

**SIÇANLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN
KARACİĞER HASARINA KARŞI
TRANS-3 HİDROKSİSİNNAMİK ASİT'İN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özge ARSLAN

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR
2016
Her hakkı saklıdır**

**AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SIÇANLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN
KARACİĞER HASARINA KARŞI TRANS-3 HİDROKSİSİNNAMİK
ASİT' İN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özge ARSLAN

KİMYA ANABİLİM DALI

**AĞRI
2016**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAY FORMU

SIÇANLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARINA KARŞI TRANS-3 HİDROKSİSİNNAMİK ASİT'İN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yrd.Doç.Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR danışmanlığında, Özge ARSLAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 25/11/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (3./3.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Mustafa GÜL

İmza :

Üye : Doç.Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza :

Üye : Yrd.Doç.Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../201.. tarih ve / nolu kararı ile onaylanmıştır.


Doç. Dr. Karim ZILBEYAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SIÇANLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARINA KARŞI TRANS-3 HİROKSİSİNNAMİK ASİT' İN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Özge ARSLAN

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR

Metotreksat (MET), çeşitli kanser türlerinde ve bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde sitotoksik kemoterapötik ajan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, bir antioksidan bileşik olarak trans-3 hidroksisinnamik asit (HS)' in, MET' e bağlı oksidatif karaciğer hasarının tedavisinde olası yararlı etkilerini belirlemektir.

Çalışmamızda her biri 200-220 gr ağırlığında 24 Wistar albino rat kullanıldı. Kontrol grubu ratlara tedavi uygulanmadı. MET grubu ratlara intraperitoneal olarak tek doz 20 mg/kg MET verildi ve 5 gün sonra sakrifiye edildi. HS grubunda intraperitoneal olarak 5 gün boyunca 100 mg/kg HS verildi. MET+HS grubu ratlara birinci gün intraperitoneal olarak tek doz 20 mg/kg MET verildi ve MET verilmesinden 1 saat sonra 100 mg/kg dozda HS verildi ve 5 gün boyunca HS uygulamasına devam edildi. Çalışmanın son gününde ratlar sakrifiye edildi ve karaciğer dokusu alındı. Doku örneklerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ile glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) seviyeleri değerlendirildi.

Biyokimyasal sonuçlara göre karaciğer doku örneklerinde MDA seviyeleri MET grubunda anlamlı olarak artarken, bu seviyelerin tedavi grubunda anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Ayrıca SOD' un, MET grubunda belirgin olarak azaldığı; ancak HS tedavisiyle yükseldiği tespit edildi. Öte yandan, kontrollerle karşılaştırıldığında MET kullanımının, rat karaciğerinde GSH seviyesi anlamlı olarak azalttığı tespit edildi. Bu sonuçlar, MET' e bağlı oksidatif karaciğer hasarına karşı HS' nin koruyucu bir ajan olabileceğini gösterdi.

2016, 65 sayfa

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, oksidatif stres, karaciğer hasarı, trans-3 hidroksisinnamik asit.

ABSTRACT

Yüksek Lisans Tezi

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TRANS-3 HYDROXYCINNAMIC ACID AGAINST LIVER DAMAGE INDUCED-METHOTREXATE IN RATS

Özge ARSLAN

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR

Methotrexate (MTX) is usually used as a chemotherapeutic agent in the treatment of various types of cancer and some inflammatory diseases. The aim of this study was to determine the possible beneficial effects of trans-3 hydroxycinnamic acid (HC) as an antioxidant compound against oxidative liver damage induced by MTX.

In our study, we used 24 Wistar albino rats each weighing 200-220 g. The treatment was not applied in control group. Only a single dose of 20 mg/kg of MTX was administered intraperitoneally to MTX group rats and sacrificed 5 days later. In HC group, we administered intraperitoneally 100 mg/kg of HC for 5 days. Intraperitoneally a single dose 20 mg/kg of MTX was given to MTX+HC rats on the first day of the experiment. Later, it was used 100 mg/kg dose of HC following 1 h after the MTX and HC was continued to be given for 5 days. Rats were sacrificed on the last day and the liver tissue was removed. Superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) levels were evaluated in tissue samples.

MDA levels increased in the MTX group according to the biochemical results. but these levels decreased significantly in group treated with HC. Also, SOD activity decreased in group of MTX. However, this enzyme activity increased depending on HC treatment. On the other hand, GSH level were significantly reduced in group used of MTX compared to controls in the rat's liver tissue.

These results show that HC have a protective role against oxidative liver damage induced-MTX.

2016, 65 pages

Keywords: Methotrexate, oxidative stress, liver damage, trans-3 hydroxycinnamic acid.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, tez çalışmamızın planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen, en zor zamanlarımda varlığıyla beni mutlu eden danışmanım saygıdeğer hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR' e sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunuyorum.

Yüksek lisans eğitimime başlamama vesile olan saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet Ocak AKDEMİR' e ve Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, varlıklarından ve desteklerinden güç aldığım annem Ayşe TAN ve babam Mehmet TAN' a ve beni her zaman maddi-manevi olarak destekleyen, bugünlere gelmemde büyük katkısı olan sevgili eşim Ali Gürkan ARSLAN' a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tezi yazabilmemde bize bu ortamı sağlayan şehit, gazi ve şerefli Türk Silahlı Kuvvetleri mensuplarına teşekkürü bir borç bilirim.

Ve bu tezi varlığıyla beni mutlu eden kızım Ayşe Zümra ARSLAN' a armağan ediyorum.

Özge ARSLAN

Kasım, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ BÖLÜMÜ	3
2.1. Karaciğer	3
2.1.1. Karaciğerin embriyolojisi.....	3
2.1.2. Karaciğerin histolojisi	4
2.1.3. Karaciğerin anatomisi.....	6
2.2. Karaciğerin Fizyolojisi ve Biyokimyasal Fonksiyonları.....	8
2.3. İlaçlar ve Toksik Maddelere Bağlı Karaciğer Hasarı	10
2.4. Serbest Radikaller.....	10
2.4.1. Serbest oksijen türleri	13
2.4.2. Serbest oksijen radikallerinin etkileri.....	14
2.4.3. Karaciğerde serbest radikal hasarı.....	15
2.5. Oksidatif Stres	16
2.6. Kanseri ve kemoterapi	18
2.7. Metotreksat (MET).....	17
2.7.1. Metotreksat' ın mekanizması	19
2.7.2. Metotreksat' ın yan etkileri	20
2.7.3. Metotreksat ve karaciğer toksisitesi	22
2.7.4. Metotreksat toksisitesi ve oksidatif stres.....	23
2.8. Antioksidanlar	24
2.9. Trans-3 Hidroksisinnamik Asit	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1. Materyal.....	31

3.1.1. Deney hayvanları.....	31
3.2. Metot	32
3.2.1. Deney planı.....	32
3.3. Yöntem	34
3.3.1. Dokularının biyokimyasal analizi	34
3.3.2. Doku numunelerinin hazırlanması	34
3.3.3. Protein tayini	35
3.3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	35
3.3.5. Total Glutasyon (GSH) Seviyesi Ölçümü	38
3.3.6. Lipit peroksidasyon Seviyesi Ölçümü.....	39
3.4. İstatistiksel Analiz	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1. Tartışma.....	43
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	53
KAYNAKÇA.....	54
ÖZGEÇMİŞ	65
ETİK KURUL KARARI	66
İNTİHAL RAPORLARI FORMU.....	68

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADA	Adenozin Deaminaz
CAPE	Kafeik Asit Fenetil Ester
CAT	Katalaz
DHF	Dihidrofolat
GSH	Glutasyon
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HRO ₂ ⁻	Hidroperoksil
HS	Trans-3 Hidroksisinnamik Asit
KC	Karaciğer
MDA	Malondialdehit
MPO	Miyeloperoksidaz
MET	Metotreksat
NO	Nitrik Oksit
O ₂ ^{-•}	Süperoksit Anyon Radikali
OH	Hidroksil İyonu
RO ₂	Peroksil
SAH	S-adenozil Homosistein
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
THF	Tetrahidrofolat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. A: 25 günlük embriyoda kalp, mide ve karaciğerin gelişimi.	
B: 30 günlük embriyoda karaciğer, safra kesesi ve pankreasın gelişimi	3
Şekil 2.2. Karaciğer yapısının şematik çizimi	5
Şekil 2.3. Sıçan karaciğerinde sinüzoidal kapillerin endotel örtüsünün taramalı elektron mikroskop resmi.	6
Şekil 2.4. Sıçan karaciğeri	6
Şekil 2.5. Karaciğerin anterior ve posteriordan görünüşü	7
Şekil 2.6. Oksidatif stres mekanizması	17
Şekil 2.7. Normal hücre ile kanser hücresinin çoğalması.....	18
Şekil 2.8. MET' in moleküler yapısı	20
Şekil 2.9. Dihidrofolatın moleküler yapı	20
Şekil 2.10. Folik asitin moleküler yapısı	20
Şekil 2.11. Fenolik Asitlerin Temel Kimyasal Yapısı	28
Şekil 2.12. Bazı benzoik asitlerin kimyasal yapıları	29
Şekil 2.13. Bazı sinnamik asitlerin kimyasal yapıları	29
Şekil 2.14. Trans-3 Hidroksisinamik asit' in kimyasal yapısı.....	30
Şekil 3.1. Deneyde kullanılan doku homojenizatörü ve bilyeli öğütücü	35
Şekil 4.1. SOD (U/mg protein) aktivitesine ait gruplar arası karşılaştırmalar.....	41
Şekil 4.2. GSH (nmol/mg protein) seviyesi için gruplar arası karşılaştırmalar.....	42
Şekil 4.3. MDA (nmol/mg protein) seviyesi için gruplar arası karşılaştırmalar.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Serbest radikallerin oluşumunu artıran nedenler	12
Çizelge 2.2. Serbest oksijen türleri	13
Çizelge 2.3. Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller	14
Çizelge 2.4. Antioksidanların sınıflandırılması	25
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan gruplar ve gruplara uygulanan tedaviler	32
Çizelge 4.1. Tüm grupların SOD (U/mg protein) aktivitesi, GSH (nmol/mg protein) ve MDA (nmol/mg protein) seviyelerine ait Ortalama±Standart Sapma (Ort±SS) değerleri tablo halinde sunulmuştur.....	41

1. GİRİŞ

Karaciğer; vücudun en büyük bezi ve deriden sonra gelen en büyük organıdır (Ozan 2004). Toplam vücut ağırlığının % 2' si kadar bir ağırlığa sahip olan karaciğer koyu kahverenginde, gevrek (travmada kolayca yırtılabilir) bir organdır (Sarsılmaz 2000). Sindirim kanalının hem endokrin hem ekzokrin işleve sahip bezi olan karaciğer, üç temel alanda merkezi bir rol oynar. Karbonhidratların, yağların ve proteinlerin metabolizması ile ilaç ve alkol gibi dışarıdan vücuda alınan bazı maddelerin metabolize edilmesi ve yağ sindirimi için çok önemli olan safranin yapımı ve salgılanmasıdır (William and Patrick 2009).

Karaciğer hasarında önemli mekanizmalardan biri oksidatif strestir. İlaç/toksin metabolitleri, iskemi/reperfüzyon ve alkol metabolizmasının sonucunda ortaya çıkan ve serbest oksijen türleri olarak bilinen süperoksit anyonları, hidroksil ve hidroksietil radikalleri ile hidrojen peroksit gibi ürünler, hepatositlerin nekroz ve apoptozu ile ilgilidir ve hepatik stellat hücre aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır (Prosser *et al.* 2006). Hücrede serbest oksijen türleri (SOR)' nin ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. Hücrede oluşan SOR, antioksidanlar olarak bilinen mekanizmalarla dengede tutulur. Oksidatif stres; hücresel oksidan/antioksidan dengenin oksidan lehine bozulması olarak tarif edilebilir (Sinclair *et al.* 1990). Oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunun; kanser, aterosklerotik kalp hastalıkları, diabetes mellitus, romatoid artrit, katarakt, karaciğer hastalıkları ve toksik hücre hasarlarının patogeneğinde rol aldığı bilinmektedir (Halliwell and Chirico 1993; Droge 2002). Yapılan bir çalışmada karaciğer hastalıklarında oksidatif stres ve buna bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Shimizu 2001).

Metotreksat (MET) kan ve solid organ malignansilerinde, dermatolojik ve romatolojik hastalıklarda, ektopik gebelik sonlandırılmasında yaygın bir şekilde kullanılan folat analogu olan bir antimetabolit ajandır (Smith and Nelson 2008). Akut lösemi ya da psöriazis gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan yüksek doz MET' in karaciğerde

ilerleyici fibrozis ve siroza kadar gidebilen hepatik toksisite ile ilgili olduğu belirtilmiştir (Hytioglou *et al.* 2004). MET' in mide-bağırsak, karaciğer, böbrek ve kemik iliği toksisiteleri en sık görülen yan etkileridir (Sener vd 2006). Sıçanlara MET verilmesinin; kan, karaciğer, böbrek ve ince bağırsakta glutatyon (GSH) seviyelerini azalttığı, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesini ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyelerini arttırdığı bulunmuştur (Jahovic *et al.* 2003). Son zamanlarda çalışmalar MET' in normal ve anormal dokulardaki istenmeyen etkilerini önleyebilecek maddeler üzerinde yoğunlaşmıştır (Yüncü ve Kanter 2006).

Çeşitli çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engellemek veya oksidan/antioksidan dengeyi sağlamak için antioksidan olarak nitelendirilen birçok farmakolojik madde kullanılmıştır (Liang and Akaike 2000).

Sinnamik asit α,β -doymamış aromatik yağ asidi olup bitkilerde yaygın bir şekilde bulunmakta ve tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Hoskins 1984). Sinnamik asit ve türevleri doğal olarak çilek, erik, tarçın, karanfil ve baharat olarak kullanılan bitkilerde bulunur (Beuchat and Golden 1989). Toksititesinin düşük olması nedeniyle Food and Drug Administration (FDA) tarafından gıdalarda kullanımına izin verilmiş olup kabul edilebilir günlük alımı 1.25 mg/kg olarak belirlenmiştir (Hoskins, 1984; Kirk and Othmer 1993). Sinnamik asit doğal bir antimutajenik ajandır (Mitscher *et al.* 1992; Liu *et al.* 1995; www.toraks.com.tr), ancak bu bileşiğin MET' in oluşturduğu oksidatif strese karşı etkilerini ortaya koyan bir çalışma mevcut değildir.

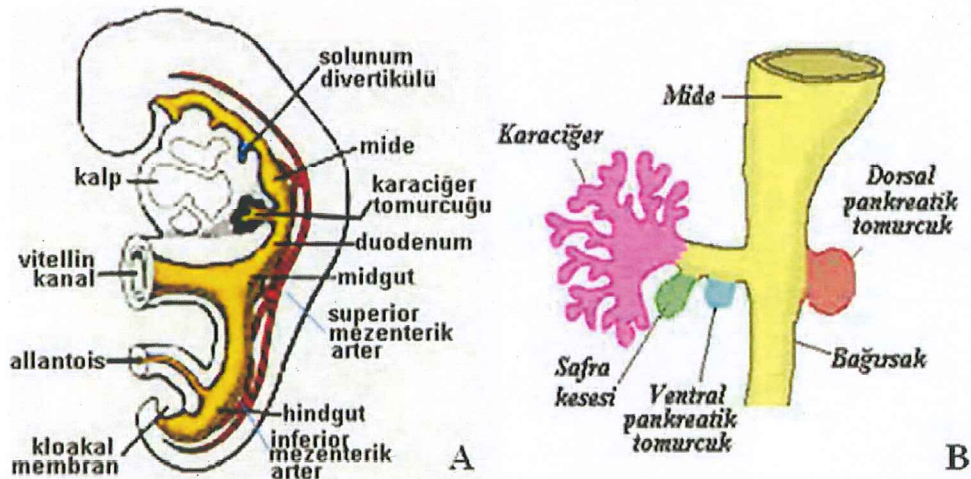
Bu çalışmada sıçanlarda MET uygulamasına bağlı olarak oluşan hepatotoksisiteye karşı bir sinnamik asit türevi olan trans-3 hidroksisinnamik asit' in olası yararlı etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ BÖLÜMÜ

2.1. Karaciğer

2.1.1. Karaciğerin embriyolojisi

Karaciğer gelişimi fetal yaşamın 4. Haftasında başlar. Ventral bölgede dışarıya doğru çıkıntı oluşturan karaciğer tomurcuğu ilk bu dönemde oluşur (Şekil 2.1) (Arbak 2007).



Şekil 2.1. A: 25 günlük embriyoda kalp, mide ve karaciğerin gelişimi. **B:** 30 günlük embriyoda karaciğer, safra kesesi ve pankreasın gelişimi (Sadler 2005).

Karaciğer hızla gelişim göstererek ve embriyonel yaşamın beşinci haftasından onuncu haftasına kadar, abdominal alanda geniş bir alanı kapsar. Oksijenden zengin kan miktarının, Vena umblikalis' ten karaciğere akması karaciğerin geliştiğini ve bölünmesini (segmentasyon) gösterir. Başlangıçta sağ ve sol loblar aynı büyüklükte dirler, ancak sağ lob, kısa zamanda daha büyük olur (Şeftalioğlu 1998).

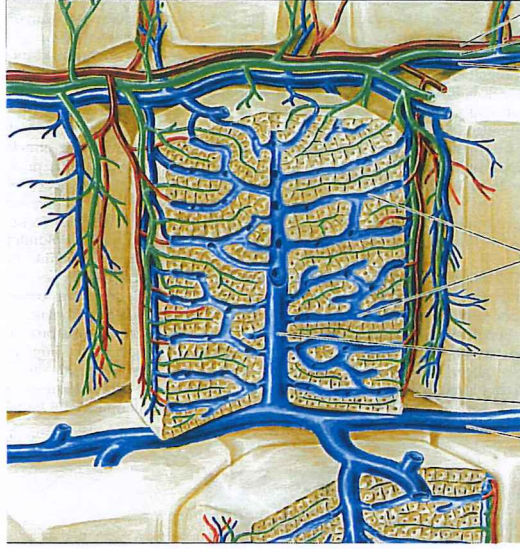
Altıncı haftadan itibaren oluşan hematopoezis nedeniyle karaciğer parlak kırmızı bir görünüme sahiptir; bu nedenle yedinci ve dokuzuncu haftalar arasında gerçekleşen

hematopoetik aktivite karaciğerin büyüklüğünden sorumludur. Dokuzuncu haftaya kadar fetüsün toplam ağırlığının % 10' unu karaciğer oluşturur (Moore 2002). Ancak hematopoetik aktivite, gebeliğin son iki ayında yavaş yavaş azalır ve doğum ile beraber geriye birkaç hematopoetik hücre adası kalır. Bundan sonra ise asıl hematopoetik aktiviteyi kemik iliği gerçekleştirir (Lauren 1998). Artık karaciğer ağırlığı vücut ağırlığının % 5' i kadardır (Sadler 2005). Onikinci haftada, karaciğer hücreleri safra yapmaya başlarlar (Moore 2002).

2.1.2. Karaciğerin histolojisi

Stroma; Karaciğer, hilumda kalınlaşan ince bir bağ dokusu kapsülü (Glisson kapsülü) ile örtülüdür. Hilumda, organa portal ven ve hepatik arter girer, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar. Bu damarlar ve kanallar, klasik karaciğer lobülleri arasında sonlandıkları (ya da köken aldıkları) portal alanlara kadar bağ dokusu ile çevrilmiştir. Bu noktadan itibaren karaciğer lobüllerindeki hepatositlere ve sinüzoidal endotel hücrelerine destek sağlayan ince bir retiküler lif ağı oluşur (Aytekin ve Solakoğlu 2006).

