



T. C.

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**GLUTAMİN ve HİDROKSİMETİL BUTİRAT
KULLANIMININ RATLARDA METOTREKSAT
KULLANIMINA BAĞLI GASTROİNTESTİNAL MUKOZİT
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dr. Mehmet ALAKAYA
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Elvan Çağlar ÇITAK**

MERSİN - 2013



T. C.

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**GLUTAMİN ve HİDROKSİMETİL BUTİRAT
KULLANIMININ RATLARDA METOTREKSAT
KULLANIMINA BAĞLI GASTROİNTESTİNAL MUKOZİT
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dr. Mehmet ALAKAYA
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Elvan Çağlar ÇITAK**

**Bu tez, BAP-TF DTB (MA) 2012- 4 TU kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir**

MERSİN - 2013

	Sayfa No
1. ÖZET	5
2. ABSTRACT	7
3. Giriş ve amaç	9
4. Genel bilgiler	11
4.1. Metotreksat	11
4.1.1. Metotreksatın Metabolizması	12
4.1.2. İlaç Direnci	14
4.1.3. Emilimi Dağılımı ve Atılımı	15
4.1.4. Klinik Kullanım	16
4.1.5. İlaç Etkileşimleri	16
4.1.6. Toksisitesi ve Oksidatif Stres	17
4.1.6.1. Kemik İliği Supresyonu	17
4.1.6.2. Sindirim Sistemi Hasarları	17
4.1.6.3. Hepatotoksisite	17
4.1.6.4. Akciğer Hasarları	18
4.1.6.5. Üriner Sistem Hasarları	18
4.1.6.6. Oküler Hasar	18
4.1.6.7. Nörolojik Hasar	18
4.1.6.8. İskelet ve Kas Sistemi Hasarı	18
4.1.6.9. Üreme Sistemi Hasarı	18
4.1.6.10. Cilt Hasarı	18
4.1.6.11. Metotreksata bağlı oksidatif stres	19
4.2. Sindirim Sisteminin Histolojik Özellikleri	19
4.3. Mukozit	23
4.3.1. Mukozit Patofizyolojisi	24
4.3.2. Mukozit Görülme Sıklığı	24
4.3.3. Mukozit Gelişiminde Risk Faktörleri	25
4.3.3.1. Hastaya Ait Risk Faktörleri	25
4.3.3.2. Tedaviye Ait Risk Faktörleri	26
4.3.4. Mukozitin Klinik Özellikleri	27
4.3.5. Mukozitin Tanı Kriterleri	27
4.3.6. Mukozitin Evreleri	29

4.3.6.1. Başlangıç Evresi	33
4.3.6.2. Hasara Yanıt ve Mesaj Oluşumu Evresi	33
4.3.6.3. Sinyal Çoğalma Evresi	34
4.3.6.4. Ülserleşme Evresi	35
4.3.6.5. İyileşme Evresi	36
4.3.7. Mukozitin Sonuçları ve Maliyeti	36
4.3.8. Mukozitin Önlenmesi ve Tedavisi	37
4.3.8.1. Oral Mukozitten Koruyucu Yaklaşımlar	38
4.3.8.2. Antimikrobiyal Ajanlar	38
4.3.8.3. Büyüme Faktörleri ve Sitokinler	39
4.3.8.4. Antiinflamatuvar Tedavi	39
4.3.8.5. Hücre Koruyucular	39
4.3.8.6. Kriyoterapi	40
4.3.8.7. Düşük Enerjili Lazer Uygulaması	40
4.3.8.8. Doğal Maddeler ve Alternatif Yaklaşımlar	40
4.4. Glutamin	41
4.5. Hidroksimetilbütirat	43
4.5.1. Kimyasal Özellikleri	44
4.5.2. HMB'nin Farmakodinamik Özellikleri	45
4.5.2.1. Metabolizması	45
4.5.2.2. Protein Yıkımının Etkilenmesi	46
4.5.2.3. Protein Sentezini Direk Arttırıcı Etki	47
4.5.2.4. Yaşlı Gönüllülerde Yara İyileşmesinin Geliştirilmesi	47
4.5.3. HMB'nin Klinik Güvenirliliği	48
4.6. Oksidatif Stres ve Total Antioksidan Kapasite	49
4.6.1. Serbest Oksjen Radikalleri	49
4.6.1.1. Serbest Oksijen Partiküllerinin Kaynakları	49
4.6.2. Antioksidan Sistemler	50
4.6.3. Total Antioksidan Kapasite (TAOK)	52
4.7. Apoptozis	54
4.7.1. Tanım ve Tarihçe	55
4.7.2. Apoptozis Biyokimyası	56

4.7.2.1. Kaspazlar	57
4.7.2.1.1.Kaspazların Biyokimyası	57
4.7.2.1.2. Kaspazların Sınıflandırılması	59
4.7.3. Hücre dışı Uyarılarla Apoptozisin Tetiklenmesi, Ölüm Algaçları ve Apoptoz	61
4.7.4. Hücre içi Apoptotik Yollar	62
5. Materyal ve Metot	66
5.1. Işık Mikroskopik Doku Takip ve İnceleme Protokolü	68
5.2. Bağırsak Mukoza Hasarı Skorlaması ve Kript Derinliği Ölçümleri	68
5.3. İmmünohistokimyasal İşaretleme	68
5.4. Elektron Mikroskopi Takibi	69
5.5. Kaspaz-3-8-9 Gen İfadesi	70
5.5.1. Materyal	70
5.5.2. Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu	71
5.5.3. cDNA Sentez Aşaması	73
5.5.4 Real-time PCR Aşaması	74
5.5.5. Ekspresyon Çalışması İçin İzlenen Yöntem	75
5.5.6. Taqman Prob Yöntemi	77
5.6. Verilerin Analizi	78
5.7. Total Antioksidan Status (TAS) Düzeyi Ölçümü	78
5.8. TOS Ölçümü	79
5.9. İstatistik	79
6. Bulgular	81
6.1. Grupların Klinik Gözlemi	81
6.2. Grupların Tartıları	81
6.3. Histopatolojik Sonuçlar	81
6.4. Park Skorlaması	83
6.5. Enterosit Çoğalma İndeksi	84
6.6. Apoptotik Hücre Sayımı	85
6.7. Elektron Mikroskopi Bulguları	87
6.8. Total Antioksidan Kapasite	88
6.9. Genetik	90

6.9.1.Kaspaz-3, -8, -9 Gen İfade Düzeyleri	90
7. Tartışma	93
8. Sonuçlar	99
9. Kaynaklar	101
10.Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	124
11.Şekiller Dizini	126
12.Resimler Dizini	127
13.Tablolar Dizini	129

ÖZET

Mukozit metotreksat (MTX) uygulaması sonrası en sık görülen yan etkilerden birisidir. Klinik öneminin anlaşılmasına rağmen halen mukozitten korunma ve tedavi için standart bir yaklaşım yoktur. Bu çalışma ile glutamin (Gln) ve hidrosimetil bütirat (HMB)'nin tek başlarına ve birlikte kullanımının intestinal mukozitten korumada ki etkinliklerini karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır.

Çalışma için 50 adet Wistar albino cinsi sıçan toplam 5 gruba ayrıldı. Tüm hayvanlara sakrifiye edilmeden 2 saat önce histopatolojik olarak bağırsak epitel hücre proliferasyonunu saptamak için 50 mg/100gr başına Bromodeoksiüridin (BrdU) uygulandı. Kontrol grubuna intraperitoneal serum fizyolojik (SF) uygulandı. Diğer tüm gruplara intraperitoneal 20 mg/kg MTX uygulandı. İlk iki gruba deneyin 3. gününden itibaren 5 gün plasebo olarak gavaj yoluyla 6 ml/kg distile su verildi. Üçüncü grup "MTX ve Gln" grubuna Gln 1 g/kg dozunda 5 gün gavaj yoluyla verildi. Dördüncü grup "MTX ve HMB" grubuna HMB 200 mg/kg dozunda 5 gün gavaj yoluyla verildi. Deneyin 3. gününde MTX 20 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. Beşinci grup "MTX, Gln ve HMB" grubuna Gln 1g/kg, HMB 200 mg/kg dozunda 5 gün gavaj yoluyla verildi. Beşinci gün tüm gruplardan histopatolojik inceleme için intestinal ve kan örnekleri alındı. Elde edilen intestinal örnekler hem histolojik olarak incelendi hem de apoptozu belirlemek için kaspase-3 gen ifadesine bakıldı. Alınan serum örneklerinden Total antioksidan kapasite (TAOK) düzeyleri çalışıldı.

Çalışmada MTX uygulanan tüm gruplarda ishal tespit edildi. Gerek Gln, gerek HMB ve gerekse Gln-HMB kombinasyonunun ishal oluşumunu önleyici etkisi tespit edilemedi. Kript derinliği bakımından değerlendirildiğinde MTX alan grubun kript derinliğinin en az olduğu ($p<0.05$), buna karşın MTX-Gln ve MTX-HMB grubunun kript derinliğinin MTX grubuna kıyasla daha iyi oldukları ($p<0.05$) ancak aralarında istatistiksel farklılık olmadığı belirlendi ($p>0.05$). MTX-Gln-HMB grubunun ise kontrol grubuna yakın kript derinliğine sahip olduğu ancak SF grubu ile aralarında istatistiksel olarak farklılık olduğu belirlendi ($p<0.05$). Park skorlamasında en iyi sonuçların SF grubunda olduğu

tedavi grupları arasında ise en iyi sonuçların MTX-Gln-HMB grubunda olduğu belirlendi. Benzer şekilde enterosit çoğalma indeksinin en yüksek MTX-Gln-HMB grubunda olduğu belirlendi. Dokuda kaspaz-3 boyanması açısından bakıldığında en fazla apoptozun MTX grubunda olduğu diğer gruplarla kıyaslandığında apoptotik hücre yüzdesinin en düşük MTX-Gln-HMB grubunda olduğu saptandı. Kaspaz-3, ve-8 ifadenmesinin en yüksek MTX grubunda olduğu ($p < 0.05$), diğer gruplara göre en düşük değerin ise MTX-Gln-HMB grubunda olduğu ancak istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). Kaspaz-9 gen ifadenmesinde en düşük değerin MTX-Gln-HMB grubunda olduğu ancak diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($p > 0.05$).

Literatürde bilgilerimiz doğrultusunda MTX kullanımına bağlı intestinal mukozit gelişiminin önlenmesi amacıyla Gln ile birlikte HMB kullanımına dair bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışma sonuçlarımız kombine tedavinin gerek Gln gerekse HMB'nin tek başına kullanımından daha iyi sonuçlar verdiğini göstermektedir. Yapılacak klinik çalışmalarla elde ettiğimiz bu verilerin doğrulanması gerektiğini düşünmekteyiz. Başarılı sonuçlar elde edilmesi durumunda oral ve intestinal mukozitin önlenmesinde yeni ufuklar açılacağını ve tedavi stratejilerine olumlu katkılar sağlayacağını söylemek mümkün olabilecektir.

ABSTRACT

Mucositis is one of the most complications that is seen during methotrexate (MTX) treatment. Though the clinical importance of mucositis is realized well, there has not been implemented standard strategy in prevention and treatment yet. In this study, glutamine (Gln) and β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB) were used combined or one by one, for the prevention of intestinal mucositis, and there was made the comparison of the efficacy of either methods.

For the study, fifty Wistar albino rats were divided to 5 groups. For determining the degree of the gut epithelial proliferation, 2 hours before sacrificing the animals, 50 mg/100gr Bromodeoxyuridine (BrdU) was applied to all the animals where intraperitoneal %0.9 salin to the control rats. All of the study groups got 20 mg/kg MTX intraperitoneally. At the third day of the experiment, 6 ml/kg distilled water was given by nasogastric route for 5 days to the first 2 groups of animals as placebo. The third group was "MTX ve Gln" group and they were given 1 g/kg Gln for 5 days in the same route. "MTX and HMB" group was designed as 4th group and was given 200 mg/kg HMB for 5 days by nasogastric route. In the third day of the experiment 20 mg/kg MTX was exerted intraperitoneally. "MTX, Gln ve HMB" combination was used to the fifth group and they had been given 1g/kg Gln with 200 mg/kg HMB by nasogastric route for 5 days. On the fifth day of the experiment, blood and intestinal tissue samples were obtained form all of the groups. Intestinal samples were dissected for histopathological examination, and apoptosis was searched by inquiring caspase-3 gene expression. Total antioxydant capacity (TAOC) was studied in the serum samples too.

Diarrhea was the common symptom in the MTX groups and either Gln or HMB or Gln-HMB combination did not prevent diarrhea. When compared, the degree of the intestinal cripts were deepest in the MTX group ($p < 0.05$), despite that MTX-Gln and MTX-HMB groups were shown better scores in cript lengths ($p < 0.05$), there was no significant difference ($p > 0.05$). Though the MTX-Gln-HMB group had similiar results with the control group in the depth of cript measures, there was statistically difference when compared

with the saline group ($p < 0.05$). When park scoring system was applied, the best results were belonged to saline group, furthermore the MTX-Gln-HMB group had higher scores among five study groups. Similarly “erythrocyte reproduction index” was also highest in this group. When the tissue was inspected by caspase-3 coating, apoptosis was highest in MTX group. The percentage of apoptosis was lowest in MTX-Gln-HMB when compared to the among the groups. Expression of caspase-3 and -8 genes were highest in the MTX group ($p < 0.05$) where lowest in the MTX-Gln-HMB group but there was no significant difference ($p > 0.05$). Though the Kaspase 9 expression was lowest in the MTX-Gln-HMB group, there was no significant difference among the groups ($p > 0.05$).

To our knowledge, there is not any study investigating Gln and HMB use in the prevention of MTX induced intestinal mucositis. This research showed that the combination Gln and HMB use is more effective then the seperate use of both chemicals.

In our opinion the data from this study may be confirmed by future clinical research. If it could be possible to get successful results in preventing oral and intestinal mucositis, new horizons will come up on treatment strategy.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, çocuklarda ölüm nedenleri arasında Amerika Birleşik Devletleri ve birçok gelişmiş ülkede ikinci sırada yer alırken ülkemizde 3. sıradadır (Tablo 1). Çocuklarda erişkinlere kıyasla çok daha nadir olup, tüm kanserlerin %0.5'i 15 yaşından küçük çocuklarda görülmektedir. Çocuklarda sıklığı 15 yaş altında milyonda 110-150 arasındadır^{1,2,3,4}. Şu an dünyada yaklaşık 25.000.000 kanserli olgu olduğu bilinmektedir ve her yıl 12.7 milyon kişi kansere yakalanmaktadır. Olguların %56'sı gelişmekte olan ülkelere aittir. 2030 yılında bu rakamın 21.4 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Her yıl 7.6 milyon kişi kanserden ölmekte iken 2030 yılında bu rakamın 13.200.000'a ulaşacağı tahmin edilmektedir⁶.

Tablo1: Türkiye'de 1-14 yaş grubu çocuklarda ölüm nedenleri (2008)⁵

Ölüm nedeni	Toplam (%)
Kalp Hastalıkları	30.1
Enfeksiyon Hastalıkları	13.5
Kanser	6.7
Kazalar	6.0
Serebrovasküler Hastalıklar	3.9
Diğerleri	39.7

Çocuklarda ve ergenlerde sık görülen kanser türleri akut lenfoblastik lösemi, beyin tümörleri, lenfomalar, yumuşak doku ve kemik sarkomlarıdır. Ayrıca çocuklarda erken çocukluk ve ergenlik olmak üzere iki yaş grubunda kanser sıklığında artış görülür. Hayatın ilk yılında en sık görülen tümörler nöroblastom, wilms tümörü, retinoblastom, rabdomiyosarkom, medulloblastom gibi embriyonel tümörlerdir. İki ile beş yaşlar arasında bu embriyonel tümörlere ek olarak akut lösemiler, hodgkin dışı lenfomalar ve gliomlar sık görülmeye başlamaktadır. Ergenlik dönemini geçtikten sonra ise kemik maligniteleri,

hodgkin lenfoma, gonadal germ hücreli tümörler, tiroid kanserleri ve malign melanom gibi karsinom türleri daha sık karşımıza çıkmaktadır.

Çocukluk çağında kanserlerin büyük bir çoğunluğu tedavi edilebilmekte olup uzun yaşam beklentileri nedeniyle yüksek doz ve yoğun kemoterapi (KT) protokolleri uygulanmaktadır. Antineoplastik ajanların çoğu hücre döngüsünün çeşitli basamaklarına etki ettikleri için gözlemlenen yan etkilerin çoğu hızlı hücre döngüsü olan kemik iliği, oral ve intestinal mukoza, epidermis, karaciğer gibi doku ve organlar üzerine olur. En sık görülen yan etkiler kemik iliği ve bağışıklık sisteminin baskılanması, bulantı ve kusma, karaciğer bozukluğu, üst ve alt gastrointestinal mukozit, dermatit ve alopesidir. Bu akut yan etkiler çoğunlukla geri dönüşümlüdür. Hem KT hem de radyoterapi (RT) hastaların hayat kalitelerini arttırmak amacıyla kullanılmalarına rağmen bir çok yan etkiye sahiptirler. Tedaviye bağlı gelişen ağır yan etkiler hastalarda morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır. Kanser tedavisinin diğer önemli yan etkileri olan nötropeni ve ağır bulantıyla nispeten başa çıkmış olmasına rağmen mukozit halen tedavide doz kısıtlayıcı neden olmaya devam etmektedir. Her yıl ortalama olarak KT ve RT sonucu oluşan 400.000 yeni oral kavite hasarı saptanılmaktadır⁷. Mukozit tedavisinde bir çok ajan kullanılmakta olup sınırlı etkilere sahiptir. Bu nedenle mukozitin önlenmesi ve tedavisi amacıyla birçok ajan gerek hayvan çalışmaları gerekse klinik çalışmalarla araştırılmaktadır.

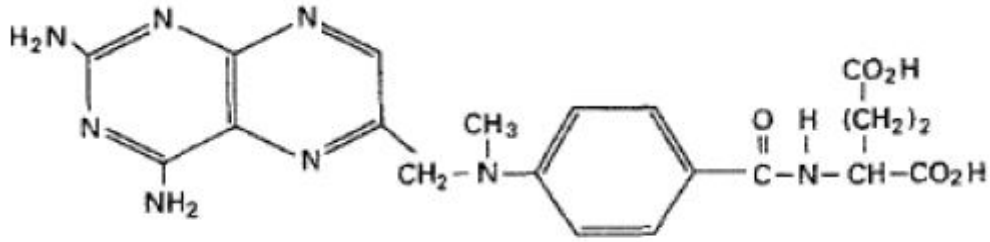
4.GENEL BİLGİLER

4.1. Metotreksat

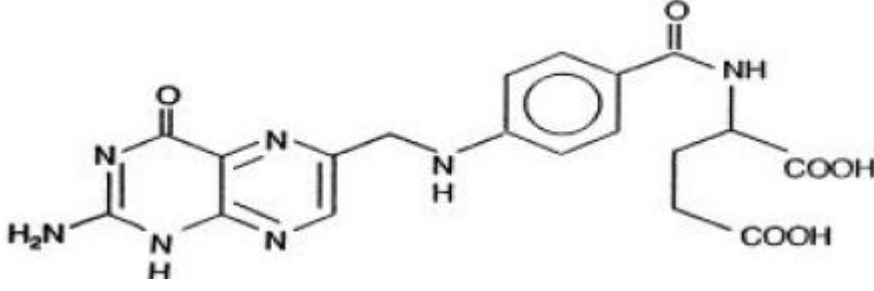
Kliniklerde çok yaygın olarak kullanılan folik asite benzeyen folik asit antimetaboliti bir antineoplastik ilaçtır.

Antimetabolitler, deoksinükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA), proteinler ve diğer temel hücre bileşenlerinin sentez zincirinin değişik basamaklarında substrat ya da koenzim olarak rol oynayan çeşitli doğal metabolitlerin benzeşikleridir. Antimetabolitler, çoğu kez çoğalma hızı yüksek tümörlere etkili olmaktadır. En önemli toksik etkileri kemik iliği ve bağırsak mukozası epiteli üzerindedir. Fetüse gebeliğin bütün dönemlerinde zarar verebilirler⁸. Antimetabolit ilaçlara 5-Flourasil (5-FU), metotreksat (MTX), sitarabin, merkaptopürin örnek gösterilebilir.

Folik asit antagonistlerinin ilk defa Farber ve arkadaşları tarafından 1948'de tanımlanmasıyla kanser KTsinde yeni bir dönem açılmıştır. Klinikte şimdiye kadar birçok folat analogu kullanılmıştır ancak MTX en yaygın kullanılanıdır ayrıca MTX sodyum, MTX LPF, rheumatrex, amethopterin ve NSC-740 olarak da isimlendirilmektedir⁹.



Şekil 1: Metotreksatın yapısal formülü¹⁰



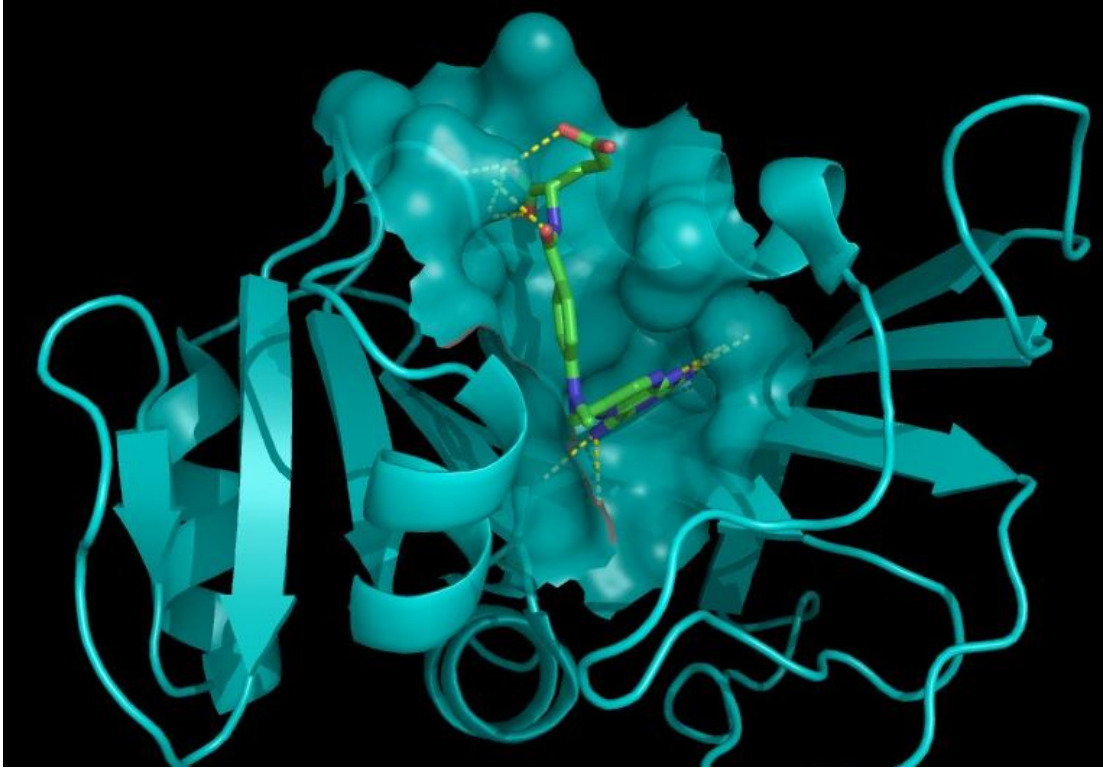
Şekil 2: Folik asit yapısal formülü¹¹

Kimyasal olarak folik asitin 4-amino, N¹⁰-metil analogudur. Kimyasal MTX N-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridinil)metilamino] benzoil]-L-glutamik asittir.

4.1.1. Metotreksatın metabolizması

Folik aside bağlı enzimler tek karbon fragmanların transferini içeren reaksiyonlarda gereklidir. Bunlar arasında en önemlisi DNA sentezi için deoksiüridilatın metilasyonu ile timidilat elde edilmesidir. Bu işlem sırasında metilen tetrahidrofolat (MTHF) dihidrofolata (DHF) dönüşür. DHF'in ise tekrar kullanılması için tetrahidrofolata (THF) dönüşmesi gereklidir. Bu dönüşüm için dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine ve NADPH'a gereksinim vardır. THF, DNA ve RNA sentezi için gerekli olan pürin ve pirimidin nükleotidlerinin sentezinin önemli bir komponenti olan timidilatın üretiminde rol oynar¹². Bu nedenle MTX THF eksikliğine yol açarak pürin, pirimidin metabolizması ve DNA sentezini içeren pek çok metabolik yolu etkiler⁹.

MTX'in moleküler yapısı DHF'ye benzer (Şekil 1 ve 2). MTX'in yapısında birden fazla metil grubu vardır ve DHF'deki hidroksil (OH) grubu yerine NH₂ bulunur. MTX, DHF'yi THF'ye çeviren DHFR enzimini inhibe eder (Resim 1).



Resim 1: DHFR'nin bağlanma bölgesi (Yeşil renk ile gösterilen MTX mavi renk ile gösterilen DHFR'nin aktif bölgelerine bağlanır)

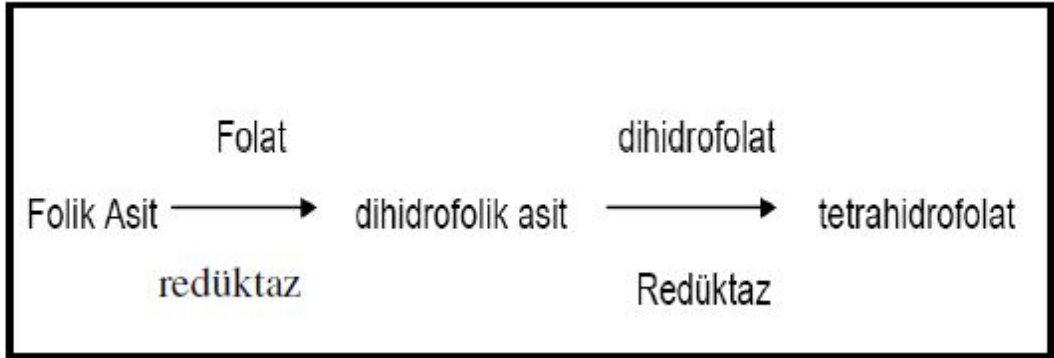
MTX'in sitotoksik etkisini gösterebilmesi için folilpoliglutamata sentaz enzimi tarafından poliglutamasyona uğratılması gerekmektedir. Poliglutamasyon işlemi hem karaciğer, kemik iliği, fibroblast ve eritrosit gibi normal dokularda hem de malign dokularda yapılmaktadır. MTX poliglutamalarının hücre dışına atılmalarının zor olması nedeniyle, MTX'e oranla hücre içinde daha uzun süre kalır, diğer bir deyişle poliglutamalar bir tür depo formudur. Böylece metotreksat, folat metabolizmasını etkileyen enzimler üzerinde artmış baskılayıcı etki gösterir¹³.

Chabner ve arkadaşları MTX'in folat antagonisti mekanizmasını açıklayacak iki farklı teori öne sürmüşlerdir. Birincisi folik asit azalma teorisidir. Bu teoriye göre hücre içi folik asitin azalması DHFR enziminin baskılanmasına dayanmaktadır. İkinci teori ise yarışma teorisidir. Bu teori ise nükleotidlerin sentezinde görevli basamakları MTX'in doğrudan baskılamasına ve DHF birikimine dayanmaktadır. MTX, DHFR'yi baskılayarak THF oluşumunun azalmasına neden olur(Şekil3). MTX poliglutamaları 5,10 metilen tetrahidrofolat

redüktaz, glisinamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz ve aminoimidazol-karbokzamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz enzimlerini doğrudan baskılar. Bu enzimlerdeki baskılanma pürin ve pirimidin metabolizmasının baskılanmasına neden olur¹³.

Bu yapı taşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA sentezini baskımlarken aynı zamanda enerji üretimi için gerekli adenozin trifosfat (ATP) üretimini baskılar. Ayrıca THF'ye dönüşmeden kalan DHF poliglutamatlar ve MTX'in poliglutamat türevleri toksik baskılayıcı metabolitler şeklinde birikir. Timidilat sentazın ve pürinin sentezinde rol oynayan transformilaz enzimlerinin baskılanması, MTX'in iki poliglutamat metaboliti tarafından yapılır. MTX'in hücrelerdeki toksik etkileri dışarıdan ilaç olarak verilen folinik asit (N5-formiltetrahidrofolat) tarafından tersine döndürülür ancak folik asidin kendisi ise bu durumda THF'ye dönüşemediğinden antidot etkinlik göstermez^{13,14}.

Ayrıca MTX antiinflamatuvar etkiye de sahiptir. Proinflamatuvar sitokinler olan İnterlökin 1(IL-1), 2, 6 ve interferonγ (INF-γ)'nın gen belirlenmesini azaltır, siklooksijenaz-2 sentezini ve nötrofil kemotaksisini inhibe eder.



Şekil 3: Folik Asit Metabolizması

4.1.2. İlaç Direnci

MTX kullanımını kısıtlayan faktör direnç gelişimidir. MTX'e karşı tümör hücrelerinde oluşan direnç gelişimi dört nedene bağlıdır. Bunlar; ilacın hücre içi alımının azalması, değişime uğrayan DHF'nin MTX'e karşı olan ilgisinin azalması, poliglutamat oluşumunda azalma ve gen ifadeleneşindeki artışa

bağlı olarak DHFR sentezinde artıştır. MTX'in hücre içine alınması; folik asit ve L-lökovorin ile paylaşılmış bir taşıyıcı sistem gerektirmektedir^{15,16}.

Oysaki atılımı özgül baskılayıcılara duyarlı en az üç bileşik ile farklı bir mekanizma tarafından gerçekleştirilir¹⁷. Bu nedenle direnç gelişimi MTX'in hücre içine alınmasının azalması ya da atılımının artması sonucu gerçekleşir. İkinci olarak hücre içi MTX direkt etki edebilir ya da MTX'in dışarıya atılmayan uzun zincirli poliglutamat türevlerine dönüşebilir¹⁸.

MTX'in her iki formunda sitotoksik olmasına karşın poliglutamat formu hücre içinde çok uzun süre kalabilir ve önemli sitotoksositeye yol açabilir. Böylece MTX'in poliglutamat formuna dönüşmesinin azaltılması bir direnç mekanizması olabilir. MTX'in bazı tümör hücreleri tarafından poliglutamata dönüşümünün artması normal hücrelerle kıyaslanınca tümörlü hücrelerin ölümünde artışa neden olur.

Direncin üçüncü mekanizması hedef molekül DHFR ile ilintilidir. Tümör hücrelerinde mutasyon sonucu DHFR'nin MTX'e ilgisinin azalması, direnç gelişmesine neden olur¹⁹. Ayrıca DHFR'nin aşırı ifadenmesi sonucu hücrede bol miktarda THF oluşması da direnç gelişiminde rol oynayan önemli bir faktördür. Dirençli hücrelerde MTX'e ilgisi düşük DHFR mutantlarının oluştuğuda gösterilmiştir. MTX, hücelere folatı ve THF'i de taşıyan bir aktif transport olayı ile girer; mutasyon sonucu bu mekanizmanın bozulmasının da dirençte rol oynadığı deneysel tümör modellerinde gösterilmiştir. Diğer bir direnç mekanizması dirençli hücrelerde timidin sentaz aktivitesinin azalmasıdır²⁰.

4.1.3. Emilimi, dağılımı ve atılımı

MTX ağız yoluyla alındığında %47-83 oranında emilir. 40 mg/m²'den yüksek dozda alındığında biyoyararlanımı ortalama %17,5'e kadar düşer. Aynı zamanda süt ve süt ürünleriyle birlikte alımda biyoyararlanımını düşürmektedir. İntramusküler uygulamalarda ise ortalama biyoyararlanımı %76'lara kadar çıkmaktadır. Parenteral uygulandığında tamamıyla emilir. İntravenöz bolus tarzı uygulamalarda yarılanma ömrü ilacın dokuya geçiş fazı olan alfa fazında 2-8 dakika, ekskresyon ve metabolizma fazı olarak tanımlanan beta fazında 0,9-2 saat ve hücreden salınım fazı olan gama fazında ise 5.3-11 saattir. MTX intravenöz uygulamadan %41-51 oranında serum proteinlerine özellikle albüminine bağlanır ve sinir sistemi dışında tüm vücuda yayılır. Serum MTX

düzeyi 5×10^{-5} Molar'a (M) ulaştığında proteinlere bağlanma kapasitesini aşar ve serumda bağlanmadan serbest halde kalır. Normal tedavi dozunda verildiğinde serebrospinal sıvıya geçişi kötüdür. Serebrospinal sıvıda terapötik düzeyi sağlamak için MTX yüksek düzeyde ya da intratekal olarak verilmelidir. Plevral effüzyon ve asit gibi üçüncü boşlukta toplanan sıvılarda dağılım gösterir^{21,22}.

Karaciğerde ve hücre içinde folilpoliglutamata sentaz enzimi tarafından poliglutamata çevrilir. Az miktarda 7-hidroksimetotreksata metabolize olur, bu maddenin suda çözünürlüğü 3-5 kat daha azdır. Ana maddenin %10-20'si ve 7-hidroksimetotreksat, safra ile atılır ve enterohepatik dolaşım ile yeniden emilir. Asıl olarak glomerüler filtrasyon ve aktif tübüler sekresyon aracılığıyla böbrekler yoluyla atılır. Alınan ilacın %80-90'ı 24 saat içinde değişime uğramadan idrar ile atılır.

4.1.4. Klinik kullanımı

Akut lenfoblastik lösemi, hodgkin dışı lenfoma, osteosarkoma gibi malignitelerin yanı sıra, juvenil idiopatik artrit, psöriasis, psöriatik artrit, vaskülit, wegner granülomatozu, henoch schönlein purpurası, sarkoidoz, sistemik lupus eritematozus, eozinofilik fasiit, crohn hastalığı, ülseratif kolit ve juvenil idiopatik artritte görülen üveitte de kullanılır.

Romatoid artrit ve psöriatik artrit tedavisinde antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interlökin 1-beta (IL1- β) gibi inflamatuvar sitokinler ile metalloproteinaz gibi mediatörlerin romatoid artritte MTX tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir²³.

4.1.5. İlaç Etkileşimleri

Aspirin, penisilinler, probenesid, non-steroidal antiinflamatuvarlar, sefalosporinler ve fenitoin, MTX'in renal atılımını baskılar ve toksik etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. Omeprazole MTX'in serum düzeyini arttırarak toksik etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. MTX warfarinin antikoagulan etkisini arttırır; ilacın plazma proteinlerine bağlanmasını kompetitif olarak engeller. 5-FU'dan 24 saat önce verildiğinde ilacın antitümör aktivitesini arttırır. Leukovorin, MTX'in toksik etkilerini engeller, ayrıca antitümör etkinliğini

azaltabilir. Ayrıca folik asit içeren maddeler ve L-asparaginaz, MTX'in antitümör etkinliğini azaltırlar²³.

4.1.6. Toksisitesi ve Oksidatif stres

4.1.6.1. Kemik iliği supresyonu (baskılanması)

MTX'in başlıca yüksek doz toksisitesidir. Özellikle kötü huylu olmayan tümörlerde, hastalarda miyelosüpresyon oluşması tedavinin ertelenmesine neden olur. Nötropeni ilaç dozuyla ilintilidir. Nötrofil sayısı MTX alımından 4-7 gün sonra en düşük düzeyine ulaşır ve ortalama 14. günde normal düzeyine tekrar döner. Trombositopeni, nötropeni ile paraleldir. Ayrıca anemi kemik iliği baskılanmasına ikincil olarak görülür⁹.

