

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE METOTREKSATLA İNDÜKLENEN OKSİDATİF
STRESS ÜZERİNE APİGENİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

Ecz. Yeliz AKYOL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Fatma KOCASARI

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0532-YL-18 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2020

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

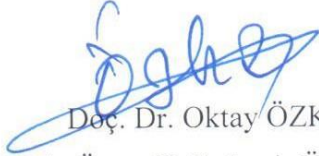
Yeliz AKYOL tarafından *Doç. Dr. Fatma KOCASARI* yönetiminde hazırlanan "*Farelerde metotreksatla indüklenen oksidatif stress üzerine apigeninin koruyucu etkisi*" başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20.01.2020



Prof. Dr. Asım KART

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji AD
Başkan



Doç. Dr. Oktay ÖZKAN

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji AD

Jüri



Doç. Dr. Fatma KOCASARI

Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji AD

Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu 28/01/2020 Tarih ve 09 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa Doğa TEMİZSOYLU



Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve hayatımda önemli bir iz bırakan kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Fatma KOCASARI'ya, değerli bilgi, tecrübe ve destekleri için, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam Prof. Dr. Asım KART'a, Dr.Şükrü KOCASARI'ya, yardım ve destekleri ile çalışmamıza yön veren Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özlem Özmen'e, tez çalışmam süresince sıcaklığı, samimiyeti, özverisi, bilgisi ve zamanını benden esirgemeyen Arş. Gör. Selinay Başak ERDEMLİ KÖSE'ye ve Simge GARLI'ya, yüksek lisans arkadaşlarım Merve TAŞBAŞ'a, Rıza YALÇIN'a, deneysel aşamalarda yardımları için Zeki EROL'a, çok sevgili iş arkadaşlarıma, beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen annem ve babama, bu hayattaki en büyük mucizelerim ve öğretmenlerim olan, bana anne olmayı, sevmeyi, sevilmeyi öğreten canım oğullarım Ada ve Eymen'e, varlığıyla yaşamımı anlamlı ve değerli kılan, desteğiyle, sevgisiyle bana güç veren, sevgili ruh eşim Hilmi AKYOL'a sonsuz teşekkür ediyorum.

ETİK BEYAN

“*Farelerde metotreksatla indüklenen oksidatif stress üzerine apigeninin koruyucu etkisi*” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Fatma KOCASARI danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığımı beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Yeliz AKYOL

Tarih: 20.01.2020

İmza:



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	<i>i</i>
KABUL VE ONAY	<i>ii</i>
TEŞEKKÜR	<i>iii</i>
ETİK BEYAN	<i>iv</i>
İÇİNDEKİLER	<i>v</i>
ŞEKİLLER	<i>vii</i>
TABLolar	<i>viii</i>
SİMGELER ve KISALTMALAR	<i>ix</i>
TÜRKÇE ÖZET	<i>xi</i>
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	<i>xii</i>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Flavonoidler ve Flavonlar	3
2.1.1. Apigenin (Apig)	4
2.1.1.1. Apigeninin Farmakokinetiği	6
2.1.1.2. Farmakolojik Etkileri	7
2.1.1.2.1. Yangı Önleyici ve Antioksidan Etkileri	8
2.1.1.2.2. Diğer Etkileri	11
2.2. Metotreksat (MTX)	13
2.2.1. Toksisitesi	15
2.2.1.1. Karaciğer ve Böbrek Üzerinde Toksik Etkisi	16
2.3. Serbest Radikaller	19
2.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	21
2.3.2. Singlet Oksijen (1O_2)	22
2.3.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	22
2.3.4. Peroksil Radikali (ROO^{\cdot})	23
2.3.5. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})	23
2.4. Oksidatif Stres	24
2.5. Antioksidan Enzimler/ Sistemler	26
2.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	27
2.5.2. Katalaz (CAT)	27

2.5.3. <i>Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)</i>	28
2.5.4. <i>Glutasyon (GSH)</i>	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. Hayvan Materyali	29
3.1.2. Kimyasal Maddeler	29
3.1.3. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri	30
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Etik	30
3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü	31
3.2.3. Örneklerin Toplanması	31
3.2.4. Kan ve Doku Analizleri	32
3.2.4.1. Eritrositlerin Yıkılması ve Hemolizatın Hazırlanması	32
3.2.4.2. Dokuların Homojenizasyonu ve Homojenatın Hazırlanması	32
3.2.4.3. <i>Süperoksit Dismutaz 1 (SOD1) Analizi</i>	32
3.2.4.4. <i>Katalaz (CAT) Analizi</i>	33
3.2.4.5. <i>Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizi</i>	33
3.2.4.6. <i>Glutasyon (GSH) Analizi</i>	34
3.2.4.7. <i>Malondialdehit Analizi</i>	34
3.2.4.8. <i>Dokularda Total Protein</i>	35
3.2.4.9. <i>Histopatoloji Yöntemi</i>	35
3.2.5. İstatistiksel Hesaplamalar	35
4. BULGULAR	36
4.1. Biyokimyasal Parametreler	36
4.2. Antioksidan-Oksidatif Stres Parametreleri	36
4.3. Histopatolojik Bulgular	38
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	67

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Flavonoidlerin genel yapısı	3
Şekil 2.2.	Flavonoidlerin sınıflandırılması	4
Şekil 2.3.	Apigeninin kimyasal yapısı ve doğal kaynakları	5
Şekil 2.4.	Apigeninin emilimi, dağılımı ve atılımı	6
Şekil 2.5.	Apigeninin farmakolojik etkileri	8
Şekil 2.6.	Apigeninin yangı önleyici etkisi	9
Şekil 2.7.	Metotreksatın kimyasal formülü	13
Şekil 2.8.	Metotreksatın etki şekli	15
Şekil 4.1.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait histopatolojik görünümler	38
Şekil 4.2.	Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait histopatolojik görünümler	39

TABLÖLAR

Tablo 2.1.	Önemli serbest radikaller	21
Tablo 3.1.	Araştırma gruplarına verilen maddeler ve verildiği günler	31
Tablo 4.1.	Araştırma gruplarının serum AST, ALT ve kreatinin düzeyleri	36
Tablo 4.2.	Araştırma gruplarının kan SOD1, CAT ve GSH-Px enzim etkinlikleri ile GSH ve MDA düzeyleri	36
Tablo 4.3.	Araştırma gruplarının karaciğer SOD1, CAT ve GSH-Px enzim etkinlikleri ile GSH ve MDA düzeyleri	37
Tablo 4.4.	Araştırma gruplarının böbrek SOD1, CAT ve GSH-Px enzim etkinlikleri ile GSH ve MDA düzeyleri	37

SİMGELER ve KISALTMALAR

5,10-MTHF	5,10-metilentetrahidrofolat
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid transformilaz
AICART'az	AICAR transformilaz
AkE	Asetil kolin esteraz
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AP-1	Aktivatör protein-1
Apig	Apigenin
AST	Aspartat aminotransferaz
CAT	Katalaz
COX	Siklooksijenaz
DAMPA	2,4-diamino-N ¹⁰ -metilpteroik asit
DHF	Dihidrofolat
DHFR	Dihidrofolat redüktaz
DMSO	Dimetilsülfoksit
DTNB	Ditiyobisnitrobenzoik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
ERK	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen protein kinaz
FAICAR	Formil-AICAR
FPGS	Folilpoliglutamat sentetaz
G-6-Paz	Glukoz-6-fosfataz
GABA	Gama-aminobutirik asit
GCL	Glutamat sistein ligaz
GLUT	Glukoz taşıyıcı
GSH-R	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Glutasyon disülfid
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HIF-1α	Hipoksiyle indüklenen faktör-1 alfa
HO-1	Hem oksijenaz-1
IL	İnterlökin
INF-γ	İnterferon
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
KO	Ksantin oksidaz
LOX	Lipooksijenaz
LPO	Lipit peroksidasyonu
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojen etkinleştirilen protein kinaz
MCP	Monosit kemotaktik protein
MDA	Malondialdehit
MIP	Monosit yangısal proteini
MTHFR	Metilentetrahidrofolat redüktaz

MTX	Metotreksat
MTXglu	Metotreksat poliglutamat
NADP	Nikotinamid adenozin difosfat
NaOH	Sodyum hidrokisit
NDEA	N-nitrosodietilamin
NF-Kb	Nükleer faktör kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Nitrik oksit
Nrf2	Nükleer faktör 2
p53	Tümör Protein 53
PG	Prostaglandin
PKC	Protein kinaz C
PPAR-γ	Peroksizom aktive edici reseptör-gama
RFC	İndirgenmiş folat taşıyıcı
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
STAT-3	Transkripsiyon aktivatör protein 3
T3	Triiodotironin
T4	Tiroksin
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloroasetik asit
THF	Tetrahidrofolat
TNF	Tümör nekroz faktör
TS	Timidilat sentaz
UDP	Uridin 5'-difosfat

ÖZET

Farelerde Metotreksatla İndüklenen Oksidatif Stress Üzerine Apigeninin Koruyucu Etkisi

Bu araştırmada farelerde metotreksat (MTX) ile oluşturulan oksidatif hasara karşı apigeninin (Apig) koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada her bir grupta 12 adet olmak üzere toplam 48 adet CD-1 erkek fare kullanıldı. Farelere *ad libitum* pelet yem ve su verildi. Çalışmada kontrol, MTX, Apig ve Apig+MTX'in birlikte verildiği grup olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Kontrol grubuna 4 gün süreyle periton içi (p.i) %0,1 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren %0,9'luk NaCl (2 mg/kg c.a) verildi. Apigenin grubuna 4 gün süreyle 3 mg/kg/c.a/gün p.i (DMSO içinde) Apig, MTX grubuna tek doz 4. günde 20 mg/kg/c.a/gün MTX (fizyolojik NaCl içinde) uygulandı. Apig+MTX'in birlikte verildiği gruba ise 7 gün süreyle 3 mg/kg/c.a/gün p.i Apig, 4. gün tek doz 20 mg/kg/c.a MTX p.i verildi. Çalışma sonunda kan, karaciğer ve böbrek örnekleri alındı. Serum örneklerinde *alanin aminotransferaz* (ALT) ve *aspartat aminotransferaz* (AST) ile kreatinin; hemolizatlar ile karaciğer ve böbrek homojenatlarında *katalaz* (CAT), *glutasyon peroksidaz* (GSH-Px) ve glutasyon (GSH) seviyeleri ile plazma, karaciğer ve böbrek homojenatlarında malondialdehit (MDA) ve *süperoksit dismutaz 1* (SOD1) seviyeleri ölçüldü. Ayrıca karaciğer ve böbrek örneklerinde histopatolojik incelemeler yapıldı. Çalışmada MTX verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum AST, ALT ve kreatinin değerlerinde önemli düzeyde bir artış ($p<0,05$), Apig+MTX'in birlikte verildiği grupta ise, MTX'in tek başına verildiğinde artan AST, ALT ve kreatinin değerlerinde önemli düzeyde bir düşüş ($p<0,05$) olduğu belirlendi. Kan, karaciğer ve böbrek doku örneklerinde MTX verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA miktarlarında önemli düzeyde bir artış ($p<0,05$); SOD1, CAT ve GSH-Px enzimlerinin etkinliği ile GSH düzeylerinde ise önemli bir düşüş ($p<0,05$) tespit edildi. Apig+MTX'in birlikte verildiği grupta ise, MTX'in tek başına verildiğinde artan MDA miktarında önemli düzeyde bir düşüş ($p<0,05$); SOD1, CAT ve GSH-Px enzimlerinin etkinliği ile GSH düzeylerinde ise önemli düzeyde bir artış ($p<0,05$) belirlendi. Ayrıca histopatolojik incelemeler sonucunda da MTX'in karaciğer ve böbrek dokularında belirgin şekilde patolojik lezyon oluşturduğu; ancak Apig'in bu lezyonları belirgin şekilde düzelttiği saptandı. Sonuç olarak MTX'in kan ile karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyona (LPO) ve antioksidan savunma sistemlerinde tükenmeye yol açtığı, Apig'in, MTX'in yol açtığı LPO'yu azalttığı ve antioksidan enzimler/sistemler üzerinde düzeltici etki gösterdiği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Apigenin, Fare, Metotreksat, Oksidatif stress

ABSTRACT

Protective Effect of Apigenin on Methotrexate-Induced Oxidative Stress in Mice

The aim of this study was to investigate the protective effect of apigenin (Apig) against oxidative damage induced by methotrexate (MTX) in mice. A total of 48 CD-1 male mice, 12 in each group, were used in the study. Mice were given *ad libitum* pellet feed and water. In the study, 4 groups were formed as control, MTX, Apig and Apig + MTX. The control group received 0.9% NaCl (2 mg/kg b.w) containing 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) intraperitoneally (i.p) for 4 days. Apigenin group received 3 mg/kg/b.w/day i.p (dissolved in DMSO) apigenin for 4 days and methotrexate group was given a single dose of 20 mg/kg/b.w/day i.p methotrexate (dissolved in 0.9% NaCl) on the 4th day. Apig+MTX group was given 3 mg/kg/b.w/day p.i Apig for 7 days and single dose 20 mg/kg/b.w MTX on 4th day. Blood, liver and kidney samples were taken at the end of the study. In serum samples, *alanine aminotransferase* (ALT), *aspartate aminotransferase* (AST) and creatinine, in hemolysates, liver and kidney homogenates *catalase* (CAT), glutathione (GSH) and *glutathione peroxidase* (GSH-Px) levels and in plasma, liver and kidney homogenates malondialdehyde (MDA) and *superoxide dismutase1* (SOD1) levels were measured. Histopathological examinations of liver and kidney samples were also performed. In the study, when MTX group was compared with the control group, there was a significant increase ($p<0.05$) in serum AST and ALT levels and creatinine values. In Apig+MTX group, there was a significant decrease ($p<0.05$) in AST, ALT and creatinine values compared with the MTX group. In MTX group, a significant increase ($p<0.05$) in MDA levels was found in blood, liver and kidney tissue samples compared to the control group; SOD1, CAT and GSH-Px enzymes and GSH levels decreased significantly ($p<0.05$). In the group in which Apig + MTX was administered together, a significant decrease ($p<0.05$) in the amount of MDA that was increased when MTX was administered alone; SOD1, CAT and GSH-Px enzymes and GSH levels increased significantly ($p<0.05$). In addition, histopathological examinations revealed that MTX caused marked pathological lesions in liver and kidney tissues and Apig corrected these lesions. As a result, it was found that MTX caused lipid peroxidation in blood, liver and kidney tissues and depletion of antioxidant defense systems, Apig decreased lipid peroxidation caused by MTX and showed corrective effect on antioxidant enzymes/systems.

Keywords: Apigenin, Methotrexate, Mouse, Oxidative stress

1. GİRİŞ

Farmakognozi alanındaki son gelişmeler, flavonoidlerin canlılar üzerindeki biyolojik ve farmakolojik etkilerine olan ilginin yeniden canlanmasına ve geleneksel doğu tıbbına olan merakın artmasını sağlamıştır (Middleton ve ark., 2000).

Flavonoidler düşük molekül ağırlıklı polifenolik bileşikler olup, bitkilerde sekonder metabolitler halinde yaygın olarak bulunurlar (Leyva-López ve ark., 2016). Flavonoidler bitki renklerinin oluşmasından sorumlu pigmentler olarak kabul edilirler (Middleton ve ark., 2000). Sarı anlamına gelen Latince “flavus” sözcüğünden türetilerek “flavonoid” adını almışlardır (Kahraman ve ark., 2002). Flavonoidler bir asırdan fazla bir süredir bitkilerde varlığı bilinen önemli bileşiklerdir. Macar biyokimyacı Rusznyakand Szent Gyorgyi narenciye kabuğundan flavonoidleri izole etmiş ve 1936 yılında ilk kez flavonoidlerin biyolojik etkinlikleri ile ilgili bilgileri yayınlamıştır. Bu bileşiğe “Vitamin P” adı verilmiş, ancak daha sonra flavonoid olarak yeniden adlandırılmıştır (Ali ve ark., 2017; Sung ve ark., 2016). Flavonoidler, meyveler, sebzeler ve tıbbi bitkiler ile kakao, çikolata, çay, soya, kırmızı şarap gibi bitkisel kaynaklı yiyecek ve içeceklerde bulunan birçok farklı fenolik bileşikten oluşan geniş bir sınıfı temsil etmektedir. Günümüzde, 9000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır ve bunların bazıları klinik olarak kullanılmaktadır (Babu ve ark., 2013). Günümüzde flavonoidler sinir hücrelerini koruyucu etkileri, *asetilkolin estera*z (AChE) inhibitörü olmaları, serbest oksijen radikallerini yok etme ve metal bağlama kapasiteleri sebebiyle oldukça ilgi çekmektedir (Li ve ark., 2013; Routray ve Orsat 2012). Yapılan çalışmalar flavonoidlerin yangı ve kanser önleme ile antioksidan etki gibi önemli farmakolojik etkinliklere sahip olduğunu göstermiştir (Liang ve ark., 1999; Nile ve ark., 2017; Reuter ve ark., 2010). Apigenin (Apig), meyve ve sebzeler de dahil olmak üzere çeşitli doğal kaynaklarda en fazla bulunan flavonlardan biridir (Patel ve ark. 2007). Apigeninin kanser önleyici (Caltagirone ve ark., 2000; Gupta ve ark., 2001; Kiraly ve ark., 2016), antioksidan ve yangı önleyici etkileri (Ali ve ark., 2014a; Ali ve ark., 2017; Raskovic ve ark., 2017) başta olmak üzere çok sayıda biyolojik etkilere sahip olduğu yapılan araştırmalarda belirtilmiştir (Ali ve ark., 2017). Metotreksat (MTX) çeşitli kanser türleri (lösemi, meme ve testis kanseri gibi) ile otoimmün hastalıklar, romatoid artrit, sedef ve çeşitli yangısal bozuklukların

tedavisinde kullanılan folat antimetaboliti olarak bilinen bir ajandır (Abdel-Daim ve ark., 2017; David ve ark., 2016; Khokhar ve ark., 2017; Yüncü ve ark., 2015). Metotreksat karaciğerde mikrozomal enzim sistemi tarafından metabolize edilir ve özellikle Faz 1 tepkimesi sonucu oluşan metabolitlerinin oksidatif strese ve çeşitli organ hasarlarına (özellikle karaciğer, böbrek, bağırsak gibi) yol açtığı vurgulanmıştır. Reaktif metabolitleri protein, lipit ve nükleik asit gibi hücrel makromoleküllerle etkileşime girerek protein sentezinin bozulmasına, lipid peroksidasyona (LPO), DNA hasarına ve oksidatif strese yol açarlar. Ayrıca MTX nikotinamid adenzin difosfat (NADP) sentezini engelleyerek, glutatyon (GSH) depolarının tükenmesine ve böylece oksidatif stresin oluşmasına yol açmaktadır (Çakır ve ark., 2015).