Karaciğer Lobülü; Karaciğerin temel yapı elemanı karaciğer hücresi ya da hepatositir. Bu epitelyal hücreler birbirleriyle bağlantılı plaklar halinde gruplaşmışlardır. Işık mikroskobu kesitlerinde, karaciğer lobülü olarak isimlendirilen yapısal birimler görülebilir (Şekil 2.3). Karaciğer lobülü 0.7x2 mm boyutlarında poligonal bir doku kitlesidir. İnsan karaciğer lobülünde 3-6 portal alan bulunur ve her bir portal alanda bir venül (portal venin bir dalı); bir arteriyol (hepatik arterin bir dalı); bir kanal (safra kanalı sisteminin bir parçası) ve lenfatik damarlar bulunur. Venül süperior ve inferior mezenterik venler ile dalak veninden gelen kanı içerir. Arteriyoldeki kan abdominal aortun çölyak dalından gelir. Kübik epitelle örtülü olan kanal parenkimal hücrelerden (hepatositler) gelen safrayı taşır ve sonunda hepatik kanal içine boşalır. Lenf, bir ya da daha fazla lenfatikle taşınır ve sonuçta kan dolaşımına geçer. Bu yapıların hepsi bir bağ dokusu kılıfı içinde bulunur (Aytekin ve Solakoğlu 2006).



Şekil 2.2. Karaciğer yapısının şematik çizimi (Aytekin ve Solakoğlu 2006).

Karaciğer lobülü içindeki hepatositler ışınsal olarak dizilmiştir. Bu hücre plakları lobülün periferinden merkezine doğru yönlenmişlerdir. Labirent şeklinde ve sünger benzeri bir yapı oluşturacak biçimde serbestçe anastomozlaşırlar. Bu plaklar arasındaki boşlukta karaciğer sinüzoidal adı verilen kapilerler bulunur (Şekil 2.2). Sinüzoidal kapilerler sadece kesintili bir pencereci endotel tabakasından oluşan düzensiz olarak genişlemiş damarlardır. Pencereci yaklaşık 100 nm çapındadır ve kümeler halinde gruplaşmıştır (Aytekin ve Solakoğlu 2006).

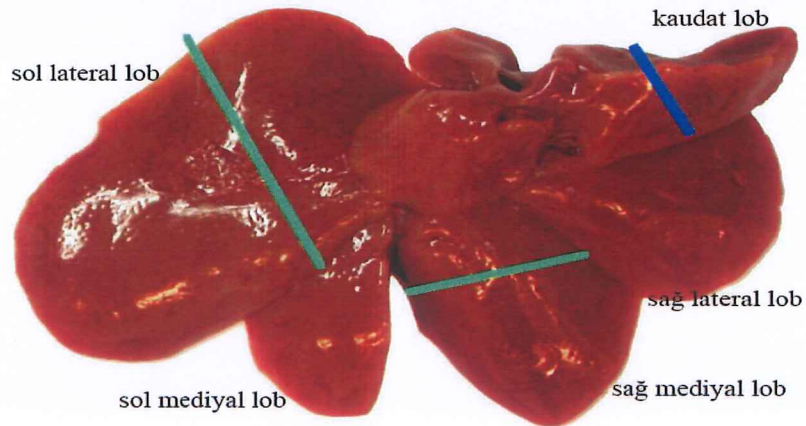
Endotel hücreleri altlarında bulunan hepatositlerden kesintili bir bazal lamina (canlı türüne bağlı değişiklik gösterir) ve Disse aralığı adı verilen endotel altı bir boşlukta ayrılmıştır. Bu aralıkta hepatositlerin mikrovilusları bulunur (Şekil 2.3.). Sonuç olarak kan sıvısı endotel duvarından kolayca geçer ve hepatosit yüzeyi ile temas eder (Aytekin ve Solakoğlu 2006).



Şekil 2.3. Sıçan karaciğerinde sinüzoidal kapillerin endotel örtüsünün taramalı elektron mikroskop resmi (Aytekin ve Solakoğlu 2006).

2.1.3. Karaciğerin anatomisi

Ratlarda karaciğer 4 ana loba ayrılır. Caudat, sağ lob, orta lob ve sol dış lobtur. Caudat lob, caudat çıkıntı, ön ve arka caudat lob olmak üzere üçe ayrılır. Sağ lob, süperior sağ lob ve inferior sağ lob olarak ikiye ayrılır. Medial lob, sağ orta lob ve sol orta lob şeklinde ikiye ayrılır (Martins *et al.* 2008).

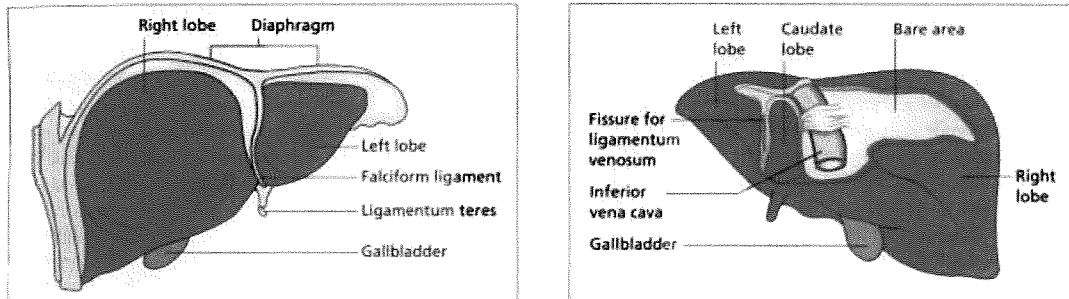


Şekil 2.4. Sıçan karaciğeri (Snell 2008).

Kongure' nin çalışması rat karaciğer anatomisini açıklar ve Couinaud tarafından gösterilen insan karaciğer segmentasyonu ile uyumluluk gösterir (Kogure *et al.* 1999).

Karaciğer abdomendeki en büyük organdır. Büyüklüğü ve konturları kişiden kişiye değişiklik gösterir. Kadınlarda ortalama 1200-1400 gr erkeklerde ortalama 1400-1600 gr ağırlıktadır. Karaciğer topografik olarak sağ ve sol loblara ayrılır. Karaciğer ince fibröz bir kapsül (Glisson kapsülü) ile kaplıdır. Karaciğer sağ lobunun altında önden arkaya doğru kolonun hepatik fleksurası ve sağ böbrek bulunur. Bu yapıların medialinde safra kesesi ve posteriorunda duodenum yer alır. Sol lobun alt yüzüne midenin küçük kurvaturu ve ön yüzü komşudur (Snell 2008).

Karaciğerin bir diyafragmatik (üst) yüzü, bir visseral (alt) yüzü, keskin bir ön kenarı ve bir de künt arka kenarı vardır (Sarsılmaz 2000). Karaciğerin üst kenarı, ksifosternal eklem seviyesinde olup, linea medioklavikularis' te sağda 5' inci kıkırdak kaburga, solda 5' inci interkostal boşluğu birleştiren çizgi üzerindedir. Diyafragmatik yüzü, area nuda hariç, tamamen visseral peritonla örtülüdür. Diyafragma aracılığıyla; her iki akciğer ve plevraları, fibröz perikardiyum ve kalbin ventriküler bölümünden ayrılır. Diyafragmatik yüz ile diyafragma arasında, recessus subphrenicus denilen potansiyel bir aralık vardır. Karaciğerin alt kenarı keskindir. Sağ 10' uncu kıkırdak kaburga ile linea medioklavikularis' in sol 5' inci kıkırdak kaburgayı kestiği nokta arasında uzanır (Ozan 2004).



Şekil 2.5. Karaciğerin anterior ve posteriordan görünüşü (Scherlock and Dooley 2002).

2.2. Karaciğerin Fizyolojisi ve Biyokimyasal Fonksiyonları

Karaciğerin İşlevleri:

- 1- Kan depo işlevi
- 2- Kan Temizleme İşlevi
- 3- Metabolik İşlevleri
- 4- Diğer İşlevleri

Karaciğerin Kan Depo İşlevi: Karaciğerin normal kan hacmi 450 ml' dir. Bununla birlikte karaciğer genişleyebilen bir organ olduğundan sağ atriyum içi basınç yükseldiğinde hepatik venler ve sinüslerde büyük miktarlarda kan depolanabilir. Bundan da anlaşılacağı gibi karaciğer, kan hacmi azaldığında ek kan sağlama yeteneği olan, kan hacmi aşırı şekilde arttığında ise önemli bir kan deposu olabilen büyük venöz bir organdır (Guyton and Hall 2007; Çapan ve Yalçın 2010).

Karaciğerin Kan Temizleme İşlevi: Barsak kapillerlerinden portal vene akan kan barsaklardan birçok bakteriyi de beraberinde karaciğere getirir. Karaciğere gelen bu kan venöz sinüsler içinden geçerken sinüsoidleri döşeyen Kupffer hücreleri tarafından son derece etkili bir şekilde temizlenmektedir. Barsaklardan portal kana girerek karaciğer içinden geçip sistemik dolaşıma ulaşmayı başaran bakterilerin sayısı bu yüzde muhtemelen birden fazla değildir (Guyton and Hall 2007; Çapan ve Yalçın 2010).

Karaciğerin Metabolik İşlevleri: Karaciğer de vücudun diğer bölgelerinde kullanılacak birçok madde sentez edilip, işlenirken diğer birçok metabolik işlev de yürütülür. Bu metabolik işlevler karbonhidrat metabolizması, yağ metabolizması, protein metabolizması ve diğerleri şeklinde sıralanmaktadır (Guyton and Hall 2007; Çapan ve Yalçın 2010).

Karaciğerin Diğer İşlevleri:

a) Vitaminlerin depo edilmesi; Karaciğerde en fazla A vitamini depo edilirken büyük miktarlarda D vitamini ve B₁₂ vitamini de depo edilir (Guyton and Hall 2007; Çapan ve Yalçın 2010).

b) Karaciğerde demirin ferritin şeklinde depolanması; Vücutta demir hemoglobin dışında, normalde en büyük oranda karaciğerde ferritin şeklinde depo edilir. Vücut sıvılarında demir miktarı arttığı zaman karaciğerde apoferritin ile birleşerek ferritin şeklinde bir daha kullanılmak üzere depo edilir (Guyton and Hall 2007; Çapan ve Yalçın 2010).

c) Kan pıhtılaşmasına etkisi; Birçok koagülasyon faktörü karaciğerde yapılır. Bu faktörlerden protrombin, faktör VII, IX ve X' un oluşumundaki metabolik olaylarda K vitaminini gerekmektedir. K vitamini yokluğunda bu faktörlerin konsantrasyonu çok düşer ve pıhtılaşma bozulur (Guyton and Hall 2007; Çapan ve Yalçın 2010).

d) Bilirubin atılımına etkisi; Hemoglobin yıkımındaki son ürünlerden biri olan bilirubin plazmada albumine bağlı olarak karaciğere taşınır. Bilirubin karaciğerde plazma albümininden ayrılıp yaklaşık yüzde 80' i glukuronik asitle, yüzde 10' u sülfatla birleşerek bilirubin glukuronat ve bilirubin sülfat oluşurken geri kalan yüzde 10' u çeşitli maddelerle birleşir. Bilirubin bu şekilde hepatositlerden aktif transportla safra kanalcıklarına daha sonra da barsaklara salgılanır. Barsaklara geçen "konjuge" bilirubinin yarısı bakteriler tarafından suda kolay eriyen ürobilinojene çevrilir. Ürobilinojenin bir kısmı barsak mukozasından kana emilir. Kana emilen ürobilinojenin büyük kısmı karaciğerden tekrar barsağa atılırken yaklaşık yüzde 5' i de böbreklerden geçip idrar ile atılır (Guyton and Hall 2007; Çapan ve Yalçın 2010).

Aynı zamanda bazı ilaçlar (Sülfonamid, penisilin gibi çeşitli ilaçlar), hormonlar (Tüm steroid hormonlar ve tiroksin) ve diğer maddeler (Kalsiyum gibi) karaciğer tarafından vücuttan uzaklaştırılır (Guyton and Hall 2007; Çapan ve Yalçın 2010).

2.3. İlaçlar ve Toksik Maddelere Bağlı Karaciğer Hasarı

Karaciğer ilaç ve toksinlerin biyotransformasyonunda önemli bir rol oynar. Bu nedenle ilaçlarla oluşan hasarların ana hedefidir. Karaciğer hasarına yol açan ve hemen hemen her tür karaciğer hastalığı tablosuyla sonuçlanabilen 600' den fazla farklı ilaç vardır. İlaçla oluşan karaciğer hasarı nadir bir durum olmayıp hastaneye yatan ikterli hastaların % 2' sinde, fulminan hepatit ve karaciğer yetersizliği olanların % 25' inde ve patoloji laboratuvarına gönderilen tüm karaciğer biyopsilerinin % 5-10' unda ilaçların rolü olduğu belirlenmiştir (Jick *et al.* 1981; Koch *et al.* 1985; Lee *et al.* 1989).

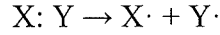
Hasar ani olabileceği gibi, haftalar, hatta aylar içinde gelişebilir. Belirgin hepatosit nekrozu ve kolestaz ile karşılaşabileceği gibi yavaş ve hafif bir karaciğer fonksiyon bozukluğu da söz konusu olabilir. En önemli nokta, ilaç nedenli kronik hepatitin klinik ve histolojik olarak viral hepatitten ya da otoimmün hepatitten farksız olmasıdır. Bu nedenle ikisi arasındaki ayrımın yapılmasında viral enfeksiyonun serolojik belirleyicilerinin kritik rolü vardır (Crawford 2002).

2.4. Serbest Radikaller

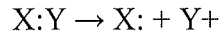
Stabil moleküllerin dış yörüngesinde biri diğerine zıt yönde dönen elektron çiftleri vardır. Dış yörüngelerinde eşlenmemiş en az bir adet elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir. Serbest radikaller oldukça reaktiftir ve elektron çiftlemek için diğer moleküllerle reaksiyona girme eğilimindedir (Bekerecioğlu vd 1998).

Serbest radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur (Cheeseman and Slater 1993).

1-Kovalent bağların homolitik bölünmesi (Kovalent bağlı molekülün bölünmesinden sonra, her bir parçasında ortak olan elektronlardan birinin kalması)

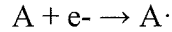


2-Normal bir molekülden tek elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi (Radikal özelliği olmayan bir molekülden bir elektron kaybı sırasında dış orbitalinde ortaklanmamış elektron kalması)



3-Normal bir moleküle elektron transferi

Organizmada serbest radikal ve serbest oksijen türlerinin oluşmasına neden olan endojen ve ekzojen kaynaklar bulunmaktadır (Freeman and Crapo 1982).



Serbest radikallerin biyolojik etkileri;

- 1-DNA hasarı
- 2-Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı
- 3-Lipid peroksidasyonu, zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi
- 4-Protein ve lipidlerle kovalent bağlantılar oluşturmak
- 5-Zar proteinlerinin hasarı ve transport sisteminin bozulması
- 6-Protein hasarı
- 7-Tiollere bağlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması
- 8-Mukopolisakkaritlerin yıkımı olarak özetlenir (Cotran 1994).

Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikal etkisi ile zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinde bulunan alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. En önemli uyarıcı ise hidroksil radikalidir.

Oluşan lipit radikali bir seri reaksiyon sonucu lipit hidroksi-peroksitlere dönüşür (Slater 1984).

Lipid peroksitlerinin yıkım ürünlerden biri de MDA' dır. Protein ve fosfolipidlere çapraz bağ ve polimerizasyon yaparak özelliklerinin kaybolmasına neden olur. MDA deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir, sülfidril içeren enzimleri inaktive eder ve nükleik asitlerle etkileşime girerek mutasyona yol açar. Sonuçta enzim aktivite değişiklikleri, iyon transportu bozuklukları, hücre bileşenlerinin agregasyonları gibi değişiklikler ortaya çıkar (Green *et al.* 1986; Cotran 1994).

Çizelge 2.1. Serbest radikallerin oluşumunu artıran nedenler (Uysal 1998).

EKZOJEN FAKTÖRLER	Çevresel (Sigara dumanı, hava kirliliği, radyasyon vb.)
	Diyetsel (Çok doymamış yağ asitlerince zengin beslenme, aşırı alkol, demir ve bakır alımı, fazla kalorili beslenme-obezite vb.)
	İlaçlar (Kanser ilaçları, glutatyon tüketen ilaçlar vb.)
	Diyet ile antioksidanların alımını etkileyen koşullar (İştahsızlık, kolestaz, malabsorbsiyon vb.)
ENDOJEN FAKTÖRLER	Doku hasarı ve kronik hastalıklar (Ateroskleroz, kanser, kronik inflamasyon vb.)
	Fiziksel egzersiz/sedanter yaşam
	Stres
	Yaşlılık

2.4.1. Serbest oksijen türleri

Oksijenli solunum yapan organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Canlılar sisteminde en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Bu radikallere “Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)” de denilmektedir.

Normal metabolizma esnasında gelişen oksidasyon-redüksiyon olayları sonucunda oluşan Serbest oksijen türevleri biyolojik bir bozukluğa neden olmamasına rağmen; bazı hücrel metabolik bozukluklar nedeniyle (iskemi, inflamasyon, radyasyon, hiperoksi vb.) çok daha fazla miktarlarda üretilmeleri sonucu membranlar, nükleik asitler, enzimler ve polisakkaritler üzerinde değişik derecelerde toksik etki yaparak çeşitli dokularda hasara yol açmaktadırlar. Bunlar, elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alış-verişi yapabilenler (radikaller) ve elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşenler (nonradikaller) olmak üzere iki grupta toplanabilir (Çizelge 2.2) (Bulkley 1993; Yu 1994).

Çizelge 2.2. Serbest oksijen türleri (Akkus 1995).

Radikalik Serbest Oksijen Türleri	Nonradikalik Serbest Oksijen Türleri
Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikal ($OH^{\cdot}$)	Singlet Oksijen (1O_2)
Peroksil radikal ($ROO^{\cdot}$)	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Alkoksil radikal ($RO^{\cdot}$)	Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)
Organik radikaller (R.)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Organik peroksit radikali ($RCOO^{\cdot}$)	Hipohalöz asit (HOX)
Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)	Azot dioksit (NO_2)
Semikinon radikali ($HQ^{\cdot}$)	Ozon (O_3)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	N- halojenli aminler ($R-NH-X$)

2.4.2. Serbest oksijen radikallerinin etkileri

Normal şartlarda bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için serbest radikaller gereklidir. Yalnız serbest radikallerin gereğinden fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümüne neden olur.

Serbest radikaller, hücre içinde antioksidan kapasiteyi aşan konsantrasyonlarda bulundukları zaman; başta lipitler olmak üzere, protein, DNA, karbonhidratlar ve enzimler gibi birçok molekülle reaksiyona girdikleri saptanmıştır (Bonney *et al.* 2002). Hücre serbest radikallerin etkilediği moleküller Çizelge 2.3' de gösterilmiştir. Sonuç olarak enzimlerin normal fonksiyonlarını, aerobik solunumu, kapiller permeabiliteyi bozup, hücrenin potasyum kaybını artırır. Hücre içindeki birçok litik enzimi aktif hale getirip, savunma sistemlerini inaktive ederler. Trombosit agregasyonunu artırıp, dokularda fagosit toplanmasını sağlarlar (Iuliano *et al.* 1997). Son zamanlarda literatürde yer alan çalışmalar, serbest oksijen radikallerinin ve lipit peroksidasyonunun artmasının birçok hastalığın temelinde rol oynadığını gösterir. Serbest radikallerin damar endotel hücrelerinde hasar yaparak vasküler hastalıklara neden olduğu da saptanmıştır (Halliwell 1993).

Miyokard enfarktüsü, bazı nörolojik hastalıklar, astım, romatoid artrit, kanser ve obezite gibi birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (Bal and Kasprzak 2002). Serbest radikallerin ayrıca yaşlanmada da rolü olduğu belirtilmektedir (Burçak ve Andican 2004).

Çizelge 2.3. Hücre serbest radikallerin etkilediği moleküller (Akpoyraz ve Durak 1995).

