

**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA METHOTREXATE TARAFINDAN OLUŞTURULAN
OKSİDATİF KARACİĞER HASARI ÜZERİNE
ALFA LİPOİK ASİDİN ETKİLERİ**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ALİ ÇETİNKAYA**

**DR. EBRU AYDINLIK
UZMANLIK TEZİ**

KAHRAMANMARAŞ - 2011

TEŞEKKÜR

İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında, konunun seçiminden araştırmanın yürütülmesi ve yazımına kadar her konuda beni destekleyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ali Çetinkaya'ya;

Uzmanlık eğitimim süresince bana büyük emek veren, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren başta bölüm başkanımız Sayın Doç. Dr. Mehmet Sayarlıoğlu olmak üzere Sayın Doç. Dr. Hayriye Sayarlıoğlu, Sayın Doç. Dr. Mesut Özkaya, Sayın Doç. Dr. Ekrem Dođan, Sayın Doç. Dr. Bülent Kantarçeken, Sayın Yrd. Doç. Dr. Kamile Gül, Sayın Uzm. Dr. Gözde Yıldırım Çetin ve Sayın Uzm. Dr. Orçun Altunören'e;

Tezimin deney aşamasında her türlü yardımı benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ergül Belge Kurutaş, Sayın Doç. Dr. Ertan Bülbülođlu, Sayın Doç. Dr. Davut Özbađ'a, histopatolojik incelemeleri titizlikle yapan Sayın Doç. Dr. Harun Çıralık ve Dr. Şule Ağırbaş'a, projemizi destekleyen Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine;

Rotasyonlarım süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Doç. Dr. Nurhan Köksal, Sayın Doç. Dr. Ömer Faruk Kökođlu, Sayın Doç. Dr. Hasan Uçmak, Sayın Doç. Dr. Gülizar Sökmen, Sayın Yrd. Doç. Dr. Gürkan Acar, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Akçay'a;

Asistanlığım boyunca beraber çalıştığımız tüm asistan, hemşire arkadaşlarımıza ve personelimize;

Beni hep destekleyen ve bugünlere gelmemde büyük katkısı olan sevgili eşim Halil İbrahim Aydınlık'a ve varlıkları ile benim yaşam kaynağım olan çocuklarım Yunus Emrah ve Onur Nail'e sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Ebru AYDINLIK
Kahramanmaraş, 2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa no:

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
KISALTMALAR	vi
ÖZET.....	viii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karaciğerin Anatomisi ve Histolojisi	3
2.2. Karaciğerin Fonksiyonları	5
2.2.1. Metabolik Fonksiyonları	5
2.2.2. Sekretuar Fonksiyonu.....	6
2.2.3. Detoksifikasyon Fonksiyonu	6
2.2.4. Karaciğerin Diğer Önemli Fonksiyonları.....	6
2.3. İlaçlarla Oluşan Karaciğer Hasarları	7
2.4. Serbest Radikaller	8
2.4.1. Giriş.....	8
2.4.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri:.....	9
2.4.3. Serbest Radikallerin Etkileri	11
2.4.4. Myeloperoksidaz (MPO).....	13
2.4.5. Karaciğerde Serbest Radikal Hasarı.....	13
2.5. Methotrexate (MTX)	14
2.5.1. Folik Asit Antagonisti Olarak MTX'in Mekanizması	15
2.5.2. MTX'in Toksik Etkileri :	16
2.5.3.Methotrexate ve Karaciğer Toksisitesi:.....	16
2.5.4. MTX Toksisitesi ve Oksidatif Stres:.....	17
2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri	18
2.6.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	18
2.6.2. Enzimatik Antioksidanlar.....	20
2.6.3. Nonenzimatik antioksidanlar.....	20

2.6.4. Oksidatif Karaciğer Hasarının Önlenmesinde Antioksidanların Yeri.....	21
2.7. Alfa Lipoik Asit	21
2.7.1. Lipoik Asitin Genel Özellikleri ve Kaynakları	22
2.7.2. Lipoik Asitin Yapısı, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	22
2.7.3. Lipoik Asidin Antioksidan Özellikleri ve Klinik Endikasyonları.....	23
2.7.4. ALA Eklenmesinin Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Deney Hayvanları.....	25
3.2. Deney grupları ve deney protokolü	25
3.3. Kan ve Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Çalışılması	26
3.4. Karaciğer Dokusunda Oksidan ve Antioksidan Belirteçlerin Ölçülmesi.....	26
3.4.1. Karaciğer Dokusunda Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Ölçülmesi (Lipid Peroksidasyonu Değerlendirilmesi)	26
3.4.2. Karaciğer Dokusunda MPO Aktivitesinin Ölçülmesi	27
3.4.3. Karaciğer Dokusunda SOD Aktivitesinin Ölçülmesi.....	27
3.4.4. Karaciğer Dokusunda CAT Aktivitesinin Ölçülmesi.....	27
3.4.5. Karaciğer dokusunda GSH Düzeyinin Ölçülmesi.....	28
3.5. Karaciğer Dokularının Histopatolojik İncelenmesi.....	28
3.6. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR	29
4.1. Kan Biyokimyası Sonuçları	29
4.2. Karaciğer Doku Biyokimyası Sonuçları	29
4.2.1. MDA Düzeyleri.....	29
4.2.2. MPO Aktivitesi	30
4.2.3. Doku Antioksidan Düzeyi Sonuçları.....	30
4.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları.....	32
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	39
7. KAYNAKLAR.....	40

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. İlaçlarla oluşan karaciğer hasarları ve histolojik tipleri

Tablo 2. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri (oksidanlar)

Tablo 3. Karaciğer dokusundaki mikroskobik bulguların skorlanması (Roenigk skorlaması)

Tablo 4. ALA'in karaciğer enzim düzeylerine olan etkileri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Karaciğerin anterior ve posteriordan görünüşü

Şekil 2. Karaciğerin fonksiyonel en küçük birimi olan lobülün şematik yapısı

Şekil 3. MTX'in moleküler yapısı

Şekil 4. FA'in ve dihidrofolatın moleküler yapısı

Şekil 5. Lipoik asid ve DHLA 'in yapısı

Şekil 6. ALA'in MTX'a bağlı toksisitede MDA düzeyleri üzerine etkileri

Şekil 7. ALA'in MTX'a bağlı toksisitede MPO düzeyleri üzerine etkisi

Şekil 8. ALA'in MTX'a bağlı toksisitede GSH düzeyleri üzerine etkisi

Şekil 19. ALA'in MTX'a bağlı toksisitede CAT düzeyleri üzerine etkisi

Şekil 10. ALA'in MTX'a bağlı toksisitede SOD düzeyleri üzerine etkileri

KISALTMALAR

ALA	: Alfa lipoik asid
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
ALP	: Alkalen Fosfataz
CAT	: Katalaz
CCl₄	: Karbontetraklorür
Cu	: Bakır
DTNB	: 5,5'ditiyobis 2-nitrobenzoik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DHLA	: Dihidrolipoik Asit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus / İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
FA	: Folik Asit
FH₂	: Dihidrofolat
FH₄	: Tetrahidrofolat
GGT	: Gamaglutamil Transferaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş Glutasyon
HE	: Hematoksilen Eozin
HeLa	: Kendini yenileyebildiği için kanser gibi türlü araştırmalarda kullanılan hücreler
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HOCl	: Hipoklorik asit
IL-1β	: İnterlökin-1 β
ip	: İntraperitoneal
INT	: P-iyodonitrotetrazolium viyoleto
LA	: Lipoik Asit
LDH	: Laktik Dehidrogenaz
M	: Mol
MPO	: Myeloperoksidaz
MDA	: Malondialdehit
MTX	: Methotrexate
MnSOD	: Mitokondrial Süperoksit Dismutaz

NADP	: Nikotinamid Adenozin Dinükleotid Fosfat
NADPH	: İndirgenmiş Nikotinamid Adenozin Dinükleotid Fosfat
NBT	: Nitrobluetetrazolium
O₂	: Oksijen
O₂^{•-}	: Süperoksit Radikali
¹O₂	: Singlet Oksijen
•OH	: Hidroksil Radikali
RA	: Romatoid Artrit
RNA	: Ribonükleikasit
ROS	: Reactive Oxygen Species=Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksitdismutaz
SSS	: Santral Sinir Sistemi
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
SF	: Serum Fizyolojik
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α)
Zn	: Çinko

ÖZET

RATLARDA METHOTREXATE TARAFINDAN OLUŞTURULAN OKSİDATİF KARACİĞER HASARI ÜZERİNE ALFA LİPOİK ASİDİN ETKİLERİ

Giriş ve Amaç: Methotrexate (MTX), sıklıkla malignitelerde ve bunun yanı sıra çeşitli inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılan sitotoksik kemoterapötik bir ajan olup, bir folik asit antagonistidir. Bu ajanın etkinliği genellikle ciddi yan etkiler ve toksik durumlar dolayısıyla sınırlanmaktadır. MTX, progressif hepatik fibroz ve siroz gibi karaciğer toksisitelerine sebep olabilmektedir. Bu çalışma, bir antioksidan bileşik olarak alfa lipoiik asidin (ALA), MTX'a bağlı oksidatif karaciğer hasarınının tedavisinde faydalı etkileri olup olmadığını belirlemek amacıyla yapıldı.

Yöntem ve Gereçler: Bu çalışmada her biri 200-250 gr ağırlığında 32 Wistar albino rat kullanıldı. 1. gruptaki (kontrol grubu) ratlara sadece 1 ml serum fizyolojik (SF) intraperitoneal olarak verildi. 2. gruptaki (MTX grubu) ratlara intraperitoneal olarak sadece tek doz 20 mg/kg MTX verildi ve 5 gün için günlük 1 ml SF verildi. 3. gruptaki (MTX+ALA grubu) ratlara intraperitoneal olarak sadece tek doz 20 mg/kg MTX verildi ve daha sonra 5 gün için günlük 50 ml/kg ALA verildi. 4. gruptaki (ALA grubu) ratlara intraperitoneal olarak sadece tek doz 1 ml SF verildi ve daha sonra 5 gün için günlük 50 ml/kg ALA verildi. Çalışmanın sonunda (6. gün) ratlar sakrifiye edildi ve karaciğer enzim düzeyleri için kardiak kan alındı. Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) ve myeloperoksidase (MPO) düzeyleri için karaciğer örnekleri alındı. Karaciğer dokusunda MDA, GSH, SOD, CAT ve MPO düzeyleri ölçüldü. Kan ALT, AST, total bilirubin (T.Bil), alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri ölçüldü ve karaciğer örnekleri histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: MTX grubunda serum AST düzeyi kontrol grubundan daha yüksek, serum ALT ve ALP düzeyi daha düşük iken; MTX tedavisine ALA tedavisi eklendiğinde serum AST düzeyinin azaldığı, serum ALT ve ALP düzeylerinin önemli oranda değişmediği gözlemlendi. Serum GGT ve T.Bil düzeyleri değerlendirildiğinde; gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Karaciğer doku örneklerinde MDA ve MPO düzeyleri MTX grubunda anlamlı olarak artarken, bu düzeylerin tedavi grubunda anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edildi. Doku antioksidan düzeyleri değerlendirildiğinde; SOD ve CAT'ın, MTX grubunda belirgin olarak arttığı; ancak ALA tedavisiyle gerilediği tespit edildi. Öte yandan, kontrollerle

karşılaştırıldığında MTX kullanımının, rat karaciğerinde GSH'ı anlamlı olarak azalttığı tespit edildi. Ancak, MTX tedavisine ALA eklendiğinde, GSH düzeylerinde anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Karaciğer dokularının histopatolojik olarak değerlendirilmesinde ise tüm gruplarda anlamlı bir fark görülmedi.

Sonuçlar: Bu sonuçlar, MTX'a bağlı oksidatif karaciğer hasarına karşı ALA'in koruyucu bir ajan olduğunu gösterdi. Ancak daha uzun maruziyet süresi ve kimyasal maddelerin farklı dozda tedavi seçenekleri ile toksisite modelleri inceleyen başka çalışmalar yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Methotrexate, oksidatif stres, karaciğer hasarı, alfa lipoik asit.

SUMMARY

EFFECTS OF ALPHA LIPOIC ACID TO THE LIVER OF RATS IN WHICH OXIDATIVE DAMAGE WAS INDUCED BY METHOTREXATE

Objective: Methotrexate (MTX), a folic acid antagonist, is widely used as a cytotoxic chemotherapeutic agent for malignancies, as well as in the treatment of various inflammatory diseases. The efficacy of this agent often is limited by severe side effects and toxic conditions. MTX may cause liver toxicities such as progressive hepatic fibrosis and cirrhosis. The present study was undertaken to determine whether alpha lipoic acid (ALA), as a antioxidant compound, could ameliorate MTX-induced oxidative liver injury.

Material and Methods: Thirty two Wistar albino rats weighing 200-250 g each, were used in this study. Only 1 ml SF was given in peritoneum of rats which were in first group (control group). 20 mg/kg MTX was given only one dose and 1 ml SF was given in a day for five day in peritoneum of rats which were in second group (MTX group). 20 mg/kg MTX was given only one dose and then 50 mg/kg ALA was given in a day for five day in peritoneum of rats which were in third group (MTX+ALA group). 1 ml SF was given only one dose and then 50 mg/kg ALA was given in a day for five days in peritoneum of rats which were fourth group (ALA group). At the end of this study (sixth day) rats were sacrificed and blood was taken from heart for liver enzyme levels. And then for malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and myeloperoxidase (MPO) levels and liver specimens was taken. MDA, GSH, SOD, CAT, and MPO levels were measured in liver tissue. Blood ALT, AST, total bilirubin (T.Bil), alkaline phosphatase (ALP) and gama glutamyl transpeptidase (GGT) were measured and then liver specimens were observed histopathologically.

Results: Serum AST level was higher, serum ALT and ALP level was lower in MTX group than control group when ALA treatment was added to MTX treatment, serum AST level decreased, serum ALT and ALP level didn't change importantly. The levels of GGT and T.Bil were observed not to differ significantly among the groups. While MDA and MPO levels in the liver tissue samples increased significantly in the MTX group, those levels were determined to be decreased significantly in treatment group. When the tissue antioxidant levels were evaluated; SOD and CAT increased markedly in the MTX group, but decreased following the treatment with ALA. On the other hand, MTX administration significantly decreased GSH in the rat liver compared with controls. However, when ALA was added to

the MTX treatment, there was no significant difference GSH levels. In the histopathological evaluation of liver tissues there was no significant difference in all groups.

Conclusion: These results showed, that ALA is a protective agent against MTX-induced liver oxidative injury. However studies investigating toxicity models with longer exposure time and treatment options with different doses of chemicals would be of benefit in further research.

Key Words: Methotrexate, oxidative stres, liver injury, alpha lipoic acid.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer, vücudun birçok metabolik olaylarının meydana geldiği, ilaçların ve diğer maddelerin metabolizmasında ve detoksifikasyonunda önemli rol oynayan bir organdır. Aynı zamanda kendisi de toksik etkilere karşı risk altında kalmaktadır.¹ Hepatitler, kanserler, toksinler ve ilaçlar gibi birçok etken karaciğerde hasar oluşturmaktadır. Karaciğerde meydana gelen hasarlanma etkin bir rejenerasyon ve onarımla cevaplanmazsa normal karaciğer yapısı bozulur.^{2 3 4} Bu sebeple, siroza kadar gidebilecek karaciğer hasarlarının daha başlangıç döneminde engellenmesi önem kazanmaktadır. Çeşitli nedenlerle oluşan karaciğer hasarlarında karaciğer koruyucu ajanların kullanımı, morbidite ve mortaliteyi önemli oranda azaltabilir ve sağkalım oranlarını yükseltebilir.

Karaciğer hasarında önemli mekanizmalardan biri oksidatif streştir. İlaç/toksin metabolitleri, iskemi/reperfüzyon ve alkol metabolizmasının sonucunda ortaya çıkan ve reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species=ROS) olarak bilinen süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroksietil radikalleri gibi ürünler, hepatositlerin nekroz ve apopitozu ile ilgilidir ve hepatik stellat hücre aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır.⁵ Hücrede reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. Hücrede oluşan ROS, antioksidanlar olarak bilinen mekanizmalarla dengede tutulur. Oksidatif stres; hücresele oksidan/antioksidan dengenin oksidan lehine bozulması olarak tarif edilebilir.⁶ 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 hasarlarında patogeneizde rol aldığı bilinmektedir.^{7 8} Yapılan birçok çalışmada karaciğer hastalıklarında oksidatif stres ve buna bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.⁹ Bu nedenle son yıllarda antioksidan moleküllerin terapötik amaçlı kullanımı artmıştır.

