saat kadardır (11).

2.2.3. Etki Mekanizması:

DNA sentezinin inhibisyonu:

Folik asitin vücuttaki yararlı şekli folinik asit ve diğer tetrahidrofolat türevi koenzimlerdir. Bu koenzimler timidilatin, purinlerin, metionin ve glisinin sentezinde rol oynayan tek karbon transferi reaksiyonları için gereklidir. Folik asitin dihidrofolat (FH₂) üzerinden tetrahidrofolata (FH₄'e) dönüşümü şu şekilde olur:



Metotreksat ve onun poliglutamat metabolitleri dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin aktif noktasına sıkı bir şekilde fakat tersinir bağlanarak enzimi inhibe eder(14,15). Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu timidilat ve

purin nukleotidlerinin (adenin ve guanin) biyosentezinin durmasına yol açar. Bu yapı taşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA sentezini ve enerji üretimi için gerekli ATP üretimini inhibe eder. Ayrıca FH_4 'e dönüşmeden kalan FH_2 dihidrofolat poliglutamatlar (FH_2Glu_n) ve metotreksatın poliglutamat türevleri toksik inhibitör metabolitler şeklinde birikir; timidilat sentazın ve purin bazı sentezinde rol oynayan transformilaz enzimlerinin inhibisyonu, metotreksatın kendisinden çok adı geçen iki poliglutamat metaboliti tarafından yapılır(16). Metotreksatın hücrelerdeki toksik etkileri dışarıdan ilaç olarak verilen folinik asit (N^5 – formiltetrahidrofolat) tarafından antagonize edilir; folik asidin kendisi ise bu durumda tetrahidrofolat'a dönüşemediğinden antidotal etkinlik göstermez.

2.2.4. Rezistans Oluşması

Metotreksata karşı oluşan biyokimyasal rezistans birçok faktöre bağlıdır ve bir çok basamağı gerektirmektedir. İlk olarak metotreksatın hücre içine alınması; folik asit ve L-lökovorin ile paylaşılmış bir taşıyıcı sistem gerektirmektedir(17,18) Oysaki atılımı spesifik inhibitörlere hassas en az üç bileşik ile farklı bir mekanizma tarafından gerçekleştirilir (19). Bu nedenle rezistans metotreksatın azalan hücre içine alınımı veya artan bir atılımı ile gerçekleşir.

İkinci olarak hücre içi metotreksat direk etki edebilir veya metotreksatın dışarıya atılmayan uzun zincirli poliglutamat türevlerine dönüşebilir (20). Metotreksatın her iki formunda sitotoksik olmasına karşın poliglutamat formu hücre içinde çok uzun süre kalabilir ve önemli sitotoksositeye yol açabilir. Böylece metotreksatın poliglutamat formuna dönüşmesinin azaltılması bir rezistans mekanizması olabilir. Metotreksatın bazı tümör hücreleri tarafından poliglutamata dönüşümünün artması normal hücrelerle kıyaslanınca tümörlerin ölümünde artışa neden olur (16,20,21).

Rezistansın üçüncü mekanizması hedef molekül DHFR'yi gerektirir. Tümör hücrelerinde mutasyon sonucu dihidrofolat redüktazın (DHFR) metotreksata afinitesinin azalması, rezistans gelişmesinde rol oynar (22). Ayrıca DHFR geninin aşırı ekspresyona uğraması (gen amplifikasyonu) sonucu hücrede bol miktarda tetrahidrofolat oluşması da rezistansda rol

oyunar. Rezistan hücrelerde metotreksata afinitesi düşük DHFR mutantlarının oluştuğu da gösterilmiştir. Metotreksat, hücrelere folatı ve tetrahidrofolatı taşıyan bir aktif transport olayı ile girer; mutasyon sonucu bu mekanizmanın bozulmasının da rezistansta rol oynadığı deneysel tümörlerde gösterilmiştir.

Diğer bir rezistans mekanizması rezistant hücrelerde timidin sentaz aktivitesinin azalmasıdır (23).

2.2.5. Farmakokinetiği

Metotreksat intravenöz uygulamadan sonra serum albuminine bağlanır ve sinir sistemi dışında tüm vücuda yayılır. Metotreksat böbreklerde haftalarca karaciğerde aylarca tutulur.

Metotreksat tarafından DNA sentezinin supresyonu genellikle 10^{-8} M yada daha fazla ekstraselüler metotreksat konsantrasyonu gerektirir. Bu da hücre içinde bağlanmamış metotreksat veya metotreksat poliglutamatları ile sonuçlanır. Bir hücrenin serbest intraselüler metotreksat yada metotreksat poliglutamatlarına maruz kalma süresi kritiktir. Toksisitenin meydana gelmesi için konsantrasyon eşiği ve süre eşiği aşılmalıdır. Örneğin kemik iliği ve barsak epiteli için plazma konsantrasyon eşiği 2×10^{-8} M ve zaman eşiği yaklaşık 42 saat olmalıdır. Değişik dokularda toksisite için konsantrasyon miktarları değişmektedir (24). Ancak birçok doku için zaman eşiği kesin değildir.

2.2.6. Toksisitesi

Kemoterapiye her insanın reaksiyonu farklıdır. Bazıları çok az etkilenirken bazılarında etki daha fazla ortaya çıkabilir. Burada anlatılan yan etkiler her insanda ortaya çıkmaz ve birden fazla kemoterapi ilacı kullanılıyorsa farklı olabilir. MTX'e bağlı doku harabiyeti beslenme bozukluklarında artar.(Gossie et al 1982, Harvey 1984)

Kemik iliği supresyonu (baskılanması): MTX'in başlıca yüksek doz toksisitesidir. Özellikle kötü huylu olmayan tümörlerde, hastalarda myelosupresyon oluşması terapiyi ertelemek için güçlü bir göstergedir(12).

Hematolojik toksisiteler: Nötropeni dozla alakalıdır. 7 ila 14üncü günler arasında ortaya çıkan granülositopeninin en uç noktasında ortaya çıkar ve

14 - 21inci günler arasında eski haline döner. Thrombositopeni, nötropeni ile paraleldir. Nadiren immün hemolitik anemi oluşabilir(12).

Sindirim sistemi hasarları: Standart dozlarda genellikle mide bulantısı ve kusma görülmez. Oluşan diyare bazen tedaviyi kesmeye sebep olacak kadar şiddetli olabilir. MTX koliti ya da peptik ülseri olan hastalarda dikkatli kullanılmalıdır. Başlıca uzun süre ve düşük dozda tedavi uygulanan hastalarda karaciğer disfonksiyonu oluşabilir. Uzun süreli kullanımlarda karaciğer fibrozu ile birlikte kronik hepatoksisite ve siroz oluşabilir. Böyle durumlar ölümle sonuçlanabilir(12).

Mukokutanös: Ağız mukozasının etkilenmesi ile oluşan stomatitis tedavinin yarım bırakılmasına sebep olabilir. Konjonktivit gibi mukositisler yaygındır ve dozun yüksekliğiyle ortaya çıkar (25).

Akciğer hasarları: Doza bağımlı olmaksızın kuru bir öksürük ya da zatürre gözlenebilir (26). Böyle durumlarda MTX kullanımı hemen sona erdirilmelidir çünkü dispne, hipoksi ve göğüs radyografisinde artan infiltrasyon gibi akciğer hastalıkları görülebilir.

Üriner sistem hasarları: Yüksek dozlarda kanamayla birlikte renal toksisite, nadiren renal tübüler nekroz ve proteinüri gözlenebilir (27).

2.2.7. Nadir görülen yan etkiler:

Sistemik: Ateş, titreme, kırıklık oluşabilir. Zayıf insanlarda dikkatli kullanılmalıdır(12).

İmmunolojik: Anaflaksi nadiren görülür. İmmunosupresyon genellikle ılımlıdır(12).

Kardiyovasküler: Vaskulitis oluşabilir (12).

Okuler: Konjonktiva iltihabı, aşırı göz yaşarması, katarakt, fotofobi, görmede bulanıklık görülebilir. Yüksek dozlarda nadiren kortikal körlük meydana gelebilir (12).

Nörolojik: Lökoensefalopati oluşabilir. Tedavinin kesilmesine rağmen lökoensefalopati devam edebilir. Yüksek doz MTX alan hastalarda kısa süreli

nörolojik bozukluklar (davranış bozuklukları ve anormal refleksler gibi) görülebilir (12).

İskelet-kas sistemi: Osteoporotik kırılmalar, eklem ve kas ağrıları oluşabilir.

Üreme: Oligospermia ve menstrual bozukluklar görülebilir (12).

2.3. E VİTAMİNİ

Antioksidan (oksitlenmeyi önleyici) etki gösteren bir grup tokoferol'e kısaca E vitamini denmektedir. Tanımlanmış 7 ayrı formu vardır. En çok üzerinde durulan formu α tokoferoldür.

2.3.1. E Vitamininin Tarihçesi:

1922 yılında Evans ve Bishop yaptıkları bir çalışmada ratların diyetlerine ekşimiş yağ katılmasıyla oluşan fetal rezorbsiyonları, sebzelerde bulunan ve henüz tanımlanmayan bir maddenin engellediğini bildirmişlerdir. Bu bilinmeyen madde 1924 yılında Sure tarafından 'E vitamini' olarak isimlendirilmiştir. Evans, eksikliğinde ratlarda kısırlığa sebep olan bu alkol türevi bileşiğe "**tokoferol**" (tokos= doğurmak, Phero= taşımak, ol=alkol manasına son ek) adını vermiştir (28). E Vitamini 1936' da Evans ve Sure tarafından ayrı ayrı izole edilmiştir. Bu araştırmacılar buğday embriyonundan antisterilite etkisi gösteren, yapıları bakımından birbirlerine benzeyen iki farklı bileşik elde etmişler, bunlara α ve β tokoferol adını vermişlerdir (29).

Daha sonra yapılan araştırmalarda bu grupla ilişkili iki bileşik daha bulunmuş, bunlara da γ ve θ tokoferol adı verilmiştir (29).

Tokoferoller açık sarı renkte ve yapışkan kıvamda maddelerdir. Bunlar lipitlerde ve birçok organik eriticide erir, suda erimezler. E Vitamini ısıya (200°C 'a kadar), alkalilere, asitlere ve ışığa karşı dayanıklıdır, fakat ultraviyole ışınları karşısında kolayca bozulur (29). Oksitlenince biyolojik etkisini kaybeder (30).

2.3.2. E Vitamininin Doğal Kaynakları

Doğada yaygın olarak bulunur. E vitamini hububat tanelerinde (bunların yağ fraksiyonunda), mısır yağı, pamuk yağı, soya yağı ve diğer bitkisel sıvı yağlarda ve bunlardan yapılan margarinlerde, et, hayvansal yağ, karaciğer, balık eti, tavuk eti ve yumurtada bulunur. Kızartma, kaynatma ve saklama

sırasında önemli ölçüde etkisini kaybeder. Anne sütünde oldukça fazladır (31).

2.3.3. Günlük Gereksinimi:

E vitamini besinlerde yaygın olarak bulunduğu ve özellikle, günlük besinin önemli bir miktarını oluşturan hububat türleri bu vitamini içerdiklerinden, erişkinlerde dengesiz bir diyet bile günlük gereksinimi karşılayabilir (31).