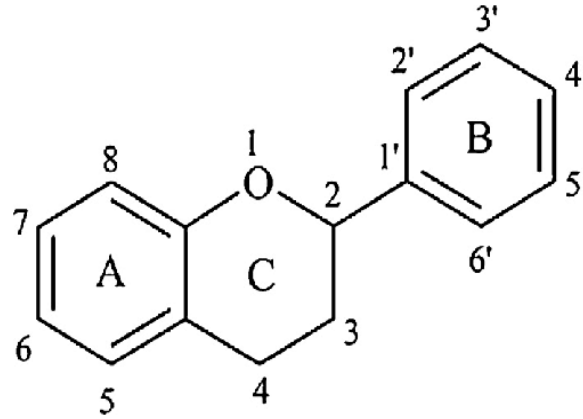
Bu çalışmada, farelerde MTX ile oluşturulan oksidatif strese karşı Apig'in koruyucu etkisi araştırılarak kullanılabilirliğinin ortaya konması ve literatüre yeni bilgiler kazandırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

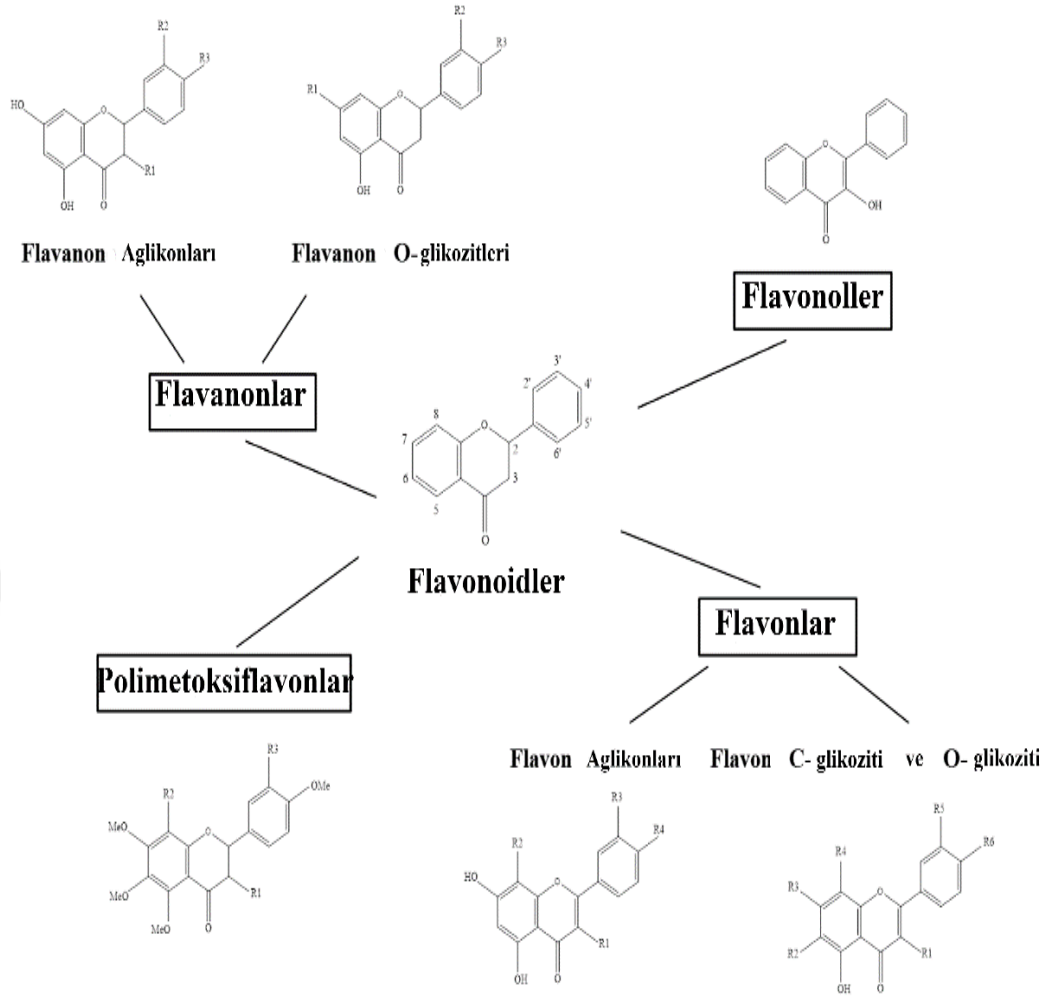
2.1. Flavonoidler ve Flavonlar

Bitkilerde bulunan polifenolik bileşikler içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapılara göre flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler ve lignanlar olmak üzere 4 ana gruba ayrılırlar (Manach ve ark., 2004). Flavonoidler, bitkilerde sekonder metabolitler halinde yaygın olarak bulunan düşük molekül ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir (Cirmi ve ark., 2016a).

Flavonoidler C6-C3-C6 heterosiklik iskelet yapısını içeren 2-fenil-benzo- γ -piran çekirdeğine sahip kromon türevi maddelerdir. Kimyasal yapılarında heterosiklik piran halkasına (C) bağlanan iki benzen halkası (A ve B) bulunur. Bu karbon atomlarının her biri belirli bir sistemle numaralandırılır. A ve C halkaları için normal rakamlar, B halkası için ise üslü rakamlar kullanılır (Erlund, 2004) (Şekil 2.1). Moleküler yapılarına göre flavonoidler flavonlar, flavanonlar, flavonoller ve polimetoksiflavonlar olmak üzere sınıflara ayrılırlar (Cirmi ve ark., 2016b; Tripoli ve ark., 2007) (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Flavonoidlerin genel yapısı (Erlund, 2004).



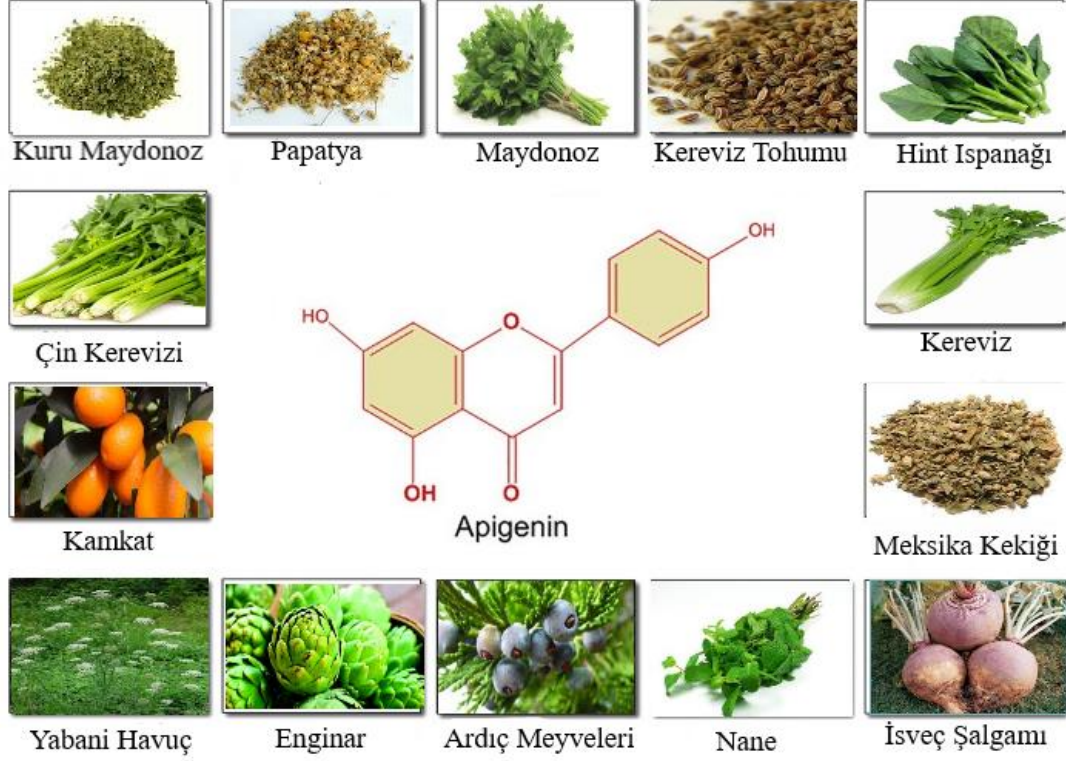
Şekil 2.2. Flavonoidlerin sınıflandırılması (Cirmi ve ark., 2016b).

Günümüzde çok sayıda flavonoid tanımlanmıştır ve bazı flavonoidler klinik olarak çeşitli hastalıklarda hem koruyucu hem de sağaltıcı amaçla kullanılmaktadır. Kimyasal yapılarına, çeşitli sayıda hidroksil ve metoksil gruplarının bağlanmasıyla farklı flavonoidler sentezlenmektedir (Cirmi ve ark., 2016b).

2.1.1. Apigenin (Apig)

Apigenin, maydanoz, papatya, kereviz, hint ıspanağı, enginar, portakal, soğan, buğday filizi gibi birçok meyve ve sebze yaygın olarak bulunan bir flavonoiddir (Patel ve ark., 2007; Sung ve ark., 2016). Kuru maydanozda 45.035 µg/g Apig bulunur ve en zengin Apig kaynağıdır. Yüksek Apig içeren diğer bitkiler ise sırasıyla; 3.000-

5.000 µg/g, 786,5 µg/g, 622 µg/g ve 240,2 µg/g içeren papatya (kuru çiçek), kereviz tohumu, hint ıspanağı ve Çin kerevizidir (Sung ve ark., 2016) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Apigeninin kimyasal yapısı ve doğal kaynakları (Sung ve ark., 2016).

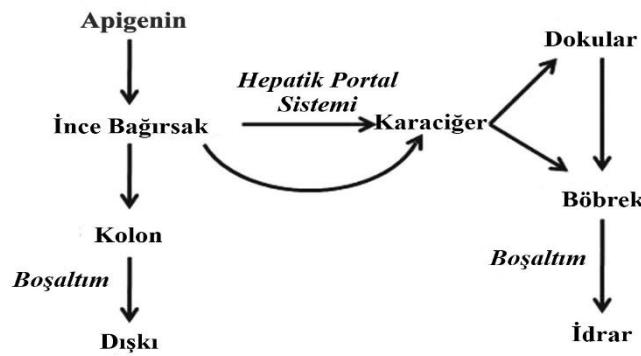
Kimyasal yapısı 4', 5, 7- trihidroksiflavon olan Apig, A halkasının C-5 ve C-7 pozisyonlarında ve B halkasının C-4' pozisyonunda hidroksil gruplarına sahiptir. Apigenin ismi, Apiaceae'deki *Apium* cinsinden (kereviz, havuç veya maydanoz ailesi, *Umbelliferae* olarak da bilinir) gelmektedir. Apigenin flavonoidlerin alt sınıfında bulunan bir flavondur (Ahmad ve ark., 2019; Shukla ve Gupta, 2010; Sung ve ark., 2016) (Şekil 2.3).

Apigenin moleküler formülü $C_{15}H_{10}O_5$ ve molekül ağırlığı 270,24 g/mol olan; suda çözünmeyen, dimetilsülfoksit (DMSO) ve sıcak etanolde çözünen sarı renkte kristalize bir tozdur (Shukla ve Gupta, 2010; Sung ve ark., 2016).

2.1.1.1. Apigeninin Farmakokinetiği

Apigeninin dolaşımdaki miktarlarını ve buna bağlı biyolojik dağılımını, dokularda daha büyük moleküllere dönüşmesi etkilemektedir. Özellikle bağırsak mukozasında oluşan glukuronitler, bağırsak lumenine geri salınır ve böylece Apig'in emilimi azalır (Andlauer ve ark., 2000; Crespy ve ark., 1999).

Apigeninin metilasyon, sülfasyon ve glukuronidasyon gibi birleşme tepkimelerine uğraması biyoetkinliğini etkilemektedir (Manach ve ark., 2004). Apigenin bağırsak epitel hücrelerinde bulunan *uridin 5'-difosfo-glukuronil transferaz* (*UDP-glukronil transferaz*) enzimi aracılığıyla glukuronidasyona uğrayan bir substrattır (Ng ve ark., 2004). Apigenin bağırsakta, karaciğere göre daha hızlı bir şekilde biyotransformasyona uğrar (Ali ve ark., 2017). Apigeninin emilimi, dağılımı ve atılımı Şekil 2.4'de gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Apigeninin emilimi, dağılımı ve atılımı (Scalbert ve Williamson, 2000).

Sıçan karaciğerinde yapılan bir çalışmada, Apig'in *in vivo* ve *ex vivo* Faz I tepkimeleri sonucunda monohidroksi türevlere (luteolin, skutellarein ve izo-skutellarein) dönüştüğü, oluşan metabolitlerin de Faz II metabolizması yoluyla konjugasyon ürünlerine çevrildiği belirtilmiştir. Faz I tepkimeleri sonucunda oluşan skutellarein ve izo-skutellarein metabolitlerinin, üç mono-glukuronat ve bir mono-sülfatlanmış bileşiğe dönüştüğü tespit edilmiştir. Fakat Apig'in Faz I metaboliti olan

luteolinin, dört farklı mono-glukuronat bileşiğe, iki sülfatlanmış bileşiğe ve bir metilasyon bileşiğine (yani, diosmetin) konjuge olduğu belirlenmiştir. Değişmeyen Apig'in ise iki mono-glukuronat ve bir mono-sülfatlanmış konjuge bileşiğe dönüştüğü saptanmıştır (Gradolatto ve ark., 2004). Olgunlaşmamış erkek ve dişi sıçanlarda Apig mono-glukurono konjugatının, mono-sülfonatlı konjugatına (sırasıyla %10,0-31,6'ya karşılık, %2,0-3,6'ya kıyasla) göre daha yüksek oranda atıldığı tespit edilmiştir. Olgun dişilerde de aynı şekilde olduğu saptanmıştır. Olgun erkek sıçanlarda ise mono-glukurono konjugatının, mono-sülfonatlı konjugatına (sırasıyla %4,9 ve %13,9) göre daha düşük oranda atıldığı bildirilmiştir (Gradolatto ve ark., 2005).