Etkilenen Bileşikler	Sonuçlar
Doymamış amino asitler ve kükürt içeren amino asitler	Protein denatürasyonu Çapraz bağlanma Enzim inhibitasyonu Organ ve hücre geçirgenliğinde değişim

Çizelge 2.3. (devamı)

Nükleik asit bazları	Hücre gelişiminde değişmeler Mutasyon
Karbonhidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
Doymamış lipitler	Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma Askorbat ve porfirin oksidasyonu
Antioksidanlar	α -tokoferol ve β -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
Proteinler	Denatürasyon Peptit zincirlerinde kırılmalar
DNA	Baz modifikasyonları Zincirde kırılmalar
Hyaluronik asit	Sinovial sıvının vizkozitesinde değişim

2.4.3. Karaciğerde serbest radikal hasarı

SOR olarak isimlendirilen süperoksit, serbest hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen türleri karaciğer gibi yoğun fizyolojik ve metabolik olayların seyrettiği bir ortamda sürekli olarak üretilmekte ve detoksifiye edilmektedir. Oksidatif stres, SOR ve çeşitli sitokinlerle hepatosit, kupffer ve karaciğer yıldız hücrelerinin etkileşimi neticesinde oluşan proinflamatuvar olaylar hepatositlerin apoptoza gitmesine, böylece fibrogenezin oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Cassiman *et al.* 2001; De Minicis *et al.* 2006; Russo *et al.* 2006). Karaciğerde bulunan hücreler; hepatositler, endotel hücreleri, kupffer hücreleri, stellat hücreler ve safra kanalı epitel hücrelerinin hepsi oksidatif stresle ilişkili hücrelerdir. Oksidatif hasarda, karaciğer stellat hücreleri ve fibroblastlar uyarılarak bunların ekstrasellüler matriks ve kollajen sentezini gerçekleştirmeleri sağlanır (Parola *et al.* 1993; Lee *et al.* 1995; Poli 2000). Ayrıca hasarlarla uyarılmış olan Kupffer hücreleri; proinflamatuvar sitokinler, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve interlekin-1 β (IL-1 β) üretimini uyarırlar. Bundan

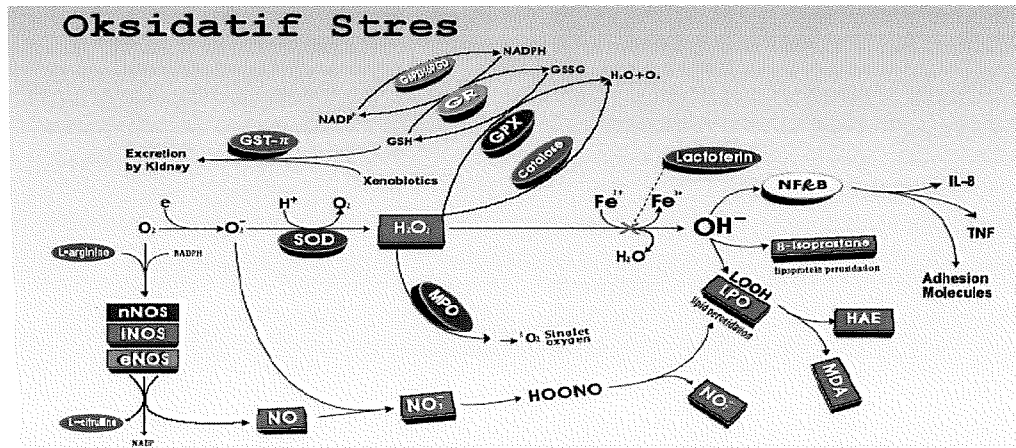
dolayı, oksidatif stresin inhibe edilmesi faydalı sonuçlar sağlayacaktır (Wang *et al.* 2005).

Lipid peroksidasyonu oksidatif stresin önemli bir sonucudur. Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlar da çeşitli değişiklikleri beraberinde getirir. Hücresel organellere olduğu gibi, bütün organizma içinde yüksek derecede yıkıcı bir süreçtir. Biyokimyasal fonksiyon kaybı ve/veya yapısal hasara yol açar (Manda and Bhatia 2003a). Sonuç olarak hücre membranı ve hücre içi organellerin membran yapıları tamamen bozulur. Yapısal hasar yayılır ve hücrelerin ölümüne yol açar. Kronik süreçte fibrozis ve siroz meydana gelir (Kuzu *et al.* 2007). Karaciğer, yağ asitlerinin β -oksidasyonunu gerçekleştiren mitokondriye zengin bir organdır. Yağ asitlerinin oksidasyonu iç membrana yakın bir bölgede yer almaktadır. Organizmada enerji açığa çıkmasını sağlayan prosesler, metabolik süreçlerde ortaya çıkan serbest elektronların bir sistemden diğerine aktarılmasının sonucudur. Bu elektronlar son olarak sitokrom sisteminde oksijene aktarılmakta ve H_2O oluşturulmaktadır. Her iki H_2O molekülü oluşumu için oksijene 4 elektron aktarılmaktadır. Elektron sayısını tamamlayarak nötral hale gelmemiş ve tek elektron ihtiva eden oksijen molekülü olan singlet oksijen, serbestleşmesi tehlikeli bir yapıdır ve sitokrom-c sistemi içinde elektronları tamamlanıncaya kadar sıkı bir şekilde tutulmaktadır (Gochee *et al.* 2003) Serbestleştiği takdirde bu radikal bulabildiği her sistemden elektron kopartmaya çalışmakta ve özellikle mitokondri ve hücre membranına lipid peroksidasyonu yoluyla hasar vermektedir. Ancak, fizyolojik koşullarda da az miktarda serbestleşen oksijen radikallerini fizyolojik antioksidan savunma, ciddi bir hasar oluşmadan nötralize edebilmektedir (Aboutwerat *et al.* 2003).

2.5. Oksidatif Stres

Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan SOR ile antioksidan savunma sistemi bir denge halindedir. Yoğun SOR üretimi ya da antioksidan defansın azalması, biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açarak oksidatif strese neden olur (Antmen 2005; Demir 2008).

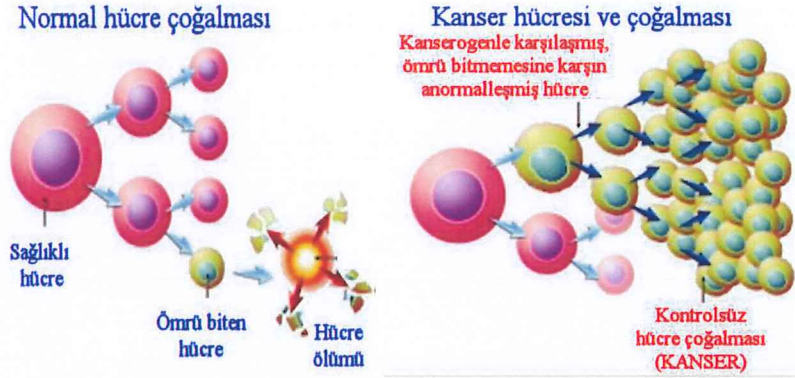
Temel olarak oksidatif stres, biyolojik sistemde prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanır. Hücreler hafif oksidatif stresi tek başlarına tolere edebilseler de genellikle antioksidan enzim sistemlerini aktive ederler. Ancak, hücre içi savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda, oksidatif stresin tanımında belirtildiği üzere, serbest oksijen bileşikleri ile antioksidanlar arasındaki denge bozulur, dolayısıyla oksidan hasara duyarlı DNA, protein, karbonhidratlar ve lipitler gibi hücresel makromoleküller zarar görür (Romero *et al.* 1998; Halliwell and Whiteman 2004; Berk vd 2008; Zadak *et al.* 2009).



Şekil 2.6. Oksidatif stres mekanizması (Altan vd 2006).

2.6. Kanser ve kemoterapi

Kanser ifadesi Latince kökenli bir kelime olup yengeç anlamına gelen “Crab” kelimesinden türemiştir. Bu tanımlamayı hastalığın başladığı bölgeden diğer alanlara doğru yayılışını inceleyen Yunanlı hekim Hipokrat yapmıştır.



Şekil 2.7. Normal hücre ile kanser hücresinin çoğalması (www.toraks.com.tr).

Kanser vücuttaki bir hücre grubunun farklı bir kimliğe bürünerek, aşırı ve kontrolsüz bir şekilde artması ile oluşmaktadır. Normalde hücrelerin büyümesi ve çoğalması bir düzen içerisinde gerçekleşir. Bunun sonucunda vücuttaki doku ve organlar görevlerini tam ve doğru bir şekilde gerçekleştirmektedir. Yalnız bu hücrelerin anormal hızla büyümesi hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına sebep olacağından vücutta tümör diye adlandırılan kitle oluşumlarına yol açacaktır. Küçük bir tümörün oluşması için sayıları yüz binleri bulan kanserli hücrelerin bir araya gelmesi gerekeceğinden kanser erken aşamalarda tespit edilmesi oldukça zor olan bir hastalıktır.

Cerrahi uygulanamayan hastalar çeşitli kemoterapötik ajanlar ve lokal-bölgesel tedaviler ile cerrahiye uygun hale getirilmeye, bunun mümkün olmadığı durumlarda ise kür sağlanmaya çalışılmaktadır (Mahnken *et al.* 2013).

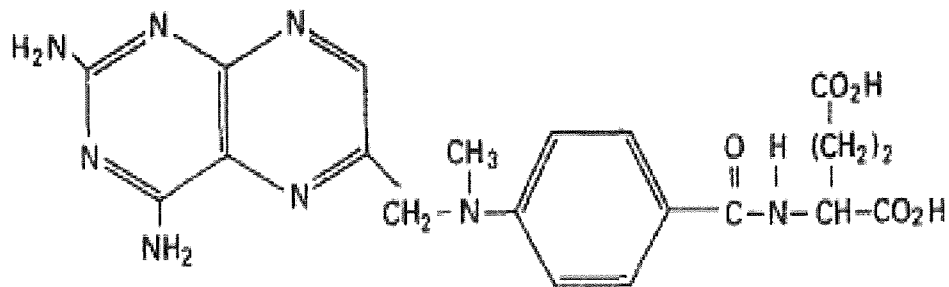
2.7. Metotreksat (MET)

MET lösemiler, çeşitli solid tümörler, psöriasis, romatoid artrit ve diğer bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde 40 yıldan daha uzun süredir yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda sarkoidoz, inflamatuvar barsak hastalıkları ve vaskülitlerde de kullanılmaktadır. MET, S fazındaki hücreleri etkileyen folat antagonisti antimetabolittir. Dihidrofolat anoloğu olan ilaç, hücre replikasyonunda anahtar enzim dihidrofolat redüktaz' a bağlanarak pürin ve primidin yapımı için gerekli tetrahidrofolat sentezini

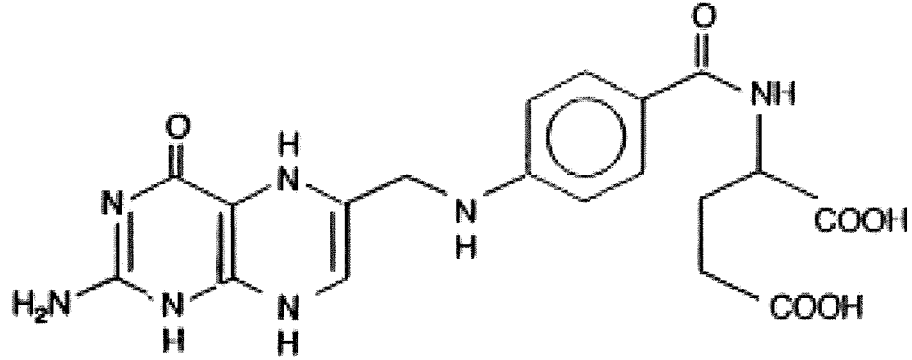
inhibe eder. Pürin ve pirimidin sentez inhibisyonu apoptozisle sonuçlanan DNA defektlerine yol açar (Uraz vd 2005; Chabner *et al.* 2007). MET' in aynı zamanda kaspaz aktivasyonuna bağlı mekanizma ile apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (Papaconstantinou *et al.* 2001).

2.7.1. Metotreksat' ın mekanizması

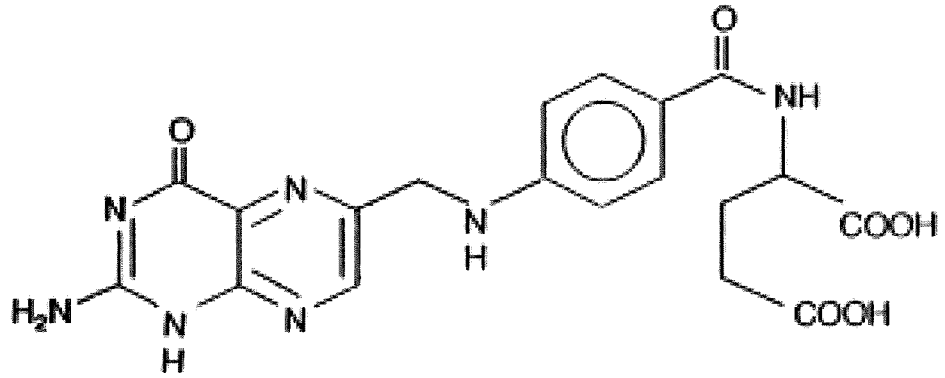
Folata bağlı enzimler tek karbon fragmanların transferi içeren reaksiyonlarda gereklidir. Bunlar arasında en önemlisi DNA sentezi için deoksiüridilat' ın metilasyonu ile timidilat elde edilmesidir. Bu işlem sırasında metilen tetrahidrofolat (MTHF) dihidrofolat' a (DHF) dönüşür. Dihidrofolat (pteroil glutamik asit) ise tekrar kullanılması için tetrahidrofolat' a (THF) dönüşmesi gereklidir. Bu dönüşüm için dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine ve NADPH' ya gereksinim vardır. MET' in (4-amino 4-deoksi N10 metil pteroil glutamik asit) moleküler yapısı DHF' a benzerdir (Şekil 13 ve 14). MET' in yapısında birden fazla metil grubu vardır ve DHF' deki OH grubu yerine NH₂ bulunur. MET düşük dozlarda oral olarak hemen hemen tamamen emilir. Başlangıç yarı ömrü (dağılımı) 1.5-3.5 saattir. Terminal yarı ömrü 8-15 saattir. MET ve metabolitleri büyük oranda böbrek yoluyla elimine olur ve hücrelere aktif taşıma ile girer. MET, folilpoliglutamil sentetaz ile 1-4 glutamat gruplarının eklenmesiyle poliglutamat forma dönüştürülen bir ilaçtır. Poliglutamat yapı muhtemelen tüm hücrelerde bulunur, poliglutamat formun ölçümleri eritrosit, karaciğer, fibroblastlar ve kemik iliği myeloid serisinde ölçümleri yapılmıştır. MET poliglutamatları hücre içinde tutulur ve DHFR enzimine bağlanarak DHF ile yer değiştirir (Van Ede *et al.* 1998; Rubino 2001).



Şekil 2.8. MET' in moleküler yapısı (Van Ede *et al.* 1998).



Şekil 2.9. Dihidrofolatın moleküler yapı (Rubino 2001).



Şekil 2.10. Folik asitin moleküler yapısı (Rubino 2001).

2.7.2. Metotreksat' ın yan etkileri

MET toksisitesinin mekanizmaları hâlâ tam olarak anlaşılamamakla birlikte yan etkileri oldukça yaygındır. Yapılan çalışmalar sonucunda bu etkiler birçok faktöre bağlanmıştır. Pürin, pirimidin, poliamin ve folat gibi metabolik yollar üzerindeki inhibitör etkisiyle doğrudan ilişkilendirilmiştir. MET' in karaciğer toksisitesi, metotreksat poliglutamatlarının birikmesiyle birlikte folat eksikliğinin de bulunmasına bağlanmıştır (Kremer, Galivan, Streckfuss, & Kamen, 1986). Yan etkilerin büyük oranda bu birikimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Jahovic *et al.* 2003; Miyazono and Horie

2004). MET değişik yollarla adenzin deaminazı (ADA) inhibe etmesi sonucu biriken adenzin metabolitleri de toksik etkilidir (Baggott *et al.* 1993; Van Ede *et al.* 1998).

MET protein, lipid ve myelinin şekillenmesi için önemli olan transmetilasyon reaksiyonlarını da etkiler. Beyin omurilik sıvısında metionin ve S- adenzilmetionin (SAM) oranında azalmaya, S- adenzilhomosistein (SAH) ve homosistein oranında artmaya neden olur. Artmış homosistein miktarı endotel hücre hasarı ve infarktlara neden olurken, SAM oranındaki azalma miyelinizasyon bozukluğuna yol açabilir. Azalmış SAM/SAH oranı santral sinir sisteminde hipometilasyon ve demiyelinizasyon anlamına gelir. Bu yüzden metilasyon reaksiyonlarının inhibisyonu toksisiteye neden olabilir (Linnebank *et al.* 2005).

Antikanser ilaçlarla yapılan son zamanlardaki toksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerinde durulmaktadır. Mitokondrial enzimlerden pirüvat dehidrogenaz, 2-okzogluterat dehidrogenaz ve nikotinamid adenindinkleotid (NAD) bağımlı enzimler ile sitozolik nikotinamid adenindinkleotid fosfat (NADP) bağımlı dehidrogenazın metotreksat tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. NADPH, glutatyon redüktaz tarafından hücredeki GSH oranını belirli bir seviyede tutmak için kullanılır. GSH ise hücreleri serbest radikallerin etkilerinden korur. Metotreksat NADPH' da azalmaya neden olarak hücrede GSH miktarını azaltır ve hücrelerin radikallere daha duyarlı hale gelmesine neden olur (Babiak *et al.* 1998).

Yapılan birçok çalışmada MET verilmesi sonucu SOR' un oluştuğu ve bunun da hücre membranındaki lipid komponentlerini etkileyerek lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve hücreye zarar verdiği anlaşılmıştır. MET verilmesini takiben hücrede lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA ve inflamatuvar yanıtın göstergesi olan miyeloperoksidaz (MPO) seviyelerinde artış, hücredeki GSH seviyesinde azalmaya neden olarak, hücrenin SOR' a daha duyarlı hale gelmesine neden olur (Miketova *et al.* 2005).

Bulantı ve kusma MET' in en sık görülen gastrointestinal yan etkilerindendir. MET kemik iliği supresyonu ve gastrointestinal mukozada hasarlara neden olabilmektedir. MET' e bağlı hematolojik yan etkilerin oluşumunda DHFR' nin inhibisyonu sonucu DNA sentezindeki bozulma ve hızlı hücre değişimine sahip kemik iliğinin baskılanması sorumlu tutulmaktadır. Karaciğerde fibrozis, kronik hepatotoksisite ve siroza neden olabilir (Kane *et al.* 2004). MET' in özellikle yüksek doz veya uzun süre kullanımı ise böbrek hasarı, pulmoner infiltrasyon ve pulmoner fibrozise yol açmaktadır (Katzung 2004).

2.7.3. Metotreksat ve karaciğer toksisitesi

MET kullanımındaki temel sorun hepatotoksisitedir. Romatoid artriti olan ve düşük doz MET kullanan olguların yaklaşık % 3' ünde ciddi karaciğer fibrozisi gelişmektedir (Beyeler *et al.* 1997). Psöryazisi olan olgularda MET' e bağlı karaciğer fibrozisi görülme insidansı % 8-23 arasındadır (Boffa *et al.* 1995; Malatjalian *et al.* 1996). MET' in karaciğer toksisitesine bağlı histolojik anormallikler; yağlı değişiklikler, fokal hücre nekrozu, portal traktüste inflamasyon, nükleer pleomorfizm, fibrozis ve özellikle perisinüzoidal aralıkta kollajen akümüasyonu olarak özetlenebilir (Richard *et al.* 2000). MET' e bağlı karaciğer toksisitesinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. MET' e maruz bırakılan ratlarda hepatosit nekrozu, hücre ölümü ve Kupffer hücre aktivasyonu geliştiği saptanmıştır (Hall *et al.* 1991). MET' in uzun süreli kullanımı ilacın poliglutamat formlarının karaciğerde birikimine ve sonuç olarak hepatosit nekrozuna yol açar. Hepatosit nekrozunun makrofaj stümulasyonu, hepatik stellate hücre aktivasyonu ve ekstraselüler matriks ekskresyonundaki artışa neden olduğu saptanmıştır (Friedman 2004). Hepatik stellate hücre aktivasyonu ve myofibroblastlara farklılaşması fibrozisle kuvvetli korelasyon göstermektedir (Levy *et al.* 2002). MET nedenli NADP düzeylerindeki azalma GSH seviyelerinde azalmaya neden olur. GSH seviyelerindeki azalma hepatositleri süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hipoklorhidrid radikalleri gibi SOR' a karşı daha hassas ve korumasız bırakır (Lucas and Solano 1992; Videla *et al.* 1993; Borg *et al.* 1996; Van Dyke *et al.* 2003; Cody *et al.* 2005).