Günlük ihtiyaç vücut ebatlarına, kişinin fizyolojik durumuna, hatta beslenmede bulunan uzun zincirli yağların oranına göre değişmektedir. Buna karşın günlük E vitamini miktarı yetişkinlerde 10 ila 12 mg olarak kabul edilir (31). Yenilen rafine yağlar, yağda kızartılmış yiyecekler bu ihtiyacı artırmaktadır.

2.3.4. Farmakokinetik Özellikler:

Vücutta daha çok yağ dokusunda ve bir miktarda karaciğerde depolanır. Plasentayı zor geçer. Emziren kadınlarda meme bezleri tarafından süt içine nispeten fazla miktarda salgılanır. Normal durumda plazmadaki konsantrasyonu bireyler arasında değişkenlik gösterir ve ortalama 0.4- 0.5 mg/dl kadardır. Plazmadaki toplam lipit düzeyinde meydana gelen değişimler E vitamini düzeyini de etkiler. Bu nedenle plazma E vitamini düzeyine bakarak yeterliliğin değerlendirilmesinde mutlak E vitamini konsantrasyonu değil; plazma E vitamini/total lipit oranına bakılır. Oranın 0.8 mg/g in altına düşmesi eksiklik belirtisidir. Malabsorbsiyon sendromlarında, yağ absorpsiyonundaki bozulmaya paralel olarak E vitamini absorpsiyonu da azaldığından, vücut sıvılarındaki düzeyi düşer (31).

20 mg/kg gibi yüksek sayılan bir dozda bir kez verilmesinden sonra eliminasyon yarılanma ömrü 44 saat bulunmuştur (31).

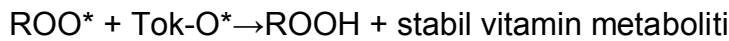
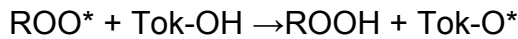
2.3.5. İşlevleri

Eskiden E vitamininin insan organizmasında herhangi bir öneminin olmadığı düşünülüyordu. Ancak günümüzde bilinmektedir ki E vitamininin

insan vücudunda çok büyük fizyolojik önemi vardır ve eksikliğinde belirli patolojik bozukluklar olur.

Alfa tokoferolün başlıca özelliği antioksidan olmasıdır. Yani oksijeni bağlayarak, oksijen etkisi ile oluşabilecek istenmeyen etkilerin önüne geçer. Hücrelerde membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asitleri (linoleik asit ve araşinodik asit gibi) kendiliğinden yada oksidan metabolitlerin etkisi sonucu kolayca oksitlenebilir ve peroksit türevlerine dönüşebilirler. Bu olaya lipit peroksidasyonu veya otooksidasyon denir. Serbest oksijen radikalleri oluşmasının eşlik ettiği bu olay zincirini membranda önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan E vitamindir. Vücudun diğer antioksidan sistemleri; (C vitamini, glutathion peroksidaz ve beta karoten gibi) bu olay üzerine E vitamini kadar etkili değildirler. Tüm hücre membranlarının lipitleri serbest radikaller tarafından oksidasyona maruz kalarak yıkılırlar. Alfa tokoferol lipit yıkım reaksiyon zincirini engeller ve serbest radikalleri durdurur. E vitamini, hücre ve organellerinin membran lipidleri üzerindeki bu etkisi nedeniyle, membranları oksidatif zedelenmeye karşı korur. Böylece genel olarak membranların stabilitesini artırır. Eritrosit membranı ve bronkoalveoler sistemin epitel membranı gibi vücutta en yüksek parsiyel oksijen basıncına maruz kalan yerlerde E vitamini daha yoğundur (31).

E vitamini (Tok-OH), peroksidler üzerindeki nötralize edici etkisini, kendinin bir fenolik hidrojen atomunu peroksil radikale (ROO*) transfer etmek suretiyle aşağıdaki şekilde, iki basamakta yapar:



E vitamini membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunu engelleyen birinci sıra savunma hattını oluşturur. Onu destekleyen gerideki savunma sistemlerinden glutathion peroksidazın molekülünde fonksiyonel önemi olan bir öge selenyum iyonudur. Selenyum vücutta E vitaminini tasarruf ettirir ve E vitamini gereksinimini düşürür (31).

Alfa tokoferollerin antioksidan özellikleri dışında daha birçok fonksiyonları vardır. Örneğin önemli bir hücre sinyal molekülü olan protein kinaz C'nin aktivitesini engellerler. E vitamini hücre içi kinaz kayıplarını önleyerek ya da en aza indirerek oksidasyonu ve diğer yıkımları önler. Aynı yolla kaslarda

egzersize bağlı oksidatif stresin giderildiği, kasların fiziksel performansının artırıldığı ve dejeneratif nörolojik hastalıkların önlendiği sanılmaktadır (31).

E vitamininin bir diğer işlevi de A vitamininin barsaktan absorpsiyonunu ve dokulardaki düzeyini artırmasıdır. Bu durum büyük bir olasılıkla, A vitamininin oksidasyonla kaybının azaltılmasına bağlıdır (31).

Alfa tokoferol farmakolojik dozlarda kullanıldığında trombosit adezyonu ve agregasyonunu azaltır, K vitaminine bağlı pıhtılaşma faktörlerini engeller. Calzada ve ark. (32) trombosit membranı E vitamini miktarındaki artışın bu hücrelerde agregasyon yeteneğini düşürdüğünü, bir antioksidan olarak E vitamininin trombosit agregasyonunu önleyebileceğini bildirmişlerdir.

Alfa tokoferol vücuttaki hücre membranı bütünlüğünü koruma yanında, arteroskleroz gelişmesinde önemli bir risk faktörü olan düşük dansitedeki lipoproteinleri de (LDL) oksidasyondan korur. Lipoproteinler; yağların kan içerisinde transportunu sağlayan lipid ve proteinden oluşan partiküllerdir. LDL'nin önemli fonksiyonlarından biri kolesterolün kanda taşınmasını sağlamaktır. Oksidatif LDL'ler kardiyovasküler hastalık oluşumuna katılırlar. Bir molekül α tokoferol bir serbest radikali nötralize ettiği zaman antioksidan özelliğini kaybederek değişime uğrar. Bununla birlikte C vitamini gibi diğer antioksidanlar α tokoferolün antioksidan kapasitesini rejenere edebilirler (33).

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda E vitamininden yoksun diyetle beslenme sonucu dişilerde gebelik sırasında fötüsün rezorbsiyona uğradığı, erkeklerde spermatogenezle ilgili hücrelerin atrofiye olduğu ve bunun sonucunda da kısırlık meydana geldiği gözlenmiştir (34).

E vitamini eksikliğinde karaciğerde oksijen kullanımı azalır. Sıçanlarda E vitamini ile birlikte selenyumdan da yoksun diyetle beslenmenin karaciğer nekrozuna sebebiyet verdiği gösterilmiştir (34).

Güneş ışınları derinin, epidermis ve dermis tabakalarında harabiyete neden olurlar. Bu da deri üzerinde yaşlılık belirtilerine neden olur. Bu nedenle yaşlılık, dermatoloji, oksidatif stres ve antioksidanlar üzerinde çalışan bilim adamları güneş ışınları ve diğer ışık kaynaklarının canlılar üzerindeki kısa ve uzun dönem etkileri ile tesir mekanizmalarını açıklığa kavuşturmaya çalışmaktadırlar. E vitamininin antioksidan etkisi üzerinde yapılan çalışmalar α tokoferolün deri antioksidan kapasitesini artırdığını ortaya koymaktadır. Palomaki ve arkadaşlarına (35) göre cilt yaşlanmasına

ve ışığın deri üzerindeki yıpratıcı etkisine karşı daha güçlü bir korunma oluşturmada E vitamini ve kombinasyonları önemli düzeyde etkilidir. Bu konuyla ilgili yapılan diğer çalışmalarda, ultraviyole ışınlarına ve ozona maruz bırakılan hayvanlarda oluşan deri hücrelerindeki yıkımı, alfa tokoferol ve beta karoten uygulamaları SOD (süperoksit dismutaz) ve katalaz gibi hücresel endojen antioksidanların aktivitelerini artırarak azaltmaktadır (36,37).

Güneş ışınları ile yoğun olarak karşı karşıya kalınması lipid oksidasyonu düzeyini artırarak erken yaşlanma, kanser, kalp hastalığı riskini artırmaktadır. Güneş ışınları ve diğer ışık kaynakları ile ozonun bu tip sakıncalı tesirlerine karşı E vitamini önemli bir antioksidan olarak kabul edilmeye başlanmıştır (38). Deri yanıkları ve operasyon yaraları dahil çeşitli tipteki yaralanmaları takip eden dermizasyon ve epidermizasyonun E vitamini ile ilişkili olduğu gözlenmektedir (39).

E vitamininin antioksidan etkinliğinin tartışıldığı bir diğer alan senil fizyolojideki rolüdür. Yaşlanma ile birlikte bozulan oksidan-antioksidan denge sinir hücreleri dejenerasyonunun hızlanmasında etkindir. Bu nedenle pek çok bilimsel çalışma vitamin E gibi güçlü antioksidanların alımı ile yaşlılıkta görülebilen sinirsel sorunların ve hafıza kaybının azaldığını ileri sürmektedir (33).

2.3.6. E Vitamininin Metabolizması:

Oral yolla alınan tokoferol genellikle iyi absorbe edilir (40). Yağlar ve safra tuzları, diğer yağda eriyen vitaminler gibi E vitamininin de absorpsiyonunu kolaylaştırır (29). Tokoferoller ince barsakta safranin yardımıyla emülsiyon haline gelir ve sonra absorbe olurlar. Maksimum absorpsiyon E vitamini alındıktan birkaç saat sonra görülür (41). Bozulmuş yağlar E vitaminini oksidasyona uğratarak bozulmasına neden olur, mineral yağlar ise bu vitaminin absorpsiyonunu engeller (29,42).

E vitamini plazmada β lipoproteinlere bağlı olarak taşınır. Tokoferol safra ile küçük miktarlarda atılır. Yüksek dozda tokoferol verildikten sonra insan idrarında metabolitleri [2-(3-hidroksi-3-metil-5-karboksi pentil)-3,5,6-trimetil hidrokinon ve tokoferolün gama laktonu] izole edilmiştir (40).

Tokoferollerin depolanmalarının ve absorbe edilme derecelerinin farklı olduğu tespit edilmiştir. Etki derecesi arttıkça depolama ve absorpsiyonda da artış görülmektedir; bu şekilde bir sıralama yapılacak olursa: α tokoferol > β tokoferol > γ tokoferol > δ tokoferol (41).

E vitamini karaciğer ve yağ dokularında depo edilir. Depolama miktarı yaşa ve cinsiyete göre değişir. Yaş ile depolama kapasitesi artar, ayrıca dişi hayvanların birçok organında erkeklere göre daha yüksek miktarda vitamin içerdiği bulunmuştur. Bütün hayvanlarda E vitamini miktarının hipofizde, adrenal bezlerde ve uterusda daha yüksek olduğu görülmüştür. E vitamini, A vitamininin tersine plasentada da depo edilir, ancak fötusa transferi çok sınırlı olup, yeterli değildir (43). Hücre içerisinde ise tokoferol mitokondri, mikrozom ve lizozomlarda daha yoğundur (29).