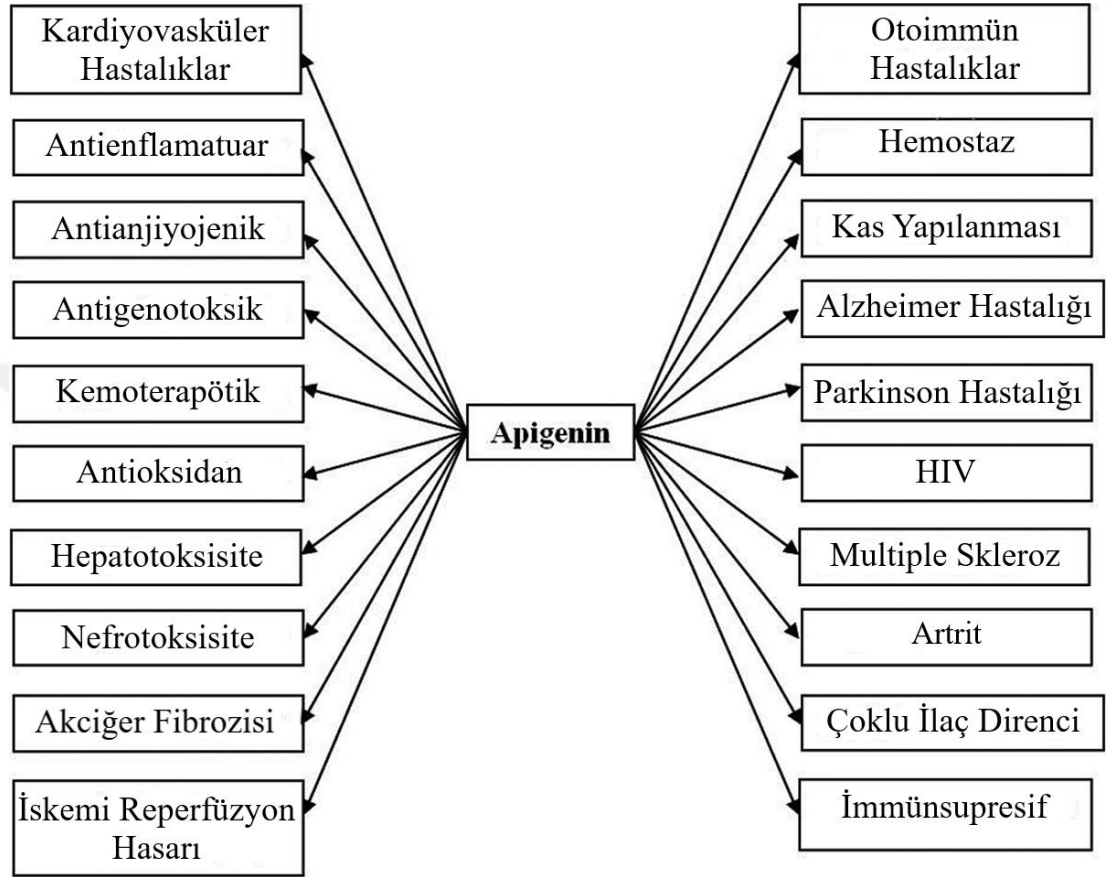
Nielsen ve ark. (1999) maydanoz tüketimi sonrasında insan idrarında Apig atılımını incelemişler ve Apig'in %0,58 oranda atıldığını ve 24 saat sonra idrarda tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Apigeninin radyoaktif bir madde ile etiketlenerek tek doz ağızdan verildiği bir çalışmada, idrarda %51; dışkıda %12; kanda %1,2; böbreklerde %0,4; bağırsakta %9,4 ve karaciğerde %1,2 dağılım gösterdiği ve 10 gün sonra vücutta kalan miktarının %24,8 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca söz konusu çalışmada Apig'in 24 saat sonra kanda tespit edildiği, atılma yarı ömrünün 91,8 saat, dağılım hacminin 259 ml ve plazma klirensinin 1,95 ml/saat olduğu da belirtilmiştir. Araştırmacılar hesaplanan tüm parametreler sonucunda Apig'in yavaş emildiğini ve yavaş atıldığını tespit etmişlerdir (Gradolatto ve ark., 2005).

2.1.1.2. Farmakolojik Etkileri

Apigenin, son yıllarda toksisitesinin düşük olması ve diğer flavonoidlere kıyasla özellikle kanser hücrelerine olan etkileri nedeniyle dikkat çeken bir maddedir (Ali ve ark., 2017). Apigeninin bazı hastalıklara karşı sağaltıcı ve koruyucu etkinlik gösterdiği çeşitli araştırmalarla ortaya konulmuştur (Ali ve ark., 2017; An ve ark., 2015).

Apigeninin olası kanser önleyici etkisi, güçlü antioksidan ve yangı önleyici etkinliklerinden kaynaklanmaktadır (Nile ve ark., 2017). Apigeninin çeşitli farmakolojik etkileri Şekil 2.5’de özetlenmiştir.

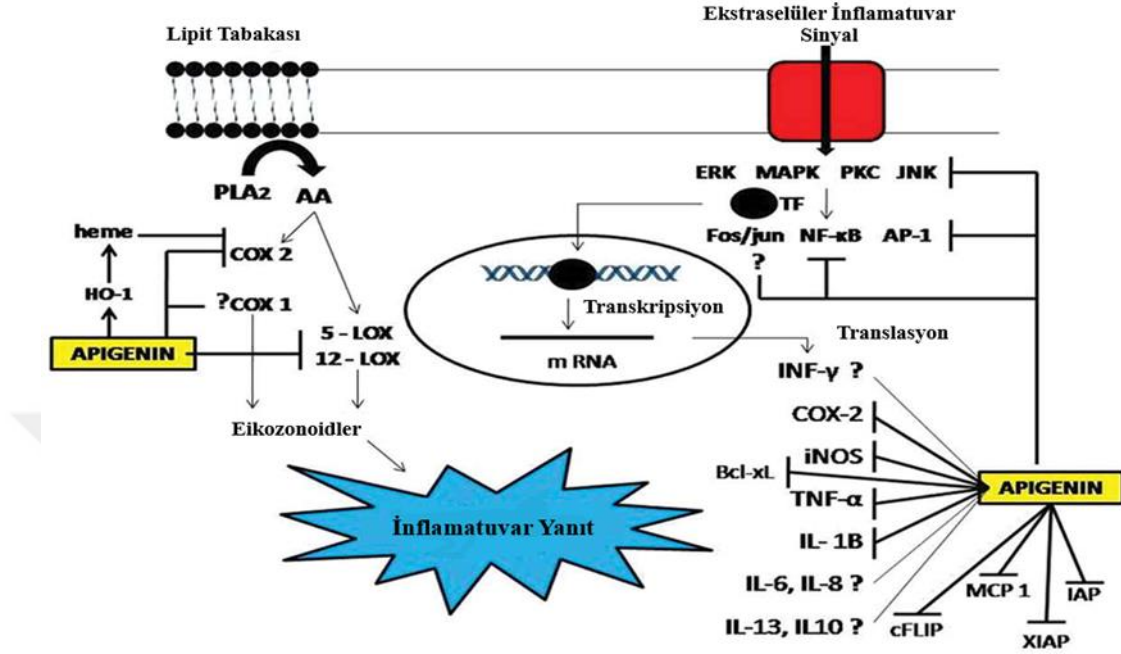


Şekil 2.5. Apigeninin farmakolojik etkileri (Ali ve ark., 2017).

2.1.1.2.1. Yangı Önleyici ve Antioksidan Etkileri

Çoğu flavonoidin, seçici ya da seçici olmayan bir şekilde *siklooksijenaz* (COX), *lipooksijenaz* (LOX), *fosfolipaz* (PLA) ve *indüklenebilir nitrik oksit sentetaz* (iNOS) gibi enzimlerin inhibitörleri olduğu bilinmektedir. Bu moleküller yangının başlamasına aracılık ederler. Bazı flavonoidler, yalnızca bir yangısal enzimin etkinliğini engellerken, bazıları bir seri enzimin etkinliğini engeller. Apigenin özellikle iNOS ve COX-2 ekspresyonlarını engeller. Flavonların, C-2,3 çifte bağı ile sırasıyla A ve B halkalarındaki hidroksil grupları, iNOS ve COX-2 enzimlerinin

baskılanmasından sorumludur (Kim ve ark., 2004). Apigeninin yangı önleyici etkisi Şekil 2.6’da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Apigeninin yangı önleyici etkisi (Ali ve ark., 2017).

Apigeninin, lipopolisakkarid (LPS) ile uyarılan astrositler ve RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde iNOS'un ekspresyonunu baskılayarak nitrik oksit (NO) üretimini engellediği belirtilmiştir (Kim ve ark., 1999; Soliman ve Mazziro, 1998). Yangının oluşmasında iNOS ve COX-2'ye ilave olarak, interlökin (IL)-1 β , IL-6, interferon (INF- γ), IL-4, IL-5, tümör nekroz faktör- α (TNF- α), monosit kemotaktik protein (MCP-1 α) ve monosit yangısal proteini (MIP-1 α) gibi sitokinler de aracılık ederler. Apigeninin bazı sitokin genlerinin ekspresyonunun baskılanmasındaki olası rolü *protein kinaz C* (PKC), *ekstraselüler sinyalle düzenlenen protein kinaz* (ERK) ve *mitojen etkinleştiren protein kinaz* (MAPK) dahil sinyal iletiminde yer alan bir dizi protein kinaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Apigeninin bu moleküllerin inhibisyonunu, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve aktivatör protein-1 (AP-1)'in etkinliğini engelleyerek oluşturduğu belirtilmiştir (Kim ve ark., 1999).

Yapılan çalışmalarda reaktif oksijen türleri (ROS)'nin, NF- κ B, AP-1, tümör protein 53 (p53), hipoksiyle indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1 α) gibi bir dizi

transkripsiyon faktörlerinin etkinliğini indüklediği belirtilmiştir (Reuter ve ark., 2010; Zhou ve ark., 2016). Ayrıca peroksizom aktive edici reseptör-gama (PPAR- γ), transkripsiyon aktivatör protein 3 (STAT-3) ve majör nükleer faktör 2 (Nrf2)'nin çoğu kanser ve yangılı hastalıklarda rol oynadığı da vurgulanmıştır (Reuter ve ark., 2010; Zhou ve ark., 2016). Transkripsiyon faktörlerinin aktif hale gelmesi, büyüme faktörleri, yangı sitokinleri, kemokinler, hücre döngüsü düzenleyici moleküller ve antiinflamatuvar moleküller dahil olmak üzere 500'den fazla farklı genin ekspresyonuna neden olabilir (Reuter ve ark., 2010; Ribeiro ve ark., 2015). Liang ve ark. (1999) yapmış oldukları bir çalışmada Apig'in söz konusu transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek yangısal yolları değiştirdiğini belirtmişlerdir. Iwakiri ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada, Apig'in LPS ile indüklenen fare makrofajlarının COX-2 ve iNOS etkinliklerini engellediğini bildirmişlerdir.

Ali ve ark. (2017) Apig'in yangı önleyici özelliklerine ilaveten aynı zamanda *süperoksit dismutaz* (SOD), *glutasyon peroksidaz* (GSH-Px), *katalaz* (CAT), iNOS, *glutasyon redüktaz* (GSH-R) gibi antioksidan enzimler ile indirgenmiş GSH düzeylerini arttırarak antioksidan özellik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Nielsen ve ark. (1999) insan denekleri ile yapmış oldukları çalışmada iki hafta süreyle 3,73-4,49 mg Apig içeren maydanoz ile beslenen insanlarda, GSH-R ve SOD düzeylerinde artış olduğunu bildirmişlerdir.

An ve ark. (2015) Apig'in eritrositlerde hidrojen peroksit (H₂O₂) ile oluşturulan oksidatif hasara karşı koruyucu etkilere sahip olduğunu ve eritrositlerin antioksidan aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir.

Ali ve ark. (2014a) çalışmalarında düşük yoğunluklarda (10, 20 ve 40 mg/kg c.a) alınan Apig'in, sıçan karaciğerlerinde ROS kaynaklı oksidatif hasara karşı LPO ve zar protein hasarını azaltarak, ayrıca *alkalen fosfataz* (ALP), *alanin aminotransferaz* (ALT) ve *aspartat aminotransferaz* (AST) gibi serum enzim düzeylerini düşürerek koruma sağladığını belirtmişlerdir.

Panda ve Kar (2007) alloxan ile deneysel olarak diabet oluşturulan hayvanlarda; karaciğer ile CAT ve SOD enzim etkinliğinde düşme, GSH düzeylerinde azalma ile LPO'da artma olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar 10 gün süreyle deri altı 0,78 mg/kg Apig uygulaması ile tüm bu değişikliklerin tersine döndüğünü ve karaciğerde koruyucu bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Raskovic ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, Apig'in parasetamole bağlı hepatotoksistide; sıçanlarda LPO düzeyini inhibe ederek antioksidan savunma mekanizmalarını önemli ölçüde artırdığını bildirmişlerdir.

Ali ve ark. (2014a), Wang ve ark. (2014), Yang ve ark. (2013) Apig'in GSH düzeyini ve SOD, CAT dahil antioksidan enzim etkinliğini artırması ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 da dahil olmak üzere hepatik yangı sitokinlerinin sentezini azaltması sonucu asetaminofen, furan ve N-nitrosodietilamin (NDEA) gibi bazı kimyasallara bağlı oluşan karaciğer hasarını engellediğini bildirmişlerdir.

Ksantin oksidaz (KO), canlı dokularda yapmış olduğu oksidatif hasara bağlı olarak Gut'a neden olur. İncelenen tüm flavonoidlerin arasında Apig'in KO'nun en güçlü inhibitörü olduğu görülmüştür. Çalışmalar, Apig, krisin ve luteolinin, *hem oksijenaz-1 (HO-1)* ve *glutamat sistein ligaz (GCL)* gibi proteinlerin ekspresyonunu doza bağımlı olarak artırdıklarını göstermiştir (Huang ve ark., 2011; Paredes-Gonzalez ve ark., 2015). Ayrıca ERK2 ve Nrf2'yi aktive ederek, hücre içi GSH düzeyini ve GSH'nin oksitlenmiş GSH'ye oranını arttırdıkları belirlenmiştir (Huang ve ark., 2011; Paredes-Gonzalez ve ark., 2015).

2.1.1.2.2. Diğer Etkileri

Gilani ve ark. (2005) Apig içeren zeytinyağının, kalsiyum kanallarını kapatarak endotelin gevşemesine yol açtığını belirtmişlerdir. Apigeninin aorttaki NO düzeyini arttırarak damar endotel hücrelerini koruyabileceği (Jin ve ark., 2009), anjiyotensin dönüştürücü enziminin (ACE) etkinliğini engelleyerek doğrudan kan basıncını düşürebileceği (Salah ve ark., 2001) ve hipertansif sıçanlarda anormal miyokardiyal

glikolipit metabolizmasının ve kardiyak hipertrofinin iyileştirilmesine yol açabileceği belirtilmiştir (Zhu ve ark., 2016).

Losi ve ark. (2004) Apig'in, sinir hücre kültürlerinde glutamata bağlı nörotoksositeye karşı nöroprotektif olduğunu göstermişler ve gama-aminobutirik asit (GABA) ile N-metil-D-aspartat (NMDA) kanalları üzerindeki antagonistik etkisini ortaya koymuşlardır.

Panda ve Kar (2007) farelerde yaptıkları bir çalışmada, alloksan ile oluşturulan diyabette serum insülin, tiroksin (T4) ve triiodotironin (T3) düzeylerinde belirgin bir azalmaya paralel olarak serum glukoz ve karaciğer *glukoz-6-fosfataz* (G-6-Paz) etkinliğinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Diyabetik farelere 10 gün süreyle deri altı 0,78 mg/kg Apig verilmesi sonucunda serum insülin ve tiroid hormon düzeylerinin artışına paralel olarak glukoz düzeyinde ve G-6-Paz aktivitesinde azalma görüldüğü bildirilmiştir. Alloksan ile indüklenen serum kolesterol seviyesindeki artışın Apig kullanımıyla azalmaya başladığı belirlenmiştir.

Li ve ark. (2007) *Cephalotaxus sinensis* bitkisinden elde ettikleri Apig'in ve Apig'in iki glikopiranosid glikozidinin, insüline duyarlı glukoz taşıyıcı (GLUT) ailesi olan glukoz taşıyıcı alt tip 4 formunun (GLUT-4) insüline direncini güçlendirerek vücutta diyabet önleyici etki oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Streptococcus pneumoniae ile enfekte edilen iki grup fareyle (1. grup 80 mg/kg Apig ve 2. grup dimetilsülfoksit (DMSO) kontrol grubu) yapılan çalışmada, Apig verilen gruptaki farelerin akciğerlerindeki bakteri kolonizasyonunun belirgin ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca Apig'in, *S. pneumoniae*'nin yol açtığı hemoliz ve hücre yıkımlayıcı etkisini engellediği de tespit edilmiştir (Song ve ark., 2016).

Apigenin doza bağımlı olarak Şap Hastalığı virüsünü inhibe ederek antiviral etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Qian ve ark., 2015). Lv ve ark. (2014) ile Qian ve ark. (2015), Apig'in viral enzimleri inhibe ederek ve viral girişi önleyerek enterovirüslerin sebep olduğu el, ayak ve ağız hastalığını önemli ölçüde engellediğini tespit etmişlerdir.

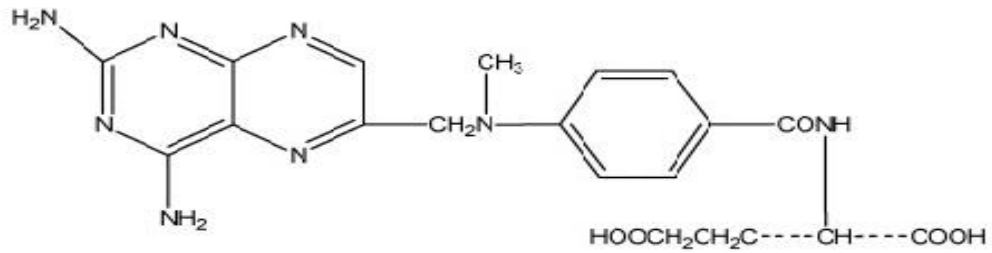
Wang ve ark. (2013) *in vitro* olarak C6 glioma hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmada, Apig'in zaman ve doza bağımlı bir şekilde programlanmış hücre ölümünü indüklemesi sonucu antikanserojen etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Lampropoulos ve ark. (2013) deneysel olarak pankreatit oluşturulan sıçanlarda, Apig'in yangısal hücre infiltrasyonu ve nekrozu engellediğini belirtmişlerdir.

Kang ve ark. (2009) lupus oluşturulan farelerle yaptıkları çalışmada, Apig'in Th1 (T-helper 1) ve Th17 hücrelerinin major lupus oto antijenine cevabını azalttığı ve dolayısıyla lupus B hücrelerinin oto-antikör üretme yeteneğini bastırdığını tespit etmişlerdir. Ayrıca Apig, bağışıklık hücrelerinde COX-2 oluşumunu azalttığını vurgulamışlardır.