4.1.6.2. Sindirim sistemi hasarı

Mukozit doz kısıtlayıcı yan etkilerinden biridir. MTX tedavisinden sonraki 3-7. günde oluşur, nötropeni ve trombositopeniden önce gerçekleşir. Bulantı ve kusma doza bağlı oluşur. İntestinal kriptlerde apopitoz ve villöz atrofi oluşur. Goblet hücrelerindeki hasara bağlı müsin sekresyonunda ve bağırsak koruma özelliği olan proteinlerde azalma gerçekleşir²⁴. Özellikle gastrointestinal sisteme ait mukozit hastalarda beslenme, büyüme gelişme ve yaşam standartlarında bozulmalara sebep olacaktır.

Standart dozlarda genellikle mide bulantısı ve kusma görülmez. Oluşan diyare bazen tedaviyi kesmeye sebep olacak kadar şiddetli olabilir. MTX koliti ya da peptik ülseri olan hastalarda dikkatli kullanılmalıdır⁹.

4.1.6.3. Hepatotoksisite

MTX karaciğerde enzimatik bir sistem aracılığıyla major ekstrasellüler metaboliti olan 7-hidroksimetotreksata dönüşür²⁵. MTX hücre içinde poliglutamat formunda tutulur. MTX kullanımı ile hücre içindeki poliglutamat formunun miktarı artar ve folik asit seviyeleri düşer. Bu da hepatosit nekrozuna sebep olur²⁶. Poliglutamat formunun seviyesinin artması intrasellüler alanda ilacın varlığını artırır. Bu mekanizmanın MTX'in hepatotoksik etkisinin sebebi olduğu düşünülmektedir²⁷. Yüksek doz tedavide ilk 12-24 saat içinde başlayabilen serum transaminazları ve bilirubin düzeylerinde geçici yükseklığe yol açar, 10 gün içinde normale döner. Uzun süre ve düşük dozda tedavi uygulanan hastalarda da karaciğer disfonksiyonu oluşabilir. Uzun süreli kullanımlarda

karaciğer fibrozu ile birlikte kronik hepatoksisite ve siroz oluşabilir, ölümlerle sonuçlanabilir.

4.1.6.4. Akciğer hasarı

Doza bağımlı olmaksızın kuru öksürükten, dispne, hipoksi, pnömonitise ve göğüs radyografisinde değişikliklere kadar değişik etkileri görülebilir.

4.1.6.5. Üriner sistem hasarı

Akut böbrek yetmezliği, azotemi ve idrar retansiyonuna yol açar. MTX ve metabolitlerinin intratubuler çökmesine bağlı olarak renal toksisite gelişir. MTX'in kendisi tübüller üzerine direkt toksik etki gösterir. Yüksek dozlarda kanamayla birlikte renal toksisite, nadiren renal tübüller nekroz ve proteinüri gözlemlenebilir²⁸.

4.1.6.6. Oküler hasar

Konjonktiva iltihabı, aşırı göz yaşarması, katarakt, fotofobi ve görmede bulanıklık görülebilir. Yüksek dozlarda nadiren kortikal körlük meydana gelebilir.

4.1.6.7. Nörolojik hasar

Intratekal tedavi sonrasında serebrospinal sıvıda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ciddi baş ağrısı, ense sertliği, nöbet, kusma ve ateşin eşlik ettiği akut kimyasal araknoidit gözlemlenebilir. Demans, ekstremitelerde spastisite ve ileri evrede koma olarak kendini gösteren, intratekal MTX'ten aylar yıllar sonra ortaya çıkabilen kronik demiyelizan ensefalopatisi önemli geç yan etkilerindendir. Yüksek doz MTX tedavisi alan hastaların %5-15'inde gelişen, parezi, afazi, davranış bozukluğu ve nöbetlerin eşlik ettiği akut serebral disfonksiyon genellikle tedaviden sonraki ilk 6 günde ortaya çıkar ve 48-72 saat içinde düzelir. Tedaviden 2-4 ay sonra ortaya çıkan ve demans, motor parezi ile birlikte ensefalopatinin görüldüğü kronik nörotoksisiteye de yol açabilir.

4.1.6.8. İskelet ve kas sistemi hasarı

Osteoporotik kırılmalar, eklem ve kas ağrıları oluşabilir.

4.1.6.9. Üreme sistemi hasarı

Oligospermi ve menstrual bozukluklar görülebilir⁹.

4.1.6.10. Cilt hasarı

Eritematöz deri döküntüleri, kaşıntı, ürtiker, fotosensitivite ve hiperpigmentasyona yol açar. Radyasyona benzer deri reaksiyonuna yol açabilir.

4.1.6.11. Metotreksata bağlı oksidatif stres

Antikanser ilaçlarla son zamanlarda yapılan toksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerine dikkat çekilmektedir. Karaciğer, böbrek, ince bağırsak ve merkezi sinir sistemindeki MTX'in yan etki mekanizması olarak oksidatif stres ayrıca sorumlu tutulmaktadır^{29,30,31,32}.

HeLa hücrelerinde mitokondride piruvat dehidrojenaz, 2-oksogluterat dehidrojenaz ve nikotinamid adenindinkleotid (NAD) bağımlı enzimler ile sitozolik NADP bağımlı dehidrojenazın MTX tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Babiak ve ark. MTX'in HeLa hücrelerinde vücudun önemli antioksidanı olan glutasyon seviyelerini azalttığını gstermiřlerdir³³.

Jahovic ve ark. 20 mg/ kg tek doz MTX intraperitoneal uygulanan ratların kan, karaciğer, böbrek ve ince bağırsak dokularında glutasyon seviyelerinde azalma, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinde artma ve malondialdehit (MDA) seviyelerinde belirgin artma olduğunu bulmuřlardır³⁰.

Miyazono ve ark. MTX'in yan etkisi olarak rat ince bağırsağında süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitelerinde artma, indirgenmiş glutasyon (GSH) seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX'in yol açtığı ince bağırsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne srmřlerdir³⁴.

Uz ve arkadaşları benzer sekilde MTX alan ratların böbrek dokularında nitrik oksid seviyelerinde artışı bildirmiřlerdir³². Bu nedenle MTX toksisitesinden korunmak için antioksidan ajanlarla birlikte kullanması gerekliliği ne sürülmektedir.

4.2. Sindirim sisteminin histolojik zellikleri

Sindirim sistemi, ağızdan anüse kadar uzanan sindirim kanalından ve bu kanala açılan bezlerden oluşur. Sindirim kanalı, ağız boşluğu, yemek borusu, mide, ince ve kalın bağırsaklar ve anüsü içerir. Sindirim kanalının duvarı istisnalar dışında tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olarak adlandırılan dört büyük tabakadan oluşur.

Tunika mukoza; epitel örtüsü, lamina propriya ve muskularis mukozadan oluşmuştur. Lamina propriya, kan ve lenf damarları içeren bir gevşek bağ dokusudur. Ayrıca bazen bezler ve lenfoid doku içerir. Muskularis mukoza ise

mukozayı submukozadan ayıran içte ince dairesel, dışta longitudinal düz kas hücrelerinin oluşturduğu tabakalardan oluşmuştur. Muskularis mukoza genellikle düz kaslardan oluşmakla birlikte bazı bölgelerde çizgili kas içerir. Tunika submukoza çok sayıda kan ve lenf damarları ile submukozal sinir ağı (Meissner sinir pleksusu) içeren sıkı bağ dokusundan oluşmuştur. Aynı zamanda bezler ve lenfoid doku da içerebilir. Tunika muskularis ise kas hücrelerinin yönüne göre belirlenen iki tabakadan oluşmuştur. Lümene yakın iç tabakada kasların yönü genellikle dairesel, dış tabakada ise uzunlamasıdır. Bu iki kas tabakası arasında myenterik (ya da Auerbach) sinir ağı ile bağ dokusu içinde kan ve lenf damarları bulunur. En üstte yer alan tunika seroza ya da adventisya tabakası ince bir gevşek bağ dokusu tabakasıdır. Kan ve lenf damarları ile yağ dokusundan zengindir. Bu tabaka mezotelyum olarak adlandırılan tek katlı yassı epitel ile örtülüdür. Karın boşluğunda seroza, mezenterler ve periton ile devamlılık gösterir. Sindirim organının diğer organ ya da yapılara bağlandığı bölümlerde serozanın yerini kalın bir adventisya alır. Adventisya, içinde damar ve sinirlerin yer aldığı gevşek bağ dokusundan meydana gelir ancak mezotelyumu bulunmaz.

Sindirim kanalının mukozası bulunduğu bölgeye göre bir ölçüde değişen çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Kanalda yer alan organların hemen hepsinde mukoza salgı yapma özelliğindedir. Bu tabakadaki hücreler kayganlaştırıcı ve koruyucu etkisi olan mukus salgısı üretir. Özofagusta özofagiyal kardiyak bezleri, midede mide bezleri, bağırsaklarda bağırsak bezleri çoğu sindirimi sağlayan enzimlerden oluşan çeşitli maddeler salgırlar. Bağırsak mukozası bu fonksiyonuna ek olarak emilim yapma yeteneğindedir. Mukoza, içerdiği lenfoid doku sayesinde immünolojik korumada da rol alır. İnce barsağın ileum parçasının lamina propriyasının lenf follikülleri Peyer plakları olarak bilinir. Bu foliküller mukozal immün sistemin bir parçası olarak görev yaparlar. Muskularis mukoza, mukozanın hareketini sağlar ve böylece yiyeceklerle olan temasını artırır.

Özofagus, gıdaları yutaktan mideye taşıyan tüp şeklinde bir organdır. Yüzey epiteli keratinsiz çok katlı yassı epitelidir. Özofagusun bitip midenin başladığı noktada bu epitel aniden, midenin tek katlı prizmatik epiteline dönüşür. Lamina propria diffüz lenfoid doku ve lenf follikülleri içerebilen gevşek

bağ dokusudur. Mideye yakın bölümde lamina propria içinde muköz salgı yapan özofageyal kardiyak bezleri bulunur. Muskularis mukoza longitudinal seyirli düz kas liflerinden oluşan ince bir tabaka olarak izlenir. Submukoza kollajen ve elastik liflerden zengin çok miktarda kan damarı ve lenf damarı, sinir lifi ve gangliyon hücresi içeren sıkı bağ dokusudur. Bu doku içinde de muköz salgı yapan, gerçek özofagus bezleri bulunur. Tunika muskularis genellikle içte sirküler dışta longitudinal seyirli kaslardan oluşur. Bu tabaka özofagusun 1/3 üst bölümünde tamamen çizgili kaslardan oluşur. Özofagusun orta bölümlerinde bu tabakada hem çizgili hem düz kaslara rastlanırken, alt 1/3 bölümünde sadece düz kaslar bulunur. Tunika adventisya seroza özelliğinde olmayan bağ dokusu özelliğindedir.

Mide, anatomik olarak kardiya, korpus, fundus ve pilor bölümlerinden oluşur. Histolojik olarak içerdiği bezlerin özellikleri farklı olan bölümler kardiya, pilor ve fundustur. Mide duvarı da genel histolojik tabakalar olan tunika mukoza, submukoza, muskularis ve serozadan oluşur. Çıplak gözle bakıldığında mide iç yüzünün girintili çıkıntılı olduğu görülür. Bu görünümün sebebi mukoza ve submukozanın lümenine doğru yaptığı rugae adı verilen katlantılardır. Mide epiteli, foveola veya gastrik çukurcuk denilen girintileri döşer. Foveolalar dahil bütün mide yüzeyini döşeyen epitelyum tek katlı prizmatik epitelidir. Mide epiteli hem örtü hem salgı epiteli özelliği gösterir. Lamina propriyada foveolalara açılan mide bezleri bulunur. Bez epitelinde farklı histolojik ve fonksiyonel özelliklere sahip beş çeşit hücre yer alır. Bunlar, pepsinojen ve lipaz salgılayan esas hücreler, hidroklorik asit sentezleyen pariyetal hücreler, epitelin boyun bölgesinde yerleşmiş mukus salgılayan boyun mukus hücreleri, gastrin, histamin ve somatostatin salgılayan enteroendokrin hücreler ve diğer hücre tiplerine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir.

İnce bağırsaklar anatomik olarak duodenum, jejunum ve ileum olmak üzere üç bölümden oluşur. Bu bölümlerin genel histolojik özellikleri birbirine benzer. Ancak baskın olan fonksiyonları ile paralel olarak histolojik özelliklerinde değişiklikler görülebilir. Çıplak gözle bakıldığında ince bağırsakların lümeninde kıvrımlar görülür. Plika sirkularis olarak isimlendirilen bu kıvrımlar, mukoza ve submukozanın transvers katlantılarıdır. Yüzey epiteli ve altındaki lamina propria lümenine doğru uzanarak villus denilen çıkıntıları oluşturur. Bu yapılar

absorbsiyon yüzeyini artırmaya yönelik olarak gelişmiştir. Villusların lamina propriyaları, çok sayıda fibroblast, düz kas hücresi, plazmosit, eozinofil granülosit ve makrofaj içeren gevşek bağ dokusudur. Bu dokuda pencerele kan kapiller ağı ile lakteal olarak bilinen lenf kapillerleri yer alır. Laktealler özellikle yağların taşınmasında önemlidir. Absorbsiyon yüzeyini arttıran bir başka yapı da bağırsağın tek katlı prizmatik epitelyum hücrelerinin yüzeyinde yer alan çok sayıdaki mikrovilluslardır. İnce bağırsakların yüzey alanını plika sirkularislerin 3 kat, villusların 10 kat, mikrovillusların 20 kat arttırdığı söylenebilir. İnce bağırsakları döşeyen tek katlı çizgili kenarlı prizmatik epitelde iki farklı tip hücre bulunur. Bunlardan biri enterosit olarak bilinen absorbsiyon yapan mikrovilluslu prizmatik hücrelerdir. Diğeri absorbsiyon yeteneğinde olmayıp, mukozayı koruyucu ve kayganlaştırıcı özellikte mukus salgılayan goblet hücreleridir. Işık mikroskopi düzeyinde izlenen çizgili kenarı, enterositlerin apikal yüzlerinde yer alan sık ve düzenli mikrovilluslar oluşturur. Lamina propriyada izlenen ve villuslar arasına açılan bağırsak bezleri tübüler bez özelliğindedir. Bez epitelinde yüzey epitelinde de yer alan enterosit ve goblet hücrelerinin yanı sıra antibakteriyel özellikleri ve fagositoz yetenekleri sayesinde bağırsağın normal bakteriyel florasını kontrol eden Paneth hücreleri, polipeptid salgılayan enteroendokrin hücreler, antijen taşıyan hücreler olan M hücreleri ve enterosit veya goblet hücrelerine dönüşebilen intermediyer hücreler bulunur. İnce bağırsaklarda da sindirim kanalındaki diğeri organlarda olduğu gibi lamina propriyanın altında düz kas hücrelerinden oluşan muskularis mukoza bulunur. Submukoza yoğun bir bağ dokusu tabakasıdır. Damar ve sinirlerden, pleksuslardan (Meissner) zengindir. Duodenumda bu tabakada Brunner bezleri olarak da bilinen serömüköz submukozal bezler bulunur. Salgıları duodenumu mideden gelen asidik kimusun etkilerinden korurken, aynı zamanda pankreatik enzim aktivitesi için uygun ortam hazırlar. İnce bağırsakların tunika muskularisi içte sirküler dışta longitudinal seyirli düz kas tabakasıdır. Seroza, mezotel ve altında uzanan ince bir bağ dokusundan ibarettir.

Kalın bağırsaklar genel histolojik tabakalar açısından ince bağırsaklara benzer. Ancak, plika sirkularis ve villus içermemeleri yönünden ince bağırsaklardan farklılık gösterir^{35,36}.

4.3. Mukozit

Mukozit, ağız boşluğu ve gastrointestinal kanalın mukozasındaki çeşitli nedenlerle oluşan zedelenme ve gelişen inflamatuvar reaksiyon olarak tanımlanır. Ağızdan başlayarak tüm gastrointestinal kanal boyunca görülebilir^{37,38}.

Mukozit, sitotoksik KT ve RT uygulaması sonrası olgularda görülen en sık ve en ağır yan etkilerden birisi olup tedaviye bağlı ortaya çıkan akut toksisite içerisinde önemli bir yer tutar. Hafif hassasiyetten çok sayıda birleşik ülserlere ve kanamalı lezyonlara kadar değişen geniş bir yelpazede olabilir. Genellikle ağrı, kanama, ülserasyon, ağız kuruluğu, tat değişikliği ve beslenme bozukluğu gibi semptomlar birbirini izler. İmmün sistemi baskılanmış olgularda mukozit gibi epitelyal bütünlüğün bozulduğu bu bölgeler enfeksiyon ajanlarının vücuda giriş noktasını oluşturur. Sıvı ve besin alımının ağırlı, yetersiz olması sonucunda dehidratasyon ve malnutrisyon gözlenir. Mukozitte ağrı yanında psikososyal sonuçlarda önemlidir. Konuşma ve iletişim zorlaşır. Depresyona eğilim vardır. Mukozit hastanın rahatını, beslenmesini, konuşmasını, gülümsemesini, iletişimini kısacası yaşam kalitesini bozan onkolojik tedavinin zamanında devamını engelleyen ve dolayısıyla sağ kalımı etkileyen önemli bir klinik sorundur³⁷.

Onkolojide mukozitin öneminin anlaşılması ve olguların yaşam kalitelerindeki değişimlerin gözlenmesi üzerine özellikle moleküler düzeyde patolojisinin daha iyi anlaşılması, sıklığının belirlenmesi, tüm merkezlerce kullanılacak standart tanımlamalarda bulunulması ve uygun tedavi önerilerinin belirlenmesi planlanmıştır. Bu amaçla son yıllarda çok merkezli, birçok disiplinin işin içine girdiği çalışma grupları oluşturulmaktadır. Oral Mukozit Denetimi (POMA: Prospective Oral Mucositis Audit), Çok Uluslu Kanserde Destek Tedavi Birliği (MASCC: Multinational Association of Supportive Care in Cancer), Uluslararası Oral Onkoloji Derneği (ISOO:International Society for Oral Oncology), İngiltere Çocukluk Çağı Kanseri Çalışma Grubu ve Pediatrik Onkoloji Hemşire Forumu Mukozit Çalışma Bölümü (Mucositis Study Section, UKCCSG/PONF (United Kingdom Children's Cancer Study Group / Pediatric Oncology Nursing Forum), ağız bakım grubu gibi çalışma grupları

oluşturulmuştur . Bu gruplar tarafından oluşturulan protokoller ve öneriler ile başarılı tedavi modaliteleri hedeflenmektedir.

4.3.1. Mukozit patofizyolojisi

Son yıllarda artan araştırmalar ve gözlemler mukozit patofizyolojisinin çok karmaşık olduğunu göstermektedir. Epitel ile mukozayı oluşturan bütün diğer hücreler arasındaki dinamik etkileşim anlaşılmaya başlamıştır. Onkolojik tedavi alan bir hastada önce KT veya RT'nin doğrudan etkisi ile bazal epitel hücrelerinde DNA sarmalı kırılır. Böylece doku hasarı ve hücre ölümü gerçekleşir.

DNA zedelenmesi dışında serbest oksijen radikalleri (SOR) ve aracı molekül oluşumu gibi dolaylı mekanizmalarda doku hasarı ve hücre ölümünde rol alır^{39,40,41}. SOR endotelde, fibroblastlarda, makrofajlarda ve epitel hücrelerinde Nuclear Factor kappa B (NF-κB) ve Nuclear Respiratory Factor 2 (NRF-2) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder. NF-κB sitokinler, radyasyon, antineoplastik ilaçlar gibi hücre dışı uyarılara maruz kalan hücrelerin yok edilmesini belirleyen genlerin aktivasyonunda etkilidir. NF-κB aktivasyonu hem pro-apoptotik hemde anti-apoptotik yolları etkiler. NF-κB uyarımı yapan birçok faktör vardır. Bakteri ve bakteri duvarı ürünleri, virüsler, inflamatuvar sitokinler (IL-1,IL-2,IL-12,IL-15,IL-17,IL-18,TNF-α), büyüme faktörleri, sitotoksik ilaçlar, radyasyon, şok ve hiperglisemi NF-κB aktivitesini arttırlar. NF-κB aktivasyonu pro-apoptotik mekanizmaları tetiklediğinde hem tümör hücre ölümü hem mukozaya toksik yan etkiler artmaktadır^{41,42,43}. Makrofajlar TNF-α, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler yaparak doku hasarını ilerletirler. TNF-α, NF-κB ve sifingomyelinazı aktive ederek mukozada daha fazla hücre ölümüne neden olur. Ayrıca doğrudan veya dolaylı epitel kök hücre harabiyeti oluştukça yenilenme kapasitesi kaybedilir. Sonuçta epitel incelmeye başlar. Atrofi, mukozal incelme ve ülserasyon birbirini izler.

4.3.2. Mukozit görülme sıklığı

Oral ve gastrointestinal mukozitin görülme sıklığı tam olarak bilinmemektedir. Mukozit görülme sıklığının araştırıldığı çalışmalarda genellikle aynı protokolü almış hasta grupları için mukozit oranları bildirilmiştir. İdame tedavilerinde %10'dan az, primer tedavilerin ağırlığına göre %40-80, kök hücre

transplantasyonunda ise en az %80 oranında mukozit görüldüğü bildirilmektedir⁴⁴.

Erişkin kanserlerinde standart protokoller için mukozit sıklığı %40-70 olarak verilmektedir. Çocukluk çağı için rakamlar belirsizdir. Çocukluk çağı kanserlerinde erişkine göre 3 kat fazla oral mukozit gözleendiği bildirilmiştir⁴³. Son çalışmalarda oral mukozitin kanserli çocuklarda %52-80 oranında görüldüğü bildirilmektedir⁴³. Buna karşın çocukluk yaş grubunda tedaviye bağlı intestinal mukozit görülme sıklığına ait güvenilir veri yoktur. Bu durum sorunun gerçek klinik boyutunu gizlemektedir. Orointestinal mukozitin gerçek sıklığının iyi bilinmemesi günlük uygulamalarda mukozit sorunun gerekenden az dikkate alınmasına neden olmaktadır.

4.3.3. Mukozit gelişiminde risk faktörleri

Mukozit onkoloji pratiğinde sık gözlenen bir sorundur. Her hastada mukozit riski aynı değildir. Oral ve intestinal mukozit gelişimine etkili faktörler hasta kaynaklı ve tedavi kaynaklı olmak üzere ikiye ayrılır.

4.3.3.1. Hastaya ait risk faktörleri

Yaş, cinsiyet, ağız sağlığı ve hijyeni, tükrük salgı fonksiyonu, bireye ait genetik faktörler, tümör tipi ve yerleşim yeri, eşlik eden diğer hastalıklardır.

Çocuk olgularda muhtemelen yüksek hücre döngüsü nedeniyle daha ağır ve daha sık mukozit deneyimi olduğu gözlenmiştir. Yirmi yaştan önce ve 50 yaştan sonra mukozit riski artar. Erişkin yaş grubunda kadınlarda mukozitle daha sık karşılaşılmasına karşın çocukluk çağında cinsiyete ait herhangi bir farklılık gözlenmemektedir^{45,46,47}.

Malnutrisyon, periodontolojik sorunlar, kötü ağız hijyeni ve yetersiz tükrük fonksiyonu oral mukozit gelişimini arttıran etmenler olarak belirlenmiştir. Tükrük, epiteli kaplayan bir örtü olarak bakterilere ve çevresel faktörlere karşı koruyucu bir katman oluşturur. Yapısında lizozim, laktoferrin, salgısal immunglobulinler gibi biyolojik aktif moleküller bulundurulur. Bu koruyucu faktörlerin azalması nedeniyle tükrük yapımı az olan hastalar mukozit gelişimine daha duyarlıdır⁴⁸.

Çeşitli çalışmalarda olguların mukozit gelişimi için genetik olarak yatkınlık taşıyabileceği ya da kemoterapötik ajanlara verilen farmakodinamik cevaplarda genetik farklılıklar olabileceği gösterilmiştir⁴⁹. Bu nedenle aynı kemoterapötik ajanlarla tedavi edilen olguların bir kısmında mukozit gelişirken diğerlerinde

gelişmemekte ya da oluşan mukozit değişik şiddetlerde olabilmektedir. Genetik yatkınlığın en çok araştırılan örneklerinden biri MTX tedavisi alan hastalarda 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz(MTHFR) genindeki (C677T) polimorfizmdir. Bu polimorfizme bağlı olarak MTX kullanımı sonrasında değişik derecelerde mukozit gelişir⁴⁹. MTHFR TT genotipinde MTHFR aktivitesi daha düşüktür ve mukozit doğal genotipe göre daha ağır seyreder^{49,50}.

Kanserin tipi ve tümörün yerleşimi mukozit gelişim riskini etkileyen faktörler arasındadır. Baş-boyun yerleşimli yumuşak doku sarkomları, nazofarenks karsinomu, hodgkin dışı lenfoma mukozit riskinin daha yüksek olduğu gruplardır^{24,42,50}.

Eşlik eden sağlık sorunlarında mukozit gelişme riskini artırabilirler. Böbrek veya karaciğer fonksiyonlarında bozulma olması hastada ilaç eliminasyonunu engelleyerek mukotoksik etkiyi artırır. Ayrıca ağızdan soluk alan çocuklarda ve maske ile oksijen alan olgularda mukoza kolaylıkla gelişir ve mukozit daha kolay oluşur.

4.3.3.2. Tedaviye ait risk faktörleri

Olgunun aldığı kemoterapötik ilaçlar, ilaç dozu, ilaç sıklığı, eş zamanlı KT ve RT alması, RT bölgesi, hematopoetik kök hücre nakli ile nakil tipidir.

KT protokolündeki ilaçlar ve dozları çocukluk çağı kanserlerinde tedaviye bağlı mukozit riskini belirleyen en önemli faktörlerdir. Standart doz KTlerde mukozit oranı daha düşüktür. Hodgkin lenfomada ABVD KT protokolü ile mukozit riski %3, hibrit protokollerde %8 dir. Akut myeloid lösemide kullanılan fludarabin yüksek doz sitarabin ve granülosit koloni uyarıcı faktörden oluşan FLAG protokolünde mukozit gelişim riski %70 dolayındadır^{39,40,42}.

Mukozit yapıcı etkileri en fazla olan kemoterapötikler timidin sentetaz inhibitörleri, topoizomeras II inhibitörleri, primidin analogları, pürin analogları, yüksek dozlarda alkilleyici ajanlar ve antrasiklin grubu ilaçlardır. Bu grup ilaçlar arasında sitozin arabinozid, sisplatin, daunomisin, doksorubisin, etoposid, taksol, vinkristin, vinblastin, bleomisin ve melfalan NF-κB uyarımı yaparak mukozit gelişimine neden olurlar⁵¹.(Tablo 2) MTX NF-κB baskılanmasına yol açarak antiinflamatuvar etkinlik gösterir. MTX aynı zamanda hem oral mukozada, hemde ince bağırsak mukozasında hasar yapmaktadır. MTX intestinal hücrelerde apoptozise neden olurken goblet hücrelerinde de yıkıma neden olur.

MTX'in ayrıca TNF yapımını arttırmasının yanında T lenfosit ve makrofajların sayısını arttırdığıda gösterilmiştir⁵².

Yüksek doz KT uygulamalarında mukozit sıklığı daha fazladır. KT'ye ikincil mukozitlerde kür sayısı arttıkça mukozit olasılığı da artmıştır. Bolus infüzyon tarzında kullanılan ilaçlarda mukozit riski uzun süreli infüzyonlara ya da düşük dozda tekrarlanan ilaçlara göre daha yüksektir⁴⁰.

Tablo 2: Mukozite neden olan kemoterapotik ajanlar

Alemtuzumab	Bleomisin	L-asparaginaz	Siklofosfamid	Sitarabin	Busülfan
Dositaksel	Doksorubisin	Kapesitabin	Florourasil	Gemsitabin	Karboplatin
Gemtuzumab	Hidroksiüre	Daunorubisin	İdarubisin	İnterlökin 2	Epirubisin
Lomustin	Melfelan	Etoposid	Mitomisin	Mitoksantron	İrinotekan
Oksaliptatin	Paklitaksel	Methotreksat	Pentostatin	Prokarbazin	Mekloreタミン
Topotekan	Trastuzumab	Pemetrksed	Vinblatin	Vinkristin	Tiotepa
Tretinoin					

RT alan hastalarda mukozit riski artar. Bu risk RT nin uygulandığı alana, toplam doza ve günlük fraksiyona göre değişim göstermektedir^{40,43}. Günlük RT dozları ya da fraksiyonu artarsa mukozitin şiddeti alınan doza ve fraksiyon sayısına paralel olarak artış gösterir. Oral mukozit 40 gray (Gy) dozda belirginleşirken 50 Gy dozunu aşan dozda RT tükrük bezlerinde kalıcı hasara neden olur. Baş boyun bölgesine alınan RT de ağız mukozası, tükrük bezleri ve damarlar etkilenir. Baş boyun bölgesi kanserleri nedeni ile RT alan yetişkinlerde ve kök hücre transplantasyonu nedeni ile total vücut ışınlanması yapılan hastalarda mukozit oranı yüksektir⁵³. Mukoza komplikasyonlarının en ağır grubu kök hücre transplantasyonu yapılan hematolojik onkolojik vakalardır. Allojenik kemik iliği transplantasyonunda otolog nakillere oranla daha yüksek mukozit tanımlanmıştır. Oral mukozitin kök hücre transplantasyonu yapılan hastalarda sağkalımı kısaltan bir faktör olduğu bilinmektedir.

4.3.4. Mukozitin klinik özellikleri

Mukozal bariyerin yıkılması olan mukozit KT ve RT etkisi ile başlıca ağız ve gastrointestinal kanalda görülür^{39,42}.

Mukoza hasarının derecesine ve yerleşimine göre klinik bulgular farklılık gösterir. Oral mukozitte erken klinik belirtiler KT uygulamasını izleyen 4-8. günlerde eritemle başlar, 7-14 günde biter. Sert damak ve gingiva KT mukozitlerine dirençli iken RT mukozitleri gingiva, dil kökü, ve sert damakta keratinize epitel alanları dahil bütün oral mukozada belirti verebilir.

Baş boyun RT'si alan hastalarda 10 Gy dozda ilk bulgular oluşur, hasta yanma tanımlar. Oral mukozitin ana bulgusu ağrı ve yutma güçlüğüdür, fizik bakıda en hafif olarak mukoza eritemi ve atrofi görülür, bu dönemde besin alımına bağlı yanma hissi mevcuttur^{39,42,45}. Lezyon ilerledikçe mevcut olan ağrı şiddetlenir. Olgular başlangıçta sulu ve yumuşak gıdaları alabilirler. Sert baharatlı yiyecekleri tolere edemezler. Bulantı, kusma ve tükürük salgısı artar. Ağız içinde fibrinöz yalancı membranlar oluşurken enfeksiyon tabloya eklenir. Daha ağır mukozitte narkotik analjezik gereksinimi gösteren şiddetli ağrı oluşabilir.

Ülserler KT'nin 7-10. gününde, RT'nin ise 30 Gy dozunda başlar. Kanama, beslenememe, tükürük azalması ve konuşamama şiddetli oral mukozitte görülür. Ağır mukozitte sepsis riski önemli sorundur.

Klinik ve semptomatik düzelme KT mukozitlerinde infüzyon bitiminden 3 hafta sonra, RT mukozitlerinde tedaviden 2 hafta sonra başlar. Kök hücre transplantasyon alıcılarında mukozitli gün sayısı, antibiyotik gereksinimi, opioid ihtiyacı ve total parenteral beslenme gereği ilaç dozlarına bağlı olarak diğer KT protokolleri alan olgulara göre daha fazladır^{39,41,42}.

Ağız, özefagus ve rektum mukozası onkolojik tedaviden sonra bir hafta kadar bütünlüğü sürdürebilir. Toraks, baş boyun RT'si alan olgularda akut radyasyon özefajiti görülebilir. Ayrıca MTX, 5-FU, taksan grubu ilaçlar özofajite neden olurlar. Bu tabloda ağırlı yutma ve retrosternal ağrı başlıca bulgulardır⁵⁴.

Bu belirtiler KT başlangıcından itibaren ilk birkaç gün içerisinde ortaya çıkabilirse de genelde KT bittikten sonra gözlenir. Epitelde incelme ve ülserasyon oluşur. Lamina propriyadaki bağ doku hücrelerinin çoğalmasında meydana gelen değişiklik sonucunda vasküler geçirgenlik ve inflamatuvar hücre birikiminde artış meydana gelir. Fibröz dokuda iskemi oluşur.

İntestinal epitelde hasar daha hızlı gelişir. Bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı ağırlıklı semptomlardır. Hiperomotilite ve diyare KT verilmesinden itibaren

yaklaşık 3. günde başlar. KT'ye ikincil intestinal mukozitlerde geri emilim yüzeyi hasarlandığından aşırı sıvı ve elektrolit kaybı olabilir^{54,55}.

İntestinal mukozit oral mukozitten daha önce başlar ancak daha erken geriler. Bu semptomlara ek olarak gastrointestinal sistemde obstrüksiyon, perforasyon ve enfeksiyon ile komplike olabilir^{7,56}.

Tüm sitotoksik ilaçlar kript hücrelerinde apoptoza ardından kript hipoplazisine ve sonrasında da tepkisel kript hiperplazisine neden olurlar. İnce bağırsaktaki epitelyal kök hücreler KT sonrası hasara uğrarlar ve özgül hücre gruplarına bölünemez ya da farklılaşma göstermezler. Böylece villöz mukoza yenilenemez dolayısıyla hızla yapı ve fonksiyon kaybına uğrar⁵⁷.

Mukozit ince bağırsakta kolona göre daha belirgindir. Bunun sebepleri arasında ince ve kalın bağırsakta belirlenen pro ve antiapoptotik proteinlerin farklı olmaları ile ince bağırsak ve kolondaki kök hücrelerin yerleşim yerlerinin farklı olmaları sayılabilir. Çoğu olguda RT'nin kesilmesinden 2-3 hafta sonra, veya KT'den 2 hafta sonra kendiliğinden iyileşme olur. Abdominal RT'den sonra 6 aydan 3 yıla kadar bağırsak semptomları sürebilmektedir. Sonuç olarak mukozitin oluşumu kanser tedavisinin tipi, seçilen ilaçlar, doz ve zamanlama ile ilişkilidir^{39,54,55,58}.

Kolon üzerine etkili olduğu gösterilen kemoterapötik ajan irinotekandır. Kript hücreleri apoptoza uğrar ve hipoplazi gelişir. Lamina propriyada mononükleer hücre infiltrasyonu ve eozinofillerde artış görülür. Epitelin kolumnar yapısı değişerek kübik bir hal alır. Goblet hücreleri azalır ve mukus salgısı artar. Sonuç olarak tüm bu değişiklikler sonucunda ishal görülür. KT dışında batına uygulanan RT'de benzer değişikliklere neden olur.

4.3.5. Mukozitin tanı kriterleri

Gastrointestinal mukozitin değerlendirilmesi, belirti ve bulguların ortaya çıkması ve bunların sıklığına bağlıdır. Kemoterapötik ajanlardan 5-FU, MTX, irinotekan, taksanlar ve monoklonal antikolar diyareye neden olurken; vinka alkaloidleri, platinumlar, talidomid konstipasyona yol açarlar.

4.3.6. Mukozit evreleri

Mukozit dinamik ve devamlı bir süreç olup 5 patobiyolojik evreden oluşur. Bunlar; başlangıç, hasara yanıt ve mesaj oluşumu, sinyal çoğalması, ülserasyon ve iyileşme dönemleridir (Tablo 3)^{41,42,43,45}.