2.3.7. Eksiklik:

E Vitamini eksikliği beslenme yetersizliklerinde, α tokoferol transfer proteinini etkileyen genetik kusuru olanlarda ve yağ malabsorpsiyon sendromlarında gözlenir. Bebeklerde beslenme ve absorpsiyon bozukluğu nedeniyle yeterli E vitamini alınamaması durumunda eritrositlerin ömürlerinin azalması, hemolitik anemi ve makrositoz gibi olgulara rastlanabilir.

Şiddetli E vitamini eksikliği periferik nöropatiler, miyopati ve pigmentli retinopati gibi klinik durumlarla sonuçlanabilir. Gelişen sinir sistemi vitamin E eksikliğinden daha fazla etkilenir (31).

2.3.8. E Vitamini Fazlalığı

E vitamini yetişkinlerde 800 IU veya daha fazla dozlarda ve uzun süre alındığında bulantı, yorgunluk, kaslarda güçsüzlük, görme ve duyma bulanıklığına sebep olabilir. 2000 IU ve daha fazla dozlarda ise gonadlarda bozukluğa, kreatinüriye ve gastrointestinal bozukluğa yol açabilir (31).

E vitamini intravenöz yoldan kullanıldığı takdirde asit, hepatosplenomegali, sarılık, trombositopeni ve azotemi gibi klinik semptomlara yol açar ve ölümle sonuçlanabilir (31).

2.3.9. E Vitamininin Klinikteki Kullanımı

a. Kardiyovasküler Hastalıklar

Erişkin bireylerin %30'unun sorunu olan hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklarla ilgili olarak özellikle E vitamini eksikliği üzerinde durulmaktadır (44). Avrupa birliği ülkelerindeki 16 değişik bölgede kalp krizine bağlı ölüm oranları arasında yapılan taramalar kandaki E vitamini düzeyleri ile ölüm oranlarının korelasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır (38).

Koroner sorunların giderilmesinde 1000 IU/gün megadoz E vitamini uygulamasının ilk uygulamadan sonra etkili olduğu, 3-4 aylık terapi programının bu hastalar için 'sekonder koruyucu' olabileceği ortaya konulmuştur (31).

Uzun süreli ve geniş bir insan grubunda yapılan araştırmalar, E vitamini tüketiminin artmasının, miyokardiyal enfarkt yada kalp hastalıklarından ölüm oranını azalttığını göstermektedir (45,46,47,48). Yakın zamanda birçok çalışmada α tokoferolün plasma yada kırmızı kan hücrelerindeki seviyesinin, carotid arterioskleroz varlığı veya şiddeti ile ters ilişkili olduğu saptanmıştır (49,50,51,52). İlginç olarak E vitamininin kalp hastalığı oluşmuş olanlarda, kalp krizini yada ölümleri önlemede etkili olmadığını rapor eden çalışmalar da vardır. (53,54)

Kardiyovasküler hastalıklarda tedaviye α tokoferol eklenmesinin, hastalığın seyrine etkisinin olup olmadığı tartışmalı bir konudur. Örneğin; koroner arter bypass operasyonu geçirmiş erkekler üzerinde yapılan bir araştırmada günde 100 IU α tokoferol (67 mg'a eşdeğer) alımının koroner arter arteriosklerosis ilerlemesini azalttığı saptanmıştır. İngilterede yapılan bir çalışmada, kalp hastalarına 18 ay boyunca 400 yada 800 IU sentetik α tokoferol verilmesinin, ölümlerle sonuçlanan kalp krizi oranını % 77 azalttığı bildirilmiştir. Bununla birlikte kalp krizinden toplam ölümlerde azalma görülmemiştir (55). Kronik böbrek dializ hastaları oksidatif stres altındadırlar ve kardiyovasküler hastalıklardan ölüm oranları genel popülasyona kıyasla daha fazladır. Böbrek diyaliz hastalarına 1.4 yıl boyunca 800 IU doğal α tokoferol eklenmesi kalp krizi riskini azaltmıştır (56). Bununla beraber diğer bazı çalışmalar tedaviye α tokoferol eklenmesinin risk azalmasını bulmada başarısız olmuştur. Kalp krizi önlemeyi araştırma için yapılan bir çalışma günlük 50 mg sentetik α tokoferolün daha önce kalp krizine maruz kalanlarda

öldürücü kalp krizinin önemli olmayan derecede azaldığını bildirilmiştir (57). Bununla birlikte başka iki büyük çalışma kardiyovasküler hastalığı olan bireylerde günde 400 IU doğal α tokoferol ve 300 mg sentetik α tokoferol 150mg eklenmesi ile sonraki kalp krizi yada felç riskini önemli derecede değiştirmedini bulmuştur (53,54).

b. Immun sistemle ilişkisi:

Alfa tokoferolün insan yaşıyla inişe geçen immun yanıtın spesifik açısını artırdığı gösterilmiştir. Örneğin aylarca günlük olarak alınan 200 mg sentetik α tokoferol hepatit B ve tetanoz aşısına karşı antikor oluşumunu yaşlı insanlarda artırdığı bildirilmiştir (58).

c. Kanser:

Hayvan ve insanlarda yapılan çalışmalar tokoferollerin deri, mide, mesane, kolon, karaciğer, akciğer, meme ve prostat kanseri gibi deneysel olarak oluşturulan veya spontan meydana gelen tümörlerin gelişmesini geciktirici hatta iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (59,60,61,62).

Birçok kanser tipinin serbest radikaller tarafından DNA da oluşan oksidatif hasardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Alfa tokoferol, serbest radikalleri nötralize etme yeteneğinden dolayı, kanser önleme çalışmalarında oldukça araştırılmıştır. Bununla birlikte birçok geniş çalışma α tokoferol alımı ve akciğer yada göğüs kanseri arasındaki ilişkiyi bulmada başarılı olamamıştır.

Kanser hücreleri hızla çoğalırlar ve apoptozis'e (programlanmış hücre ölümü) dirençlidirler. Hücre kültür çalışmaları E vitamini esteri, α tokoferol süksinatın, proliferasyonu engellediğini ve kanser hücrelerinin apoptozisine neden olduğunu göstermiştir (64,65). Alfa tokoferol süksinat, proliferasyonu etkin olarak engeller yada kanser hücre ölümüne neden olur (65). Alfa tokoferol süksinatın kanser hücreleri üzerindeki etki mekanizması açık değildir ve ilginç olarak antioksidan aktivitesi yoktur (66). Hayvan modelleri üzerindeki bazı çalışmalar, alfa tokoferol succinnate'ın tümör büyümesini engellediğini göstermiştir (67,68,69). Ancak alfa tokoferol süksinatın insanlarda kanser tedavisine eklenmesi için daha fazla çalışma gerekmektedir.

2.3.10. İlaç Etkileşimi:

Cholestyramine, colestipol, isoniazid, mineral yağlar, orlistat, sucralfate, ve olestra gibi ilaç bileşenleri E vitaminin emilimini azaltır. Phenobarbitol, phenytoin, yada carbamazepine gibi antikonvülsan ilaçlar E vitamini'nin plazma seviyesini azaltır (70,71). Antikoagulan tedavisi gören yada K vitamini eksikliği olanlar kanama riskini artırdığı için doktor kontrolü olmadan alfa tokoferol yada türevlerini almamalıdır (70).

2.4. ANTİOKSİDANLAR:

Oksidanları inhibe eden ve vücudu serbest radikallerin zararlarından koruyan maddelerdir.

Antioksidanların öyküsü serbest radikallerle başlar. Bu yüksek aktiviteye sahip bileşikler, kirli havalarda, sigara dumanında, radyasyonda, zirai ilaçlarda ve bozulmuş gıdalarda bulunduğu gibi normal vücut metabolizması sırasında da oluşurlar. Serbest radikaller vücuttaki hücrelere saldırır ve tahrip eder. İlk saldırıda öncelikli olarak yeni bir serbest radikal oluşur ve kontrol edilemeyen zincirleme bir reaksiyon başlar (80).

Serbest radikaller, hücre zarındaki yağlardan birine saldırdığında yağ molekülü değişime uğrar. Bu değişim bitkisel yağların acılaşmasına sebep olan küçük bir değişikliktir. Yağlar vücutta değişime uğradığında; hücre zarının yapısı ve fonksiyonları bozulur, hücre zarı gıdaların, oksijenin ve suyun uzun süreli olarak transferini yapamaz, metabolik ürünlerin atılmasını düzenleyemez. Serbest radikal saldırısının devamı; hücre zarının yapısında bulunan yağların parçalanmasına ve hücre bileşenlerinin dağılmasına sebep olur. Hücre içi bileşenlerin hücre dışına akması etraftaki dokulara da zarar (Oksidatif hasar) verir.

Serbest radikallerin dokularda sebep olduğu zararın, başta ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın etyopatogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (72,73).

Serbest radikaller aynı zamanda; hücrelerin genetik kodunu içinde taşıyan; hücrenin üretimini ve büyümesini sağlayan DNA gibi nükleik asitlere de etki eder. Hücreler genetik kodları değiştiğinde apoptozisle ölüme giderler. Aşırı hücre ölümü erken yaşlanmaya yol açtığı gibi, hücrelerin

değişime uğraması, kanser ve benzeri hastalıklara meyli olan hücre dizinleri oluşmasına yol açar (72) .

Mitokondrilerin serbest radikallerden zarar görmesiyle hücredeki enerji üretimi ve protein sentezi bozulur (74).

Antioksidanlar, serbest radikallerin etkisiz hale getirilmelerinde devreye girmektedir. Çeşitli enzimler, antioksidan olan pek çok vitamin ve mineralleri içeren bu sistem, serbest radikalleri hücre zarına, nükleik asitlere ve hücre bileşenlerine saldırmadan kendine çeker ve bağlar.

Antioksidan maddeler başlıca şu altı mekanizma ile çalışırlar:

1. Oluşan serbest radikalleri toplayıcı veya giderici etkileri ile bağlayarak kararlı hale getirirler (75).
2. Zincir kırıcı etki ile serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdururlar (76).
3. Baskılayıcı etki ile reaksiyon hızını azaltırlar (77).
4. Onarıcı etki ile lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşmakta olan biyolojik moleküler hasarı rejenere ederler (78).
5. Hücresel kinaz kayıplarını önleyip oksidasyon reaksiyonlarını durdururlar (76).
6. Organizmadaki SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırır (79).

Antioksidanlar arasında başlıca; A vitamini , C vitamini, E vitamini, Selenyum ve manganez sayılabilir (80).

Genel olarak antioksidanların organizma üzerindeki etkileri şunlardır:

- Antikansorejen etki gösterir.
- Kardiyovasküler hastalıklar üzerine etkilidir.
- Yaşlanmayı geciktirici etkisi vardır.
- Bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkilere sahiptir.
- Cildin güneşten gördüğü zararları önleyici etkiye sahiptir
- Çeşitli toksik maddelere karşı vücudu korur.
- Akdeniz anemisi, orak hücreli anemi gibi metabolizma hastalıklarına karşı etkilidir.
- Egzersiz ve stres sonucu oluşan kas hasarlarını önler (80).

2.4.1. E Vitamininin Antioksidan Özelliği

Özellikle α tokoferol çok kolay oksitlenebilme yeteneğine sahiptir. Bu antioksidan karakteri nedeniyle E vitamini aktif radikallerle reaksiyona girerek oksidasyona duyarlı moleküler yapıların istenmeyen oksidasyonlarının önlenmesinde ya da azaltılmasında etkili olur (79).