2.2. Metotreksat (MTX)

Bir folik asit antagonisti olan MTX, lösemi ve lenfoma gibi bazı tümörler ile romatoid artrit, lupus ve sedef hastalığı gibi bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde 60 yıldan uzun süredir kullanılmaktadır (Türkcü ve ark., 2015). Kimyasal olarak MTX, N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metilamino]benzoil]-L-glutamik asittir (Kayaalp, 2005; Zhang ve ark., 2005) (Şekil 2.7).



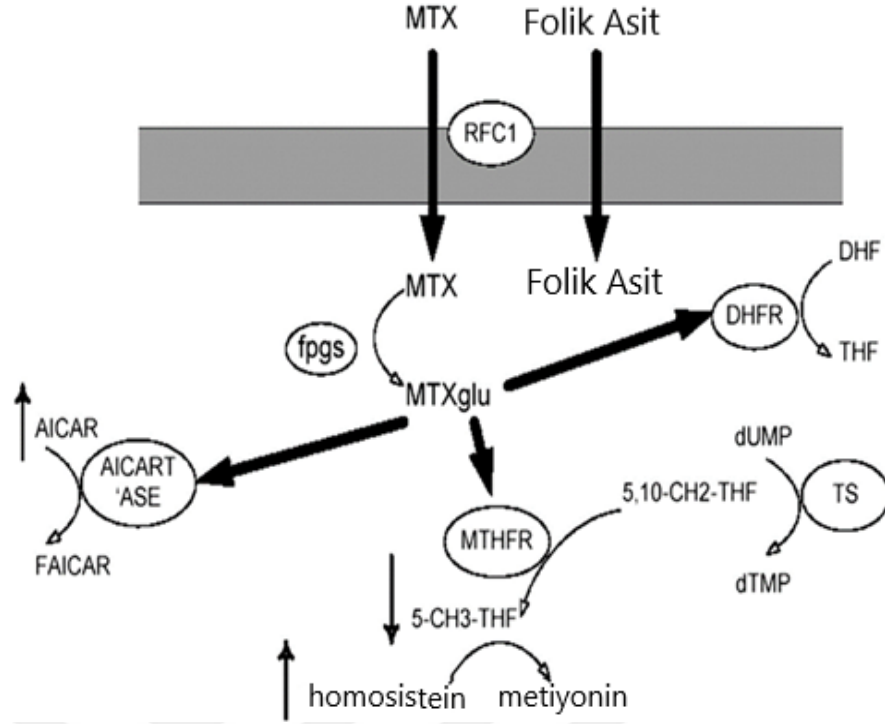
Şekil 2.7. Metotreksatın kimyasal yapısı (Zhang ve ark., 2005).

Metotreksat, pKa 4,8-5,5 olan zayıf bir dikarboksilik asittir ve bu nedenle fizyolojik pH'da iyonize halde bulunur. Metotreksat lipofilik özelliği düşük bir maddedir (Grim ve ark., 2003; Shen ve Azarnoff, 1978). Ağızdan alınan MTX'in tamamına yakını emilir. Metotreksat ağızdan, kas içi (Kİ), damar içi (Dİ) ve deri altı

(DA) yolla kullanılır. Emilip sistemik dolaşıma geçen MTX'in %10'u 7-hidroksi-MTX'e dönüşür. İlacın dağılım yarı ömrü 2 saat, atılma yarı ömrü 6-8 saat arasında değişmektedir (Shen ve Azarnoff, 1978; Van Ede ve ark., 1998). Metotreksat, %90 oranında böbrekler tarafından glomerüler filtrasyon ve aktif tübüler salgılanma yoluyla idrarla, %10'u ise safrayla atılır. Ayrıca ilaç enterohepatik dolaşıma uğrar (Balis ve ark., 1983).

Metotreksat hücreye, indirgenmiş folat taşıyıcı 1 (RFC1) taşıt proteini ile girer ve *folilpoliglutamata sentaz* (FPGS) ile MTX poliglutamata (MTXGlu) dönüştürülür (Sirotnak ve ark., 1976). Buna karşılık, folatın MTX ile birlikte uygulanması, MTX'in biyoyararlanımını azaltmaz, bu da folatın, MTX'den ayrı bir taşıyıcıyla taşındığını gösterir (Kurnik ve ark., 2003; Schornage ve McVie, 1983). Küçük miktarlarda MTXGlu'ları dokularda uzun süre (yarı ömrü 1-4 hafta) kalabilirler (Dalrymple ve ark., 2008). Metotreksat, dihidrofolik asit analogudur ve dihidrofolatın (DHF) etkin tetrahidrofolata (THF) dönüşümünü katalize eden, *dihidrofolat redüktaz* (DHFR) enziminin etkinliğini oldukça seçici bir şekilde engeller. Böylece DHF'lerin biyolojik olarak etkin THR'lere dönüşümü gerçekleşemez. Ayrıca MTX, hücre içi çeşitli folat metabolize edici enzimlerin yapısında birtakım değişikliklere yol açar. Folat yolağında merkezi bir düzenleyici enzim olan, *metilentetrahidrofolat redüktaz* (MTHFR)'in etkinliğini de önler. Bu enzim 5-tetrahidrofolatın, 5,10-metilentetrahidrofolata (5,10-MTHF) dönüşümünü sağlar ve sonuçta homosistein metiyonine dönüşür (Aggarwal ve ark., 2006; Türkcü ve ark., 2015). Hücre içinde biriken MTXGlu'ları pürin biyosentezinde görevli bir enzim olan *aminoimidazol karboksamid ribonükleotid transformilaz* (AICARTaz)'ın etkinliğini önler. Metotreksat ve/veya MTXGlu'ları, hücresel düzeyde DHFR, *timidilat sentaz* (TS) ve AICARTaz'ın etkinliğini doğrudan engellerken, MTHFR'nin etkinliğini dolaylı olarak engeller (Cronstein, 2005; Kremer, 2008; Wessels ve ark., 2007) (Şekil 2.8).

Poliglutamata türevleri, DHFR'in etkinliği engelleyerek THF oluşumunu önler (Dalrymple ve ark., 2008). Bunun sonucunda, hücrelerin içindeki pürin nükleotid sentezinin öncü faktörü olan THF oluşmadığından ve dihidrofolik asit biriktiğinden DNA ve RNA sentezi bozulur (Kurnik ve ark., 2003; Schornage ve McVie, 1983).



Şekil 2.8. Metotreksatın etki şekli. MTXglu, metotreksat poliglutam; RFC1, indirgenmiş folat taşıyıcı; FPGS, folilpoliglutam sentaz; TS, timidilat sentaz; DHFR, dihidrofolat redüktaz; DHF, dihidrofolat; THF, tetrahydrofolat; 5,10-CH₂-THF, 5,10-metilen tetrahydrofolat; MTHFR, metilen tetrahydrofolat redüktaz; 5-CH₃-THF, 5-metil tetrahydrofolat; AICAR, 5-aminoimidazol-4-karboksamid-ribonükleotit; AICART'az, AICAR transformilaz; FAICAR, formil-AICAR (Cornstein, 2005; Kremer, 2008).

Metotreksatın adenozin aracılı yangı önleyici etkinliği *in vitro*, *in vivo* ve klinik verilerle ortaya konulmuştur. Metotreksatın daha önce yapılan çalışmalarda deneysel olarak yangı oluşturulan hayvan modellerinde ve romatoid artritli hastalarda adenozin salınımını indüklediği ve kendi reseptörlerine bağlanarak güçlü bir yangısal inhibitör olduğu tespit edilmiştir (Chan ve Cronstein, 2013; Schafranski ve ark., 2012).

2.2.1. Toksisitesi

Metotreksat, kemik iliği, karaciğer, gastrointestinal sistem, böbrek, solunum, dermatolojik ve hematolojik sistemler dahil olmak üzere birçok organ için potansiyel olarak toksik etkiye sahiptir. Metotreksat uygulamaları sonrasında bulantı, kusma, mukoza yangısı, stomatit, kas güçsüzlüğü, hepatotoksisite ve böbrek yetmezliği

görülür. Yüksek dozlu MTX tedavisinde böbrekte MTXGlu'ların birikmesi sonucu böbrek yetmezliği ve hasarı oluşmaktadır (Isaacs ve ark., 1996; Serraj ve ark., 2007).

Alarcoan ve ark. (1989), 1981 ve 1986 yılları arasında MTX ile tedavi edilen 152 romatoid artrit hastasını incelemişler, yaptıkları çalışmada hastaların MTX kullanımını kesmelerinin ana nedeninin görülen ağır yan etkiler olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca Buchbinder ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada MTX ile tedavi edilen romatoid artrit hastalarında melanom, Hodgkin olmayan lenfoma ve akciğer kanseri görülme sıklığının arttığını bildirmişlerdir.

Padmanaphan ve ark. (2008) erkek İsviçre farelerinde MTX'in üreme sistemi üzerine etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada, farelerde germ hücre toksisitesini indüklediği sonucuna varmışlardır.

Schmiegelow ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada akut lenfoblastik lösemili çocuklarda 6-merkaptopurin (6MP) ve MTX'in birlikte uygulandığı tedavide, çocuklarda ikinci bir malign neoplazma gelişme riskinin arttığını bildirmişlerdir.

2.2.1.1. Karaciğer ve Böbrek Üzerinde Toksik Etkisi

Metotreksatın hepatotoksite mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamakla birlikte yapılan deneysel ve klinik çalışmalar, oluşan hepatotoksitenin MTX'in yol açtığı oksidatif stresin bir sonucu olabileceği hipotezini desteklemektedir (Jahovic ve ark., 2003; Uraz ve ark., 2008).

Karaciğer toksisitesi sık görülen bir sorundur ve düşük doz MTX kullanıcılarının %20'sine varan oranda *serum transaminaz* seviyelerinin en az birinde yükselme olduğu ve %3,7'sinin de karaciğer toksisitesi nedeniyle tedaviyi bıraktığı belirlenmiştir (Sparks ve ark., 2017).

Metotreksatın ana metaboliti olan 7-hidroksi-MTX'e dönüşümü karaciğerde gerçekleşmektedir. MTX, poliglutamat formunda karaciğer hücrelerinde depolanır (Çetinkaya ve ark., 2006).

Uzun süreli MTX kullanımı, hepatositlerde MTX'in poliglutamit formlarının birikmesine ve hepatoselüler folik asit seviyelerinin azalmasına nihayetinde de hepatosit nekrozuna yol açar (Kamen ve ark., 1981). Buna ek olarak, sitozolik NADP bağımlı *dehidrojenaz* ve NADP malik enzimleri MTX tarafından inhibe edilir. NADP, GSH-R enzimi tarafından ROS'u yok etmede kullanılan önemli bir sitozolik antioksidandır. Metotreksat sebebiyle ortamda bulunan NADP'nin azalması, süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri, H₂O₂ ve hipoklorür radikalleri gibi reaktif oksijen moleküllerinden gelen hasara karşı hepatositleri korumakla görevli olan GSH seviyelerini azaltır (Uraz ve ark., 2008).

Metotreksatın yüksek affiniteli DHFR inhibitörü olması, dolaylı olarak timidilat sentezini etkiler, böylece DNA sentezi baskılanır (Jolivet ve ark., 1983). Buna ek olarak sitozolik NADP bağımlı dehidrojenazların (Vogel ve ark., 1963) ve NADP enziminin MTX tarafından inhibe edildiği, MTX'in hücrelerde nikotinamid adenin difosfat redüktaz (NADPH) düzeyini azalttığı tespit edilmiştir (Caetano ve ark., 1997). Normal koşullar altında, NADPH, ROS'a karşı koruyucu olan önemli bir sitozolik antioksidan olan hücresel GSH'ın indirgenmiş halini korumak için GSH-R tarafından kullanılır. Bu nedenle, MTX GSH düzeylerinde ve antioksidan enzim savunma sisteminin etkinliğinde belirgin azalmaya ve sonuçta hücrelerin ROS'a duyarlı hale gelmesine sebep olur (Babiak ve ark., 1998).

Metotreksat kaynaklı böbrek fonksiyon bozukluğunun etiyolojisinin, MTX ve metabolitlerinin böbrek tübüllerinde çökmesi veya MTX'in böbrek tübülleri üzerindeki doğrudan toksik etkisi ile oluştuğuna inanılmaktadır. Metotreksatın %90'ından fazlası böbrekler tarafından atılır. Metotreksat, asidik pH'da zayıf şekilde çözünür ve metabolitleri olan 7-hidroksi-MTX 6 kat, 2,4-diamino-N¹⁰-metilpteroik asit (DAMPA) ise MTX'den 10 kat daha az çözünür. İdrar pH'sının 6,0'dan 7,0'a yükseltilmesi, MTX ve metabolitlerinin 5-8 kat daha fazla çözünmesine neden olur. Yüksek dozda verilen MTX plazma ve idrarda daha yüksek ilaç yoğunluklarına neden olur, bu da böbrek fonksiyon bozukluğu riskini arttırabilir. Metotreksat kaynaklı böbrek fonksiyon bozukluğunun sebebi, plazmada yüksek yoğunluklarda uzun süre kalmasıdır. Ayrıca bu durum MTX'in diğer toksik etkilerinin, özellikle kas

güçsüzlüğü, mukoza yangısı, hepatit ve dermatitin belirgin bir şekilde artmasına neden olabilir (Widemann ve Adamson, 2006).

Coleshowers ve ark. (2010) Wistar sıçanlara 6 hafta süreyle, 13,4 mg/kg dozunda (haftada bir) ağızdan MTX uyguladıkları çalışmada, MTX gruplarında 2., 3., 4., 5. ve 6. haftalarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer dokularında SOD, CAT ve GSH-Px etkinliklerinde azalma, malondialdehit (MDA) düzeylerinde ise artma olduğunu tespit etmişlerdir.

Hadi ve ark. (2012), tavşanlarda MTX'in neden olduğu hepatotoksisite üzerine metforminin iyileştirici etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada, MTX verilen grupta, kontrol grubuna göre karaciğer fonksiyon parametreleri olan ALT, AST, ALP ve bilirubin seviyelerinde önemli düzeyde artışların olduğunu ve karaciğerde önemli patolojik bulguların görüldüğünü belirtmişlerdir.

Dalaklıoğlu ve ark. (2013), sıçanlarda MTX ile indüklenen karaciğer hasarına resveratrolün iyileştirici etkisini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre serum ALT, AST ve ALP ile karaciğer CAT etkinliği ve MDA düzeyinde artışa yol açtığını vurgulamışlardır.

Ali ve ark. (2014b), MTX ile indüklenen karaciğer hasarı üzerine krisinin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre serum ALT ve AST düzeylerinde artış ile karaciğer dokusunda SOD, CAT ve GSH-Px etkinliği ve GSH düzeylerinde azalmaya, MDA düzeyinde ise artışa yol açtığını ifade etmişlerdir.

Akbulut ve ark. (2014) sıçanlarda MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesi üzerine amifostin, askorbik asit ve N-asetil sistein'in koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grubun karaciğerinde oksidatif stres kaynaklı yapısal ve fonksiyonel hasarın oluştuğunu bildirmişlerdir.

Hafez ve ark. (2015), MTX ile indükledikleri hepatotoksisite ve nefrotoksisite üzerine etanerseptin ve aminoguanidinin iyileştirici etkilerini araştırdıkları çalışmada,

MTX verilen grupta kontrol grubuna göre TNF- α , iNOS ve kaspaz-3 ekspresyonlarında artışa yol açtığını belirtmişlerdir.

Abdel-Daim ve ark. (2017), biyolojik olarak aktif bir flavonoid olan diosminin, farelerde MTX kaynaklı hepatik, böbrek ve kalp hasarlarına karşı etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada, MTX verilen grupta dokularda kontrol grubuna göre SOD, CAT ve GSH-Px etkinlikleri ile GSH düzeylerinde azalmaya, MDA düzeylerinde ise artışa yol açtığı tespit edilmiştir.

Abo-Haded ve ark. (2017) MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesinde, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre, karaciğer dokusunda SOD etkinliği ve GSH düzeylerinde düşüşe, MDA düzeyinde ise anlamlı artışa yol açtığını belirtmişlerdir.

Ameen ve ark. (2019), sıçanlarda MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesi üzerine Mezenkimal Kök Hücre tedavisinin iyileştirici etkisini araştırdıkları çalışmada, MTX'in, serum karaciğer enzimleri ve MDA düzeyleri ile iNOS ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı ve serum CAT etkinliğini ise düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

2.3. Serbest Radikaller

Bir atom molekülü, etrafında dönen elektron çiftleri ve merkezi bir çekirdekte oluşur. Bununla birlikte, bazı atomlar ve moleküller en dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronlara sahiptirler ve bunlara “serbest radikaller” denir. Serbest radikaller genellikle kararsız ve yüksek oranda reaktiflerdir (Li ve ark., 2015; Yoshikawa ve Naito, 2002). Biyolojik moleküllerin çoğu iki veya sekiz elektronun tam bir yörüngesiyle çevrili bir protein çekirdeğinden oluşur. Bu tam dış yörüngeye sahip olan moleküller, dış yörüngede eşleşmemiş elektronu bulunan moleküllerden daha karardır. Eşleşmemiş elektron, başka bir molekülden bir elektron alabilir, başka bir moleküle bağlanabilir veya kendisini tamamen ayırabilir. Serbest radikalın diğer moleküllerden elektron alması/vermesi ya da diğer moleküllerle birleşmesi onu kararsız hale getirir (Kerr ve ark., 1996). Serbest radikaller pozitif yüklenebilir, negatif yüklenebilir veya elektriksel olarak nötr olabilir. Bir türün eşleşmemiş elektronu ve

radikal doğası geleneksel olarak kalın bir üst nokta ile yazılarak belirtilir (Cheeseman ve Slater 1993). Genel olarak, serbest radikaller kısa ömürlüdür, yarı ömürleri mili-, mikro- veya nanosaniyedir (Devasagayam ve ark., 2004).