Methotrexate (MTX), bir folik asit antagonisti olup, sitotoksik kemoterapötik bir ajandır. Psöriazis, dermatomyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit gibi çeşitli inflamatuvar hastalıkların tedavisinde, malignitelerde kullanımı yaygındır. Etkili bir ilaç olmasına rağmen, sıklıkla yan etki ve toksik etkileri nedeni ile kullanımı kısıtlanmaktadır. Uzun süreli tedavi sırasında progressif hepatik fibroz ve sirozu içeren karaciğer toksisitesine sebep olabilmektedir. MTX ile indüklenen toksisitenin mekanizması tam açıklanamamıştır. Ancak birçok faktörün etkileşimi sonucu olduğu belirlenmiştir. MTX'in ana metaboliti olan 7-hidroksimetotrekstat'a dönüşümü karaciğerde gerçekleşir. MTX, poliglutamat formunda

karaciğerde depolanır. Uzun süreli MTX tedavisi poliglutamatların birikimine ve folat seviyelerinin düşmesine neden olabilir. Poliglutamatların yüksek seviyesi MTX'in hepatotoksik etkisinde önemli bir mekanizma sayılmaktadır. Yine MTX, sitozolik nikotinamid adenin difosfat (NADP)-bağımlı dehidrogenaz ve NADP malik enzimi inhibe eder. İntraselüler indirgenmiş nikotinamid adenin difosfat (NADPH) düzeylerinde azalmaya neden olur. NADPH, sitozolik bir antioksidandır. Glutasyon redüktaz enzimi için esansiyel olup redükte glutasyon (GSH) seviyelerinin destekleyicisidir. MTX'dan dolayı GSH'da azalma, reaktif oksijen radikallerine karşı antioksidan etkinliğin zayıflamasına yol açar.¹⁰

Çeşitli çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engellemek veya oksidan/antioksidan dengeyi sağlamak için antioksidan olarak nitelendirilen birçok farmakolojik madde kullanılmıştır. Alfa lipoik asid (ALA), fizyolojik sistemlerde doğal olarak bulunan, tiyol grubu içeren temel bir bileşiktir ve antioksidan aktivitesi vardır.¹¹ Ekzojen olarak verildiğinde serbest radikal temizleyici, metal şelasyonu ve vitamin E, askorbik asid ve glutasyonun rejenerasyonu gibi antioksidan özellikler gösterir.¹²

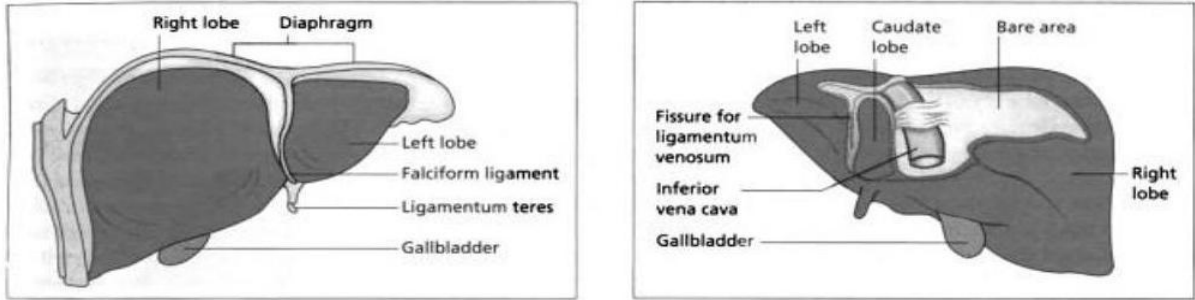
Lipoik asidin (LA) antioksidan enzimler üzerine etkisini araştırmak için de birçok çalışma yapılmıştır. ALA'nın; klinik olarak mantar zehirlenmesi ve metal toksisitesinin tedavisinde kullanılmanın yanı sıra; iskemi-reperfüzyon hasarı, diyabet, katarakt oluşumu, HIV aktivasyonu, nörodejenerasyon ve radyasyon hasarı gibi çeşitli oksidatif stres modellerinde yararlı olduğu ortaya konulmuştur.¹³

Bu tez çalışmasında amaç, ratlarda MTX ile deneysel olarak oluşturulan oksidatif karaciğer hasarı üzerine, güçlü bir antioksidan olan ALA'nın olası yararlı etkilerini araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğerin Anatomisi ve Histolojisi

Karaciğer insan vücudunun deriden sonra en büyük organıdır. Yaklaşık olarak 1.5-2 kg normal ağırlığa sahiptir. Abdominal boşluğun üst bölümünde sağ hipokondriak ve epigastrik bölgenin büyük bir kısmını kapsar.¹⁴ Sağ ve sol olmak üzere iki ana lobdan oluşur (Şekil 1). Karaciğeri iki ana loba ayıran falsiform ligament, karaciğerin ön yüzünü diafragmağa bağlar. Vena kava'nın solundaki peritoneal uzantılarla birleşir. Hepatoduodenal ligament karaciğeri duodenumun üst kısmı ile birleştirir. Bu ligamentin uç kısmı hepatik arter, portal ven safra yolları, sinirler ve lenfatik damarları içerir. Bu yapılar karaciğerin transvers portal fissürü ile birleşir. Bu fissürün arkasında kaudat lob önünde kuadrat lob vardır. Kuadrat lob sağda safra kesesi, solda ise umbilikal fissür ile sınırlanır.^{15 16 17 18}

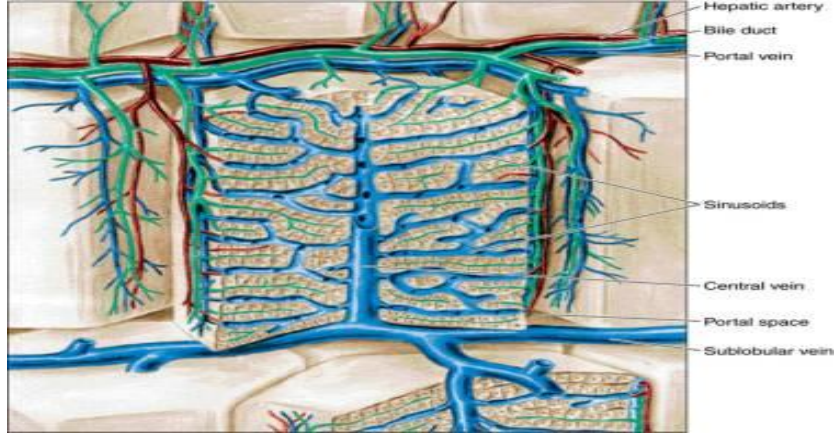


Şekil 1. Karaciğerin anterior ve posteriordan görünüşü.¹⁷

Karaciğer kollojen ve elastik lifler içeren özel bir kapsül (Glisson kapsülü) ile kaplanmıştır. Bu fibröz kapsül kanal ve damarlarla birlikte karaciğerin en derin noktasına gider.^{14 19} Bu kapsül aynı zamanda lobülleri de oluşturur. Lobüller arasında yerleşim gösteren portal triad ise safra kanalı, portal ven ve hepatik arter dallarını ve lenfatik damarları içerir.²⁰ Karaciğer, kalp debisinin yaklaşık %25'ini alır, böylece 1500 ml/dk kanla sulanır. Karaciğerin kanlanması hem hepatik arter, hem de portal ven aracılığıyla olur. Bu iki ana damar porta hepatis adı verilen bir fissür aracılığıyla sağ lobun alt yüzünden karaciğere girerler. Hepatik arter çölyak arterin bir kolu olup, karaciğere gelen kanın yaklaşık olarak %20-25'ini sağlar. Hepatik arter dallanarak interlobüler arterleri oluşturur.¹⁷ Portal ven sindirim kanalı, dalak, pankreas ve safra kesesinden gelen kanı karaciğere ulaştırır ve karaciğere gelen kanın yaklaşık olarak %75-80'ini sağlar. Portal kan akımı tüm ince barsakların venöz drenajını sağlar. İnce barsaklardan emilen maddelerin çoğu portal ven yoluyla karaciğere ulaşır, sadece şilomikronlar lenfatik yolla taşınır.¹⁶ Böylece ince bağırsakta besin değeri zengin maddeleri

ve beraberinde ilaçları ve zehirli maddeleri karaciğere taşır. Karaciğer venlerinde 200-400 ml kadar kan birikir. Bu kan, muhtemel şok veya hipovolemide sistemik dolaşımın takviye edilmesinde kullanılır.^{21 22} Karaciğere gelen kan klasik olarak karaciğer lobülünün çevresinden merkeze doğru akar ve karaciğer içinde portal venüllere ve oradan da sinüzoidlere boşalır.¹⁷ Bundan sonra santral vene ulaşır. Karaciğer içindeki santral venler birleşerek hepatik venleri oluşturur.¹⁹ Hepatik vene gelen kan, inferiyor vena kava'ya ulaşarak karaciğeri terk eder.^{15 17 23} Karaciğerde sentezlenen safra, kanaliküller aracılığı ile intrahepatik safra kanalcıklarına, buradan da sağ ve sol karaciğer safra kanallarına doğru akar. Sağ ve sol safra kanalları porta hepatisse birleşerek ortak safra kanalını (duktus hepatikus komminis) oluşturur. Karaciğerden çıkan duktus hepatikus komminis safra kesesinden gelen sistik kanalla birleşerek duktus koledokus adıyla, duodenuma boşalır.^{16 19} Karaciğerin temel yapısını hepatositler oluşturur. Bu epitelyal kökenli hücreler karaciğerin en küçük yapısal birimi olan lobülleri oluştururlar (Şekil 2). Lobüller yaklaşık 0,7x2 mm boyutlarında poligonal yapılardır. Lobüller arasındaki yakın komşuluğa rağmen her bir lobülün çevresinde bir portal boşluk bulunur. Bu boşlukta her bir lobül için 3-6 adet portal triad yer alır.²⁴ Lobülün ortasında bir santral ven yer alır ve hepatositler bu venden portal boşluğa doğru bir veya iki kat hücreden oluşan ışınal bir dizilim gösterir. Bu hepatosit dizileri arasında kapiller ağ içeren sinüsoidler bulunur. Hepatositler ile kapiller endotel hücreleri arasında Disse aralığı bulunur. Hepatositlerin mikrovillusları bu aralığa uzanırken, kapiller endotel yüzündeki porlar da bu aralığa açılır. Bu özel porlu yapı sayesinde hepatositler ile kapiller damarlar arasında makromolekül transferi gerçekleşebilmektedir. Sinüzoidler, kapiller endotelin luminal yüzeyinde mononükleer fagositler serisinden Kupffer hücrelerini içerir. bu hücrelerin başlıca fonksiyonları; yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini sindirmek, bakterileri, virüsleri, tümör hücrelerini ve parazitleri etkisizleştirmektir.^{16 24 25}

Sinüzoidlerin duvarında stellat hücreler de denilen ve A vitamini metabolizmasında rol alan yağ depolayıcı İto hücreleri bulunur. Karaciğerdeki hücrelerin yaklaşık %30'una karşılık gelen retikuloendotelyal hücrelerin 1/3'ünü Kupffer hücreleri oluşturur. Retikuloendotelyal hücreler hepatositleri destekleyen hücreler olduğu gibi, fagositoz ve sitokinlerin salınımı gibi daha özel işlevlere de sahiptir.



Şekil 2. Karaciğerin fonksiyonel en küçük birimi olan lobülün şematik yapısı.²⁴

2.2. Karaciğerin Fonksiyonları

Karaciğer vücudun hemen her türlü metabolik fonksiyonunda rol oynayan bir organdır. Karaciğerin organizma için ne kadar vazgeçilmez fonksiyonları olduğunu anlamak için, kanlanmasına ve genel dolaşım içerisinde yerleştiği stratejik konuma bakmak yeterlidir. Özofagusun abdominal parçasından itibaren, mide duodenum-jejunum-ileum, kalın bağırsakların tümü ve hatta dalak ve pankreasın tüm venöz kanı, içindekilerle beraber kalbe dönmeye önce işlenmek üzere karaciğerden geçmek zorundadır. Bu durum karaciğeri, metabolik faaliyetlerin merkezi konumuna getirmektedir.¹⁹ Karaciğer gastrointestinal sistemden emilen besinlerin metabolize edildiği ve depolandığı organdır. Bu yüzden sindirim sistemi ile kan arasında bir geçiş bölgesi oluşturur.¹⁶ Metabolitlerin işlenmesi, toksik maddelerin safra ile nötralizasyonu ve atılması açısından önemli role sahiptir. Ayrıca karaciğerin başta albumin olmak üzere birçok proteinin sentezlenmesinde önemli bir işlevi vardır.

2.2.1. Metabolik Fonksiyonları

Karaciğer karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında kritik görevler gerçekleştirir. Özellikle kanda normal glukoz konsantrasyonunun devamlılığının sağlanmasında önemli rol oynar. Glikojenin depo edilmesi ve glikojenoliz, glukoneogenez, glukozun pentoz fosfat yolunda yıkımı, galaktoz ve fruktozun glukozla dönüştürülmesi, glukozun diğer monosakkaritlere ve yağla dönüştürülmesi gibi görevleri vardır.²⁶ ¹⁹ Karaciğerin lipid metabolizmasıyla ilgili de önemli görevleri vardır. Diğer vücut fonksiyonları için enerji sağlayacak yağ asitlerinin sentezi ve oksidasyonu, lipoprotein, fosfolipid, keton cisimleri ve kolesterol sentezi, yağ asitlerinden trigliserid oluşumu, safra asitleri ve tuzlarının oluşturulması karaciğerde gerçekleşir.

Karaciğerin, protein metabolizmasıyla ilgili olarak aminoasitlerin deaminasyonu, üre oluşumu ile amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılması, endojen aminoasitlerin ve albumin, protrombin, fibrinojen, lipoproteinler gibi plazma proteinlerinin sentezi, vücuttaki metabolik olaylar için önemli aminoasitlerin ve öteki maddelerin birbirine dönüşümleri gibi fonksiyonları vardır.²⁶

2.2.2. Sekretuvar Fonksiyonu

Karaciğerin en önemli fonksiyonlarından biri de safranın üretilmesidir. Safranın iki önemli işlevi; yağların sindiriminde, emiliminde ve kandan özellikle hemoglobin parçalama ürünü olan bilirubin ve karaciğer hücrelerinde sentezlenen kolesterol gibi önemli yıkım ürünlerinin atılmasında rol oynamaktadır.²⁷ Karaciğer, safranın gastrointestinal sisteme aktarılmasını sağlar. Bu şekilde sindirim sistemi içinde de görev alır.²⁶

2.2.3. Detoksifikasyon Fonksiyonu

İlaçların, dışarıdan alınan veya endokrin sistemde üretilen östrojen, kolesterol, aldosteron, tiroksin gibi hormonların fazlasının veya kalsiyum gibi minerallerin fazlasının detoksifikasyonunu veya safra ile atılımını sağlar. Karaciğer harabiyetinde, çok defa bu hormonlardan birinin ya da birçoğunun vücutta birikmesi, hormonal sistemin aşırı faaliyetine yol açar.²⁶ Çoğu ilaçlar karaciğerde p 450 enzim sistemi tarafından metabolize ve inaktive edilirler. Karaciğer, vücutta çeşitli metabolitlerin zararsız hale getirilmesinden de sorumludur. Protein yıkımından ortaya çıkan ve hücreler için toksik bir madde olan amonyağı, üreye dönüştürerek idrarla atılmasını sağlar. Hemoglobinin yıkım ürünü olan bilirubin de karaciğerde glukronik asitle konjuge edilerek suda erir hale getirildikten sonra safra yolu ile vücut dışına atılır.^{23 26}

2.2.4. Karaciğerin Diğer Önemli Fonksiyonları

Bağırsak kapillerlerinden akan kan bağırsaklardan birçok bakteriyi de beraberinde götürür. Bağırsaklardan portal kana girerek karaciğere gelen mikroorganizmalar hepatik venöz sinüslerde bulunan büyük fagositik makrofajlar (Kupffer hücreleri) aracılığı ile temizlenmiş olur. Kanda koagülasyon işleminde kullanılan fibrinojen, protrombin, globulin, faktör V-VII-IX-X gibi maddeler karaciğerde yapılır. Karaciğerde A vitamini, D vitamini, B12 vitamini depo edilir. Hepatik venlerdeki ve hepatik sinuslardaki kan ile birlikte karaciğerin normal kan volümü 450 ml yani yaklaşık olarak vücudun toplam kan hacminin yüzde 10'u kadardır. Sağ atriumda basınç yükseldiği zaman karaciğerde de basınç artar ve karaciğer genişleyerek 0.5-1 litre ekstra kan hepatik venler ve sinuslarda depo edilir.

Bütün bu fonksiyonları nedeniyle insan biyokimyası biliminin odağında bu organ vardır.²⁶

2.3. İlaçlarla Oluşan Karaciğer Hasarları

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.^{28 29}
³⁰ İlaçla oluşan karaciğer hasarları geniş bir morfolojik spektrumu kapsar ve karaciğer hastalığının hemen hemen tüm histolojik paternleri görülebilir. Bu paternler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 1. İlaçlarla oluşan karaciğer hasarları ve histolojik tipleri.^{31 32}

Hasar	Tipleri
Hepatit	Akut, Kronik
Konfluent nekroz	Zonal, Multilobüler
Kolestaz	Akut, Kronik
Yağlı değişiklik	Makroveziküler, Mikroveziküler
Granülomlar	
Fibrozis	
Siroz	
Vasküler bozukluklar	Budd-Chiari sendromu, Hepatoportal skleroz, Peliosis hepatit, Sinüzoidal dilatasyon, Venookluziv hastalık
Neoplazmlar	Hepatosellüler adenom, Hepatosellüler karsinom, Kolanjiokarsinom, Anjiosarkom

İlaçlara bağlı yağlı değişiklik, mikroveziküler ve makroveziküler olmak üzere iki histolojik gruba ayrılabilir. İlaça 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 glutasyon ile konjugasyondur. Glutasyon (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 kovalan bağlanma ve oksidatif strestir. Reaktif metabolitler için kritik hedef mitokondridir. Reaktif metabolitler, mitokondrinin idamesinden sorumlu anahtar

proteinlere kovalan 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 reaktif oksijen metabolitleri devamlı yapıldığından, mitokondri glutatyon azalmasına özellikle duyarlıdır.³³

2.4. Serbest Radikaller

2.4.1. Giriş

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve bu sebeple oldukça reaktif ve toksik atom veya moleküllerdir.^{34 35} Organizmada hem metabolizma sırasında sürekli oluşurlar, hem de radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasallar gibi çeşitli dış etkenlerin etkisi sonucunda ortaya çıkabilirler. En fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat, bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.³⁵

Normal koşullarda, aerobik metabolizmanın ürettiği reaktif oksijen türleri sürekli olarak inhibe edilir. Bu işi, organizmada yer alan antioksidan savunma sistemleri gerçekleştirdiğinden patolojik bir durum gözlenmez. Serbest radikallerin oluşum hızı ile savunma sistemlerinin gücü arasındaki denge bozulmadığı sürece, organizma oluşan radikallerden etkilenmez. Bu denge, antioksidan sistemlerin aleyhine bozulduğu zaman, potansiyel bir hasar meydana gelir ki buna 'oksidatif stres' adı verilir. Oksidatif hasar, DNA, lipid, protein ve karbonhidrat gibi tüm biyolojik moleküllerde ortaya çıkabilir. Bu radikal saldırısından, başta lipidler olmak üzere tüm biyolojik yapılar zarar görebilir.³⁶

Organizmada oluşan radikallerin çok önemli bir bölümü oksijen kaynaklıdır. Bu sebeple serbest oksijen radikalleri (SOR), oksidan moleküller veya en doğru adlandırma ile reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species=ROS) olarak da adlandırılırlar. Oksijen, aerobik canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olmasına karşın potansiyel olarak toksik bir moleküldür. Serbest radikaller organizmada mitokondrinin yanı sıra hücrelerin tüm fraksiyonlarında zara bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sırasında oluşmaktadır. Bunlar arasında mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi, sitoplazmada ksantin oksidaz, hücre zarına bağlı NADPH oksidaz ve lipooksijenazlar gibi enzimlerin kataliz ettiği reaksiyonlar sayılabilir.^{37 38 39 40} Fizyolojik şartlarda SOR; hücrede mitokondrial respirasyon, hücrenin sinyal iletim sistemi ve bakteri fagositozu gibi görevler için gereklidir. Serbest radikaller karaciğerde detoksifikasyon işlemi için kullanılmaktadır. Nötrofiller de zararlı patojenleri yok etmek için serbest radikalleri üretirler.

Diyabet mellitus, kanser gelişimi, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın etiolojisinde ve ilerlemesinde SOR'un rol oynadığı gösterilmiştir.^{41 42 43}

Organizmada sürekli biçimde serbest radikal niteliğinde bileşikler oluşmaktadır. Ancak bu radikallerin organizmaya zarar vermesi güçlü bir savunma sisteminin varlığı nedeniyle engellenmektedir. Bu nedenle serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirme hızının dengede tutulması son derece önemlidir. Bu denge bozulduğu zaman, serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmakta ve çeşitli organ ve sistemler olumsuz etkilenmektedir.^{44 45}

2.4.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri:

Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksid, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir.³⁵ Singlet oksijen ve hidroksil radikali lipid peroksidasyonuna neden olan en önemli etkenlerdir.