Uzunca bir süre E vitamininin antioksidan aktivitesinin sadece peroksidasyon reaksiyon zincirini sonlandırarak gerçekleştirdiği kabul edilmiş, ancak bugün E vitamininin radikal giderme, baskılama, onarma ve endojen savunmayı artırma gibi yukarıda bahsedilen hemen tüm mekanizmaları kullanabildiğinden, çok hızlı ve etkili bir antioksidan kapasitesine sahiptir (79).

E vitamini bulunduğu biyolojik ortamdaki serbest radikal türlerini toplayarak peroksidasyonun erken döneminde zar fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerini korumada oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur (76,79).

Hücre genetik yapısı açısından güçlü bir mutojen oksidan metabolit olan peroksinitrinin oluşum reaksiyonlarının önlenmesinde ve hem peroksil hem de nitrik oksitin toplanmasında γ tokoferol bir antioksidan olarak rol almaktadır (81). E Vitamini katkılı yemle beslenen ratlarda intraselüler antioksidan enzimler olan SOD (82) ve katalaz (78) düzeylerinin arttığı gösterilmiş, bu yolla E vitamininin endojen antioksidan savunma performansını yükselttiği ileri sürülmüştür. Tokoferolün antioksidan aktivitesi, birçok antioksidan savuma elemanının yetersiz kaldığı, oksijenin yüksek konsantrasyonlarında bile etkilidir. Eritrositler ve alveoler membranlar bu durumu açıklayan önemli örnekler olarak gösterilebilir(75,77,78).

E vitamini üzerinde yoğun olarak devam eden tartışma konularından birisi de 'antioksidan etkinliğin gerçekleştirilebilmesi için gerekli doz' hakkındadır. Bu alanda türlere cinsiyete, yaşa patolojilere göre değişen miktarlar ortaya konulmaya başlanmıştır. Yayınların önemli bir kısmında insanlarda 50, 100, 250, 400, 800 ve 1000 IU/günlük dozların araştırıldığı görülmektedir (83,84).

Antioksidan besin maddeleri ile ilgili önemli bir kuşku bu maddelerin rafine edilme gibi endüstriyel işlemler sırasında antioksidan özelliklerini yitirebilecekleridir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1. Denek Hayvanlarının Hazırlanması:

Çalışmada Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden elde edilen 30 adet, 8-10 haftalık ağırlıkları 20-30 gram arasında değişen erkek Swiss albino fareler kullanıldı. Hayvanlar ortama alışmaları için deneye başlanmadan bir hafta önce diğerlerinden ayrılarak, ortam ışığının 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olarak ayarlandığı, ortam ısısının 21 ± 1 °C'a sabitlendiği odalardaki tel kafeslere alındı. Deney süresince tüm hayvanlar standart yem ve çeşme suyu ile beslendiler.

Fareler biri kontrol grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı. Tüm hayvanlar çalışma başlangıcında ve sakrifiye edilmeden önce tartılarak ağırlıklar kayıt edildi.

1. Gruba (MTX grubu) MTX injeksiyonundan 1 hafta önce başlanarak intraperitoneal olarak E vitamini yerine plasebo olarak 0.2 cc serum fizyolojik verildi. 1 hafta sonunda Yine intraperitoneal olarak 20 mg/kg dozunda metotreksat (methotrexate 500 mg/20 ml, F H Faulding & Co Ltd. Australia) uygulandı.

2. Gruba (VEMTX grubu) aynı dozda intraperitoneal yapılan MTX injeksiyonundan 1 hafta önce başlanarak hayvanlar sakrifiye edilene kadar her gün aynı saatte 300 mg/Kg dozunda E vitamini (α -tokoferol asetat), intraperitoneal olarak verildi.

3. Grup kontrol grubu olarak alındı. MTX ve E vitamini yerine plasebo olarak aynı yollarla ve aynı hacimde serum fizyolojik verildi.

Tüm hayvanlar MTX injeksiyonundan 4 gün sonra eter anestezisi altında intrakardiyak formalin injeksiyonu ile öldürüldü. Her hayvandan, proksimal jejunumdan (duodenum bitiminden 2-3 cm uzaklıktaki jejunumdan) her biri yaklaşık 0.5 cm uzunluğunda iki adet doku örneği çıkarıldı. Doku örneklerinden biri hızla %10 nötral formaline alınarak fikse edildi, ışık mikroskobu için rutin takibi yapıldı ve parafine gömüldü. 5-6 μ kalınlığında kesitler alınarak hematoksinin eosin boyasıyla boyandı. Alınan diğer örnekler doku MDA tayini için hazırlandı.

3.2. Histopatolojik değerlendirme

Hematoksilin eosin ile boyanmış preparatlar Olympus BX50 model ışık mikroskopunda değerlendirilerek fotoğrafları çekildi. Hematoksilin-eozin boyamalarda villusların yapısı ve yüksekliği, kriptalardaki histopatolojik değişiklikler ve lamina propriada mononükleer hücre infiltrasyonu yönünden incelendi. Bulguların şiddeti şu şekilde derecelendirildi : 0: Hiç lezyon yok, 1: Hafif hasar, 2: Orta derecede hasar, 3: Şiddetli hasar.

3.3. Malondialdehyde (MDA) ölçümleri

Dokular %1.15 lik KCl tamponunda homojenize edildi.(100mg/ml). Elde edilen homojenatlar (100 µl) , 1.5 ml %0.8'lik tiyobarbiturik asit, 200 µl %8.1'lik sodyum dodesil sülfat, 1.5 ml %%20'lik asetik asit (pH 3.5), 0.1 ml bütilat hidroksi tolueen (90Mm) ve 600µl distile su içeren karışıma eklendi. Elde edilen karışım 95°C'de 1 saat süreyle kaynatıldı. Soğuduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml n-butanol ve piridin (15:1,hacim/hacim) karışımı eklendi ve hızlıca karıştırıldı. 3,000 g'da 10 dakika santrifüj edildi ve organik tabakası alınarak 1,1,3,3- tetrametoksipropan eksternal standardı kullanılarak 532nm'de absorbanası (kırmızı pigment) ölçüldü. Lipit peroksidazın seviyesi her gram başına protein için nanomol MDA olarak bulundu. MDA konsantrasyonu Lowry metodunda olduğu gibi proteinin her birim ağırlığına göre belirlendi.

3.4. İstatistiksel Analizler

Sonuçlar Kruskal-Wallis varyans analizleri kullanılarak karşılaştırıldı. Fark bulunan gruplar ise Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Klinik gözlemler: (klinik görünüm, diyare ve ağırlık kaybı)

MTX grubundaki hayvanlar genel olarak bitkin bir görünümdeydi ve aktiviteleri azalmıştı. MTX grubundaki hayvanların % 60'ında diyare gelişti. VEMTX grubunda ise diyare gelişimi % 30 idi.

Kontrol grubunda ağırlık deney öncesi ve sonrası ağırlık farkı yoktu ($p=0,68$). MTX ve VEMTX gruplarında hayvanlar ağırlık kaybına uğradı ($p=0,005$). MTX grubundaki ağırlık kaybı VEMTX grubundaki kayıptan daha fazlaydı ($p=0,029$). (Tablo 4.1)

Tablo 4.1. Grupların Deney Öncesi ve Sonrası Ağırlık Ortalamaları

	İlk Ağırlık	Son Ağırlık	
Kontrol Grubu	25,52 $\pm$ 1,26	25,51 $\pm$ 1,23	$p=0,68$
MTX Grubu	25,70 $\pm$ 1,28	22,07 $\pm$ 1,19*	$p=0,005$
VEMTX Grubu	25,26 $\pm$ 1,38	23,63 $\pm$ 1,48*	$p=0,005$

* $p= 0,029$

4.2. Histopatolojik bulgular

Kontrol grubu: Hayvanların tüm günlerdeki doku kesitlerinde normal ince barsak yapısı gözlemlendi.(Şekil 4.2, 4.3)

MTX grubu: Jejunum doku kesitlerinde villuslarda kısalma ve küntleşme, değişik derecelerde villus füzyonu ve epitelde atrofi gözlemlendi. Kripta epitelinde dejenerasyon, kriptalarda kayıp, sayısında azalma ve bazı yerlerde kistik dilatasyon dikkati çekiyordu. Lamina propriada iltihabi hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Yer yer fibrosis ve vaskülarizasyonda artış dikkati çekmekteydi (Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7,). Histopatolojik hasarlardaki şiddetin dereceleri tablo4.2'de gösterilmiştir.

VEMTX grubu: Metotreksat injeksiyonu, öncesinde ve sonrasında E vitamini verilen bu grupta, MTX grubunda gözlenen histopatolojik bulguların şiddetinin azaldığı gözlemlendi (Tablo 4.2) (Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11)

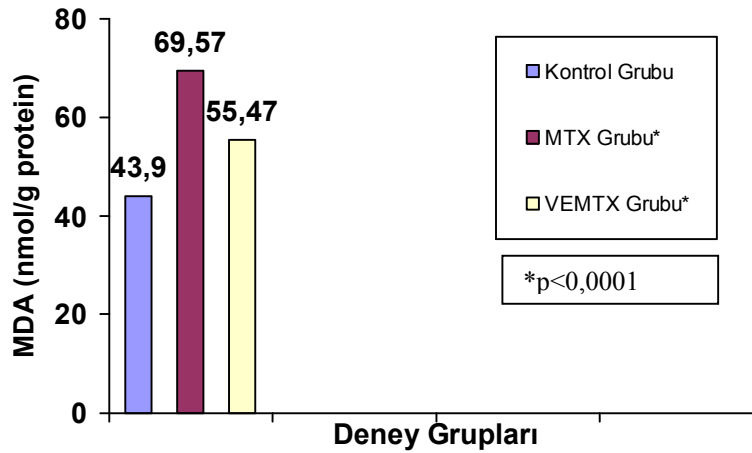
Tablo 4.2. histopatolojik bulguların hasar skor değerleri

	Kontrol grubu	MTX grubu	VEMTX grubu
Villus hasarı	01 ± 0,3	2,6 ± 0,6 ^a	1,6 ± 0,8 ^a
Kripta hasarı	0,1 ± 0,3	2,4 ± 0,5 ^b	1,8 ± 0,6 ^b
Hücre infiltrasyonu	0,2 ± 0,4	2,5 ± 0,7 ^c	1,8 ± 0,6 ^c