Yaşam için vazgeçilmez bir unsur olan oksijen, bazı durumlarda canlı vücudu üzerinde zararlı etkiler gösterebilir. Oksijenin potansiyel olarak zararlı etkilerinin çoğu, ROS olarak bilinen ve diğer maddelere oksijen verme eğilimi gösteren bir dizi kimyasal bileşikler oluşturmasından kaynaklanmaktadır (Lobo ve ark., 2010). Reaktif oksijen türleri, moleküler oksijenden daha reaktif olan oksijen formlarını tanımlamak için kullanılan bir terimdir (Abouzari ve Fakheri, 2015).

Canlı vücudunda oluşan ve farklı hastalık durumlarından da sorumlu en önemli oksijen içeren serbest radikaller, oksijen kaynaklı radikaller ve azot kaynaklı radikallerdir. Başlıca reaktif oksijen ve azot türleri radikal ve radikal olmayanlar olmak üzere 2'ye ayrılır. Oksijen türlerinin radikal olanları süperoksit, hidroksil ve peroksil radikalleri; radikal olmayanları ise H_2O_2 , hipoklorik asit ve ozondur. Azot türlerinin radikal olanları azot dioksit ve NO, radikal olmayanları ise peroksinitrit, nitril klorit ve nitroksil anyonudur (Li ve ark., 2015; Singh ve ark., 2015) (Tablo 2.1).

Canlı organizmalar aktif oksijen türleri ve serbest radikalleri uzaklaştırmak ya da yok etmek için antioksidan sistemlere sahip olduğundan, bu oksijen metabolizmasının yan ürünleri fizyolojik koşullar altında vücut için tehdit oluşturmaz. Ancak bu aktif oksijen türleri veya serbest radikaller aşırı miktarda üretildiğinde, oksidan/antioksidan arasındaki denge bozulur ve oksidatif stres oluşur. Sonuç olarak, aktif oksijen türleri ve serbest radikaller biyolojik membran ve dokulardaki moleküllere saldırabilir ve bunun sonucunda çeşitli hastalıkların oluşmasına sebep olurlar (Yoshikawa ve Naito, 2002).

Serbest radikaller, hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açan önemli makromoleküllere saldırır. Lipitler, nükleik asitler ve proteinler ana hedeflerdir. Serbest radikaller ve diğer aktif oksijen türleri, canlı organizmalarda normal metabolik faaliyetler veya X ışınları, ozon, sigara, hava kirleticiler ve endüstriyel kimyasallara maruz kalma gibi dış etkenler sonucu oluşur. Serbest radikaller, hücrelerde hem

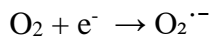
enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucu meydana gelebilir. Enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin (PG) sentezinde ve sitokrom P-450 sisteminde oluşurken, oksijenin organik bileşiklere ve iyonlaştırıcı radyasyonlara maruz kalmasıyla başlatılan enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucunda da ortaya çıkabilirler (Bagchi ve Puri, 1998).

Tablo 2.1. Önemli serbest radikaller (Singh ve ark., 2015)

Serbest Radikalin Sembolu	Serbest Radikalin adı
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HO^{\cdot}	Hidroksil radikali
1O_2	Singlet oksijen
HOO^{\cdot}	Hidroperoksil radikali
$LOOH$	Alkilhidroperoksit
LOO^{\cdot}	Alkilperoksil radikali
LO^{\cdot}	Alkoksil radikali
$ClO^{\cdot-}$	Hipoklorit iyonu
$Fe^{4+}O$	Ferril iyonu
$Fe^{5+}O$	Periferril iyonu
NO^{\cdot}	Nitrik oksit

2.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), biyolojik sistemler üzerine olumsuz etkileri olan önemli bir anyondur. $O_2^{\cdot-}$ aerobik metabolizma sırasında O_2 'nin kısmi indirgenmesinin birincil yan ürünü olarak üretilir ve ROS'ların en önemli bileşenidir (Jalilov ve ark., 2016).

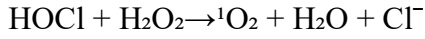


Süperoksit anyonu normal olarak organizmada ya SOD ya da CAT enzimleri ile önce H_2O_2 'ye sonra da suya dönüşerek, zararsız hale getirilir (Conner ve Grisham,

1996). Süperoksit üretimi çoğunlukla hücrenin mitokondrisi içinde gerçekleşir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, memeli hücresinde yaşam için gerekli olan ATP'nin ana kaynağıdır. Enerji iletimi sırasında, az sayıda elektron oksijene sızar ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol alan $O_2^{\cdot-}$ 'yi oluşturur (Valko ve ark., 2007). Süperoksit anyonu canlı organizmada en yaygın olarak üretilen serbest radikaldir ve makrofajlar ile nötrofiller gibi fagositik hücreler $O_2^{\cdot-}$ 'nin önde gelen kaynaklarıdır (Scheibmeir ve ark., 2005).

2.3.2. Singlet Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen, moleküler oksijenin kısa ömürlü, yarı kararlı ve uyarılmış halidir. Bileşik oksidasyon için oldukça uygun bir reaktiftir; karbon-oksijen ve heteroatom-oksijen bağları oluşturabilir (Ghogare ve Greer, 2016). Canlı dokularda nötrofillerin ve eozinofillerin aktif hale getirilmesiyle oluşur. Bunun yanı sıra bazı *laktoperoksidaz*, *dioksijenaz* ve LOX enzimlerinin katalizör olarak kullanıldığı bir takım enzimatik reaksiyonlar ile de meydana gelebilir. Güçlü bir oksidasyon ajanı olarak DNA ve dokularda hasar oluşturabilir (Phaniendra ve ark., 2015).



2.3.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit yaygın olarak antioksidan savunma enzimlerinin etkisiyle azaltılması gereken, sitotoksik bir madde olarak kabul edilir. Kimyasal açıdan zayıf bir reaktiftir, hafif oksitleyici veya indirgeyici bir madde olarak işlev görebilir. Oldukça reaktif tiyol grupları veya metiyonin kalıntılarına sahip olmayan lipitler, DNA ve proteinler dahil olmak üzere çoğu biyolojik molekülü kolayca oksitleyemez. Hidrojen peroksit toksisitesini büyük ölçüde ya ultraviyole ışığına maruz kalınmasıyla ya da *in vivo* olarak demir gibi bir dizi geçiş metal iyonlarıyla etkileşime girerek reaktif hidroksil radikaline (OH^{\cdot}) dönüşmeye hazır olmasından kaynaklanmaktadır. Hidrojen peroksit, hem enzimatik olmayan hem de SOD enzimleri tarafından katalize edilen, $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismuatasyonu (ters dönüşümü) ile *in vivo* olarak üretilir. Bunun yanı sıra

doğrudan, glikollat ve monoamin oksidazlar gibi bir dizi oksidaz enzimi ve ayrıca yağ asitlerinin β -oksidasyonu için peroksizomal yolla üretilir. Bununla birlikte, kalp kası dışında, çoğu dokudaki mitokondri, H_2O_2 'yi ortadan kaldırmak için sınırlı bir kapasiteye sahiptir, çünkü bunlar *in vitro* ve *in vivo* olarak önemli miktarlarda H_2O_2 üretmektedirler. Mitokondri, GSH-Px ve *tioredoksin-bağımlı peroksidaz* aktiviteleri ile H_2O_2 'yi bir miktar ortadan kaldırabilmektedir (Halliwell ve ark., 2000).

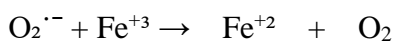
2.3.4. Peroksil Radikali (ROO[•])

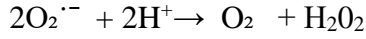
Peroksil radikalleri, yağ asiti yan zincirlerine saldırarak hidrojen molekülünü ayırarak kadar reaktiftir. Metal iyonları lipid hidroperoksitlerini ROO[•]'ya ayrıştırarak LPO'yu da hızlandırabilir. Peroksil radikali, hidrojen atomlarını yağ asidi yan zincirlerinden çekerek LPO'nun zincir reaksiyonunu daha da ilerletebilir (Halliwell, 1989).

2.3.5. Hidroksil Radikali (OH[•])

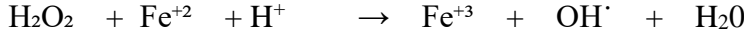
Hidroksil radikali en yaygın şekilde oluşan aktif oksijen türlerinden biridir (Scheibmeir ve ark., 2005). Hemen hemen tüm bileşiklere elektronları aktarabildiği için en fazla hasara neden olan serbest radikaldir. Hidroksil radikalinden meydana gelen hasarın türü, üretildiği sırada hangi yapılara yakın olduğuna bağlıdır. Örneğin, hücre zarı, esas olarak %28 lipidlerden, %55 proteinden, %14 kolesterol ve %3 karbonhidratlardan oluşur. Hidroksil radikali hücre zarının yakınında üretildiğinde, hücre zarının lipid, protein veya kolesterol bileşenleriyle etkileşime girerek hücre zarının bütünlüğünü bozar. Hidroksil radikali çekirdeğin içinde üretilirse, DNA'nın yapısını değiştirir ve genetik kodun uygun şekilde onarılmasını önler. DNA'nın oksijen radikalleri tarafından değiştirilmesi, tüm hücrenin tahrip olmasına neden olur (Kerr ve ark., 1996).

Geçiş metallere varlığında süperoksit anyonu Haber-Weiss tepkimesi ile moleküler oksijen ve H_2O_2 oluşur (Koppenol, 2001).





Haber-Weiss tepkimesi sonucu H_2O_2 'den Fe^{+2} katalizli Fenton reaksiyonu ile OH^{\cdot} radikali oluşur (Chen ve Schopfer, 1999).



2.4. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki kritik denge bozulduğunda ortaya çıkan oksidatif hasar durumudur (Sies, 2015). Oksidatif stres belirli fizyolojik koşullarda faydalıdır. Örneğin, uygun fiziksel egzersiz ve iskemi sırasında biyolojik savunma mekanizmalarını güçlendirebilir (Apel ve Hirt, 2004; McCord, 2000). Bununla birlikte, faydaları bu özel durumlar ile sınırlıdır ve diğer birçok durumda, yüksek seviyelerde ROS ve oksidatif stres, nekrotik ve/veya apoptotik mekanizmalar yoluyla hücre ölümüne dolayısıyla hücre ve doku hasarlarına neden olur (Lobo ve ark., 2010).

Oksidatif stres karmaşık patolojik bir mekanizma olarak kabul edilmiştir. Özellikle çeşitli organ hasarları ile hastalıkların başlamasına ve ilerlemesine sebep olur. Alkol, ilaçlar, çevresel kirleticiler ve ışınlar dahil birçok risk faktörü oksidatif strese neden olabilir (Li ve ark., 2015).

Yoğun egzersiz, akut yangı ve sepsis sebebi ile fagositik etkinliğin artması ve antioksidanlardan eksik beslenme sonucu oksidan/antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres çeşitli hastalıkların (kronik obstrüktif akciğer hastalığı, ateroskleroz, kanser, kronik yangı gibi) patogenezinde rol oynar (Lemineur ve ark., 2006; McCord, 2000).

Aktif oksijen türlerinin endojen ve ekzojen kaynaklardan sürekli akışı, birçok hücrel işlevi değiştirir. Oksidatif hasara en çok maruz kalan biyolojik hedefler arasında enzimler, hücre zarları ve DNA yer alır (Kohen ve Nyska, 2002). Oksijen radikalleri, proteinlerin hızlı bozulmalarına neden olabilecek oksidatif

mekanizmaların önemli bir nedeni olarak gösterilmektedir (Reznick ve Packer, 1994). Proteinler oksidatif olarak spesifik amino asidin oksidatif modifikasyonu, serbest radikal aracılı peptit bölünmesi ve LPO ürünleri ile reaksiyona bağlı olarak protein çapraz bağ oluşumu ile üç şekilde değişikliğe uğrarlar. Oksidasyona triptofan, tirozin, pirolin, metiyonin, sistein, arginin ve histidin gibi amino asitler oldukça duyarlıdır (Lobo ve ark., 2010; Mercuri ve ark., 2000). Serbest radikal kaynaklı proteinlerde meydana gelen değişiklikler, enzimlerin parçalanmasını artırır. Protein ürünlerine oksidatif hasar, enzimlerin, reseptörlerin ve taşıt proteinlerinin aktivitesini etkileyebilir. Oksidatif olarak hasar görmüş protein ürünleri, hücre zarına ve birçok hücre fonksiyona zarar verebilecek çok reaktif gruplar içerebilir. Peroksil radikalının proteinlerin oksidasyonuna neden olan serbest radikal olduğu düşünülmektedir. Reaktif oksijen türleri, proteinlere zarar verebilir ve metiyonin sülfoksit ve protein karbonillerinin oluşumu dahil olmak üzere karbonilleri ve diğer amino asit değişiklikleri ile metiyonin sülfoksit ve protein peroksit oluşumunu içeren diğer amino asit değişikliklerine neden olabilir. Protein oksidasyonu, sinyal iletim mekanizmasının, enzim aktivitesinin, ısı stabilitesinin ve yaşlanmaya neden olan proteoliz duyarlılığının değişmesine sebep olur (Lobo ve ark., 2010).

Lipitlerin peroksidasyonu, biyolojik membranların doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girdiğinde meydana gelir ve radikal zincir reaksiyonu ile ilerler. Oksidatif olaylar, zarların fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişikliklere neden olur, böylece hücre içi organellerin şişmesi ve zarların parçalanmasıyla akışkanlık ve geçirgenliklerini değiştirir. Hidroksil radikalının ROS'u başlattığı, hidrojen atomunu çıkardığı ve böylece lipit radikalini ürettiği ve ayrıca dien konjugatına dönüştürüldüğü düşünülmektedir. Ayrıca, oksijen ilavesiyle ROO[•] meydana gelir. Bu yüksek oranda reaktif radikal, lipit hidroperoksiti (LOOH) ve yeni bir radikal oluşturan başka bir yağ asidine saldırır. Böylece LPO yayılır. Lipit yükseltgenme indirgenme durumunun değişikliği, sinyal iletimi ve iyon değişimi gibi zarların spesifik özelliklerini de etkileyebilir. Ayrıca, lipit peroksitleri, iltihaplanma ve doku hasarından sonra yeniden yapılanma öncüleri olan fibroblastik hücre aktivasyonunun öncü mediyatörleridir. Lipit peroksidasyonundan dolayı, örneğin alkanlar, MDA ve izoprostanlar gibi birçok

bileşik oluşur. Bu bileşikler LPO ölçümlerinde belirteç olarak kullanılmaktadır (Lobo ve ark., 2010; Vendemiaie ve ark., 1999).

DNA ve RNA oksidatif hasara karşı duyarlıdır. Özellikle yaşlanma ve kanserde DNA'nın ana hedef olduğu düşünülmektedir. Glikol, timidin glikol ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin gibi oksidatif nükleotidlerin UV radyasyonu veya serbest radikal hasarı ile DNA'da oluşan oksidatif hasar sırasında arttıkları görülmüştür. Mitokondriyal DNA'nın, kanser dahil birçok hastalıkta oksidatif hasara daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. 8-hidroksi-2-deoksiguanozinin oksidatif stres için biyolojik belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir (Kasai, 1997; Valavanidis ve ark., 2009).

2.5. Antioksidan Enzimler/Sistemler

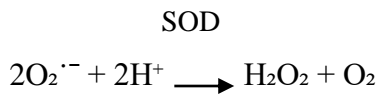
Antioksidanlar, vücudu serbest radikallerin neden olduğu kimyasal reaksiyonlardan kaynaklanan hasara karşı koruyan fizyolojik maddelerdir (Lobo ve ark., 2010). Bir antioksidan, oksitlenebilir, oksidasyonu geciktirebilir veya önleyebilir. Vücuttaki karbonhidratlar, yağlar, proteinler ve DNA oksitlenebilir. Antioksidanlar, serbest radikalleri, onlarla birleşmesi muhtemel olan moleküllerden uzaklaştıran maddelerdir (Kerr ve ark., 1996; Lobo ve ark., 2010). Antioksidanlar serbest radikallerin neden olduğu zincirleme reaksiyonu durdurarak, serbest oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek, oluşumlarını önleyerek ve hücre yapısında oluşturdukları hasarı onararak etki gösterirler. Halen klinik çalışmalarda kullanılan çeşitli tiplerde antioksidanlar vardır: Vücutta doğal olarak meydana gelenler (alfa-tokoferol, GSH veya SOD), demir bağımlı serbest radikal bağlayanlar (probucol) veya diğer klinik uygulamalarda kullanılan antioksidan özelliklere sahip farmakolojik ajanlar (Kerr ve ark., 1996).