Oksidanlar, tek elektron eksiklikleri nedeniyle, başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilenler (radikaller) ve elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllerle, radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşebilenler (nonradikaller) olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. ROS terimi hem O_2^- (süperoksid), $\cdot OH$ (hidroksil) gibi oksijen merkezli radikalleri, hem de H_2O_2 (hidrojen peroksit) ve $HOCl$ (hipkloröz asid) gibi nonradikal oksijen derivelerini tanımlar (Tablo 2).

Tablo 2: Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri (oksidanlar).⁴⁶

Radikaller	Radikal olmayanlar
Hidroksil ($\cdot OH$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Alkoksil ($RO\cdot$)	Singlet oksijen (1O_2)
Peroksil ($ROO\cdot$)	Ozon (O_3)
Süperoksit (O_2^-)	Hipokloröz asid ($HOCl$)
Nitrik oksit ($NO\cdot$)	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)
Azot dioksit ($NO_2\cdot$)	Peroksinitrit ($ONOO^-$)

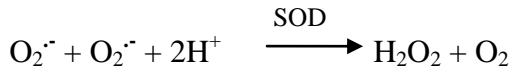
2.4.2.1. Süperoksid Radikali (O_2^-)

Oksijenin tek bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. Süperoksid, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.³⁵ Süperoksit radikali okside haldeki demir veya bakır ile reaksiyona girebilir. İndirgen geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucu da O_2^- radikali oluşur. Geçiş metal iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü redoks reaksiyonlarının ve serbest radikal reaksiyonlarının ilerlemesinde çok önemlidir.^{44 47} Süperoksit radikali, hidroksilden daha az reaktiftir. Bununla beraber ortaya

çıkıldığı hücreden daha uzak yerlere rahatlıkla geçerek başka radikallerin oluşmasına ve doku hasarına neden olur.^{43 48}

2.4.2.2 Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması ile meydana gelen peroksidin, iki hidrojen atomuyla birleşmesi sonucu hidrojen peroksit oluşur.³⁷ Biyolojik sistemlerde H₂O₂'in asıl kaynağı süperoksidin dismutasyonudur. Bu reaksiyon spontan veya süperoksit dismutaz (SOD) ile enzimatik olarak gerçekleşir:



Hidrojen peroksit aslında serbest radikal değildir, ancak süperoksidin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Süperoksitle reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.⁴⁹

2.4.2.3. Hidroksil Radikal (·OH)

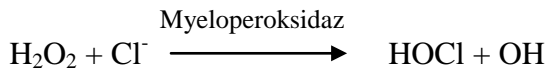
Hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. H₂O₂'deki O-O bağının hemolitik parçalanması ile iki hidroksil radikali meydana gelir. Gama radyasyona maruz kalan dokularda da meydana gelir. Bilinen en reaktif ve en toksik oksijen radikali. Tüm biyolojik moleküllere etki ederek serbest radikal zincir tepkimelerini başlatabilir.⁴³ Hidroksil radikali DNA'ya saldırarak kırıklar oluşturur, deoksiriboz parçalanır, purin ve pirimidin bazlarında kimyasal değişiklikler meydana gelir. Hidroksil ile oluşan DNA hasarının kusurlu tamiri, proto-onkogen aktivasyonuna ve kanserlerin oluşmasına neden olur.⁵⁰ Hidroksil radikali hücredeki fosfolipidler, aminoasitler, şekerler, DNA bazları ve organik asitler gibi moleküllerle oldukça hızlı reaksiyon verir.³⁴

2.4.2.4. Singlet Oksijen (¹O₂)

Ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur.³⁵ Radyasyon sonucu oluşabileceği gibi, in vivo olarak sitokrom p450, prostoglandin endoperoksit sentetaz ve myeloperoksidaz reaksiyonları ile de enzimatik olarak oluşabilmektedir. Singlet oksijen doymamış yağ asitlerini doğrudan etkileyerek membran lipidlerinde bölge değişikliği ile lipid peroksidlerini oluşturabilir.⁵¹

2.4.2.5. Hipokloröz Asid

Doku hasarındaki inflamatuvar yanıtta göç eden veya endotel hücrelerine yapışmış olan polimorfonükleer hücreler ve yine sadece insanlarda bulunan fagositlerdeki miyeloperoksidaz-H₂O₂-Cl sistemi tarafından üretilen majör oksidandır. Çeşitli hücrel yapılar için son derece toksiktir.⁴⁴ Hipokloröz asit de radikal olmadığı halde SOR arasında yer almaktadır. Fagositik hücrelerce bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktive olan nötrofiller, monosit ve makrofajlar, eozinofiller süperoksid üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz etmektedir. Özellikle nötrofiller içerdikleri miyeloperoksidaz enzimi aracılığıyla süperoksidin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirilerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürür.



2.4.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler.

2.4.3.1. Proteinlere Etkisi

Proteinler serbest radikal etkisine karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda; proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelir. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler.³⁵

2.4.3.2. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkisi

İnsan bedeninin her hücresindeki DNA, günde 10.000 kez serbest radikal saldırısına maruz kalmaktadır. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne veya mutasyona neden olur. DNA hasarının çeşitli hastalıkların etyolojisinde ve yaşlanmada önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir.⁵² Serbest radikaller DNA yapısında mutasyon, karsinogenez ve hücre ölümüne yol açabilirler. DNA yapısındaki deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, purin ve pirimidin bazların spesifik modifikasyonuna ve DNA-protein çapraz bağlanmalarına neden olurlar.^{53 54} Radikaller aracılığı ile özellikle guanin bazının hidroksilasyonu sonucu DNA molekülünün yapısı değişerek mutasyonlar ortaya çıkmaktadır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açar. Ayrıca, aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H₂O₂ de

membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir.^{35 52}

2.4.3.3. Karbohidratlara Etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu, hidrojen peroksit, peroksitler ve oksoaldehitler meydana gelir. Oksoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağ oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Okside olan glukoz, proteinlerle reaksiyona girerek glikozilasyon ve glikasyon ürünlerini oluşturur.^{34 35}

2.4.3.4. Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikal hasarına en hassas olan yapılar hücre membranındaki lipidlerdir. Serbest radikallerin hücre membranları üzerindeki fosfolipidlerin yapısındaki yağ asitlerinin peroksidasyonuna sebep olduğu bulunmuştur. Bu süreçte lipid peroksid radikalleri, lipid hidroperoksidler ve lipid bozulma ürünleri meydana gelir. Her biri aktif bir oksitleyici ajan oluşturmaktadır. İn vivo lipid peroksidasyonu, ateroskleroz, kanser ve yaşlanma süreçlerinde olan temel bir bozucu reaksiyondur. Çünkü, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.³⁵ Lipid peroksidasyonu sonucu hücre membran yapısı ve akışkanlığı bozulur, kalsiyum gibi iyonlar hücre içine girer ve nihayet hücre fonksiyonlarında bozukluklar ortaya çıkar. Plazma membranı ve organel lipid peroksidasyonu, daha önce bahsedilen serbest radikal kaynaklarının hepsiyle stimüle edilebilir ve metallerin varlığında artar. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksidlerinin yıkımı ile, çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşur. Bu bileşikler, ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehidtir. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda veya eikozanoid sentezinde serbestleşen endoperoksidler, tiobarbitirik asitle ölçülebilen malondialdehidin (MDA) asıl kaynağıdır.⁵⁵ Bu metod lipid peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir.^{56 57} MDA, protein amino gruplarına, fosfolipitlere ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. Membran bileşenlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona neden olur. İyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. Membranlardan kolaylıkla difüze olarak, DNA yapısında yer

alan nitrojen bazlarla reaksiyona girer ve mutajen, karsinojen, genotoksik etkiler gösterir. Lipid peroksidasyonunun ölçümü doku hasarının iyi bir göstergesi kabul edilmektedir. Lipid peroksidasyonunun; hücre zarının lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile hücre zarı işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Özellikle aldehit yapılı bileşikler, uzun yaşam süreli ve zarları geçebilme özelliğinde olması sebebiyle en toksik olanlarıdır. Bu nedenle lipid peroksidasyonunun hedef organlardaki etkilerinden bu bileşiklerin sorumlu olduğunu düşünülmektedir.⁵⁸ Lipid peroksidasyonunun kontrolü çok önemlidir. Bu amaçla da hem endojen hem de eksojen antioksidanlar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda antioksidan suplementasyonunun plazma antioksidan düzeylerini önemli derecede artırdığı vurgulanmaktadır.⁵⁹

2.4.4. Myeloperoksidaz (MPO)

SOR'nin en önemli kaynaklarından biri nötrofillerdir.⁶⁰ MPO, polimorf nüveli lökositlerden salınan bir hemoprotein olup güçlü proinflamatuvar ve oksidatif özelliği vardır, peroksidasyondan sorumludur. Hidrojen peroksit tarafından klorid iyonlarının oksidasyonu yoluyla hipoklorik asit üretimini katalizleyen bir enzimdir. Bu reaksiyonun toksisitesi savunma sisteminde bakterilerin öldürülmesine katkıda bulunur. Buna karşılık, oluşan hipoklorik asit aynı zamanda α 1-antiproteinaz'ı inaktive etmekte ve sağlıklı insan dokusunu da zarara uğratmaktadır.⁶¹ MPO aktivitesi dokuya polimorfonükleer lökosit infiltrasyonunu göstermektedir ve dolayısıyla inflamatuvar yanıtın bir göstergesi sayılabilir.⁶²

2.4.5. Karaciğerde Serbest Radikal Hasarı

Serbest oksijen radikalleri olarak isimlendirilen süperoksit, serbest hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri karaciğer gibi yoğun fizyolojik ve metabolik olayların seyrettiği bir ortamda sürekli olarak üretilmekte ve detoksifiye edilmektedir. Oksidatif stres, ROS ve çeşitli sitokinlerle hepatosit, kupffer ve karaciğer yıldız hücrelerinin etkileşimi neticesinde oluşan proinflamatuvar olaylar hepatositlerin apoptoza gitmesine, böylece fibrogenezin oluşmasına katkıda bulunmaktadır.^{63 64 65} 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.^{66 67 68 69} Ayrıca hasarlarla uyarılmış olan Kupffer hücreleri; proinflamatuvar sitokinler, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve interlökin-1 β (IL-1 β)

üretimini uyarırlar. Bundan dolayı, oksidatif stresin inhibe edilmesi faydalı sonuçlar sağlayacaktır.²

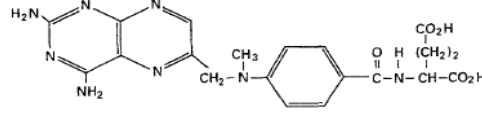
Lipid peroksidasyonu oksidatif stresin önemli bir sonucudur. Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda çeşitli değişiklikleri beraberinde getirir. Hücrel organellere olduğu gibi, bütün organizmaya da yüksek derecede yıkıcı bir süreçtir. Biyokimyasal fonksiyon kaybı ve/veya yapısal hasara yol açar.⁷⁰ 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.⁷¹ 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 su 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 tamamlanmaya kadar sıkı bir şekilde tutulmaktadır.⁷² Serbestleştiği takdirde bu radikal bulabildiği her sistemden elektron koparmaya 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.⁷³

2.5. Methotrexate (MTX)

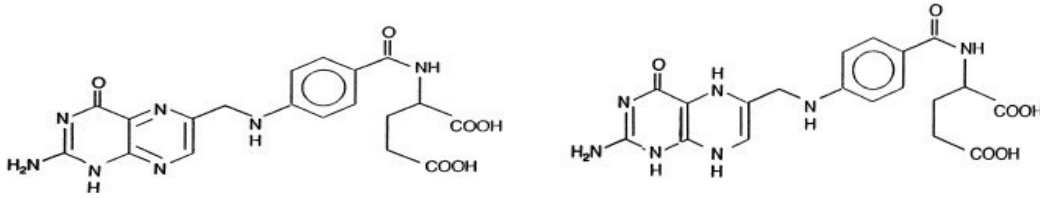
Methotrexate çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklarda ve neoplastik durumlarda kullanılan bir folik asit antagonisti olup, sitotoksik kemoterapotik bir ajandır. Uzun yıllardan beri lösemi, lenfoma, osteosarkom, akciğer kanseri, meme kanseri, baş ve boyun tümörleri gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca immünsüpresif ve antienflamatuvar özellikleri nedeniyle MTX, kanser tedavisinin dışında; romatoid artrit (RA), psoriasis, sarkoidoz, vaskulit ve diğer otoimmün rahatsızlıklarda da kullanılan etkili bir ilaçtır.⁷⁴ ⁷⁵ Ancak bu ajanın etkinliği genellikle ciddi yan etkileri ve toksik durumlar dolayısıyla sınırlanmıştır.⁷⁶ MTX, S fazındaki hücreleri etkiler. MTX ve metabolitleri hücrelere aktif taşıma ile girer ve büyük oranda böbrek yoluyla elimine olur. MTX böbreklerde haftalar, karaciğerde ise aylar boyunca kalmaktadır.⁷⁷ Sıçan ve farelerde uygulanan MTX dozunun %50'den fazlası karaciğerden safra ile elimine olmaktadır.⁷⁸

2.5.1. Folik Asit Antagonisti Olarak MTX'in Mekanizması

MTX antimetabolit grubu neoplastik bir ilaçtır. Kimyaca 4-amino 4-deoksi N10 metil pteroil glutamik asid olup, yapısal olarak folik asitin (FA) analogudur (Şekil 3).

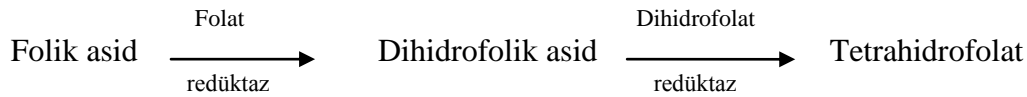


Şekil 3. MTX'in moleküler yapısı.⁷⁹



Şekil 4. FA'in (solda) ve dihidrofolatın (sağda) moleküler yapısı.⁸⁰

İnsanlarda vücudun ana yapılarından FA'yi (Şekil 4) sentezleme özelliği olmadığından diyetle FA alımı zorunludur. FA'in (folat'ın) vücuttaki yararlı şekli, folinik asid ve diğer tetrahidrofolat türevi koenzimlerdir.^{81 82} Bu koenzimler timidilatın, purinlerin, metionin ve glisinin sentezinde rol oynayan tek karbon transferi reaksiyonları için gereklidir. Folik asit bağırsaklardan emildikten sonra hücrede NADPH bağımlı dihidrofolat redüktaz (DHFR) tarafından aktif formu olan tetrahidrofolat formuna indirgenir. FA'in, dihidrofolat (pteroil glutamik asid (Şekil 4) üzerinden tetrahidrofolat'a dönüşümü şu şekilde olur:



MTX, hücre içine indirgenmiş folat taşıyıcı protein ile alınır ve folilpoliglutamat sentetaz aracılığı ile moleküle glutamil grupları eklenerek poliglutamat formuna dönüştürülür.⁷⁷ MTX ve onun poliglutamat metabolitleri dihidrofolatı (FH2) tetrahidrofolata (FH4) indirgeyen ve hücre replikasyonunda anahtar enzim olan DHFR'a bağlanır. Böylece tetrahidrofolat sentezi inhibe olur.^{83 84} Bu inhibisyon, timidilat ve purin nükleotidlerinin (adenin ve guanin) biosentezinin durmasına yol açar.⁸⁵ Dolayısıyla apoptozisle sonuçlanan DNA defektlerine

neden olur. Bu yapı taşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA'nın sentezini ve enerji üretimi için gerekli ATP üretimini inhibe eder.⁸⁶ Bu da hücre ölümüyle gerçekleşir.⁸² Ayrıca FH₄'e dönüşmeden kalan dihidrofolatpoliglutamalar (FH₂Glu_n) ve metotreksatın poliglutamat türevleri toksik inhibitör metabolitler şeklinde birikir. Poliglutamalar büyük molekülü olduğundan ve negatif elektrik yükü yüksek olduğundan hücre dışına çıkamaz.⁸⁷ Timidilat sentazın ve purin bazı sentezinde rol oynayan transformilaz enzimlerinin inhibisyonu, metotreksatın kendisinden çok adı geçen iki poliglutamat metaboliti tarafından yapılır.⁸⁸

2.5.2. MTX'in Toksik Etkileri :

MTX gibi sitotoksik ilaçlar yalnız kanser hücrelerine karşı değil, sağlıklı ve malign bütün hızlı bölünen hücreleri etkilerler. Bu nedenle yaygın toksik etkileri vardır.⁸⁹ Klinikte geniş kullanım alanları olmasıyla birlikte, karaciğer üzerine toksik etkisinden dolayı daha fazla önem kazanmıştır.⁸³ Kronik düşük doz MTX, fibrozis ve siroza yol açarken, yüksek doz karaciğer fonksiyon testlerinde bozulmaya yol açar. MTX'a bağlı fibrozisi takiben gelişen hepatoselüler karsinom iki vakada bildirilmiştir.⁹⁰ MTX'ın karaciğer dışında; böbrek, ince barsak, kemik iliği, akciğer gibi organlar üzerinde de önemli hasarlara sebep olduğu bilinmektedir.⁹¹ MTX toksisitesi; dozaj planı ve tedavinin uzunluğu, hastanın risk faktörleri, hastalığın tipi, genetik ve moleküler apoptotik faktörlerin varlığı gibi birçok faktörün etkileşiminin bir sonucu gibi görünmektedir.⁷⁶ MTX'ın akut yan etkileri doza bağlıdır. Yüksek doz MTX tedavisi sonucunda; kemik iliği baskılanması, mukozit, kusma, diyare, gastrointestinal ülserler, deri ülserleri gibi yan etkilerinin olmasının yanında en önemli etkisi karaciğer toksisitesidir.^{75 92}

MTX tedavisi esnasında ortaya çıkan yan etkiler oldukça yaygındır. Yan etkinin şiddeti değişiktir. En sık rastlanan yan etkiler hafif ve geri dönüşümlüdür. Bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme ve stomatit gibi yan etkiler sıklıkla dozla ilişkilidir.