MET' e bağlı toksik karaciğer hasarı uzun yıllar boyunca klinik olarak sessiz olabilir. Biyokimyasal bozukluk gelişmeyebilir. MET' e bağlı karaciğer toksisitesini göstermenin en iyi yolu karaciğer biyopsisidir. Uzun dönem MET kullanan ya da kümülatif dozu 1.5-2.5 gr' a ulaşan olgularda karaciğer biyopsisi ve histopatolojik değerlendirme önerilmektedir (Gawkrödger 1997; Roenigk *et al.* 1998).

2.7.4. Metotreksat toksisitesi ve oksidatif stres

Kemik iliği supresyonu (baskılanması); MET' in başlıca yüksek doz toksisitesidir. Özellikle kötü huylu olmayan tümörlerde, hastalarda myelosupresyon oluşması tedavinin ertelenmesine neden olur. Nötropeni ilaç dozuyla ilintilidir. Nötrofil sayısı MET alımından 4-7 gün sonra en düşük düzeyine ulaşır ve ortalama 14' üncü günde normal düzeyine tekrar döner. Trombositopeni, nötropeni ile paraleldir. Ayrıca anemi kemik iliği baskılanmasına ikincil olarak görülür (Jolivet *et al.* 1983).

Sindirim sistemi hasarı; Mukozit doz kısıtlayıcı yan etkilerinden biridir. MET tedavisinden sonraki 3-7' nci günler arasında oluşur, nötropeni ve trombositopeniden önce gerçekleşir. Bulantı ve kusma doza bağlı oluşur. İntestinal kriptlerde apoptoz ve villöz atrofi oluşur. Goblet hücrelerindeki hasara bağlı mün sekresyonunda ve bağırsak koruma özelliği olan proteinlerde azalma gerçekleşir (Logan *et al.* 2007).

Standart dozlarda genellikle mide bulantısı ve kusma görülmez. Oluşan diyare bazen tedaviyi kesmeye sebep olacak kadar şiddetli olabilir. MET koliti ya da peptik ülseri olan hastalarda dikkatli kullanılmalıdır (Jolivet *et al.* 1983).

MET' in yaygın yan etkileri kemik iliği supresyonu ve cilt ile gastrointestinal mukozada (mukozitis) meydana gelen hasardır. Normal hücrelerdeki toksik etkileri Lökoverin (folinik asid) verilmesiyle azaltılabilir (Lökoverin Kurtarması). MET' in uzun süre kullanımları ise hepatotoksiste, nefrotoksiste, pulmoner infiltrasyona ve fibrozise yol açar (Bertram 2004).

Üriner sistem hasarı; Akut böbrek yetmezliği, azotemi ve idrar retansiyonuna yol açar. MET ve metabolitlerinin intratubuler çökmesine bağlı olarak renal toksisite gelişir. MET' in kendisi tübüller üzerine direkt toksik etki gösterir. Yüksek dozlarda kanamayla birlikte renal toksisite, nadiren renal tübüler nekroz ve proteinüri gözlelenebilir (Kovacs *et al.* 1993).

2.8. Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir (Ames *et al.* 1993; Frei 1994; Yanbeyi 1999).

Antioksidanlar, sellüler lokalizasyonlarına göre intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere sınıflandırılabilirler. Fonksiyonlarına göre de, radikal oluşumunu önleyen (metal şelatörler, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve oluşan radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (E vitamini, ubikinon, retinoik asit, β -karoten, GSH, ürat) antioksidanlar olarak iki kategoride incelenirler. Ayrıca Çizelge 2.4' de görüldüğü gibi enzim ve enzim olmayan (nonenzimatik) antioksidanlar şeklinde de sınıflandırma yapılmaktadır (Yanbeyi 1999).

Çizelge 2.4. Antioksidanların sınıflandırılması (Yanbeyi 1999).

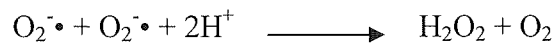
Enzimatik Antioksidanlar	Nonenzimatik Antioksidanlar	
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Glutasyon (GSH)	Melatonin
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Flavonoidler	Seruloplazmin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Askorbat (Vit. C)	Transferin
Süperoksit dismutaz (SOD)	β -Karoten (Vit. A)	Ferritin
Peroksidaz (PLGPx)	α -Tokoferol (Vit. E)	Laktoferrin
Katalaz (CAT)	Ürat	Albumin
Fosfalipit hidroperoksit glutasyon	Biluribin	Lipoik asid

Antioksidanlar, yiyecek katkıları olarak, hücresel komponentler veya plazma bileşenleri olarak çok önemli rol oynamaktadırlar. Çok sayıda yiyecek katkıları günümüzde koruyucular, antioksidanlar, renk vericiler, tatlandırıcılar, koyulaştırıcı ajanlar, besleyici olmayan şekerli tatlandırıcılar olarak kullanılmaktadır. Yiyecek katkıları olarak kullanılanların bazılarının yasaklandığı ve bunların mutajenik, karsinojenik ve toksik etkili olduğu belirtilmiştir (Fujise 1982).

Antioksidanların oksidatif hasarlara karşı dokuları veya hücreleri koruyucu özellikleri göz önüne alındığında; yaşlanmaya, doku hasarlarına ve toksik ajanlar ile zehirlenmeye karşı koruyucu ajanlar olarak gösterilmektedir (Ito and Hirose 1989).

1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen bir antioksidan enzimdir.



SOD enziminin bakır-çinko, mangan ve demir içeren üç tip izoenzimi bulunur. Bakır ve çinko içeren Cu/Zn-SOD sitoplazmada, mangan içeren Mn-SOD mitokondride bulunarak aktivite gösterir. SOD' un fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosit edilmiş bakterilerin intrasellüler olarak öldürülmesinde de rol oynar. Bu reaksiyon SOD enzimi tarafından katalizlendiğinde kendiliğinden oluşmasına kıyasla yaklaşık 4000 kat hızlı olur. Dolayısıyla antioksidan savunmada oldukça önemli bir enzimdir. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazladır ancak ekstrasellüler sıvılarda aktivitesi oldukça düşüktür (McCord 2000).

2. Glutasyon (GSH)

GSH, birçok hücrede bulunan tripeptid yapısındaki indirgenmiş glutatyondur. GSH L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki basamakta sentezlenir. Oluşan her peptid için bir molekül ATP harcanır. GSH, hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür. Eritrosit hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500 civarındadır. GSH aktif bölgesinde selenyum içeren bir enzim olan glutasyon peroksidaz enzimi katalizörlüğünde, H_2O_2 ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidan etki gösterir ve H_2O_2 ' yi alyuvarlardan uzaklaştırır (Muslu *et al.*, 2007). GSH hidrojen peroksiti veya organik oksitleri kimyasal olarak detoksifiye edebilir. Belirli oksidaz tepkimeleriyle oluşan hidrojen peroksiti uzaklaştıran enzim glutasyon peroksidaza substratlık yaparak proteinlerin sülfhidril gruplarını da korur. GSH yokluğunda hidrojen peroksit birikir. GSSG, glutasyon redüktaz tarafından sürekli GSH' ya indirgenerek GSH miktarı düzenlenir (Mercan 2004).

3. Malondialdehit (MDA)

Biyolojik sistemlerde, oksidanlarca lipid hidroperoksidasyonu hücre zarı yüzeyindeki okside yağ asitleri ve poliansatüre lipidlerin yıkılması sonucunda aldehidler oluşur. MDA da [tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS)] üç ya da daha fazla çift

bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda meydana gelen bir çeşit aldehittir. Bu nedenle MDA miktarı ölçümü dokulardaki lipid peroksidasyonunun derecesini yansıtmaktadır (Young and Woodside 2001).

Lipid peroksidasyonu yıkım ürünü olan MDA, moleküler oksijen azalması yaparak süperoksit anyonu ve H_2O_2 oluşumuna neden olur. Bu ürünler de hücre ve dokularda hasar etkisi yaparlar. Biyolojik ortamlarda MDA hem serbest hem de protein ve nükleik asit gibi makromoleküllerin SH ve NH_2 gruplarına bağlı olarak bulunur. Bundan dolayı, genellikle total (serbest ve bağlı) MDA değerlendirilir. DNA ve proteinlerle etkileşiminin potansiyel olarak mutajenik ve karsinojenik olduğu gösterilmiştir (Young and Woodside 2001).

2.9. Trans-3 Hidroksisinamik Asit

Fenolik asitler, ya benzoik asit ya da sinamik asitlerin hidroksile olmuş türevleridir. Bitki alemine geniş ölçüde yayılmış maddelerdir ve hem serbest halde hem de esterleri veya glikozidleri ile kombine halde bulunurlar (Spacil *et al.* 2008). Bazı kırmızı meyveler, karaturp ve soğan hariç, yenilebilir bitkilerde hidroksi benzoik asit içeriği çok düşüktür (Shahidi and Nacz 1995). Ayrıca, hidroksibenzoik asitler hidrolize olabilen taninler gibi (mangoda gallotannin, çilek, ahududu, böğürtlen gibi kırmızı meyvelerde ellagitannin) kompleks yapıların bileşenleridir (Clifford and Scalbert 2000).

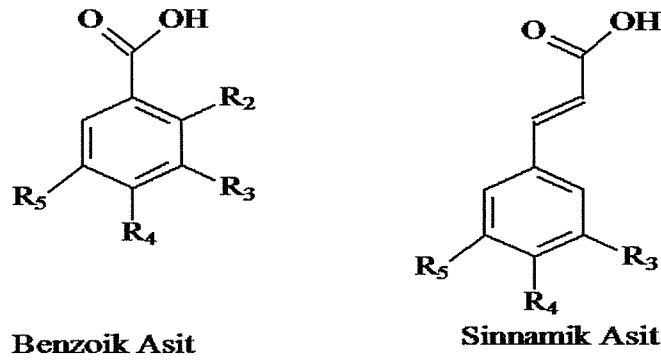
Lifli materyaller yüksek oranda flavon ve fenolik asit içermektedirler. Kumarik asit ve ferulik asit gibi fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri düşüktür. Kafeik asit ve klorojenik asit ise daha fazla hidroksil grubu taşıyan fenolik bileşiklerin ise antioksidan aktiviteleri daha yüksektir. Bunun dışında gallik asit ve esterleri bilinen en güçlü antioksidanlardandır (Hudson 1990). Çay önemli bir gallik asit kaynağıdır (Tomas-Barberan and Clifford 2000).

En sık tüketilen sebzelerin içerdiği antioksidanlar arasında askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler, flavanoller ve fenolik asitler gibi fenolik bileşikler sayılabilmektedir.

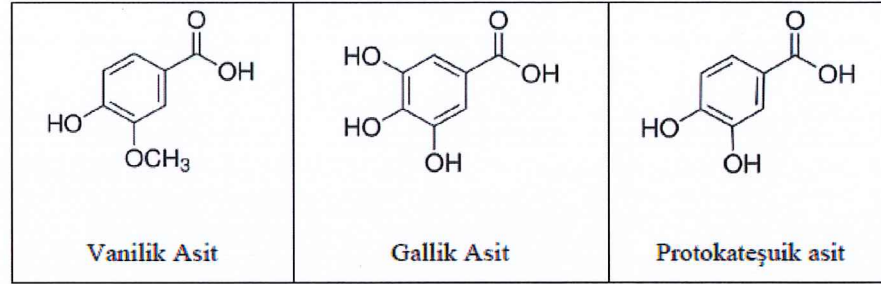
Ancak meyvelerle karşılaştırıldığında sebzelerin genellikle daha düşük oranda antioksidan bileşik içerdikleri bilinmektedir (Heinonen 2002).

Ferulik asit, başlıca besin kaynağımızı oluşturan tahıllarda en fazla bulunan fenolik asittir (Sosulski *et al.* 1982; Lempereur *et al.* 1997). Ferulik asit bilhassa tahılın dış kısmında bulunur. Buğday tanesinin aleuron tabakası ve perikarbi toplam ferulik asidin % 98' ini içerir (Lempereur *et al.* 1997).

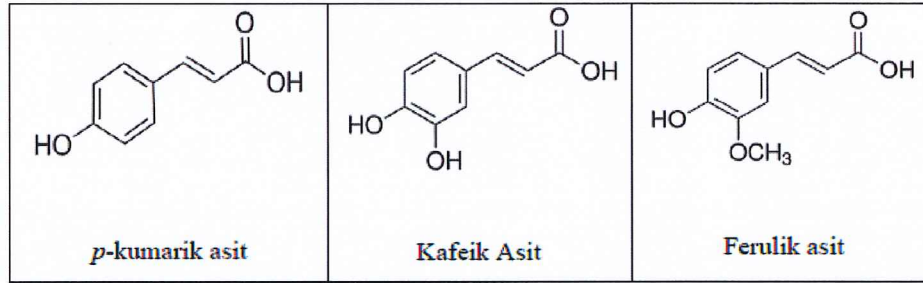
Fenolik asitler genellikle serbest halde bulunmamaktadır. Serbest halde bulunan fenolik asitler, ince ve kalın bağırsaktan absorbe edilmektedir. Ancak alkoller, şekerler veya organik asitler ile esterleşen, aktif hidroksil grubu içeren fenolik asitler ise ince bağırsakta esteraz enzimi bulunmamasından dolayı ince bağırsak tarafından absorbe edilememektedir. Fakat kalın bağırsakta bulunan bazı bakteriler tarafından metabolize edilerek absorbe olmaktadır (Acar ve Gökmen 1998; Vallejo *et al.* 2004).



Şekil 2.11. Fenolik Asitlerin Temel Kimyasal Yapısı (Spacil *et al.* 2008).



Şekil 2.12. Bazı benzoik asitlerin kimyasal yapıları (Spacil *et al.* 2008).



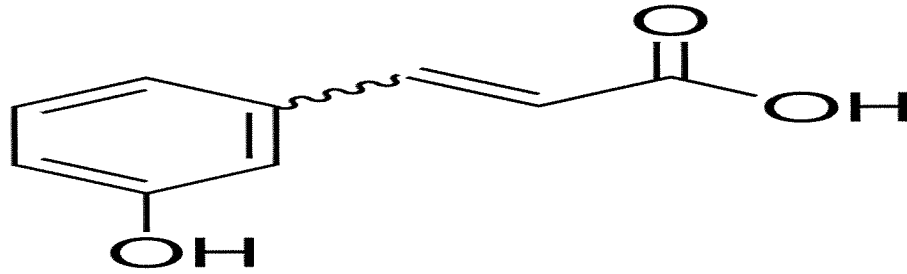
Şekil 2.13. Bazı sinnamik asitlerin kimyasal yapıları (Spacil *et al.* 2008).

Hidroksisinamik asitler, hidroksibenzoik asitlerden daha yaygındır. Bu asitler dondurma, sterilizasyon veya fermantasyona uğrayarak işlem görmüş gıdalar haricinde, nadiren serbest formda bulunurlar (Macheix *et al.* 1990).

Hidroksisinamik asitler, fenil-propanoid türevleridir ve genellikle bitkisel gıdalarda bulunur (AbuAmsa *et al.* 1996). Hidroksisinamik asitler, bitkilerin fenolik metabolizmalarında merkezi rol oynayan ve fenil alaninin biyosentetik türevi olan fenolik bileşenlerdir. Bu bileşikler aynı zamanda flavonoidlerin öncüsüdür ve bitkilerde hücre duvarının yapısına katılırlar (Heller and Forkmann 1993). Genellikle bu tür fenolik asitler bitkilerde esterleri halinde veya şekerlerle, organik asitlerle veya yağlarla birleşmiş halde bulunurlar (Wallace and Fry 1994). Hidroksisinamik asitler trans konumunda daha kararlıdır. Ancak UV ışınlarına maruz bırakıldıklarında trans izomerinden cis izomerine dönüşürler (Spanos and Wrolstad 1992). Bu bileşenler

meyve, sebze, çiçek, fındık, tohum ve şarap, çay, kahve ve zeytinyağı gibi bitki-türevli ürünlerde bulunurlar (Herrmann 1989;Cadenas and Packer 2002). Kafeik asit, p-kumarik asit ve kafeik asidin kuinik asit esteri olan klorojenik asit, elma, armut ve üzüm gibi meyvelerde ve bitkilerde en çok bulunan Hidroksisinamik asitlerdir (Cadenas and Packer 2002).

Çoğu meyvenin toplam hidroksinamik asit içeriğinin % 75-100 aralığında olduğu belirtilir (Manach *et al.* 2004).



Şekil 2.14. trans-3 Hidroksisinamik asit' in kimyasal yapısı

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=trans+3+hydroxycinnamic+asit&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=TR&focus=product>).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı ve Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma ile ilgili olarak Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu' nun onayı alındı (04/11/2016 Tarihli Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Toplantı Sayı No:7-Karar No:148).

3.1. Materyal

3.1.1. Deney hayvanları

Bu projede ağırlıkları 200-220 gram arasında değişen, Wistar Albino cinsi 24 adet erkek sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından temin edildi. Sıçanlar çalışma süresince standart ısı ($25\pm1^{\circ}\text{C}$) ve ışık (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık), nem (% 55 ± 5) ortamında, yeteri kadar su ve yem (Standart Sıçan Yemi) verilerek 1 hafta süreyle beslendiler. Sıçanlara deneyden 24 saat önce su serbest olmak üzere aç bırakıldı.

3.1.2. Kullanılan ilaçlar

Metotreksat (Emthexate-S 50 mg 1 Flakon-MED İLAC), Sevofluran 100 ml Koçak Farma İlaç A.Ş. Türkiye, Pentotal (Thiopental sodium) Ulugay A.Ş. Türkiye ve trans-3 hidroksisinnamik asit ise Sigma-Aldrich, USA temin edildi.

3.2. Metot

3.2.1. Deney planı

Çalışmamızda, 6 adet sıçan içeren 4 grup oluşturuldu. Gruplar; Kontrol, Metotreksat (1 gün-tek doz), trans-3 Hidroksisinnamik asit (5 gün-5 ardışık doz) ve Metotreksat+trans-3 Hidroksisinnamik asit şeklinde oluşturuldu.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan gruplar ve gruplara uygulanan tedaviler.

Deney Gruplarımız	1.Gün	2. Gün	3. Gün	4.Gün	5.Gün
Kontrol Grubu	-	-	-	-	Sakrifikasyon yapıldı.
Metotreksat (MET) Grubu	20 mg/kg i.p MET verildi.	-	-	-	Sakrifikasyon yapıldı.
trans-3 Hidroksisinnamik asit (HS) Grubu	100 mg/kg i.p HS verildi	100 mg/kg i.p HS verildi	100 mg/kg i.p HS verildi	100 mg/kg i.p HS verildi	100 mg/kg i.p HS verildi daha sonra Sakrifikasyon yapıldı.
Metotreksat+trans-3 Hidroksisinnamik asit (MET+HS) Grubu	20 mg/kg i.p MET verildi. Daha sonrasında 100 mg/kg i.p HS verildi.	100 mg/kg i.p HS verildi	100 mg/kg i.p HS verildi	100 mg/kg i.p HS verildi	100 mg/kg i.p HS verildi daha sonra Sakrifikasyon yapıldı.

Kontrol Grubu: Kontrol grubu olan bu hayvanlara hiçbir madde verilmedi.

Metotreksat (MET) Grubu: Bu gruptaki hayvanlara uygulanan sıvı formdaki MET, çalışmanın ilk günü 20 mg/kg dozda i. p. olarak tek doz uygulandı.

trans-3 Hidroksisinnamik Asit (HS) Grubu: Bu gruptaki hayvanlar, sadece 5 gün boyunca 100 mg/kg dozda ve i.p. olarak trans-3 hidroksisinnamik asit verildi. Bunun için 100 mg/kg trans-3 hidroksisinnamik asit, % 20 oranında etanol içinde çözündürülerek bir solüsyon hazırlandı ve bu solüsyon, 100 mg/kg dozunda 1 cc kadar intraperitoneal yolla uygulandı.