Geçiş metal iyonlarının varlığında H_2O_2 , süperoksit ile hidroksil radikallerine indirgenebilir. Süperoksit ve H_2O_2 , OH'den çok daha az reaktiftir ve bu iki reaktifi üreten bir hücre, yüksek derecede reaktif hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olabilir. Bilinen bir hidroksil radikal temizleyicisi olmadığı için, bu radikaller sebebiyle oluşan oksidatif hasarı önlemenin tek yolu, hidroksil radikali oluşumuna yol

açan reaksiyonları kontrol etmektir. Bu nedenle, hücrelerde süperoksit, H₂O₂ ile Fe ve Cu gibi geçiş metallere yoğunluklarını kontrol altına almak gerekir (Apel ve Hirt, 2004). Enzimatik antioksidan savunma sistemleri arasında SOD, GSH-Px, GSH-R, *glutasyon transferaz*, *tiyoredoksin redüktaz*, *CAT*, *hemoksijenaz*, *peroksiredoksin* (Prx) ve *paraoksonaz I* sayılabilir. Enzimatik olmayan antioksidanlar; askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), GSH, karotenoidler, flavonoidler, transferrin, albümin, bilirubin ve ürik asit ile temsil edilir. Normal koşullar altında, bu moleküller, hücrelerde optimum etkinlik ve yoğunluk gösterdiklerinde hücre içi redoks dengesini korurlar. Bu denge hücrelerin hayatta kalması için esastır (Sánchez-Valle ve ark., 2012).

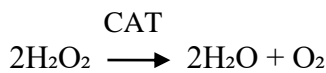
2.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

İlk olarak 1969'da keşfedilen SOD, vücutta hücresel sitoplazmada bulunan bakır/çinko SOD (SOD1), mitokondride yerleşmiş manganez MN-SOD (SOD2) ve hücre yüzeyinde ve ekstrasellüler matrikste bulunan ekstrasellüler (EC)-SOD (SOD3) olmak üzere üç formda üretilir. Her üç SOD formunun antioksidan özellikleri, dokunun iskemik periyodları sırasında üretilen oksijen kaynaklı serbest radikallerden zarar görmesini önler. SOD, süperoksit radikalini, H₂O₂ haline dönüştüren bir enzimdir (Jung, 2014; Kerr ve ark., 1996; Sánchez-Valle ve ark., 2012).



2.5.2. Katalaz (CAT)

Katalaz demir içeren antioksidan bir enzim olup öncelikle peroksizomlarda bulunur. İki H₂O₂ molekülü arasındaki bir reaksiyonu katalize ederek H₂O₂'yi detoksifiye eder. Reaksiyon su ve oksijen üretimi ile sonuçlanır (Sánchez-Valle ve ark., 2012).



2.5.3. *Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)*

Glutasyon peroksidaz, H₂O₂'yi detoksifiye eden, bunun için GSH'ı organik ve lipit hidroperoksidlerini indirgeyici bir ajan olarak kullanan ve bu şekilde oksidatif strese karşı yardımcı koruma sağlayan antioksidan bir enzimdir. *Glutasyon peroksidaz*, her biri aktif bölgesinde selenyum içeren dört protein alt biriminden oluşur. *Glutasyon peroksidaz*, H₂O₂'yi GSH'ın oksidasyonu ile uzaklaştırır. Özellikle mitokondri, endoplazmik retikulum veya sitozolik CuZn SOD kaynaklı ortaya çıkan H₂O₂'nin bertarafında GSH-Px etkilidir (Abuzari ve Fakheri, 2015).



2.5.4. *Glutasyon (GSH)*

Nonenzimatik antioksidanlar kategorisinde bulunan GSH, hepatositler dahil tüm hücrelerde yüksek miktarlarda bulunan bir tripeptittir. Sitozolde, iki aşamalı enerji tüketen bir reaksiyon ile sistein ve glisinden sentezlenerek endoplazmik retikulum ve mitokondri dahil olmak üzere farklı organellere dağıtılır. Glutasyon, proteinlerin disülfid bağlarının düzenlenmesinde, elektrofiller veya oksidanların yok edilmesinde önemli rol oynar. Mitokondride GSH, esas olarak indirgenmiş formda bulunur. Mitokondriyal elektron taşıma zincirinde üretilen ROS'u detoksifiye eder, böylece organelleri korur. Mitokondriyal GSH'ın tükenmesi, mitokondriyal işlevi tehlikeye atabilir ve hücreleri farklı oksidan kaynaklı toksisite türlerine karşı hassaslaştırarak hücre ölümüne yol açar. Bu nedenle, GSH'nin ana işlevi, H₂O₂ ile reaksiyona girmek ve GSH-Px yoluyla glutasyon disülfid (GSSG) oluşturmaktır. Glutasyon ayrıca diğer ROS ve RNS'leri de temizler, bakır ile şelat oluşturur ve proteinleri sülfidril gruplarının oksidasyonunu önler (Fernandez-Checa ve Kaplowitz, 2005; Sanchez-Valle ve ark., 2012).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan Materyali

Araştırmada hayvan materyali olarak kullanılan fareler Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi ve deneysel uygulamalar aynı yerde gerçekleştirildi.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Apigenin (Cayman 10010275),
Asetik asit (Merck 100056.2500),
Bakır sülfat (CuSO₄) (Aldrich 451657),
Bütanol (B4800/17),
Dimetil sülfoksit (DMSO) (Tekkim 201790.01000),
Dipotasyum fosfat (K₂HPO₄) (Merck 1551128)
Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) (Merck 106580),
Ditiyobisnitrobenzoik asit (DTNB) (TCI D0944),
Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma E5134),
Glutasyon redüktaz (GSH-R) (Sigma G3664),
Hidrojen peroksit (H₂O₂) (Merck 107209),
İndirgenmiş glutasyon (Cayman 10007461),
İsofluran (Adeka),
Metotreksat (Cayman 13960),
Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat redüktaz (NADPH) (Cayman 9000743),
Piridin (Sigma-Aldrich 270970),
Potasyum sodyum tartarat (Merck 108087),
SOD kit (Elabscience Mouse SOD1, Soluble ELISA Kit E-EL-M2398),
Sodyum bikarbonat (NaHCO₃) (Merck 1613655),
Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck 106482),
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma L3771),
Sodyum klorür (NaCl) (Merck 106400),

Sodyum potasyum tartarat (Sigma-Aldrich S2377),
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck 104873),
Potasyum klorür (KCl) (Merck 1048170250)
t-Bütilhidroperoksit (Aldrich 458139),
Trikloroasetik asit (TCA) (Merck 100810),
Tiyobarbitürik asit (TBA) (Sigma T5500),
Tris (Sigma T1503),
Yapıştırıcı (Entellan-Merck 107961).

3.1.3. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

Analitik terazi (Shimadzu AY-220),
ELISA okuyucu (ELx800, Biotek),
Hassas terazi (BX 4200H),
Homojenizatör (IKA),
Işık mikroskopu (Olympus CX21),
Kamera (Olympus DP26),
Magnetik karıştırıcı (IKA-RH Basic 2),
Mikrotom (Leica 2155 rotary),
Otoanalizör (GesamChem-200),
Ototeknikon (Leica ASP300S),
pH metre (Metrohm 704),
Soğutmalı santrifüj (Eppendorf-5810R),
Su banyosu (Mettler WNB 14),
Vorteks (Yellowline TTS2).

3.2. Yöntem

3.2.1. Etik

Araştırma, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 19/07/2018 tarihli toplantısında alınan 374 sayılı karar doğrultusunda gerçekleştirildi.

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü

Bu araştırmada kontrol, MTX, Apig ve Apig+MTX'nin birlikte verildiği olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Her bir grupta 12 adet olmak üzere toplam 48 adet (yaklaşık 25-30 g ağırlığında 10-12 haftalık) CD-1 erkek fare kullanıldı (Tablo 3.1). Hayvanlar 12 saat ışık/karanlık siklusu ayarlanabilir odalarda %55-65 nem ve 21-23 °C sıcaklıkta bakıldı. Tüm hayvanlara *ad libitum* pelet yem ve su verildi. Deneme süresi boyunca hayvanlara %24 ham protein, %6,19 ham selüloz ve 3.100 kcal/kg metabolik enerji içeren fare pelet yemi kullanıldı.

Hayvanlara verilen MTX'in dozu Abdel-Daim ve ark. (2017), Apig'in dozu ise Hassan ve ark. (2017) yaptıkları araştırmalardan yararlanılarak belirlendi. Metotreksat %0,9'luk NaCl'de, apig ise %0,1 DMSO'da çözdürüldü ve maddeler hayvanlara periton içi (p.i) olarak uygulandı.

Tablo 3.1. Araştırma gruplara verilen maddeler ve verildiği günler (n: 12).

Deney Grupları	Verilen maddeler- Verildiği günler
Kontrol	%0,1'lik DMSO p.i (2 ml/kg c.a./gün)-4 gün (4-7. günler)
MTX	20 mg/kg/c.a/gün MTX tek doz p.i-4. gün (fizyolojik NaCl içinde)
Apig	3 mg/kg/c.a/gün Apig p.i (% 0,1'lik DMSO)- 4 gün (4-7. günler)
Apig+MTX	3 mg/kg/c.a/gün Apig p.i-7 gün (1-7. günler) + 20 mg/kg/c.a/gün MTX p.i tek doz- 4.gün

3.2.3. Örneklerin Toplanması

Çalışma 8. günde sonlandırıldı, hayvanların tamamı %2-3 oranında izofluran (inhalasyon) ile anesteziye alınarak kalpten kan alma işlemi gerçekleştirildi ve hayvanlar anestezi altındayken servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi edildi. Karaciğer ve böbrek örnekleri alındı. Alınan kanların bir kısmı antikoagulan içermeyen tüplere, bir kısmı da K₃EDTA içeren tüplere koyuldu. Antikoagulan

içermeyen kanlar 4.000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serum örneklerinde AST, ALT ve kreatinin değerleri; K₃EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinde ise Hemogloblin (Hb) değerleri bakıldı. Biyokimyasal parametrelerin ölçümü otoanalizörde gerçekleştirildi.

3.2.4. Kan ve Doku Analizleri

3.2.4.1. Eritrositlerin Yıkınması ve Hemolizatın Hazırlanması

K₃EDTA içeren tüplere alınan kan örnekleri 4 °C de 4.000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Plazma kısmı ayrılarak, -20 °C'de analiz yapılncaya kadar saklandı. Geride kalan kısmına, hacminin 3 katı kadar pH 7,4'e ayarlanan tuzlu fosfat tampon çözeltisi eklenerek, 4.000 devirde 5 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan kısım atıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Eritrosit kısmına 1:1 hacimde tuzlu fosfat tampon çözeltisi eklenerek hemolizatlar -20 °C'de saklandı.

3.2.4.2. Dokuların Homojenizasyonu ve Homojenatın Hazırlanması

Dokular öncelikli olarak %0,9'luk tuzlu su ile yıkandı ve dokulardan 1 g alınarak 1/5 oranında hazırlanan tampon (140 mM KCl, 10 mM NaHCO₃, 3 mM KH₂PO₄ ve 2 mM K₂HPO₄/L; 950 ml deiyonize suda çözdürülerek 5 N NaOH ile pH'sı 7,2'ye ayarlandı ve 1.000 ml'ye tamamlandı) ile homojenizasyonu yapıldı. Homojenat daha sonra 15.000 devirde 45 dakika (4 °C) santrifüj edildi ve üst kısım ayrıldı. Örnekler analizleri yapılncaya kadar -20 °C'de saklandı.

Hemolizat ve doku homojenat örneklerinde CAT ve GSH-Px etkinliği, GSH düzeyleri ile plazma ve doku homojenat örneklerinde SOD etkinliği ve MDA düzeyleri ölçüldü.

3.2.4.3. Süperoksit Dismutaz 1 (SOD1) Analizi

Plazma ve doku homojenat örneklerindeki SOD etkinliği ticari kit (Elabscience Mouse Superoxide Dismutase 1, Soluble ELISA Kit E-EL-M2398) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Bu amaçla standart

solüsyonlardan ve plazma/homojenat örneklerinden kuyucuklara 50 µl konuldu. Sonra her bir kuyucuğa 100 µl biotinlenmiş antikor çözeltisi ilave edildi ve mikropleyitin üzeri kapatılarak 37 °C'de 45 dakika bekletildi. Süre sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve kuyucuklar yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkandı. Ardından her bir kuyucuğa 100 µl konjugat çözeltisi ilave edildi ve mikropleyitin üzeri kapatılarak 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Kuyucuklar tekrar boşaltılarak 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 90 µl substrat çözeltisi eklendi ve mikropleyitin üzeri kapatılarak 37 °C'de 15 dakika bekletildi. Ardından kuyucuklara 50 µl stop çözeltisi konuldu ve 450 nm'de okundu. *Süperoksit dismutaz* etkinliği için standart yoğunlukları (0; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; 5; 10 ng/ml) ve bu standartlar için ölçülen absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi ve sonuçlar hesaplandı. Ölçülen SOD1 etkinliği plazma ve homojenat örneklerinde ng/ml olarak ifade edildi.

3.2.4.4. Katalaz (CAT) Analizi

Hemolizat ve homojenat örneklerinde CAT etkinliği Aebi (1984)'nin bildirdiği yöntemle yapıldı. Bu yöntemin prensibi, ortama eklenen H₂O₂'nin örneklerdeki CAT tarafından parçalanması esasına dayanır. Hemolizat veya homojenattan 50 µl alındı ve 200 µl distile su eklenerek 1:5 oranında seyreltildi. Bu karışımdan 50 µl alınarak 4950 µl fosfat tamponu eklenerek 1:100 oranında ikinci seyreltme yapıldı (toplam seyreltme oranı 1:500). Eş zamanlı olarak kör ve örnek için 2 ml süpernatant alındı, köre 1 ml fosfat tampon çözeltisi, örneğe ise 1 ml H₂O₂-fosfat tamponu çözeltisi eklendi. Absorbanslar 240 nm'de köre karşı 0. ve 30. saniyelerde spektrofotometrede okundu. Ölçülen CAT etkinliği hemolizat ve homojenat örneklerinde sırasıyla k/gHb, k/g-protein olarak ifade edildi.

3.2.4.5. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizi

Hemolizat ve homojenat örneklerinde GSH-Px etkinliği Paglia ve Valentine'nin (1967) bildirdiği yöntemle yapıldı. Yöntemin prensibi, kofaktör olarak kullanılan NADPH varlığında GSH-Px tarafından üretilen okside GSH'ın, GSH-R tarafından indirgenmesi esasına dayanır. Analizde kör ve örnek tüplere 100 µl Tris-EDTA (1 M Tris tamponu ve 5 µM EDTA ile hazırlandı), 20 µl 0,1M indirgenmiş

GSH, 100 µl 2 µM NADPH ve 100 µl 10 U GSH-R ilave edildi. Örnek tüplere 10 µl hemolizat veya homojenat ile karıştırıldı ve 37 °C’de 10 dakika bekletildi. Reaksiyon 7 µM t-butilhidroperoksit eklenmesiyle başlatıldı ve 340 nm’de 0. ile 2,5. dakikalarda spektrofotometrede ölçüldü. Ölçülen GSH-Px etkinliği hemolizat ve homojenat örneklerinde sırasıyla U/gHb ve U/g-protein olarak ifade edildi.

3.2.4.6. Glutatyon (GSH) Analizi

Hemolizat ve homojenat örneklerinde GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay’ın (1968) bildirdiği yöntemle yapıldı. Bu yöntemin prensibi, bir tiyol bileşiği olan GSH’nin DTNB ile reaksiyona girip disülfid bağı kırarak 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) maddesini oluşturması esasına dayanır. Analizde 700 µl %15’lik TCA ve 700 µl örnek (kör için distile su) alındı ve 2.500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Sonra 500 µl süpernatant alındı, 2 ml Tris-EDTA ve 100 µl 0,01 M DTNB eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 412 nm’de absorbans köre karşı spektrofotometrede okundu. Ölçülen GSH düzeyi hemolizat ve homojenat örneklerinde sırasıyla µmol/gHb ve µmol/g-protein olarak ifade edildi.

3.2.4.7. Malondialdehit Analizi

Plazma ve homojenat örneklerinde MDA düzeyleri ölçümü Ohkawa ve ark. (1979)’nin bildirdiği yöntem temel alınarak yapıldı. Yöntemin prensibi asidik ortamda TBA ile LPO’nun son ürünü olan MDA’nın oluşturduğu pembe renkli ürünün spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır. Analiz için 100 µl %8,1 SDS üzerine 200 µl plazma/doku homojenat ilave edilerek karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kör için distile su kullanıldı. Üzerine 750 µl %20’lik asetik asit (pH: 3,5) ve 750 µl %0,6 TBA eklendi. Kaynar su banyosunda 60 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Sonra 2,5 ml butanol:piridin (15:1) karışımı eklendi. Organik (pembe) tabaka ayrıldı ve 532 nm’de köre karşı absorbans spektrofotometrede okundu. Ölçülen MDA düzeyleri plazma ve homojenizat örneklerinde sırasıyla nmol/ml ve nmol/mg-protein olarak ifade edildi.

3.2.4.8. Dokularda Total Protein

Dokulardaki total protein yoğunluğu Gornal ve ark. (1949) bildirdiği Biüret metoduna göre yapıldı. Yöntemin prensibi Biüret ayracında bulunan Cu^{+2} nin proteinlerin yapısındaki azot atomları ile mavi renkli kompleks oluşturması ve bu kompleksin 540 nm'de absorbandsının ölçülmesine dayanmaktadır. Analizde 1 ml homojenat üzerine (kör için 1 ml su üzerine) 4 ml Biüret ayracı (Na-K tartarat+ CuSO_4) karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve absorbands 540 nm'de spektrofotometrede okundu. Dokulardaki total protein miktarı mg/ml olarak ifade edildi.