MTX toksisitesinin mekanizması hala tam anlaşılmamıştır. Ancak bazı yan etkiler bahsedilen pürin, pirimidin, poliamin ve folat gibi metabolik yolların bozuklukları ile doğrudan ilişkilendirilmiştir. Kremer ve ark. ilk kez RA'lı hastaların karaciğer biyopsisinde MTX poliglutamalarının birikmesine folat eksikliğinin eşlik ettiğini göstermiştir.⁷⁶ MTX tedavisi alan RA'lı hastaların yaklaşık %30'unda ilaç toksisitesi nedeniyle tedavi kesilir.⁷⁹

2.5.3. Methotrexate ve Karaciğer Toksisitesi:

MTX'ın klinik kullanım alanının genişlemesi ile karaciğerdeki toksisitesi daha da önem kazanmıştır. MTX'ın hepatotoksik etki mekanizması henüz tam olarak

açıklanamamakla birlikte toksisiteyi açıklayabilen bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür.⁷⁶ MTX'in başlıca aktivitesi DHFR enzimine bağlanarak FA'in aktive formu olan folinik asite dönüşümünü engellemektir. Bu da nükleik asitler, bazı aminoasitler ve dolaylı olarak proteinlerin sentezini bloke eder. Bu durum, plazma membranları ve organellerin hasarına neden olabilir ve hepatik parankimal hücrelerin fonksiyonlarına müdahale eden enzimlerin kaçışına izin verir.⁹³ MTX'in enzimatik bir sistemle okside edilerek majör ekstraselüler metaboliti olan 7-hidroksimetotreksat'a dönüşümü karaciğerde gerçekleşir.⁷⁶ MTX folilpoliglutamil sentetaz ile 1-4 glutamat gruplarının eklenmesiyle poliglutamat forma dönüştürülen bir ilaçtır. Karaciğer hücreleri içinde poliglutamat formunda depolanır. MTX poliglutamatları hücre içinde tutulur ve DHFR enzimine bağlanarak DHF ile yer değiştirir. Poliglutamatlar hücre dışında ilaç bulunmasa da hücre içindeki varlıklarını sürdürürler.^{79 82} MTX kullanımıyla hücre içindeki poliglutamatların artışı ve folik asit seviyelerinin düşmesi, MTX'in hepatotoksik etkisinde önemli bir mekanizma sayılmaktadır. Poliglutamat formunun artmış seviyesi, ilacın hücre içinde daha uzun bulunmasına neden olur. Bu mekanizmanın MTX'in hepatotoksik etkisinin bir sebebi olduğu düşünülmektedir.⁷⁶

MTX kullanımı ile ilgili karaciğer histolojisi üzerine yan etkileri yağ infiltrasyonu, inflamasyon, hücresel nekroz ve nihayet fibrozis olarak bulunmuştur. Ancak klinik hatta biyokimyasal olarak bu bulgular yıllarca sessiz kalabilir. Toksisitenin gösterilmesinin tek yolu karaciğer biopsisi olabilir. Prosedür olarak toplam MTX dozu 1.5-2 gr olduktan sonra veya 10 yıllık kullanımdan sonra tavsiye edilir.⁸³

MTX makroveziküler yağlı değişikliğe neden olan ilaçlar arasındadır. MTX, kronik hepatit ve siroza yol açabilir. Karaciğer toksisitesi riski, ağır alkol kullanımı, önceden karaciğer hastalığı, günlük doz ve yüksek kümülatif doz ile şiddetlenir. Hastaların %20-50'sinde karaciğer enzimlerinde minimal yükselme olur ama bu önemli bir toksisite anlamına gelmez. MTX ile ilgili toksisitenin histolojik özellikleri minör yağlı değişiklik, hepatosit anizonükleozis, hafif portal inflamasyon ve fokal nekrozdan, daha ciddi hepatosellüler nekroz, fibrozis ve siroza kadar değişir. MTX, obezite ve diyabet gibi risk faktörleri olan hastalarda steatohepatiti hızlandırabilir veya şiddetlendirebilir. Yüksek kümülatif dozlu bazı hastalar diğer risk faktörleri olmadan da karaciğer yağlanması gibi histolojiye sahip olabilir.⁹⁴

2.5.4. MTX Toksisitesi ve Oksidatif Stres:

MTX'in hepatotoksik etki mekanizmaları arasında oksidatif stres üzerinde de durulmuştur. MTX piruvat dehidrojenaz, 2-oksogluterat dehidrojenaz, sitosolik nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP)-bağımlı dehidrojenazı ve NADP malik enzimi inhibe eder.

Böylece hücre içi NADPH düzeyinin düşmesine neden olur. NADPH, reaktif oksijen radikallerine karşı koruyucu önemli bir sitozolik antioksidan olan redükte glutatyonun üretilmesi için, glutatyon redüktaz enzimi tarafından kullanılmaktadır.^{76 95} MTX kullanımıyla, NADP seviyeleri düşer. Böylece glutatyon seviyelerinde anlamlı bir azalmaya neden olarak antioksidan enzim savunma sisteminin etkinliğinin azalmasına yol açar ve reaktif oksijen radikallerine (süperoksid anyonları, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksid ve hipoklorid radikalleri gibi) karşı hepatositleri duyarlılaştırır. Bu da hepatosit hasarına neden olur.^{76 83} Bundan dolayı, karaciğer hasarının engellenmesinde ve tedavisinde serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonunun ortadan kaldırılması anahtar rol oynamaktadır.

MTX ile ilgili yapılan son zamanlardaki toksisite çalışmalarında oksidatif stres dikkati çekmektedir. MTX'in karaciğer dokusunda oksidatif strese sebep olduğu bildirilmiştir.⁹³ Ayrıca; böbrek, ince barsak ve SSS'de de MTX'in yan etki mekanizması olarak oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır.^{76 96} Babiak ve ark. MTX'in HeLa hücrelerinde vücudun önemli antioksidanı olan glutatyon seviyelerini azalttığını saptamışlardır. HeLa hücresi mitokondrisinde pirüvat dehidrojenaz, 2-okzogluterat dehidrojenaz ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağımlı enzimler ile sitozolik NADP-bağımlı dehidrojenazın MTX tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir.⁹⁵ Jahovic ve ark. ratlara i.p. olarak 20 mg/kg tek doz MTX verilmesinin; kan, karaciğer, böbrek ve ince barsakta glutatyon seviyelerini azalttığını, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesini ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) seviyelerini arttırdığını bulmuşlardır.⁷⁶ Bu nedenle MTX toksisitesinden korunmak için antioksidan ajanlarla birlikte kullanması gerekliliği öne çıkmaktadır.

2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için organizmada antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Eğer serbest radikaller ve antioksidan düzeyleri arasındaki hassas denge korunamazsa hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır.

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, zar yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir.^{97 98}

2.6.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre gruplanabilirler.

- Yapılarına göre; a) Enzimler b) Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller
- Kaynaklarına göre; a) Endojen antioksidanlar b) Eksojen antioksidanlar
- Çözünürlüklerine göre; a) Suda çözünenler b) Lipidlerde çözünenler
- Yerleşimlerine göre; a) Hücre içinde bulunanlar b) Plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunanlar

2.6.1.1. Endojen Antioksidanlar

1- Enzimatik antioksidanlar: Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz, Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon Redüktaz, Glutatyon-S-transferaz, Mitokondrial sitokrom oksidaz, Hidroperoksidaz.⁹⁹

2- Enzimatik olmayan antioksidanlar:

Seruloplazmin, Transferin, Ferritin, Hemoglobin, Miyoglobin, Glutatyon, Sistein, Metiyonin, Glikoz, Ürik Asit, Bilirubin, Albumin, Ubiquinon, Melatonin, Selenyum, Lipoik asit.^{99 100 101}

2.6.1.2. Eksojen Antioksidanlar

1- Vitamin eksojen antioksidanlar: α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, Askorbik asit (vitamin C), Folik asit (folat).

2- İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar:

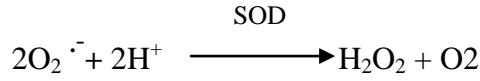
- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)
- Rekombinant süperoksit dismutaz
- Trolox-C (vitamin E analogu)
- Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
- Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin, dimetil sülfoksit)
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- Nötrofil adezyon inhibitörleri
- Sitokinler (TNF ve IL-1)
- Barbitüratlar
- Flavonoidler
- Demir şelatörleri.^{35 99 100 101}

2.6.2. Enzimatik Antioksidanlar

SOD, katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimler serbest radikallerin oluşmasını ve lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyen enzimlerdir.¹⁰²

2.6.2.1. Süperoksid Dismutaz (SOD)

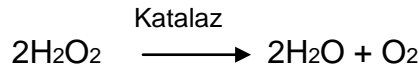
Serbest radikallere karşı ilk ve en önemli savunma bu enzim tarafından gerçekleştirilir. Süperoksidin hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder.^{103 104} Böylece hücre içindeki süperoksid düzeylerini azaltır.



Süperoksit dismutazın insanlarda iki izoenzimi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik yapıdaki bakır ve çinko içeren Cu.Zn-SOD ile mitokondrilerde bulunan tetramerik yapıdaki Mn-SOD'dır.

2.6.2.2. Katalaz (CAT)

Yapısında dört adet hem grubu içeren alt ünitelerden oluşmuş kompleks bir hemoproteindir. Katalazın en önemli görevi H₂O₂'in enzimatik yıkımıdır. Enzim en çok peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde bulunur. Enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu organlar karaciğer, böbrek, myokard, çizgili kaslar ve eritrositlerdir.^{105 106} Yüksek konsantrasyonda oluşan H₂O₂'i oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler.



2.6.3. Nonenzimatik antioksidanlar

Birçok çeşidi olan nonenzimatik antioksidanlar arasında en önemlisi glutatyonur.

2.6.3.1. Glutatyon (GSH)

Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutatyon, hücrenin yükseltgenme-indirgenme dengesini koruyan önemli bir indirgen ve antioksidan olup, reaktif serbest radikaller ve diğer oksidan türlere karşı hücrel savunmada temel bir rol oynar.⁷⁰ Proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. İndirgenmiş glutatyon selenyum içeren glutatyon peroksidaz ile yükseltgenerek, GSSG'ye dönüşür. Yükseltgenmiş glutatyonun tekrar indirgenmesi NADPH'nin da kullanıldığı bir reaksiyonla olur. Bu şekilde dokularda GSSG/GSH oranı düşük tutulur (<1/1000).⁹⁷ GSH

hücre içinin en önemli antioksidan molekülüdür ve serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir.¹⁰⁷ Glutasyon aynı zamanda hücre içinde singlet oksijen (1O_2), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksi ($\cdot OH$) radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir.¹⁰⁸ GSH detoksifikasyon reaksiyonlarına doğrudan katıldığı gibi, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı veya kofaktörü olarak da görev yapmaktadır. Başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek oranda bulunur. GSH aminoasitlerin membrandan transportunda da rol alır.^{39 45 97} Redükte glutasyonun (GSH) tüketimi (azalması) lipid peroksidasyonunun artışıyla sonuçlanır. Çok fazla lipid peroksidasyonu GSH tüketiminin artmasına sebep olabilir.⁷⁰

2.6.4. Oksidatif Karaciğer Hasarının Önlenmesinde Antioksidanların Yeri

Yapılmış olan birçok çalışmada karaciğer hastalıklarında oksidatif stres ve buna bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.¹⁰⁹ Antioksidanlar, karaciğer dokusunda biriken ve oksidatif hasar içeren bozuklukların önlenmesi ve tedavisi için potansiyel adaylardır.¹¹⁰ Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Bu nedenle karaciğerde oksidatif hasarı önlemek ve tedavi etmek için çeşitli antioksidanlarla ilgili olarak birçok çalışma yapılmıştır. Yüksek doz MTX kullanan hastalarda, melatoninin hepatorenal toksisiteyi önleyebileceği bulunmuştur.⁷⁶ Diyetle alınan alfa-tokoferolün lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu olduğu ve sonuçta steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabileceği bildirilmiştir.¹¹¹ Cisplatin ile kan ve karaciğerde oluşan oksidatif strese karşı, karotenoidlerden likopenin koruyucu etki sağladığı ortaya konulmuştur.¹¹² Yine MTX tarafından indüklenen oksidatif karaciğer hasarının düzeltilmesinde N-asetil sistein ile ilgili yapılan çalışmalar, bu ajanın oksidatif karaciğer hasarını azaltabileceği şeklinde sonuçlanmıştır.¹⁰ Siklofosfamidin karaciğerde oluşturduğu oksidatif hasarın azaltılmasında alfa lipoik asidin etkili olduğu rapor edilmiştir.¹¹³ Yapılan bütün bu çalışmalara göre, karaciğerde oksidatif hasara karşı çeşitli antioksidan tedavilerin yararlı etkileri olduğu söylenebilir.

2.7. Alfa Lipoik Asit

Alfa lipoik asit (ALA), oktonoik asidin disülfid türevi olup (6,8-dithio-octanoic acid), aynı zamanda tioktik asit olarak da bilinen, kimyasal adı 1,2-dithiolan-3-pentonoik asit

(C₈H₁₄O₂S₂) olan doğal bir bileşiktir.^{99 114} Çeşitli hücrel enzim komplekslerinin çok önemli bir prostetik grubu olarak bilinmektedir.¹¹⁵

ALA'nın biyosentez yolağı hala tam olarak açıklanamamıştır. 8 karbonlu bir yağ asidi ve elementer sülfürün mitokondride birleşmesiyle sentezlendiği düşünülmektedir.¹¹⁶ Mikroorganizmalardan insanlara kadar bütün organizmalarda enerji metabolizmasında kofaktör olarak gerekli olan ve son zamanlarda antioksidan özellikleri ortaya konulan bir moleküldür.^{117 118}

ALA, fizyolojik sistemlerde bulunur, tiyol grubu içerir ve antioksidan aktivitesi olan önemli bir moleküldür.¹¹⁹ Lipoik asit (LA) vücutta doğal olarak üretilmesine rağmen 1930 yılına kadar varlığının farkına varılmamıştır. İlk olarak 1937'de Snell ve arkadaşları tarafından patates ekstraktında bulunmuş ve çeşitli bakterilerin büyümesi için gerekli "patates büyüme faktörü" olarak adlandırılmıştır.¹²⁰ 1951 yılında sığır karaciğerinden izole edilmiştir.¹²¹

2.7.1. Lipoik Asitin Genel Özellikleri ve Kaynakları

ALA insan diyetinde yeterli miktarda bulunmasına rağmen, de novo olarak mitokondride lipoik asit sentaz tarafından sentezlenmektedir. Lipoik asit insanlarda karaciğer ve diğer dokular tarafından sentezlenerek, doğal bir kofaktör olarak görev yapmaktadır.¹²² Endojen lipoik asit genellikle bazı multienzim komplekslerinde (piruvat dehidrojenaz kompleksi, α- ketoglutarat dehidrojenaz kompleksi) proteine bağlı kısım olarak bulunur. Memeli dokuları 5-25 nmol/g lipoik asit içerir fakat pratik olarak hemen hemen tamamı proteine bağlı formda bulunmaktadır. Dışardan verilmediği sürece hücrede çok az miktarda serbest lipoik asit bulunur.¹²³ Gıdalarla alınan ALA'nın çok büyük bir kısmı lipoamid içeren enzimlerden elde edilir ve lizin amino asidine bağlı (lipolizin) bulunur. Ispanak, brokoli, domates, bezelye, Brüksel lahanası ve pirinç ALA içeren bitkisel kaynaklardır. Kalp, karaciğer ve böbrek gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip hayvansal dokular da ALA bakımından zengin kaynaklardır.^{116 124 125}

2.7.2. Lipoik Asitin Yapısı, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

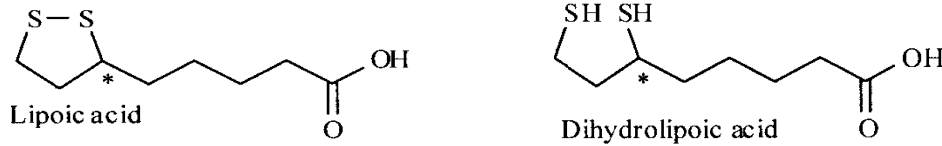
ALA, sekiz karbonlu bir bileşik olup, ditiyolan halka yapısında iki sülfür atomu ve bir karboksilik asit grubu içerir. LA'nın halkasal yapısında okside ditiyolan üzerinde bükülme gerilimi, çevresel şartlar altında molekülde indirgenme için büyük bir eğilime neden olur.¹²⁶ LA oral yolla alındığında hızla absorbe edilir ve vücutta pek çok dokuda indirgenmiş formu olan dihidrolipoik aside (DHLA) kolayca çevrilebilir. Handelman ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada memeli hücrelerinin lipoik asiti alabilme ve DHLA'e indirgeyebilme yeteneğinin

olduğunu göstermiştir.¹²⁷ Hem lipid hem de sulu ortamda çözünür. LA ve indirgenmiş hali olan DHLA'nın kimyasal reaktivitesini sağlayan ditiyolan halkasıdır. Bu yapı LA'yi diğer tiyol içeren biyomoleküller arasında özgün yapan özelliğidir. Diğer yandan düşük negatif redoks potansiyeli LA ve DHLA'yi güçlü indirgeyiciler yapmaktadır.¹²⁶

Oral uygulama gibi ekstraselüler olarak uygulanan LA'den sonra hem ALA'nın hem de DHLA'nın etkileri intra ve ekstraselüler olarak bulunabilmektedir. LA'nın iki formu bulunmaktadır:

- 1- Okside LA'de 6. ve 8. pozisyonlarda bulunan kükürtler kapalı bir halka meydana getirir. Buna ALA denir.
- 2- LA'nın redükte şekli DHLA, açık zincir şeklinde olup 6. ve 8. pozisyonda bulunan kükürtler sülfidril grubu halinde bulunmaktadır. LA'nın bu iki formu oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ile birbirine dönüşebilmektedir.¹²⁸

Hem redükte hem de okside formlar biyolojik aktivite göstermesine rağmen DHLA biyolojik olarak daha aktif form olarak kabul edilmektedir.¹²³ ALA ve DHLA'nın yapıları şekil 5'de verilmiştir.