Tablo 3: Mukozit evrelemesi

Biyolojik Evre	Tanımlama ve yorumlar
Evre 1: Başlangıç	Bazal epitelde DNA hasarı ve serbest oksijen radikalleri oluşumu sonucu submukozada hücre ve damarlarda hasar oluşumu meydana gelir
Evre 2: Upregulasyon ve haberci üretimi	Apoptoz ve inflammatuar sitokinlerde artış oluşur.
Evre 3: Sinyalizasyon ve Amplifikasyon	İnflamatuvar sitokinler doku hasarı oluşturur ve sinyalizasyonu arttırlar.
Evre 4: Ülserasyon	Mukozal bütünlüğün bozulmasına bağlı çok ağrılı lezyonlar oluşur, bunlar da bakteri, virus, mantar için giriş yolu oluşturur.
Evre 5: iyileşme	Mukozal bütünlüğü oluşturmak için epitel hücrelerinin çoğalması, farklılaşması ve göçü meydana gelir. Mukozit azalmış mutlak nötrofil sayısı ile birliktelik gösterir

Histolojik olarak 5 farklı evreden oluşan mukozit kliniğe farklı şiddette yansımakta ve aynı kemoterapötik ajan her olguda farklı klinik bulgular vermektedir. Bu klinik farklılık için Amerikan Ulusal Kansere Enstitüsünün toksisite kriterleri kullanılmaktadır (Tablo4-5)⁵⁹.

Tablo 4 : Radyasyona Bağlı Olmayan Mukozit için Amerikan Ulusal Kansere Enstitüsü'nün Genel Toksikite Kriterleri-1

Yan Etki	0.Derece	1.Derece	2.Derece	3.Derece	4.Derece
özefajit	Yok	Hafif disfaji, normal yemek yiyebilir	Disfaji, yumuşak ve püre kıvamında ve sıvı gıdalar alabilir	İv hidrasyona ihtiyaç duyan disfaji	Tam obstrüksiyon (tükürüğünü yutamaz) enteral veya parenteral nutrisyon ihtiyacı, veya perforasyon
Stomatitis/ Faranjit	Yok	Ağrısız ülserler, eritem veya hafif ağrı	Ağrılı eritem, ödem veya ülser fakat yiyebilir ve yutkunabilir	İv hidrasyon ihtiyacı olan ağrılı eritem, ödem veya ülser	Ağır ülserasyon, parenteral veya enteral nutrisyon desteği veya profilaktik entubasyon
Gastritis	Yok	-	Medikal müdahale veya cerrahi gerekmeyen tedavi	Hospitalizasyon veya cerrahi ihtiyacı	Hayati tehdit eden kanama, acil cerrahi müdahale
Kolit	Yok	-	Abdominal ağrı, mukus veya kan içerikli gayta	Abdominal ağrı, ateş, bağırsak hareketlerinde değişiklik, ileus veya peritoneal bulgular, radyolojik olarak veya biyopsi ile tanı koyma	Perforasyon veya cerrahi müdahale gerekliliği veya toksik megakolon
Bulantı	Yok	Yemek yiyebilir	Oral alım belirgin olarak azalmıştır	Ağızdan alım yoktur, iv sıvı ihtiyacı vardır	-
Tifilit	Yok	-	-	Abdominal ağrı, diyare, ateş, radyolojik olarak veya biyopsi ile tanı koyma	Perforasyon, kanama veya nekroz veya hayati tehdit eden diğer komplikasyonlar; cerrahi müdahale gerekir
Kusma	Yok	Tedavi öncesine göre 24 saat içinde 1 atak	Tedavi öncesine göre 24 saat içinde 2-5 atak	Tedavi öncesine göre 24 saat içinde 6 veya daha fazla atak veya iv sıvı ihtiyacı	Parenteral nutrisyon ihtiyacı, yoğun bakım gerekliliği, hemodinamik şok

Tablo 5: Radyasyona Bağlı Olmayan Mukozit için Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'nun Genel Toksikite Kriterleri-2

Yan Etki	0.Derece	1.Derece	2.Derece	3.Derece	4.Derece
Diyare - kolostomisiz hasta	Yok	Tedavi öncesine göre 24 saat içinde 4'ten az gaita çıkışı	Günlük 4-6 kez gaita çıkışı veya gece gaita çıkışı	Günde 7'den fazla gaita çıkışı,inkontinans, dehidratasyon açısından parenteral destek ihtiyacı	Yoğun bakım gerekliliği, hemodinamik şok
Diyare - kolostomili hasta	Yok	Tedavi öncesine göre kolostomi getirisinde hafif kıvamsız, sulu artış	Tedavi öncesine göre kolostomi getirisinde orta dereceli kıvamsız, sulu artış; normal aktiviteyi kısıtlamaz	Tedavi öncesine göre kolostomi getirisinde ağır dereceli kıvamsız, sulu artış;normal aktiviteyi kısıtlar	Yoğun bakım gerekliliği, hemodinamik şok
Diyare- Kemik iliği transplantasyonu yapılmış pediatrik populasyon	Yok	>5-≤ 10 ml/kg günlük diyare	>10- ≤15 ml/kg günlük diyare	>15 ml/kg günlük diyare	
Konstipasyon	Yok	Diyette modifikasyon, gaita kıvamını yumuşatan ajanlar	Laksatifgerekliliği	Opstipasyon, elle veya lavman ile boşaltma ihtiyacı	Obstruksiyon veya toksik megakolon
İleus	Yok	-	Aralıklı, müdahaleye gerek yok	Cerrahi olmayan müdahale gerekliliği	Cerrahi müdahale

4.3.6.1. Başlangıç evresi

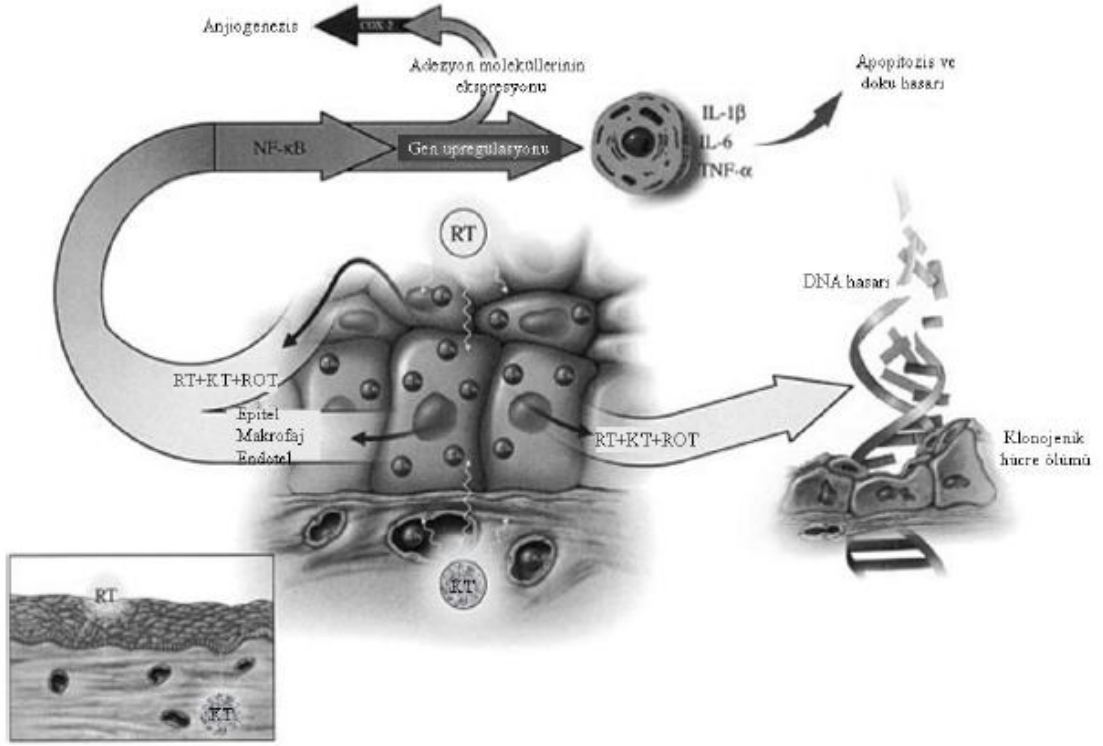
Mukozite neden olan birincil olay kemoterapötik ajanların ya da radyasyonun uygulamasını takiben oksidatif stres sonucunda hızlı doku zedelenmesidir. SOR oluşur. SOR direkt olarak ya da NF-κB gibi hasara yol açan ikincil aracı molekülleri uyararak hücre ve dokulara hasar verir. Bu aşamada mukoza tamamen normal görünümündedir. Endotel ve epitel hücrelerinin etkilenmesi ile döngü devam eder (Resim 2).

4.3.6.2. Hasara yanıt ve mesaj oluşumu evresi

SOR DNA hasarına yol açarak tüm hücre klonunun ölümüne yol açar. Aynı zamanda p53 ve NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerini doğrudan uyarabilir. NF-κB mukozit oluşumunda anahtar özelliğe sahiptir. NF-κB RT, KT, enfeksiyöz ajanlar, fizyolojik stres ve inflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilir.

NF-κB aktivasyonu 200'den fazla genin regülasyon artışı ile sonuçlanır. Bu gen ürünlerinin çoğu mukoza üzerine toksiktir. NF-κB pro apoptotik ve anti apoptotik yollara da etki eder. Bax geni aktivasyonu ile mukoza hücrelerinin ölümü hızlanır.

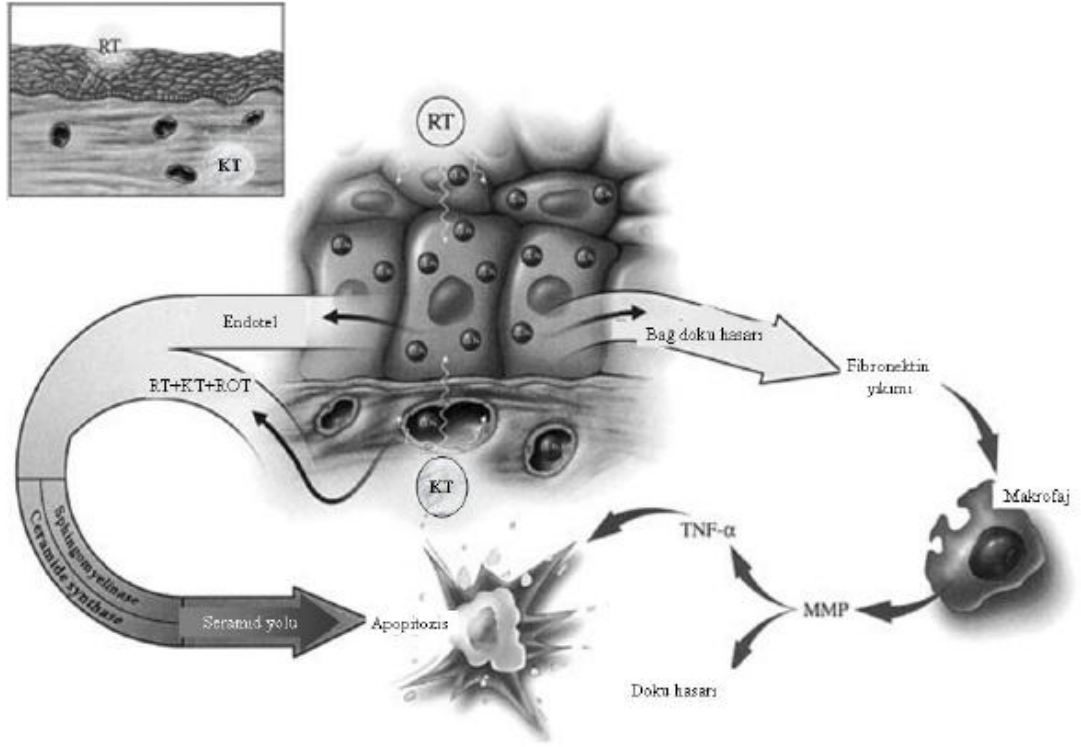
NF-κB artışı proinflamatuvar sitokinlerin yapımına yol açar bu da bağ doku ve endotelde erken hasarı tetikler. RT ve KT etkisiyle hücre zarında bulunan sfingomyelin, sfingomyelinaz ve seramid sentaz aracılığı ile hidrolize olur. Fibroblast yıkımı olur. Fibronektin ve metalloproteinazların salgılanması artar bunun sonucunda kollajen yıkımı ve epitel bazal membranında parçalanma gerçekleşir. Sonuçta bütün mukozada doku zedelenmesi ve apoptozis gerçekleşir (Resim 2)⁶⁰.



Resim 2: Mukozit başlangıç ve hasara yanıt mesaj oluşması evreleri

4.3.6.3. Sinyal çoğalma evresi

KT ve RT'nin başlangıçta oluşturduğu saldırıya bağlı salınan haberci moleküller pozitif geri bildirimde bulunarak doku hasarını artırır. Bu dönemde birincil doku hasarı sonunda pek çok gen ve biyolojik olarak aktif proteinler tetiklenmiştir. Bu proteinler submukozada birikerek doku zedelenmesini sürdürür. Kaspaz, mitojen etkinleştirilmiş protein kinaz (MAPKA) ve siklooksijenaz 2, tirozin kinaz yolağı ile NF-κB bağlantılı transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Proinflamatuvar sitokinler, proapoptotik yolak ve NF-κB ile etkileşerek mukozit şiddeti ve süresini artırır. Dokudaki biyolojik karmaşa sonucunda mukoza bütünlüğü bozularak ülserleşme başlar (Resim 3) ⁶⁰.

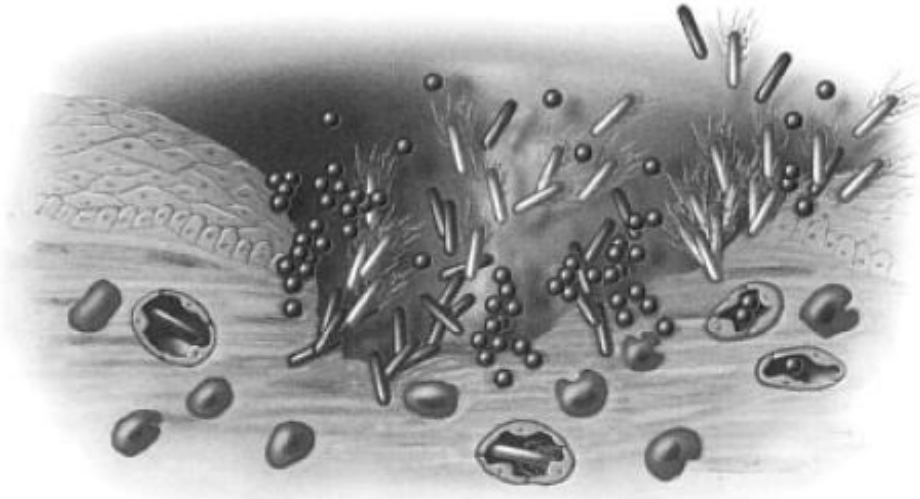


Resim 3: Haberci sinyallerin çoğalması

4.3.6.4. Ülserleşme evresi

Mukoza bütünlüğünün bozulması, yerel bakteri kolonizasyonu ve bakteri hücre duvarı ürünlerinin submukozal nüfuz etmesi sonucunda mukozal lezyonlar gelişir. Bu dönemde mononükleer hücre birikimi olurken proinflamatuvar sitokin salınımı devam etmektedir. Histolojik olarak ağızda fibrinöz eksuda içeren ülserler, ince bağırsakta kript ve villus atrofisi, goblet hücre sayısında azalma görülür. Ülser gelişimi ile birlikte submukozaya geçen bakteriyel ürünlere bağlı olarak makrofajlardan proinflamatuvar sitokin salınımı devamlılık gösterir (Resim 4)⁶⁰.

Bakteriyel kolonizasyon



Hücre duvarında bulunan aktive makrofajlar



Resim 4: Ülserleşme

4.3.6.5. İyileşme evresi

Mukoza'nın iyileşme dönemi submukozada hücre dışı matriks ve mezankim hücrelerinin uyarıları ile başlar. Epitel hücreleri hasarlı alanlara göç ederek yüzeyi kaplar, çoğalıp farklılaşarak mukoza yeniden yapılandırılır. Bu süreçte Epidermal Growth Faktör Beta (EGF-β), Transforming Growth Faktör alfa (TGF-α), IL-1β, interferon alfa (IFN-α) görev almaktadır. Bu yapılanma ile iyileşme evresi tamamlanmasına karşın mukoza zedelenmeden önceki durumuna tamamen dönemediği için yeni bir hasara çok daha duyarlı hale gelir.

4.3.7. Mukozitin sonuçları ve maliyeti

İleri derecede mukoziti olan hastaların % 35'inde bir sonraki KT döngüsü gecikir. Hastaların yaklaşık % 60'ında doz azaltımına giderken yine yaklaşık % 30'unda tedavi kesilir. Standart doz KT almakta olan ve ağır mukozit gelişen hastaların yaklaşık %70'inin yeterli nutrisyonu sağlayabilmek için nazogastrik/nazoduodenal tüp ile beslenmesi gerekmektedir. Bu hastaların % 60'ında ateş ve sonrasında hastaneye yatış ihtiyacı gelişmektedir.

Yüksek doz KT alan hastalarda ise nazogastrik/nazoduodenal tüp ile beslenme oranı % 87'ye çıkmaktadır ve bu hastaların % 80'nin opioid analjezik ihtiyacı olmaktadır⁶⁰.

Mukoziti olan hastaların % 4'ünde gastrointestinal kanama gelişirken bu oran mukozit olmayan hastalarda % 1'den daha azdır. Gastrointestinal mukozit olan döngülerde 3 kat fazla enfeksiyon geliştiği görülmüştür⁶¹. Tedavi esnasında gelişen mukozit ekonomik açıdan da önemlidir. Grade 1-2 mukozit her tedavi döngüsünde 2725 \$'a mal olurken bu tutar Grade 3-4 için 5565 \$'dır⁶¹.

Ağır gastrointestinal mukozit gelişen hastaların KT esnasında hastanede yatış süresi mukoziti olmayanlara göre ortalama 8.2 gün daha fazladır^{61,62}.

4.3.8. Mukozitin önlenmesi ve tedavisi

Klinik öneminin anlaşılmasına rağmen halen mukozitten korunma ve tedavi için standart bir yaklaşım yoktur. Oral mukozitin önlenmesi ya da hafifletilmesi öncelikli bir konudur.

Destek bakım, ağız hijyeninin sağlanması, ağız sağlığının periyodik kontrolü ve hasta eğitimi mukozitten korunmada en önemli basamaklardır. Değerlendirme ve izlem için objektif oral mukozit ölçekleri gereklidir. Bu ölçeklerin oluşturulması için birçok çalışma grubu oluşturulmuştur. Oluşturulan her ölçeğin birbirinden farklı sınırlamaları ve tutarsızlıkları nedeni ile geçerli bir değerlendirme ölçeği halen bulunmamaktadır.

Mukozitin önlenmesinde en etkili yöntem düzenli ağız bakımı yapılmasıdır. Temel bakım dışında mukozit proflaksisi için hem topikal hem sistemik pek çok ilaç veya doğal madde uygulanmıştır^{63,64}.

Mukozitten korunma ve sağaltım uygulamalarının çoğu tek merkez deneyimi şeklindedir. Etkinliği kanıtlanmamış, ancak yararlı olması mümkün olan yaklaşımlar geniş bir grubu oluşturmaktadır. Klinik çalışmaların çoğunda rastgele seçimle yapılmamış, ileriye dönük olmayan, çift kör çalışmaların olamaması, yetersiz hasta sayısı, metod hataları, zıt veriler nedeniyle bu çalışmalardan elde edilen verilerin kullanımı sınırlıdır^{40,65,66}.

4.3.8.1. Oral mukozitten koruyucu yaklaşımlar

Mukozitten korunmak ve tedavi amacıyla birçok ajan kullanılmaktadır. Polimiksin, amfoterisin B, Tobramisin gibi antibiyotikli pastiller, klorheksidin, povidon iyodin, hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi antimikrobiyal ilaçlar, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF)/ granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), biyolojik cevap değıştirciler, TGF-3, Palifermin (Keratinosit büyüme faktörü-1(KGF-1)) gibi büyüme faktörleri, benzdamin hidroklorür, papatya suyu, zerdeçal (curcumin) gibi antiinflamatuvar maddeler, sükralfat, glutamin, prostoglandin E2, vitamin E, allopurinol, amifostin, N-asetil sistein gibi hücre koruyucular kullanılmaktadır. Ayrıca propantelin, pentoksifilin, difenhidramin, pilokarpin, siklooksijenaz 2 inhibitörleri, kriyoterapi ve düşük enerjili laser de bu amaçla kullanılmaktadır. Bunların dışında alternatif yöntemler olarak doğal bal, aloe vera da tedavi ve korunma amacıyla denenmektedir.

4.3.8.2. Antimikrobiyal ajanlar

Topikal antibiyotikler ve antiseptik solüsyonlar en çok araştırılan gruptur. Polimiksin, tobramisin, ve amfoterisin B (PTA) içeren pastiller, flukonazol ve protegrin gibi birçok madde koruma amaçlı olarak uygulanmıştır. Meta analizlerde PTA içeren pastillerle yapılan çalışmalarda RT alan baş boyun kanseri olan olgularda bölgesel olarak mukoziti kontrol ettiği ancak daha geniş ve iyi kurgulanmış çalışmalarda bu etkinin gösterilmesi gerektiği saptanmıştır^{67,68,69}.

Kök hücre nakli yapılan hastalarda mukozit için önleyici antibiyotik kullanımı önerilmektedir. Iseganan oral çalkalama önerilen antibikrobiyal bir ilaçtır. Iseganan kullanımının plasebodan farklı bir etki göstermediği de ortaya konulmuştur⁶⁷. Oral povidon iyodin ve H₂O₂ yeni granulasyon dokusu oluşurken hücre büyümesini baskılar. Ancak mukozitte etkinliği gösterilememiştir. Ağızda kolonizasyonu azaltma amacı ile halen klorheksidin kullanımı vardır^{63,68}. Mukozit tedavisinde klorheksidin ile yapılmış plasebo ya da tedavisiz olgu gruplarının araştırıldığı çalışmaların meta analiz sonucunda klorheksidin mukozitten koruyucu etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır⁶⁷.

4.3.8.3. Büyüme faktörleri ve sitokinler

G-CSF ve GM-CSF dermis ve submukozada makrofaj ve nötrofil artışına yol açar. Endotel hücrelerini ve keratinositleri uyatabilecekleri düşünülmüştür^{46,53,70,71}.

Meta analiz sonuçları G-CSF kullanımının RT alan baş boyun kanserli olgularda ciddi mukoziti önlemede zayıfta olsa etkisi olduğunu ortaya koyarken GM-CSF kullanımının plasebo ya da tedavisiz olgularla karşılaştırıldığında arada bir farklılık olmadığını göstermiştir⁶⁷.

Palifermin rekombinant insan KGF'si yapısındadır. KGF mukoza bütünlüğü sağlanmasında ve zedelenmelerden sonraki iyileşme sürecinde kilit rol oynar. Hayvanlarda epitel dokunun yenilenmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Epitel hücre apoptozisine engel olur ve DNA sarmal kırık oluşumunu önler. Epitelde onarım ve farklılaşmayı artırır. Oral ve intestinal mukoza bariyerini radyasyon ve KT'den korur. Döküntü, kaşıntı, eritem, öksürük, ağızda tat değişiklikleri, rinit artralji gibi yan etkileri vardır. Maliyeti çok yüksek olması sebebi ile palifermin sadece çok şiddetli mukozit olan olgularda tercih edilir, ancak maliyet-etkinlik konusu ve verileceği hasta grupları halen araştırılmaktadır^{72,73,74}.

4.3.8.4. Anti-inflamatuvar tedavi

Benzidamin klorür TNF- α , IL-1 β ve prostoglandin sentezini azaltarak antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, analjezik etki yapar. Benzidamin meta analizlerde az miktarda da olsa koruyucu etkisi olan bir ajan olarak tanımlanmaktadır⁶⁷.

Prostoglandin E1, prostoglandin E2, kortikosteroid, %1'lik topikal tretinoin, aloe vera, papatya suyu antiinflamatuvar etkisi olan uygulamalara örneklerdir. Ancak çift kör çalışmalarda ve meta analizlerde gösterilmiş etkinlikleri yoktur^{46,53,67}.

4.3.8.5. Hücre koruyucular

Sükralfat kaplayıcı bir tabaka oluşturarak mukozayı lokal iritanlardan korur. Mukozal kan akımı, mukus yapımını, prostoglandinleri uyarır. Ancak zıt sonuç vermiş bazı çalışmalarda vardır^{46,68,75}.

Bu güne kadar sükralfat ile yapılan toplam 516 olgunun irdelendiği 9 çalışmada orta ve ciddi şiddette olan mukozitleri önleyebildiği ayrıca ciddi mukozitleri %33 oranında azalttığı gösterilmiştir⁶⁷.

Başlıca antioksidanlar ve serbest radikalleri uzaklaştırıcı maddeler bu grubun diğer üyeleridir. Amifostin, prostoglandinler, N-asetil sistein, glutamin(Gln), vitamin E, azelastin hidroklorür, allopürinol jel hücre koruyucu gruba örnektir.

Ancak çalışmalarda mukozit sıklığı ve şiddetine etkisi net olarak gösterilememiştir. Gln ile ilgili çalışmalarda oral formlarının plasebodan farklı olmadığı ancak damar içi uygulamalarda mukoziti önlemede etkin olabileceği gösterilmiştir⁶⁷.

4.3.8.6. Kriyoterapi

Mukozitin önlenmesi için buz parçalarının veya buzlu soğuk suyun kullanımını ifade eder. Pratikte çocukluk çağında klinik kullanımı yoktur^{43,76}.

4.3.8.7. Düşük enerjili laser uygulaması

Farklı dalga boylarında etkinliği olan düşük enerjili helyum neon lazeri uzun süreler kullanılmış. Standart protokol yoktur. Antiinflamatuvar etki yaptığı ve ağrı kontrolünde önerildiği bilinmektedir. Yan etkisi az veya yoktur. Pahalı, özel cihaz ve deneyimli ekip gerektirmesi nedeniyle yaygın kullanılmamaktadır^{77,78}.

4.3.8.8. Doğal maddeler ve alternatif yaklaşımlar

Doğal bal topikal olarak RT mukozitlerinde verilmiş ve koruyucu etkisi olduğu öne sürülmüştür⁷⁹.

Koyun sütü ile yapılmış yoğurdun MTX alan sıçanlarda ince bağırsakta mukoza yıkımını azalttığı, mukoza koruyucu etkisi savunulmuştur⁸⁰.

PV701 ve çinko desteğinin mukozit gelişimini geciktirdiği ve iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir⁷⁶. Ancak meta analiz sonuçlarında çinko ile ilgili daha çok çalışma yapılması gerekliliği üzerinde durulmaktadır⁶⁷.

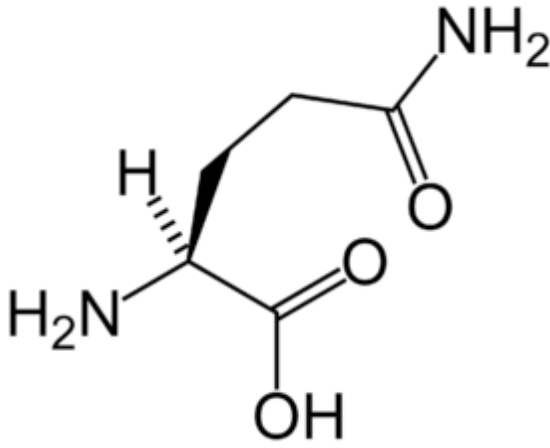
Adaçayı, rezene, papatya suyu, meyan kökü, ratanya gibi bitkiler oral mukoziti önleyici olarak kullanılmıştır. Zerdaçal antiinflamatuvar, anti oksidan, hücre koruyucu etkisi bilinmektedir. NF-κB baskılanması ve apoptozisin önlenmesi önemli etki mekanizmasıdır⁸¹. Ancak etkinlikleri yeterince kanıtlanamamıştır.

4.4. Glutamin

Temel olarak protein sentezinde görev alan aminoasitler ayrıca sinyal kaskatlarının tetikleyicisi olarak, önemli substratlar için öncül molekül olarak ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde görev alırlar. Doğada esansiyel ve esansiyel olmayan olarak sınıflandırılan 20 aminoasit vardır.

Gln, vücutta en yaygın bulunan aminoasittir ve birçok metabolik fonksiyonda önemli role sahiptir⁸². Çünkü Gln, iki amonyum grubu içerir.

Birincisi glutamat prekürsörü diğeri kandaki serbest amonyum, vücudu yüksek amonyum seviyelerinden koruyan nitrojen mekiği olarak işlev görür. Gln, hücre tarafından Gln sentetaz aracılığıyla sentezlenebildiği için esansiyel olmayan bir aminoasittir⁸².



Şekil 4: Glutaminin kimyasal formülü⁸³

Gln'in yara iyileşmesinde dolaylı bir rolü vardır. Fibroblastlar, epitelyal hücreler, enterositler, lenfositler ve makrofajlar gibi hızla çoğalan hücreler için bir enerji kaynağıdır. Gln, fizyolojik durumda birçok organda yeteri miktarda üretilirken büyük cerrahi operasyon, travma ya da sepsis gibi ağır katabolik durumlar Gln üretimini sınırlandırılır⁸⁴. Bu durumlarda endojen Gln depoları ve sentezi hızlı bir şekilde düşüş gösterir. Bunun sonucunda Gln miktarında azalma meydana gelir. Bu azalma kötü prognoz ile ilintilidir⁸⁵. Ancak yerine koyma ile nitrojen dengesinin ve immunosupresyonun iyileştirilmesi mümkündür⁸⁶.

Gln dokular arasında nitrojen transferini sağlar ve böbrek amonyumunun en önemli kaynağıdır. Protein sentezini düzenler. Tüm hücrelerin nükleik asit biyosentezinin en önemli öncül maddesidir. İskelet kasları Gln'in en önemli sentez ve depolama yeridir. Buradaki konsantrasyonu dolaşan kandakinin 30 katıdır⁸⁷.

Gastrointestinal sistemden emilen aminoasitlerin bir kısmı karaciğere giderken bir kısmı hücre içi aminoasit havuzunda toplanıp protein ve diğer nitrojenli maddelerin sentezinde kullanılır. Gln ise enterositlerde metabolize olur ve bu hücreler için gerekli enerjinin büyük kısmını sağlar. Bu yüzden gastrointestinal kanal vücutta Gln'in en büyük kullanıcısıdır. Enterositlerin başlıca enerji kaynağı olan Gln intestinal epitel hücrelerinin proliferasyonunu büyüme faktörlerine verilen yanıtları düzenleyerek gerçekleştirir^{88,89}. Gln ince bağırsak hücrelerinin mitokondrilerinde glutaminaz aktivitesi sayesinde önce glutamata daha sonra alfa ketoglutarata dönüşümler yaparak Trikarboksilik asit (krebs) döngüsüne katılarak ATP üretiminde önemli bir rol üstlenir.

Kolonositler ise enerji kaynağı olarak kısa zincirli yağ asitleri ve Gln'i kullanırlar⁸². Bağırsak ve bağışıklık sisteminde birçok hücre hızla proliferasyon olmaktadır. Gln, bu durumu hem enerji hem de biyosentetik öncül molekül kaynağı işlevi görerek kolaylaştırır⁸². Bağırsak mukozasının homeostazisi, Lieberkühn kriptalarında yerleşmiş olan hücrelerin proliferasyonu ve apoptozis ile hücrelerin eliminasyonu arasındaki denge ile sağlanır. Apoptozis sonucu ortadan kaldırılan hücreler hem kriptalarda hem de villüslarda bulunur⁹⁰.

Gastrointestinal sistem gibi Gln'e yüksek oranda bağımlı olan organlar stres durumlarında hasarlanmaya yatkın hale gelmektedirler. Uzun süren stres durumlarında Gln azalmasının etkileri, barsağın apoptotik yanıtlarını etkiler. Fizyolojik stres durumlarında Gln, intestinal epitel hücrelerini koruyucu etki gösterir. Bu etkinin, ısı şok proteinleri ailesi gibi hücre koruyucu protein uyarımı ile ilişkili olduğu da düşünülmektedir^{91,92,93}. Gln, Bcl-2 ve CD45-RO antiapoptotik protein belirlenmesini lenfositlerde artırırken, T lenfositlerde Fas ve Fas ligand proapoptotik proteinlerin belirlenmesini azaltmaktadır⁹⁴. Ayrıca Gln, aktive T hücrelerinde apoptozisi başlatan kaspaz-3 ve kaspaz-8 düzeyini azaltmaktadır⁹⁴. Gln'in bir diğer potansiyel mekanizması, glutatyon yolağı üzerinde meydana gelmektedir. Glutatyon bir antioksidan olup reaktif oksijen

moleküllerini detoksifiye eder ve anti-apoptotik etkilere sahiptir^{95,96}. Bunlara ek olarak Gln, TNF- α ile ilişkili apoptoziside intestinal hücrelerde önleyebilmektedir⁹⁷. Yapılan bir çalışmada Gln düzeyinin azalması ile kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonu olduğu ve sonuçta hücrelerin apoptozise gittiği ancak Gln desteği verilmesi ile ince bağırsak kökenli epitel hücrelerinde apoptozisin önlediği bildirilmiştir⁹⁸. Bu nedenle beslenme protokollerine Gln eklenmesi gastrointestinal sistemi koruyucu etki göstermektedir. Gln, bağırsak duvarının bütünlüğünün korunmasına yardımcı olarak, septisemi ve çoklu organ yetmezliğine yol açabilecek bakteriyel translokasyonu önler^{99,100}.

Dokuları serbest radikal hasarına karşı koruyan majör bir antioksidan olan glutasyon sentezinin öncülüğünü de yapabildiğinden, şok sonrası mukozal hasardan korunmada ve iskemi sonrası reperfüzyonda rol oynayabilir¹⁰¹.

Gln ile zenginleştirilmiş total parenteral beslenmede jejunal mukozanın ağırlığı, DNA ve nitrojen içeriği artar ve anlamlı olarak villoz atrofi azalır¹⁰². Gln ilave edilmiş enteral ve parenteral diyet ile beslenmenin KT ve RT'ye bağlı mukozit oluşumunu azalttığı bildirilmektedir^{103,104,105}.

Etkin bir bariyer oluşturmak suretiyle antioksidan koruma özelliğini artırarak gerçekleştirdiği savunma iyileşmesi aracılığıyla bağırsağın korunmasına yardımcı olmasından başka, Gln optimal immün savunmayı başka yollardan da kolaylaştırır. Lenfosit proliferasyonu ile nötrofil ve makrofajların fonksiyonlarını optimal olarak yerine getirmeleri açısından da esansiyel özellikte bir maddedir. Plazma Gln düzeylerinin düşük olduğu durumlarda, T lenfositleri baskılanır, nötrofillerin bakterisidal fonksiyonları bozulur, makrofajların fagositik aktiviteleri ve IL-1 yapımı azalır¹⁰⁶.

4.5. HMB (β – hidroksi β – metilbutirat)

HMB (β – hidroksi β – metilbutirat) esansiyel dallı zincirli bir aminoasit olan lösin metabolitidir. HMB aynı zamanda avokado, narenciye, karnıbahar, yonca ve anten balığı gibi bazı bitki ve hayvanlarda da bulunmaktadır. HMB'nin ticari olarak üretilen kalsiyum HMB monohidrat (CaHMB) şeklinde besin desteği formu mevcuttur¹⁰⁷.

İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda HMB'nin protein sentezini arttırdığı, protein yıkımını ise azalttığı gösterilmiştir¹⁰⁸. Bu nedenle deneysel olarak HMB, atletler tarafından performans geliştirici ve kas kitlesini

arttırıcı madde olarak kullanılmaktadır¹⁰⁸. Yakın zamanda yapılan araştırmaların çoğu, yağsız vücut kitlesi (YVK) kaybı olan insanlarda HMB'nin kullanımının hasar, sakatlık ya da mortalite üzerine olan etkileri konusunda yoğunlaşmıştır. Bu araştırmalara göre, YVK kaybı olan yaşlı ve AIDS/kanser gibi kronik hastalığı olan insanlarda, diğer aminoasitlere göre HMB desteğinin daha faydalı olduğu gösterilmiştir^{109,110,111,112}.