Metotreksat+trans-3 Hidroksisinnamik Asit (MET+HS) Grubu: Bu gruptaki hayvanlara, ilk gün 20 mg/kg tek doz MET i.p yoluyla verildi, daha sonra 100 mg/kg trans-3 Hidroksisinnamik asit, 5 gün boyunca her gün taze olarak hazırlanıp sıçanlara uygulandı.

Deney ilk ve son günü sıçanların ağırlıkları tartıldı. İlaç uygulamaları sıçanların ağırlıklarına göre yapıldı. Tüm grupların enjeksiyonları i.p. şekilde aynı gün başlandı ve 5 gün boyunca yapılarak yine aynı gün sonlandırıldı. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra doku biyokimyasal ölçümler yapılmak üzere karaciğer doku örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri daha sonra çalışılncaya kadar -80 °C' de saklandı.

3.2.2. Doku örneklerinin alınması ve hazırlanması

Sıçanlar, son enjeksiyondan 12 saat sonra, yani deneyin beşinci günü sonunda, deneyler için gerekli olan doku örnekleri inhalasyon yoluyla sevofluran anestezisi altında alınıp yüksek doz i.p. olarak uygulanan Thiopental sodyum 400 mg/kg doz uygulanarak sakrifiye edildi.

Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra doku biyokimyası için karaciğer doku örnekleri alındı. Alınan bu doku örnekleri MDA, SOD ve GSH tayini için çalışılacakları güne kadar enzim aktivitelerini korumak üzere -80 °C de derin dondurucuya muhafaza edildi. MDA ve antioksidan enzim ölçümlerinin yapılacağı gün dokular sıvı azotta muamele edilerek öğütölüp vidalı ependorf tüplere 100 mg tartılarak konuldu. Daha sonra PBS tampon eklenerek 5000 devirde 15 dk santrifüj edilerek homojenize edildi. Bu

dokulardan homojenatlar hazırlanıp, bu homojenatlardan elde edilen süpernatantlar doku biyokimyası çalışması için ayrıldı.

3.3. Yöntem

3.3.1. Dokularının biyokimyasal analizi

Ayrılan süpernatantlar SOD enzim aktivitesi, GSH ve MDA miktarları ölçümü için kullanıldı. Her bir parametre için homojenize edilmiş dokuların süpernatantların da protein seviyesi ölçüldü ve ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterildi. SOD enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu yöntemin Elisa' ya modifiye edilerek 96' lık well plate' te her bir sıçan dokusu için, lipid peroksidasyon ürünü MDA seviyeleri Ohkawa ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemin yine Elisa' ya modifiye edilerek 96' lık well plate' te her bir sıçan dokusu için ve GSH seviyesi ise Sedlak ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu yöntemin Elisa' ya modifiye edilerek 96' lık well plate' te her bir sıçan dokusu için ikişer tekrarlamalı olarak ölçüldü

3.3.2. Doku numunelerinin hazırlanması

Her bir sıçandan alınan doku teker teker sıvı azot ile bilyeli öğütücüye konularak (Qiagen Tissuelyser II) (Şekil 3.21) toz haline getirildi. Dokular toz haline geldikten sonra her biri yaklaşık 100 mg tartılarak vidalı ependorf tüplere aktarıldı ve içerisine 1 ml fosfat tamponu (PBS) eklendi ve iyice karıştırıldı. Elde edilen karışım yine Qiagen Tissue Lyser II homojenizatörünün 48' li adaptörü ile homojenize edildi (30 hz 3 dk). Daha sonra literatürlere uygun olarak her ölçüm için soğutmalı santrifüjde belirtilen hızlarda +4 °C' de santrifüj edildi. Ölçümler de süpernatant kısmı kullanıldı.



Şekil 3.1. Deneyde kullanılan doku homojenizatörü ve bilyeli öğütücü.

3.3.3. Protein tayini

Deney Prensipli: Lowry metoduna göre ticari protein standartları kullanılarak protein konsantrasyonları tespit edildi. (Sigma Aldrich, Total protein kit-TP0300-1KT-USA).

Kullanılan Reaktifler

- 1) **Lowry Reagent Solüsyonun Hazırlanması:** İyice karıştırılacak şekilde bir şişeye Lowry Reagent içine 40 ml saf su eklenerek solüsyon hazır hale getirilir.
- 2) **Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent (Working) Solüsyonun Hazırlanması:** 4.75 ml saf su içerisine 450 µl Folin&Ciocalteu' s Phenol Reagent eklenerek hazırlanır.
- 3) **Protein Standart Solüsyonun Hazırlanması:** 20 ml saf su içerisine 32 mg BSA ile çözünür hale getirerek hazırlanır.

Deney Prosedürü

1. Tüm kuyulara 95 µl saf su konur (Standartlar hariç).
2. Her bir numune 5 µl olacak şekilde kuyulara (well) eklenir. Standartlar kuyulara 100 µl eklenir.
3. Plate' i shaker ile 10 dakika boyunca sallayarak inkübe edilir.
4. Standart ve kör kuyularda dahil olmak üzere her bir kuyuya 50 µl Lowry Reagent solüsyonu karıştırılır.
5. Oda sıcaklığında (25 ± 1 °C) 20 dakika inkübe edilir.
6. Tüm kuyulara 50 µl Working solüsyonu eklenir.
7. 30 dk oda sıcaklığında (25 ± 1 °C) inkübe edilir.
8. Elisa' da 750 nm' de (standart değer) ölçüm yapılır.

3.3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini

Deney Prensibi: Yöntem olarak Sun ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu metot esas alınarak gerçekleştirilmiştir (Sun *et al.* 1988). Bu metodun prensibi süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantin oksidaz sistemi nitroblue tetrazolium' u (NBT) indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Yöntemin esası, ksantin oksidasyonu ile ksantin oksidaz sırasında açığa çıkan $O_2^{\cdot-}$ ' nin NBT' yi redükleyerek, farmazon meydana getirme esasına dayanmaktadır. SOD aktivitesi yükseldikçe, NBT ile reaksiyona giren $O_2^{\cdot-}$ miktarı azalacak ve sonuç olarak formazon oluşumu da azalacaktır.

Kullanılan Reaktifler

- 1) PBS homojenat tamponu olarak kullanıldı.
- 2) Karışım içerisinde 0.3 mM Xanthine, 0.6 mM EDTA, 150 µM NTB, 0.4 M Na_2CO_3 ve 1.2 g/L BSA maddeleri bulunur.
- 3) Xanthine Oxidase.
- 4) 50 mM pH: 0.8 Tris-HCl.
- 5) SOD standart.

Deneyin Yapılışı

Doku homojenizasyonu;

1. Dokuların homojenize edilmesi sıvı azot altında oluşturuldu.
2. Dokuları kandan uzaklaştırmak için PBS ile yıkandı.
3. Her bir dokuya 1 ml PBS olacak şekilde Qiagen Tissue Lyser II homojenizatörü ile homojenize edildi (30 hz 3 dk).
4. +4 °C' de 1500 g' de 15 dakika süresince santrifüj edildi.
5. Üste kalan süpernatant (sıvı) kısmında ölçüm yapıldı.

Çalışma toplam 96 kuyucuklu plate'lerde gerçekleştirildi. Ölçüm aşağıdaki sıralamaya göre yapıldı;

1. 50 µl numune ve standartlar kuyulara eklendi.
2. Plate' in kör kısmına 50 µl homojenat tamponu konuldu.
3. Tüm kuyulara 200 µl olacak şekilde ölçüm karışımı eklendi.
4. 20 µl olacak şekilde tüm kuyulara Xanthine Oxidase eklendi.
5. İlk kuyulara Xanthine Oxidase eklendikten sonra 20 dakika boyunca ve 25 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübe edildikten sonra Elisa reader da 560 nm' de okutuldu.

SOD Enzim Aktivitesinin Hesaplanması: Meydana gelen mavi-mor rengindeki formazon boyasındaki absorbans miktarları 560 nm' de 96' lık well plate kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak daha önceden hazırlanan SOD stok çözeltisi ile hazırlanan standart grafikten yararlanarak ölçümler hesaplandı. Numunelerin SOD aktivitesi, U/mg protein şeklinde tarif edildi. 2 kez tekrar yapılarak her bir doku faktörünün etkisi belirlendi.

3.3.5. Total Glutasyon (GSH) Seviyesi Ölçümü

Deney Prensipleri: Yöntem olarak Sedlak ve arkadaşlarının geliştirdiği metot esas alınarak gerçekleştirildi (Sedlak and Lindsay 1968). Ölçüm ortamında bulunan DTNB 5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) disülfid bir kromojendir ve sülfhidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenir. Oluşan sarı renk 412 nm spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

Kullanılan Reaktifler

1. PBS homojenat tamponu olarak kullanıldı.
2. Ölçüm tamponu; 0.2 mM EDTA içeren 200 mM Tris-HCl, pH: 8.2
3. 10 mM DTNB, metanol
4. Standart GSH stok

Deneyin Yapılışı

Doku homojenizasyonu;

1. 0.1 g (100 mg) dokuya 1 ml PBS eklendi.
2. Qiagen Tissue Lyser II homojenizatörü ile karışım homojenize edildi (30 Hz 3 dk).
3. +4°C' de 12000 rpm' de 15 dk da homojenatlar santrifüj edildi.
4. GSH ölçümü için meydana gelen süpernatantlar kullanıldı.

Ölçüm 96 tane kuyucuklu plate'te aşağıdaki gibi yapıldı;

1. Kuyulara 25 µl olacak şekilde numune ve standartlar eklendi.
2. Homojenat tamponu plate' in kör kısmına 25 µl kadar konuldu.
3. Tüm kuyulara ölçüm tamponu 150 µl eklendi.
4. DTNB 10 µl pipetlenerek tüm kuyulara karıştırıldı.

5. Plate' e gerekli yüklemeler yapıldıktan sonra 37 °C' de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. Son olarak 412 nm de Elisa' da ölçüm alındı.

GSH Miktarının Hesaplanması: Meydana gelen sarı renk miktarları 412 nm' de 96' lık well plate kullanılarak ölçüldü ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak daha önceden hazırlanan GSH stok çözeltisi ile oluşturulan standart grafikten faydalanarak ölçümler hesaplandı. Numunelerin GSH miktarları, nmol/mg protein olarak belirtildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar edilerek belirlendi.

3.3.6. Lipit peroksidasyon Seviyesi Ölçümü

Deney Prensipleri: Yöntem olarak Ohkawa ve arkadaşlarının geliştirdiği metot esas alınarak ölçüm gerçekleştirildi (Ohkawa 1979). Lipit peroksidasyonun göstergesini MDA' nın miktarı belli etmektedir. Tiyobarbitürik asit reaktif türlerinin konsantrasyonuna göre, lipit peroksidasyon miktarı ölçülür. MDA, tiyobarbitürik asit ile 90-95 °C' de tepkime vererek pembe renkli kromojen oluşturur.

Kullanılan Reaktifler

1. PBS homojenat tamponu olarak kullanıldı.
2. Ölçüm tamponu; % 8 SLS, % 0.08 TBA ve % 20 Asetik asit.
3. 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (MDA) stok standart.

Deneyin Yapılışı

Doku homojenizasyonu;

1. 1 ml PBS oluşturulan 100 mg dokular ile kapalı tüplere konuldu.

2. Qiagen Tissue Lyser II homojenizatörü tüplerdeki karışım ile homojenize edildi (30 Hz 3 dk).
3. Elde edilen homojenat +4 °C' de 4000 rpm' de 15 dk santrifüjlenir.
4. Tüpteki süpernatant kısım (sıvı) MDA ölçümü için kullanılır.

96 well plate' te ölçüm şu şekilde yapıldı;

1. 50 µl numune ve 10 µl standartlar kuyulara eklendi.
2. Plate' in kör kısmına 10 µl homojenat tamponu konuldu.
3. Tüm kuyulara ölçüm tamponu 190 µl eklendi.
4. 100 °C' de 1 saate kadar karışım inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyondan sonra plate' in biraz soğuması için beklendi.
6. Ve son olarak 532 nm de Elisa' da ölçüm alındı.

MDA Miktarının Hesaplanması: 100 mM stok standart çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, numunelerle aynı şartlarda çalışıldı ve meydana gelen pembe renk miktarları 532 nm' de 96' lık well plate kullanılarak Elisa' da okundu ve elde edilen sonuçlar ile standart grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen eğim sabiti numunelere uygulanarak MDA miktarı yaş, gram ve doku başına nanomol olarak hesaplandı. Daha sonra numunelerin MDA miktarları, nmol/mg protein olarak belirtildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar edilerek belirlendi.

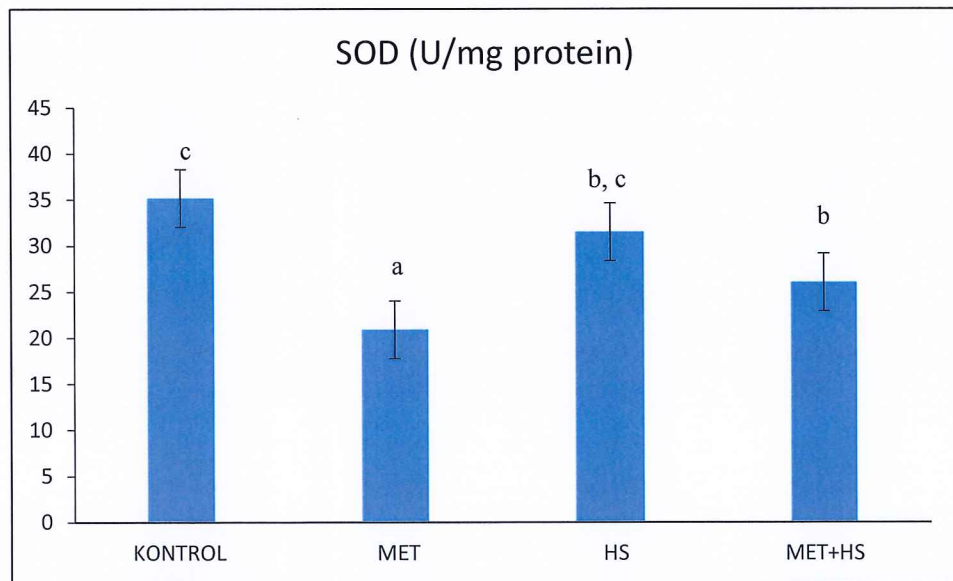
3.4. İstatistiksel Analiz

Yapılan bu çalışma sonucunda istatistiksel analizler ve karşılaştırmalar IBM SPSS Statistich 19.0 software programı kullanılarak hazırlandı. Deneylerden elde edilen sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi ve 0.05' in altındaki P değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. One-Way ANOVA testinde Post Hoc Çoklu karşılaştırmalı testlerden Duncan' a göre gruplar arası farkın önemlilik derecesi belirlendi. Her bir farklı harf diğer gruptan istatistiksel olarak farklı, aynı harfler ise anlamsız olduğunu göstermektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.1. Tüm grupların SOD (U/mg protein) aktivitesi, GSH (nmol/mg protein) ve MDA (nmol/mg protein) seviyelerine ait Ortalama±Standart Sapma (Ort±SS) değerleri tablo halinde sunulmuştur.

	SOD (U/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
KONTROL (n=6)	35.18±5.49	3.89±0.58	1.79±0.27
MET (n=6)	20.91±3.37	1.53±0.31	2.68±0.56
HS (n=6)	31.51±6.48	3.77±0.85	1.74±0.39
MET+HS (n=6)	26.04±4.52	2.90±0.45	2.20±0.54

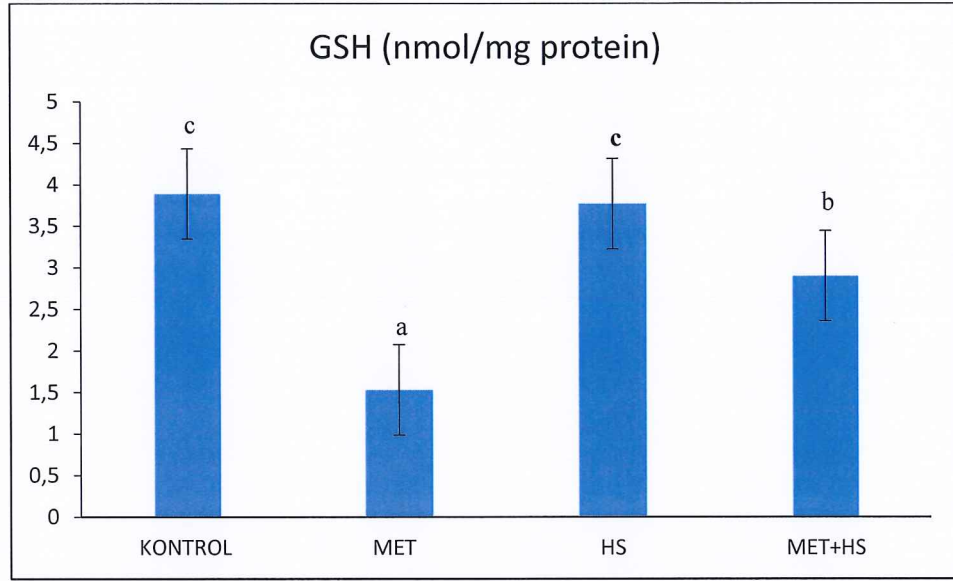


Şekil 4.1. SOD (U/mg protein) aktivitesine ait gruplar arası karşılaştırmalar.

c: Kontrol ve hidroksisinnamik asit grupları diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteriyor ($p<0.05$). Kontrol ve hidroksisinnamik asit grupları arasında anlamlı bir fark yoktur.

a: MET diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteriyor ($p<0.05$)

b: MET+HS asit grubu kontrol ve metotreksat gruplarından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteriyor ($p<0.05$). HS ve MET+HS grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



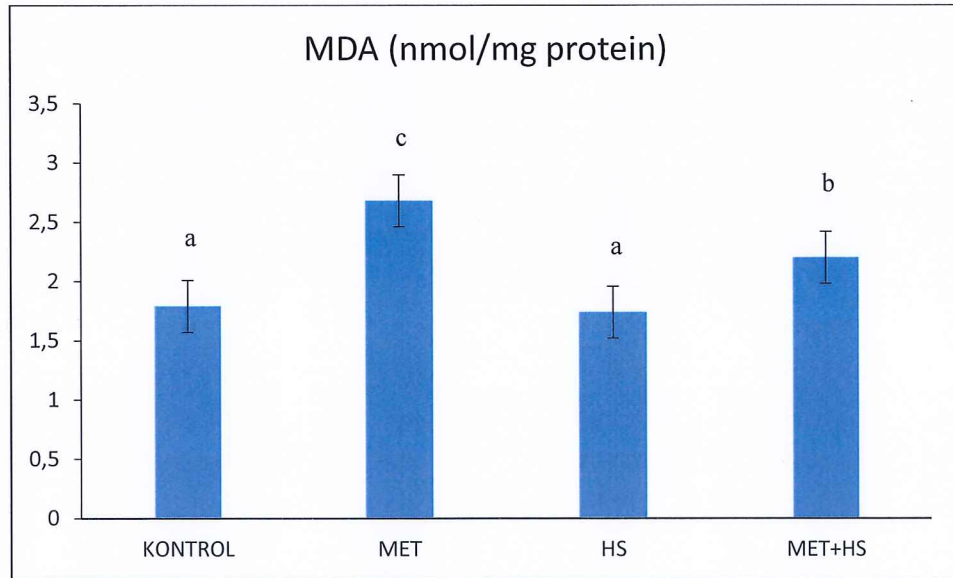
Şekil 4.2. GSH (nmol/mg protein) seviyesi için gruplar arası karşılaştırmalar.

a: MET diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteriyor ($p<0.05$)

b: MET+HS grubu diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteriyor ($p<0.05$)

c: Kontrol ve HS grupları diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteriyor ($p<0.05$).