Şekil 5. Lipoik asid ve DHLA'nın yapısı.¹¹⁴

ALA, hücrelere girdikten sonra sitozolik enzimler olan GSH redüktaz, tiyoredoksin redüktaz ve mitokondrial enzim E3 tarafından indirgenmektedir. ALA bağırsaktan emildikten sonra, çeşitli dokularda metabolik değişikliğe uğradıktan sonra salgılanır. LA metabolizmasındaki katabolik süreç pentanoik asid yan zincirinin β -oksidasyonu üzerinden gerçekleşmektedir. ALA'nın metaboliti olan 3 ketolipoat, serbest ALA'nın β -oksidasyonla salgılandığını göstermektedir.¹²⁹

2.7.3. Lipoik Asidin Antioksidan Özellikleri ve Klinik Endikasyonları

LA'nın biyolojik antioksidanlar arasında en büyük farkı, gerek redükte gerekse okside formlarında antioksidan fonksiyonlarını sürdürmesidir.¹¹⁷ Yine ALA, amfipatik bir bileşiktir, yani hem lipofilik hem de hidrofilik ortamlarda güçlü bir antioksidandır.¹³⁰ LA'nın diğer antioksidanlar ile etkileşimi de söz konusudur. ALA'nın en önemli özelliklerinden birisi vitamin C, GSH ve indirekt olarak vitamin E'yi yeniden oluşturma yeteneğidir. LA, bu suretle vitamin C ve vitamin E yetersizliği semptomlarını önleyebilmektedir. LA suda ve lipit

tabakada çözünülebilirliği nedeniyle lipit-su ara yüzeyinde okside antioksidan redüksiyon işlevlerini yerine getirebilir. Vitamin E'nin yeniden oluştuğu sıklıkta vitamin C ve glutatyon ile etkileşerek membranları korur.^{131 132} ALA'in bazı metalleri şelat etme yeteneği bulunmaktadır. Bakır, manganez ve çinko ile stabil kompleksler oluşturmaktadır.^{133 134}

LA son zamanlarda önemli bir antioksidan olarak dikkat çekmektedir. LA veya onun redükte formu DHLA; süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri, hipokloröz asit, peroksil radikalleri ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen bileşikleri ile reaksiyona girer.¹¹⁷ Ratlarda intragastrik olarak LA verilmesi (150 mg/kg bw/gün, 8 hafta) kalp, karaciğer ve iskelet kaslarını egzersiz tarafından indüklenen oksidatif yağ hasarına karşı korumuştur; karaciğer ve kanda toplam glutatyon seviyesini artırmış ve kalpte glutatyon S-transferaz aktivitesinde egzersiz ile indüklenen azalmayı engellemiştir.¹³⁵ Mitokondri seviyesinde GSH, askorbik asit ve E vitaminine ilave olarak LA verilmesi (100 mg/kg bw/gün; 2 hafta) rat karaciğer veya böbreklerinden izole edilen mitokondrilerdeki izositrat dehidrojenaz, α -ketogluterat dehidrojenaz ve süksinat dehidrojenaz gibi enzimlerin azalan aktivitesini artırmıştır.¹³⁶ LA'nın 2 hafta süre ile diyetel takviyesi aynı zamanda hepatosellüler GSH seviyesinde yaşa bağı olarak ortaya çıkan azalmayı değiştirmiştir.¹³⁷

Çeşitli hayvan modellerinde iskemi-reperfüzyon, hepatik hastalıklar ve diyabet durumlarında doku hasarına karşı LA takviyesinin koruyucu etkilerine dair kanıtlar başka çalışmalarda da gösterilmiştir.^{116 132 138}

Lipoik asit uzun zamandır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalar ALA'in iskemi-reperfüzyon hasarı, diyabetes mellitus, glokom, alkole bağlı karaciğer hasarı, mantar zehirlenmesi, HIV enfeksiyonu, ağır metal zehirlenmesi, radyasyon hasarı, yaşlanma, vasküler ve nörodejeneratif hastalıklar dahil birçok klinik durumda görülen oksidatif stresin önlenmesi ve tedavisinde etkili olduğunu ortaya koymuştur.^{116 117 139 140}

2.7.4. ALA Eklenmesinin Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu

Diyabette retinal oksidatif stresin ALA ile önlendiği görülmüştür.¹⁴¹ ALA eklenmesinin karaciğer ve kandaki glutatyon konsantrasyonunu arttırdığı; kalp glutatyon S-transferaz aktivitesinin egzersizle azalmasının, ALA eklenmesi ile önlendiği bulunmuştur.¹³⁵ Karnitin ve ALA takviyesinin sıçan beyindeki lipit peroksidasyonunu ve protein karbonil miktarını azalttığı, antioksidan enzim aktivitesini ise artırdığı gösterilmiştir.¹⁴² ALA'in nekrotik ve apoptotik hücrelerin sayısını azalttığı gözlemlenmiştir.¹⁴³ Böbrekte artan lipit peroksidasyonunun ALA eklenmesi ile azaldığı; ALA'in, böbrek, karaciğer ve kalpte Cu/Zn SOD aktivitesini azalttığı, glutatyon peroksidaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir.¹⁴⁴ Yine

ALA'in yaşı sıçanların beyindeki asetilkolineraz aktivitesini düzenleyici etki gösterdiği saptanmıştır¹⁴⁵

Çalışmalar genellikle oksidatif stres ile ilgili durumlarda LA kullanımının biyolojik etkileri veya LA ve türevlerinin antioksidan aktivitesi arasındaki farklar ile ilgilenmektedir. ALA'in MTX kullanımında görülen oksidatif stres üzerine etkinliği ve biyolojik aktivitesi ile ilgili çok fazla veri bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu deneysel çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında Haziran 2010 - Aralık 2010 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışma ile ilgili olarak Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı alındı (06.04.2010 Tarihli Etik Kurul Oturum No: 2010/3 – Karar No:3). Çalışmada kullanılacak ratlar, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Barınağı'ndan temin edildi. Çalışmada ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen, 28–32 haftalık 32 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar deneyden 1 hafta önce laboratuvar koşullarına alınarak, çalışma süresince, 12 saat ışık/karanlık döngüsünün sağlandığı, ısı (23–25°C) ve nemin kontrol edildiği ortamda muhafaza edildi. Standart rat yemi ve şehir şebeke suyu kullanılarak beslendi. Gündüz-gece siklusuna uyacak şekilde aydınlatıldı. Ratlar, deneyden bir gece önce su serbest olmak üzere aç bırakıldı.

3.2. Deney grupları ve deney protokolü

Ratlar ortama uyum sağlamaları için deney başlangıcından 1 hafta önce her grupta 8 rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

I. Grup (Kontrol Grubu): Ratlara 5 gün boyunca intraperitoneal (ip) olarak 2cc/gün serum fizyolojik verildi.

II. Grup (Methotrexate grubu): Ratlara ip olarak tek doz 20 mg/kg methotrexate verildikten 1 saat sonra 2 cc serum fizyolojik verildi ve geri kalan 4 gün boyunca da serum fizyolojik 2 cc/gün verildi.

III. Grup (MTX+ALA grubu): Ratlara ip olarak tek doz 20 mg/kg MTX verildikten 1 saat sonra 50 ml/kg dozunda alfa lipoik asid verildi ve kalan 4 gün boyunca da 50 ml/kg ALA verildi.

IV. Grup (ALA grubu): 5 gün boyunca 50 ml/kg ALA ip olarak verildi.

Deney başlangıcında ve 6. gün ratların ağırlıkları tartıldı. İlaç uygulamaları ratların ağırlıklarına göre yapıldı. Tüm grupların enjeksiyonu ip yoldan aynı gün başlandı ve 5 gün boyunca yapılarak aynı gün sonlandırıldı. Deneyin sonunda II. gruptan 3, III. ve IV. gruptan 1'er tane olmak üzere toplam 5 rat kaybedildi. Geriye kalan ratlar 6. gün genel anestezi altında sakrifiye edildi. Ratlar sakrifiye edilmeden hemen önce genel anestezi altında biyokimyasal tetkikler için intrakardiyak kan alındı. Ratlar sakrifiye edildikten sonra histopatolojik inceleme ve doku biyokimyası için karaciğer doku örnekleri alındı. Alınan kanların serumları ayrılarak daha sonra çalışılmak üzere -80° C de saklandı. Alınan karaciğer dokuları, histopatolojik çalışma için formolde, biyokimyasal çalışmalar için ise -80° C de saklandı.

3.3. Kan ve Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Çalışması

Serumda ALT, AST, ALP, GGT, Total bilirubin düzeyleri, İmmulite 2000 otomatik biyokimya cihazında çalışıldı. Çıkarılan karaciğer doku örnekleri iki parçaya ayrıldı. Parçalardan biri % 10 luk formaldehit içine konularak histopatolojik tetkike gönderildi. Diğer parça ise MDA, SOD, CAT, GSH ve MPO tayini için -80 °C de derin dondurucuya konuldu.

3.4. Karaciğer Dokusunda Oksidan ve Antioksidan Belirteçlerin Ölçülmesi

Karaciğer doku örnekleri, buz içinde 0.25 M sükröz ile 14000 rpm hızda santrifüje edilerek homojenize edildi. Üstte biriken supernatanlar, doku biyokimyası çalışması için ayrıldı.¹⁴⁶

3.4.1. Karaciğer Dokusunda Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Ölçülmesi (Lipid Peroksidasyonu Değerlendirilmesi)

Karaciğerde lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA düzeyleri, MDA'in asidik ph ve sıcak ortamda tiyobarbitürik asitle (TBA) oluşturduğu bileşiğin pembe-kırmızı renginin 532 nm dalga boyunda absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanan Ohkawa ve arkadaşlarının yöntemi uygulanarak ölçüldü.¹⁴⁶

MDA'nın kendisi stabil olmadığından, standart olarak test sırasında MDA'ya hidroliz olan 1,1,4,4 tetramethoksiopropan kullanılmıştır. Tayin edilen MDA'nın çoğu testin asit ortamdaki ısıtma fazı sırasında nonvolatil lipit peroksidasyon ürünlerinin yıkımı sonucu oluşmaktadır. Yöntem uygulama prosedürüne göre; 0,1 ml homojenat üzerine 0,2 ml %8,1'lik sodyum dodesil sülfat, 1,5 ml %20'lik asetik asit, 1,5 ml %0,8'lik TBA ve 0,7 ml saf su konularak 95⁰C'de 30 dakika su banyosunda kaynatıldı. Soğutulduktan sonra 1 ml saf su ve 5

ml butanol/piridin (1:14 oranında) eklendi ve sonra tüpler 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki organik faz alınarak 532 nm dalga boyunda absorbans okundu ve değerler standart eğriden değerlendirildi. Sonuçlar nmol/g doku olarak tanımlandı.

3.4.2. Karaciğer Dokusunda MPO Aktivitesinin Ölçülmesi

MPO enzim aktivitesi tayini enzimatik yöntemle kinetik olarak Shimadzu UV 1601 (Japan) spektrofotometre ile ölçüldü ve O-dianisidin metodu kullanıldı.¹⁴⁷

Bu metod, MPO tarafından oksitlenen H₂O₂'nin O-dianisidini redüklemesi ve bu redüklenmiş ürünün 460 nm dalga boyunda absorbansının ölçülmesi esasına dayanır. Bir ünite MPO aktivitesi, bir dakikada 1 µmol peroksidi indirgeyen enzim aktivitesi olarak tanımlandı. Reaksiyon karışımı 0,3 ml fosfat tamponu (pH 6.0), 0,3 ml hidrojen peroksit, 0,5 ml O-dianisidin ve 10µl örnek'ten oluşmaktaydı. Absorbans değişimi 460nm'de 10 dakika süreyle izlendi. Miligram protein başına düşen MPO aktivitesi hesaplanarak sonuçlar spesifik aktivite olarak değerlendirildi. Enzim aktivite sonuçları U/mg protein olarak verildi.

3.4.3. Karaciğer Dokusunda SOD Aktivitesinin Ölçülmesi

SOD aktivitesi, hemolizatta Fridovich yöntemiyle saptanmıştır.¹⁴⁸ Bunun için hemolizat 1:20 oranında 0,01 M fosfat tampon ile dilüe edilerek, bu dilüsyonda aktivite tayini yapıldı. Reaksiyon karışımı 1 ml'lik total volümde 25 µl enzim içeren hemolizat, 850 µl ksantin ve INT (p-iyodonitrotetrazolium viyole) içeren miks substrat ve 125 µl 80 U/L ksantin oksidazdan oluşmaktaydı. Kör de tıpkı numune gibi hazırlandı fakat örnek yerine fosfat tamponu kondu. Ksantin oksidazın etkisiyle ksantin oluşturduğu süperoksid radikali; (O₂), 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium (INT) boyası ile kırmızı renk vermektedir. Ortamda bulunan ve tepkimeyi inhibe eden SOD, süperoksid radikalini hidrojen perokside dönüştürür. Ortamda bulunan SOD bu reaksiyonu inhibe etmekte ve renk oluşumu azalmaktadır. SOD'un bu reaksiyonu inhibe etme derecesine bağlı olarak SOD aktivitesi belirlenmiştir. SOD aktivitesi ile renk miktarı arasında ters ilişki vardır. Tepkimede, 37°C' de ışık yolu 1 cm olan küvetlerde 505 nm dalga boyunda havaya karşı ilk 30 saniyedeki başlangıç absorbansları (A1) okundu. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbansları (A2) tekrar okundu ve değerler standart eğriden değerlendirildi.

3.4.4. Karaciğer Dokusunda CAT Aktivitesinin Ölçülmesi

CAT aktivitesi hemolizatta Beutler yöntemiyle saptanmıştır.¹⁴⁹ Reaksiyon karışımı 1 ml'lik total volümde 50 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0 tampon, 900 µl 10 mM H₂O₂ ve 30 µl saf su ve 20 µl hemolizattan oluşur. Tepkime, ışık yolu 1 cm olan küvetlerde 37°C' de 230 nm dalga

boyunda 5 dakika süreyle her 2,5 dakikadaki absorbans değişimi izlenerek gerçekleştirilmiştir.

3.4.5. Karaciğer dokusunda GSH Düzeyinin Ölçülmesi

GSH düzeyi hemolizatta Beutler yöntemiyle saptanmıştır.¹⁴⁹ Deneyin prensibi indirgenmiş glutatyonun sülfidril grupları bazik ortamda 2,2'-Dinitro-5,5'ditiodibenzoik asid (DTNB) ile sarı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşiğin renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Reaksiyon karışımı 10 ml'lik total volümde 2,0 ml filtrat, 8 ml fosfat tampon ve 1,0 ml DTNB'den oluşmaktadır. Kör 1,2 ml presipite edici solüsyon, 0,8 ml saf su, 8 ml fosfat tampon ve 1 ml DTNB 'den hazırlanmaktadır. Spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda DTNB öncesi ve DTNB sonrası absorbanslar okunarak değerler standart eğriden değerlendirilmiştir.

3.5. Karaciğer Dokularının Histopatolojik İncelenmesi

Deney sonunda postmortem karaciğer eksizyonu uygulandı. Karaciğer dokularından 0.5 cm kalınlığında kesitler alındı. Tamponlu %10'luk formalinde fiske edilen doku parafin bloklara gömüldü. Bloklardan 4 µm kalınlığında alınan kesitler histopatolojik inceleme için Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi. Karaciğer dokusundaki mikroskobik değişiklikler Roenigk skorlaması' na göre 0–3 değerleri arasında derecelendirildi.

Tablo 3: Karaciğer dokusundaki mikroskobik bulguların skorlanması.¹⁵⁰

Yağlanma	Nükleer polimorfizm	Fibrozis	Portal inflamasyon
Yok 0	Yok 0	Yok 0	Yok 0
Hafif 1	Hafif 1	Hafif: (Asinüs içine uzanan fibrozis) 1	Hafif 1
Orta 2	Orta 2	Orta/ciddi 2	Orta 2
Ciddi 3	Ciddi 3	Ciddi 3	Ciddi 3

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistik değerlendirme; bilgisayar ortamında, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 15.0 version) programında yapıldı. Gruplara ait veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterildi. Grupların biyokimyasal parametreleri ve histolojik karşılaştırılması

için One Way Anova ve Post-Hoc testi kullanıldı. Her iki test içinde $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kan Biyokimyası Sonuçları

Serum ALT ve AST düzeyleri değerlendirildiğinde; ALT düzeyinin MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü, AST düzeylerinin ise anlamlı olarak arttığı ($p < 0.05$) gözlemlendi. MTX uygulamasına ALA tedavisi eklendiğinde ise MTX grubuna göre, artmış AST düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.05$), buna karşılık azalmış ALT düzeylerinin anlamlı olarak değişmediği gözlemlendi. Serum ALP düzeyinin, MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü ($p < 0.05$); MTX uygulamasına ALA tedavisi eklendiğinde ise MTX grubuna göre, azalmış ALP düzeylerinin anlamlı olarak değişmediği gözlemlendi. Serum GGT ve Total bilirubin düzeyleri değerlendirildiğinde ise; gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 5).

Tablo 4. ALA'in karaciğer enzim düzeylerine olan etkileri.

	Kontrol grubu (n=8)	MTX grubu (n=5)	MTX+ALA grubu (n=7)	ALA grubu (n=7)
ALT (U/L)	58,6±13,9	25,8±7,6*	45,2±21,8	55,5±6,4
AST (U/L)	148,1±33,0	228,4±142,5**	99,0±27,3	120,1±19,2
ALP (IU/L)	318,87±75,04	47,40±14,04**	81,28±78,36	227,42±70,84
GGT (IU/L)	5,87±2,53	3,5±1,73	5,28±1,11	6±1,29
T.Bil. (mg/dl)	0,18±0,38	0,22±0,10	0,23±0,07	0,15±0,05

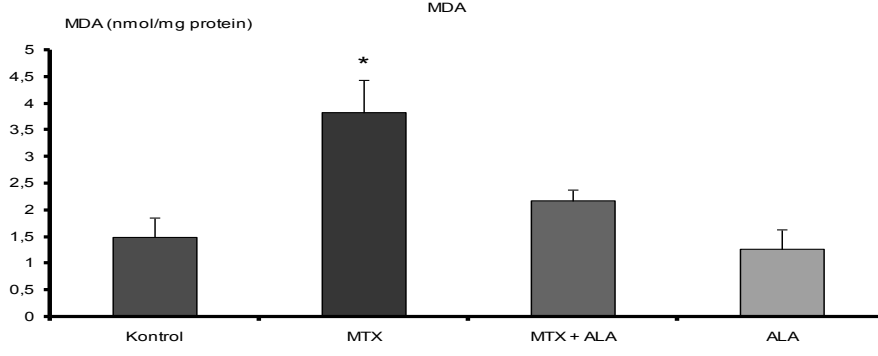
Not. Veriler, ortalama \pm SD olarak verildi.

* $p < 0.05$, kontrol grubundan farklı , ** $p < 0.05$, kontrol ve tedavi gruplarından farklı.

4.2. Karaciğer Doku Biyokimyası Sonuçları

4.2.1. MDA Düzeyleri

Lipid peroksidasyon göstergesi olarak MDA düzeyleri değerlendirildiğinde; MTX uygulanması ile kontrol grubuna göre karaciğer doku MDA düzeylerinin anlamlı olarak artmış olduğu gözlemlendi. MTX uygulanan ratlara ALA tedavisi verilmesi ile, yükselmiş MDA düzeylerinin MTX grubuna göre anlamlı olarak düştüğü ($p < 0.05$) gözlemlendi (Şekil 6).

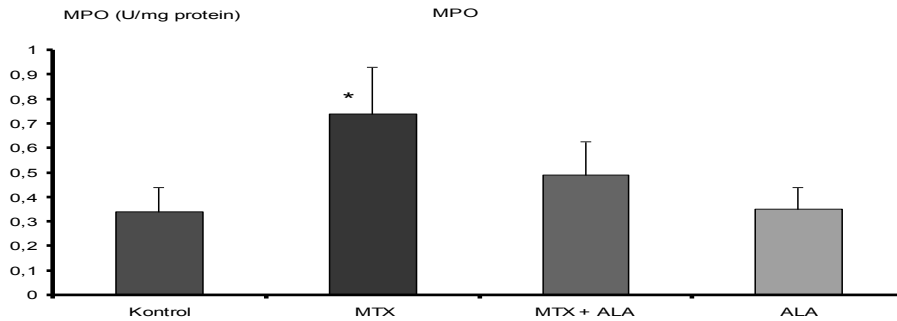


Şekil 6. ALA'in MTX'a bağlı toksisitede MDA düzeyleri üzerine etkileri

* $p < 0.05$, kontrol ve tedavi gruplarından farklı

4.2.2. MPO Aktivitesi

MPO düzeyleri açısından değerlendirildiğinde de; MTX uygulanması ile kontrol grubuna göre karaciğer doku MPO düzeylerinin anlamlı olarak artmış olduğu gözlemlendi. MTX uygulanan ratlara ALA tedavisi verilmesi ile, yükselmiş MPO düzeylerinin MTX grubuna göre anlamlı olarak düştüğü ($p < 0.05$) gözlemlendi (Şekil 7).