YVK'nin kaybı, hastalık süreçlerini etkilemekte ve mobilite ile kendine kendine yetebilirlik ile ilişkili olan hayat kalitesini etkilemektedir. Kayıp YVK'nın yerine konması, bu süreçlerin ve hayat kalitesinin iyileştirilmesinde oldukça etkilidir.

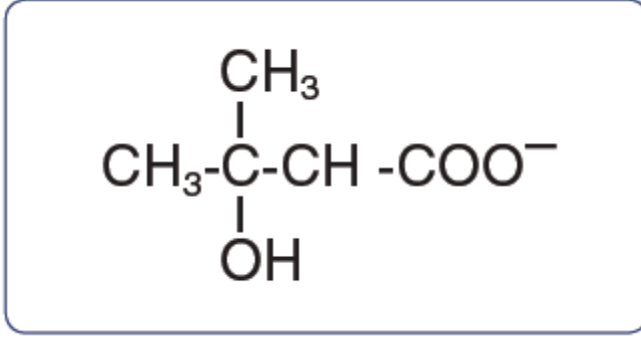
YVK kaybı olan popülasyonlarda, YVK'nın yeniden kazandırılması, morbidite ve mortaliteyi azaltabilecektir^{113,114,115,116,117}. Bunun olası mekanizmaları; fiziksel fonksiyonların geliştirilmesi, immün fonksiyonların sağlıklı bir şekilde sürdürülmesi ve yara iyileşmesine destek olmak olarak düşünölmektedir.

HMB'nin yalnız başına ya da diğer aminoasitlerle birlikte kullanımının, yaşlı bireylerde, AIDS'li hastalarda ve ileri evre kanseri olan ya da kritik durumdaki hastalarda meydana gelen YVK kaybını iyi bir şekilde gerilettiği ve sağlığa olumlu etki ettiği gösterilmiştir^{109,110,111,112,118,119}.

Lösin protein sentezinin düzenlenmesini sağlar ve nitrojen dengesinin sağlanmasına yardım eder. Buna ek olarak vücudun protein kullanılabilirliğini arttırmada da belirteç olarak kullanılmaktadır^{120,121,122}. Lösin metaboliti olan HMB'nin kas proteolizis'ini inhibe ettiği ve protein döngüsünü düzenlediği gösterilmiştir^{123,124,125,126}.

4.5.1. Kimyasal Özellikler

HMB'nin kimyasal formölü $C_5H_{10}O_3$ tür (şekil 5). HMB, ticari olarak üretilmektedir, organik kimyasal sentez yoluyla üretilen HMB, kalsiyum tuzlarının da eklenmesi ile CaHMB monohidrat $[Ca(C_5H_9O_3)_2 \cdot H_2O]$ şeklinde ticari formda piyasada bulunmaktadır.



Şekil 5: HMB nin kimyasal yapısı

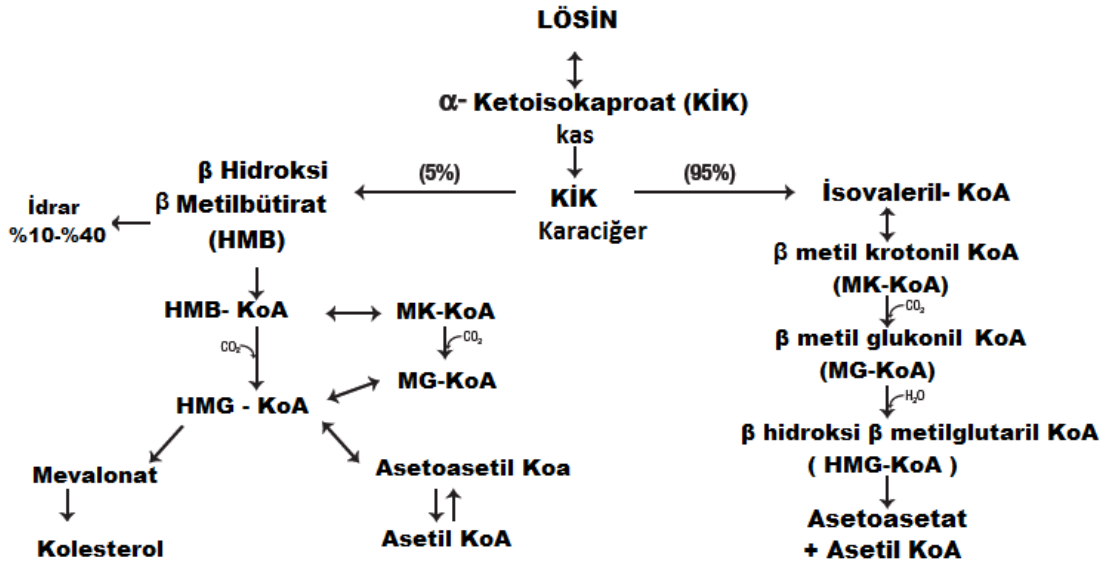
4.5.2. HMB'nin Farmakodinamik Özellikleri

4.5.2.1. Metabolizması

Lösin metabolizmasında ilk basamak, kas hücrelerinde α -ketoisokaproat'ın (KİK) transaminasyonudur.

KİK, kas hücrelerinden salınarak karaciğere taşınır. Karaciğerde ise KİK'in büyük bölümü, mitokondri'de izovaleril koenzim-A (izovaleril-koA)'ya okside olur ve daha sonra asetoasetat ile asetil-koA' ya metabolize olur. KİK'in yaklaşık %5'i ise, sitozolik bir enzim olan KİK-dioksijenaz aracılığı ile HMB'ye metabolize olur. Üretilen HMB dolaşıma verilir (Şekil 6)¹²⁰.

70 kg ağırlığında bir insan günde yaklaşık olarak 0,2-0,4 g HMB üretir. Bu miktarda HMB; özellikle stres ve yara iyileşmesi gibi metabolik süreçler için yeterli olup olmadığı kesinlik kazanmamıştır^{120,124}.



Şekil 6: HMB metabolizması

HMB ayrıca iskelet kası hücrelerinde kolesterol sentezi için bir öncül maddedir. Çok aşamalı süreçte HMB, kas hücrelerinin sitozol bölümünde β-hidroksi-β-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) ya ardından kolesterole dönüştürülür. Kas hücreleri, hücre membranının stabilizasyonunu idame ettirebilmek için gerekli olan kolesterolü HMG-KoA'dan elde ederler çünkü dolaşımdan absorbe edilen kolesterolden yararlanamazlar¹²⁰.

4.5.2.2. Protein yıkımının etkilenmesi

YVK'nın kaybı; kronik hastalıklar, akut hastalıklar, kanser ve kronik yara iyileşmesi gibi dolaşımda inflamatuvar sitokinlerin dolaşımdaki miktarlarının artışına yol açan durumlarla ilişkilidir. Bu durumlarda protein yıkımı da artmaktadır^{119,127,128}.

Proteolizis-ilişkili faktör (PIF), kanserlerde tümör kitlesinden salınır ve dolaşımdaki miktarı artar¹²⁸. Protein yıkım aşamasında farklı sinyallerin uyardığı her iki yolak protein yıkımını sağlayan düzenleyici faktör olan NF-κB'yi aktive etmektedir. NF-κB'nin nükleustaki aktivitesinin artması sonucunda proteinleri yıkan enzimler olan proteozomların üretimi artar. Sonuçta protein yıkımı artış gösterir^{127,128,129}.

TNF-α, IFN-γ, Angiotensin II ve Lipopolisakkaritler (LPS), apoptozu ekstremsel olarak başlatan prokaspaz-8'i aktive ederek kaspaz-8'e dönüştürür.

Kaspaz-8, hücre membranında yer alan bir protein olup, hücredeki bir diğer protein olan prokaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-3 ve intraselüler diğer proteinler arasında etkileşim sonucunda, nükleustaki protein yıkımında artış meydana gelir. HMB, kaspaz-8'in aktivasyonunu inhibe eder^{127,129,130}. HMB, NF-κB tarafından başlatılan protein yıkımını azaltarak, etki gösterir. Bu mekanizmada apoptozu başlatan kaspaz-8 aktivasyonu azaltarak gerçekleştirir. Böylece HMB, protein sentezinin idame ettirilmesinde ve protein yıkımının önlenmesinde oldukça önemli bir rol üstlenmektedir.

Kanser hastalarında, PIF kas hücre membranındaki araşidonik asiti aktive ederek inflamatuvar mediatörlerin hücre stoplazmasında üretilmesini artırır. Bu inflamatuvar mediatörler ve intraselüler proteinler arasındaki etkileşim sonucunda NF-κB aktive olur. HMB, araşidonik asit ürünleri ile intraselüler proteinler arasındaki bu etkileşimi bozarak NF-κB'nin aktivasyonunu önler. Bunların sonucunda protein yıkımı azaltılmaya çalışılır^{127,129,130}.

4.5.2.3. Protein sentezini direkt arttırıcı etki

HMB, protein sentezini direkt olarak arttırıcı etkiye sahiptir. Bu etki, protein sentezini kontrol eden bir hücre içi proteini olan mTOR (mammalian target of rapamisin-memelilerde rapamisin hedefi) aktivasyonu üzerinden sağlanmaktadır¹³¹. mTOR yolağı büyüme faktörleri, hormonlar, aminoasitler, glikoz ve stres tarafında aktive edilmektedir. mTOR, protein sentezi için gerekli olan mekanizmaları ribozomlar üzerinden aktive etmektedir¹³². İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), mTOR'u kas hücrelerinde aktive eden büyüme faktörlerinden biridir. HMB, mTOR'u ve IGF-1 üzerinden meydana gelen mTOR aktivitesini arttırmaktadır^{131,133}.

Bu nedenle HMB, büyüme hormonu ve IGF-1 ile ilişkili olarak yaşla ilişkili doku yanıtında meydana gelen azalmayı da önleyebilecektir. Böylece sarkopeninin önüne geçilmesi mümkün olacaktır^{134,135}.

4.5.2.4. Yaşlı gönüllülerde yara iyileşmesinin geliştirilmesi

HMB'nin arginin (ARG) ve Gln ile kombine şekilde kullanılması sonucunda, deneysel yara iyileşmesi modellerinde kollajen depolanmasında artış olduğu gösterilmiştir. 14 günlük randomize kontrollü, çift kör bir çalışmada 2 küçük steril politetrafloroetilen (PTFE) tüpü, 35 sağlıklı gönüllüde (ortalama yaş 75,4 yıl) deltoid kas bölgesine subkutan olarak implante edilmiş.

Gönüllülere günde 2 defa, 3 g HMB, 14 g ARG ve 14 g Gln içeren karışım (HMB/ARG/Gln, n=18) ya da esansiyel olmayan aminoasit karışımı (placebo, n=17) verilmiş. Tüpler daha sonra 7. ve 14.günlerde kollajen matriks depolamasının değerlendirilmesi amacıyla çıkarılmış. Kollajen matriks depolamasının değerlendirilmesinde hidrokisprolin birikmesine bakılmış¹³⁶.

14 gün sonra, HMB/ARG/Gln verilen grupta, plasebo grubuna oranla hidrokisprolin içeriği %67 daha yüksek bulunmuştur: Sonuçta HMB/ARG/Gln' nin oral yoldan uygulanması ile sağlıklı yaşlı gönüllülerde kollajen sentezi önemli oranda artmakta ve yara iyileşmesi oranlarında artış görülmektedir¹³⁶.

4.5.3. HMB'nin klinik güvenilirliği

HMB, klinik güvenilirlik çalışmalarının birçoğuna konu olmuştur. Hayvanlar üzerinde yapılan toksisite çalışmalarında, HMB'ye maruziyetin herhangi bir yan etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir¹³⁷.

İn vitro genotoksisite testleri negatif bulunmuş. İn utero maruziyet ile ilgili ratlarda yapılan çalışmalarda, fetus üzerine herhangi bir ciddi yan etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir. HMB'nin klinik güvenilirliği ve tolere edilebilirliği, sağlıklı erişkinler üzerinde olduğu gibi, YVK kaybı olan AIDS ve kanser hastaları üzerinde de iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Bu çalışmalardan bazıları 24 haftaya kadar olan sürelerde yapılmıştır^{138,139}. Önerilen doz, HMB için günde 3g'dir. Bu dozda kullanıldığında (kombine edilen maddelerin dozu farklı olsa da), güvenilir ve iyi tolere edilebilir görülmektedir. HMB'nin sağlık durumunu etkileyecek ciddi yan etkileri bulunmamaktadır. Dahası, HMB desteğinin bazı hematolojik parametreler üzerine olumlu etkisinin olduğu bile söylenmektedir^{138,139}.

Karaciğer fonksiyonlarını gösteren kan testlerine göre, HMB ile plasebo kullanan hastalar arasında bilirubin, alkalen fosfataz, laktat dehidrojenaz, aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz, gama-glutamil transpeptidaz ve demir parametreleri açısından anlamlı fark bulunmamaktadır. Yine plasebo ve HMB kullananlar arasında kreatin fosfokinaz, glikoz, ürik asit, kan üre azotu (BUN), kreatinin, BUN/kreatinin oranı, sodyum, klor, fosfor, protein, albümin ve globülin açısından da anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Potasyum düzeyleri içinse, HMB kullanan grupta küçük fakat anlamlı düzeyde (-%1,9) azalma kaydedilmiştir. Yine HMB kullanan hastalarda albümin/globulin oranında %5 kadar bir artış saptanmıştır. Beyaz küre sayısı, eritrosit, hemoglobin, hematokrit

veya trombosit sayısı açısından ise, HMB ya da plasebo kullanan hastalar arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir¹³⁸.

4.6. Oksidatif Stres ve Total Antioksidan Kapasite

Elektronlar atomun yapısında orbital adı verilen uzaysal bölgede belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt dengeli çiftler halinde bulunurlar¹⁴⁰. Serbest radikaller; radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkması ya da ilavesi sonucu elektron çiftinin dengesinin bozulmasıyla oluşan, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron taşıyan, organik ve inorganik moleküller ile reaksiyona girebilme yeteneğine sahip, yüksek oranda reaktif kısa ömürlü bileşiklerdir¹⁴¹. Normal metabolizma sırasında ya da patolojik hücre içi veya hücre dışı olaylarla ortaya çıkan serbest radikallerin etkileri oksidatif stres olarak adlandırılır. Bu radikaller ortamdaki uzaklaştırılmadığı takdirde, enzim ve proteinleri inaktive ederek (kovalent bağlanma teorisi) ya da serbest radikalın kendisi birincil olarak (serbest radikal teorisi) hücre hasarına veya ölümüne neden olabilirler¹⁴¹. Sonuçta serbest radikaller erken yaşlanma, kanser, otoimmün hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar gibi birçok hastalıkların etyopatogenezinde suçlanmaktadır^{142,143,144}.

Doğal bir süreç olan oksidatif stres, oksijene ihtiyaç duyan tüm canlı sistemlerde, çeşitli basamaklarda oluşmaktadır. Biyolojik sistemler, özgül mekanizmalar ile bu stresi kontrol altında tutar. Kontrol mekanizmalarının yetersiz olduğu durumlarda oksidatif hasar meydana gelmektedir¹⁴⁵.

4.6.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati öneme sahip olan oksijen, yer aldığı biyokimyasal tepkimelerde gerçekleşen enzim inhibisyonları ve oluşan oksijen radikalleriyle toksik etkiye yapabilmektedir^{140,144,146,147}.

Oksijen radikalleri, biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest radikallerin en önemlisidir. SOR normal hücre metabolizmasında oksijen içeren birçok biyokimyasal indirgenme reaksiyonları sonucunda oluşabilmektedir. Oluşan SOR hücrede protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar verebilmektedir^{144,146,147,148}.

4.6.1.1. Serbest Oksijen Partiküllerinin Kaynakları

I - Normal biyolojik işlemler

- 1 - Oksijenli solunum
- 2 - Katabolik ve anabolik işlemler

II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

- 1-İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon
- 2-Ksenobiotik maddelerin etkisi
- 3 -Oksidan enzimler
 - a-) Ksantin oksidaz
 - b-) İndolamin dioksijenaz
 - c-) Triptofan dioksijenaz
 - d-) Galaktoz oksidaz
 - e-) Siklooksijenaz
 - f-) Lipooksijenaz
 - g-) Monoamino oksidaz
- 4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
- 5 - Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma
- 6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar
- 7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

III - Yaşlanma süreci^{140,149}

Vücutta üretilen radikaller her zaman zararlı olarak görülmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için reaktif formlarına çevrilmesi zorunludur. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, steroid yapıdaki çok sayıda bileşiklerin ve eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimleri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için radikal yapımı zorunludur¹⁴⁸.

En Önemli SOR örneklerine; O_2^- (Süperoksit) Radikali, H_2O_2 (Hidrojen Peroksit), OH^- (Hidroksil Radikali) ve Singlet Oksijen'dir (O_2). Bunların dışında; HOCl (Hipoklorid), ROO^- (Peroksil Radikali), $RCOO^-$ (Organik Peroksit Radikali), HO_2^- (Perhidroksil Radikali), RO^- (Alkoksil Radikali) sayılabilir.

4.6.2. Antioksidan sistemler

Serbest radikallerin potansiyel olarak toksik oldukları bilinmektedir. Organizmanın oluşacak toksik etkilerden korunabilmesi için antioksidan sistemi adı verilen bir savunma sistemi mevcuttur¹⁵⁰. Bu sistemin temel öğeleri olan

antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki grupta toplanabilirler¹⁵¹.

Majör antioksidanlar

Enzimatik

- Süperoksit dismutaz
- Katalaz
- Glutatyon peroksidaz
- Glutatyon redüktaz

Enzimatik olmayan

Vitaminler

- Vitamin E
- Vitamin A
- Vitamin C
- Koenzim Q
- β -keroten

İndirgen ajanlar

- Glutatyon
- Sistein
- Tiorredoksin

Bağlayıcı proteinler

- Albumin
- Serüloplazmin
- Laktoferrin
- Transferin

Enzim bileşenleri

- Çinko
- Selenyum

Diğerleri

- Ürik asit
- Bilirubin
- Eritropoetin

Antioksidan moleküller endojen ve ekzojen kaynaklı yapılar olup, oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunmada albumin, bilirubin, transferrin, seruloplazmin, Vit C, Vit E, sülfhidril grupları, ürik asit ve diğer tanımlanmamış molekülleri görev almaktadır^{150,151}.

Asıl oksidan savunmayı hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler sağlamaktadır. Oksidanlar ile antioksidanlar arasında denge bozulursa oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar. Antioksidanlar, hücreleri oluşabilecek oksidatif hasara karşı değişik şekillerde koruma özelliklerine sahiptirler. Bu koruyucu fonksiyonlar radikal oluşumunun engellenmesi, radikallerin oluşturdukları hasarın azaltılması, hasara uğrayan moleküllerin eliminasyonunun artırılması, hasarlı moleküllerin onarılarak mutasyonların en aza indirgenmesi şeklinde sıralanabilir.

4.6.3. Total Antioksidan Kapasite (TAOK)

Normal koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı gelişen oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarını sürdürebilmesinde kan çok önemli rol oynamaktadır. Kan, antioksidanların bütün vücuda taşınmasını ve dağıtılmasını sağlar¹⁵². Total antioksidan kapasiteye (TAOK) en büyük katkı plazmada bulunan antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi proteinler yanında serbest radikalleri kapatan zincir kırıcı antioksidanlarda bulunmaktadır. Proteinler plazmanın ana antioksidan bileşenini oluştururlar. Proteinlerin serbest sülfhidril grupları onların antioksidan cevabından sorumludur. Plazmanın serbest sülfhidril grupları

proteinlere aittir çünkü aynı şekilde sülfidril gruplarına sahip olan linoleik asitin serum total serbest sülfidril seviyesine etkisi önemsizdir. Proteinlerin sağlıklı bireylerde güçlü serbest radikal reaksiyonlarına karşı serum TAOK'un %49'unu oluşturduğu bulunmuştur. Aynı zamanda TAOK seviyesi ile serum total sülfidril içeriği arasında ilişki bulunmuştur. Vitamin C'nin güçlü serbest radikal tepkimelerini ertelediği ve bastırdığı gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerde güçlü serbest radikal tepkimelerine karşı ölçülen serum TAOK'un %5'ini Vitamin C oluşturmaktadır. Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme örnek olarak; glutatyonun askorbatı, askorbatın da tokoferolü yeniden aktifleştirmesini sağlaması verilebilir. Plazma ve vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların toplam etkisini TAOK yansıtır. Total antioksidan durumun ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir. Bu yüzden kanın antioksidan durumunu saptamada bireysel antioksidanlar yerine bunların toplam antioksidan değerini veren TAOK ölçümü yaygınlaşmaktadır^{153,154}.

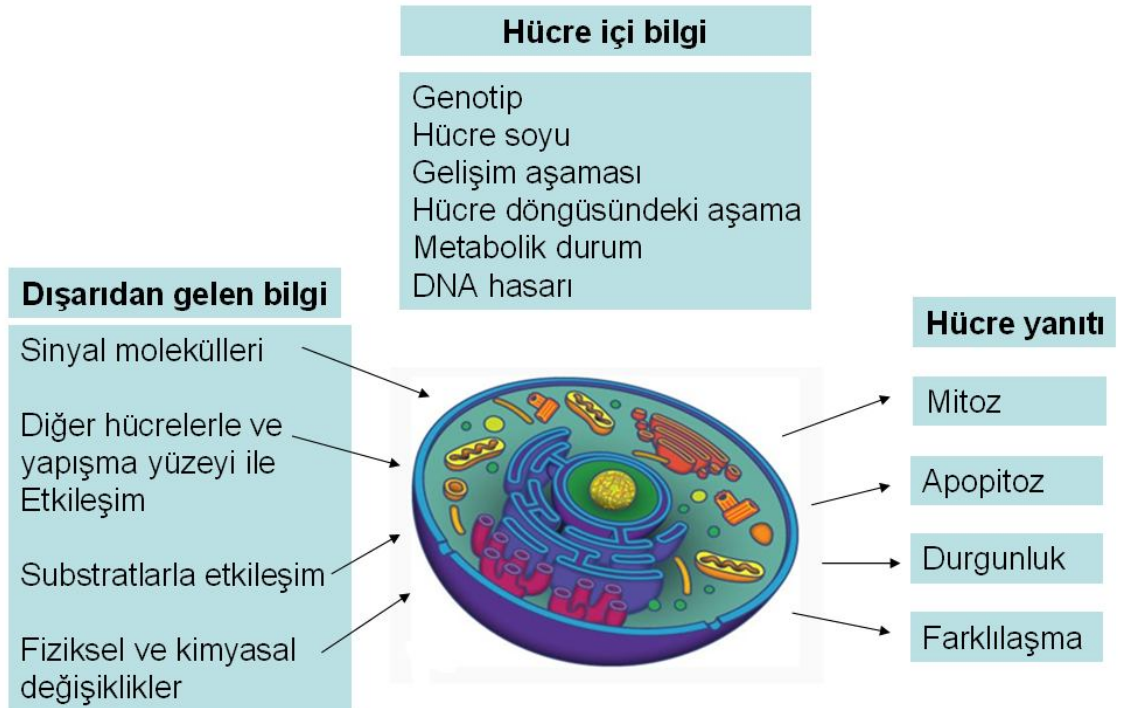
Plazmadaki TAOK'un önemli miktarını oluşturan moleküller Tablo 6'da sıralanmıştır¹⁵⁴.

Tablo 6: TAOK'u oluşturan moleküller

Antioksidanlar	Miktarı (%)
Total Sülfidril	48.89
Vitamin C	5.00
Ürik asit	3.83
Vitamin E	1.88
Biluribin	1.69
Diğer	38.71
Total	100

4.7. Apoptozis

Çok hücreli bir organizmanın döllemesinden başlayarak hücrelerinde mitoz, farklılaşma ve hücre ölümünün düzenlenmesi büyük önem taşır. Bir hücrenin, yaşaması, bölünmesi, farklılaşması ya da ölmesi seçeneklerinden hangisine yöneleceği konusundaki karar, hücre içi ve hücre dışındaki etkenlerin etkileşimlerine bağlıdır. Dış ortamdan gelen sinyaller hücre yüzeyinde bulunan çeşitli reseptörlerle hücre içine iletilir. İletilen mesajın hangi yanıtı yol açacağı hücrenin iç ortamındaki karmaşık bir dizi etken tarafından belirlenir. Hücrenin ölümü yönündeki yol apoptozla sonuçlanır. Hücrenin yaşamını bölünmeden sürdürmesi, çoğalması ya da ölmesi seçeneklerinden hangisinin gerçekleşeceğini belirleyen üç temel etmen vardır. Bunlar besin maddelerinin, büyüme faktörlerinin ve hücre dışından gelen ve hücredeki algaçlar aracılığıyla hücreye iletilen ölüm sinyallerinin varlığı ya da yokluğudur. Bu etmenler dışında hücrenin hasar görmesi ya da DNA yapısının bozulmasında ölüm ya da yaşam kararının verilmesinde belirleyici rol oynar (Resim 5).



Resim 5: Apoptozis hücre döngüsü

4.7.1. Tanım ve tarihçe

Apopitozis kelime anlamı olarak çiçeklerin taç yapraklarının ya da ağaçların yapraklarını dökmesi ile benzeştirilen, “yaprak dökme” anlamına gelen bir terimdir. Programlı hücre ölümü adıyla da anılan bu süreç, hücrede bazen yeni proteinlerin sentezini, hücre iskeletinin yıkımı için bazı proteaz enzimlerin ve DNA'nın parçalanması için DNAazların aktif hale geçmesini tetikleyen, aktif olarak düzenlenen bir süreçtir. Embriyologların 19. yüzyılın sonundaki gözlemleriyle gündeme gelen programlı hücre ölümü kavramı 1965 de böceklerin başkalaşımında da tanımlanmış, 1971 yılında Wylie, Kerr ve Currie, programlı hücre ölümü morfolojisini tanımlamış ve “apopitoz” terimini ilk kez kullanmışlardır^{155,156}.

Apopitoz çok hücreli bir organizmanın embriyonik dönemdeki gelişiminden başlayarak erişkin bir organizma olarak varolmasına ve yaşlanmasına dek birçok gelişim aşamasında organizmada homeostazisin sürmesini sağlayan önemli bir fizyolojik işlevdir. Apopitoz, homeostazisin korunmasında embriyonik dönemde ekstremitelerin ve içi boş organların oluşumunda, dişi fetüste Wolf ya da erkek fetüste Müller kanallarının körelmesi sırasında ve merkezi sinir sistemi gelişiminde nöron sayısının düzenlenmesinde yer alır. Ayrıca doğumdan sonra T ve B lenfositlerin seçiminde temel bir işlev yürütür. DNA'sı ağır hasar gören ya da virüsle infekte hücrelerin ölümünde temel bir rol oynar¹⁵⁷. Büyüme faktörlerinin ortamdan çekildiği koşullarda (emzirme sonunda meme bezinin, doğum sonrası uterusun) organlarda gerçekleşen küçülmenin de temel mekanizması, ilgili organlardaki hücrelerin apopitozla ölümüdür.

Hücre zarının ya da hücredeki metabolik süreçlerin çok hızlı ve ağır biçimde hasar gördüğü ve hızla bozulan zar geçirgenliğinin hücrenin şişmesi ve zarın patlayarak hücre içi maddelerin dışarı saçılmasıyla sonuçlanan nekrotik süreçten farklı olarak apopitozda zar bütünlüğü bozulmaz. Apopitoz ve nekroz dışında otofaji, parapitozis ve onkozis gibi farklı hücre ölümü tipleri de tanımlanmışsa da apopitoz dışındaki isimlendirmelerin biyokimyasal ya da morfolojik tanımları ve klinik önemleri üzerinde bir uzlaşma bulunmamaktadır¹⁵⁸.

Nekroz ve apopitoz ile ölüm; morfolojik özellikleri, oluşumlarında yer alan biyokimyasal süreçler, tetikleyen mekanizmalar ve sonuçları açısından önemli

farklılıklar gösterir (Tablo 7). Apoptotik bir uyarının ardından hücre yapıştığı zeminden ve komşu hücrelerden ayrılarak küçülür, çekirdek içinde kromatin yoğunlaşır, sürecin ilerlemesiyle hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar. Bu parçalar çevredeki komşuları ya da profesyonel fagositler tarafından fagosite edilir. Apoptotik süreçte inflamasyon oluşmaz.

4.7.2. Apoptozun Biyokimyası

Tanımlandığı günlerden bu yana geçen yaklaşık 40 yıl içinde apoptozun tüm çok hücreli canlılarda önemli ölçüde korunan ve hem temel adımlar, hem de uygulayıcı proteinlerdeki özdeş yapılar açısından birbirine benzeyen genetik bir yolla belirlendiği saptanmıştır. Apoptoz hücre dışından tetiklenen ekstrinsek yolak ve hücre içinde tetiklenen intrinsek yolak olmak üzere iki temel yolakla başlatılır. Mitokondri aracılığıyla düzenlenen hücre içi yolak aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortaklaştığı bir mekanizma oluşturur.

Tablo 7: Apoptoz ve Nekrozla Ölüm Arasındaki Temel Farklılıklar

	Apoptoz	Nekroz
Morfolojik özellikler	Küçülme, çekirdekte kromatin yoğunlaşması, tomurcuklanmayla apoptotik cisimlerin oluşması, komşu hücreler tarafından fagosite edilme	Şişme, hücre geçirgenliğinin hızla artması ve blebleşme, hücre içeriğinin dış ortama dağılması
Tetikleyen mekanizmalar	Hücre dışından (TNF α , büyüme faktör eksikliği, antikanserijen ilaçlar, oksidatif stres, DNA hasarı) Hücre içinden (mitokondri, ER)	Ani toksik etki sonucu zar geçirgenliğinin çok büyük ölçüde bozulması
Biyokimyasal değişimler	Hücre içinde proteolitik enzimlerin aktivasyonu, hücre içi proteinlerin ve DNA'nın yıkımı (kaspaz ve DNaz aktivasyonu),	Hücrede çok hızlı bir enerji yetmezliği ya da toksik etki sonucu zar geçirgenliğinin hızla artmasıyla osmotik dengenin bozulması, hücrenin patlaması
Sonuçları	Apoptoza uğrayan hücrenin inflamasyon oluşturmaksızın ortamdaki temizlenmesi	Hücre içi maddelerin dağılmasıyla oluşan inflamasyon

İster hücre içi, isterse hücre dışı mekanizmayla başlamış olsun, apoptotik süreç kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Kaspazlar, bugüne dek bir düzine farklı türü tanımlanan, sitoplazmada inaktif proenzimler halinde bulunan, aktif katalitik bölgesinde sistein içeren ve substratlarını aspartat içeren özgül bir bölgeden kesen proteaz enzimlerdir. (**caspase=cysteine-dependent aspartate spesific proteases**).

4.7.2.1. Kaspazlar

4.7.2.1.1. Kaspazların biyokimyası

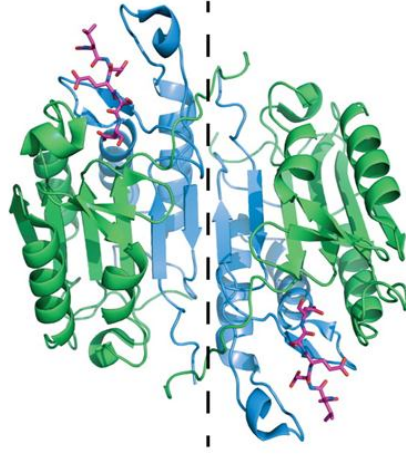
Birçok proteazda olduğu gibi kaspazlar özgül proteoliz aktivasyonunda kullanılmak üzere inaktif zimojenler olarak sentezlenir ve prokaspaz adını alırlar¹⁵⁹. İnaktif prokaspaz enzimleri apoptoz sinyalinin alınmasıyla birlikte aktifleşirler ve aktifleşen bu kaspazlar diğer inaktif kaspazları aspartik asit birimlerinden keserek şelale etkisiyle aktifleştirirler¹⁶⁰. Kaspazlar apoptotik yolda “başlatıcılar” ve “bitiriciler” olmak üzere iki grupta toplanırlar. Apoptotik ölüm işlem sırasına göre kaspazlardan ilk görev alanlar başlatıcı ya da öncü kaspazlardır ve bunların uzun öncül bölgeleri bulunur. Apoptotik yolun daha sonraki aşamalarında görev alan kaspazların diğer üyeleri ise efektör kaspazlar olarak adlandırılır. Başlatıcı kaspazlar efektör kaspazları aktive eden proteazlardır. Kaspaz-2, 8, 9 ve 10 başlatıcı, kaspaz-3, 6 ve 7 ise efektör kaspazlardır. Başlatıcı kaspazların üç önemli özelliği vardır; farklı şekillerde gelen uyarıları, genel bitirici faza taşırlar, yeterli miktarda bitirici kaspazın aktifleşmesini sağlayarak apoptotik sinyalin çoğalmasını sağlarlar, ölümün en son basamağında bir kontrol noktası olarak bulunurlar. Efektör kaspazlar hücre çekirdeğinde (laminler), DNA tamir enzimlerinden PARP, fodrin, Rb, sitoplazmada (aktin) ve hücre iskeletinde bulunan birçok yapısal ve işlevsel proteinleri parçalayan proteazlardır. Efektör kaspazlar katepsin veya kalpein (Ca^{+2} tarafından aktive edilen hücre hareketinde ve adezyonda rol alan proteaz) gibi diğer proteazlar tarafından da aktive edilebilmektedir¹⁶¹.

Her bir kaspaz enziminin optimum kesme bölgesi vardır ve bu bölge aspartik kesim noktasının N-terminalinde bulunan dört aminoasitlik bir motiftir (P1-P4). Bu motifin görevi, kaspazın hedef proteininin seçimini belirlemektir.

Ayrıca bu motif ilgili kaspazın peptid inhibitörlerle inaktive olmasına aracılık etmektedir. Bu dört aminoasitlik motif kaspazların üç boyutlu yapısının özgüllük göstermesinde de önemli bir etkiye sahiptir¹⁶¹.

Kaspazlar; NH₂-terminal bölge, büyük alt ünite, küçük alt ünite ve katalitik alt üniteleri birbirine bağlayan bağlayıcı bölge olmak üzere dört alt üniteden oluşur. Bütün prokaspazlar yüksek oranda birbirlerine benzerlik gösteren proteaz bölgesi içerir. Bu bölge iki alt üniteden oluşur. Büyük alt ünite yaklaşık 20kDa (p20) ve küçük alt ünite yaklaşık 10kDa (p10)'dur. Bazı prokaspazlarda bu alt üniteler arasında 10 aminoasitlik kısa bir bağlayıcı bölge bulunmaktadır. Büyük ve küçük alt birimler birbirleriyle etkileşime girerek enzimin aktif merkezini oluştururlar. Her prokaspaz çeşitli uzunluklarda bir ön bölge veya NH₂-terminal peptid bölgesi içermektedir ve bu ön bölgeler düzenleyici olarak görev yaparlar. Kaspazların ön bölgeleri çeşitlilik gösterir. Başlatıcı ve inflamatuvar kaspazların 100 aminoasitten daha uzun bir ön bölgesi bulunurken; efektör kaspazlarda ise 30 aminoasitten daha kısa bir ön bölge vardır.