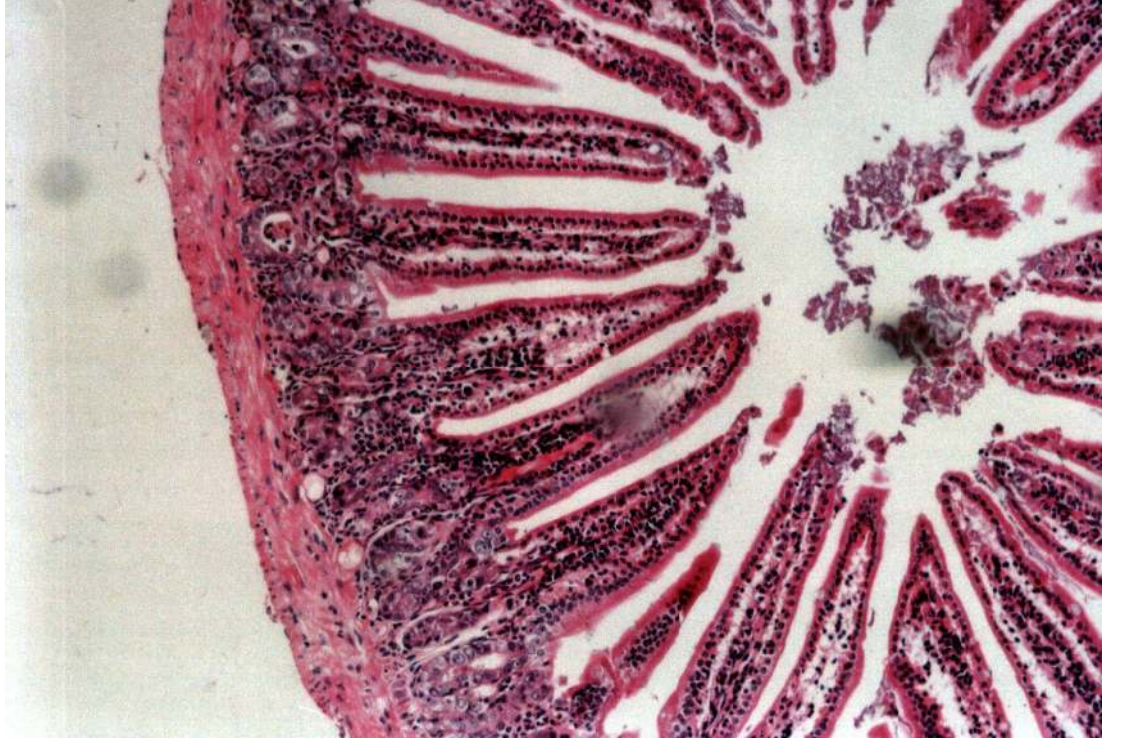
^a p=0,02, ^b p=0,05, ^c p=0,04

4.3.MDA ölçümleri

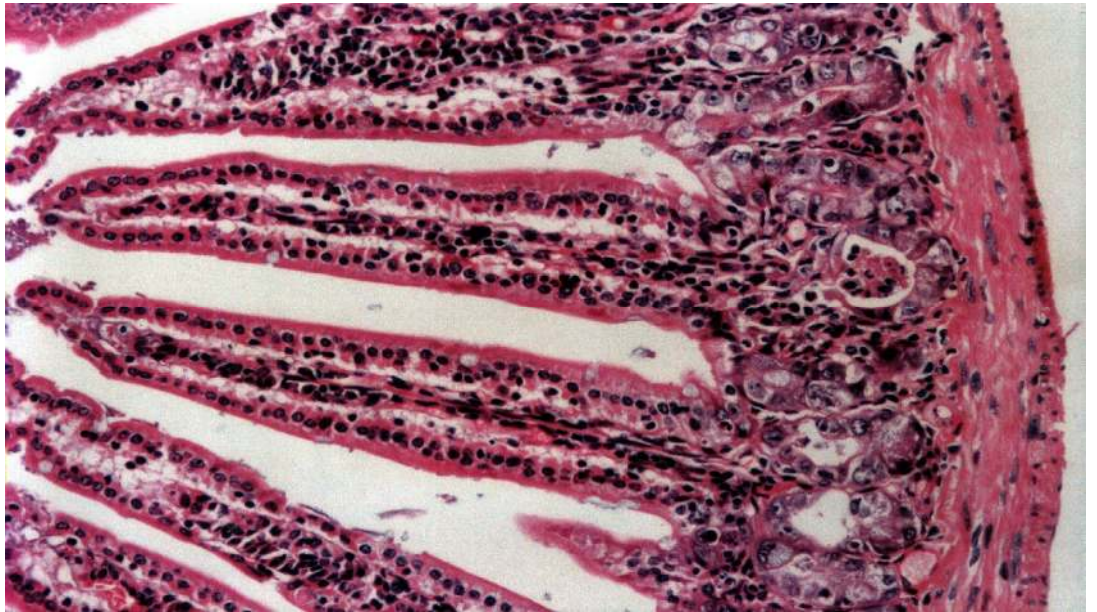
Jejunum dokusu MDA seviyeleri, hem MTX(p<0,0001) hem VEMTX gruplarında (p<0,0001) kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmişti. Ancak VEMTX grubundaki yükselme MTX grubuna göre daha azdı (p<0,0001).



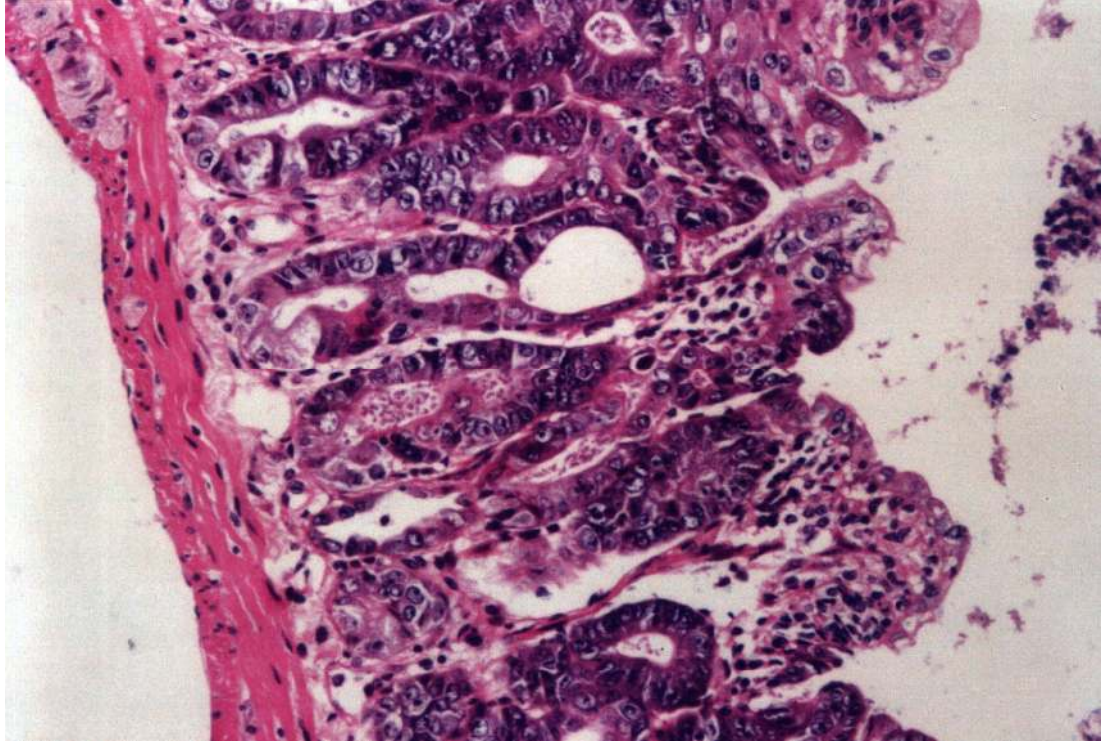
Şekil 4.1. Deney Gruplarındaki MDA Değerleri



Şekil 4.2.: İnce Barsak kontrol grubuna ait ışık Mikroskopik Görünüm (HE; x 200)



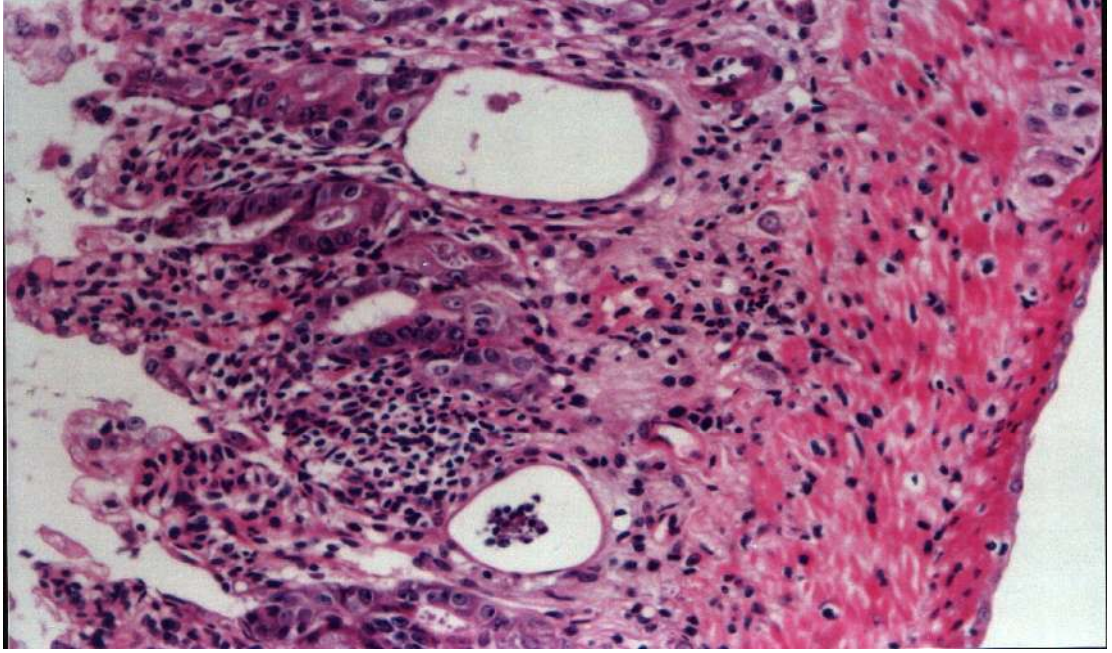
Şekil 4.3.: İnce Barsak kontrol grubuna ait ışık mikroskopik Görünüm (HE; x 200)



Şekil 4.4 : Mtx grubuna ait ince barsak ışık mikroskopik görüntü

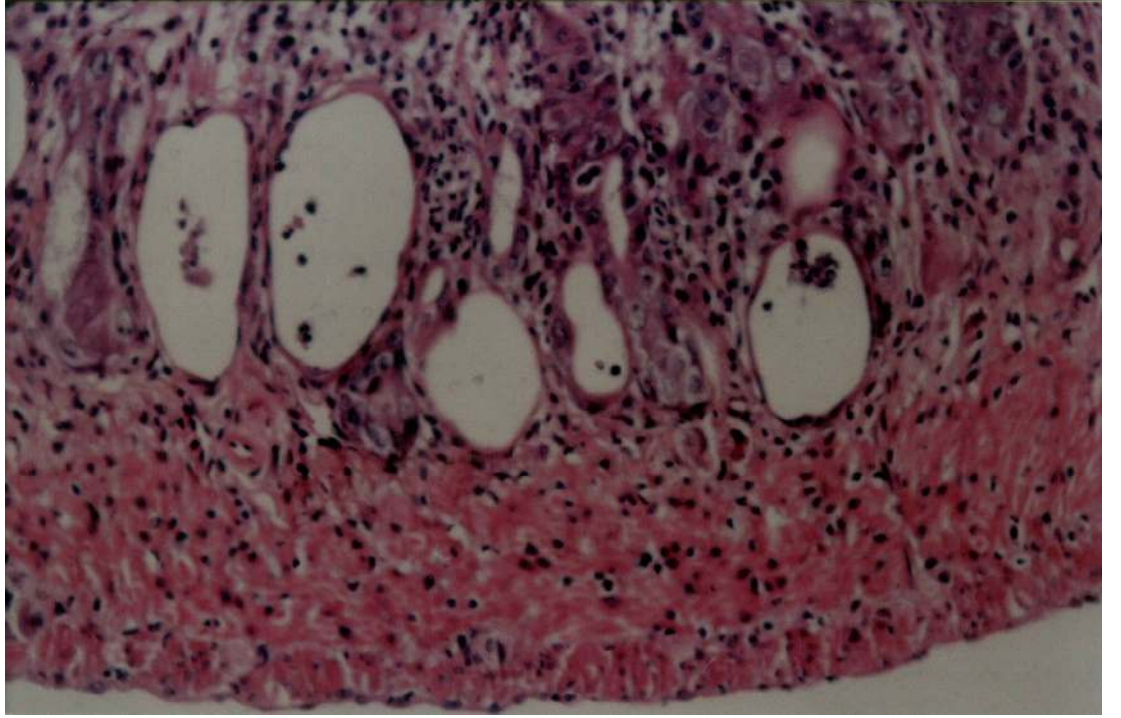
Villuslarda kaynaşma ve ileri dercede kısalma görülmekte. Şiddetli derecede epitel atrofisi ve yer yer lamina propriada hücre infiltrasyonu dikkati çekmektedir.