Kontrol ve HS grupları arasında ise anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



Şekil 4.3. MDA (nmol/mg protein) seviyesi için gruplar arası karşılaştırmalar

a: kontrol ve HS grupları diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteriyor ($p<0.05$). Kontrol ve HS grupları arasında anlamlı bir fark yoktur.

b: MET+HS grubu diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteriyor ($p<0.05$)

c: MET diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteriyor ($p<0.05$)

4.1. Tartışma

Metotreksat (MET), kanser tedavisinde etkin olarak kullanılan ilaçlardan birisidir. Bir folik asit antagonisti olan MET karaciğer üzerine toksik etkileri olduğu bilinmektedir. MET' in toksik etkilerinin azaltmak amacıyla yeni ilaçların geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bununla ilgili olarak hasarı azaltacak ve karaciğeri koruyacak ilaçların uygulanması faydalı bir yaklaşım olacaktır. Bu nedenle MET sonucu oluşan serbest radikallerin zararını en aza indirmek için antioksidan kapasitelere sahip maddelerin sıçan karaciğer hasar modelinde olası yararlı etkilerinin araştırılması planlandı.

İlaçlara bağlı gelişen toksik olaylar, karaciğer hasarının en sık sebeplerinden biri olarak tanımlanmaktadır. Bunun da nedeni karaciğerin birçok ilaç veya kimyasal ajanın metabolizması için temel organ olmasıdır. Toksik hepatit nedenleri genel olarak üç başlık altında incelenir. Bunlar; ilaçlar, doğal toksik ajanlar ve kimyasal maddelerdir. İlaçların karaciğerde biyotransformasyon mekanizmaları toksik etkinin daha iyi anlaşılabilmesi için kısaca ilaçların normal metabolizmasına bakmak gerekir (Arıcı 2008).

İlaca bağlı hasar gelişiminde ilk basamak sıklıkla p450 aracılı reaktif metabolit oluşumudur. Reaktif metabolitler genellikle ilaç metabolizmasının minör ürünleridir ve reaktif yapıları sebebi ile de çok kısa ömürlüdür. Reaktif metabolitlerin emniyetli uzaklaştırılmasında major yol GSH ile konjugasyondur. GSH organizmada tüm hücreler tarafından sentezlenmekle birlikte major sentez yeri karaciğerdir. Toksik metabolitler pek çok mekanizma ile karaciğer hücresinde hasara yol açabilir. Ancak en önemli iki mekanizma kovalent bağlanma ve oksidatif streştir. Reaktif metabolitler için kritik hedef mitokondridir. Reaktif metabolitler, mitokondrinin idamesinden sorumlu anahtar proteinlere kovalent bağlanabilir veya mitokondri DNA' sını hasarlar. Mitokondri GSH sentezleyemez ve sitozolden gelen GSH' a bağımlıdır. Oluşan reaktif oksijen metabolitlerini glutatyon peroksidaz ile uzaklaştırır. Mitokondri tarafından serbest oksijen metabolitleri devamlı yapıldığından, mitokondri GSH miktarının azalmasına özellikle duyarlıdır (Beşışık 2007).

Lipid peroksidasyonu oksidatif stresin önemli bir sonucudur (Manda and Bhatia 2003b). Lipit peroksidasyonu, serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asitleriyle etkileşmesi sonucu başlar. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve lipit peroksidasyonunun en yaygın kullanılan belirleyicilerinden biridir. Oksidatif strese maruz kalan dokularda MDA seviyesinde artış görülür. Başka bir deyişle plazma MDA seviyesi oksidatif stres için potansiyel bir biyomarker olarak kullanılabilir (Kovacic and Jacintho 2001).

MET çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklarda ve neoplastik durumlarda kullanılan bir folik asit antogonisti olup, sitotoksik kemoterapotik bir ajandır. Uzun yıllardan beri lösemi, lenfoma, osteosarkom, akciğer kanseri, meme kanseri, baş ve boyun tümörleri gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca immünsüpresif ve antienflamatuvar özellikleri nedeniyle MET, kanser tedavisinin dışında; romatoid artrit, psoriasis, sarkoidoz, vaskulit ve diğer otoimmün rahatsızlıklarda da kullanılan etkili bir ilaçtır (Totan vd 1999; Şendur vd 2002). Ancak bu ajanın etkinliği genellikle ciddi yan etkileri ve toksik durumlar dolayısıyla sınırlanmıştır (Jahovic *et al.* 2003). MET, S fazındaki hücreleri etkiler. MET ve metabolitleri hücrelere aktif taşıma ile girer ve büyük oranda böbrek yoluyla elimine olur. MET böbreklerde haftalar, karaciğerde ise aylar boyunca kalmaktadır (Hardman and Limbird 2001). Sıçan ve farelerde uygulanan MET dozunun % 50' den fazlası karaciğerden safra ile elimine olmaktadır (Henderson *et al.* 1965).

MET gibi sitotoksik özelliğe sahip ilaçlar yalnız kanser hücrelerine karşı değil, sağlıklı ve malign bütün hızlı bölünen hücreleri etkilerler. Bu nedenle yaygın toksik etkileri vardır (Reide and Taylor 2000). Klinikte geniş kullanım alanları olmasıyla birlikte, karaciğer üzerine toksik etkisinden dolayı daha fazla önem kazanmıştır (Uraz vd 2005). MET karaciğerde enzimatik bir sistem aracılığıyla major ekstrasellüler metaboliti olan 7-hidroksimetotreksat' a dönüştür (Kuzu vd 2007). MET hücre içinde poliglutamat formunda tutulur. MET kullanımı ile hücre içindeki poliglutamat formunun miktarı artar ve folik asit seviyeleri düşer. Bu da hepatosit nekrozuna sebep olur (Gochee *et al.* 2003). Poliglutamat formunun seviyesinin artması intrasellüler alanda ilacın varlığını artırır. Bu mekanizmanın MET' in hepatotoksik etkisinin sebebi olduğu

düşünülmektedir (Aboutwerat *et al.* 2003). Kronik düşük doz MET, fibrozis ve siroza yol açarken, yüksek doz karaciğer fonksiyon testlerinde bozulmaya yol açar (Şahan ve Öztürk 2003).

Literatür taramalarında; Krokower ve Kamen (1983), 10 mg/kg (düşük doz) i.p. MET' in rat beyinde hızlı bir şekilde birikip bir hafta boyunca MET poliglutamatların yüksek seviyelerde bulunduğunu göstermişlerdir. Kobaylarda deneysel olarak düşük doz MET' in serebellumun purkinje hücrelerinde dejenerasyona yol açtığı El-Badawi ve arkadaşları (1990) tarafından gösterilmiştir.

Deneysel olarak MET' in nöral tüp defekti yaptığı bilinmektedir (Vatansever vd 2003). Klinik olarak hastalarda MET' in paraparezi, nörojen mesane, afazi, hemiparezi, bilinç bulanıklığı ve polinöropati, kauda equina sendromu, radikülit gibi periferik sinir sistemi semptomlarına neden olabilmektedir. MET' in bu yan etkileri kanser hastalarında tedaviye uyumu bozmaktadır (Cinbis vd 2003; Birtas vd 2004).

Serbest radikaller, hücre içinde antioksidan kapasiteyi aşan konsantrasyonlarda bulundukları zaman; başta lipidler olmak üzere, protein, DNA, karbonhidratlar ve enzimler gibi birçok molekülle reaksiyona girdikleri saptanmıştır (Bonney *et al.* 2002). Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir (Fujise 1982; Yanbeyi 1999).

Glutasyon, enzimatik olmayan antioksidan sistemin önemli bir parçasıdır. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Redükte glutasyon/okside glutasyon oranı, oksidatif durumlarda azalır (Ames *et al.* 1993).

SOD' un fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri $O_2^{\cdot-}$ in hasarlayıcı etkilerine ve lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilere karşı korumaktır. Dolayısıyla antioksidan savunmada oldukça önemli bir enzimdir (McCord 2000).

Son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalarda MET' in karaciğer hasarında önemli bir rol oynayan oksidatif stres ve antioksidan tedaviler yoluyla bu olumsuz etkide azalma gösterilmiştir. Vardi ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, MET' in ratlarda intestinal sistemde oluşturduğu oksidatif hasara karşı kaybı ve beta karotenin koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada MET uygulaması ile ratların intestinal dokusunda MDA ve MPO aktivitesinin arttığı; SOD, CAT (katalaz) ve GSH içeriğinin ise azaldığı tespit edilmiştir (Vardi *et al.* 2008). Yine ratlarda MET' e bağlı hepatik oksidatif hasarın curcumin verilmesiyle azaltıldığı gösterildiği, Hemeidan ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada MET, oksidan/antioksidan dengesini anlamlı bir şekilde değiştirmiş, MDA seviyesinde artış ile birlikte GSH içeriği ve SOD ile CAT aktivitelerini azaltmıştır. Bizim çalışmamızda da MET kullanımının oksidatif doku hasarına neden olduğunu gözlemledik.

Daha önce yapılan çalışmalara göre; folik asit, aynı zamanda bir antioksidan ajan olup, etki mekanizması ile ilişkili olarak MET' in toksik etkilerini azaltmak için yaygın olarak kullanılır. Eşlik eden folik asit kullanımının MET' in etkinliğini azaltabildiği yönünde tartışmalar vardır. Dolayısıyla yeni antioksidan ajanlar MET toksisitesine karşı deneysel olarak kullanılmıştır. Bu antioksidan maddelerden biri melatonin olup, MET' in yol açtığı hepatorenal ve ince barsak oksidatif hasarına karşı yararlı etkileri gösterilmiştir. Ayrıca bazı araştırmacılar, MET ile oluşturulan oksidatif hasara karşı lökosit, karaciğer ve böbrek üzerinde taurin ve L-karnitin yararlı etkilerini göstermişlerdir (Ames *et al.* 1993). Yine yapılan birçok çalışmada metotreksat verilmesi sonucu SOR' un oluştuğu ve bunun da hücre membranındaki lipid komponentlerini etkileyerek lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve hücreye zarar verdiği anlaşılmıştır. Metotreksat verilmesini takiben hücrede lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA ve inflamatuvar yanıtın göstergesi olan MPO seviyelerinde artış, hücredeki GSH

seviyesinde azalmaya neden olarak, hücrenin SOR' a daha duyarlı hale gelmesine neden olur (Miketova *et al.* 2005).

Maiguma *et al.* (2009), normal insan epidermal keratinosit hücre serilerinde MET ve 5-Florourasil' in indüklediği sitotoksisteyi araştıran çalışmalarında, MET ile indüklenen toksisitenin oksidatif stres ve SOR ile yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir. MET' in spesfik olarak normal insan epidermal keratinositlerinde (in vitro hücre kültürü ortamında) intraselüler süperoksit radikallerinin aktivasyonu aracılığı ile sitotoksisteye neden olduğunu ortaya koymuşlardır. MET' in ayrıca insan epidermal keratinosit hücrelerinin yaşayabilirliğini azalttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada hidroksil radikali temizleyicisi bir antioksidan olan amifostinin MET' in indüklediği hücre hasarını geri çevirdiği gösterilmiştir.

Vardi *et al.* (2010) rat karaciğerinde yaptıkları çalışma, Devrim ve arkadaşlarının (2005) rat böbreğinde yaptıkları çalışmada, Uzar ve arkadaşlarının (2008) rat serebellumunda yaptıkları çalışmada (Armagan *et al.* 2008), Cıralık ve arkadaşlarının (2006) rat intestinal dokusunda yaptıkları çalışmada MET' in MDA seviyelerini anlamlı derecede arttırdığı saptanmıştır.

Jahovic *et al.* (2004) 20 mg/ kg tek doz MET intraperitoneal uygulanan ratların kan, karaciğer, böbrek ve ince bağırsak dokularında GSH seviyelerinde azalma, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz aktivitesinde artma ve MDA seviyelerinde belirgin artma olduğunu bulmuşlardır. Miyazono ve arkadaşları (2004) MET' in yan etkisi olarak rat ince bağırsağında SOD ve katalaz aktivitelerinde artma, GSH seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MET' in yol açtığı ince bağırsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdi. Bu nedenle MET toksisitesinden korunmak için antioksidan ajanlarla birlikte kullanması gerekliliği öne sürülmektedir.

Günümüzde MET' e bağlı karaciğer hasarı ile ilgili yapılan çalışmalar apoptozis, proapoptotik gen ve faktörler üzerine yoğunlaşmıştır (Neuman *et al.* 1999; Kobayashi *et*

al. 2002). Apoptozis DNA kırılması ve kromatin yoğunlaşması ile başlayan programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozise uğramış hücreler inflamatuvar yanıt oluşturmaksızın makrofajlar tarafından fagosite edilirler (Hickman 1992). Apoptozise yol açan birkaç mekanizma mevcuttur. Bu mekanizmalardan birisi kaspaz aktivasyonudur. Los ve arkadaşları (1997) kaspaz aktivasyonunun MET' e bağlı apoptozis için gerekli olduğunu saptamışlardır. Bazı güncel çalışmalarda MET' e bağlı karaciğer toksisitesi ve TNF- α aktivasyonu arasında bağlantı saptanmıştır. Neuman ve arkadaşlarının çalışmasında MET' e bağlı karaciğer toksisitesinde TNF- α ' nın rol oynadığını saptamışlardır (Neuman *et al.* 1999). Kobayashi ve arkadaşlarının (2002) ratlarda yaptığı çalışmada rejenere hepatositlerde MET' e bağlı apoptoziste TNF- α ' nın rol oynadığını saptamışlardır.

Bu araştırmalar ışığında çalışmamızda kullandığımız MET, mevcut literatürlerde gösterildiği gibi, karaciğer dokusunda belirgin biyokimyasal değişiklikler meydana getirdi. Biyokimyasal değerlendirmede, sadece 5 gün boyunca 20 mg/kg dozda i.p. ile verilen MET ve bunun sonucunda karaciğer dokusunda lipid peroksidasyon göstergesi MDA değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı arttığı, buna karşılık SOD gibi antioksidan enzim aktivitesinin ve GSH seviyesinin azaldığı gözlemlendi.

Sinamik asit doğada bulunan bir bileşendir. Bitkiler aleminin bir üyesi olmakla birlikte genellikle tatlı kompozisyonlarda bulunur ve sinamon yağının yapısında bulunur (Hoskins 1984). Son yıllarda sinamik asidin insan malign tümörlerinde (Prostat ve akciğer melanoma, glioblastoma ve adenokarsinoma) antitümöral aktivite sergilediği de gösterilmiştir (Liu *et al.* 1995). Bazı sinnamik asit analoglarının tirozin kinaz inhibitörleri gibi hareket ederek tümör hücre çoğalmasını engelledikleri öne sürülmüştür (Shiraishi *et al.* 1989).

Ekmekçioğlu ve arkadaşları (1998) sinnamik asitin hücre proliferasyonu ve alkalın fosfataz, sukraz ve aminopeptidaz N farklılaşma belirteçleri üzerine etkisini insan kolon adenokarsinoma hücrelerinde incelemiştir. Bu çalışmada sinnamik asitin önemli bir

antiproliferatif ajan olduğu ve büyüyen hücrelerde DNA sentezini inhibe ettiği ortaya konmuştur.

Bizim çalışmamızda da amacımız, yaygın olarak kullanılan bir ilaç olan MET tarafından karaciğerde oluşturulan oksidatif strese karşı trans-3 hidroksisinnamik asit' in antioksidan etkilerini incelemektir. trans-3 Hidroksisinnamik asit kullanımının, MET ile oluşturulan oksidatif karaciğer hasarı üzerine olan olası yararlı etkilerinin ve tedavideki etkinliğinin araştırılması hastalar için önem arz etmektedir. Biz de bu tez çalışmasında trans-3 hidroksisinnamik asit kullanımının MET ile oluşturulmuş akut karaciğer hasarında bazı oksidatif stres belirteçlerini önemli oranda azalttığını tespit ettik.

Bütülllenmiş hidroksi toluen ve bütülllenmiş hidroksi anisol gibi sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde kullanılmalarına ciddi sınırlamalar ve yasaklar getirilmiştir. (Koşar vd 2002; Öztürk vd 2002; Yağcı vd 2008; Koyu vd 2009). Bu nedenle doğal antioksidan kaynağı olan meyve ve sebzeler, baharatlar ve bitkisel çaylara olan ilgi artmıştır.

Bitkisel ürünlerin antioksidan etkileri özellikle flavonoidler başta olmak üzere sinnamik asit türevleri, kumarinler gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. En fazla antioksidan etkinin sırasıyla üzüm, greyfurt, domates, portakal ve elma sularında olduğu tespit edilmiştir (Öztürk *et al.* 2002).

Fenolik bileşikler antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antirombotik etkiye sahip olduğu yapılan pek çok araştırma ile tespit edilmiştir (MacDougall 2002; Aras 2006). Antioksidan olarak fenolik bileşikler kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları ve Alzheimer gibi hastalıkları engellemektedirler (MacDougall 2002; Bakkalbaşı 2009).

Yapılan araştırmalar ve elde edilen sonuçlara göre MET ile bir antioksidan olan trans-3 hyroxcinnamic asit çalışmamızda birlikte kullanıldı. Ratlara ilk gün 20 mg/kg tek doz MET i.p yoluyla verildi, daha sonra 100 mg/kg trans-3 hidroksisinnamik asit, 5 gün

boyunca her gün taze olarak hazırlanıp sıçanlara uygulandı. Karaciğer dokusunda anlamlı biyokimyasal değişiklikler meydana geldi. Biyokimyasal değerlendirmede, karaciğer dokusunda lipid peroksidasyon göstergesi MDA değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı, buna karşılık SOD aktivitesi antioksidan enzim düzeylerinin ve GSH seviyesinin arttığı gözlemlendi.

Sinamik asitler, bitki hücre duvarının yapısal ve fonksiyonel bileşenleri ve aynı zamanda diyetin biyoaktif maddeleri olarak kategorize edilmiştir. (Kroon and Williamson 1999; Shahidi and Chandrasekara 2010). Son veriler, ateroskleroz, iltihaplı yaralanma ve kanser gibi çeşitli oksidatif strese bağlı hastalıklarda önleyici ve/veya terapötik maddeler olarak sinamik asitlerin yararlı olduğunu desteklemektedir (Fresco *et al.* 2006). Literatürde bulunan veriler hidroksisinnamik asitler antioksidan etkinliğinin yapısal özelliklerine sıkı bir şekilde bağlı olduğunu ve yapısal olarak aromatik yapıda hidroksi fonksiyonun varlığı ile ilgili olduğunu göstermektedir (Rice-Evans *et al.* 1996).

Söylemezoğlu ve arkadaşları (2003), trans yapısındaki sinamik asit türevlerinin cis yapısındakine göre izomerizasyona daha hassas ve yatkın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca diyetle alınan sinamik asit türevlerin kansere sebep olmasından şüphelenen nitrosaminlerin oluşumunu engellediği tezi de araştırmaya değer bir konudur diye önemini göstermiştir. MET' in etkisinin trans-3 hidroksisinnamik asit ile önlenip önlenemeyeceğini belirten bir çalışma tespit edilmemiştir ve bu nedenle sinamik asit türevlerinden olan kafeik, kumarik, ferulik ve sinapik asit gibi asitlerin oksidatif stresin varlığındaki çalışmalara yer verdik.

Benzer şekilde yapılan bazı çalışmalarda ratlarda MET' in hepatik oksidatif stresi arttırdığı, bu hepatotoksik etkinin N-asetilsistein, melatonin, kurkumin ve üzüm çekirdeği ekstresi ile geri döndürülebileceği rapor edilmiştir (Jahovic *et al.* 2004; Ciralik vd 2006; Cetin vd 2008; Hemeida and Mohafez 2008). Rat testisinde, MET ile indüklenen toksisite ve depresyonun patogeneğinde oksidatif stresin rolü olduğu; beta karoten ve kafeik asitin bu oksidatif stres üzerinde koruyucu etki yaptığı iki ayrı çalışmada bildirilmiştir (Armagan vd 2008; Vardi vd 2010).