Şekil 7. ALA'in MTX'a bağlı toksisitede MPO düzeyleri üzerine etkisi

* $p < 0.05$, kontrol ve tedavi gruplarından farklı

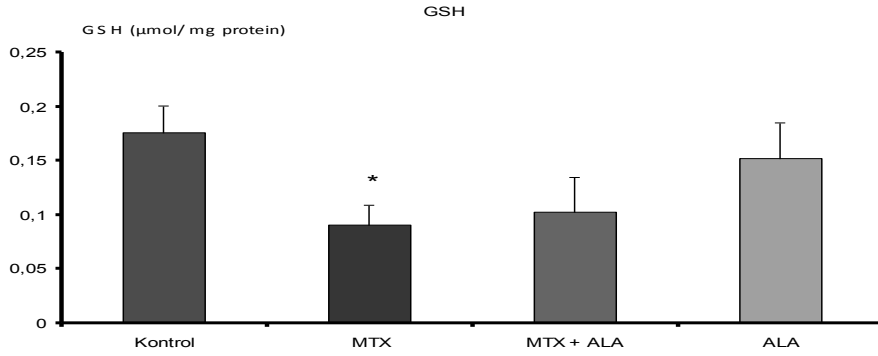
4.2.3. Doku Antioksidan Düzeyi Sonuçları

Karaciğer dokusunda antioksidan belirteç olarak; GSH, SOD ve CAT düzeyleri değerlendirildi.

4.2.3.1. Doku GSH Düzeyleri

Karaciğer doku GSH düzeyleri değerlendirildiğinde; MTX uygulanması ile kontrol grubuna göre karaciğer doku GSH düzeylerinin anlamlı olarak düştüğü ($p < 0.05$) gözlemlendi.

MTX uygulanan ratlara ALA tedavisi verilmesi ile GSH düzeyinde MTX grubuna göre hafif bir artış oldu, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 8).

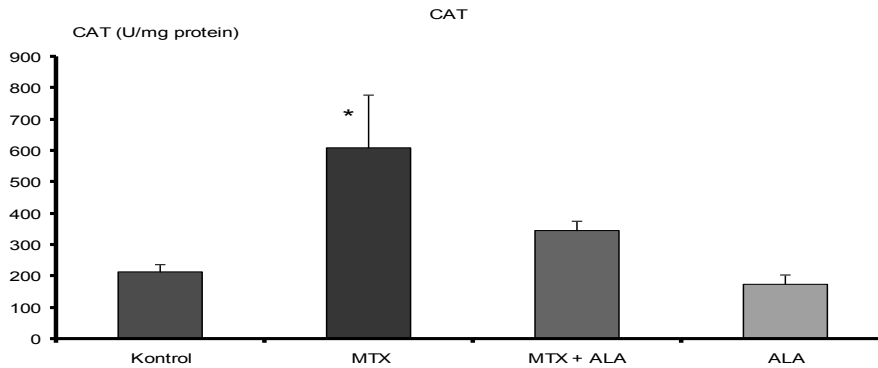


Şekil 8. ALA'nın MTX'a bağlı toksisitede GSH düzeyleri üzerine etkisi

* $p < 0.05$, kontrol ve tedavi gruplarından farklı

4.2.3.2. Doku CAT Aktivitesi

Karaciğer doku CAT düzeyleri değerlendirildiğinde; MTX uygulanması ile kontrol grubuna göre CAT düzeylerinde anlamlı olarak artış gözlenmiş olup; MTX uygulanan ratlara ALA tedavisi verilmesi ile, yükselmiş CAT düzeylerinin MTX grubuna göre anlamlı olarak düştüğü ($p < 0.05$) gözlemlendi (Şekil 9).

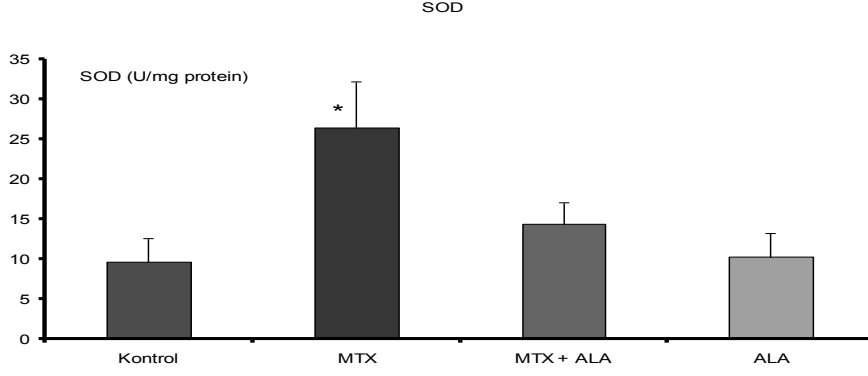


Şekil 9. ALA'nın MTX'a bağlı toksisitede CAT düzeyleri üzerine etkisi

* $p < 0.05$, kontrol ve tedavi gruplarından farklı

4.2.3.3. Doku SOD Aktivitesi

Karaciğer SOD düzeyleri değerlendirildiğinde; MTX uygulanması ile kontrol grubuna göre karaciğer doku SOD düzeylerinin anlamlı olarak arttığı saptandı. MTX uygulanan ratlara ALA tedavisi verilmesi ile, yükselmiş SOD düzeylerinin MTX grubuna göre anlamlı olarak düştüğü ($p < 0.05$) gözlemlendi (Şekil 10).



Şekil 10. ALA'nın MTX'a bağlı toksisitede SOD düzeyleri üzerine etkileri

* $p < 0.05$, kontrol ve tedavi gruplarından farklı.

4.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Histopatolojik değerlendirmede minimal değişiklikler gözlemlense de, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

5. TARTIŞMA

Karaciğer, sentez ve detoksifikasyon görevleriyle vücuttaki en önemli organlardan biridir. Birçok hastalıkta karaciğer dokusu direkt veya dolaylı olarak etkilenir. Karaciğer hasarının değişik formları, oksidatif stres ve bunu takiben oluşan toksik serbest radikallerle oluşmaktadır. Serbest radikallerin hücre zedelenmesinde başlıca üç mekanizma ile rol aldığı söylenebilir: Membranların lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, proteinlere ve karbonhidratlara bağlanarak bunların yapılarındaki bozulmalar.

Serbest radikallerin ve lipid peroksidlerin çeşitli hastalıkların oluşumunda rol oynadıkları kabul edilmektedir. Oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunun; kanser, aterosklerotik kalp hastalıkları, diabetes mellitus, romatoid artrit, katarakt, ülseratif kolit, karaciğer hastalıkları ve toksik hücre hasarlarında patogeneze rol aldığı bilinmektedir.^{7 8} Son zamanlarda reaktif oksijen metabolitlerinin çeşitli ksenobiyotiklerin ve ilaçların hepatotoksitesinde temel bir rol oynadığı iddia edilmiştir.¹⁰

Biyolojik sistemler oksidatif süreç kontrolü için çeşitli antioksidan mekanizmalar ile donatılmıştır. Serbest radikal temizleyiciler muhtemelen ilaca bağlı toksisiteye karşı da koruyucudur.¹⁵¹ Çeşitli çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engellemek veya oksidan/antioksidan dengelyi sağlamak için birçok antioksidan madde kullanılmıştır.^{10 13}¹⁴² Bizim çalışmamızda da amacımız, yaygın olarak kullanılan bir ilaç olan MTX tarafından

karaciğerde oluşturulan oksidatif strese karşı ALA'in antioksidan etkilerini incelemektir. ALA kullanımının, MTX ile oluşturulan oksidatif karaciğer hasarı üzerine olan olası yararlı etkilerinin ve tedavideki etkinliğinin araştırılması hastalar için önem arz etmektedir. Biz de bu tez çalışmasında ALA kullanımının MTX ile oluşturulmuş akut karaciğer hasarında bazı oksidatif stres belirteçlerini önemli oranda azalttığını tespit ettik.

Antitümör ilaçlar, tekrarlayan inflamatuvar hastalıklar için adjuvan tedavi olarak giderek kullanılmaya başlanmıştır. ROS ve hidrojen peroksitlerin antitümör ilaçların yan etkileri ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. MTX, kanser tedavisi veya çeşitli tekrarlayan inflamatuvar hastalıklarda yaygın olarak kullanılan bir antimetabolit ilaçtır. Ancak MTX tedavisi bir dizi olumsuz etkileri de beraberinde getirir. Bunlar pnömoni, nefrotoksisite ve hepatotoksisitedir.¹⁵¹ Karaciğerde metabolizması sırasında gerçekleşen oksidatif reaksiyonlar nedeniyle toksik etkileri olduğu bilinmektedir. MTX karaciğerde steatoz, kolestaz, fibrozis ve siroz gibi toksik durumlara sebep olabilir.¹⁰

MTX kullanımı ile ilgili sık görülen yan etkiler romatizmal hastalıkların (özellikle RA) tedavisinde yaygın olarak kullanılan dozlarda yaşamı tehdit edici değildir. Ancak, bazı komplikasyonlar, özellikle hepatotoksisite oldukça ciddi olabilir. MTX'in ratların karaciğer, böbrek ve intestinal dokularında oksidatif strese yol açtığı bildirilmektedir.⁷⁶ Son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalarda MTX'in karaciğer hasarında önemli bir rol oynayan oksidatif stres ve antioksidan tedaviler yoluyla bu olumsuz etkide azalma gösterilmiştir.¹⁰ Vardi ve ark. tarafından yapılan, MTX'in ratlarda intestinal sistemde oluşturduğu oksidatif hasara karşı kaybı ve beta karotenin koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada MTX uygulaması ile ratların intestinal dokusunda MDA ve MPO aktivitesinin arttığı; SOD, CAT ve GSH içeriğinin ise azaldığı tespit edilmiştir¹⁵² Yine ratlarda MTX'a bağlı hepatik oksidatif hasarın curcumin verilmesiyle azaltıldığının gösterildiği, Hemeidan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada MTX, oksidan/antioksidan dengesini anlamlı bir şekilde değiştirmiş, MDA düzeyinde artış ile birlikte GSH içeriği ve SOD ile CAT aktivitelerini azaltmıştır.¹⁵³ Bizim çalışmamızda da MTX kullanımının oksidatif doku hasarına sebep olduğunu gözlemledik.

Folik asit, aynı zamanda bir antioksidan ajan olup, etki mekanizması ile ilişkili olarak MTX'in toksik etkilerini azaltmak için yaygın olarak kullanılır. Eşlik eden folik asit kullanımının MTX'in etkinliğini azaltabildiği yönünde tartışmalar vardır. Dolayısıyla yeni antioksidan ajanlar MTX toksisitesine karşı deneysel olarak kullanılmıştır. Bu antioksidan maddelerden biri melatonin olup, MTX'in yol açtığı hepatorenal ve ince barsak oksidatif hasarına karşı yararlı etkileri gösterilmiştir. Ayrıca bazı araştırmacılar, MTX ile oluşturulan oksidatif hasara karşı lökosit, karaciğer ve böbrek üzerinde taurin ve L-karnitin yararlı

etkilerini göstermişlerdir.¹⁰ Biz bu çalışmada karaciğer dokusu üzerine MTX'in oksidatif hasarına karşı MTX toksisitesini azaltmak için alternatif bir ilaç olarak, güçlü bir antioksidan olan ALA'ı tercih ettik.

ALA, fizyolojik sistemlerde bulunan, tiyol grubu içeren ve antioksidan aktivitesi olan önemli bir moleküldür.¹¹ Bu maddenin ekzojen ilavesinin serbest LA seviyelerini arttırdığı ve güçlü bir antioksidan olarak oksidatif stresi azalttığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. LA, küçük boyutu ve yüksek lipofilitesi nedeniyle biyolojik membranları kolayca geçerek tüm hücre kompartmanlarına ulaşır. Endojen ve ekzojen serbest radikal üreten süreçler sonucu DNA, lipidler ve proteinlerin bozulmasına karşı lipoik asidin koruyucu bir etkisi olduğuna dair önemli deliller vardır. LA hem yağ hem de suda çözünebilir, başlıca mitokondride serbest radikalleri temizlediği gibi, hücrel membranlarda da lipid peroxidler dahil serbest radikallerin azaltılmasında son derece etkindir.¹⁵¹ ALA'in reaktif oksijen bileşiklerinden $\cdot\text{OH}$, HOCl ve $^1\text{O}_2$ 'i doğrudan temizlediği, H_2O_2 ' i ise indirgediği bildirilmektedir.¹⁵⁴

Son günlerde LA, farklı farmakolojik olarak girişim çalışmalarında potansiyel bir antioksidan olarak dikkate değer bir önem kazanmıştır.¹⁵⁵ LA'in antioksidan enzimler üzerine etkisini araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır. Zacharias ve ark. ratlarda lipopolisakkaritin meydana getirdiği karaciğer hasarını, ALA'in 50 ve 100 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal yolla 3 hafta boyunca verilmesinin önlediğini bulmuşlardır.¹⁵⁶ Hagen ve ark. ratların karaciğerinde yaşlanmaya bağlı olarak artan MDA düzeylerinin diyetle ALA uygulamasıyla azaldığını bildirmişlerdir.¹⁵⁷ Maritim ve ark. streptozotosin ile diyabet oluşturdukları ratlarda oksidatif stres biyomarkerlerini araştırdıkları bir çalışmada; lipoik asidin karaciğer, böbrek ve kalpte SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerini değiştirerek diyabet sonucu oluşan oksidatif stresi azalttığını belirtmişlerdir.¹⁵⁸ Shila ve ark. ise arsenik intoksikasyonu oluşturulan ratlarda beyinde artan oksidan üretimi ve lipid peroksidasyon düzeylerinin lipoik asit uygulanmasından sonra azaldığını ortaya koymuşlardır.¹³⁰ Lee ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, fare beyin homojenatlarında *in vitro* H_2O_2 ve FAS (Ferröz amonyum sülfat) uygulanmasıyla lipid peroksidasyonu sağlanmış ve ALA'in doza bağımlı olarak lipid peroksidasyonunu azalttığı bulunmuştur.¹⁵⁴

Litaratüre baktığımızda MTX'in karaciğerde oluşturduğu oksidatif hasara karşı ALA'in koruyucu etkilerini inceleyen sadece bir çalışma yapıldığını gördük. Tabassum ve ark.'nın yaptığı bu güncel çalışmada 20 mg/kg tek doz MTX verilen farelerin karaciğer mitokondrisinde kontrol grubuna göre lipid peroksidasyonunda anlamlı bir artış saptanmış; 35 mg/kg LA ile desteklenmiş MTX uygulamasında ise sadece MTX verilen gruba göre lipid

peroksidasyonunda anlamlı bir azalma gösterilmiştir. MTX verilen farelerin süperoksid üretimi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış, LA tedavisi verilen farelerin süperoksid seviyesinde ise kontrol grubuna göre değişiklik olmamıştır. Ek olarak, LA ile ön tedavi yapılan farelere MTX verildiğinde süperoksid seviyesi, sadece MTX verilenlere göre anlamlı olarak azalmış ve kontrol grubuyla benzer bulunmuştur. Yine MTX verilen grupta GSH düzeyi anlamlı olarak azalmış, MTX+LA grubunda ise GSH düzeyinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada MTX kullanımı, karaciğerde Mn-SOD aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltmış; LA ön tedavisi ile birlikte MTX verilmesi tek başına MTX alan gruba göre enzim aktivitesini anlamlı olarak normale döndürmüştür. Ancak LA ön tedavisi, Mn-SOD aktivitesinde anlamlı bir etki göstermemiştir.¹⁵¹

MTX'in karaciğerde oluşturduğu oksidatif stresin tedavisi veya önlenmesinde LA ile ilgili yapılan başka bir çalışma henüz yoktur. Ancak LA'in başka ilaçlarla oluşturulan oksidatif karaciğer hasarını önleyebileceğine dair yapılan yayınlar vardır. Örneğin Saad ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ratlarda izoniazid ve rifampisin kombinasyonuna bağlı oksidatif karaciğer hasarına karşı LA tedavisinin potansiyel koruyucu etkisi incelenmiştir. Buna göre; izoniazid ve rifampisin verilen ratlarda lipid peroksidasyon ürünleri artmış, GSH içeriği, SOD, CAT ve MPO aktivitesi azalmıştır. Aynı ratlara aminoguanidin ve ALA verilmesiyle SOD, CAT ve MPO aktivitesi anlamlı olarak artmış ve GSH seviyesinde düzensizlik devam etmiştir.¹⁵⁹

Yapılan deneysel çalışmalarda MTX ratlara farklı dozlarda ve farklı uygulama şekilleri ile verilmiştir. Biz ratlara MTX'ı daha önceden doku toksisite çalışmalarında tanımlandığı gibi intraperitoneal yolla tek seferde 20 mg/kg dozdan verdik.^{76 160}

Oksidatif stresin, MTX'in karaciğer üzerinde toksisitesi üzerinde önemli bir oynadığı ve bu olumsuz etkisinin çeşitli antioksidan maddelerle azaltıldığı bazı deneysel çalışmalarla gösterilmiştir.^{76 83 93 95} Bunun yanında lipid peroksidasyonun serbest oksijen radikalleri yoluyla hücre membranına olan hasarda temel bir rol oynadığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehidtir. MDA lipid peroksidasyon düzeylerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılmaktadır ve lipid peroksidasyonunun derecesi ile çok iyi korelasyon göstermektedir.^{56 57} MTX'in karaciğerde mitokondrial lipid peroksidasyonu, protein karbonil içeriği ve süperoksid radikal oluşumunda önemli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. MTX'in karaciğer üzerine olan toksisitesinde lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerini arttırdığı ve bizim çalışmamızda kullanılan ALA gibi antioksidan maddelerle bu artışın azaltıldığı ortaya konmuştur. Ayrıca azalmış olan enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar yeniden normale dönmüştür.¹⁵¹ Bizim çalışmamızda da

benzer şekilde MTX uygulanması ile kontrol grubuna göre karaciğer doku MDA düzeylerinin anlamlı olarak artmış olduğunu gözledik. MTX uygulanan ratlara ALA tedavisi verilmesi ile, yükselmiş MDA düzeylerinin MTX grubuna göre anlamlı olarak düştüğünü tespit ettik.

Serbest radikaller, dokular üzerindeki doğrudan zararlı etkilerinin yanı sıra, ilgili dokularda lökositlerin birikimini tetikler ve böylece aktive nötrofiller aracılığıyla dolaylı olarak doku hasarını ağırlaştır. Daha önceki çalışmalarda MTX aracılı oksidatif karaciğer hasarına katkıda bulunan nötrofil birikiminin kantitatif bir belirteci olarak MPO düzeyleri kullanılmıştır.⁷⁶ MPO nötrofil infiltrasyonunun bir belirtecidir. Aktive nötrofiller MPO, elastaz, proteaz gibi bazı enzimler salgılar ve oksijen radikalleri açığa çıkarırlar.¹⁶¹ Ratlarda yapılmış pek çok çalışmada MTX'in nötrofil infiltrasyonunun bir belirteci olan MPO seviyelerini artırdığı saptanmıştır. Bu çalışmaların bazılarında beta-glukan, melatonin, N-asetil sistein gibi maddelerin MTX'in oluşturduğu MPO artışını baskıladığı saptanmıştır.^{10 76}

¹⁶⁰ Bizim çalışmamızda da benzer şekilde MTX ile indüklenen oksidatif karaciğer hasarına katkıda bulunan önemli oranda yükselmiş karaciğer doku MPO düzeyleri gösterilmiş; MTX uygulanan ratlara ALA tedavisi verilmesi ile, yükselmiş MPO düzeylerinin MTX grubuna göre anlamlı olarak düştüğü gözlenmiştir. Bu da ALA'in MTX'in neden olduğu inflamatuvar süreci azalttığına indirekt olarak bir göstergesi sayılabilir.