(HE; x 400)

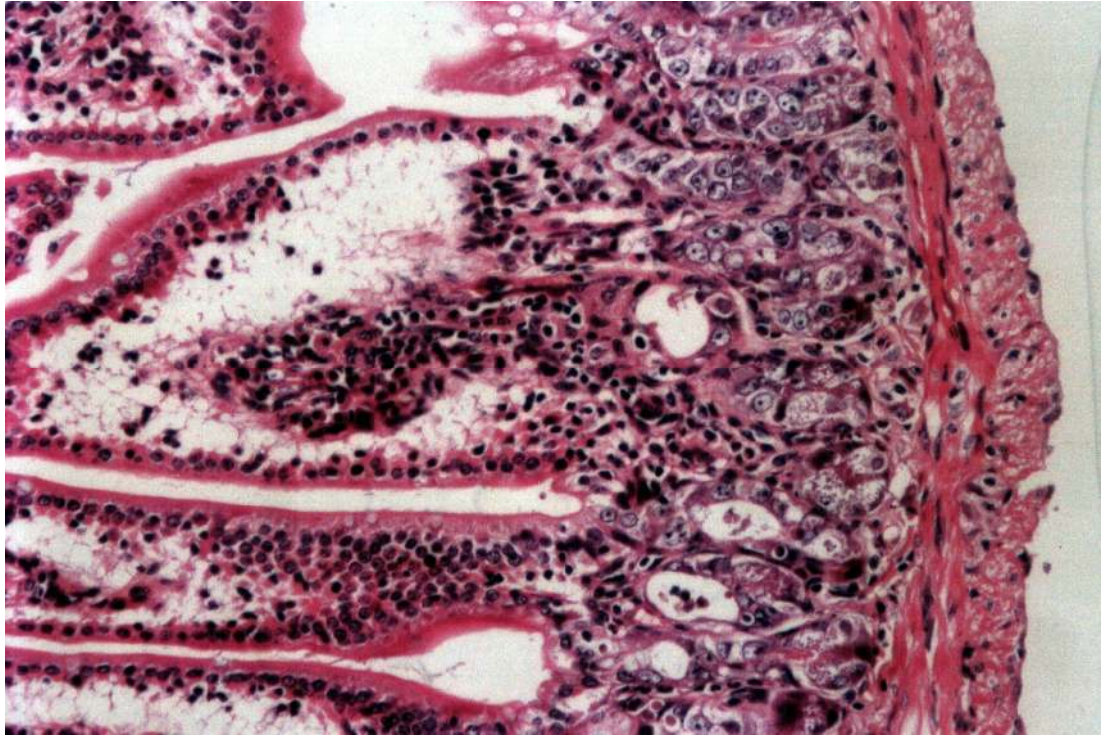


Şekil 4.5: Mtx grubuna ait ince barsak ışık mikroskopik görüntü

Villuslar tamamen kaybolmuştur. Lamina propriada mononükleer hücre infiltrasyonu dikkati çekmektedir. Bezler çok azalmış ve iki tipik kistik kripta dejenerasyonu görülmektedir. (HE; x 400)

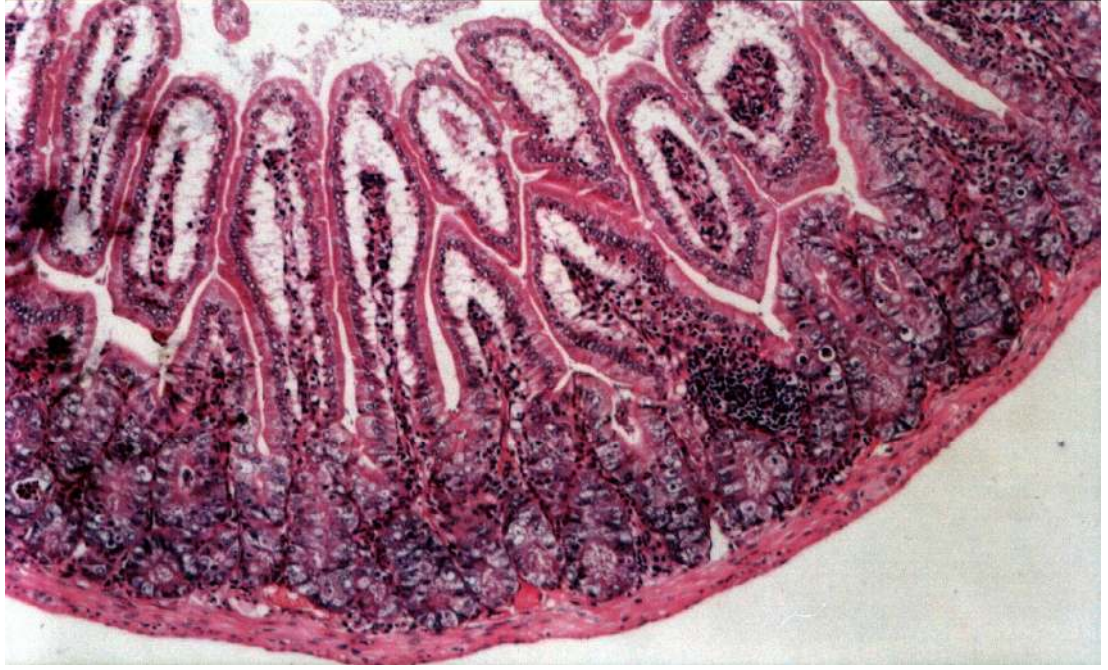


Şekil 4.6: Mtx grubuna ait ince barsak ışık mikroskopik görüntü
Bez kriptalarında kistik dejenerasyon dikkati çekmekte. Mononükleer hücre infiltrasyonu görülmekte. (HE; x 400)



Şekil 4.7: Mtx grubuna ait ince barsak ışık mikroskopik görüntü

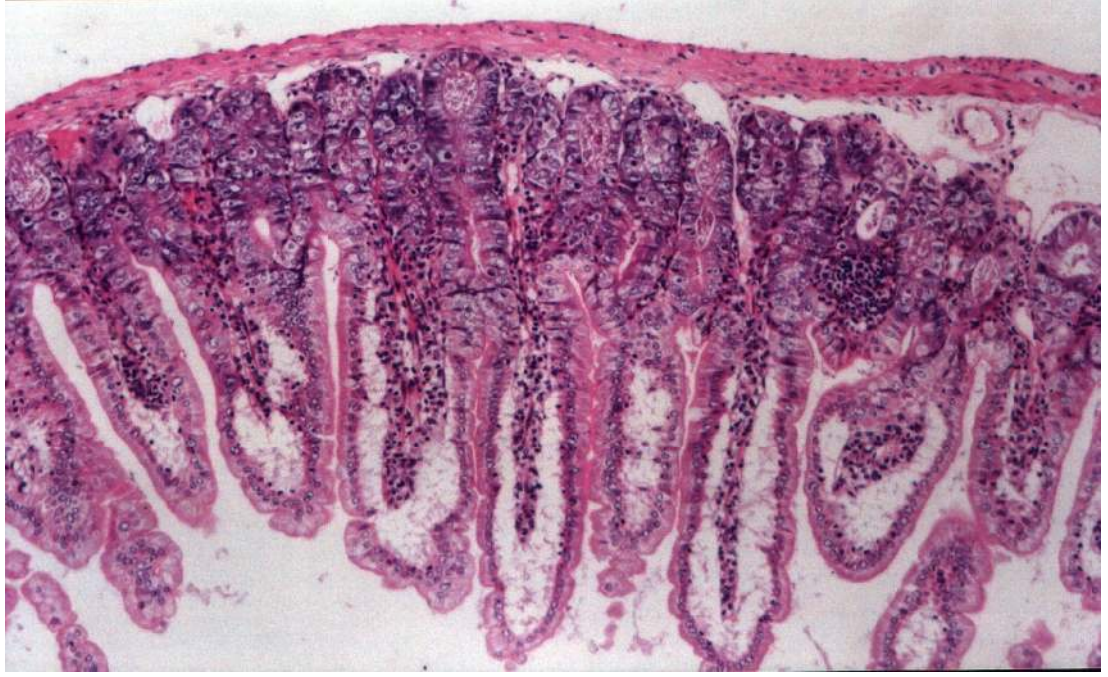
Villus lamina propriasında ödem meydana gelmiştir. Mononükleer hücre infiltrasyonu görülmektedir. Bez kriptalarının yer yer daha şiddetli olmak üzere bozulduğu dikkati çekmektedir. (HE; x 400)



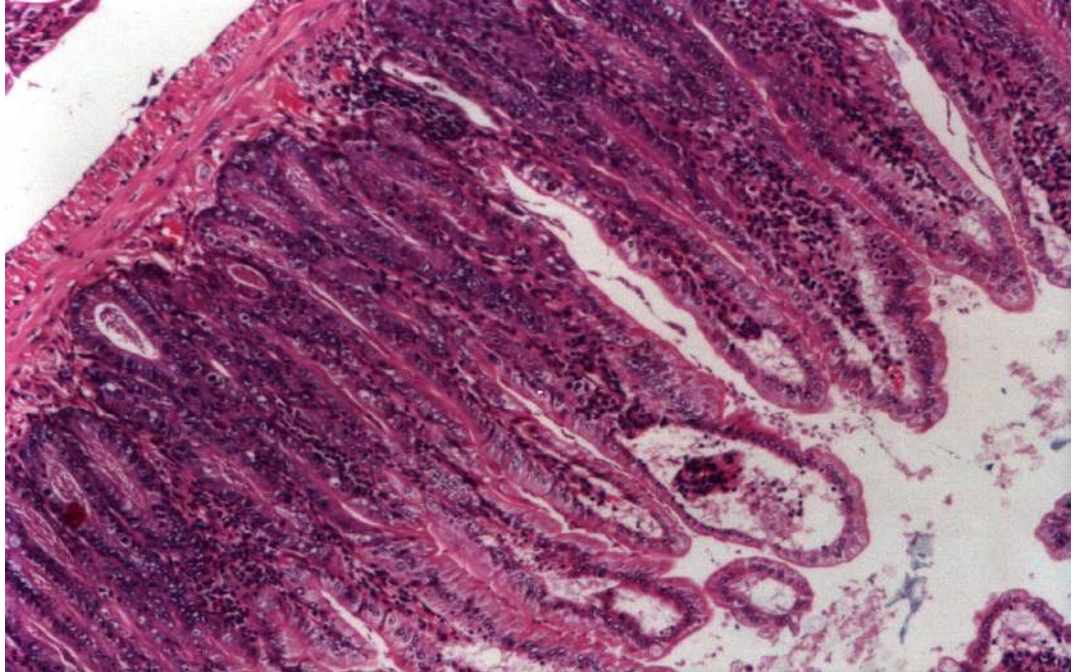
Şekil 4.8: VEMTX grubuna ait ince barsak ışık mikroskopik görüntü
Villuslarda ödem ve orta derecede infiltrasyon görülmekte beraber villus genel yapısının ve epitelin nispeten korunduğu görülmektedir. Bezlerde az derecede düzensizlik görülmekle beraber kistik dejenerasyon gibi ağır hasar bulgularına rastlanmamakta. (HE; x 200)