Kafeik asit birçok hastalığın önlenmesinde potansiyel terapötik özellikler gösteren bir bileşiktir (Feng *et al.* 2008). Kafeik asit hayvan modellerinde oluşturulan çeşitli oksidatif stres modellerinde antioksidan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Yildiz vd 2009). Gökçe ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışmada, siklosporin A ile indüklenen lipid peroksidasyonu aracılı nefrotoksisitede kafeik asitin koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır. Koyu ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışmada, kafeik asitin rat karaciğerinde 900 MHz elektromanyetik alanın indüklediği oksidatif değişiklikler üzerinde SOR' u azaltıp, antioksidan enzim aktivitesini artırarak koruyucu etkisi olduğu öne sürülmüştür.

Sudina ve arkadaşları (1993) bir sinnamik asit türevi olan kafeik asitin 10 µmol/litre konsantrasyonda ksantin/ksantin oksidaz sisteminde serbest oksijen radikallerinin oluşmasını bloke ederek antioksidan (serbest oksijen radikalini önleyici) etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Kafeik asit düşük konsantrasyonlarda azot oksit (NO) oluşumunu inhibe ettiği ve serbest oksijen radikali oluşumunda önemli bir faktör olan Nüklear Faktör Kappa-B (NF-kB) aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Ilhan vd 2004; Noelker *et al.* 2005). Parlakpınar ve arkadaşları (2003) yaptıkları deneysel çalışmalarda amikasin ile indüklenen böbrek hasarına karşı melatonin ve kafeik asitin koruyucu etkilerini değerlendirmişler, melatonin ve kafeik asitin antioksidan enzim aktivitelerini artırıp, lipid peroksidasyonunu azaltarak nefrotoksisite gelişimini engellediğini göstermişlerdir. Serarslan ve arkadaşlarının (2007) ratlarda, yara iyileşmesi modeli oluşturularak yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre kafeik asitin yara iyileşmesini arttırdığı ve bu etkinin multipl antiinflamatuvar özelliklerinin yanı sıra antioksidan ve SOR' u temizleyici etkisi aracılığıyla olabileceği öne sürülmüştür. Yağmurca ve arkadaşlarının (2004) yapmış oldukları bir çalışmada da kafeik asitin doksorubisin ile oluşturulan nefrotoksisitede lipid peroksidasyonunu değerlendirmişler ve doksorubisin uygulanan grupta renal dokuda NO ve MDA seviyeleri yüksek bulunmuştur.

Eroğlu ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları deneysel çalışmalarda yine bir sinnamik asit türevi olan ferulik asitin prostat kanseri hücre hatları üzerinde hem invazyon hem de koloni oluşumunu baskılayıcı etkisi metastazı da baskılayabileceği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız trans-3 hidroksisinnamik asit' in, oluşabilecek muhtemel oksidatif stresin varlığında, MET' in bu etkisinin trans-3 hidroksisinnamik asit ile önlenip önlenemeyeceğini belirten bir literatür de tespit edilmemiştir. Bizim çalışmamızda da sıçanlara sadece 5 gün boyunca 100 mg/kg dozda ve i.p. olarak trans-3 hidroksisinnamik asit verildi. Biyokimyasal değerlendirme sonucunda karaciğer dokusunda lipit peroksidasyon göstergesi MDA değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı, buna karşılık SOD ve GSH gibi antioksidan enzim seviyelerinin arttığı gözlemlendi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Çalışmamızda MET ile indüklenen oksidatif stres sonucunda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA' nın anlamlı olarak arttığını gözlemledik. trans-3 trans-3 Hidroksisinnamik asit' in MET' in indüklediği oksidatif stres (lipid peroksidasyonu) parametresi olan MDA seviyesini anlamlı olarak düşürdüğünü saptadık.
2. Antioksidanlardan GSH seviyesi ve SOD aktivitesinin, MET ile indüklenen oksidatif stres sonucunda azaldığını; bir sinnamik asit türevi olan trans-3 hidroksisinnamik asit verilmesi ile MET grubuna göre anlamlı olarak arttığını gözlemledik.
3. Antioksidanlardan SOD, GSH ve lipid peroksidasyonu MDA seviyelerinin trans-3 hidroksisinnamik asit verilmesi ile kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlemlemedik.
4. Antioksidanlardan SOD aktivitesinin, MET+HS verilmesi ile kontrol ve MET gruplarına göre anlamlı farklılıklar gözlemledik.
5. Antioksidanlardan SOD aktivitesinin, MET+HS ve HS gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlemedik.
6. Antioksidanlardan GSH seviyesinin MET+HS verilmesi ile MET grubuna göre anlamlı olarak arttığını gözlemledik.
7. Lipid peroksidasyonunun parametresi olan MDA seviyesinin MET+HS verilmesi ile MET grubuna göre anlamlı olarak azaldığını gözlemledik.

Bu sonuçlar, MET tarafından indüklenen oksidatif karaciğer hasarını trans-3 hidroksisinnamik asit' in uygulamasının azaltma yeteneğine sahip olabileceğini göstermektedir. MET uygulamasıyla meydana gelen hepatotoksik etkilerin azaltılmasında trans-3 hidroksisinnamik asit' in MET tedavisinde destek bir tedavi olarak kullanılabileceği düşüncesindeyiz. Yalnız MET ile ilgili farklı doz ve sürelerde toksisite modellerinin oluşturulduğu ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünüldü.

KAYNAKÇA

- Aboutwerat, A., Pemberton, P. W., Smith, A., Burrows, P. C., McMahon, R. F., Jain, S. K., Warnes, T. W. (2003). Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cirrhosis. *Biochim Biophys Acta*, 1637(2), 142-150.
- AbuAmsha, R., Croft, K. D., Puddey, I. B., Proudfoot, J. M., Beilin, L. J. (1996). Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: Identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clinical Science*, 91(4), 449-458.
- Acar, J., Gökmen, V. (1998). Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri. In İ. Saldamlı (Ed.), *Gıda Kimyası* (pp. 463- 496). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- Akkus, İ. (1995). *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, 1 ed. Konya Mimoza Yayınları.
- Akpoyraz, M., ve Durak, İ. (1995). Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Univ Tıp Fak. Mecm*, 48, 253-262.
- Altan, N., Dinçel, A. S., Koca, C. (2006). Diyabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Turkish Journal of Biochemistry*, 31, 51-56.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993). Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915-7922.
- Antmen, Ş. E. (2005). *Beta Talasemide Oksidatif Stres*. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Aras, Ö. (2006). *Üzüm Ve Üzüm Ürünlerinin Toplam Karbonhidrat, Protein, Mineral Madde ve Fenolik Bilesik İçeriklerinin Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi), Süleyman Demirel Üniversitesi Isparta.
- Arbak, S. (2007). Klinik Gastroenteroloji ve Hepatoloji In Ş. H. Tözün N., Özkan H., Şimşek İ., Gören A. (Ed.), (301-303). Ankara: Nobel Yayınevi.
- Arıcı, S. (2008). Toksik Hepatit. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi. Pamukkale Tıp Dergisi*, 1(2), 113-119.
- Armagan, A., Uzar, E., Uz, E., Yilmaz, H. R., Kutluhan, S., Koyuncuoglu, H. R., Serel, T. A. (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Human and Experimental Toxicology*, 27(7), 547-552.
- Aytekin, Y., ve Solakoğlu, S. (2006). *Temel Histoloji* (10 ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Babiak, R. M. V., Campello, A. P., Carnieri, E. G. S., Oliveira, M. B. M. (1998). Methotrexate: Pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochemistry and Function*, 16(4), 283-293.
- Baggott, J. E., Morgan, S. L., Ha, T. S., Alarcon, G. S., Koopman, W. J., Krumdieck, C. L. (1993). Antifolates in Rheumatoid-Arthritis-a Hypothetical Mechanism of Action. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 11(8), 101-105.
- Bakkalbaşı, E. (2009). *Farklı Ambalaj Materyalleri ve Depo Koşullarının Ceviz İç Bileşimine Etkisi*. (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Ankara.

- Bal, W., Kasprzak, K. S. (2002). Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. *Toxicology Letters*, 127(3), 55-62.
- Bekerecioğlu, M., Uğraş, S., Dilek, O. N., Tercan, M. ve Özyazgan, İ. (1998). Serbest Radikaller. *Sendrom*, 10(3), 85-94.
- Berk, M., Ng, F., Dean, O., Dodd, S., Bush, A. I. (2008). Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(7), 346-351.
- Bertram, G. (2004). *Katzung, Basic and Clinical Pharmacology* (9 ed.). Singapore: The McGraw-Hill Companies.
- Beşışık, F. (2007). *İlaçlara Bağlı Karaciğer Hasarı*. Paper presented at the 9. İç Hastalıkları Kongresi, Antalya.
- Beuchat, L. R., Golden, D. A. (1989). Antimicrobials Occurring Naturally in Foods. *Food Technology*, 43(1), 134-142.
- Beyeler, C., Reichen, J., Thomann, S. R., Lauterburg, B. H., Gerber, N. J. (1997). Quantitative liver function in patients with rheumatoid arthritis treated with low-dose methotrexate: A longitudinal study. *British Journal of Rheumatology*, 36(3), 338-344.
- Birtas, E., Tuglular, T. F., Kaygusuz, I., Noyan, F., Adıgüzel, C., Çetiner, M., Bayık, M. (2004). ALL Hastasında İntratekal Metotreksata Bağlı Kauda Equina Sendromu: Vaka Sunumu. *Türk J Haematol*, 21, 3.
- Boffa, M. J., Chalmers, R. J., Haboubi, N. Y., Shomaf, M., Mitchell, D. M. (1995). Sequential liver biopsies during long-term methotrexate treatment for psoriasis: a reappraisal. *Br J Dermatol*, 133(5), 774-778.
- Bonnefoy, M., Draï, J., Kostka, T. (2002). [Antioxidants to slow aging, facts and perspectives]. *Presse Med*, 31(25), 1174-1184.
- Bulkley, G. B. (1993). Free-Radicals and Other Reactive Oxygen Metabolites - Clinical Relevance and the Therapeutic Efficacy of Antioxidant Therapy. *Surgery*, 113(5), 479-483.
- Burçak, G., Andican, G. (2004). Oksidatif DNA Hasarı ve Yaslanma. *Cerrahpasa J Med*, 35(4), 159-169.
- Cadenas, E., Packer, L. (2002). *Handbook of Antioxidants* (E. Cadenas and L. Packer Eds. Second Edition Revised and Expanded ed.). TM Marcel Dekker, Inc. New York- Basel: Taylor and Francis Group, LLC.
- Cassiman, D., Denef, C., Desmet, V. J., Roskams, T. (2001). Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology*, 33(1), 148-158.
- Cetin, A., Kaynar, L., Kocyigit, I., Hacıoglu, S. K., Saraymen, R., Ozturk, A., Sagdic, O. (2008). Role of Grape Seed Extract on Methotrexate Induced Oxidative Stress in Rat Liver. *American Journal of Chinese Medicine*, 36(5), 861-872.
- Chabner, B., Wilson, W., Supko, J. (2007). *Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs*. In *Williams Hematology* (M. A. Lichtman, E. Beutler, U. Seligsohn, T. J. Kipps and K. Kaushansky Eds. 7 ed.). United States: Mc Graw Hill Company.
- Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1993). An Introduction to Free-Radical Biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-493.
- Cinbis, M., Polat, A., İnan, M., Bican, M. (2003). Metotreksat Nörotoksitesisi Gelişen Çocuk ALL Olgusu. *Turkish Journal of Haematology*, 20, 3.

- Ciralik, H., Bulbuloglu, E., Cetinkaya, A., Kurutas, E. B., Celik, M., Polat, A. (2006). Effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced small intestinal damage in rats. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 73(8), 1086-1092.
- Clifford, M. N., Scalbert, A. (2000). Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1118-1125.
- Cody, V., Luft, J. R., Pangborn, W. (2005). Understanding the role of Leu22 variants in methotrexate resistance: comparison of wild-type and Leu22Arg variant mouse and human dihydrofolate reductase ternary crystal complexes with methotrexate and NADPH. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 61(2), 147-155.
- Cotran, R. (1994). Basic Pathology In R. Cotran, V. Kumar and S. Robbins (Eds.), *Hücre Zedelenmesi Adaptasyon*, 3 -11. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Crawford, J. M. (2002). Robbins Basic Pathology. In V. Kumar, R. S. Cotran and S. L. Robbins (Eds.), *The Liver and the Biliary Tract*, 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 592-611.
- Çapan, Z., ve Yalçın, Ö. F. (2010). Organ Sistemleri ve Anestezi. In H. Teltik Başar, B. Baltacı ve Ç. Kaymak (Eds.), *Karaciğer Hastalıkları ve Anestezi*. (125-142). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri Ltd Şti.
- De Minicis, S., Bataller, R., Brenner, D. A. (2006). NADPH oxidase in the liver: Defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology*, 131(1), 272-275.
- Demir, K. (2008). *Sıçanlarda Tiyoasetamid İle Uyarılan Akut Karaciğer Yetmezliğini Önlemede Kefirin Etkinliğinin Araştırılması*. (Uzmanlık Tezi), Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- Devrim, E., Ccedil;etin, R., Kilicoglu, B., Erguder, B. I., Avci, A., Durak, I. (2005). Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Renal Failure*, 27(6), 771-773.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- Ekmekcioglu, C., Feyertag, J., Marktl, W. (1998). Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. *Cancer Lett*, 128(2), 137-144.
- El-Badawi, M. G., Fatani, J. A., Bahakim, H., Abdalla, M. A. (1990). Light and electron microscopic observations on the cerebellum of guinea pigs following low-dose methotrexate. *Exp Mol Pathol*, 53(3), 211-222.
- Eroğlu, C. (2014). *PC-3 ve LNCaP Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Ferulik Asitin Etkisinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Feng, Y., Lu, Y. W., Xu, P. H., Long, Y., Wu, W. M., Li, W., Wang, R. (2008). Caffeic acid phenethyl ester and its related compounds limit the functional alterations of the isolated mouse brain and liver mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation: Relationship to their antioxidant activities. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1780(4), 659-672.
- Freeman, B. A., Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47(5), 412-426.
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*, 97(3A), 22-28.

- Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., Marques, M. P. M. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, 26(6), 747-766.
- Friedman, S. L. (2004). Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 1(2), 98-105.
- Fujise, H. (1982). Enzyme Induction in Liver Microsomes and Alteration of Benzo(A)Pyrene Metabolism in Isolated Liver Cells From Rats Administered Food Additives. *Nagoya Med, J*, 26, 151-171.
- Gawkrodger, D. J. (1997). Current Management of Psoriasis. *J Dermatol Treat*, 8, 27-55.
- Gochee, P. A., Johnsson, J. R., Clouston, A. D., Pandeya, N., Purdie, D. M., Powell, E. E. (2003). Steatosis in Chronic Hepatitis C: Association with Increased Messenger RNA Expression of Collagen I, Tumor Necrosis Factor-Alpha and Cytochrome P450 2E1. *J Gastroenterol Hepatology*, 18, 386-392.
- Gokce, A., Oktar, S., Yonden, Z., Aydin, M., Ilhan, S., Ozkan, O. V., Yalcinkaya, F. R. (2009). Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cyclosporine A-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Renal Failure*, 31(9), 843-847.
- Green, C. J., Healing, G., Simpkin, S. (1986). Increased Susceptibility to Lipid Peroxidation in Rabbit Kidneys: A Consequence of Warm Ischemia and Subsequent Reperfusion. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83(3), 603 -606.
- Guyton, A. C., Hall, J. E. (2007). Tibbi Fizyoloji, (C. Güzel, Trans.). In A. C. Guyton and J. E. Hall (Eds.), *Bir Organ Olarak Karaciğer*. 11 ed., (859-864.). Ankara: Nobel Tıp.
- Hall, P. D., Jenner, M. A., Ahern, M. J. (1991). Hepatotoxicity in a Rat Model Caused by Orally-Administered Methotrexate. *Hepatology*, 14(5), 906-910.
- Halliwell, B. (1993). Free-Radicals and Vascular-Disease - How Much Do We Know. *British Medical Journal*, 307(6909), 885-886.
- Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid-Peroxidation - Its Mechanism, Measurement, and Significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715-725.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, 142(2), 231-255.
- Hardman, J. G., Limbird, L. E. (2001). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (J. G. Hardman and L. E. Limbird Eds.). ABD: The McGraw-Hill Companies.
- Heinonen, I. M. (2002). Antioxidants in Fruits, Berries and Vegetables. In W. Jongen (Ed.), *Fruit and Vegetable Processing Improving Quality* (pp. 23-44). CRC press, New York Washington, DC: Woodhead Publishing Limited.
- Heller, W., Forkmann, G. (1993). Biosynthesis of flavonoids,. In J. B. Harborne (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research since 1986* (499-535). London: Chapman and Hall.
- Hemeida, R. A., Mohafez, O. M. (2008). Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats. *J Egypt Natl Canc Inst*, 20(2), 141-148.
- Henderson, E. S., Adamson, R. H., Denham, C., Oliverio, V. T. (1965). The metabolic fate of tritiated methotrexate. I. Absorption, excretion, and distribution in mice, rats, dogs and monkeys. *Cancer Res*, 25(7), 1008-1017.

- Herrmann, K. (1989). Occurrence and Content of Hydroxycinnamic and Hydroxybenzoic Acid Compounds in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(4), 315-347.
- Hickman, J. A. (1992). Apoptosis Induced by Anticancer Drugs. *Cancer and Metastasis Reviews*, 11(2), 121-139.
- Hoskins, J. A. (1984). The Occurrence, Metabolism and Toxicity of Cinnamic Acid and Related-Compounds. *Journal of Applied Toxicology*, 4(6), 283-292.
- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=trans+3+hydroxycinnamic+acid&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=TR&focus=product.trans-3-Hydroxycinnamic acid>. Retrieved 12.10. 2016
- Hudson, B. J. (1990). *Food Antioxidants* B. J. Hudson (Ed.)
- Hytiroglou, P., Tobias, H., Saxena, R., Abramidou, M., Papadimitriou, C. S., Theise, N. D. (2004). The canals of Hering might represent a target of methotrexate hepatic toxicity. *American Journal of Clinical Pathology*, 121(3), 324-329.
- Ilhan, A., Iraz, M., Gurel, A., Armutcu, F., Akyol, O. (2004). Caffeic acid phenethyl ester exerts a neuroprotective effect on CNS against pentylene-tetrazol-induced seizures in mice. *Neurochemical Research*, 29(12), 2287-2292.
- Ito, N., Hirose, M. (1989). Antioxidants-Carcinogenic and Chemopreventive Properties. *Advances in Cancer Research*, 53, 247-302.
- Iuliano, L., Colavita, A. R., Leo, R., Pratico, D., Violi, F. (1997). Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(6), 999-1006.
- Jahovic, N., Cevik, H., Sehirli, A. O., Yegen, B. C., Sener, G. (2003). Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *Journal of Pineal Research*, 34(4), 282-287.
- Jahovic, N., Sener, G., Cevik, H., Ersoy, Y., Arbak, S., Yegen, B. C. (2004). Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochemistry and Function*, 22(3), 169-178.
- Jick, H., Walker, A. M., Porter, J. (1981). Drug-Induced Liver-Disease. *Journal of Clinical Pharmacology*, 21(8-9), 359-364.
- Jolivet, J., Cowan, K. H., Curt, G. A., Clendeninn, N. J., Chabner, B. A. (1983). The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med*, 309(18), 1094-1104.
- Kane, D., Gogarty, M., O'Leary, J., Silva, I., Bermingham, N., Bresnihan, B., FitzGerald, O. (2004). Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis and Rheumatism*, 50(10), 3286-3295.
- Katzung, B. G. (2004). *Basic and Clinical Pharmacology* (9 ed.). Singapore: The McGraw-Hill Companies.
- Kirk, R. E., Othmer, D. F. (1993). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (A. Seidel and M. Bickford Eds. 4th ed.). New York: John Wiley and Sons.
- Kobayashi, K., Terada, C., Tsukamoto, I. (2002). Methotrexate-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy. *Eur J Pharmacol*, 438(1-2), 19-24.
- Koch, H. K., Gropp, A., Oehlert, W. (1985). Drug-Induced Liver-Injury in Liver Biopsies of the Years 1981 and 1983, Their Prevalence and Type of Presentation. *Pathology Research and Practice*, 179(4-5), 469-477.