3.2.4.9. Histopatoloji Yöntemi

Nekropsi sırasında alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehid solüsyonu içinde tespit edildi. Doku örnekleri 2 günlük formaldehid tespiti ardından Leica ASP300S model ototeknikon kullanılarak rutin takip prosedüründen geçirilerek parafine gömüldü. Bloklardan 4-5 saat soğutulmanın ardından Leica 2155 rotary mikrotom ile 5 μm kalınlığında kesilen doku örnekleri lama çekildi ve ardından Hematoksilen-Eozin ile boyandıktan sonra üzerleri lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi.

3.2.5 İstatistiksel Hesaplamalar

Çalışmadan elde edilen veriler SPSS 22 programı ile değerlendirildi. Sonuçlar aritmetik ortalama \pm standart hata (SE) ile ifade edildi. Elde edilen verilerin öncelikli olarak Kolmogorov-Smirnov testi ile parametrik-nonparametrik olup olmadıkları analiz edildi. Veriler normal dağılım gösterdiği için İstatistiksel yöntem olarak One-Way ANOVA testi uygulandı ve gruplar arasındaki olası farklılıklar Duncan testi ile belirlendi. $p < 0,05$ altındaki değerler anlamlı kabul edildi (Özdamar, 2003).

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Parametreler

Metotreksat verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum AST, ALT ve kreatinin değerlerinde önemli düzeyde artış ($p<0,05$) tespit edildi. MTX+Apig'in birlikte verildiği grupta ise, MTX tek başına verildiğinde artan AST, ALT ve kreatinin değerlerinde önemli düzeyde düşüş ($p<0,05$) olduğu belirlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Araştırma gruplarının serum AST, ALT ve kreatinin düzeyleri.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	MTX	Apig	MTX+Apig
AST	98,86±6,79 ^a	417,58±23,33 ^c	120,23±5,71 ^a	193,53±13,31 ^b
ALT	33,50±3,65 ^a	176,50±14,29 ^c	44,50±4,02 ^a	77,17±4,52 ^b
Kreatinin	0,57±0,03 ^a	1,89±0,06 ^c	0,70±0,03 ^a	1,05±0,05 ^b

Değerler aritmetik ortalama ± standart hatayı ifade eder.

a, b, c. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

ALT: mg/dl AST:U/L Kreatinin: mg/dl

4.2. Antioksidan-Oksidatif Stres Parametreleri

Tablo 4.2. Araştırma gruplarının kan SOD1, CAT ve GSH-Px enzim etkinlikleri ile GSH ve MDA düzeyleri.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	MTX	Apig	MTX+Apig
SOD1	2,01±0,02 ^d	0,32±0,02 ^a	1,84±0,02 ^c	1,30±0,03 ^b
CAT	4,72±0,10 ^c	1,51±0,03 ^a	4,60±0,12 ^c	3,00±0,04 ^b
GSH-Px	7,26±0,33 ^c	2,07±0,17 ^a	7,30±0,11 ^c	3,96±0,10 ^b
GSH	9,70±0,14 ^c	3,50±0,25 ^a	8,79±0,50 ^c	7,31±0,22 ^b
MDA	2,69±0,22 ^a	8,47±0,47 ^c	3,25±0,06 ^a	5,19±0,12 ^b

Değerler aritmetik ortalama ± standart hatayı ifade eder.

a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

SOD1: Süperoksit Dismutaz 1 (ng/ml) CAT: Katalaz (k/gHb) GSH: Glutasyon ($\mu\text{mol/gHb}$)

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz (U/gHb) MDA: Malondialdehit (nmol/ml)

Metotreksat verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kan, karaciğer ve böbrek doku örneklerinde MDA düzeyinde önemli bir artış ($p<0,05$); SOD1, CAT ve GSH-Px enzimlerinin etkinliği ile GSH düzeyinde ise önemli bir düşüş ($p<0,05$) tespit edildi. Apig+MTX'in birlikte verildiği grupta ise, MTX tek başına verildiğinde artan MDA düzeyinde önemli bir düşüş ($p<0,05$); SOD1, CAT ve GSH-Px enzimlerinin etkinliği ile GSH düzeyinde ise önemli bir artış ($p<0,05$) belirlendi (Tablo 4.2-4.4).

Tablo 4.3. Araştırma gruplarının karaciğer SOD1, CAT ve GSH-Px enzim etkinlikleri ile GSH ve MDA düzeyleri.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	MTX	Apig	MTX+Apig
SOD1	7,20±0,09 ^d	2,70±0,09 ^a	6,53±0,12 ^c	4,71±0,13 ^b
CAT	68,70±1,50 ^c	26,98±0,84 ^a	65,24±1,22 ^c	47,13±1,25 ^b
GSH-Px	46,51±1,42 ^c	18,39±0,56 ^a	46,56±0,53 ^c	34,88±1,25 ^b
GSH	96,30±9,15 ^c	37,92±1,47 ^a	133,79±2,76 ^d	74,59±3,24 ^b
MDA	1,52±0,15 ^a	8,48±0,48 ^c	1,62±0,13 ^a	4,97±0,30 ^b

Değerler aritmetik ortalama ± standart hatayı ifade eder.

a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

SOD1: ng/ml CAT: k/g-protein GSH: µmol/g-protein

GSH-Px: U/g-protein MDA: nmol/mg-protein

Tablo 4.4. Araştırma gruplarının böbrek SOD1, CAT ve GSH-Px enzim etkinlikleri ile GSH ve MDA düzeyleri.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	MTX	Apig	MTX+Apig
SOD1	3,92±0,02 ^d	1,28±0,04 ^a	3,71±0,05 ^c	2,59±0,04 ^b
CAT	18,66±0,45 ^c	8,23±0,37 ^a	18,49±0,48 ^c	12,55±0,40 ^b
GSH-Px	18,39±0,35 ^c	8,14±0,39 ^a	19,97±0,35 ^d	15,62±0,29 ^b
GSH	26,04±1,15 ^c	12,27±0,47 ^a	23,90±2,42 ^c	18,55±1,07 ^b
MDA	8,80±0,24 ^a	20,23±0,58 ^c	10,16±0,30 ^a	13,38±0,76 ^b

Değerler aritmetik ortalama ± standart hatayı ifade eder.

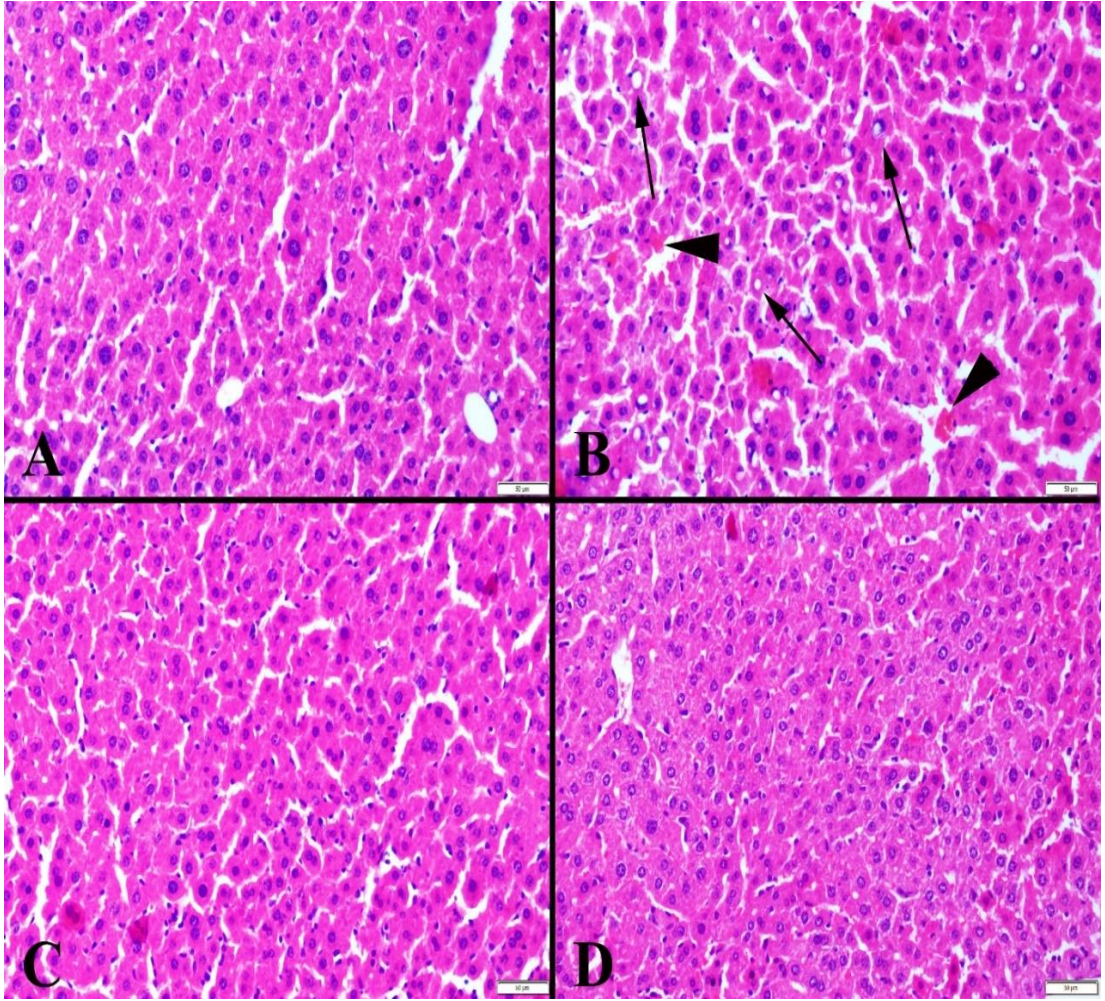
a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

SOD1: ng/ml CAT: k/g-protein GSH: µmol/g-protein

GSH-Px: U/g-protein MDA: nmol/mg-protein

4.3. Histopatolojik Bulgular

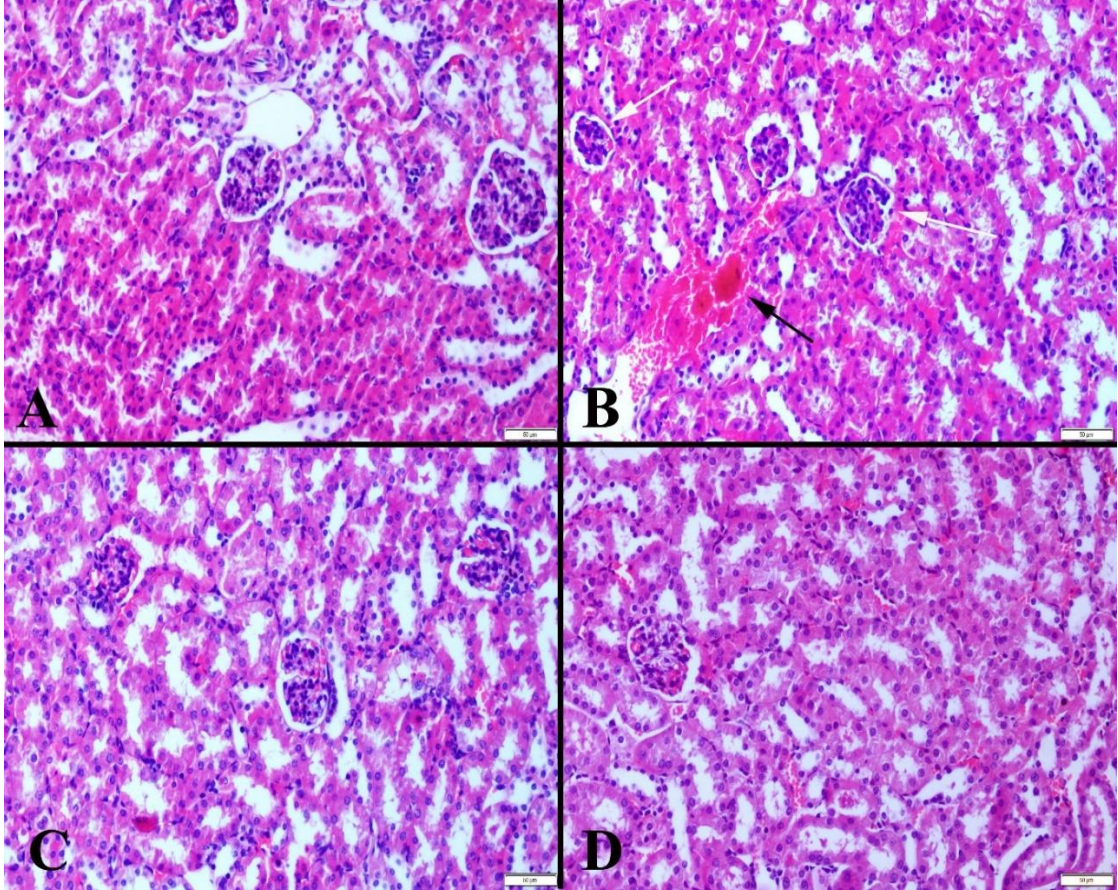
Çalışmada Apig ve kontrol gruplarında karaciğer dokusunda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadığı ve dokuların normal görünümde olduğu tespit edildi. Metotreksat grubunda karaciğerlerde hiperemi, yer yer kanama ve bazı hepatositlerde yağlanma (lipidozis) gözlemlendi. Apig+MTX grubunda mikroskopik olarak karaciğerlerin normal görünümde olduğu saptandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait histopatolojik görünümler.

(A) Kontrol grubundaki normal bir karaciğerin görünümü, (B) MTX grubunda lipidozis (oklar) ve kanama (ok başları), (C) Apig grubunda normal karaciğer histolojisi, (D) Apig+MTX grubunda mikroskopik olarak normal görünümde karaciğer yapısı, HE, Barlar=50µm.

Çalışmada Apig ve kontrol gruplarında böbreklerin normal histopatolojik görünümüne sahip olduğu gözlemlendi. Metotreksat grubunda şiddetli hiperemi, yer yer kanama ve glomeruluslarda sklerozis dikkati çekti. Apig+MTX grubunda, MTX'in yalnız verildiği grupta gözlenen bulguların önemli ölçüde azaldığı görüldü (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait histopatolojik görünüm.

(A) Kontrol grubunda normal görünümde böbrek histolojisi, (B) MTX grubunda kanama (siyah ok) ve glomeruluslarda sklerozis (beyaz oklar), (C) Apig grubunda normal histolojik görünüm, (D) MTX+Apig grubunda mikroskopik olarak normal görünümde böbrek yapısı, HE, Barlar=50µm.

5. TARTIŞMA

Metotreksat çeşitli kanser türleri ile yangısal hastalıkların sağaltımında uzun yıllardır kullanılan folat antagonisti bir ilaçtır. İlacın karaciğer, böbrek, gastrointestinal ve sinir sistemi üzerinde çeşitli toksik etkileri vardır. Metotreksatın toksik etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla beraber, çeşitli mekanizmaların rol oynadığı düşünülmektedir (Ali ve ark., 2014b). Bu mekanizmalardan biri, MTXGlu formunun hücrelerde birikerek, folat düzeylerini düşürmesidir. Diğer bir mekanizma da, MTX'in vücutta serbest radikal türlerinin oluşumunu indüklemesidir. Fazla miktarda oluşan ROS karaciğer, böbrek, ileum gibi organlarda LPO'ya yol açmaktadır (Ali ve ark., 2014b; Çetinkaya ve ark., 2006).

Son yıllarda çeşitli doğal antioksidan maddelerin, etkinlikleri klinik olarak kanıtlandığından, destekleyici tedavi ajanları olarak kullanımları yaygınlaşmıştır. Bu doğal antioksidan maddelerin önemli bir kısmını flavonoidler oluşturmaktadır. Bu bileşikler, toksisitelerinin çok düşük olması ve kolay elde edilebilir olmalarından dolayı, araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Apigenin çeşitli sebze ve meyvelerde bulunan flavonoidlerin alt sınıfı olan flavonların bir üyesidir. Apigeninin antioksidan, yangı ve kanser önleyici etkileri çeşitli araştırmalarla ortaya konulmuştur (Anusha ve ark., 2017; Hassan ve ark., 2017; He ve ark., 2016; Jeyabal ve ark., 2005; Li ve ark., 2017; Panda ve Kar, 2007; Singh ve ark., 2004;).

Oksidatif stres antioksidan enzim sistemlerinin etkinliğinin azalması ve fazla miktarda ROS üretilmesi sonucu meydana gelir. *Süperoksit dismutaz* enzim sistemi, süperoksit anyonunun H_2O_2 ve moleküler oksijene ayrışmasını katalize eder ve ilk savunma hattını oluşturan en önemli antioksidan enzimlerdir. Bu enzimler 3 gruba ayrılır: CuZn-SOD (SOD1) sitoplazmada, Mn-SOD (SOD2) mitokondride, EC-SOD (SOD3) hücre yüzeyinde ve ekstrasellüler matrikste bulunur (Jung, 2014). *Katalaz* ve GSH-Px H_2O_2 de dahil hidroperoksitlerin moleküler oksijen ve suya dönüşmesinden sorumlu enzimlerdir. *Katalaz* enzimi eritrositlerde, karaciğerde ve böbreklerde yüksek düzeyde etkinliğe sahiptir (Deisseroth ve Dounce, 1970). Bu antioksidan enzimler serbest oksijen radikallerine karşı hücreyi oksidatif hasardan koruma işlevini yerine getirmede birlikte görev yaparlar (Jung, 2014).