Şekil 4.9: Mtx grubuna ait ince barsak ışık mikroskopik görüntü
Villus genel yapısında ve epitelde az derecede bozulma (HE; x 200)



Şekil 4.10 : VE-MTX grubuna ait ince barsak ışık mikroskopik görüntü
Orta derecede ödem ve hücre infiltrasyonu görülmekte. Villus ve kriptaların genel yapısında hafif derecede bozulma görülmekte. (HE; x 200)



Şekil 4.12 : VE-MTX grubuna ait ince barsak ışık mikroskopik görüntü
Mononükleer hücre infiltrasyonu olmasına karşın villus ve epitelin iyi korunduğu gözlenmekte. (HE; x 200)

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

MTX; kemik iliği ve gastrointestinal sistem gibi hızlı çoğalan ve gelişen dokular için toksiktir. 1962'de trier ve ark. ilk olarak MTX in sebep olduğu intestinal hasarın barsak villuslarında kısalma ve kriptalarda mitoz artışı olarak saptamışlardır (2). Bu çalışmadan sonra MTX in yol açtığı hasarlar konusunda çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. (4,5,6,7)

E vitamini aktif radikallerle reaksiyona girerek oksidasyona duyarlı moleküler yapıların istenmeyen oksidasyonlarının önlenmesinde ya da azaltılmasında etkili olur. Etanol, karbontetraklorür, trikloretilen, krom gibi birçok zararlı maddenin hücre üzerindeki zararlı etkilerinin önlenmesinde önemli antioksidanlardır (85,86).

Çalışmamızda kontrol grubunda ince barsak yapısında herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Bununla birlikte MTX uygulanan grupta tutarlı olarak ince barsak yapısında ciddi hasarlar meydana gelmişti. Yine aynı tutarlılıkla VEMTX grubunda da hasarlar gözlendi. Ancak hasarın şiddeti MTX grubundaki kadar yoğun değildi.

Diğer çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da kontrol grubunda ince barsak histolojik yapısının korunduğu gözlenmektedir. Bu grupta villuslarda herhangi bir kısalma, epitelyal dejenerasyon veya kripta hücrelerinde hasar gözlenmedi (7).

MTX'e bağlı gelişen ince barsak harabiyetleri diğer çalışmalarla uyumlu idi (85,86,87). Bu hasarlar başlıca ince barsak mukozasında villus füzyonu ve kısalması, kriptalarda kistik dejenerasyon, epitelyal hücre kaybı ve mononükleer hücre infiltrasyonu'ndan oluşmaktaydı. Ayrıca MTX uygulanan farelerde intestinal enteropati neticesinde diyare gelişimi ve buna bağlı olarak ağırlık kayıpları meydana geldi.

Epitel hücrelerinin yenilenmesi kripta hücrelerinin mitoz bölünmeleri ile çoğalıp villus tepelerine doğru göçleri ile olur. Böylece barsak epitel hücreleri 3 gün içinde yenilenmiş olurlar (88,89). MTX alımından sonra ince barsak histopatolojik bulguları ve izole kripta hücrelerindeki timidin kinaz ölçümleri, MTX'in yaptığı harabiyette, tetikleyici mekanizmanın kripta hücre hasarı olduğunu ortaya koymuştur (1,2,90,91). Bunu kripta

hücrelerinde yapılan timidin kinaz aktivitesi ölçümleri de desteklemektedir (92). MTX ayrıca diğer kemoterapötik ajanlar gibi, hızlı proliferen olan gastrointestinal mukoza hücrelerinde apoptozis oranını da artırmaktadır (93).

Metotreksat ve onun poliglutamat metabolitleri hidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin aktif noktasına sıkı bir şekilde bağlanarak enzimi inhibe eder.(3,4) Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu timidilat ve purin nukleotidlerinin (adenin ve guanin) biyosentezinin durmasına yol açar. Bu da hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA sentezini inhibe eder. Enerji üretimi için gerekli ATP sentezinin de baskılanması, proliferasyonun engellenmesine katkıda bulunur. Ayrıca FH_4 'e dönüşmeden kalan FH_2 dihidrofolatpoliglutamatlar (FH_2Glu_n) ve metotreksatın poliglutamat türevleri toksik inhibitör metabolitler şeklinde birikir. Timidilat sentetatazin ve purin bazı sentezinde rol oynayan transformilaz enzimlerinin inhibisyonu, metotreksatın kendisinden çok adı geçen iki poliglutamat metaboliti tarafından yapılır.(11)

VENTX grubunda hasarlar meydana gelmişse de bu hasarlar MTX grubu kadar şiddetli değildi. MTX tedavisine E vitamini eklenmesinin barsak mukozası hasarlarını azalttığını gösteren histopatolojik delilleri, MDA ölçümlerine dayanan biyokimyasal bulgularımızda desteklemektedir. E vitamini bir antioksidan olması nedeniyle oksijeni bağlayarak, oksijen etkisi ile oluşabilecek istenmeyen etkilerin önüne geçer. Serbest radikalleri hücre zarına, nükleik asitlere ve hücre bileşenlerine saldırmadan kendine çeker ve bağlar. Hücrelerde membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asitleri (linoleik asit ve arasinodik asit gibi) kendiliğinden yada oksidan metabolitlerin etkisi sonucu kolayca oksitlenebilir ve peroksit türevlerine dönüşebilirler. Tüm hücre membranlarının lipidleri serbest radikaller tarafından oksidasyona maruz kalarak yıkılırlar. Alfa tokoferol lipid yıkım reaksiyon zincirini engeller ve serbest radikalleri durdurur. E vitamini, hücre ve organellerinin membran lipidleri üzerindeki bu etkisi nedeniyle, bu membranları oksidatif zedelenmeye karşı korur. Böylece genel olarak membranların stabilitesini

artırır. E vitamini bu etkileri ile MTX in oluşturduğu hasarları çalışmamızda gözlemlendiği gibi azaltmaktadır.

Özet olarak; metotreksat uygulamasını takiben farelerde jejunal histopatolojik hasarlar meydana getirmekte ve bu da, diyare ve malabsorbsiyon gibi klinik durumlarla karşımıza çıkmaktadır. E vitamini verilen grupta histopatolojik bulgularda azalmalar olmuştur. E vitamininin etki mekanizmalarında halen aydınlatılamamış karanlık noktalar varsa da, bizim çalışmamız, MTX'in istenmeyen etkilerinden korunmada E vitamini kullanımı için bir ümit vermektedir. Ancak klinik uygulamaları da içeren daha ileri çalışmalara gerek vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Loehry, C. A., Creamer B., Three-dimensional structure of the rat small intestinal mucosa related to mucosal dynamics. Gut 1969; 10:112-120
2. Trier, J. S., Morphological alterations induced by methotrexate in the mucosa of human proximal intestine, I. Serial observations by light microscopy. Gastroenterology 1962; 42:295-305
3. Jollivet J., Cowan K., Curt G., Clendeninn N., Chabner B. The pharmacology and clinical use of methotrexate. N. Eng. J. Med. 1983; 309:1094-1104
4. Iqbal MP, Sultana F, Mehboobali N, Pervez S. Folinic acid protects against suppression of growth by methotrexate in mice. Biopharm Drug Dispos, 2001; 22: 169-178.
5. Kosakai Y, Horie T, Awazu S. Protective effect of vitamin A against the methotrexate-induced damage to small intestine: A study on the crypt cells. Pharmacol Toxicol, 1991; 69: 291-295.
6. Yüncü M, Eralp A, Koruk M, Sarı İ, Bağcı C, İnalöz S. Effect of vitamin A against methotrexate-induced damage to the small intestine in rats. Med Princ Pract, 2004; 13: 346-352.
7. Warden, RA., Noltorp, RS., Francis, JL., Dunkley, PR., O'Loughlin, EV.; Vitamin A Deficiency exacerbates methotrexate-induced jejunal injury in rats. J Nutr, 1997; 127:770-776
8. Subramaniam S, Subramaniam S, Shyamala Devi CS. Vitamin E protects intestinal basolateral membrane from CMF-induced damages in rat. Indian J Physiol Pharmacol, 1995; 39: 263-266.
9. Logvinova AV, Foehr MW, Pemberton PA, et al. Soy-derived antiapoptotic fractions protect gastrointestinal epithelium from damage caused by methotrexate treatment in the rat. Nutr Cancer, 1999; 33: 33-39.
10. Ross, M., Romrell, JR., Kaye, GI.:Histology; 1995; 16:453-464
11. Kayaalp, O.: Tibbi Farmakoloji;1994; 41:1035-1037
12. Jollivet, J., Cowan, K., et. Al.: The Pharmacology and clinical use of methotrexate. N. Eng. J. Med.309: 1094-1104
13. Bannwarth, B., Labat, L., Moride, Y., Schaefferbeke, T., Methotrexate in rheumatoid arthritis, Drugs 1994; 47: 25-50

14. Waltham, MC., Holland, JW., Robinson, SC., et al: Direct experimental evidence for competitive inhibition of dihydrofolate reductase by methotrexate. *Biochem Pharmacol* , 37:535-539, 1988
15. Bertino, JR.; Karnofsky Memorial Lecture. Ode to methotrexate. *J Clin Oncol* 1993; 11:5-14
16. Bram, J., Allegra, CJ., Fine, RL., Chabner, BA.; Effects of methotrexate on intracellular folate pools in purified myeloid precursor cells from normal bone marrow. *J Clin Invest* 1987; 79:692-697
17. Henderson, GB., Tsuji, JM., Kumar, HP.; Transport of folate compounds by leukemic cells: evidence for a single influx carrier for methotrexate, 5-methyltetrahydrofolate, and folate in CCRF-CEM human lymphoblasts. *Biochem Pharmacol*; 1987;36:3007-3014
18. Gifford, AJ., Kavallaris, M., Madafiglio, J., et al. P-glycoprotein-mediated methotrexate resistance in CCRF-CEM sublines deficient in methotrexate accumulation due to a point mutation in the reduced folate carrier gene. *Int J Cancer*; 1998;78:176-181
19. Henderson, GB., Tsuji, JM.; Identification of the bromosulphophthalein-sensitive efflux route for methotrexate as the site of action of vincristine in the vincristine-dependent enhancement of methotrexate uptake in L1210 cells. *Cancer Res*; 1998; 48:5995-6001
20. Pizzorno, G., Mini, E., Coronello, M. et al. ; Impaired polyglutamylation of methotrexate as a cause of resistance in CCRF-CEM cells after short-term, high-dose treatment with this drug. *Cancer Res*; 1998;48:2149-2155
21. Chabner, BA., Allegra, CJ., Curt, GA. et al. Polyglutamation of methotrexate: is methotrexate a prodrug?; *J Clin Invest*; 1985; 76:907-912
22. Dicker, AP., Waltham, MC., Volkenant, M. et al. Methotrexate resistance in an in vivo mouse tumor due to a non-active-site dihydrofolate reductase mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1993; 90:11797-11801
23. Curt, GA., Jolivet, J., Carney, DN. et al : Determinants of the sensitivity of human small-cell lung cancer cell lines to methotrexate. *J Clin Invest*; 1985;76:1323-1329