Başlatıcı kaspazların kaspaz aktive edici toplayıcı alan [caspase-recruitment domain (CARDs)] ya da ölümü etkileyen alan (DED: death effector domain) adı verilen iki önemli bölgesi vardır. CARD ve DED kaspazların ön bölgelerinin özel motifleridir ve protein-protein etkileşiminde görev alırlar. Bu bölgeler prokaspazlar ve adaptörleri arasında homofilik etkileşime aracılık ederek prokaspaz aktivasyonunda önemli rol oynarlar. Aktivasyonları sırasında aspartat (P1) - X (P2) bağının ayrılması ile proenzimden, küçük ve büyük alt üniteleri içeren aktif enzim oluşur. Ayrılma noktasında aspartatın bulunması kaspazın otoaktif ya da aktive edilebilir olmasıyla uyumludur. Ayrılma işleminden sonra 2 büyük ve 2 küçük alt üniteden oluşan tetramer yapısına sahip kaspaz yapısı izlenir¹⁶¹. (Resim 6)



Resim 6: Kaspazın 2 küçük 2 büyük alt üiteden oluşan tetramerik yapısı (Yeşil ile gösterilen alan büyük alt ünite, mavi ile gösterilen küçük alt ünite)

4.7.2.1.2. Kaspazların sınıflandırılması

Kaspazlar dizin homologilerine ve P4 rezidülerine göre 3 gruba ayrılırlar¹⁶².(Tablo 8).

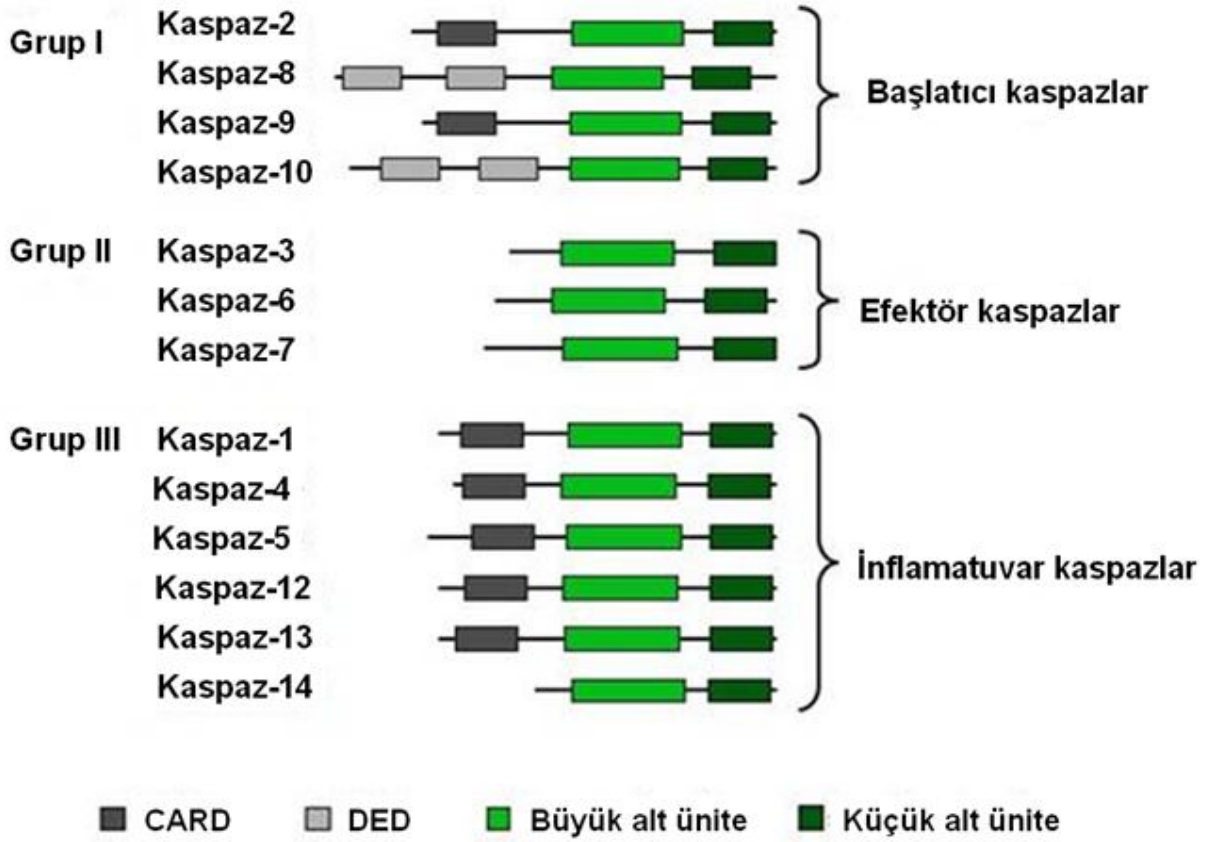
Birinci grupta yer alan kaspazlarda uzun CARD içeren bir öncül alan ve P4 pozisyonunda triptofan ya da lösin bulunur. Bu grupta yer alan kaspaz-1, 4 ve 5 inflamatuvar kaspazlar olarak tanımlanırlar. İkinci gruptaki kaspazlarda ise kısa bir ön alan ve P4 pozisyonunda aspartat bulunur. Bu grupta kaspaz-3 ve 7 ile *Caenorhabditis elegans* apoptotik kaspaz CED-3 yer alır. Apoptozisin en önemli efektörleri olan bu kaspazların çok fazla sayıda substratları vardır. Yine bu grupta yer alan kaspaz-2'nin apoptozisteki rolü tam olarak anlaşılammakla birlikte P4'deki aminoasit benzerliği yüzünden bu grupta yer almaktadır. Ancak büyük öncül alana sahip olması ve dizilim benzerliği dolayısıyla da birinci gruptaki kaspazlara da benzerlik gösterir¹⁶³. Üçüncü gruptaki kaspazlar uzun bir ön alan ve P4 pozisyonunda lösin ya da valin içerirler. Bu grupta başlatıcı kaspazlar olan kaspaz-8, 9 ve 10 yer alır. Kaspaz-6 P4'deki aminoasit yapısıyla bu grupta yer almakla birlikte dizilim ve fonksiyon açısından ikinci gruptaki kaspazlara benzer (Şekil 7)¹⁶³.

Kaspazlar hücrede iki önemli biyolojik yolda görev almaktadırlar; inflamatuvar sinyal yolu ve hücre ölüm yolu. Kaspaz ailesinin 7 üyesi (kaspaz-2, 3 ve 6, 10) apoptotik ölüm yolunda görev alırken, diğer üçü (kaspaz-1, 4 ve 5) proinflamatuvar sitokinleri aktiveştirerek savunma sisteminde görev alır.

İki yol birbirinden farklı olsa da sitokin aktivatörü kaspazlar ve apopitotik kaspazlar büyük benzerlikler gösterirler¹⁶¹. Bu sınıflandırmaların dışında kalan kaspaz-14 keratinositlerde üretilir ve epidermal farklılaşma sürecinde aktif olarak çalışır. Apoptozisi başlatan uyaran her olursa olsun dakikalarla saatler arasında değişen süreçte hücrelerde apoptozisin karakteristik morfolojik özellikleri gözlemlenir. Bu fiziksel değişim kaspaz substratlarının ayrılması sonucu oluşur. Kaspazların farklılaştırıcı özellikleri de vardır. Bu yeniden yapılanma bazen apoptozise benzer morfolojik özellikler gösterebilir. Kaspazların bu işlevleri yaparken nasıl farklı aktiviteler gösterdiği konusundaki bilgiler halen yetersizdir¹⁶⁴. Ayrıca inflamatuvar kaspazlar doğal immün cevabın sürdürülmesinde de görev alırlar. Örneğin kaspaz-1 proinflamatuvar sitokinlerden prointerlökin-1 β ve prointerlökin-18'i aktive eder¹⁶⁵.

Tablo 8: Apoptozda Görev Alan Kaspazlar ve Fonksiyonları

	Alternatif isimlendirme	Öncül Alan	Fonksiyonları
1	ICE	CARD	İnflamasyon
2	ICH-1, NEDD-2	CARD	ER stresle uyarılan apoptozis
3	Apopain, CPP32, Yama	—	Apoptozis ve farklılaşma
4	ICH-2, TX, ICE(rel)-II	CARD	İnflamasyon; muhtemelen ER stresle uyarılan apoptozis
5	ICH-3, TY, ICE(rel)-III	CARD	İnflamasyon
6	Mch-2	—	Apoptozis ve farklılaşma
7	ICE-LAP3, Mch-3, CMH-1	—	Apoptozis ve farklılaşma
8	MACH, FLICE, Mch-5	DED DED	Ekstresek yolak apoptozisi ve farklılaşma
9	ICE-LAP6, Mch-6, APAF-3	CARD	İntrensek yolak apoptozisi ve farklılaşma
10	Mch-4, FLICE2	DED DED	Ekstresek yolak apoptozisi ve farklılaşma
12	—	CARD	Muhtemelen inflamasyon, bir çok insanda fonksiyonsuz ve kesilmiş
14	—	—	Kornifikasyon



Şekil 7: Apoptozda Görev Alan Kaspazların Ait Oldukları Gruplar ve Yapıları

4.7.3. Hücre dışı uyarılarla apoptozun tetiklenmesi ölüm algaçları ve Apoptoz

Apoptoz, ölüm algaçları adı verilen birbiriyle yapısal olarak akraba olan birkaç algaç tarafından aktif olarak uyarılır. En iyi bilinen örnekleri TNF- α ve Fas algaçlarıdır. Ölüm algaçları hücre zarı içine tutunmuş, bir ucu hücre dışına, bir ucu hücre içine bakan, hücre içi tarafında prokaspaz 8 in aktiflenmesini sağlayan bir ölüm bölgesi (death domain) bulunan algaçlardır.

Hücre zarında bulunan kendileri için özgün algaçlara bağlanan ligandlar algacın trimerik (üç bileşenden oluşan) bir yapıya dönüşmesine yol açarlar ve hücre içinde adaptör moleküller adı verilen bir dizi molekülle etkileşerek prokaspaz-8'i iki farklı büyüklükte parçaya böler. Başlatıcı kaspaz denen aktif

kaspaz 8, inaktif durumdaki proenzimler olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin bir zincir biçiminde aktiflenmesine yol açar.

Aktiflenen tüm kaspazlar hücre makromoleküllerini parçalayarak tipik apoptoz morfolojisinin oluşumuna yol açarlar¹⁶⁶.

Aktif kaspaz-8, Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan Bid'in de proteolitik olarak aktifleşmesine yol açar. Bid, mitokondriden sitokrom C, bazı başka proteinlerin (SMAC) ve kalsiyumun serbestlemesine yol açar. Böylece ölüm algaçları yolu mitokondriyal yolu da aktiflemiş olur. Hücreye sitotoksik T algaçları yoluyla ulaşan Fas ligandı, ya da TNF- α , hücre yüzeyinde bulunan kendine özgü algaçlarına bağlanarak apoptozu uyarabilir. Fas algacının ligandı aktiflenmiş T lenfositlerde ayrıca dalak, testis, karaciğer ve böbrek hücrelerinin yüzeyinde ifade edilir¹⁶⁷. Çeşitli virüslerle infekte hücrelerde ya da p53'ün aktiflenmesi sonucu Fas algacının ifadesi, o hücrenin sitotoksik T lenfositler tarafından öldürülmesini sağlar. FAS ve TNF- α dışında TRAIL ve TRAIL algaçları da hücre içinde benzer yollarla ölümü uyarabilir. TRAIL algaçlarının FAS algacından farklı olarak karaciğer, nöronlar, miyositler, kolon, bronş epiteli, Leydig hücreleri gibi dokularda yapısal biçimde ifade edildiği ve TRAIL'in de bu dokularda bulunduğu gösterilmiştir¹⁶⁸.

Hücre dışından gelen sinyallerin hücre içinde apoptotik makinayı çalıştırmaya aracılık eden yollardan biri de sfingolipid yoludur. Sfingomiyelin, hücre zarının yapıtaşlarından biridir. Radyasyon ve KTNin yanı sıra ölüm algaçları aracılığıyla da aktiflenebilen bir enzim olan sfingomiyelinaz tarafından seramid'e dönüştürülür. Seramid, ayrıca serin palmitol transferaz tarafından da sentezlenebilir. Seramid ve seramidaz enzimiyle seramiden oluşturulan sfingozin, Bid yapımını değişik yollarla artırarak mitokondriyal yol üzerinden apoptozu tetikler¹⁶⁹.

4.7.4. Hücre İçi apoptotik yollar

Mitokondri, hücre içinde ATP üretiminin kaynağı olmasının yanı sıra, hücre içi ya da dışı yollardan gelen ölüm sinyallerinin üzerinde birleştiği bir organeldir. Mitokondri iç ve dış zarla çevrili yapıdadır, bu zarlar tıpkı hücre zarında olduğu gibi bir zar potansiyeline sahiptir. Dış zar geçirgenliğinde artış sonucu mitokondri zarı potansiyelinin bozulması dış zarda hızlı bir şişmeyi izleyerek iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına

çıkmasına yol açar. Bu kaçış, ya zarda oluşan geçirgenlik sağlayan gözenek aracılığıyla ya da dış zarın patlamasıyla oluşabilir. Temel olarak mitokondrideki solunum zincirinde yer alan bir enzim olan sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AİF), SMAC ve ENDO G adlı DNaz enzimi sitoplazmaya dağılır. Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak apoptozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar¹⁷⁰.

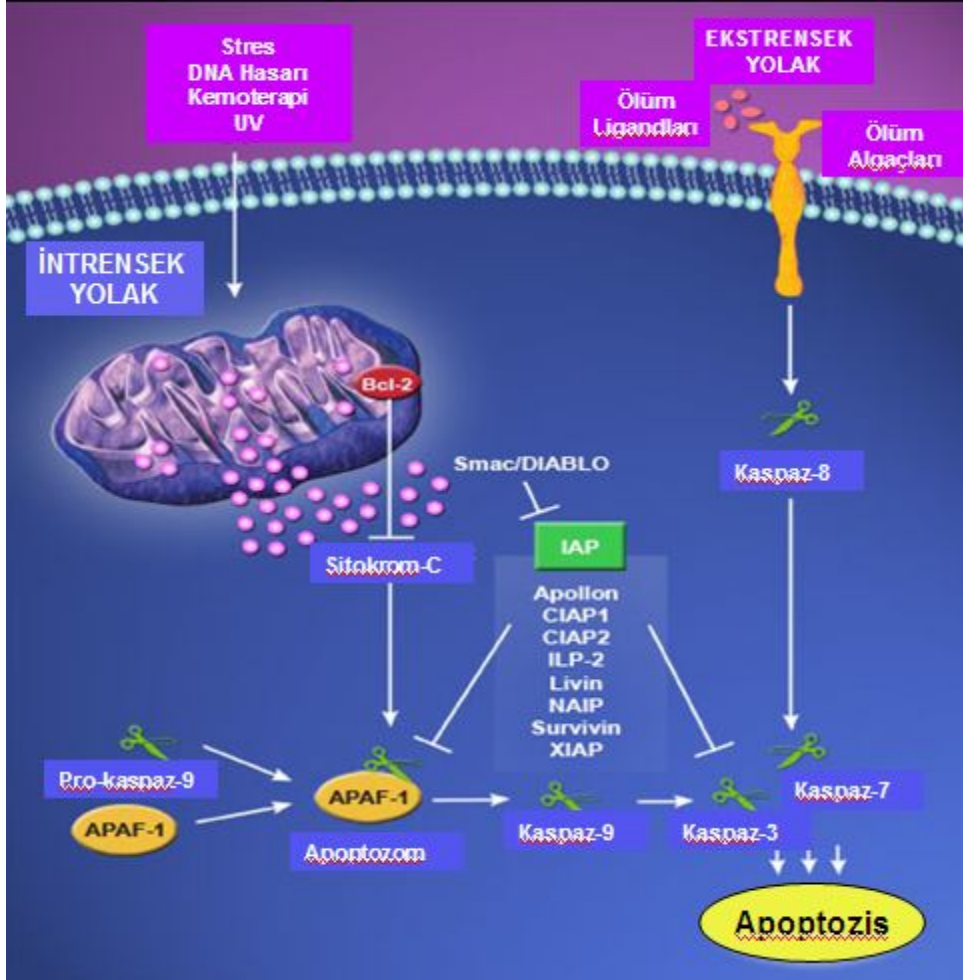
Apoptozom, kaspaz-9'u aktive etmek üzere keser, kaspaz-9, diğer kaspazları proteolitik bir zincir halinde aktive ederek apoptozun gerçekleşmesini sağlar.

Mitokondride dış zar potansiyelinin değişmesi Bcl-2 ailesi adı verilen bir protein grubu tarafından düzenlenir. Hücrede antiapoptotik aile üyeleri olan Bcl-2, Bcl-x, yine aynı ailenin üyeleri olan Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 proteinleri gibi proapoptotik proteinler tarafından baskılanır. Ailenin proapoptotik üyeleri normal koşullarda inaktif durumdadır, bu nedenle mitokondriyal zar geçirgenliği Bcl-2 ve benzerlerinin etkisi sayesinde değişmez. Ancak büyüme faktörünün uzaklaştırılması Bad'ın, kalsiyum artışı Bim'in, ultraviyole ışını Bmf'nin proapoptotik grubun aktifleşmesine yol açarlar, sonuçta Bcl-2, proapoptotik aile üyeleri tarafından baskılanır, Bcl-2 tarafından inaktif durumda tutulan ve yine aynı aileden olan Bak ve Bax proteinleri etkinleşerek mitokondri dış zarında geçirgenlik sağlayan gözeneklerin oluşumuna, zar potansiyelinin değişimine yol açar. Bu da uygulamacı kaspazların aktivasyonu ve apoptozla sonuçlanır. Kaspazlar inhibitör apoptoz proteinleri (İAP) denen bir grup protein tarafından baskılanır.

Endoplazmik retikulum (ER)'da, apoptotik süreci başlatabilen organellerden diğeridir. Protein katlanmasında temel bir işlev yapan ER'de bu katlama işlevi bozulduğunda, katlanmamış proteinlerin yol açtığı bir stres ortaya çıkar¹⁷¹. Bu stresin aşırı olması ya da uzaması, proteaz ve kinazların doğrudan aktivasyonu ve hücre içi kalsiyumun artışıyla mitokondriyal yolu aktive eden bir etki oluşturur¹⁷¹. ER ile mitokondri arasında yer değiştirerek hücre içinde çok düşük bir derişimde tutulan kalsiyumun da önemli bir apoptotik düzenleyici olduğunu gösteren bulgular vardır. Hücre içinde ER depolarında kalsiyum düzeyi düşüğe seramid, oksidatif stres gibi apoptotik uyarılar ölüme yol

açmamaktadır. Çalışmalar ER'den salınan kalsiyumun mitokondride düzeyinin arttığını ve bunun da mitokondriyal apoptotik yolu uyardığını düşündürmektedir¹⁷².

p53, DNA gardiyanı da denen ve bu güne dek üzerinde en çok çalışılan tümör baskılayıcı proteinlerden biridir. p53 sitoplazmada bulunan ve DNA'nın ya da hücrenin ağır biçimde hasar görmesi durumunda, DNA da belli genlerin aktivasyonuna, böylece yapımlarının artmasına (Bax, Apaf-1, Fas) belli genlerin de baskılanmasına (Bcl-2, Bcl-X) yol açarak apoptozu tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür. DNA hasarı, hipoksi ya da onkogenlerin aktivasyonu, sürekli yapılan ama ubiquitinleyici bir protein (mdm2) tarafından belli bir hızda yıkılan p53'ün fosforillenmesine, fosforillenme ubiquitinlemenin bozulmasına yol açar. Miktarı artan p53 çekirdeğe geçerek ilgili genlerin ifade edilmelerini değiştirerek hücreyi apoptoza sokar. Yukarıda belirtilen yollarla aktiflenen kaspazlar hücre iskeletinin bileşenleri olan aktin, miyozin, spektrin gibi proteinleri keserek apoptozun ilk döneminde gözlenen morfolojik bulgular olan hücrenin küçülmesi ve yapıştığı ortamdaki ayrılması sonucunu verir. Aktin ve miyozinin etkileşimi, hücrenin zarla sarılı tomurcuklar halinde kopuşuna yol açar. Kaspazlar çekirdek laminasını parçalar, endojen DNaz lar ise DNA'yı 200 ya da 200'ün katları baz çiftlik parçalar halinde keser. Bu nedenle apoptotik hücrelerin DNA'sı jel elektroforezinde 200 ve katı olan baz parçaları halinde sıralanır, buna merdiven kalıbı (ladder pattern) adı verilir. Transkripsiyon faktörleri gibi proteinler, ribozomlar, RNA, Golgi ve endoplazmik retikulum gibi tüm organeller parçalanır¹⁷³. Mitokondri zar potansiyelinin bozulmasının hemen ardından normal hücrede çift tabakalı hücre zarının dış katında bulunmayan bir fosfolipid olan fosfatidilserin dış yaprağa geçer ve oksitlenir. Bu değişim apoptotik hücrelerin makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilmesi için bir sinyal oluşturur. Zarla sarılı apoptotik cisimlerin fagositozuyla apoptotik süreç tamamlanmış olur (Resim 7).



Resim 7: Apoptozis yolları

5. MATERYAL ve METOD

Mersin Üniversitesi hayvan etik kuruldan etik onayı alındı. Mersin Üniversitesi Yenişehir Kampüsü Hayvan Deneyle Laboratuarında yetiştirilen 25 erkek, 25 dişi toplam 50 adet Wistar albino cinsi sıçan deneye alındı. Sıçanlar toplam 5 gruba ayrıldı. Her grupta hormona bağılı etkileri dışlama adına 5 erkek 5 dişi toplam 10 adet sıçan yer aldı. Beş gruba ayrılan sıçanlar 5 gün boyunca sıvı ve gıda tüketimi, malnutrisyon, dehidratasyon, tartı alımı ve kaybı, ishal yönünden günlük olarak takip edildi. Tüm hayvanlar sakrifiye edilmeden 2 saat önce histopatolojik olarak bağırsak epitel hücre proliferasyonunu saptamak için 50 mg/100gr başına Bromodeoksiüridin (BrdU) uygulandı. Beşinci gün (MTX uygulamasının 72. saatinde) sonunda 10 mg/kg/doz ksilazin ve 90 mg/kg/doz ketamin intraperitoneal anestezi uygulaması ardından sıçanlardan cerrahi olarak jejunal doku örnekleri alındı. Eş zamanlı TAOK için vena kava inferiordan kan örneği alındıktan sonra sıçanlar dekapite edildi.(Resim 8A-8B) Jejunal dokuların bir kısmı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına histolojik, immünhistokimyasal ve elektron mikroskopi çalışılmak üzere iletildi. Kaspaz-3, -8 ve -9 için alınan doku örnekleri Mersin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde çalışılmak üzere epandorf tüplerine alınarak Mersin Üniversitesi Hayvan Deney Laboratuarında -80°C de saklandı. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında TAOK çalışılmak üzere alınan kan örnekleri NF615 NÜVE (NÜVE Sanayi Ltd.Şti, Ankara, Türkiye) santrifüj cihazında 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Serum örnekleri -80°C de Mersin Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuarında saklandı.

Birinci grup, “Kontrol” grubu:

MTX yerine 0.8 ml/kg serum fizyolojik (%0.9 NaCl-SF) intraperitoneal uygulandı, distile su plasebo olarak 6ml/kg gavaj yoluyla 5 gün süreyle verildi.

İkinci grup, “MTX” grubu:

Her hayvana distile su 6 ml/kg dozunda plasebo olarak gavaj yoluyla her gün aynı saatte 5 gün süreyle verildi. İntraperitoneal olarak 20 mg/kg MTX deneyin 3. gününde uygulandı.

Üçüncü grup “MTX ve Gln” grubu:

Gln 1 g/kg dozunda her gün aynı saatte ratlara 5 günlük deney sürecince gavaj yoluyla verildi. Deneyin 3. gününde MTX 20 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak her hayvana uygulandı.

Dördüncü grup “MTX ve HMB” grubu:

HMB 200 mg/kg dozunda her gün aynı saatte ratlara 5 günlük deney sürecince gavaj yoluyla verildi. Deneyin 3. gününde MTX 20 mg/kg dozunda her hayvana intraperitoneal olarak uygulandı.

Beşinci grup “MTX, Gln ve HMB” grubu:

Gln 1g/kg ve HMB 200 mg/kg dozunda her gün aynı saatte ratlara 5 günlük deney sürecince gavaj yoluyla verildi. Deneyin 3. gününde MTX 20 mg/kg dozunda her hayvana intraperitoneal olarak uygulandı.



Resim 8: Dekapitasyon sonrası intestinal dokuların çıkarılması ve kan örneği alınması (**A:** Normal intestinal doku görünümü, **B:** Konjesyone, ödemli bağırsak duvarı)

5.1. Işıık mikroskobik doku takip ve inceleme protokolü

Histolojik İnceleme: Elde edilen dokular %10 nötral formalin ile 48 saat tespit edildikten sonra rutin yöntemle takip edildi ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5 µm'lik kesitlerin İmmünohistokimyasal olarak işaretlenecek olanları poly-L lysine kaplı lamlar üzerine, hematoksilen eozin ile boyanacaklar ise normal lamlar üzerine alındı. Tüm ışık mikroskobik görüntülemeler Olympus BX50™ (Olympus GmbH, Almanya) ışık mikroskobuna takılı Nikon CoolPix 5000™ (Nikon Corp. Tokyo, Japonya) dijital fotoğraf makinesi ile gerçekleştirildi.

5.2. Bağırsak mukoza hasarı skorlaması ve kript derinliği ölçümleri

Bu amaçlarla alınan kesitler hematoksilen-eozin ile boyandı. Bağırsak mukoza hasarı ilk kez Park ve arkadaşları tarafından tarif edilen yöntemle göre semi-kantitatif olarak değerlendirildi¹⁷⁴.

Mukozal hasar 0 ile 8 arasında derecelendirildi:

- 0: Normal mukoza,
- 1: Villus ucunda subepitelyal boşluk oluşumu,
- 2: Artmış subepitelyal alan,
- 3- Tüm villus kenarı boyunca epitelyal ayrılma,
- 4- Villuslarda soyulma (epitel kaybı),
- 5- Villus dokusunun kaybı,
- 6- Kript tabakasında infarkt,
- 7- Tüm mukoza boyunca infarkt,
- 8- Tüm bağırsak duvarı boyunca infarkt, biçiminde skorlandı.

Kript derinliği ölçümü için iTEM 5.0[®] (Olympus GmbH, Almanya) görüntü analiz yazılımı kullanıldı. Bu amaçla hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerden elde edilen mikrofotograflar üzerinde seçilen, boyuna kesilmiş 10 adet villus ve bunlara komşu 10 adet kriptin derinliği ölçülerek ortalamaları alındı.

5.3. İmmünohistokimyasal işaretleme

Mikrotomla poly-L lysine kaplı lamlara 4µm kalınlığında alınan kesitlerin parafinleri giderildi. Daha sonra rehidratasyon işlemi için derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek distile suya alındı. H₂O₂ içinde bekleterek endojen peroksidaz aktivitesi engellendi. Fiksasyon ve sıcak parafine

gömölmekten kaynaklanan antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak için kesitler tripsin (pH:7,6) içinde 37°C (Bio-Optica Milano Spa®) 30 dakika inkübe edildi. Taze hazırlanmış PBS ile yıkandıktan sonra 2N HCl solusyonunda 37°C 30 dakika bekletildi. Asitin etkisini nötrale etmek için kesitler 10 dakika boyunca 0,1M di-sodyum tetraborat çözeltisine konuldu ve sonra çeşme suyunda yıkandı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kesitler lamalar üzerinde pap-pen ile çevrildi. Nonspesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyamasını engellemek için kesitler Novocastra™ Protein Block damlatılarak 8 dakika beklendi. Dokuların üzerindeki protein blok uzaklaştırılarak yıkama yapılmadan PBS içinde %0.5'lik sığır serum albumin (BSA) ile 1/20 oranında dilüe edilmiş Bromodeoxyuridine (BrdU) (Kat. No: NCL-BrdU Novocastra, Leica Biosystems, Wetzlar, Almanya) antikorunu damlatılarak buzdolabında 1 gece inkübe edildi. Kesitlere biotin ile bağlanmış anti fare sekonder antikorunu (Kat No: D01-125, GBI Inc. Mukiltea, WA, ABD) damlatıldı. Streptavidin peroksidaz enzim reaktifi ve diaminobenzidin (DAB) damlatılarak antikor bağlanması görülür hale getirildi. Daha sonra kesitlere hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve entellan ile kapatıldı.

Aktif kaspaz-3 immünohistokimyası için de yukarıdaki protokol kullanıldı ancak farklı olarak primer antikor (Kat. no: 9661S, Cell Signaling Technology Inc. Danvers, MA, ABD) 1/400 oranında dilüe edildi ve HCl ile di-sodyum tetraborat aşamaları uygulanmadı.

Negatif kontrol için kesitlere primer antikor içermeyen %0,5 PBS-BSA damlatıldı. Daha sonra protokole aynı şekilde devam edildi.

5.4. Elektron mikroskop takibi

Elektron mikroskopik inceleme için alınan dokular öncelikle 1mm³'lük parçalara bölündü ve yaklaşık 4–6 saat %2,5'lik glüteraldehit solüsyonunda fikse edildi. Fiksasyon sonrası dokular fosfat tampon solüsyonuna alındı. Daha sonra EDTA çözeltisinde dekalsifikasyon işlemi yapıldı. Dekalsifikasyonun tamamlandığı günden itibaren rutin elektron mikroskopik takip işleminden sonra dokular epoksi rezin bloklara gömüldü.

Bu bloklardan ultramikrotom (Leica Ultracut UCT125, Leica Avusturya-Viyana) ile 70 nm kalınlığında kesitler, 300 gözenekli bakır gridlere alındı ve uranil asetat ve kurşun sitrat solüsyonları ile kontrastlandı.

Kontrastlanan kesitler transmisyon elektron mikroskobu (Jeol JEM1011, Tokyo, Japonya) ile görüntülendi. Mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Megaview III, Olympus GmbH, Germany) ile incelenen kesitlerin fotoğrafları çekildi ve değerlendirme yapıldı.

5.5. Kaspaz -3,-8,-9 Gen İfadesi

5.5.1. Materyal

Mersin Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında -80 derecede saklanan doku örnekleri 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Doku örneklerini parçalamak için (MagNA Lyser Green Beads, ROCHE Katalog No; 03358941001) kiti kullanıldı. Dokuların parçalanması için (MagNA Lyser Instrument, ROCHE Katalog No; 03358968001, Almanya) cihazı kullanıldı.(Resim 9)



Resim 9 : MagNA Lyser Homojenizatör Cihazı

Dokulardan RNA izolasyonu için yüksek saflıkta RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Tissue Kit, ROCHE katalog no; 12033674001) kullanıldı. Total RNA izolasyonu aşamasında Nüve marka santrifüj (ependorf tüpler için) ve karıştırıcı (vorteks) cihazı kullanıldı.

RNA örneklerini komplementer DNA'ya (c-DNA) çevirmek için;

- Transkriptör c-DNA sentez kiti (ROCHE katalog no; 04379012001)
- Kuru ısı bloğu ve thermalcyler cihazı kullanıldı.

- Universal Probe Library Primer Probe dizaynı ve Real Time Ready Primer Prob dizaynı kullanılarak Lightcyler 480 Real Time PCR cihazı ile örneklerin rölatif ekspresyon analizi sağlandı.(Resim 10)



Resim 10 : Lightcycler 480 Real-Time PCR cihazı

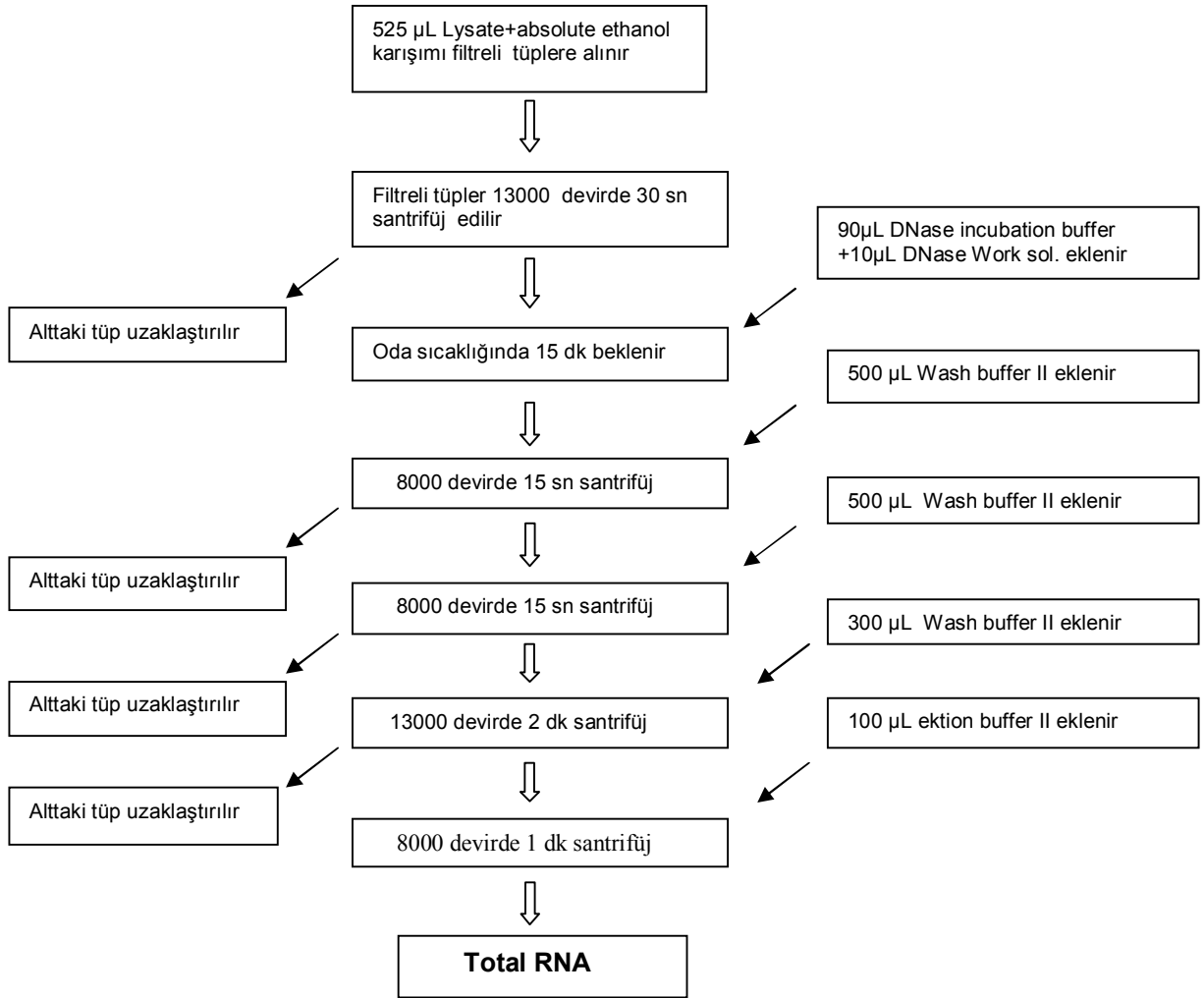
5.5.2. Doku örneklerinden RNA izolasyonu

Her örnek için; dokular 30-35 mg tartıldı ve Roche MagNA Lyser Homojenizatör de 350 µL High Pure RNA Tissue Kit Tissue Lysis / Binding Buffer ile MagNA Lyser Green Bead'ler içerisinde 6500 devirde 40sn homojenizasyon işlemine tabi tutuldu. +4°C'de 2dk soğuk blok üzerinde tutuldu. Tekrar 6500 devirde 40 sn homojenizasyon işlemine tabi tutuldu, 5-10 dk +4°C de soğuk blok üzerinde bekletildi. Beadler üzerine 175'er µL absolute Ethanol eklendi ve izolasyon aşamasına geçildi ve aşağıdaki protokol uygulandı.