- Kogure, K., Ishizaki, M., Nemoto, M., Kuwano, H., Makuuchi, M. (1999). A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 6(2), 171-175.
- Koşar, M., Bozan, B., Temelli, F., ve Başer, K. H. (2002). *Sumak (Rhus Coriaria)*'in Fenolik Bileşikleri Ve Antioksidan Etkileri. Paper presented at the 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.
- Kovacic, P., Jacintho, J. D. (2001). Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem*, 8(7), 773-796.
- Kovacs, G. T., Paal, C., Somlo, P., Koos, R., Schuler, D., Borsi, J. D. (1993). Proteinuria due to suboptimal hydration with high-dose methotrexate therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 33(3), 262-263.
- Koyu, A., Ozguner, F., Yilmaz, H. R., Uz, E., Cesur, G., Ozcelik, N. (2009). The protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on oxidative stress in rat liver exposed to the 900 MHz electromagnetic field. *Toxicology and Industrial Health*, 25(6), 429-434.
- Krakower, G. R., Kamen, B. A. (1983). In situ methotrexate polyglutamate formation in rat tissues. *J Pharmacol Exp Ther*, 227(3), 633-638.
- Kremer, J. M., Galivan, J., Streckfuss, A., Kamen, B. (1986). Methotrexate Metabolism Analysis in Blood and Liver of Rheumatoid-Arthritis Patients - Association with Hepatic Folate-Deficiency and Formation of Polyglutamates. *Arthritis and Rheumatism*, 29(7), 832-835.
- Kroon, P. A., Williamson, G. (1999). Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 355-361
- Kuzu, N., Metin, K., Dagli, A. F., Akdemir, F., Orhan, C., Yalniz, M., Ozercan, I.H., Şahin, K., Bahcecioglu, I. H. (2007). Protective role of genistein in acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *Mediators Inflamm*, 2007, 36381.
- Lauren, J. S. (1998). Basic Concepts in Embryology: A Students Survival Guide. In H. T.G. (Ed.), *Formation of Liver*. United States.: McGraw- Hill Companies.
- Lee, K. S., Buck, M., Houghlum, K., Chojkier, M. (1995). Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest*, 96(5), 2461-2468.
- Lee, M. G., Hanchard, B., Williams, N. P. (1989). Drug-Induced Acute Liver-Disease. *Postgraduate Medical Journal*, 65(764), 367-370.
- Lempereur, I., Rouau, X., Abecassis, J. (1997). Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 25(2), 103-110.
- Levy, M. T., McCaughan, G. W., Marinos, G., Gorrell, M. D. (2002). Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection. *Liver*, 22(2), 93-101.
- Liang, J. F., Akaike, T. (2000). Inhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured mouse hepatocytes by alpha-lipoic acid. *Chem Biol Interact*, 124(1), 53-60.
- Linnebank, M., Pels, H., Kleczar, N., Farmand, S., Fliessbach, K., Urbach, H., Schlegel, U. (2005). MTX-induced white matter changes are associated with polymorphisms of methionine metabolism. *Neurology*, 64(5), 912-913.

- Liu, L., Hudgins, W. R., Shack, S., Yin, M. Q., Samid, D. (1995). Cinnamic Acid - a Natural Product with Potential Use in Cancer Intervention. *International Journal of Cancer*, 62(3), 345-350.
- Logan, R. M., Stringer, A. M., Bowen, J. M., Yeoh, A. S., Gibson, R. J., Sonis, S. T., Keefe, D. M. (2007). The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev*, 33(5), 448-460.
- Los, M., Herr, I., Friesen, C., Fulda, S., SchulzeOsthoff, K., Debatin, K. M. (1997). Cross-resistance of CD95- and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases). *Blood*, 90(8), 3118-3129.
- Lucas, M., Solano, F. (1992). Coelenterazine is a Superoxide Anionsensitive Chemiluminescent Probe: Its Usefulness in the Assay of Respiratory Burst in Neutrophils. *Anal Biochem*, 206, 273-277.
- MacDougall, D. B. (2002). *Colour in Food Improving Quality* (D. B. MacDougall Ed.). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). *Fruit Phenolics* (J. J. Macheix, A. Fleuriet & J. Billot Eds.). Boca Raton: CRC Press.
- Mahnken, A. H., Pereira, P. L., De Baere, T. (2013). Interventional Oncologic Approaches to Liver Metastases. *Radiology*, 266(2), 407-430.
- Maiguma, T., Kaji, H., Makino, K., Teshima, D. (2009). Protective Effects of Amifostine and Cyclooxygenase-1 Inhibitor against Normal Human Epidermal Keratinocyte Toxicity Induced by Methotrexate and 5-Fluorouracil. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105(1), 1-9.
- Malatjalian, D. A., Williams, C. N., Colwell, S. J., Eastwood, B. J. (1996). Methotrexate hepatotoxicity in psoriatics: Report of 104 patients from Nova Scotia, with analysis of risks from obesity, diabetes and alcohol consumption during long term follow-up. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 10(6), 369-375.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Manda, K., Bhatia, A. L. (2003b). Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. *Cell Biol Toxicol*, 19(6), 367-372.
- Manda, K., Bhatia, A. L. (2003a). Melatonin-induced reduction in age-related accumulation of oxidative damage in mice. *Biogerontology*, 4(3), 133-139.
- Martins, P. N., Theruvath, T. P., Neuhaus, P. (2008). Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int*, 28(1), 3-11.
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 108(8), 652-659.
- Mercan, U. (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 15, 91-96.
- Miketova, P., Kaemingk, K., Hockenberry, M., Pasvogel, A., Hutter, J., Krull, K., Moore, I. M. (2005). Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs*, 6(3), 187-195.

- Mitscher, L. A., Telikepalli, H., Wang, P. B. B., Kuo, S., Shankel, D. M., Stewart, G. (1992). Antimutagenicity of Secondary Metabolites from Higher-Plants. *Mutation Research*, 267(2), 229-241.
- Miyazono, Y., Gao, F., Horie, T. (2004). Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 39(11), 1119-1127.
- Moore, K. M. (2002). Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. In M. Yıldırım, İ. Okar and H. Dalçık (Eds.), *Karaciğer Safra Kesesi ve Safra Yollarının Gelişmesi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Muslu, N., Turhan, A. B., Eskandari, G., Atici, A., Ozturk, O. G., Kul, S., Atik, U. (2007). The frequency of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter region (TA)7 polymorphism in newborns and it's relation with jaundice. *Journal of Tropical Pediatrics*, 53(1), 64-68.
- Neuman, M. G., Cameron, R. G., Haber, J. A., Katz, G. G., Malkiewicz, I. M. and Shear, N. H. (1999). Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatocytotoxicity. *Clinical Biochemistry*, 32(7), 519-536.
- Noelker, C., Bacher, M., Gocke, P., Wei, X., Klockgether, T., Du, Y. S., Dodel, R. (2005). The flavanoide caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neuroscience Letters*, 383(1-2), 39-43.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2), 351-358.
- Ozan, H. (2004). Ozan Anatomi. In H. Ozan (Ed.), *Karaciğer* (pp.). Ankara: Nobel Tıp Kitabevi.
- Öztürk, N., Tunalier, Z., Koşar, M., Başer, K. H. (2002). *Petroselinum Crispum, Anethum Graveolens ve Eruca Sativa'nın Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi*. Paper presented at the 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.
- Papaconstantinou, H. T., Xie, C., Zhang, W., Ansari, N. H., Hellmich, M. R., Townsend, C. M., Jr., Ko, T. C. (2001). The role of caspases in methotrexate-induced gastrointestinal toxicity. *Surgery*, 130(5), 859-865.
- Parlakpınar, H., Ozer, M. K., Sahna, E., Vardi, N., Cigremis, Y., Acet, A. (2003). Amikacin-induced acute renal injury in rats: protective role of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 35(2), 85-90.
- Parola, M., Pinzani, M., Casini, A., Albano, E., Poli, G., Gentilini, A., Gentilini, P., Dianzani, M. U. (1993). Stimulation of Lipid-Peroxidation or 4-Hydroxynonenal Treatment Increases Procollagen-Alpha-1 (I) Gene-Expression in Human Liver Fat-Storing Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 194(3), 1044-1050.
- Poli, G. (2000). Pathogenesis of Liver Fibrosis, Role of Oxidative Stres. *Molecular Aspects of Medicine*, 21 (3), 49-98.
- Prosser, C., Yen, R., Wu, J. (2006). Molecular Therapy for Hepatic Injury and Fibrosis: Where are we? *World J Gastroenterol*, 12(4), 509-515.
- Reide, P., Taylor, M. (2000). Antimetabolitler. In H. Ozer (Ed.), *Mosby's Crash Course Farmakoloji* (1 ed.). Ankara: Güneş Tıp Kitabevi.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20(7), 933-956.

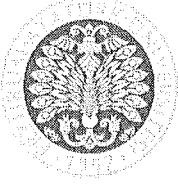
- Richard, S., Guerret, S., Gerard, F., Tebib, J. G., Vignon, E. (2000). Hepatic fibrosis in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate: application of a new semi-quantitative scoring system. *Rheumatology (Oxford)*, 39(1), 50-54.
- Roenigk, H. H., Jr., Auerbach, R., Maibach, H., Weinstein, G., Lebwohl, M. (1998). Methotrexate in psoriasis: consensus conference. *J Am Acad Dermatol*, 38(3), 478-485.
- Romero, F. J., Bosch-Morell, F., Romero, M. J., Jareno, E. J., Romero, B., Marin, N., Roma, J. (1998). Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environmental Health Perspectives*, 106, 1229-1234.
- Rubino, F. M. (2001). Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *Journal of Chromatography B*, 764(1-2), 217-254.
- Russo, F. P., Alison, M. R., Bigger, B. W., Amofah, E., Florou, A., Amin, F., Bou-Gharios, G., Jeffery, R., Iredale, J.P., Forbes, S. J. (2006). The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology*, 130(6), 1807-1821.
- Sadler, T. W. (2005). Langman's Medikal Embriyoloji. In C. Başaklar (Ed.). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Sarsılmaz, M. (2000). *Anotomi* (M. Sarsılmaz Ed.). Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.
- Scherlock, S., Dooley, S. (2002). Diseases of the Liver and Biliary System. In S. Scherlock & S. Dooley (Eds.), *Anatomy and Function*. 11 ed. Milan, Italy: Blackwell Publishing, 1-17.
- Sener, G., Eksioğlu-Demiralp, E., Cetiner, M., Ercan, F., Yegen, B. C. (2006). Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol*, 542(1-3), 170-178.
- Serarslan, G., Altug, E., Kontas, T., Atik, E., Avci, G. (2007). Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clin Exp Dermatol*, 32(6), 709-715.
- Shahidi, F., Naczki, M. (1995). *Food Phenolics, Sources, Chemistry, Effects, Applications* (F. Shahidi & M. Naczki Eds.). Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc.
- Shahidi, F., Chandrasekara, A. (2010). Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 147-170.
- Shimizu, I. (2001). Antifibrogenic therapies in chronic HCV infection. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 1(2), 227-240.
- Shiraishi, T., Owada, M. K., Tatsuka, M., Yamashita, T., Watanabe, K., Kakunaga, T. (1989). Specific inhibitors of tyrosine-specific protein kinases: properties of 4-hydroxycinnamamide derivatives in vitro. *Cancer Res*, 49(9), 2374-2378.
- Sinclair, A. J., Barnett, A. H., Lunec, J. (1990). Free-Radicals and Antioxidant Systems in Health and Disease. *British Journal of Hospital Medicine*, 43(5), 334-335.
- Slater, T. F. (1984). Overview of Methods Used for Detecting Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol*, 105, 283-293.
- Smith, S. W., Nelson, L. S. (2008). Case files of the New York City Poison Control Center: antidotal strategies for the management of methotrexate toxicity. *J Med Toxicol*, 4(2), 132-140.
- Snell, R. (2008). *Clinical Anatomy by Regions* (C. Taylor, K. Horvath and V. Sanders Eds. 8 ed.). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

- Sosulski, F., Krygier, K., Hogge, L. (1982). Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic-Acids .3. Composition of Phenolic-Acids in Cereal and Potato Flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 337-340.
- Söylemezoğlu, G. (2003). Üzümde Fenolik Bileşikler. *Gıda*, 28(3), 277-285.
- Spacil, Z., Novakova, L., Solich, P. (2008). Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta*, 76(1), 189-199.
- Spanos, G. A., Wrolstad, R. E. (1992). Phenolics of Apple, Pear, and White Grape Juices and Their Changes with Processing and Storage-a Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1478-1487.
- Sudina, G. F., Mirzoeva, O. K., Pushkareva, M. A., Korshunova, G. A., Sumbatyan, N. V., Varfolomeev, S. D. (1993). Caffeic Acid Phenethyl Ester as a Lipoxygenase Inhibitor with Antioxidant Properties. *FEBS Lett*, 329(1-2), 21-24.
- Şahan, C., Öztürk, M. (2003). Kanser Kemoterapisi ve Karaciğer. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 20, 47-60.
- Şeftalioğlu, A. (1998). *Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi* (A. Şeftalioğlu Ed. 3 ed.). Ankara: Tıp teknik yayıncılık Ltd. Şti.
- Şendur, N., Karaman, G., Şavk, H., Şahinkarakaş, E. (2002). Akut Metotreksat Toksisitesinin Erken Belirtisi; Deri Ülserleri. *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 593-596.
- Ter Borg, E. J., Seldenrijk, C. A., Timmer, R. (1996). Liver cirrhosis due to methotrexate in a patient with rheumatoid arthritis. *Neth J Med*, 49(6), 244-246.
- Tomas-Barberan, F. A., Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1024-1032.
- Totan, M., Ak, A. R., Albayrak, D. (1999). Yüksek Doz Metotreksat Tedavisine Bağlı Karaciğer ve Böbrek Toksisitesi. *T Klin J Pediatr*, 8, 185- 188.
- Uraz, S., Tahan, V., Aygun, C., Eren, F., Yuksel, M., Unluguzel, G., Tozun, N. (2005). Role of ursodeoxycholic acid in the prevention of methotrexate induced liver toxicity. *Journal of Hepatology*, 42, 255-255.
- Uysal, M. (1998). Serbest Radikaller, Lipit Peroksitleri ve Organizmada Prooksidan Antioksidan Dengeyi Etkileyen Koşullar. *Klinik Gelişim*, 11, 336-340.
- Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Perez-Vicente, A., Garcia-Viguera, C. (2004). In vitro gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 135-138.
- Van Dyke, K., Patel, S., Vallyathan, V. (2003). Lucigenin chemiluminescence assay as an adjunctive tool for assessment of various stages of inflammation: a study of quiescent inflammatory cells. *J Biosci*, 28(1), 115-119.
- Van Ede, A. E., Laan, R. F. J. M., Blom, H. J., De Abreu, R. A., van de Putte, L. B. A. (1998). Methotrexate in rheumatoid arthritis: An update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 27(5), 277-292.
- Vardi, N., Parlakpinar, H., Cetin, A., Erdogan, A., Cetin Ozturk, I. (2010). Protective effect of beta-carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol Pathol*, 38(4), 592-597.

- Vardi, N., Parlakpınar, H., Ozturk, F., Ates, B., Gul, M., Cetin, A., Otlu, A. (2008). Potent protective effect of apricot and beta-carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol*, 46(9), 3015-3022.
- Vatansever, H. S., Umur, A. S., Inan, V. S., Selcuki, M. (2003). The effects of methotrexate on the development of neural tube defects in the chick embryo. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 27(5), 1119-1125.
- Videla, L. A., Correa, L., Rivera, M., Sir, T. (1993). Zymosan-induced luminol-amplified chemiluminescence of whole blood phagocytes in experimental and human hyperthyroidism. *Free Radic Biol Med*, 14(6), 669-675.
- Wallace, G., Fry, S. C. (1994). Phenolic Components of the Plant-Cell Wall. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 151, 151, 229-267.
- Wang, H., Wei, W., Wang, N. P., Gui, S. Y., Wu, L., Sun, W. Y., Xu, S. Y. (2005). Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sci*, 77(15), 1902-1915.
- William, K. O., Patrick, C. N. (2009). *Netter's Essential Histology* (S. Müftüoğlu, M. Kaymaz and P. Atilla Eds.). Ankara: Güneş Kitabevi.
- www.toraks.com.tr.
- Yagmurca, M., Erdogan, H., Iraz, M., Songur, A., Ucar, M., Fadillioglu, E. (2004). Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clin Chim Acta*, 348(1-2), 27-34.
- Yağcı, C., Toker, M. C., Toker, G. (2008). Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoidler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1(1), 47-58.
- Yanbeyi, S. (1999). *Aspirin Ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole'ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri*. (Doktora Tezi), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun.
- Yildiz, Y., Serter, M., Ek, R. O., Ergin, K., Cecen, S., Demir, E. M., Yenisey, C. (2009). Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on intestinal ischemia-reperfusion injury. *Dig Dis Sci*, 54(4), 738-744.
- Young, I. S., Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139-162.
- Yüncü, M., Kanter, M. (2006). Farelerde Metotreksatın İnce Bağırsak Mukozasında Yaptığı Hasara Karşı E Vitamininin Koruyucu Etkisi: Elektron Mikroskopik Çalışma. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 4(2), 1-6.
- Zadak, Z., Hyspler, R., Ticha, A., Hronek, M., Fikrova, P., Rathouska, J., Hrnčiarikova, D., Stetina, R. (2009). Antioxidants and Vitamins in Clinical Conditions. *Physiological Research*, 58, 13-17.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	:Özge ARSLAN
Doğum tarihi	:25.05.1990
Doğum yeri	:Erzincan
Medeni hali	:Evli, 1 çocuk
Uyruğu	:T.C.
Adres	:Talatpaşa bul. Sakarya mah. 135/14 Ankara/Altındağ
Tel	:0534 886 16 12
E-mail	:ozgearsan2505@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	:Erzincan Milliyet Anadolu Öğretmen Lisesi, 2008
Lisans	:Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü (2009-2013)
Yüksek Lisans	:Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı (2014-2016)



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1600267123
Konu : HADYEK Kararı.

10.11.2016

HUKUK MÜŞAVİRLİĞİNE

İlgi : 18.10.2016 tarihli ve 77040475-000-E.1600241852 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 04.11.2016 tarih ve 7 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 148 no'lu kararı ile sözkonusu Yüksek Lisans Tezi çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz ederim.

Toplantı Tarihi: 04.11.2016

Toplantı Sayısı : 7

KARAR NO 148: Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR'in yürütücülüğünde, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında ve Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **"Sıçanlarda Methotrexate İle Oluşturulan Karaciğer Hasarına Karşı Trans-3-Hydroxycinnamic Acid'in Etkisinin Araştırılması"** başlıklı Yüksek Lisans Tezi çalışması ile ilgili 18.10.2016 tarih ve 77040475-000-E.1600241852 sayılı Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü, Hukuk Müşavirliği yazısı ekindeki Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Rektörlüğünün 12.10.2016 tarih ve 53108037-600-E.19206 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen Yüksek Lisans Tezi çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#!birim=veteriner-fakultesi>

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı



TEZ DEĞERLENDİRME FORMU

25/11/2016

Yrd.Doç.Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR danışmanlığında yürütülen yüksek lisans öğrencisi Özge ARSLAN'a ait 'Sıçanlarda Methotrexate ile Oluşturulan Karaciğer hasarına karşı trans-3-Hydroxycinnamic Acid'in Etkisinin Araştırılması' başlıklı tez için iThenticate programında yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdadır.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.



İmza

Öğrenci Adı-Soyadı
Özge ARSLAN



İmza

Danışman Adı-Soyadı
Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR

BENZERLİK ORANLARI:

ÖZET	: % 4
ABSTRACT	: % 19
GİRİŞ BÖLÜMÜ	: % 15
KAYNAK ÖZETLERİ BÖLÜMÜ	: % 29
MATERYAL VE YÖNTEM BÖLÜMÜ	: % 21
ARAŞTIRMA BULGULARI BÖLÜMÜ	: % 21
TARTIŞMA BÖLÜMÜ	: % 17
SONUÇ BÖLÜMÜ	: % 0