Glutatyon, tüm memeli hücrelerinde bulunan bir tripeptid olup, toksik metabolitler ve serbest radikallere karşı hücrelerin korunması için birçok metabolik süreçlere katılır. GSH ve diğer tiyol içeren bileşikler, hücre canlılığı ve membran stabilitesini sağlayarak, kimyasal yolla oluşan hücre ve doku hasarına karşı savunmada rol almaktadır.¹⁰ GSH hücre için en önemli antioksidan molekülüdür. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır.¹⁰⁷ Tiyol bileşikleri, özellikle GSH'ın koruyucu rolü mide ve karaciğerde gösterilmiştir. GSH ksenobiyotiklerin ve çeşitli kimyasalların detoksifikasyonunda önemli bir rol oynar.¹⁰ Babiak ve ark. MTX'in HeLa hücrelerinde GSH seviyelerini azalttığını, SOD ve CAT seviyelerini değiştirmediğini göstermişlerdir.⁹⁵ Phillips ve ark. MTX kullanımı sonrasında monosit GSH düzeylerinin belirgin olarak azaldığını gözlemlemişlerdir.¹⁶² Bizim çalışmamızda da, yapılan önceki çalışmalara benzer şekilde, MTX kullanımı karaciğer doku GSH düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden oldu. Yine MTX uygulanan ratlara ALA tedavisi verilmesi ile GSH düzeylerinde MTX grubuna göre bir miktar artış saptadık, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun nedeni bizim ALA'i ratlara MTX uygulamasına başlamadan birkaç gün önce değil de MTX uygulaması ile aynı gün vermemiz olabilir. Nitekim Tabassum ve ark.'nın yaptığı çalışmada ratlara LA tedavisi 10 gün boyunca verilmiş, 9. günde tek doz MTX

enjeksiyonu yapılmıştır. 11. gün sakrifiye edilen ratların karaciğer GSH düzeyi bakıldığında; MTX tarafından azaltılmış olan GSH düzeyinin LA ön tedavisi ile normal seviyelere doğru modüle edildiği gözlenmiştir. Böylece LA ön tedavisinin MTX tarafından sebep olunan lipid peroksidasyonundan hücreleri koruduğu söylenebilir.¹⁵¹ Bizim çalışmamızda ise LA'in bu etkisi tam olarak ortaya çıkmamış olabilir.

Endojen antioksidan enzimlerden olan CAT ortamdaki hidrojen peroksiti suya indirgeyerek zararsız hale dönüştürür. SOD ise vücudumuzda serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasara karşı anahtar rol oynayan endojen antioksidan bir enzimdir. Literatürde karaciğer hasarı oluşturulan deneysel modellerde antioksidan enzimlerin düzeyleri hakkında değişik sonuçlar vardır. Bizim çalışmamızda MTX uygulaması ile karaciğer doku SOD ve CAT aktiviteleri anlamlı olarak artmış, MTX uygulamasına ALA eklenmesi ile her ikisinin düzeyi de anlamlı olarak azalmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada da, ratların siyatik sinir, spinal kord ve beyin sapında MTX'in neden olduğu oksidatif strese karşı kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) koruyucu rolü incelenmiş; MTX grubunda siyatik sinir ve spinal kord dokusunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CAT ve GSH-Px aktivitelerinde artış bulunmuştur. MTX + CAPE ile MTX grubu karşılaştırıldığında CAT ve GSH-Px aktivitelerinde azalma saptanmıştır. Bu çalışmada; siyatik sinirdeki SOD aktivitesi gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.¹⁶³ Başka bir çalışmada ise ratlarda MTX uygulaması ile oluşan oksidatif renal hasara karşı N-Asetil sisteinin etkileri araştırılmış; MTX uygulaması ile böbrek dokusunda GSH, MDA düzeyleri ve CAT, SOD ve MPO aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. N-Asetil sistein tedavisiyle ise artmış olan bu parametreler azalmıştır.¹⁶⁴ Bizim çalışmamızda; MTX nedeniyle karaciğer dokusunda CAT ve SOD aktivitesindeki artış, oksidatif stres artışına adaptif bir cevap olabilir ya da in vivo uzun süreli ortamdaki aşırı hidrojen peroksit ve süperoksid birikimi nedeniyle oksidatif stresten dokuları korumak için CAT ve SOD aktiviteleri artmış olabilir. Dolayısıyla CAT ve SOD aktivitelerinin, karaciğerde oluşan oksidatif strese yanıt olarak arttığını düşünmekteyiz. MTX+ALA grubunda karaciğerde CAT ve SOD aktiviteleri, MTX grubundan anlamlı olarak düşüktü. Bu sonuçlarımız oksidatif stresle ilgili literatürdeki bazı çalışmalarla uyumlu olup karaciğer dokusunda MTX tarafından oluşturulan oksidan maddelere karşı ALA'in güçlü antioksidan ve radikal süpürücü etkisini göstermektedir.

MTX kullanımı karaciğer biyokimyasal testlerinin anormalliği ile ilişkilidir. MTX kaynaklı serum ALT artışı insidansı %14 iken, AST artışı %8 olarak bildirilmiştir.¹⁶⁵ MTX'in

ratlardaki karaciğer enzimleri üzerinde ciddi etkileri olduğu yapılmış pek çok çalışmada saptanmıştır. Uraz ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ratlara 20 mg/kg dozdan tek doz intraperitoneal olarak MTX verilmiş ve ratlar altıncı günde sakrifiye edilmiş. ALT, ALP ve GGT seviyeleri MTX alan grupta anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır.⁸³ Bu çalışmada MTX verildikten sonra 6. gün bakılan karaciğer enzimleri yüksek saptanmış, biz de aynı şekilde MTX verdikten sonra 6. gün ratları sakrifiye ettik. Bizim çalışmamızda ALT ve ALP düzeylerinin MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü, AST düzeylerinin ise anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. MTX uygulamasına ALA tedavisi eklendiğinde ise MTX grubuna göre, artmış AST düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı buna karşılık azalmış ALT ve ALP düzeylerinin anlamlı olarak değişmediği gözlemlendi. MTX grubunda ALT ve ALP düzeylerindeki azalmanın sebebi MTX'in karaciğerdeki akut toksik etkisi geçtikten sonra, yeni hepatositlerin oluşturulması aşamasında kan ve doku örneklerinin alınmış olması olabilir. Bunu destekleyen bir bulgu da MTX grubundan 3 ratın deneyin üçüncü günü ex olmasıdır. Yani biz ratları MTX'in akut toksik etkisi geçtikten sonra sakrifiye etmiş olabiliriz. Bunu araştırmak için ratlara bizim verdiğimiz dozdan MTX verilerek gruplara ayrılıp; iki, üç, dört, beş ve altı gün sonra kan ve karaciğer doku örnekleri alınıp karaciğer fonksiyon testlerine ve karaciğer histolojilerine bakılarak MTX'in maksimum toksik etkisinin uygulamadan kaç gün sonra oluştuğunu araştıran bir çalışma yapılabilir. Böyle bir çalışma bizim çalışmamızı destekleyici nitelikte olacaktır. ALT/AST ile ilgili bilinmesi gereken diğer bir husus bazı durumlarda aminotransferaz düzeylerinin olduğundan daha düşük veya yüksek bulunabileceğidir. Kronik böbrek yetersizliğinde, serum örneğinin bekletilmiş olmasında veya ALT'ye karşı antikor oluşan durumlarda beklenenden daha düşük değerlerin ölçülmesi olasıdır.

MTX karaciğerde steatoz, stellat (İto) hücre hipertrofisi, anizonukleozis ve hepatik fibroz dahil çeşitli histolojik değişiklikleri tetikleyebilir. Çalışmamızda 20 mg/kg tek doz MTX uygulaması karaciğerde belirgin histolojik değişiklikler oluşturmamıştır. Doku düzeyinde yaptığımız incelemelerde ratlarının karaciğer dokuları HE ile boyanarak yağlanma, nükleer polimorfizm, fibrozis ve portal inflamasyona bakıldı. İncelenen dokuların hiçbirinde histopatolojik olarak istatistiksel olarak anlamlı bir patoloji izlenmedi. Bunun sebebini anlamak için özellikle RA'li hastalarda yapılan çalışmalara bakmak gerekir. Örneğin Tishler ve ark. RA tanısı almış 10 hastaya MTX öncesi ve kümülatif doz 1.5 g. olduktan sonra biyopsi yapmışlardır. Hastaların hiçbirinde karaciğer yapısında bozulma saptanmamış ve sonuç olarak RA'li hastalarda uzun süreli MTX tedavisinin şiddetli karaciğer problemlerine yol açmadığı bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada 25 juvenil RA hastasının 32 biyopsi

örneğinde histolojik anormalliklerle, MTX dozu ve kullanım süresi anlamlı birlikteliğin olmadığı ifade edilmiştir. MTX kullanan RA hastalarında yapılan bir çalışmada ise karaciğer dokusunda MTX birikimi gösterilmiştir. Ancak bunun karaciğer fonksiyon testleri, histopatolojik bulgular, klinik cevap ve toksisite ile korele olmadığı bildirilmiştir¹⁶⁶ Tüm bu çalışmaların ışığında bizim çalışmamızda da histopatolojik anormalliklerin olmayabileceği söylenebilir. Bunun için MTX ile ilgili farklı doz ve farklı sürelerde başka çalışmalar yapılmasının faydalı olacağı kanısındayız.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Çalışmamızda MTX'in karaciğer enzimlerinden özellikle AST'yi anlamlı olarak arttırdığını, ALA verilmesi ile bu artışın anlamlı olarak azaltıldığını tespit ettik.

2. Çalışmamızda MTX ile indüklenen oksidatif stres sonucunda lipid peroksidasyonunun parametresi olan MDA ve inflamatuvar yanıtın bir göstergesi olan MPO düzeylerinin anlamlı olarak arttığını gözlemledik. ALA'in MTX'in indüklediği oksidatif stres (lipid peroksidasyonu) parametresi olan MDA düzeyini ve inflamatuvar yanıtın göstergesi olan MPO aktivitesini anlamlı olarak düşürdüğünü saptadık.

3. Antioksidanlardan CAT ve SOD düzeylerinin, MTX ile indüklenen oksidatif stres sonucunda arttığını; ALA verilmesi ile, MTX grubuna göre anlamlı olarak düştüğünü gözlemledik.

4. Antioksidanlardan GSH düzeyinin MTX verilmesi ile anlamlı olarak düştüğünü gözlemledik. Buna karşılık ALA eklenmesiyle GSH düzeyi hafif bir artış gösterse de, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

5. Histopatolojik incelemede, gerek hasar gerekse tedavi modelinde istatistiksel olarak anlamlı bir patoloji tespit edilmedi.

Bu sonuçlar, MTX tarafından indüklenen oksidatif karaciğer hasarını ALA uygulamasının azaltma yeteneğine sahip olabileceğini göstermektedir.

MTX uygulamasıyla meydana gelen hepatotoksik etkilerin azaltılmasında ALA'in alternatif bir tedavi olarak kullanılabileceği düşüncesindeyiz. Ancak MTX ile ilgili farklı doz ve sürelerde toksisite modellerinin oluşturulduğu çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünüldü.

7. KAYNAKLAR

- ¹ Kumar V, Cotran SR, Robbins SL. Temel Patoloji. Çevikbaş U (Çev. Ed.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2000; 713-744
- ² Wang H, Weit W, Wang NP, Gui SY, Wu L, Sun WY, Xu SY. Melatonin Ameliorates Carbon Tetrachloride-İnduced Hepatic Fibrogenesis in Rats via İnhibition of Oxidative Stress. Life Science 2005; 77: 1902-1915.
- ³ MacDonalds-Wicks LK, Garg ML. Vitamin E Supplementation in The Mitigation of Carbon Tetrachloride İnduced Oxidative Stress on Rats. Journal of Nutritional Biochemistry 2003; 14: 211-218.
- ⁴ Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, Ono Y, Ogiri Y, Kojo S. Evaluation of Oxidative Stres Durinh Apoptosis and Necrosis Caused by Carbon Tetrachloride in Rat Liver. Biochimica at Biophysica Acta 2001; 1535: 186-191.
- ⁵ Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: Where are we? World J Gastroenterol 2006; 12(4): 509-515.
- ⁶ Sinclair AJ, Barnet AH, Lunec J. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. Br J Hosp Med 1990; 43: 334-44.
- ⁷ Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr 1993; 57(5): 715-24.
- ⁸ Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82(1): 47-95.
- ⁹ Shimiziu I. Antifibrogenic therapies in Chronic HCV infection. Current Drug Targets Infectious Disorders. 2001; 1(2): 227-240.
- ¹⁰ Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. Med Sci Monit 2006; 12: 274-78.
- ¹¹ Liang JF, Akaike T. İnhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured mouse hepatocytes by α -lipoic acid. Chem Biol Interact 2000;124(1): 53-60.
- ¹² Goralska M, Dackor R, Holley B, McGahan MC. Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epiteial cells. Exp Eye Res 2003; 76(2): 241-8.
- ¹³ Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radic Biol Med 1995; 19: 227-250.
- ¹⁴ Dere F. Anatomi. 3.Baskı. Nobel Tıp Kitapevi, Adana 1994; 633-646.
- ¹⁵ Ökten A. Karaciğerin fonksiyonel anatomisi. Ökten A, Mungan Z, Çakaloğlu Y. Gastroenterohepatoloji. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul 2001; 311-314.

-
- ¹⁶ Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Basic Histology: 7th Ed, Appleton & Lange, İstanbul 1993; 380-394.
- ¹⁷ Scherlock S, Dooley S. Anatomy and function. In: Scherlock S, Dooley S (eds). Diseases of the Liver and Biliary System. 11th edition, Blackwell Publishing, Milan, İtalya 2002; 1-17.
- ¹⁸ Wanless IR. Anatomy, Histology, Embryology, and Developmental Anomalies of the Liver. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. 8th Edition, Saunder Elsevier, Philadelphia, USA 2006; 1543-1585.
- ¹⁹ Karaöz E. Sindirim Sistemi Histolojisi, In: Karaöz E. (ed) Özel Histoloji, SDÜ Basımevi, Isparta, 2002.
- ²⁰ Dilek ON. Karaciğer. Afyon Kocatepe Üniversitesi Klinik Tıp Kitapları Serisi,1.cilt, Afyon 2003; 2.
- ²¹ Pocock G, Richards CD. Human Physiology, The Basis of Medicine. Oxford University Press. Oxford: 1999: 416-417.
- ²² Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W. B. Saunders Company, 3rd ed. Philadelphia, London, Toronto: 1999: 1125-1177.
- ²³ İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalin S, Süleymanlar G. Temel İç Hastalıkları. Cilt I, Güneş Kitapevi, Ankara 1996; 1077-1167.
- ²⁴ Junqueira LC, Carnerio J, Kelley RO. Basic histology. Glands associated with the digestive tract. 8. edition, London: Appleton & Lange, 1995: 301-24.
- ²⁵ William KO, Patrick CN. Karaciğer, In: Müftüoğlu S., Kaymaz M., Atilla P. (eds) Netter's Essential Histology, Ankara 2009, Güneş Kitabevi.
- ²⁶ Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. The liver as an organ. 9. edition, Philedelphia: WB Saunders company, 1996: 883-88.
- ²⁷ Ganong WF. Karaciğer ve safra sistemi, In: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği. (eds) Ganong Tıbbi Fizyoloji, İstanbul 2002, Nobel Tıp Kitabevleri.
- ²⁸ Jick H, Walker AM, Porter J. Drug-induced liver disease. J Clin Pharmacol 1981;21:359-364.
- ²⁹ Koch HK, Gropp A, Oehlert W. Drug-induced liver injury in liver biopsies of the years 1981 and 1983, their prevalence and type of presentation, Path Res Pract 1985;179: 469-477.
- ³⁰ Lee MG, Hanchard B, Williams NP. Drug-induced acute liver disease. Postgrad Med J 1989; 65: 367-370.
- ³¹ Foulis PR, Sandrof BH, Gottfried M. Drug induced morphologic changes in the liver. Ann Clin Lab Sci 1988; 18: 215-228.

-
- ³² Stricker BHC, Blok APR, Desmet VJ. Pathology of drug-induced hepatic injury. In Stricker BHC, ed: Drug-induced hepatic injury, ed 2, Elsevier Science Publishers, Amsterdam,1992.
- ³³ Beşışık F. İlaçlara Bağlı Karaciğer Hasarı. 9. İç Hastalıkları Kongresi, Antalya, 2007; 150-152.
- ³⁴ Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med 1991; 91(Supp 3C):14-22.
- ³⁵ Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, 1995; 1-60.
- ³⁶ Ayla Ş, Oktar H, Tanrıverdi G, Cengiz M, Özkılıç AÇ. Doksorubisin nedenli sıçan hepatotoksitesine Nikotinamidin (koruyucu) etkisi, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 2009; 10(1): 229-238.
- ³⁷ Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford 1999, Oxford University Press.
- ³⁸ Knight JA. Diseases related to oxygen-derived free radicals. Ann Clin Lab Sci 1995; 25: 111-121.
- ³⁹ Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. Jpn J Physiol 1996; 46: 15-32.
- ⁴⁰ Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengesi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim 1998; 11: 336-341.
- ⁴¹ Halliwell B, Whiteman M. 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 2004;142: 231-255.
- ⁴² Von Sonntag C. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, New York, 2006.
- ⁴³ Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. Intensive Crit Care Nurs 2005; 21: 24-28.
- ⁴⁴ Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. Biyokimya, Editörler F. Gürdöl ve E. Ademoğlu. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2006; 829-835.
- ⁴⁵ Yu BP. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev 1994; 74: 139-162.
- ⁴⁶ Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med 1991; 91(Supp 3C):14-22.