İzolasyon yüksek saflıkta RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Tissue Kit, ROCHE) kullanılarak yapıldı. Örnek sayısı kadar filtreli toplama tüpleri hazırlanarak numaralandırılan ve hazırlanan karışım filtreli tüp içerisine konularak tüplerin kapakları kapatıldı. 30sn 13000xg(gravite)'de santrifüj edilerek toplama tüpleri atıldı. Filtreli tüpler yeni toplama tüplerine aktararak her bir örneğe 90 µL DNaz inkübasyon buffer ve 10 µL DNaz-I eklendi. 15 dk +15-+25°C'de inkübasyona bırakıldı. Filtreli tüplerin içerisine 0,5 ml yıkama tamponu-I ilave edilerek 15 sn 8000xg'de santrifüj edildi ve toplama tüpleri atıldı. Filtreli tüpler yeni toplama tüplerine konuldu. Filtreli tüplerin içerisine 0,5 ml yıkama tamponu-II eklenerek 15sn 8000xg'de santrifüj edildi ve toplama tüpleri atıldı. Filtreli tüpler yeni toplama tüplerinin üzerine konularak filtreli

tüplerin içerisine 0,3 ml yıkama tamponu-II ilave edilerek 2dk 13000xg'de santrifüj edildi ve toplama tüpleri atıldı.

Filtreli tüpler kapaklı 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı, her örneğe 100 µL elüsyon buffer eklenerek 1 dk 8000xg'de santrifüj edilerek RNA izolasyon protokolü sonlandırıldı. İzolasyonun tamamlanmasını takiben elüsyon tampon içerisindeki RNA'lar -80°C'de saklandı.(Şekil 8)



Şekil 8: Total RNA sentez basamakları

5.5.3. c-DNA sentez aşaması

Elde edilen RNA'ları c-DNA'ya dönüştürmek için Transkriptör First Strand c-DNA sentez kiti (ROCHE) kullanıldı.

Kitin içeriği;

Random primer

PCR için gerekli saflıkta su

Transkriptör revers traskriptaz reaksiyon tamponu

Koruyucu RNaz inhibitör

Deoksinükleotit karışımı

Transkriptör revers traskriptaz enzimi

Kullanıma başlamadan önce bütün solüsyonlar ve RNA örnekleri buz üzerinde tutularak çözdürüldü. c-DNA sentezi 2 basamakta gerçekleştirildi.

1. basamakta hazırlayacağımız karışımın içeriğinde her örnek için;

2 µL random primer

2 µL PCR için gerekli saflıkta su

9 µL RNA örneği kullanıldı.

Kuru ısı bloğunda 65°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 2. basamağa geçildi.

2. basamakta hazırlanacak karışımın içeriği;

4 µL transkriptör revers traskriptaz reaksiyon tamponu,

0,5 µL korucuyu RNaz inhibitör,

2 µL deoksinükleotit karışım

0,5 µL transkriptör revers traskriptaz enzimden oluşturuldu.

2. basamakta hazırladığımız karışım, 1. basamakta hazırlanan karışım (inkübasyondan sonra buz üzerinde soğutulan) üzerine eklendi. Karışımın son hali termalcyclus cihazına yüklendi ve aşağıdaki protokol uygulandı;

25°C'de 10 dakika

50°C'de 60 dakika

85°C'de 5 dakika

Yukarıdaki ısı döngüleri kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiş, c-DNA sentezi tamamlandı. Bu aşamadan sonra c-DNA örnekleri 1,5 ml'lik kapaklı ependorf tüplere alınarak -20°C'de muhafaza edildi(Şekil 9).

2 µL H₂O

2 µL Random hekzamer primer

9 µL RNA

13 µL → 10 dk 65°C'de inkübe edildi

0.5 µL (tüp 1)

4.0 µL H₂O (tüp 2)

0.5 µL (tüp 3)

2.0 µL (tüp 4)

7 µl → 10 dk Oda sıcaklığında inkübe edildi

13µL +7µL=20 µL

RT-PCR'da c-DNA için
aşağıdaki protokol uygulandı

Şekil 9: c-DNA protokolü

5.5.4. Real-Time PCR aşaması

Doku düzeyinde kaspaz 3-8-9 ekspresyonu çalışması için gerekli cihazlar ve kitler;

-Lightcycler 480 II Cihazı (ROCHE, Almanya)

-MAGNA Lyser Cihazı (ROCHE, Almanya)

-Lightcycler 480 Multiwell Plate 96 (ROCHE kat no: 04729692001); örnekleri pipetlemek amaçlı

-Lightcycler 480 Sealing foil (ROCHE katalog no:04729757001); plate içine pipetlenen örnekleri örtmek için kullanılan şeffaf kapatıcı

-Realtime ready catalog assay primer probe dizaynı (ROCHE kat.no: 05532957001)

-Master Mix; Lightcycler 480 probe master (ROCHE kat.no:04707494001)

- High pure RNA Tissue Kit (ROCHE kat no; 12033674001)
- MagNA Lyser Green Beads (ROCHE kat no; 03358941001); dokuları parçalama amaçlı
- Transcriptor first strand c-DNA synthesis kit (ROCHE kat no; 04379012001) c-DNA sentezi için kullanıldı

5.5.5. Ekspresyon çalışması için izlenen yöntem

Real-Time PCR da kullanılan karışım;

Beta aktin referans gen + kaspaz 8 ve kaspaz 9 hedef gen karışımı (Real Time ready assay):

- 1 µL Primer & Probe (Real Time Ready)
- 10 µL Probe Master
- 4 µL PCR grade water

15 µL total hacim

Kaspaz 3 hedef gen karışımı (UPL):

- 0,4 µL F primer
- 0,4 µL R primer
- 0,4 µL Probe XX
- 10 µL Probe Master
- 3,8 µL PCR grade water

15 µL total hacim

Herbir örnek için yukarıdaki karışımlara 5'er µL cDNA eklenerek Light Cyclers 480 sistemine ait plakalar üzerinde çalışıldı. (Beta aktin standartları ile)

Real-Time PCR protokolünün ilk aşamasında;

*İnkübasyon aşaması

95°C'de 10 dakika DNA polimerazın aktive olması için bekletildi.

*Amplifikasyon aşaması

3 aşamada gerçekleştirilerek, aşağıdaki döngü 45 defa tekrarlandı.

- 1.Basamak: 95°C'de 10 saniye DNA'nın çift iplikli yapıdan tek iplikli yapıya geçmesi (denatürasyon)
- 2.Basamak: 60°C'de 30 saniye primerlerin bağlanması (annealing)
- 3.Basamak: 72°C'de 1 saniye DNA zincirinin uzaması (elongation) sağlandı.

*Soğutma aşaması;

40°C'de 1 dakika bekletildi.

Bu işlemler Lightcycler 480 II Real-Time PCR cihazı (ROCHE, Almanya) ile gerçekleştirildi. Değerlendirilme cihazın kesin kantitasyon analiz kısmında yapıldı. Bu yöntemler ve kullanılan standart değerleri her bir hasta için optimize edilmiş ve standartlardan yola çıkarak kantitatif sonuçlar hesaplandı.

Real-Time PCR çalışması için her bir örnek için önceden PCR tüplerine hazırlanmış olan 10 µL RNA'dan elde edilen c-DNA'lar -20°C' den çıkartılarak oda ısısına getirildi. Real-Time PCR çalışması için reaksiyonda kullanılacak olan karışım 1,5 ml' lik eppendof tüpler içerisinde hazırlandı.

Tablo 9: Kaspaz-3,-8,-9 genleri için Real Time PCR amplifikasyon protokolü

	Cycle	Analysis mode	°C	Acq.mode	Time	Ramp rate
DEN	1	none	95 ⁰ C	None	00:10:00	4,4
			95 ⁰ C	None	00:00:10	4,4
AMP	45	quantification	60 ⁰ C	None	00:00:30	2,2
			72 ⁰ C	Single	00:00:01	4,4
COOL	1	none	40 ⁰ C	None	00:01:00	2,2

Çalışmada kullanılan farklı sıcaklıklar ve nedenleri;

1-95°C'de 10 dakika bekletilerek ortamdaki DNA polimerazın aktif hale geçmesi sağlandı.

2- 95°C'de 10 sn, amplifikasyon programı başladığında c-DNA'lar tek iplikli hale geçirildi.

3- 60°C'de 30 sn çoğaltılması istenilen spesifik bölgeye uygun primerlerin bağlanması sağlandı

4- 72°C'de 1 sn; Primerlerin uzaması aşamasıdır. Buradaki single modu okuma yapılacağı anlamına gelmektedir.

5- 40°C'de 30 sn soğutma aşamasıdır, kullandığımız ürünleri cihazdan çıkarabilmemiz için soğutma modu uygulandı

Çalışma sonucunda çıkan sonuçların amplifikasyon eğrileri gözlemlenerek kantitatif modda crossing point (cp) değerleri belirlendi. Yapılan çalışmada hem referans gen hem hedef gen olduğu için, çıkan sonuçlar Hedef gen (Kaspaz 3-8-9) / Referans gen (Beta aktin) formülü ile hesaplandı. Formülde veriler yerine konulduğunda çıkan sonuç ekspresyon düzeyi olarak belirlendi.

Çalışma kapsamında Beta aktin referans geni ve kaspaz -3,-8,-9 hedef gen bölgesine özgü primerler sentezletildi. c-DNA'lar Real-Time PCR tekniği ile taqman prob yöntemi kullanılarak çoğaltıldı. Bu amplifikasyon sırasında çift zincirli DNA taqman prob yöntemi kullanıldı.

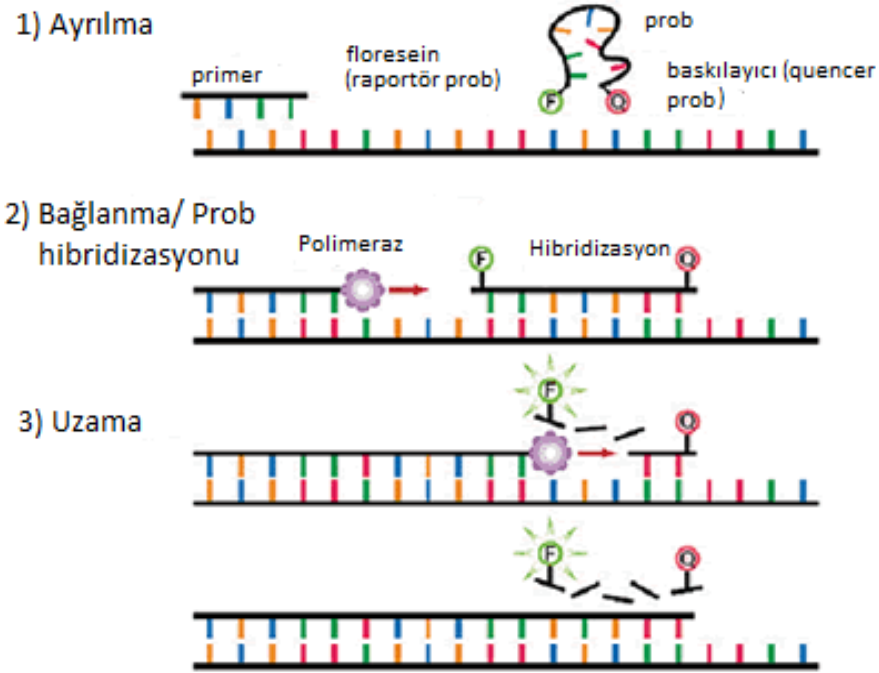
5.5.6. Taqman Prob Yöntemi

Hedefe özgül problemler kullanılmıştır. Bu testte problemlerle testin özgüllüğü artırılmıştır. Problemlerden biri 3' ucundan floresans boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya ile işaretlendi. Problemler hedef amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotit uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. "Fluorescence resonance energy transfer (FRET)" olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğeri bir ifade ile PCR siklusu süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır.

Taqman sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob'un 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein=6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine =TAMRA) bulunmaktadır. Prob, tek iplikli hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde,

sentezin devam edebilmesi için taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar.

Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır.(Şekil 10)



Şekil 10: Taqman prob yöntemi

5.6. Verilerin analizi

Real- Time PCR ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi, LightCycler® 480 Software Version 1.5 kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerin crossing point (cp) değerlerinden yola çıkarak cihaz konsantrasyon değerlerini hesapladı ve verilere göre $\Delta\Delta Ct$ ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplanarak Rölatif kantitasyon ile ekspresyon belirlendi.

5.7. Total Antioksidan Status (TAS) Düzeyi Ölçümü

Total Antioxidant Status (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) kiti kullanılarak TAS ölçümü yapıldı. Bu kitle redükte ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) molekülü, H₂O₂ kullanılarak asidik ortamda

(asetat tamponu 30 mmol/l pH 3,6) ABTS⁺ radikal katyonu oluşturmak amacıyla inkübe edilip okside edildi. Konsantre (koyu yeşil) ABTS⁺ molekülü, asetat tamponu içerisinde daha stabildir. Koyu yeşil renk, daha konsantre ve yüksek pH' a sahip asetat tamponu içinde (0.4 mol/l pH 5.8) dilüe edilirken spontan olarak yavaşça kaybolur. Bu renk kaybının hızı, örnekte bulunan antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu reaksiyon spektrofotometrede (660 nm'de) takip edilebilir ve ağarma hızı örnekteki total antioksidan kapasite (TAC) ile ters orantılıdır. Örnekteki antioksidanlar, renk oluşumunu, konsantrasyonları ile orantılı olarak önlemektedirler. Bu reaksiyon hızı, suda çözünen vitamin E'nin analogu olan Trolox (6-hidroksi-2.5.7.8-tetramethylchroman-2-karboksilik asit) ile kalibre edilir. Sonuçlar mmol Trolox equivalent/l olarak ifade edildi.

5.8. Total Oksidan Status (TOS) Düzeyi Ölçümü

Total oksidan status düzeyi, Total Oxidant Status (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) kiti kullanılarak yapıldı. Bu kitte; örnekte bulunan oksidanlar, ferro iyon (Fe⁺²)-o-dianisidine kompleksini ferrik iyon (Fe⁺³) haline getirmektedir. Reaksiyon ortamında bolca bulunan gliserol molekülleri ile oksidasyon reaksiyonu güçlendirilir. Xylenol orange ile ferrik iyon asidik ortamda renkli bileşik oluşturmaktadır. Renk yoğunluğu, örnekteki oksidan moleküllerinin miktarıyla ilişkilidir. Test H₂O₂ ile kalibre edilmiş ve sonuçlar litre başına mikromolar H₂O₂ equivalent olarak ifade edildi. (µmol H₂O₂ Equiv./l)

5.9. İSTATİSTİK

Analizler için MedCalc paket programını kullanıldı. BRDU pozitif ve negatif hücre sayıları, PARK skorlaması için Shapiro Wilk testi kullanılarak normal dağılım kontrolü yapıldı. PARK skorlaması bakımından grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Diğer değişkenler bakımından gruplar karşılaştırılırken one-way ANOVA ve post-hock Tukey testi kullanıldı. Gruplarda vücut ağırlıklarındaki değişim karşılaştırılırken tekrarlayan ölçümlü varyans analizi (Repeated ANOVA) kullanıldı. Kaspaz-3, -8 ve -9 için veriler delta delta ct değerleri olduğu için normalizasyon işlemi olarak 2 üzeri - delta delta ct değerlerini hesaplandı. Verilerin normal dağılım kontrolünü yapıldı. Bunun sonucunda normal dağılım koşulu sağlandığı için one-way ANOVA ve

post-hoc Tukey testi kullanarak grupları karşılaştırıldı. p değerinin 0.05'in altında olması istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Grupların klinik gözlemi

Sıçanlar MTX'i iyi tolere ettiler. Deneyi sonlandırmayı gerektirecek herhangi bir bulgu ortaya çıkmadı. Kontrol grubu hariç tüm gruplarda ishal deneyin 3. gününde ortaya çıktı. Sadece 4.grupta 5.dişi sıçan nedeni bilinmeyen bir şekilde öldü.

6.2. Grupların tartıları

Grupların günlük tartıları arasında anlamlı fark saptanmadı. Tablo10'da hayvanların günlere göre ağırlık ortalamaları verilmiştir.

Tablo 10: Deney Hayvanlarının Günlere Göre Ağırlık Ortalamaları

Grup	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün
SF	260.00 ± 50.34	251.30 ± 51.29	255.80 ± 51.41	252.80 ± 56.27	247.60 ± 54.65
MTX	256.70 ± 59.40	248.40 ± 58.47	239.30 ± 55.93	231.40 ± 55.35	227.20 ± 53.33
MTX-Gln	225.60 ± 59.34	212.50 ± 53.81	224.70 ± 58.67	222.40 ± 55.62	217.30 ± 57.31
MTX-HMB	264.22 ± 87.76	263.56 ± 89.13	265.67 ± 86.81	257.44 ± 84.10	253.33 ± 84.31
MTX-Gln-HMB	264.90 ± 81.36	262.70 ± 77.43	261.60 ± 76.65	257.40 ± 77.77	251.00 ± 77.18

6.3. Histopatolojik sonuçlar

Sadece kontrol grubunda (SF grubu) düzenli morfolojide yüzey ve kript epiteli ve lamina propriaya sahip villuslar gözlemlendi. Kript derinliğinin kontrol grubu diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.05$) (Resim 11A). MTX verilmiş grupta villus yüksekliğinin azaldığı ve yassılaştığı, yüzey epitelinin apikal bölgeden kript epiteline doğru döküldüğü ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun çok belirgin bir şekilde artmış olduğu görüldü. MTX grubunun kript derinliği diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu gözlemlendi ($p<0.05$) (Resim 11B). MTX-HMB grubunun kript derinliği MTX-Gln grubuna göre daha fazla olmasına karşın iki grup karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($p>0.05$) (Resim 11C, 11D). Ancak her iki grup kript derinliği açısından MTX grubu ile kıyaslandığında kript derinliklerinin

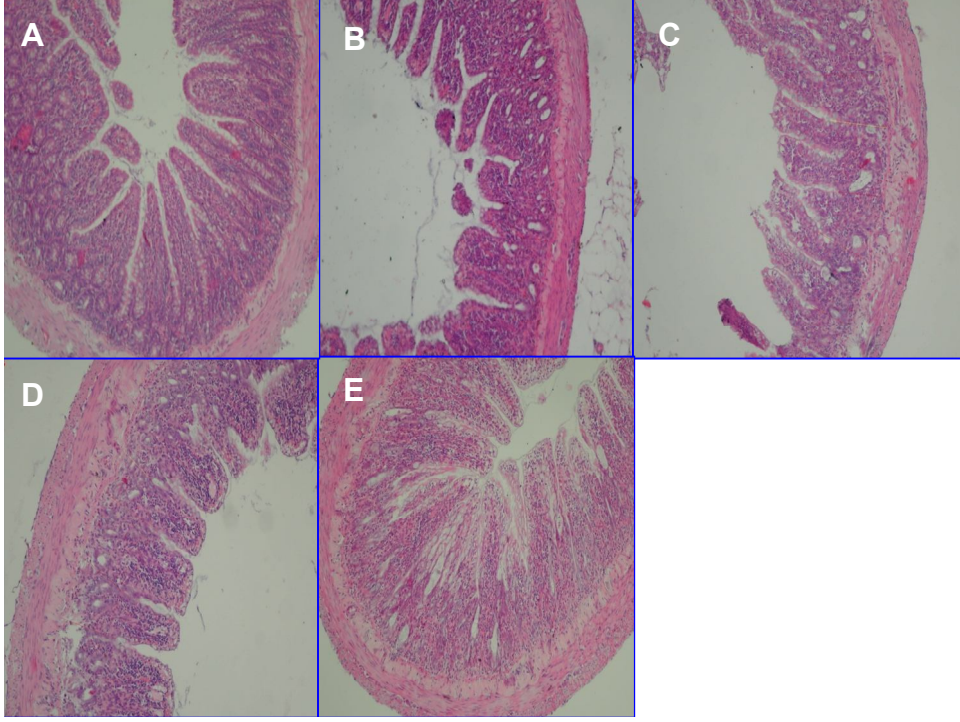
istatistiksel olarak daha iyi olduğu ancak MTX-Gln-HMB grubundan istatistiksel olarak daha düşük kript derinliğine sahip oldukları belirlendi ($p>0.05$). MTX-Gln-HMB grubunda ise villus morfolojisinin düzeldiği, yüzey ve kript epitelinin birçok alanda yenilendiği ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun ise belirgin olarak azaldığı gözlemlendi. Kript derinliği açısından değerlendirildiğinde MTX-Gln-HMB grubunun kontrol grubu haricinde diğer gruplara göre kript derinliğindeki azalmanın en az düzeyde olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Resim 11E). Kript derinliği sonuçları Tablo 11’de gösterilmiştir. Tablo 12 de gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılma yapılmıştır.

Tablo 11: Deney Gruplarının Kript Derinliği Ortalamaları

GRUP	Sıçan Sayısı	Ortalama
SF	10	2.04 \pm 0.24
MTX	10	1.11 \pm 0.11
MTX-Gln	10	1.40 \pm 0.15
MTX-HMB	9	1.54 \pm 0.39
MTX-Gln-HMB	10	1.84 \pm 0.11

Tablo 12: Deney Gruplarının Kript Derinliği Bakımından Karşılaştırılması (p değeri)

Grup	SF	MTX	MTX-Gln	MTX-HMB	MTX-Gln-HMB
SF		0.000	0.000	0.000	0.033
MTX	0.000		0.001	0.000	0.000
MTX-Gln	0.000	0.001		0.308	0.000
MTX-HMB	0.000	0.000	0.308		0.000
MTX-Gln-HMB	0.033	0.000	0.000	0.001	



Resim 11: Kript derinliği görüntüleri (**A:** SF grubu, **B:** MTX grubu, **C:** MTX-Gln grubu, **D:** MTX-HMB grubu, **E:** MTX-Gln-HMB grubu)

6.4. PARK SKORLAMASI

Mukozal hasarı Park skorlamasına göre değerlendirildiğinde en fazla hasarın istatistiksel olarak MTX grubunda olduğu, kontrol grubunda ise herhangi bir doku hasarının olmadığı belirlendi. MTX-Gln ve MTX-HMB grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak park skorlamasında bir farklılık olmadığı saptandı ($p>0.05$). MTX-Gln-HMB grubunun ise park skorlaması açısından SF grubuna yakın olduğu ancak istatistiksel açıdan SF grubunun daha iyi olduğu; MTX, MTX-Gln ve MTX-HMB gruplarından ise istatistiksel olarak daha iyi olduğu gözlemlendi (Tablo 13,14).

Tablo 13: Deney Gruplarının PARK Skorlaması Ortalamaları

Grup	Siçan Sayısı	Ortalama
SF	10	0.0 ± 0.0
MTX	10	3.50 ± 0.85
MTX-Gln	10	2.30 ± 0.67
MTX-HMB	9	1.89 ± 0.60
MTX-Gln-HMB	10	1.0 ± 0.47

Tablo 14: Deney Gruplarının PARK Skorlaması Bakımından Karşılaştırılması (p değeri)

Grup	SF	MTX	MTX-Gln	MTX-HMB	MTX-Gln-HMB
SF		0.000	0.000	0.000	0.036
MTX	0.000		0.001	0.000	0.000
MTX-Gln	0.000	0.001		0.304	0.000
MTX-HMB	0.000	0.000	0.304		0.000
MTX-Gln-HMB	0.036	0.000	0.000	0.001	

6.5. ENTEROSİT ÇOĞALMA İNDEKSİ

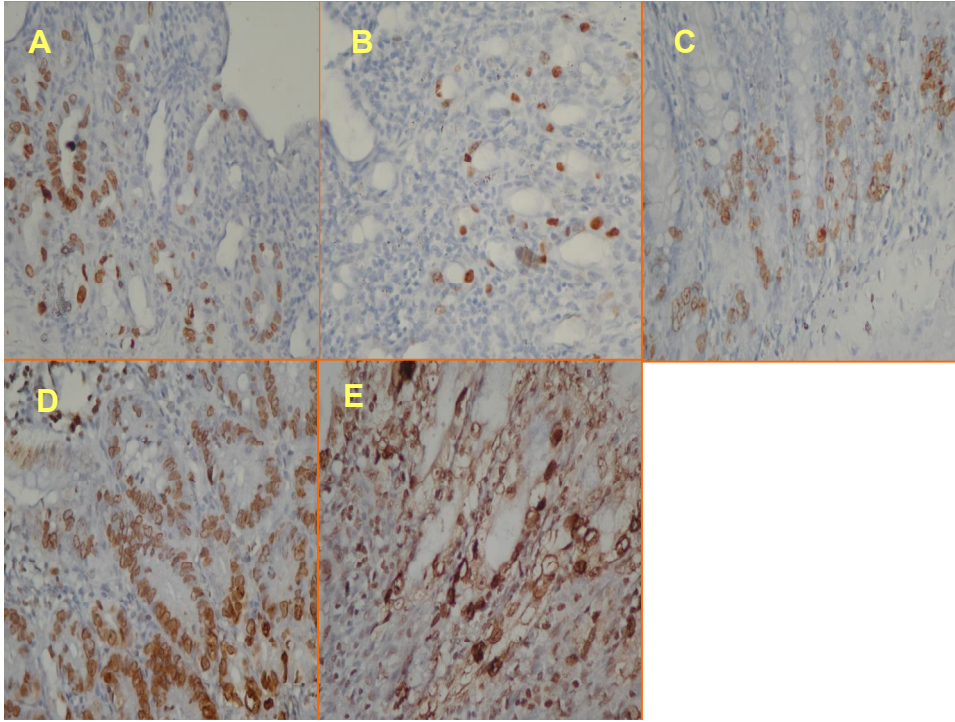
Çoğalmakta olan enterosit hücrelerini belirlemek için BrDU ile işaretlenmiş hücre ve işaretlenmemiş hücre sayımı yapıldı. SF grubunda BrDU ile işaretlenmiş hücre sayısının 89.00 ± 14.83 olduğu buna karşın MTX grubunda BrDU ile işaretlenmiş hücre sayısının belirgin şekilde azaldığı (52.62 ± 16.75) ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p < 0.05$). MTX-Gln (97.41 ± 21.02) ve MTX-HMB (139.56 ± 34.01) grubunda BrDU ile işaretlenmiş hücre sayıları arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu ($p < 0.05$), ancak MTX grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak daha fazla çoğalmakta olan enterosit hücresi olduğu saptandı ($p < 0.05$). MTX-Gln-HMB grubundaki çoğalmakta olan enterosit hücre sayısının (177.00 ± 33.13) istatistiksel olarak en yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.05$). MTX-Gln grubunda çoğalmakta olan hücre sayısının SF grubundan farklılık göstermediği belirlendi ($p > 0.05$). Çoğalmakta olan enterosit hücre sayım ortalamaları ve grupların karşılaştırılmaları Tablo 15 ve Tablo 16'da verilmiştir. BrDU ile işaretlenmiş hücrelerin görüntüleri Resim 12 de gösterilmiştir.

Tablo 15: Deney Gruplarının BrDU Pozitif Hücre Sayımlarının Ortalamaları

GRUP	BrDU Pozitif Hücre Sayısı
SF	89.00 ± 14.83
MTX	52.62 ± 16.75
MTX-Gln	97.41 ± 21.02
MTX-HMB	139.56 ± 34.01
MTX-Gln-HMB	177.00 ± 33.13

Tablo 16: Deney Gruplarının BrDU Pozitif Hücre Sayısı Bakımından Karşılaştırılması (p değeri)

Grup	SF	MTX	MTX-Gln	MTX-HMB	MTX-Gln-HMB
SF		0.018	0.943	0.001	0.0001
MTX	0.018		0.002	0.0001	0.0001
MTX-Gln	0.943	0.002		0.006	0.0001
MTX-HMB	0.001	0.0001	0.006		0.018
MTX-Gln-HMB	0.0001	0.0001	0.0001	0.018	



Resim 12: BrDU görüntüleri (**A:** SF grubu, **B:** MTX grubu, **C:** MTX-Gln grubu, **D:** MTX-HMB grubu, **E:** MTX-Gln-HMB grubu)

6.6. APOPİTOTİK HÜCRE SAYIMI

Barsak kesitlerinde apoptotik hücreleri belirlemek için kaspaz-3 ile immünohistokimyasal boyama yapıldı (Resim 13). Apoptotik ve apoptotik olmayan hücre sayımları yapıp değerler yüzde olarak hesaplandığında en düşük apoptotik hücre yüzdesinin SF grubunda olduğu belirlendi ($p < 0.05$). MTX-Gln, MTX-HMB ve MTX-Gln-HMB grubundaki apoptotik hücre

yüzdelerinin sırasıyla giderek azaldığı en düşük apoptotik hücre yüzdesinin MTX-Gln-HMB grubunda olduğu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p < 0.05$).

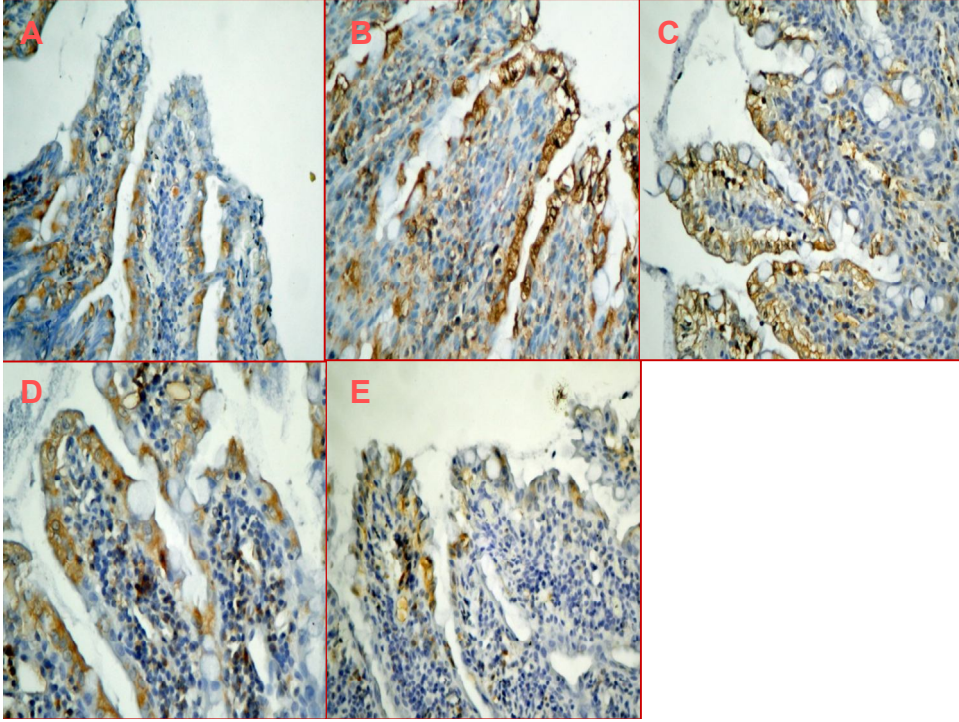
MTX-Gln grubundaki apoptotik hücre yüzdesinin MTX-HMB grubu ile kıyaslandığında MTX-Gln grubunda apoptotik hücre yüzdesinin daha yüksek olduğu aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Benzer şekilde MTX-Gln grubundaki apoptotik hücre yüzdesinin MTX-Gln-HMB grubundan yüksek olduğu ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$). MTX-Gln-HMB grubunun apoptotik hücre yüzdesi MTX-HMB grubundan daha düşük olduğu ve aralarında istatistiksel olarak bir farklılık olduğu saptandı ($p < 0.05$). Apoptotik hücre yüzdelерinin ortalamaları ve grupların karşılaştırılmaları Tablo 17 ve Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 17: Deney Gruplarında Kaspaz-3 Pozitif, Kaspaz-3 Negatif Hücre Sayımları ve Kaspaz-3 Pozitif Hücre Yüzdelerinin Ortalamaları

GRUP	Kaspaz-3(+) hücre sayısı	Kaspaz-3(-) hücre sayısı	Kaspaz-3(+) hücre yüzdesi (%)
SF	2.70 ± 0.82	36.30 ± 5.23	7.76 ± 2.85
MTX	10.20 ± 3.15	10.60 ± 2.46	95.72 ± 16.04
MTX-Gln	7.50 ± 0.53	11.30 ± 0.82	66.98 ± 9.49
MTX-HMB	5.67 ± 0.87	14.22 ± 1.20	40.52 ± 9.42
MTX-Gln-HMB	4.20 ± 0.63	20.01 ± 1.45	22.06 ± 6.51

Tablo 18: Deney Gruplarının Kaspaz-3 Pozitif Hücre Yüzdelerinin Karşılaştırılması (p değeri)

Grup	SF	MTX	MTX-Gln	MTX-HMB	MTX-Gln-HMB
SF		0.0001	0.0001	0.0001	0.019
MTX	0.0001		0.0001	0.0001	0.0001
MTX-Gln	0.0001	0.0001		0.0001	0.0001
MTX-HMB	0.0001	0.0001	0.0001		0.002
MTX-Gln-HMB	0.019	0.0001	0.0001	0.002	



Resim 13: Kaspaz-3 görüntüleri (**A:** SF grubu, **B:** MTX grubu, **C:** MTX-Gln grubu, **D:** MTX-HMB grubu, **E:** MTX-Gln-HMB grubu)

6.7. ELEKTRON MİKROSKOBİ BULGULARI

Grup 1: Mukozanın tek katlı prizmatik epitel hücrelerinde organel yapı ve dağılımları normal görünümdeydi. Hücrelerin apikal yüzeyindeki mikrovillusların sayısı ve biçimlerinde anormal bir değişiklik saptanmadı. Epitel hücreleri arasında yine normal görünümlü goblet hücreleri bulunmaktaydı. Epitelin altındaki bağ dokusunda da patolojik bir değişime rastlanmadı (Resim 14A).

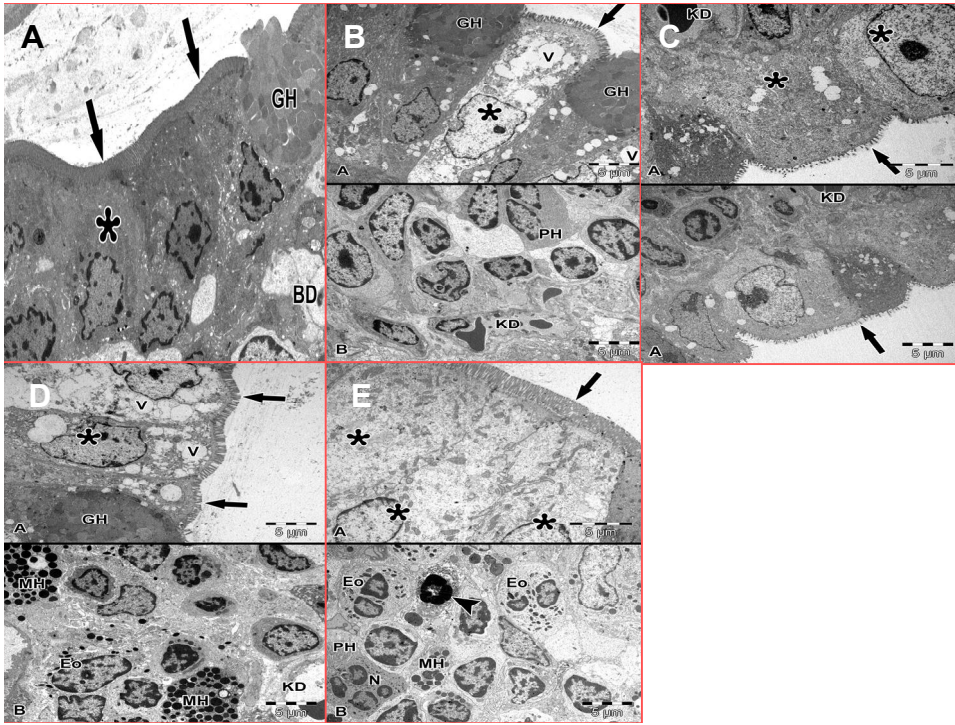
Grup 2: Bu grupta yapılan elektron mikroskopik incelemede saptanan patolojik bulgular oldukça belirgindi. Epitel hücre sitoplazmalarında vakuoller ve bazı hücrelerde artmış yağ damlacıkları gözlemlendi. Hücrelerin mitokondriyonlarında şişme ve krista kaybı bulunmaktaydı. Epitel hücre apikal yüzeyindeki mikrovilluslarda sayıca azalma ve boylarında kısalma saptandı. Bazı epitel hücrelerinde mikrovillusların tamamına yakını kaybedilmişti. Epitel altındaki bağ dokusunda çok sayıda enflamatuar hücre de görüldü (Resim 14B).