24. Bleyer, WA.; Methotrexate: clinical pharmacology, current status and therapeutic guidelines. *Cancer Treat Rev*; 1977;4:87-101
25. Sotos, GA., Liebmann, JE., Kohler, DR., Longo, DL.; Reactivation of thermal burn by methotrexate. *J Natl Cancer Inst*; 1992; 84:1936-1938
26. Schoenfeld, A., Mashiach, R., Vardy, M., Ovadia, J.; Methotrexate pneumonitis in nonsurgical treatment of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol*; 1992; 80:520-521
27. Kovacs, GT., Paal, C., Somlo, P. et al. Proteinuria due to suboptimal hydration with high-dose methotrexate therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*; 1993; 33:262-263
28. Horwitt, MK., Vitamin E: A reexamination. *Amer J Clin Nutr* 1979;29: 568
29. Aras, K., Erşen, G., Karahan, S.; *Tıbbi Biyokimya*, Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 1976
30. Ersoy, E., Bayşu, N., Ertürk, K., Üstüdal, KM., *Biyokimya*, Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi; 1979
31. Kayaalp, O.; *Tıbbi Farmakoloji*; 2002; 91:1484-1489
32. Calzada, C., Bruckdorfer, KR., Rice-Evans, CA.; The Influence of Antioxidant role of melatonin in Lipid Peroxidation of Human LDL; *FEBS* 1997; 18: 289-293
33. Dündar, Y., Aslan, R., *Genel Tıp Dergisi*; 1999;9
34. Marcus, R., Coulston, A.M.; *Fat soluble vitamins. The Pharmacological Basis of Therapeutics*; 9.baskı 1573
35. Palomaki, A., Malminiemi, K., Metsä-Ketela, T., Enhanced Oxidizability of ubiquinol and alpha-tocopherol during low-dose treatment; 1997; 410: 254-258
36. Evelson, P., Ordonez, CP., Liesuy, S., Boveris, A.; Oxidative Stress and in vivo Chemiluminescence in Mouse skin exposed to UVA radiation. *J Photochem Photobiol B*, 1997; 38: 215-219
37. Thiele, J., Traber, MG., Tsang K., Cross, CE., Packer, L.; In vivo exposure to ozone depletes vitamin C, and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of skin. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 385-391

38. Steiner, M., Vitamin E: More than antioksidant, Clin Cardiol; 1993; 16: 16-18
39. Wen, Y., Doyle, MC., Harrison, RF., Feely, J., The Effects Of Hormone Replacement, Therapy On Vitamin E Status In Postmenopausal Women. Maturitas, 1997, 26: 121-124
40. Korner, FW., Voom, J., Vitamins; Basel: La Roche; 1978
41. Zintzen, H., News and Reviews, Vitamin E/ Selenium in Ruminants. Basel: La Roche ; 1972
42. Zinten, H., Fat-Souble Vitamins in Nutrition of Ruminants. Basel: La Roche; 1977
43. Combs, GF., Noguchi, T., Scott, ML.; Mechanism of action of Selenium and Vitamin E In Protection of Biological Membranes, Federation Proc; 1975; 34:11
44. Galley, HF., Thomton, J., Howdle, PD., Walker, BE., Webster, NR.; Combination oral antioksidant supplementation reduces blood pressure. Clin Sci Colch, 1997; 92; 361-365
45. Knekt P, Reunanen A, Jarvinen R, Seppanen R, Heliovaara M, Aromaa A. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. Am J Epidemiol. 1994;139(12):1180-1189.
46. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. N Engl J Med. 1996;334(18):1156-1162.
47. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. N Engl J Med. 1993;328(20):1450-1456.
48. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. N Engl J Med. 1993;328(20):1444-1449.
49. Cherubini A, Zuliani G, Costantini F, et al. High vitamin E plasma levels and low low-density lipoprotein oxidation are associated with the absence of atherosclerosis in octogenarians. J Am Geriatr Soc. 2001;49(5):651-654.

50. Gale CR, Ashurst HE, Powers HJ, Martyn CN. Antioxidant vitamin status and carotid atherosclerosis in the elderly. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(3):402-408.
51. McQuillan BM, Hung J, Beilby JP, Nidorf M, Thompson PL. Antioxidant vitamins and the risk of carotid atherosclerosis. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment study (CUDAS). *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(7):1788-1794.
52. Simon E, Gariepy J, Cogny A, Moatti N, Simon A, Paul JL. Erythrocyte, but not plasma, vitamin E concentration is associated with carotid intima-media thickening in asymptomatic men at risk for cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2001;159(1):193-200.
53. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000;342(3):154-160.
54. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet.* 1999;354(9177):447-455.
55. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet.* 1996;347(9004):781-786.
56. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, et al. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2000;356(9237):1213-1218.
57. Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, et al. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet.* 1997;349(9067):1715-1720.

58. Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, et al. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. *Jama*. 1997;277(17):1380-1386.
59. Morrela, M., Livrea, MA.; Synergistic effects of glycolic acid on the antioxidant activity of alfa-tocopherol and melatonin in lipid bilayers and in human skin. *Biochem Mol Biol Int*; 1997; 42: 1093-1102
60. He, Y., Root, MM., Parker, RS., Campbell, TC.; Effects of carotenoid-rich food extracts on the development of preneoplastic lesions in rat liver antioxidant status. *Nutr Cancer*; 1997; 27: 238-244
61. Mooney, LA.; Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers. *Carcinogenesis*; 1997; 18:503-509
62. Sigounas, G., Anagnostou, A., Steiner, M.; dl-alpha-tocopherol induces apoptosis in evythroleukemia, prostate, and breast cancer cells. *Nutr Cancer*; 1997; 28: 30-35
63. Yu W, Sanders BG, Kline K. RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria. *Cancer Res*. 2003;63(10):2483-2491.
64. You H, Yu W, Munoz-Medellin D, Brown PH, Sanders BG, Kline K. Role of extracellular signal-regulated kinase pathway in RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced differentiation of human MDA-MB-435 breast cancer cells. *Mol Carcinog*. 2002;33(4):228-236.
65. Neuzil J, Weber T, Schroder A, et al. Induction of cancer cell apoptosis by alpha-tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements. *FASEB J*. 2001;15(2):403-415.
66. Brigelius-Flohe R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(4):703-716.
67. Weber T, Lu M, Andera L, et al. Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo. *Clin Cancer Res*. 2002;8(3):863-869.
68. Malafa MP, Fokum FD, Mowlavi A, Abusief M, King M. Vitamin E inhibits melanoma growth in mice. *Surgery*. 2002;131(1):85-91.

69. Malafa MP, Neitzel LT. Vitamin E succinate promotes breast cancer tumor dormancy. *J Surg Res.* 2000;93(1):163-170.
70. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Vitamin E. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington D.C.: National Academy Press; 2000:186-283.
71. Hendler SS, Rorvik DR, eds. *PDR for Nutritional Supplements.* Montvale: Medical Economics Company, Inc; 2001.
72. Floyd, R.; Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 1990; 4:2587-2597
73. Mccord, J.; Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med*; 1985; 12:159-163
74. Fleming, J., Miguel, J., Econimos, A.; Is a cell aging caused by respiration dependent injury to the mitochondrial genome?; *Gerontol*; 1982; 28-44
75. Zinten, H., *Fat-Soluble Vitamins in Nutrition of Ruminants.* Basel: La Roche; 1977
76. Van-Der-Meulen, JH., McArdle, A., Jackson MJ., Faulkner, JA.; Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats; The role of vitamin E; *J Appl Physiol*; 1997; 83:817-823
77. Packer, L.; Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr*; 1991; 53: 1050-1055
78. Evelson, P., Ordonez, CP., Llesuy, S., Boveris, A.; Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J Photochem Photobiol B*; 1997; 38:215-219
79. Stratton, SP., Liebler, DC.; Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of bilayers: Effects of beta-carotene and alpha-tocopherol. *Biochemistry*; 1997; 36:12911-12920
80. Üstün, N. Ş., Turhan, S., 1999. Yağ Oksidasyonu ve Antioksidanlar. O.M.Ü. Ziraat Fakültesi, Yardımcı Ders Notu No: 11, 81 s.
81. Christen, S., Woodall, AA., Shigenaga, MK., Southwell, PT., Duncan, MW., Ames, BN.; Gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO and complements alpha-tocopherol; Physiological implications. *Proc Natl Acad Sci*; 1997; 94:3217-3222

82. Smith, KL., Hogan, JS., Weiss, WP.; Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J Anim Sci*; 75:1997;1659-1665
83. Jialal, I.; The use of vitamin E in cardiovascular disease. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biol*; 1995;3:110-115
84. Hodis, HN.; Effects of alpha tocopherol in patients with coronary artery disease. *JAMA*; 1996;3;91-101
85. Xian, CJ., Couper, R., Howarth, GS., Read, LC., Kallincos, NC.; Increased expression of HGF and c-met in small intestine during recovery from methotrexate-induced mucositis. *Br J Cancer*; 2000;82:945-952
86. Taminiau, JA., Gall, DG., Hamilton, JR.; Response of the rat small intestine epithelium to methotrexate. *Gut* 1980;21:486-492
87. Naruhashi, K., Nadai, M., Nakao, M., Suzuki, N., Nabeshima, T., Hasegawa, T.; Changes in absorptive function of rat intestine injured by methotrexate. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 2000;27:980-986
88. EM. Leblond, CP., Messier, B.; Renewal of chief cells and goblet shown by radioautography after injection of thymidine- H^3 into mice. *Anat Rec*, 1958; 132: 247-259.
89. Lipkin M, Sherlock P, Bell B. Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. II. Cell renewal in stomach, ileum, colon and rectum. *Gastroenterology*, 1963; 45: 721-729.
90. Margolis, S., Philips, F.S., Sternberg, S.S.: The cytotoxicity of methotrexate in mouse small intestine in relation to inhibition of folic acid reductase and DNA synthesis. *Cancer Res*, 1971; 31: 2037-2046.
91. Altmann, G.G.: Changes in the mucosa of the small intestine following methotrexate administration or abdominal x-irradiation. *Am J Anat*, 1974; 140: 263-280.
92. Chu, E., Mota, AC., Fogarasi, MC.; Antimetabolites; in DeVito VT, Hellman, S., Rosenberg, SA.(eds); *Cancer, Principles and practice of Oncology*, ed 6. Philadelphia, Lippincott, Williams&Wilkins, 2001;pp 388-393
93. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol*, 1990; 40: 2353-2362.