-
- ⁴⁷ Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49(3): 481-93.
- ⁴⁸ Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161(4): 488-503.
- ⁴⁹ Memişoğulları R, Taysi S, Bakan E, Capoğlu I: Antioxidant status and peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochem. Func.* 2003; 21: 291-6.
- ⁵⁰ Breimer LH, Ionizing radiation-induced mutagenesis, *British Journal of Cancer* 1988; 57: 6-18.
- ⁵¹ Halliwell, B., Gutteridge, JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 280(1): 1-8.
- ⁵² Ames, BN, Shigenaga MK DNA damage by Endogenous oxidants and mithogenesis As Causes of Aging and Cancer. *Molecular Biology of free radical scavenging systems*, ed, scandalios, J.G, Cold Spring Harbor Laboratuary Pres, Plainviev 1992; 1-21.
- ⁵³ Dizdaroğlu M. Edited by Halliwell B, Aruoma OI, Horwood E. *Chemistry of Free Radical Damage to DNA and Nucleoprotein*, in *DNA and Free Radicals*. London 1993; 19-39.
- ⁵⁴ Shigenaga MK, Ames BN, Assays for 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine: A Biomarker of in vivo Oxidative DNA Damage. *Free Rad. Biol. Med.* 1991; 10: 211-216.
- ⁵⁵ Yılmaz S, Bahçelioğlu İH. Karbontetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipit peroksidasyonu, antioksidant enzim ve piruvat kinaz aktiviteleri. *Turk J Vet Anim Sci* 2000; 24: 25-28.
- ⁵⁶ Halliwell B, Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions, *Acta Neurology Scandinavia* 1989; 126: 23-33.
- ⁵⁷ Southorn PA Powis G, Free radicals in medicine, 1. Chemical nature and biologic reactions, *Mayo Clin Proc* 63, 381-389, 1988.
- ⁵⁸ Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res.* 1996; 25: 57-74.
- ⁵⁹ Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3: 30-39.
- ⁶⁰ Schoenberg MH, Poch B, Younnes M, et al: Involvement of neutrophils in postischaemic damage to the small intestine. *Gut* 1991; 32: 905-12.
- ⁶¹ Lavelli, V., Peri, C. and Rizzola, A. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48(5): 1442-1448.

-
- ⁶² Otamiri T. Oxygen radicals Lipid peroxidation and neutrophil infiltration after small-intestine ischemia and reperfusion. *Surgery* 1989; 105: 593-7.
- ⁶³ Cassiman D, Deneef C, Desmet VJ, Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 2001; 33: 148-158.
- ⁶⁴ Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130: 1807-1821.
- ⁶⁵ De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology* 2006; 131: 272-275.
- ⁶⁶ Parola M, Robino G. Oxidative Stress-Related Molecules and Liver Fibrosis. *Journal of Hepatology* 2001; 35 (2): 297-306.
- ⁶⁷ Poli G. Pathogenesis of Liver Fibrosis, Role of Oxidative Stress. *Molecular Aspects of Medicine* 2000; 21 (3): 49-98.
- ⁶⁸ Lee KS, Buck M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of Hepatic Stellate Cells By TGF Alpha and Collagen Type I is Mediated by Oxidative Stress Through Cyb Expression. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 96(5), 2461-2468.
- ⁶⁹ Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A, Gentilini P, Dianzani MU. Stimulation of Lipid Peroxidation or 4-Hydroxynonenal Treatment Increase Procollagen Alpha 1 (I) Gene Expression in human Liver Fat-Storing Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993; 194 (3), 1044-1050.
- ⁷⁰ Manda K., Bhatia A.L. Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. *Cell Biology and Toxicology*. 2003; 19: 367-372.
- ⁷¹ Kuzu N, Metin K, Dağlı AF, Akdemir F, Orhan C, Yalnız M, Özeran İH, Şahin K, Bahçecioğlu İH. Protective Role of Genistein in Acute Liver Damage Induced by Carbon Tetrachloride. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation*. Volume 2007, Article ID 36381, 6 pages doi:10.1155/2007/36381 .
- ⁷² Gochee PA, Johnsson JR, Clouston AD, Pandeya N, Purdie DM, Powell EE. 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* 2003; 18, 386-392.
- ⁷³ Aboutwerat A, Pemberton PW, Smith A, Burrows PC, McMahon RF, Jain SK, Warnes TW. Oxidant Stress is a Significant Feature of Primary Biliary Cirrhosis. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1637, 142-150.

-
- ⁷⁴ Şendur N, Karaman G, Şavk H, Şahinkarakaş E. Akut Metotreksat Toksisitesinin Erken Belirtisi ; Deri Ülserleri. T Klin Tıp Bilimleri 2002; 22, 593-596.
- ⁷⁵ Totan M, Ak AR., Albayrak D. Yüksek Doz Metotreksat Tedavisine Bağlı Karaciğer ve Böbrek Toksisitesi. T Klin J Pediatr 1999; 8, 185- 188.
- ⁷⁶ Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. J Pineal Res 2003; 34:282- 287.
- ⁷⁷ Hardman JG, Limbird LE. (Ed) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. ABD 2001, The McGraw-Hill Companies.
- ⁷⁸ Henderson ES, Adamson RH, Denham C, Oliverio VT. The metabolic fate of tritiated methotrexate. I. Absorption, excretion, and distribution in mice, rats, dogs and monkeys. Cancer Res.,1965; 25(7), 1008-17.
- ⁷⁹ Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. Seminars in Arthritis and Rheumatism 1998; 27:277-292.
- ⁸⁰ Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2001 Nov 25; 764(1-2): 217-254.
- ⁸¹ Kayaalp O. Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10. Baskı, Ankara 2002, Hacettepe Taş Yayıncılık.
- ⁸² Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. Anti Metabolitler, In: Berkman K, Oktay Ş, Onat F, Gören Z. (eds) Lippincott's Illustrated Review Serisinden: Farmakoloji, 2. Baskı, İstanbul 1997, Nobel Tıp Kitabevleri.
- ⁸³ Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M, Senturk O, Avsar E, Haklar G, Celikel C, Hulagu S, Tozun N. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. Dig Dis Sci 2008; 53(4): 1071–1077.
- ⁸⁴ Bertino JR. Karnofsky Memorial Lecture. Ode to methotrexate. J Clin Oncol 1993; 11: 5-14.
- ⁸⁵ Rosenfeld GC, Loose DS. Antimetabolitler, In: Selçukbiricik S. (ed) Farmakoloji, (Second Edition), İstanbul 1999, Nobel Tıp kitabevleri.
- ⁸⁶ Gözükara EM. Biyokimya 2 (3. Baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 1997.
- ⁸⁷ Allison AC. Immunosuppressive Drugs: The first 50 Years and a glance forward. Immunopharmacology 2000; 47, 63-83.

-
- ⁸⁸ Baram J, Allegra CJ, Fine RL, Chabner BA. Effects of methotrexate on intracellular folate pools in purified myeloid precursor cells from normal bone marrow. *J Clin Invest* 1987; 79: 692-697.
- ⁸⁹ Reide P, Taylor M. Antimetabolitler, In: Orer H. (ed) *Mosby's Crash Course Farmakoloji*, 1. Baskı, Ankara 2000, Güneş Tıp Kitabevi.
- ⁹⁰ Şahan C, Öztürk M. Kanser Kemoterapisi ve Karaciğer. 2003; 20(1): 47-60.
- ⁹¹ Olson J. *Klinik Farmakoloji*, 1. Baskı, Ankara 2000, Hacettepe Taş Yayıncılık.
- ⁹² Goto E, Tomojiri S, Okamoto I. Methotrexate poisoning with acute hepatorenal dysfunction. *Clinical Toxicology*. 2001; 39, 101-104.
- ⁹³ Hersh EM, Wong VG, Henderson ES, Freireich EJ. Hepatotoxic effects of methotrexate. *Cancer*, 1966; 19: 600-6.
- ⁹⁴ Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *J Clin Pathol*. 2009 Jun; 62 (6): 481-92.
- ⁹⁵ Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: Pentose cycle and oxidative stres. *Cell Biochem Funct*. 1998 Dec;16(4): 283-293.
- ⁹⁶ Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M, Pasvogel A, Hutter J, Krull K, Moore IM. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs*. 2005 Jan;6(3): 187-195.
- ⁹⁷ Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim II* 1998; 342-6.
- ⁹⁸ Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull* 1993;49(3): 700-18.
- ⁹⁹ Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160: 1-40.
- ¹⁰⁰ Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*. 1987;107: 526-45.
- ¹⁰¹ Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994; 52: 253-65.
- ¹⁰² Iqbal M, Cawthon D, Beers K, Widawau RF, Battje WG, Antioxidant enzyme activities and mitochondrial fatty acids in pulmonary hypertension syndrome in broilers *Poult Sci* 2002; 81: 252-60.
- ¹⁰³ Fridovich I: Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23: 239-257.

-
- ¹⁰⁴ Wheeler RC, Salkzman AJ. Automated Assays for Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activity. *Analytical Biochemistry*. 1990; 184, 193-199.
- ¹⁰⁵ Jenkins RR, Tengji J. Catalase Activity in Skeletal Muscle of Varying Fiber Types. *Experimentia*. 1981; 37: 67-68.
- ¹⁰⁶ Avviram I, Shaklai N. The association of Human Erythrocyte Catalase With the Cell Membrane. *Arch Biochem Biophys*. 1981; 212: 329-337.
- ¹⁰⁷ Di Mascio, P. Murphy, ME, Sies H. Antioxidan defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; 53; 194-200.
- ¹⁰⁸ Larson, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 1988; 27(4); 969-978.
- ¹⁰⁹ Üstündağ B, Bahçecioğlu İH, Şahin K, Gülcü F, Düzgün S, Özercan İH, Gürsu MF. Soy İzoflavonların Karbontetraklorüre (CCL₄) Bağlı Karaciğer Hasarı ve Plazma Paraoksonaz İle Arilesteraz Aktivite Düzeylerine Olan Etkileri. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*. 2005; 19(4), 263-271.
- ¹¹⁰ Çetin A, Kaynar L, Koçyiğit İ, Hacıoğlu SK, Saraymen R, Öztürk A, Orhan O, Sağdıç O. The effect of grape seed extract on radiation-induced oxidative stress in the rat liver. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. 2008; 19(2): 92-98
- ¹¹¹ Swierczynski J, Kochan Z, Mayer D. Dietary α -tocopherol prevents dehydroepiandrosteron-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes and mitochondria. *Toxicol. Lett.* 1997; 91: 129-136.
- ¹¹² Karahan İ, Yılmaz S, Ateşşahin A. Ratlarda Cisplatin ve Gentamisinin Kan İle Karaciğerde Oluşturdukları Oksidatif Stres Üzerine Likopenin Etkileri. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*. 2006; 20(1), 39-43.
- ¹¹³ Selvakumar E, Prahalathan C, Mythili Y, Varalakshmi P. Mitigation of oxidative stress in cyclophosphamide-challenged hepatic tissue by DL- α -lipoic acid. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005; 272: 179-185.
- ¹¹⁴ Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2004; 11: 1135-1146.
- ¹¹⁵ Suntres Z.E. Prophylaxis against lipopolysaccharide-induced liver injuries by lipoic acid in rats. *Pharmacological Research*. 2003; 48: 585-591.
- ¹¹⁶ Packer L, Kraemer K and Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*. 2001; 17: 888-895.

-
- ¹¹⁷ Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 1995; 19: 227-250.
- ¹¹⁸ Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem.* 2002; 40: 463-470.
- ¹¹⁹ Liang JF, Akaike T. Inhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured mouse hepatocytes by α -lipoic acid. *Chem Biol Interact.* 2000;124(1): 53-60.
- ¹²⁰ Snell EE, Strong FM, Peterson WH. Growth factors for bacteria. *Biochem J.* 1937; 31: 1789–1799.
- ¹²¹ Reed LJ, Debusk BG, Gunsalus IC, Hornberger CS. Crystalline α -lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science.* 1951; 114: 93-94.
- ¹²² Evans J, Goldfine ID. α -lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technology&Therapeutics.* 2000; 2: 401-413.
- ¹²³ Alvarez S, Boveris A. Lipoic acid and prevention of oxidative damage. *Ciencia e Cultura.* 1995; 47: 358-361.
- ¹²⁴ Bullock MW, Brockamann JA, Patterson EL, Pierce JV, Macchi ME. Proposed structures for protogen-A and protogen-B. *J. Am. Chem Soc.* 1954; 76: 1827-1828.
- ¹²⁵ Moini H, Packer L, Saris NL. Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2002; 182: 84- 90.
- ¹²⁶ Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid. *Gen. Pharmacol.* 1997; 29(3): 315-331.
- ¹²⁷ Handelman GJ, Han D, Tritschler H, Packer L. Alpha-Lipoic acid reduction by mammalian cells to the dithiol form and release into the culture medium. *Biochem Pharmacol.* 1994; 47: 1725-30.
- ¹²⁸ Gözükar EM. *Biyokimya. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları Malatya,* 1989; 55,56,705,845-848.
- ¹²⁹ Çakatay U. Pro-oxidant actions of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med Hypotheses.* 2006; 66(1): 110-7.
- ¹³⁰ Shila S, Kokilavani V, Subathra M, Panneerselvam C. Brain regional responses in antioxidant system to α -lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology.* 2005; 210: 25–36.
- ¹³¹ Pfaffly JR. Lipoic acid: The Antioxidant Chameleon. *Free Radicals in Biology and Medicine, Biosciences Department. The University of Iowa.* 2001; 77: 222.

-
- ¹³² Packer L. Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1994; 738: 257-264.
- ¹³³ Sigel H, Prijs B, McCormick DB, Shih JCH. Stability of binary and ternary complexes of α -lipoate and lipoate derivatives with Mn^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} in solution. *Arch Biochem Biophys.* 1978; 187: 208-14.
- ¹³⁴ Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP. Thioctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant?. *Biochem Pharmacology.* 1995; 50(1): 123-126.
- ¹³⁵ Khanna S, Atalay M, Laaksonen DE, Gul M, Roy S, Sen CK. Alpha-lipoic acid supplementation: Tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise. *J. Appl. Physiol.* 1999; 86: 1191–1196.
- ¹³⁶ Arivazhagan P, Ramanathan K, Panneerselvam C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. *Chem–Biol. Interact.* 2001; 138: 189-198 .
- ¹³⁷ Hagen TM, Vinarsky V, Wehr CM, Ames BN. (R) Alpha-lipoic acid reverses the age-associated increase in susceptibility of hepatocytes to tertbutylhydroperoxide both in vitro and in vivo. *Antioxidant Redox Signal.* 2000; 2: 473– 483.
- ¹³⁸ Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihn BH. Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radical Biol. Med.* 1998; 24: 1023–1039.
- ¹³⁹ Baur A, Harrer T, Peukert M, Jahn G, Kalden JR and Fleckenstein B. Alpha-lipoic acid is an effective inhibitor of human immuno-deficiency virus (HIV-1) replication, *Klin Wochenschr.* 1991; 69, 722-724.
- ¹⁴⁰ Al-Attar AM. Physiological and Histopathological Investigations on the Effects of α -Lipoic Acid in Rats Exposed to Malathion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Volume 2010 Article ID 203503, 8 pages doi:10.1155/2010/203503.
- ¹⁴¹ Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL- alpha -lipoic acid. *Eur JPharm.* 2000; 398, 139-146.
- ¹⁴² Muthuswamy AD, Vedagiri K, Ganesan M, Chinnakannu P. Oxidative stress- mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: Role of L-carnitine and DL- α -Lipoic Acid. *Clinica Chim Acta.* 2006; 368, 84-92.
- ¹⁴³ Selvakumar E, Prahalathan C, Varalakshmi P, Kumarasamy P, Saravanan R. Modification of cyclophosphamide-induced clastogenesis and apoptosis in rats by α -lipoic acid. *Mutat Res.* 2006; 606, 85- 91.

-
- ¹⁴⁴ Şahin M, Sağdıç G, Elmas O, Akpınar D, Derin N, Aslan M, Agar A, Alicigüzel Y, Yargıçoğlu P. Effect of chronic restraint stress and alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs. 2006; 54, 247- 252.
- ¹⁴⁵ Arivazhagan P, Ayusawa D, Panneerselvam C. Protective efficacy of alpha lipoic acid on acetyl cholinesterase activity in aged rat brain regions. *Rejuvenation Research*. 2006; 2, 198-201.
- ¹⁴⁶ Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95: 351–358.
- ¹⁴⁷ Worthington Enzyme Manual: Worthington Biochemical Corporation. Freehold, New Jersey, USA, 1972.
- ¹⁴⁸ Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1983; 23: 239–257.
- ¹⁴⁹ Beutler E. *Red Cell Metabolism*. New York, Grune and Stratton, 1975.
- ¹⁵⁰ Roenigk HH, Auerbach R, Mailbach HI, Weinstein GD. Methotrexate Guidelines: Revised. *J Am Acad Dermatol*. 1982; 38: 478–85.
- ¹⁵¹ Tabassum H, Parvez S, Pahsa ST, Banerjee BD, Raisuddin S. Protective effect of lipoic acid against methotrexate-induced oxidative stress in liver mitochondria. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48: 1973-1979.
- ¹⁵² Vardi N, Parlakpınar H, Ozturk F, Ates B, Gul M. Potent protective effect of apricot and β -carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46(9): 3015-3022.
- ¹⁵³ Hemeida RAM, Mohafez OM. Curcumin Attenuates Methotrexate-Induced Hepatic Oxidative Damage In Rats. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst*. 2008; 20(2): 141-148.
- ¹⁵⁴ Lee SR, Im KJ, Suh S, Jung JG. Protective effect of green tea polyphenol (-) epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gerbil brain homogenates. *Phytother Res*. 2003; 17(3): 206-9.
- ¹⁵⁵ Dadhania VP, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Intervention of α -lipoic acid ameliorates methotrexate-induced oxidative stress and genotoxicity: a study in rat intestine. *Chemico-Biological Interactions*. 2010; 183: 85-97.
- ¹⁵⁶ Zacharias ES. Prophylaxis against lipopolysaccharide-induced liver injuries by lipoic acid in rats. *Pharmacological Research*. 2003; 48(6): 585-591.

-
- ¹⁵⁷ Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr CM, Vinarsky V, Bartholomew JC, Ames AB. (R)- α -Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J.* 1999; 13(2): 411-18.
- ¹⁵⁸ Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 2003; 14(5): 288-294.
- ¹⁵⁹ Saad EI, El-Gowilly SM, Sherhaa MO, Bistavroos AE. Role of oxidative stress and nitric oxide in the protective effects of alpha-lipoic acid and aminoguanidine against isoniazid-rifampicin-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(7): 1869-75.
- ¹⁶⁰ Sener G, Eksioglu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Yegen BC. Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol.* 2006; 542(1-3):170-178.
- ¹⁶¹ Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2000; 67: 591-602.
- ¹⁶² Phillips DC, Woollard KJ, Griffiths HR: The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. *Br J Pharmacol,* 2003; 138: 501–11.
- ¹⁶³ Uzar E, Koyuncuoğlu HR, Yılmaz HR, Uz E, Songar A. Ameliorating Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Against Methotrexate-Induced Oxidative Stress in the Sciatic Nerve, Spinal Cord and Brain Stem Tissues of Rats. *Türk Nörol Derg.* 2010; 16(1): 12-20.
- ¹⁶⁴ Cetinkaya A, Kurutas EB, Bulbuloglu E, Kantarceken B. The effects of n-acetylcysteine on methotrexate-induced oxidative renal damage in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22: 284.
- ¹⁶⁵ Berkowitz RS, Goldstein DP, Bernstein MR. Ten years experience with methotrexate and folinic acid as primary therapy for gestational trophoblastic disease. *Gynecol Oncol* 1986; 23: 111.
- ¹⁶⁶ Erçin CN, Erçin O. Romatizmal Hastalıklarda Karaciğer. *Anatol J Clin Investig* 2008; 2(3):135-140.