Grup 3: Hücrelerin apikal yüzeylerindeki mikrovilluslar kontrol grubuna göre sayıca azalmıştı ve boyları da kısalmıştı. Bazı hücrelerin sitoplazmalarında

vakuoller yer almaktaydı. Epitel altındaki bağ dokusunda çok sayıda enflamatuvar hücre izlendi. Bu grupta epitel hücre sitoplazmalarında mitokondriyonlar ya da diğer organellerde bozulma saptanmadı (Resim 14C).

Grup 4: Bu grupta da mikrovilluslarda azalma ve kısalma gözlemlendi. Epitel hücrelerinde artmış vakuoller ve yağ damlacıklarına rastlandı. Epitel altı bağ dokuda enflamatuvar hücreler bu grupta da bulunmaktaydı (Resim 14D).

Grup 5: Bu grubun hücrelerinde bulgular daha hafif olarak izlendi. Mikrovillusların sayısı ve boyları kontrol grubuna benzer görünümdeydi. Hücre içi vakuoller, sayıca daha azdı ve daha küçüktü. Bağ dokusunda enflamatuvar hücre artışı bu grupta da görüldü (Resim 14E).



Resim 14: Elektron mikroskopi görüntüleri (**A:** SF grubu, **B:** MTX grubu, **C:** MTX-Gln grubu, **D:** MTX-HMB grubu, **E:** MTX-Gln-HMB grubu)

6.8.TOTAL ANTIOKSİDAN KAPASİTE

Deney grupları TAOK açısından değerlendirildiğinde SF grubunda total antioksidan kapasitenin en yüksek olduğu diğer deney grupları ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p<0.05$). MTX grubunun total antioksidan kapasitesinin en düşük olduğu diğer gruplarla aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p<0.05$). Sırasıyla MTX-Gln,

MTX-HMB, MTX-Gln-HMB gruplarının antioksidan kapasitelerinin giderek arttığı belirlendi. MTX alan gruplar içerisinde en yüksek antioksidan kapasitenin MTX-Gln-HMB grubunda olduğu ve diğer gruplarla aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p < 0.05$). Deney gruplarının antioksidan kapasite ortalamaları Tablo 19 ve gruplar arası karşılaştırma Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 19: Deney Gruplarının TAOK Ortalamaları

GRUP	Total Antioksidan Kapasite
SF	65.39 ± 17.75
MTX	6.40 ± 4.81
MTX-Gln	18.44 ± 7.02
MTX-HMB	30.49 ± 4.14
MTX-Gln-HMB	43.39 ± 3.92

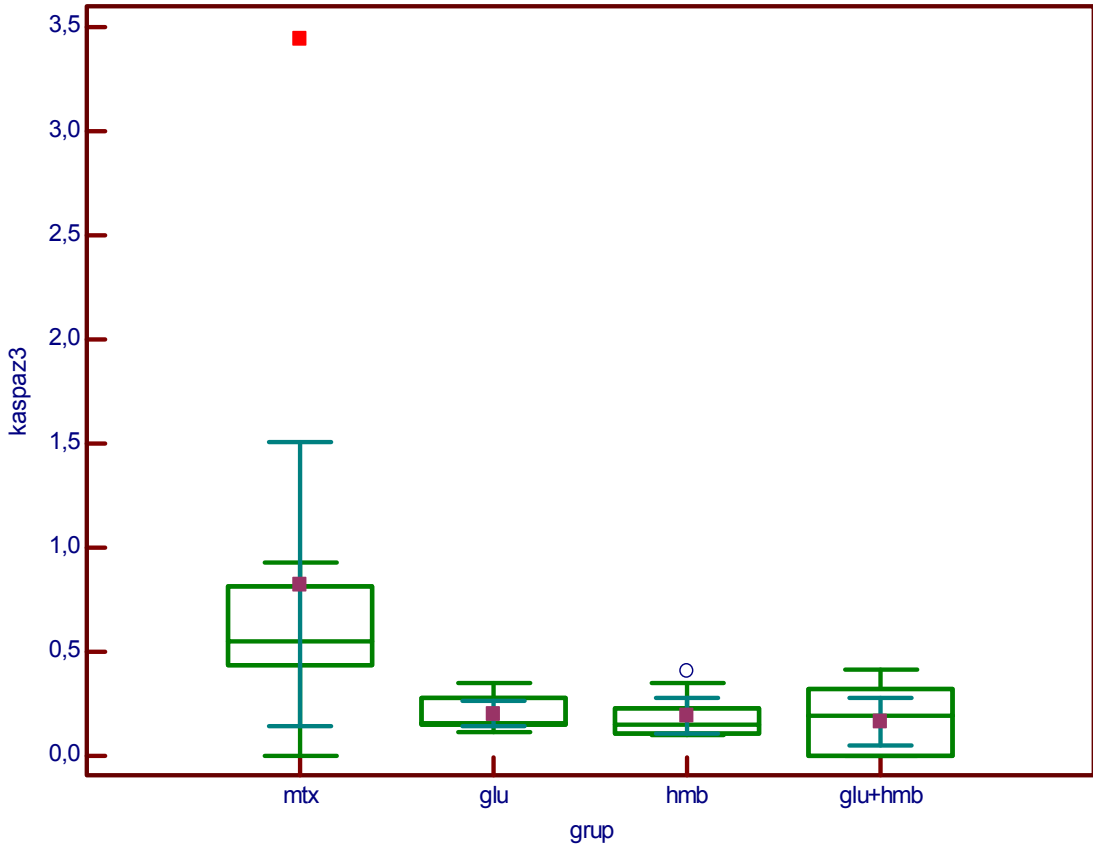
Tablo 20: Deney Gruplarının TAOK bakımından karşılaştırılması (p değeri)

Grup	SF	MTX	MTX-Gln	MTX-HMB	MTX-Gln-HMB
SF		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
MTX	0.0001		0.042	0.0001	0.0001
MTX-Gln	0.0001	0.042		0.051	0.0001
MTX-HMB	0.0001	0.0001	0.051		0.031
MTX-Gln-HMB	0.0001	0.0001	0.0001	0.031	

6.9.GENETİK

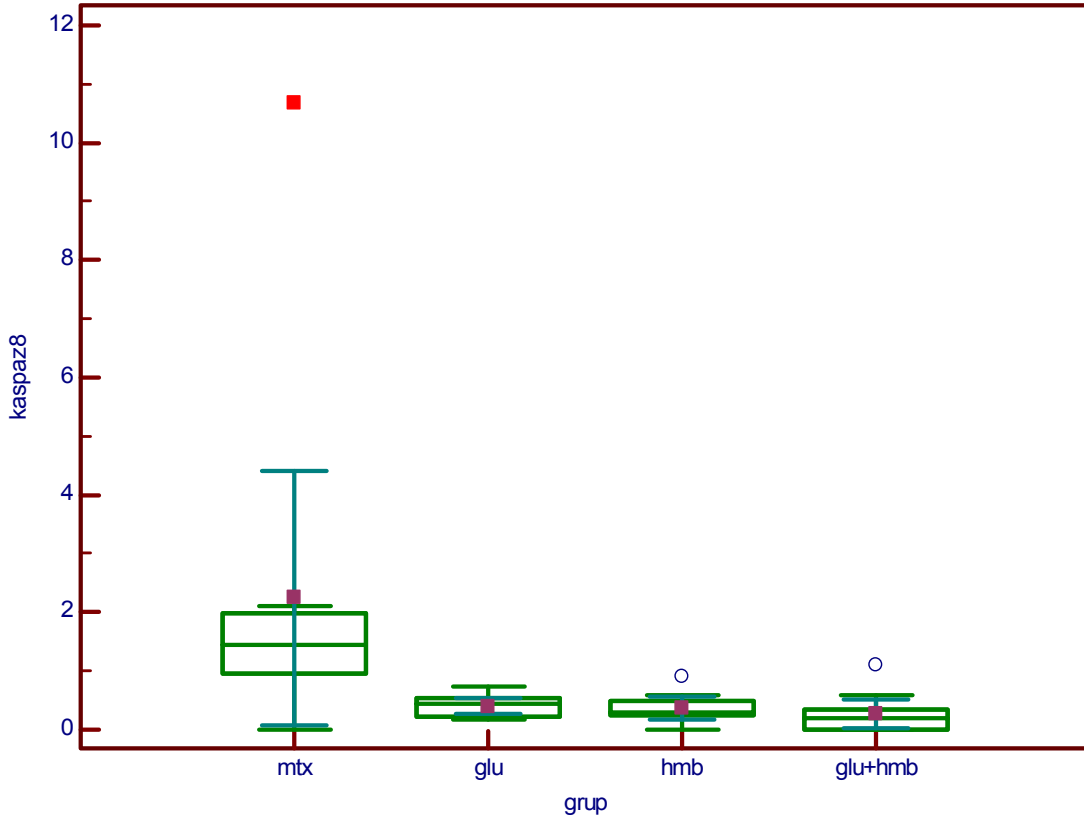
6.9.1.Kaspaz-3, -8, -9 Gen İfade Düzeyleri

Kaspaz 3 gen ifadenmesi için MTX grubunun diğer gruplardan (0.82 ± 0.95) anlamlı derecede yüksek değere sahip olduğu saptandı ($p < 0,05$). Sırasıyla MTX-Gln (0.20 ± 0.84), MTX-HMB (0.19 ± 0.11) ve MTX-Gln-HMB (0.17 ± 0.16) gruplarında kaspaz-3 belirlenmesinin giderek azaldığı ancak gruplar arasında istatistiksel farklılık olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Şekil 11).



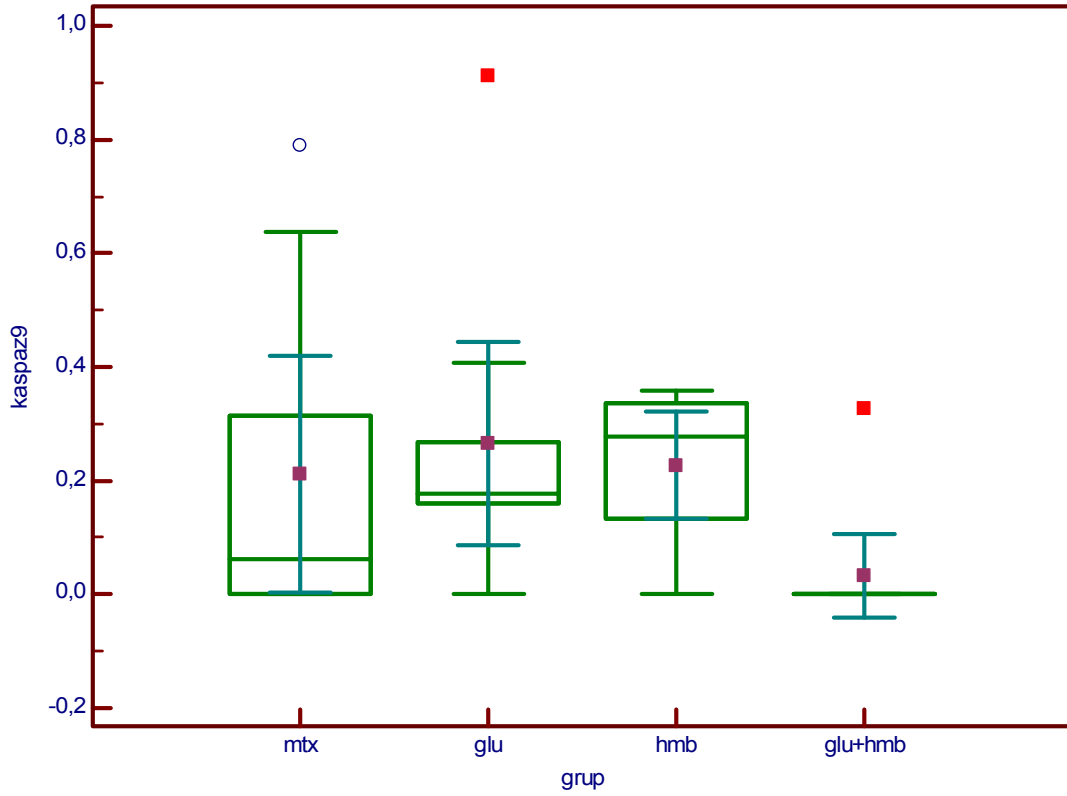
Şekil 11:Kaspaz 3 gen ifadelerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Kaspaz 8 gen ifadenmesi MTX grubunda (2.27 ± 3.03) diğer deney grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek değere sahip olduğu saptandı ($p < 0,05$). Diğer gruplarla arasında farklılık anlamlı değildi ($p > 0,05$). Sırasıyla MTX-Gln (0.40 ± 0.19), MTX-HMB (0.37 ± 0.26) ve MTX-Gln-HMB (0.27 ± 0.34) gruplarında kaspaz-8 belirlenmesinin giderek azaldığı ancak gruplar arasında istatistiksel farklılık olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Şekil 12) .



Şekil 12 : Kaspaz 8 gen ifadelerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Kaspaz 9 gen ifadenmesi sırasıyla MTX grubu için 0.21 ± 0.29 , MTX-Gln grubu için 0.26 ± 0.25 , MTX-HMB grubu için 0.23 ± 0.12 , MTX-Gln-HMB grubu için 0.03 ± 0.10 olarak bulundu. En düşük değer MTX-Gln-HMB grubunda olmakla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p > 0,05$)(Şekil 13).



Şekil 13 : Kaspaz 9 gen ifadelerinin gruplar arasında karşılaştırılması

7.TARTIŞMA

MTX, lösemi ve çeşitli solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan, DNA sentezini bozarak S fazındaki hücreleri etkileyen bir antimetabolittir. Hücre replikasyonunda anahtar bir enzim olan DHFR enzimini inhibe ederek folat antagonisti olarak görev görür. MTX hastalarda ishal, iştahsızlık ve bunlara eşlik eden malabsorbsiyon, malnutrisyon ve dehidratasyona neden olabilir. Aynı zamanda epitelyal proliferasyonu ve enterosit fonksiyonunu da inhibe eder ve mukozal bariyerin bozulmasına bağlı olarak bağırsak kaynaklı sepsis riskini artırır. MTX uygulamasında asıl doz sınırlayıcı faktör gastrointestinal toksisitedir²⁴.

MTX tedavisi uygulanan hastalarda, oral ve intestinal mukozite yol açtığı kesin bir şekilde gösterilmiştir. Sıçanlar, MTX'in yol açtığı gastrointestinal mukozit için oldukça uygun modeller oluştururlar¹⁷⁵. İnce bağırsak epitel hücrelerinin çoğalması ve kendini yenilemesi kriptlerde meydana gelmektedir. Normal fizyolojik koşullarda çok hızlı yenilenebilen kript hücreleri, villus uçlarına göç ederek yaklaşık 2-3 gün içinde gastrointestinal epitelin kendini tamamen yenilemesini sağlamaktadır.

MTX tedavisinden sonra hasar belirgin olarak ince bağırsaklarda görülür. MTX tedavisi sonrasında oluşan hasarda oksidatif stresin özellikle nötrofil infiltrasyonunun rol oynadığı gösterilmiştir³⁴. MTX'in neden olduğu histopatolojik değişiklikler içinde en ciddi etki kript ve villöz ablasyonu ile proksimal ince bağırsakta belirgindir¹⁷⁶.

MTX uygulaması, apoptoziste artışa neden olur ve ratlarda uygulamadan 6 saat sonra zirve yapar ve en şiddetli mukoza hasarı ortalama 72 saat sonra izlenir^{177,178}. Bu nedenle, bizimde çalışmamızda ince barsak hasarının histopatolojik değerlendirilmesinde, tek doz intraperitoneal MTX uygulandıktan 72 saat sonra elde edilen jejunum dokuları kullanıldı. MTX yüksek doz uygulandığında gastrointestinal hasar ve kemik iliği baskılanması gibi şiddetli sistemik yan etkilere bağlı olarak hayvanların erken ölümlerine neden olmaktadır. Daha önce yapılmış MTX ile oluşturulan deneysel mukozit çalışmalarına benzer şekilde bizde çalışmamızda MTX dozunu 20 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde belirledik¹⁷⁹. Böylece istenilen, MTX'e bağlı

gastrointestinal mukozit oluşturuldu.

Çalışmada MTX uygulanan tüm gruplarda ishal tespit edildi. Gerek Gln, gerek HMB ve gerekse Gln-HMB kombinasyonunun ishal oluşumunu önleyici etkisi tespit edilemedi.

Bağırsak mukoza hasarı gerek kript derinliği gerekse Park ve arkadaşları tarafından tarif edilen yöntemle göre semi-kantitatif olarak değerlendirildi¹⁷⁴. Kript derinliği bakımından değerlendirildiğinde MTX alan grubun kript derinliğinin en az olduğu, buna karşın MTX-Gln ve MTX-HMB grubunun kript derinliğinin MTX grubuna kıyasla yüksek olduğu ancak aralarında istatistiksel farklılık olmadığı belirlendi. MTX-Gln-HMB grubunun ise kontrol grubuna yakın kript derinliğine sahip olduğu ancak SF grubunun istatistiksel olarak daha iyi kript derinliğine sahip olduğu belirlendi.

Park skorlaması açısından irdelendiğinde MTX grubunun en yüksek değere sahip olduğu belirlendi. MTX-Gln ve MTX-HMB grubu arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı ancak MTX-Gln-HMB grubunun park skorlaması açısından SF grubuna yakın değerlere sahip olduğu ve gerek MTX-Gln gerekse MTX-HMB grubundan istatistiksel olarak daha iyi olduğu saptandı.

L-Gln esansiyel olmayan bir aminoasit olmasına karşın birçok biyokimyasal reaksiyona katılır. Lenfosit, enterosit gibi hızlı proliferasyon gösteren hücrelerde dolaylı olarak protein sentezine katılır. Aynı zamanda DNA ve glutatyon sentezi için öncül bir molekül olarak görev alır. Önemli fonksiyonlarından biri de gastrointestinal kanalın sağlıklı yapısını sürdürebilmesi ve yeniden yapılanabilmesi için önemli bir enerji kaynağıdır¹⁸⁰. Gerek hayvan gerek insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda Gln'in etkisi çelişkili sonuçlar vermektedir^{82,181}. İnvitro çalışmalar Gln desteğinin hücresel çoğalmayı artırdığını göstermesine karşın invivo çalışmalarda özellikle tümör hücrelerinde çoğalmanın arttığı gösterilememiştir^{181,182,183,184}. Ratlarda Gln desteğinin MTX'e ve RT'e bağlı mukozit gelişimini azalttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır^{185,186}. Çalışmamızdan elde edilen verilerde literatürü destekler nitelikte olup Gln'in mukozal hasarı azalttığını göstermektedir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada HMB kullanımının deneysel olarak yara iyileşmesinde kollajen sentezini artırarak olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir. oluşumunu azalttığını göstermiştir¹⁸⁷.

HMB ubikuitin-proteozom sisteminin etkinliğini azaltarak protein yıkımını önlemekte ayrıca yara iyileşmesine ve immün sistem fonksiyonlarının gelişimine yardımcı olmaktadır¹⁸⁸. Mukozal hasarın başlamasıyla birlikte ortamda fazla miktarda bulunan NF-κB protein yıkımını arttırmaktadır. İnflamatuvar sitokinlerden olan TNF-α, interferon-γ apopitozda görev alan kaspaz-8'i aktive eder. Aktive kaspaz-8 hücrede bulunan ve apopitotik kaspaz-3'ün aktivasyonu sağlar. Kaspaz-3 aynı zamanda hücre çekirdeğinde protein sentezini azaltmaktadır. HMB kaspaz-8 aktivasyonunu inhibe ederek hücrenin apopitoza gitmesini önlediği gibi, protein sentezinin artmasına ve NF-κB aracılı protein yıkımının da azalmasına yol açarak hücreyi koruyucu etki gösterir^{127,129,130}. Ayrıca HMB mTOR yolağını aktive ederek protein sentezini arttırmakta ve hücrede koruyucu etki göstermektedir¹³¹. Bizde HMB grubunda histolojik parametrelerin MTX grubu ile kıyaslandığında düzelmiş olarak saptanmasının bu mekanizmalar aracılığı ile olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda en iyi sonuçlar Gln ve HMB kombinasyonu ile tedavi edilen grupta görülmüştür. Gerek Gln'in hücresel çoğalmayı uyarması gerekse HMB'nin hücre yıkımını engelleyici etkilerinin birlikteliğinin sonuçlarımızın daha iyi olmasına neden olduğunu düşünmekteyiz. Son yapılan bir çalışmada ratlarda HMB, Gln ve L-Arginin kullanımının RT'ye bağlı mukozit oluşumunu önlemeye olan katkısı araştırılmıştır. Ratlar kontrol, RT grubu, HMB, Gln, L-ARG ve RT ile birlikte HMB, Gln, L-ARG grubu olarak 4 alt gruba ayrılmış, tek başına HMB, Gln, L-ARG alan grupta oral mukoza epitelinde çoğalma olduğu belirlenmiş. RT ile birlikte uygulandığında ise tek başına RT verilen grupta gözlenen subepitelyal ödem, konjesyon, inflamasyon ve epitelyal atrofinin daha az görüldüğü saptanmıştır¹⁸⁹. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde Gln ve HMB kullanımının enterosit hücrelerinin yıkımını azalttığı ve kombine kullanımın daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür.

DNA sentezi ve DNA replikasyonu hücresel çoğalmanın bir göstergesidir. DNA sentezi sırasında BrDU'nun DNA ya bağlanmasından faydalanılarak hücre çoğalmasının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. (³H)-timidin de replike olan hücre DNA'larını belirlemek için sıklıkla kullanılan bir ajandır. Çalışmamızda da enterosit çoğalma indeksi BrDU kullanılarak belirlenmiştir. BrDu ile işaretlenmiş hücre sayısı MTX grubunda en az olarak bulundu. SF ile

Gln grubunda BrDU işaretlenmiş hücre sayısı arasında istatistiksel olarak bir farklılık saptanmadı. Ancak gerek HMB gerekse Gln-HMB grubunda BrDU ile işaretli hücre sayısı belirgin olarak artmış bulundu. En iyi sonuçların ise Gln-HMB grubunda olduğu saptandı. SF grubu ile Gln grubu arasında farklılık olmamasını Gln'in hücre çoğalmasını uyarıcı etkisine bağlamaktayız. HMB grubu Gln grubu ile kıyaslandığında daha çok enterosit çoğalması olduğu saptandı. HMB'nin inflamatuvar sitokinlerin etkilerini azaltmaları dolayısıyla MTX sonrası yıkımın daha az olmuş olması enterosit çoğalmasının daha hızlı ve kolay olmasını sağladığını düşünmekteyiz. Kombine kullanımda ise her iki etkinin aditif olması daha iyi sonuçların alınmasına neden olmuş olabilir.

TAOK açısından değerlendirildiğinde ise; MTX'in karaciğerdeki metabolizması sırasında meydana gelen oksidatif reaksiyonlar toksik yan etkileri ortaya çıkararak hepatotoksisiteye ve kemik iliği, bağırsak gibi hızlı proliferen olan normal dokularda hasara yol açar. MTX'in oluşturduğu karaciğer ve bağırsak hasarında SOR rol oynar. SOR aracılığıyla oluşan lipid peroksidasyonu kendisini dokuda artmış malondialdehit düzeyleri ile gösterir¹⁹⁰. Ayrıca MTX, hücrelerdeki NADPH'ı azaltır. Böylece NADPH'yi kullanarak glutatyonun yükseltgenmiş durumda kalmasını sağlayan glutatyon redüktazı inhibe eder¹⁹¹. Böylece önemli bir sitozolik antioksidan olan glutatyon düzeyi azalır. Serbest radikallerin dokulardaki toksik etkisi hem direk hasar verme yoluyla hem de dokuda lökosit infiltrasyonunda artışa yol açarak meydana gelir. Fagositik hücreler uyarıldıklarında nötrofillerde oksidatif patlamaya yol açarlar. Aktive olmuş nötrofiller de MPO, elastaz, proteaz gibi enzimler salgılayıp SOR oluştururlar¹⁹².

Normal koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı gelişen oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarını sürdürebilmesinde kan çok önemli rol oynamaktadır. Kan, antioksidanların bütün vücuda taşınmasını ve dağıtılmasını sağlar¹⁵².

Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Total antioksidan durumun ölçümü, antioksidanların tek başına

ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir. Plazma ve vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların toplam etkisini TAOK yansıtır. Bu yüzden kanın antioksidan durumunu saptamada bireysel antioksidanlar yerine bunların toplam antioksidan değerini veren TAOK ölçümü giderek yaygınlaşmaktadır^{153,154}.

Bizde bu nedenle çalışmamızda TAOK ölçümünü kullandık. SF grubu en yüksek TAOK değerine sahipken en düşük değer MTX grubunda görüldü. Bu da MTX kullanımı ile birlikte artmış SOR'un olduğunu ve bunun nötralize edilmeye çalışıldığını göstermektedir. MTX ve MTX-Gln grubu karşılaştırıldığında ortalama değerler açısından Gln grubunun daha yüksek TAOK değerine sahip olmasına karşın aralarında istatistiksel olarak sınırda anlamlılık saptandı. Her ne kadar MTX-HMB grubunun TAOK değeri MTX grubundan çok daha yüksek olsa da Gln grubu ile karşılaştırıldığında aralarında sınırda bir istatistiksel anlamsızlık olduğu görüldü. Kombine grupta ise TAOK değeri diğer gruplardan daha yüksek olarak saptandı. İnflamasyonun ve hücre yıkımının azaldığı dolayısıyla serbest radikallerin daha az olduğu kombine grubun TAOK değerinin yüksek olması bu kombinasyonun enterositleri diğer tedavi modalitelerinden daha iyi koruduğunu düşündürmektedir.

Kaspase-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 gen ifadeleri ile apoptoz değerlendirildiğinde; en düşük gen ifadenmesinin SF grubunda en yüksek gen ifadenmesinin ise MTX grubunda olduğu saptandı. MTX-Gln, MTX-HMB, MTX-Gln-HMB gruplarında ise gen ifadenmesinin MTX grubundan daha düşük olduğu belirlendi. Bu sonuçlar başlangıçtaki hipotezimizi desteklemektedir. MTX uygulanmış grupta oldukça yüksek bulunan her üç genin ifadesi bu ajanın (MTX) hem dışarıdan hem içeriden apoptotik uyarıları sağladığını göstermektedir. Daha önce ki yapılan çalışmalarda da MTX'in apoptozu uyardığı gösterilmiş olup bizim çalışmamızda bu sonuçları desteklemektedir^{193,194}.

Koruyucu etki sağladığı düşünülen Gln uygulanmış grup MTX grubu ile kıyaslandığında kaspaz-3 ve -8 gen ifade düzeylerinde MTX grubuna göre düşüş olduğu gözlenirken kaspaz-9 gen ifade düzeyinde MTX'e kıyasla bir miktar artış gözlenmiştir. Diğer bir koruyucu etki sağladığı düşünülen HMB uygulanan grup, MTX grubu ile karşılaştırıldığında kaspaz-3 ve -8 gen ifade düzeylerinde düşüş olduğu benzer şekilde Gln uygulanan gruba göre de düşüş

olduğu saptandı. Kaspaz-9 gen ifadelenmesinin HMB grubunda Gln grubuna göre düşük olduğu ancak MTX grubundan belirgin bir farklılık göstermediği saptanmıştır. MTX-Gln-HMB grubunda ise kaspaz-3, -8 ve -9 gen ifade düzeyleri en düşük düzeyde saptanmıştır. Bu da bu iki ajanın tek başına kullanımına göre daha koruyucu etki sağladığını göstermektedir.

Kemoterapideki antineoplastik ajanların doku ve hücre yıkımları üzerine etkilerini azaltmak için Gln kullanımı ile ilgili çalışmalara rastlansa da enterositler üzerinde HMB'nin koruyucu etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır

185,193

Kaspaz-8 hücre dışındaki uyarılar sonucu aktive olmakta iken kaspaz-3 hücre içi uyarılarla mitokondride aktive olmaktadır. Her ikisi de sonuçta kaspaz-9 aktivasyonunu uyarmaktadır. Bu olaylar sonucunda hücrede apoptoz artış göstermekte ve doku hasarı artmaktadır. Bizim verilerimizde bu akışı destekler niteliktedir. Hücrede apoptozun önlenmesi ya da azaltılması doku hasarını azaltıcı etki göstermektedir. Gln-HMB kombinasyonu enterositlerdeki koruyucu sinerjistik etkiyi artırdığı ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. HMB'nin apoptotik yollarda etkisinin azaltılması doku ve hücre hasarlarının giderilmesinde oldukça koruyucu olduğunu düşündürmektedir.

Literatür bilgilerimiz doğrultusunda, MTX kullanımına bağlı intestinal mukozit gelişiminin önlenmesi amacıyla Gln ile birlikte HMB kullanımına dair bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu konu ile ilgili olarak yapılan ilk çalışma olması nedeniyle araştırmamız orijinal özellik taşımaktadır. Çalışma sonuçlarımız kombine tedavinin gerek Gln gerekse HMB'nin tek başına kullanımından daha iyi sonuçlar verdiğini göstermektedir. Bu güne kadar gerek oral gerekse intestinal mukozit oluşumunun önlenmesi uygulanan çeşitli tedavilere karşın mümkün olmamaktadır. Çalışma verilerinin birbirleriyle çelişebilmesi kesin bir tedavi olmadığını da göstermektedir. Yapılacak klinik çalışmalarla elde ettiğimiz bu verilerin doğrulanması gerektiğini düşünmekteyiz. Başarılı sonuçlar elde edilmesi durumunda oral ve intestinal mukozitin önlenmesinde yeni ufuklar açılacağını ve tedavi stratejilerine olumlu katkılar sağlayacağını söylemek mümkün olabilecektir.

8.SONUÇLAR

Çalışmamızda 50 adet wistar albino cinsi sıçan alındı. MTX verilen sıçanların MTX'i iyi tolere ettiği görüldü. Deneyi sonlandırmayı gerektirecek herhangi bir bulgu yoktu.

1. Grupların günlük tartıları arasında anlamlı fark saptanmadı.
2. Kontrol grubu hariç tüm gruplarda ishal deneyin 3. gününde ortaya çıktı.
3. Gerek Gln, gerek HMB ve gerekse Gln-HMB kombinasyonunun ishal oluşumunu önleyici etkisi tespit edilemedi.
4. Sadece 4.grupta 5.dişi sıçan nedeni bilinmeyen bir şekilde öldü.
5. Sadece kontrol grubunda (SF grubu) düzenli morfolojide yüzey ve kript epiteli ve lamina propriaya sahip villuslar gözlendi.
6. Kript derinliği bakımından MTX alan grubun kript derinliğinin en az olduğu, buna karşın MTX-Gln ve MTX-HMB grubunun kript derinliğinin MTX grubuna kıyasla fazla olduğu ancak aralarında istatistiksel farklılık olmadığı belirlendi. MTX-Gln-HMB grubunun ise kontrol grubuna yakın kript derinliğine sahip olduğu ancak SF grubunun istatistiksel olarak daha iyi kript derinliğine sahip olduğu belirlendi.
7. Park skorlaması açısından MTX grubunun en düşük değere sahip olduğu, MTX-Gln ve MTX-HMB grubu arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı ancak MTX-Gln-HMB grubunun park skorlaması açısından SF grubuna yakın değerlere sahip olduğu ve gerek MTX-Gln gerekse MTX-HMB grubundan istatistiksel olarak daha iyi olduğu saptandı.
8. BrDU ile işaretlenmiş hücre sayısı MTX grubunda en az olarak bulundu. SF ile Gln grubunda BrDU işaretlenmiş hücre sayısı arasında istatistiksel olarak bir farklılık saptanmadı. Ancak gerek HMB gerekse Gln-HMB grubunda BrDU ile

işaretle hücre sayısı belirgin olarak artmış bulundu. En iyi sonuçların ise Gln-HMB grubunda olduğu saptandı.

9. TAOK açısından değerlendirildiğinde ise; SF grubu en yüksek TAOK değerine sahipken en düşük değer MTX grubunda görüldü. MTX ve MTX-Gln grubu karşılaştırıldığında ortalama değerler açısından Gln grubunun daha yüksek TAOK değerine sahip olmasına karşın aralarında istatistiksel olarak sınırda anlamlılık saptandı. Her ne kadar MTX-HMB grubunun TAOK değeri MTX grubundan çok daha yüksek olsa da Gln grubu ile karşılaştırıldığında aralarında sınırda bir istatistiksel anlamsızlık olduğu görüldü. Kombine grupta ise TAOK değeri diğer gruplardan daha yüksek olarak saptandı.

10. Kaspase-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 gen ifadeleri ile apoptoz değerlendirildiğinde; en düşük gen ifadenmesinin SF grubunda en yüksek gen ifadenmesinin ise MTX grubunda olduğu saptandı. MTX-Gln, MTX-HMB, MTX-Gln-HMB gruplarında ise gen ifadenmesinin MTX grubundan daha düşük olduğu belirlendi.

11. Gln uygulanmış grup MTX grubu ile kıyaslandığında kaspaz-3 ve -8 gen ifade düzeylerinde MTX grubuna göre düşüş olduğu gözlenirken kaspaz-9 gen ifade düzeyinde MTX'e kıyasla bir miktar artış gözlenmiştir. Diğer bir koruyucu etki sağladığı düşünülen HMB uygulanan grup, MTX grubu ile karşılaştırıldığında kaspaz-3 ve -8 gen ifade düzeylerinde düşüş olduğu benzer şekilde Gln uygulanan gruba göre de düşüş olduğu saptandı. Kaspaz-9 gen ifadenmesinin HMB grubunda Gln grubuna göre düşük olduğu ancak MTX grubundan belirgin bir farklılık göstermediği saptanmıştır. MTX-Gln-HMB grubunda ise kaspaz-3, -8 ve -9 gen ifade düzeyleri en düşük düzeyde saptanmıştır. Bu da bu iki ajanın tek başına kullanımına göre daha koruyucu etki sağladığını göstermektedir.

9.KAYNAKLAR

- 1- Stiller CA, Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* 2004, 23: 6429-6444
- 2- Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA, Terracini B and Young JL (eds). International incidence of childhood cancer, IARC Scientific Publications No. 87, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1988
- 3- Parkin DM, Kramárová E, Draper GJ et al . International Incidence of Childhood Cancer, IARC Scientific Publications No. 144, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1998
- 4- Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ and Bieber CA, The international incidence of childhood cancer. *Int. J. Cancer* 1998;42: 511- 520
- 5- Ölüm İstatistikleri, İl ve İlçe Merkezlerinde, 2008. T.C. Başbakanlık Türkiye
- 6- Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008 (Globocan, 2008)
- 7- Naidu M, Ramana G, Rani P, Mohan I, Suman A, Roy P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy- induced oral mucositis -- complicating the treatment of cancer. *Neoplasia* 2004;6: 423-431
- 8- Peter CA, Frank MB, Stacey B, Susan MB, General Principles of Chemotherapy In Philip A Pizzo, David G. Poptack (eds) *Principles and Practice of Pediatric Oncology* fifth edition Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2006: 318-322

- 9- Jollivet J, Cowan K, et al. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med.* 1983 ;309:1094-1104
- 10- 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. *Semin Arthritis Rheum.* 1998 ; 27: 277-292
- 11- Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 ;764:217-254
- 12- Flores F, Kerdel FA. Other novel immunosuppressants. *Dermatol Clin.* 2000 ;18:475-483
- 13- Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, et al. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest.* 1985;76:907-912
- 14- Bram J, Allegra CJ, Fine RL, Chabner BA. Effects of methotrexate on intracellular folate pools in purified myeloid precursor cells from normal bone marrow. *J Clin Invest* 1987; 79: 692-697
- 15- Henderson GB, Tsuji JM, Kumar HP. Transport of folate compounds by leukemic cells: evidence for a single influx carrier for methotrexate, 5-methyltetrahydrofolate, and folate in CCRF-CEM human lymphoblasts. *Biochem Pharmacol*; 1987;36: 3007-3014
- 16- Gifford AJ, Kavallaris M, Madafiglio J et al. P-glycoprotein-mediated methotrexate resistance in CCRF-CEM sublines deficient in methotrexate accumulation due to a point mutation in the reduced folate carrier gene. *Int J Cancer*; 1998;78: 176-181
- 17- Henderson GB, Tsuji JM Identification of the bromosulphophthale insensitive efflux route for methotrexate as the site of action of vincristine in the vincristine-

- dependent enhancement of methotrexate uptake in L1210 cells. *Cancer Res*; 1998; 48: 5995-6001
- 18- Pizzorno G, Mini E, Coronello M et al. Impaired polyglutamylation of methotrexate as a cause of resistance in CCRF-CEM cells after short-term, high-dose treatment with this drug. *Cancer Res*; 1998; 48: 2149-2155
- 19-Dicker AP, Waltham MC, Volkenant M et al. Methotrexate resistance in an in vivo mouse tumor due to a non-active-site dihydrofolate reductase mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1993; 90: 11797-11801
- 20-Curt GA, Jolivet J, Carney DN et al. Determinants of the sensitivity of human small-cell lung cancer cell lines to methotrexate. *J Clin Invest*; 1985;76:1323-1329
- 21-Angle - Zahn A. Methotrexate for Use in Pediatric Populations. Second Meeting of the Subcommittee of the Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines Geneva; 2008
- 22- Chu E, Margit M, Elfiky A, et al. Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual. In: Chu E, DeVita V, editors. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett; 2008: 259-264
- 23- Kane D, Gogarty M, O'leary J et al. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis Rheum*. 2004 ;50: 3286-3295
- 24- Logan RM, Stringer AM, Bowen JM et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment –induced alimentary tract mucositis : Pathobiology , animal models and cytotoxic drugs .*Cancer Treat Rev* 2007 ;33 :448-460

- 25- Chládek J, Martínková J, Sispera L. An in vitro study on methotrexate hydroxylation in rat and human liver. *Physiol Res.* 1997;46:371-379
- 26-Kamen BA, Nysten PA, Camitta BM, Bertino JR. Methotrexate accumulation and folate depletion in cell as a possible mechanism of chronic toxicity to the drug. *Br J Haematol.* 1981;49:355-360
- 27-Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum.* 1986 ;29: 832-835
- 28- Kovacs, GT., Paal, C., Somlo, P. et al. Proteinuria due to suboptimal hydration with high-dose methotrexate therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*; 1993; 33: 262-263
- 29-Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M et al. : Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs.* 2005 ;6:187-195
- 30-Jahovic N, Sener G, Cevik H, Ersoy Y, Arbak S, Yegen BC. Amelioration of methotrexate induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct.* 2004 ;22:169-178
- 31- Devrim E, Çetin R, Kılıçoğlu B, Ergüder BI, Avcı A, Durak I. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail.* 2005;27:771-773
- 32- Uz E, Öktem F, Yılmaz HR, Uzar E, Özgüner F. The activities of purine catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem.* 2005 ; 277:165-170

- 33- Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: Pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct.* 1998 ;16:283-293
- 34- Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2004; 39: 1119-1127
- 35- Ross MH, Pawlina W. *Histology a Text and Atlas with correlated cell and molecular biology.* 6th ed. Philadelphia, Lipincott Williams & Wilkins, 2011:569-600
- 36- Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology text & atlas.* 11th ed. McGraw-Hill Companies, 2007: 287-311
- 37- Peterson DE, Kefe DH, Hutchins RD, Scubert MM. Alimentary tract mucositis in cancer patients: Impact of terminology and assessment on research and clinical practice. *Support Care Cancer* 2006;14:499-504
- 38- Köstler WJ, Hejna M, Wenzel C, Zielinski CC. Oral mucositis complicating chemotherapy and radiotherapy :Options for prevention and treatment ,*CA Cancer J Clin* 2001;51:290-315
- 39- Scully C, Sonis S, Diz PD. Mucosal diseases series. Oral Mucositis. *Oral Diseases* 2006;12: 229-241
- 40- Scully C, Epstein J , Sonis S. Oral mucositis : A challenging complication of radiotherapy: Part 1 pathogenesis and prophylaxis of mucositis . *Head Neck* 2003; 25:1057-1070
- 41- Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews* 2004; 4: 277-284

- 42-Nicola P, Romani C, Cupelli L, et al. Mucositis in patients with hematologic malignancies: an overview. *Haematologica* 2007;92:222-231
- 43-D'Hondt L, Lonchay C, Marc A, Jean – Lue C. Oral mucositis induced by anticancer treatments : Physiopathology and treatments. *Ther Clin Risk Manag* 2006;2:159-168
- 44-Barasch A, Coke JM. Cancer therapeutics: an update on its effects on oral health. *Periodontology* 2000;44:44-54
- 45-Brown CG, Wingard J. Clinical consequences of oral mucositis. *Semin Oncol Nurs* 2004;20:16-21
- 46-Scully C, Epstein J , Sonis S. Oral mucositis A challenging complication of radiotherapy , chemotherapy and radiochemotherapy : Part 2,diagnosis and management of mucositis .*Head Neck* 2004; 26:77-84
- 47-Pico JL, Avila-Garavito A , Naccache P. Mucositis : Its occurrence, consequences , and treatment in the oncology setting. *Oncologist* 1998;3: 446-451
- 48-Mansson – Rahemtulla B, Techanitiswad T, et al. Analyses of salivary components in leukemia patients receiving chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:35-46
- 49-Gemmati D, Ongaro A, Tognazzo S, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene variants in adult non Hodgkin's lymphoma patients :association with toxicity and survival .*Haematologica* 2007 :92;478-485
- 50-Woessmann W, Siedemann K, Mann G, et al.The impact of the methotrexate administration Schedule and dose in the treatment of children and adolescents

with B-cell neoplasms; a report of the BFM Group Study NHL-BFM 95 . Blood 2005 ;105:948-958

51-Sonis ST. The biologic role for nuclear factor kappa B in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti neoplastic therapy. Crit Rev Oral Biol Med 2002;13:380-389

52- Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, et al. Is the pathobiology of chemotherapy – induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? Cancer Chemother Pharmacol 2009; 63: 239-251

53-Stokman MA, Spijkervet FKL, Boezen HM, et al. Preventive intervention possibilities in radiotherapy and chemotherapy-induced oral mucositis :Results of meta-analyses. Dent Res 2006; 85: 690-700

54-Keefe DM. Intestinal mucositis: mechanisms and management. Curr Opin Oncol 2007; 19: 323-327

55-Gibson RJ, Keefe DM. Cancer chemotherapy – induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. Support Care Cancer 2006; 14: 890-900

56-Sevinir B. Mukozit . In : Özkan A (eds) Pediatrik Onkoloji ,Nobel matbaacılık,İstanbul . Nobel Tıp Kitabevleri 2009: 1283-1300

57-Stringer A, Gibson R, Bowen J, Logan R, Yeoh A, Keefe D. Chemotherapy-induced mucositis: the role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment. J Support Oncol. 2007;5: 259-267

58-Treister N, Sonis S, Mucositis: biology and management. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2007; 15: 123-129

- 59-Cancer Therapy Evaluation Program, National Cancer Institute, Common Toxicity Criteria. Version 2.0. Bethesda: National Cancer Institute, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 1999
- 60- Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M. Mucositis Study Section of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer; International Society for Oral Oncology. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 2004; 100: 1995-2025
- 61- Elting L, Cooksley C, Chambers M, Cantor S, Manzullo E, Rubenstein E. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. *Cancer*. 2003; 98: 1531-1539
- 62- Avritscher E, Cooksley C, Elting L. Scope and epidemiology of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Semin Oncol Nurs*. 2004; 20: 3-10
- 63-Barash A, Elad S, Altman A, et al. Antimicrobials, mucosal coating agents, anesthetics , analgesics, and nutritional supplements for alimentary tract mucositis *Support Care Cancer* 2006;14:528-532
- 64-De Koning BA, Philipsen-Geerling B, Hoijer M, et al. Protection cancer patients: Results from a randomized cross-over study. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 532-539
- 65-Harris DJ, Eilers J, Harriman A, et al. Putting evidence into practice. Evidence-based interventions for the management of oral mucositis. *Clin J Oncol Nurs* 2008; 12: 141-152

- 66-Brennan MT, von Bültzingslöwen I, Schubert MM, Keefe D. Alimentary mucositis: putting the guidelines into practice. *Support Care Cancer* 2006;14: 573-579
- 67-Worthington HV, Clarkson JE, Bryan G et al. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Apr 13;(4): CD000978
- 68-Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, et al. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer* 2007;109: 820-831
- 69-Peterson DE, Bensadoun J, Rolla F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Recommendations. *Ann Oncol* 2008;19: 4122-4125
- 70-Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, et al. Clinical Practice Guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer* 2004;100:2026-2046
- 71-Eren M, Akyüz C, Yalçın B ve ark. Çocukluk çağı kanserlerinde kemoterapi ile ilişkili mukozit tedavisinde granülosit makrofaj koloni stimulan faktörün ağız bakımındaki yeri. *Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi* 2007;17: 70-77
- 72-Blijlevens N, Sonis S. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy-and radiotherapy-induced mucositis. *Annals Oncol* 2007;18: 817-826
- 73-Stiff PJ, Emmanouilides C, Bensinger WI, et al. Palifermin reduces patient-reported mouth and throat soreness and improves patient functioning in the hematopoietic stem-cell transplantation setting. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5185-5193

- 74-Taniguchi F, Harada T, Sakamoto Y, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase-10 promotes cell proliferation in human endometrial carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 773-780
- 75-Eilers J, Million R, Prevention and management of oral mucositis in patients with cancer, *Semin Oncol Nurs* 2007;23:201-212
- 76-Migliorati CA, Oberle-Edwards L, Schubert M. The role of alternative and natural agents, cryotherapy, and/or laser for management of alimentary mucositis. *Support Care Cancer* 2006;14: 533-540
- 77-Genot-Klastersky MT, Klastersky J, Awada F, et al. The use of low-energy laser (LeL) for the prevention of chemotherapy-and/or radiotherapy-induced oral mucositis in cancer patients: results from two prospective studies. *Support Care Cancer* 2008; 16: 1381-1387
- 78-Cruz LB, Ribeiro AS, Rech A, et al. Influence of low-energy laser in the prevention of oral mucositis in children with cancer receiving chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer*.2007; 48: 435-40
- 79-Motallebnejad M , Arkam S, Moghadamnia A, et al. The effect of topical application of pure honey on radiation induced mucositis: a randomised clinical trial. *J Contemp Dent Pract* 2008; 9: 40-47
- 80-Southcott E, Tooley KL, Howarth GS, et al. Yoghurts containing probiotics reduce disruption of small intestinal barrier in methotrexate-treated rats. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1837-1841
- 81-Pari L, Tewas D, Eckel J. Role of curcumin in health and disease. *Arch Physiol Biochem* 2008; 114: 127-149
- 82-Miller AL, Therapeutic Considerations of L-Glutamine : A Review of the Literature *Altren Med Rev* 1999; 4: 239-248

83- <http://www.wikipedia.org> L-glutamine-skeletal.png Erişim tarihi: 01.09.2012

84-Melis GC, ter Wengel N, Boelens PG, van Leeuwen PA. Glutamine: recent developments in research on the clinical significance of glutamine. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2004; 7: 59–70

85-Coeffier M, Dechelotte P. The role of glutamine in intensive care unit patients: mechanisms of action and clinical outcome. *Nutr. Rev.* 2005 : 63, 65–69

86-Wilmore DW. The effect of glutamine supplementantation in patients following elective surgery and accidental injury, *J Nutr* 2001; 131: 2543-2549

87-Dudrick PS, Souba WW. Aminoacids in surgical nutrition. Principles and practice. *Surg clin North Am* 1991; 71: 459-477

88-Ko TC, Beauchamp RD, Townsend CM Jr, et al. Glutamine is essential for epidermal growth factor-stimulated intestinal cell proliferation. *Surgery* 1993;114:147–153

89- Scheppach W, Loges C, Bartram P, et al. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. *Gastroenterology* 1994; 107: 429–434

90-Bach SP, Renehan AG and Potten CS. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 469–476

91- Musch MW, Ciancio MJ, Sarge K, et al. Induction of heat shock protein 70 protects intestinal epithelial IEC-18 cells from oxidant and thermal injury. *Am J Physiol* 1996;270:429–436

- 92- Wischmeyer PE, Musch MW, Madonna MB, et al. Glutamine protects intestinal epithelial cells: role of inducible HSP70. *Am J Physiol* 1997;272:879–884
- 93- Wischmeyer PE Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition* 2002 ;18, 225–228
- 94-Chang WK, Yang KD, Chuang H, Jan JT, Shaio MF. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by upregulating glutathione and Bcl-2 levels. *Clin. Immunol.* 2002; 104, 151–160
- 95- Mates JM, Perez GC, Nunez de Castro L, Asenjo M, Marquez J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002;34, 439–458
- 96-Roth E, Oehler R, Manhart N et al. Regulative potential of glutamine—relation to glutathione metabolism. *Nutrition* 2002; 18: 217–221
- 97-Evans ME, Jones DP, Ziegler TR. Glutamine prevents cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells. *J. Nutr.* 2003; 133 : 3065-3071
- 98-Papaconstantinou HT, Chung DH, Zhang W, et al. Prevention of mucosal atrophy: role of glutamine and caspases in apoptosis in intestinal epithelial cells. *J. Gastrointest. Surg.* 2000; 4: 416–423
- 99- dos Santos RG, Viana ML, Generoso SV, Arantes RE, Davisson Correia MI, Cardoso VN. Glutamine supplementation decreases intestinal permeability and preserves gut mucosa integrity in an experimental mouse model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2010; 34: 408-413
- 100-Li Y, Chen Y, Zhang J. Protective effect of glutamine-enriched early enteral nutrition on intestinal mucosal barrier injury after liver transplantation in rats. *Am J Surg.* 2010; 199: 35-42

- 101-Hong RW, Rounds DJ, Helton WS, Robinson MK, Wilmore DW. Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. *Ann Surg* 1992; 21: 114-119
- 102-Souba WW, Smith R, Wilmore D. Glutamine metabolism by the intestinal tract. *JPEN* 1985; 9: 608-619
- 103-Alonso PL, Fernández VA, Valero Z MA, Gomis MP, León SM, Herreros de TA. Parenteral nutrition supplemented with glutamine in patients undergoing bone marrow transplantation. *Nutr Hosp* 2010; 25: 49-52
- 104-Sukhotnik I, Mogilner JG, Karry R et al. Effect of oral glutamine on enterocyte turnover during methotrexate-induced mucositis in rats. *Digestion* 2009; 79: 5-13
- 105-Membrive CI, Reig CA, Rodríguez de DN et al. Prevention of acute radiation enteritis: efficacy and tolerance of glutamine. *Clin Transl Oncol* 2011; 13: 760-763
- 106-Li P, Yin YL, Li D, Kim SW, Wu G. Amino acids and immune function. *Br J Nutr*. 2007; 98: 237-252
- 107-Zhang Z, Rathmacher J, Coates C, Nissen S. Occurrence of β -hydroxy- β -methylbutyrate in foods and feeds. *FASEB J*. 1994;8: A464 Abstract 2685
- 108-Wilson GJ, Wilson JM, Manninen AH. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of age, sex, and training experience: a review. *Nutr Metab*. 2008; 5: 1-17

- 109-Vukovich MD, Stubbs NB, Bohlken RM. Body composition in 70-year old adults responds to dietary β -hydroxy- β -methylbutyrate similarly to that of young adults. *J Nutr.* 2001;131: 2049-2052
- 110-Flakoll P, Sharp R, Baier S, Levenhagen D, Carr C, Nissen S. Effect of β -hydroxy- β methylbutyrate, arginine, and lysine supplementation on strength, functionality, body composition, and protein metabolism in elderly women. *Nutrition.* 2004; 20: 445-451
- 111-Clark RH, Feleke G, Din M, et al. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using β -hydroxy β -methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomised, double-blind, placebo controlled study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2000; 24:133-139
- 112- May PE, Barber A, D'Olimpio JT, Hourihane A, Abumrad NN. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of β -hydroxy- β -methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am J Surg.* 2002;183:471-479
- 113-Pirlich M, Schütz T, Kemps M, et al. Social risk factors for hospital malnutrition. *Nutrition.* 2005; 21: 295-300
- 114-Forster S, Gariballa S. Age as a determinant of nutritional status: a cross sectional study. *Nutr J.* 2005; 28: 1-5
- 115-Guigoz Y, Lauque S, Vellas BJ. Identifying the elderly at risk for malnutrition: the Mini Nutritional Assessment. *Clin Geriatr Med.* 2002;18: 737-757
- 116-Roubenoff R. Sarcopenia: effects on body composition and function. *J Gerontol.* 2003;58A:1012-1017
- 117-Demling RH. Nutrition, anabolism, and the wound healing process: an overview. *Eplasty.* 2009; 9: 65-94.

- 118- Kuhls DA, Rathmacher JA, Musngi D et al. β -hydroxy- β -methylbutyrate supplementation in critically ill trauma patients. *J Trauma*. 2007; 62:125-132
- 119- Hsieh LC, Chien SL, Huang MS, Tseng HF, Chang CK. Anti-inflammatory and anticatabolic effects of short-term β -hydroxy- β -methylbutyrate supplementation on chronic obstructive pulmonary disease patients in intensive care unit. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2006; 15: 544-550
- 120- Nissen SL, Abumrad NN. Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB). *J Nutr Biochem*. 1997; 8: 300-311
- 121- Williams JZ, Barbul A. Nutrition and wound healing. *Surg Clin North Am*. 2003;83: 571-596
- 122- May ME, Buse MG. Effects of branched-chain amino acids on protein turnover. *Diabetes Metab Rev*. 1989; 5: 227-245
- 123- Alon T, Bagchi D, Preuss HG. Supplementing with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) to build and maintain muscle mass: a review. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2002;111:139-152
- 124- Nissen S, Sharp R, Ray M, et al. Effect of leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J Appl Physiol*. 1996; 81: 2095-2104
- 125- Smith HJ, Mukerji P, Tisdale MJ. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by β -hydroxy- β -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res*. 2005; 65: 277-283
- 126- Smith HJ, Wyke SM, Tisdale MJ. Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by β -hydroxy- β -methylbutyrate. *Cancer Res*. 2004; 64: 8731-8735

- 127- Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Attenuation of depression of muscle protein synthesis induced by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and angiotensin II by β -hydroxy- β -methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295: 1409-1416
- 128- Yeh SS, Blackwood K, Schuster MW. The cytokine basis of cachexia and its treatment: are they ready for prime time? *J Am Med Dir Assoc.* 2008; 9: 219-236
- 129- Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor- α and angiotensin II by β -hydroxy- β -methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295: 1417-1426
- 130- Eley HL, Russell ST, Baxter JH, Mukerji P, Tisdale MJ. Signaling pathways initiated by β -hydroxy- β -methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293: 923-931
- 131- Manzano M, Giron MD, Salto R, Sevillano N, Rueda R, Lopez-Pedrosa JM. Is β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) the bioactive metabolite of L-leucine (LEU) in muscle? Molecular evidence and potential implications. Abstract presented at: European Society for Clinical Nutrition and Metabolism 31st Congress; Vienna, Austria; 2009. Abstract P267
- 132- Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4: 335-348
- 133- Kornasio R, Riederer I, Butler-Browne G, Mouly V, Uni Z, Halevy O. β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell proliferation, differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793:755-763

- 134-Bales CW, Ritchie CS. Sarcopenia, weight loss, and nutritional frailty in the elderly. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22: 309-323
- 135-Paddon-Jones D, Short KR, Campbell WW, Volpi E, Wolfe RR. Role of dietary protein in the sarcopenia of aging. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(suppl):1562-1566
- 136-Williams JZ, Abumrad N, Barbul A. Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. *Ann Surg.* 2002; 236: 369-375
- 137-Data on file, Abbott Nutrition
- 138-Nissen S, Sharp RL, Panton L, Vukovich M, Trappe S, Fuller JC Jr. β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. *J Nutr.* 2000; 130: 1937-1945
- 139-Rathmacher JA, Nissen S, Panton L, et al. Supplementation with a combination of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB), arginine, and glutamine is safe and could improve hematological parameters. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2004; 28: 65-75
- 140-Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997;3-4:92-95
- 141-Baykal Y, Gök F, Erikçi S. Demir, serbest radikaller ve oksidatif hasar. *Sendrom* 2002; 14: 94-100
- 142-Bayir H, Kagan VE, Tyurina YY et al. Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatric Research* 2002; 51: 571-578
- 143-Cirak B, Inci S, Palaoglu S, et al. Lipid peroxidation in cerebral tumors. *Clinica Chimica Acta* 2003; 327: 103-107

- 144-Minnet C. Çocukluk çağında B12 vitamin eksikliğinin oksidan-antioksidan sistem ve DNA hasarı ile ilişkisi. Uzmanlık tezi, 2006
- 145-Floyd RA, Davies KJA. Ed. DNA damage and repair in —Oxidative Damage and Repair: London: Pergamon Press; 1992
- 146-Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33: 110-118
- 147-Jensen SJK, Oxidative stress and free radicals. Journal of Molecular Structure (Theochem), 2003; 666: 387-392
- 148-Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya; Mimoza yayınları,1995, 3-24
- 149-Cross CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med 1987; 107: 526 – 545
- 150-Aliyev V. Sigara içenlerde oksidatif stres göstergelerinin değerlendirilmesi Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi,2006
- 151-Shoji H, Yamashiro Y, Koletzko B. Oxidative stress and antioxidants in the perinatal period: Packer L, Sies H editors. Oxidative stress and inflammatory mechanisms in obesity, diabetes, and the metabolic syndrome. Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2002; 71-92
- 152-Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, van Kamen DP: Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. Schizophr Res 1998; 32: 1-8

- 153-Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1106-1114
- 154-Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37: 112-119
- 155-Degterev A, Yuan J : Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 2008; 9 :378-390
- 156- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516
- 157-Vaux DL, Korsmeyer SJ: Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245—254
- 158-Kroemer G, Levine B : Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 9: 1004-1010
- 159-Khan AR, James MN. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* 1998; 7: 815–836
- 160-Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003;15: 725–731
- 161-Crawford EF, Wells JA. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 1055-1087
- 162-Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 17907–17911

- 163-Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenameele P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ.* 2002; 9: 358–361
- 164-Feinstein-Rotkopf Y, Arama E. Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes. *Apoptosis* 2009; 14: 980–995
- 165-Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004; 117: 561–574
- 166-Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516
- 167-Suda T, Nagata S. Purification and characterisation of the Fas ligand that induces Apoptosis. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 873-879
- 168-Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 821-831
- 169-Taha TA, Mullen TD, Obeid LM. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1758 :2027-2036
- 170-Ow YP , Green RD, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 9 :532-542
- 171-Xu C, Bailly MB, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115: 2656-2664
- 172-Demaurex N, Distelhorst C. Apoptosis-the calcium connection. *Science* 2003; 300: 65-67

- 173-Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 9 : 231-241
- 174-Park PO, Haglund U, Bulkley GB, et al. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990;107:574–580
- 175-Howarth GS, Geoffrey L, Cool JC, Xu X, Byard RW, Read LC. Milk Growth Factors Enriched from Cheese Whey Ameliorate Intestinal Damage by Methotrexate When Administered Orally to Rats. *Human and Clinical Nutrition* 1996; 126: 2519-2530
- 176-Taminiau JA, Gall DG, Hamilton JR. Response of the rat small-intestine epithelium to methotrexate. *Gut* 1980; 21: 486-492
- 177-Gibson RJ, Keefe DM, Thompson FM, Clarke JM, Goland GJ, Cummins AG. Effect of interleukin-11 on ameliorating intestinal damage after methotrexate treatment of breast cancer in rats. *Dig Dis Sci.* 2002; 47: 2751–2757
- 178-Gulgun M, Erdem O, Oztas E, et al. Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62: 109-115
- 179-Gulgun M, Karaoglu A, Kesik V, et al. Effect of proanthocyanidin, arginine and glutamine supplementation on methotrexate-induced gastrointestinal toxicity in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2010;32: 657-661
- 180-Noé JE. L-Glutamine use in the treatment and prevention of mucositis and cachexia: a naturopathic perspective. *Integr Cancer Ther.* 2009 8:409–415
- 181- Gaurav K, Goel RK, Shukla M, Pandey M. Glutamine: A novel approach to chemotherapy-induced toxicity. *Indian J Med PaediatrOncol.* 2012; 33: 13-20

- 182-Kang YJ, Feng Y, Hatcher EL. Glutathione stimulates A549 cell proliferation in glutamine-deficient culture: The effect of glutamine supplementation. *J Cell Physiol* 1994;161:589-596
- 183-Bartlett DL, Charland S, Torosian MH. Effect of glutamine on tumor and host growth. *Ann Surg Oncol* 1995;2:71-76
- 184-Fahr MJ, Kornbluth J, Blossom S, Schaeffer R, Klimberg VS. Glutamine enhances immunoregulation of tumor growth. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1994;18:471-476
- 185-Fox AD, Kripke SA, De Paula J, Berman JM, Settle RG, Rombeau JL. Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1988;12:325-331
- 186-Erbil Y, Oztezcan S, Giriş M, Barbaros U, Olgaç V, Bilge H, Küçüçük H, Toker G. The effect of glutamine on radiation-induced organ damage. *Life Sci*. 2005;78:376-382
- 187-Williams JZ, Abumrad N, Barbul A. Effect of a Specialized Amino Acid Mixture on Human Collagen Deposition. *Ann Surg* 2002;236:369-374
- 188-Peterson A., et al., In vitro exposure with [beta]-hydroxy-[beta]-methylbutyrate enhances chicken macrophage growth and function. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 67:67-78
- 189-Yavas C, Yavas G, Acar H, et al. Amelioration of radiation-induced acute inflammation and mucosal atrophy by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, L-glutamine, and L-arginine: results of an experimental study. *Support Care Cancer* 2013;21:883-888

- 190-Cetiner M, Sener G, Sehirli AO, Eksioglu-Demiralp E, Ercan F, Sirvanci S, et al. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;209:39-50
- 191-Caetano NN, Campello AP, Carnieri EG, Kluppel ML, Oliveira MB. Effect of methotrexate (MTX) on NAD(P)⁺ dehydrogenases of HeLa cells: malic enzyme, 2-oxoglutarate and isocitrate dehydrogenases. *Cell Biochem Funct* 1997;15:259-264
- 192-Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2000;67:591-602
- 193-Sukhotnik I, Shehadeh N, Coran AG, et al. Oral insulin enhances cell proliferation and decreases enterocyte apoptosis during methotrexate-induced mucositis in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;47:115-122
- 194-Sukhotnik I, Shteinberg D, Ben Lulu S, et al. Effect of transforming growth factor-alpha on enterocyte apoptosis is correlated with EGF receptor expression along the villus-crypt axis during methotrexate-induced intestinal mucositis in a rat. *Apoptosis* 2008;13:1344-1355

10. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
Amfoterisin B	PTA
ABTS	2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)
ATP	Adenozin trifosfat
AİF	Apopitoz indükleyici faktör
APAF	Apopitotik proteaz aktive eden faktör
ARG	Arginin
5-FU	5-flourasil
β	Beta
BUN	Kan üre azotu
c-DNA	Komplementer DNA
Caspase (kaspaz)	Cysteine depended Aspartate specific prateases
CARDS	Kaspaz aktive edici toplayıcı alan
DED	Ölümü etkileyen alan
DHF	Dihidrofolat
DHFR	Dihidrofolat redüktaz
DNA	Deoksiribonükleikasit
EGF- β	Epidermal Growth Faktör Beta
ER	Endoplazmik retikulum
g	Gravite
γ	Gamma
Gy	Gray
G-CSF	Granulosit koloni uyarıcı faktör
GM-CSF	Granulosit Makrofaj koloni uyarıcı faktör
GSH	İndirgenmiş glutatyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HMG-KoA	β -Hidroksi- β -metilglutaril koenzim A
HOCl	Hipoklorid
H ₂ O ⁻	Perhidroksil iyonu
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL	İnterlökin
IL-1 β	İnterlökin-1Beta
INF- α	İnterferon alfa
INF- γ	İnterferon-gamma
İAP	İnhibitör apopitoz proteinleri
KDA	Kilodalton
KGF	Keratinosit büyüme faktörü
KİK	α -ketoisokaproat
KT	Kemoterapi
M	Molar
MAPKA	Mitojen etkinleştirilmiş protein kinaz
MDA	Malondialdehid
mg	Miligram
μ L	Mikrolitre
ml	Mililitre

MPO	Myeloperoksidaz
mTOR	Mammalian target of rapamisin
MTHF	Metilen tetrahidrofolat
MTHF	Metilen tetrahidrofolat redüktaz
MTX	Metotreksat
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF- κ B	Nüklear faktör kappa B
NRF-2	Nüklear Respiratory Factor 2
OH	Hidroksil
O ₂ -	Süperoksit
O ₂	Singlet oksijen
PIF	Proteoliz ilişkili faktör
PTFE	Politetrafloroetilen
RCOO-	Organik peroksit radikali
RNA	Ribonükleikasit
RO-	Alkoksil radikali
ROO-	Peroksil radikali
RT	Radyoterapi
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri
TAOK	Total antioksidan kapasite
TGF- α	Transforming Growth Faktör alfa
THF	Tetra hidrofolat
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alfa
YVK	Yağsız vücut kitlesi

11.ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1-Metotreksatın yapısal formülü	11
Şekil 2-Folik asit yapısal formülü	12
Şekil 3-Folik asit metabolizması	14
Şekil 4-Glutaminin kimyasal formülü	41
Şekil 5-HMB nin kimyasal yapısı	45
Şekil 6-HMB metabolizması	46
Şekil 7- Apoptozda Görev Alan Kaspazların Ait Oldukları Gruplar ve Yapıları	61
Şekil 8-Total RNA sentez basamakları	72
Şekil 9-c-DNA protokolü	74
Şekil 10-Taqman prob yöntemi	78
Şekil 11-Kaspaz 3 gen ifadelerinin gruplar arasında karşılaştırılması	90
Şekil 12- Kaspaz 8 gen ifadelerinin gruplar arasında karşılaştırılması	91
Şekil 13- Kaspaz 9 gen ifadelerinin gruplar arasında karşılaştırılması	92

12. RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1-DHTR'nin bağlanma bölgesi	13
Resim 2-Mukozit başlangıç ve hasara yanıt mesaj oluşması evresi	34
Resim 3-Haberci sinyallerinin çoğalması	35
Resim 4-Ülserleşme	36
Resim 5-Apoptozis hücre döngüsü	54
Resim 6-Kaspazın 2 küçük 2 büyük alt ünitelerden oluşan tetramerik yapısı	59
Resim 7-Apoptozis yolları	65
Resim8-Dekapitasyon sonrası intestinal dokuların çıkarılması ve kan örneği alınması	67
Resim 8A: Normal intestinal doku görünümü	67
Resim 8B: Konjesyone, ödemli bağırsak duvarı	67
Resim 9-MagNA Lyser Homojenizatör cihazı	70
Resim 10-Lightcycler 480 Real-Time PCR cihazı	71

Resim 11-Kript derinliği	83
Resim 11 A : SF grubu kript derinliği	83
Resim 11 B : MTX grubu kript derinliği	83
Resim 11 C : MTX+Gln grubu kript derinliği	83
Resim 11 D : MTX+HMB grubu kript derinliği	83
Resim 11 E : MTX+HMB+Gln grubu kript derinliği	83
Resim 12-BrDU görüntüleri	85
Resim 12A: SF grubu BrDU görüntüsü	85
Resim 12B : MTX grubu BrDU görüntüsü	85
Resim 12C : MTX+Gln grubu BrDU görüntüsü	85
Resim 12D: MTX+HMB grubu BrDU görüntüsü	85
Resim 12E: MTX+Gln+HMB grubu BrDU görüntüsü	85
Resim 13-Kaspaz-3 görüntüleri	87
Resim 13A: SF grubu Kaspaz 3 görüntüsü	87
Resim 13B: MTX grubu Kaspaz 3 görüntüsü	87
Resim 13C: MTX+Gln grubu Kaspaz 3 görüntüsü	87
Resim13D: MTX+HMB grubu Kaspaz3 görüntüsü	87
Resim 13E: MTX+Gln+HMB grubu Kaspaz 3 görüntüsü	87
Resim 14- Elektron mikroskopi görüntüleri	88
Resim 14A: SF grubu elektron mikroskopi görüntüsü	88
Resim 14B: MTX grubu elektron mikroskopi görüntüsü	88
Resim 14C: MTX+Gln grubu elektron mikroskopi görüntüsü	88
Resim14D: MTX+HMB grubu elektronmikroskopigrnts	88
Resim 14E: MTX+Gln+HMB grubu elektron mikroskopi görüntüsü	88

13. TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1-Türkiye’de 1-14 yaş grubu çocuklarda ölüm nedenleri	9
Tablo 2- Mukozite neden olan kemoterapotik ilaçlar	27
Tablo 3-Mukozit evrelemesi	30
Tablo 4- Radyasyona Bağlı Olmayan Mukozit için Ulusal Kanser Enstitüsü’nun Genel Toksikite Kriterleri-1	31
Tablo 5- Radyasyona Bağlı Olmayan Mukozit için Ulusal Kanser Enstitüsü’nun Genel Toksikite Kriterleri-2	32
Tablo 6- TAOK’ u oluşturan moleküller	53
Tablo 7-Apoptoz ve Nekrozla ölüm arasındaki temel farklar	56
Tablo 8-Apoptozda Görev Alan Kaspazlar ve Fonksiyonları	60
Tablo 9-Kaspaz 3-8-9 genleri için Real Time PCR amplifikasyon protokolü	76
Tablo 10-Deney hayvanlarının günlere göre ağırlık ortalamaları	81
Tablo 11-Deney gruplarının kript derinliği ortalamaları	82
Tablo 12-Deney gruplarının kript derinliği bakımından karşılaştırılması (p değeri)	82
Tablo 13-Deney gruplarının PARK skorlaması ortalamaları	83

Tablo 14- Deney gruplarının PARK skorlaması bakımından karşılaştırılması (p değeri)	84
Tablo 15-Deney gruplarının BrDU pozitif hücre sayımlarının ortalaması	84
Tablo 16- Deney gruplarının BrDU pozitif hücre sayısı bakımından karşılaştırılması (p değeri)	85
Tablo 17-Deney gruplarında kaspaz-3 pozitif, kaspaz -3 negatif hücre sayımları ve kaspaz 3 pozitif hücre yüzdelerinin ortalaması	86
Tablo 18-Deney gruplarının kaspaz 3 pozitif hücre yüzdelerinin karşılaştırılması (p değeri)	86
Tablo 19-Deney gruplarının Total antioksidan kapasite ortalaması	89
Tablo 20-Deney gruplarının Total antioksidan kapasite bakımından karşılaştırılması (p değeri)	89