Bu çalışmada MTX ile indüklenen oksidatif hasara karşı Apig'in koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Farelere tek doz 20 mg/kg c.a verilen MTX'in oksidan/antioksidan dengesini önemli ölçüde değiştirdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda kan, karaciğer ve böbrek dokularında MTX verilen grupta, kontrol grubuna göre SOD1 ve CAT enzimlerinin etkinliği önemli düzeyde düştüğü ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Coleshowers ve ark. (2010) Wistar sıçanlara 6 hafta süreyle, haftada bir 13,4 mg/kg dozunda ağızdan MTX uyguladıkları çalışmada, MTX gruplarında 2., 3., 4., 5. ve 6. haftalarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer dokularında SOD etkinliğinde anlamlı bir azalma ($p<0,05$) olduğunu belirtmişlerdir. Metotreksatin indükleyici olarak kullanıldığı oksidatif strese karşı farklı antioksidan maddelerin kullanıldığı araştırmalar bulunmaktadır (Abdel-Daim ve ark., 2017; Abo-Haded ve ark., 2017; Akbulut ve ark., 2014; Ali ve ark., 2014b; Çetinkaya ve ark., 2006; Dalaklıoğlu ve ark., 2013; Moghadam ve ark., 2015; Vardi ve ark., 2012). Çetinkaya ve ark. (2006) sıçanlarda MTX ile indüklenen karaciğer hasarına karşı N-asetil sisteinin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX (20 mg/kg c.a p.i) verilen grupta, kontrol grubuna göre SOD ve CAT etkinliklerinde anlamlı düzeyde azalma ($p<0,05$) olduğunu tespit etmişlerdir. Vardi ve ark. (2012) sıçanlarda MTX ile (20 mg/kg c.a p.i) indükledikleri hasara karşı klorojenik asitin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta serebellar Purkinje hücrelerinde, kontrol grubuna göre SOD ve CAT etkinliklerinde önemli bir düşüş ($p=0,009$) olduğunu bildirmişlerdir. Ali ve ark. (2014b) sıçanlarda MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesi üzerine krisinin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre, karaciğer dokusunda SOD ve CAT etkinliğinde önemli düzeyde azalma ($p<0,001$) olduğunu belirtmişlerdir. Akbulut ve ark. (2014) MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesi üzerine amifostin, askorbik asit ve N-asetil sisteinin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre, SOD etkinliğinde önemli ($p<0,05$), CAT etkinliğinde ise anlamlı olmayan ($p>0,05$) bir azalma görüldüğünü bildirmişlerdir. Moghadam ve ark. (2015) sıçanlarda tek doz 20 mg/kg c.a p.i MTX uyguladıkları çalışmada, karaciğer dokularında SOD ve CAT etkinliklerinde kontrole göre önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) olduğunu tespit etmişlerdir. Abdel-Daim ve ark. (2017) biyolojik olarak aktif bir flavonoid olan diosminin, farelerde MTX kaynaklı karaciğer, böbrek ve kalp hasarlarına karşı

etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada, MTX verilen grupta dokularda kontrol grubuna göre SOD ve CAT etkinliklerinde önemli bir düşüş ($p<0,01$) olduğunu belirtmişlerdir. Abo-Haded ve ark. (2017) MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesine karşı sitagliptinin koruyucu etkinliğini araştırmış ve MTX verilen grupta kontrol grubuna göre, karaciğer doku örneklerinde SOD etkinliğinde anlamlı düzeyde azalma ($p<0,001$) olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan Dalaklıoğlu ve ark. (2013) MTX ile indüklenen hepatotoksisiteye karşı resveratrolün etkilerini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre CAT düzeyinde artış ($p<0,05$) grldğiğini bildirmişlerdir. Daha önce yapılan çalışmaların sonuçları, Dalaklıoğlu ve ark. (2013)'nin çalışması dışında, bizim çalışmamızla uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızda, Apig+MTX'in birlikte verildiği grupta, MTX'in tek başına verildiği grupta azalan SOD1 ve CAT etkinliklerinin önemli düzeyde arttığı ($p<0,05$) belirlenmiştir. Farklı ajanlarla indüklenen oksidatif hasara karşı Apig'in koruyucu olarak kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Anusha ve ark., 2017; Hassan ve ark., 2017; Jeyabal ve ark., 2005; Jung, 2014; Panda ve Kar, 2007; Raskovic ve ark., 2017; Singh ve ark., 2004; Wang ve ark., 2014). Deneysel olarak NDEA+fenobarbital ile karaciğer kanseri oluşturulan sıçanlarda Singh ve ark. (2004) böbrek ve karaciğer dokularında; Jeyabal ve ark. (2005) kan ve karaciğer dokularında Apig'in (25 mg/kg c.a p.i) koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmalarda dokularda Apig+kanserojen ajanların verildiği grupta, sadece kanserojen ajanların verildiği gruba göre SOD ve CAT etkinliğinde anlamlı bir artış ($p<0,05$) olduğu bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar Apig'in tek başına verildiği grupta SOD ve CAT etkinliklerinin kontrol grubuna yakın olduğunu da saptamışlardır. Panda ve Kar (2007) deneysel olarak alloksan ile diyabet oluşturulan farelerde Apig'in (0,78 mg/kg deri altı) koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmada farelerde karaciğer dokularında Apig+alloksanın birlikte verildiği grupta, alloksanın tek başına verildiği gruba göre SOD ve CAT etkinliğinde anlamlı bir artış (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,01$) olduğu belirtilmiştir. Osteoblastik MC3T-E1 hücre kültürlerinde H₂O₂ ile indüklenen hasara karşı Apig'in (0,01-100 μ M) koruyucu olarak kullanıldığı araştırmada, Apig+H₂O₂'nin birlikte verildiği grupta, H₂O₂'nin tek başına verildiği gruba göre SOD1, SOD2 ve SOD3 ekspresyonunda önemli düzeyde artış ($p<0,05$) olduğu saptanmıştır (Jung, 2014). Wang ve ark. (2014) farelerde furan ile indüklenen hasara karşı Apig'in (5, 10 ve 20 mg/kg c.a gavajla)

koruyucu olarak kullanıldığı araştırmada, Apig+furan'ın birlikte verildiği grupta, furanın tek başına verildiği grupta azalan SOD etkinliğinde verilen Apig'in dozuna göre önemli artışların ($p<0,05$) olduğunu belirtmişlerdir. Anusha ve ark. (2017) sıçanlarda rotenonla oluşturdukları nöroinflamasyona karşı Apig'in (10 ve 20 mg/kg c.a p.i) koruyucu etkinliğini araştırmışlar ve Apig+rotenonun birlikte verildiği grupta, rotenonun yalnız verildiği grupta azalan SOD ve CAT etkinliklerinde önemli bir artış ($p<0,05$) olduğunu bildirmişlerdir. Hassan ve ark. (2017) farelerde sisplatin ile indüklenen nefrotoksisiteye karşı Apig'in (3 mg/kg c.a p.i) koruyucu olarak kullanıldığı çalışmalarında, Apig+sisplatinin birlikte verildiği grupta, sisplatinin tek başına verildiği grupta azalan CAT etkinliğinde önemli düzeyde artış ($p<0,05$) olduğunu tespit etmişlerdir. Raskovic ve ark. (2017) sıçanlarda parasetamol ile indüklenen hepatotoksisite üzerine Apig'in (10 mg/kg ağızdan) etkisini inceledikleri çalışmalarında, Apig+parasetamol verilen grupta, sadece parasetamol verilen gruba göre CAT etkinliğinde önemli bir artış ($p<0,05$) olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları, bizim çalışmamızla uyumluluk göstermektedir.

GSH hücresel antioksidan olarak görev yapan düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. GSH singlet oksijen, peroksi radikaller gibi serbest radikaller ile reaksiyona girerek GSSG ve diğer disüflitlere dönüştürülür. Glutasyon-bağımlı GSH-Px ve *glutasyon S transferaz* gibi az sayıda antioksidan enzim vardır. Oksidatif stres, muhtemelen GSH içeriğindeki tükenmeden dolayı MTX kaynaklı organ hasarlarının patogenezinde büyük rol oynar (Ali ve ark., 2014b). Bu çalışmada kan, karaciğer ve böbrek dokularında GSH değerlerinin MTX verilen grupta, kontrol grubuna göre önemli düzeyde düştüğü ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Coleshowers ve ark. (2010) Wistar sıçanlara 6 hafta süreyle, haftada bir 13,4 mg/kg dozunda ağızdan MTX uyguladıkları çalışmada, MTX gruplarında 2., 3., 4., 5. ve 6. haftalarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer dokularında GSH düzeyinde anlamlı azalma ($p<0,05$) olduğunu belirtmişlerdir. Çetinkaya ve ark. (2006) sıçanlarda MTX ile indüklenen karaciğer hasarına karşı N-asetil sisteinin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX (20 mg/kg c.a p.i) verilen grupta kontrol grubuna göre GSH düzeylerinde anlamlı bir azalma ($p<0,05$) olduğunu tespit etmişlerdir. Vardi ve ark. (2012) sıçanlarda MTX ile (20 mg/kg c.a p.i) indükledikleri hasara karşı klorojenik asitin

koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta serebellar Purkinje hücrelerinde kontrol grubuna göre GSH düzeyinde önemli bir düşüş ($p=0,02$) olduğunu bildirmişlerdir. Ali ve ark. (2014b), sıçanlarda MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesi üzerine krisinin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre, karaciğer dokusunda GSH düzeyinde önemli bir azalma ($p<0,001$) olduğunu tespit etmişlerdir. Akbulut ve ark. (2014) MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesinde, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre, GSH düzeyinde önemli bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Abdel-Daim ve ark. (2017), farelerde MTX kaynaklı karaciğer, böbrek ve kalp hasarlarına karşı diosminin iyileştirici etkilerini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta dokularda kontrol grubuna göre GSH düzeylerinde önemli bir düşüş ($p<0,01$) olduğunu belirtmişlerdir. Abo-Haded ve ark. (2017) MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesine karşı sitagliptinin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre, karaciğer doku örneklerinde GSH düzeyinde anlamlı bir azalma ($p<0,001$) olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızın bulguları daha önce yapılan araştırmalarla uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızda, Apig+MTX'in birlikte verildiği grupta, MTX'in tek başına verildiği grupta azalan GSH değerlerinin önemli düzeyde arttığı ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Deneysel olarak NDEA+fenobarbital ile karaciğer kanseri oluşturulan sıçanlarda Singh ve ark. (2004) böbrek ve karaciğer dokularında; Jeyabal ve ark. (2005) kan ve karaciğer dokularında Apig'in (25 mg/kg c.a p.i) koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmalarda dokularda Apig+kanserojen ajanların verildiği grupta, sadece kanserojen ajanların verildiği gruba göre GSH düzeylerinde anlamlı bir artış ($p<0,05$) olduğu bildirilmiştir. Panda ve Kar (2007) deneysel olarak alloksan ile diyabet oluşturulan farelerde Apig'in (0,78 mg/kg deri altı) koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada karaciğer dokularında Apig+alloksanın birlikte verildiği grupta, alloksanın tek başına verildiği gruba göre GSH düzeylerinde anlamlı bir artış ($p<0,001$) olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Apig verilen grupta, kontrole göre GSH düzeylerinin 2 kat artığı tespit edilmiştir. Anusha ve ark. (2017) sıçanlarda rotenonla oluşturdukları nöroinflamasyona karşı Apig'in (10 ve 20 mg/kg c.a p.i) koruyucu etkinliğini araştırmış ve Apig+rotenonun birlikte verildiği grupta, rotenonun yalnız verildiği grupta azalan GSH düzeyinde önemli bir artış ($p<0,05$) olduğunu tespit etmişlerdir. Hassan ve ark. (2017) farelerde sisplatin ile

indüklenen nefrotoksisiteye karşı Apig'in (3 mg/kg c.a p.i) koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, Apig+sisplatinin birlikte verildiği grupta, sisplatinin tek başına verildiği grupta azalan GSH düzeyinde önemli bir artış ($p<0,05$) olduğunu belirtmişlerdir. Li ve ark. (2017) LPS ile indükledikleri miyokardiyal hasara karşı Apig'in (50 mg/kg c.a p.i) iyileştirici etkinliğini araştırdıkları çalışmada, farelerde Apig+LPS verilen grupta, LPS'nin yalnız verildiği gruba göre GSH düzeyinde anlamlı bir artış ($p<0,05$) görüldüğünü bildirmişlerdir. Wang ve ark. (2014) farelerde furan ile indüklenen hasara karşı Apig'in (5, 10 ve 20 mg/kg c.a gavajla) koruyucu olarak kullanıldığı araştırmada, Apig+furan birlikte verildiği grupta, furanın tek başına verildiği grupta azalan GSH düzeyinde önemli bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Wang ve ark. (2017) farelerde alkol (Erguotu şarabı) kaynaklı karaciğer hasarına karşı Apig'in (150-300 mg/kg c.a ağızdan) etkisini araştırdıkları çalışmada, Apig+alkolün birlikte verildiği grupta alkolün tek başına verildiği grupta azalan GSH düzeyinde önemli bir artış ($p<0,05$) olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları, bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumludur.

GSH-Px, GSH yardımıyla serbest H_2O_2 suya ve GSSG'ye dönüştürülerek dokuyu oksidatif strese bağlı hasardan korur. Oluşan GSSG, GSH-R yardımı ile GSH'ye dönüştürülür (Ali ve ark., 2014b). Bu çalışmada kan, karaciğer ve böbrek dokularında GSH-Px düzeyinin MTX verilen grupta, kontrol grubuna göre önemli düzeyde düştüğü ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Ali ve ark. (2014b) sıçanlarda MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesi üzerine krisinin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre, karaciğer dokusunda GSH-Px etkinliğinde önemli düzeyde düşüş ($p<0,001$) olduğunu bildirmişlerdir. Moghadam ve ark. (2015) sıçanlarda tek doz 20 mg/kg c.a p.i MTX uyguladıkları çalışmada, karaciğer dokularında GSH-Px etkinliğinin kontrole göre önemli düzeyde azaldığını ($p<0,05$) tespit etmişlerdir. Abdel-Daim ve ark. (2017) farelerde MTX kaynaklı karaciğer, böbrek ve kalp hasarlarına karşı diosminin etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada, MTX verilen grupta dokularda kontrol grubuna göre GSH-Px etkinliklerinde önemli bir düşüş ($p<0,01$) olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları, bizim çalışmamızla uyum göstermektedir. Çalışmamızda, Apig+MTX'in birlikte verildiği grupta, MTX'in tek başına verildiği grupta azalan GSH-Px

etkinliğinde önemli bir artış ($p<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Deneysel olarak NDEA+fenobarbital ile karaciğer kanseri oluşturulan sıçanlarda Singh ve ark. (2004) böbrek ve karaciğer dokularında; Jeyabal ve ark. (2005) kan ve karaciğer dokularında Apig'in (25 mg/kg c.a p.i) koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmalarda dokularda Apig+kanserojen ajanların verildiği grupta, sadece kanserojen ajanların verildiği gruba göre GSH-Px etkinliğinde anlamlı bir artış ($p<0,05$) olduğu bildirilmiştir. Osteoblastik MC3T-E1 hücre kültürlerinde H_2O_2 ile indüklenen hasara karşı Apig'in (0,01-100 μ M) koruyucu olarak kullanıldığı araştırmada, Apig+ H_2O_2 'in birlikte verildiği grupta, H_2O_2 'in tek başına verildiği gruba göre GSH-Px ekspresyonunda önemli düzeyde artış ($p<0,05$) olduğu saptanmıştır (Jung, 2014). He ve ark. (2016) sisplatinle indükledikleri böbrek hasarına karşı Apig'in (5, 10, 20 mg/kg c.a p.i) koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, Apig+sisplatinin birlikte verildiği gruplarda, sisplatinin tek başına verildiği gruba göre GSH-Px etkinliğinde önemli düzeyde artış (5 ve 10 mg/kg $p<0,01$, 20 mg/kg $p<0,001$) olduğunu tespit etmişlerdir. Anusha ve ark. (2017) sıçanlarda rotenonla oluşturdukları nöroinflamasyona karşı Apig'in (10 ve 20 mg/kg c.a p.i) koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Rotenon+Apig'in birlikte verildiği grupta, rotenonun yalnız verildiği grupta azalan GSH-Px etkinliğinde önemli bir artış ($p<0,05$) olduğunu bildirmişlerdir. Raskovic ve ark. (2017) sıçanlarda parasetamol ile indüklenen hepatotoksisite üzerine Apig'in (10 mg/kg ağızdan) etkisini inceledikleri çalışmalarında, Apig+parasetamol verilen grupta, sadece parasetamol verilen gruba göre GSH-Px etkinliğinde önemli bir artış ($p<0,05$) olduğunu ifade etmişlerdir. Wang ve ark. (2017) farelerde alkol (Erguotu şarabı) kaynaklı karaciğer hasarına karşı Apig'in (150-300 mg/kg c.a ağızdan) etkisini araştırdıkları çalışmada, Apig+alkolün birlikte verildiği grupta alkolün tek başına verildiği grupta azalan GSH-Px etkinliğinde önemli bir artış ($p<0,05$) olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları, bizim çalışmamızla uyum göstermektedir.

Lipit peroksidasyon, serbest radikallerin neden olduğu doku hasarının ana mekanizmalarından biri olarak kabul edilir. Hücre zarı hasarının bir göstergesi olarak kullanılan MDA, ikincil LPO ürünlerinden biri olarak bilinmektedir (Raskovic ve ark., 2017). Bu çalışmada kan, karaciğer ve böbrek dokularında MDA düzeyinde MTX verilen grupta, kontrol grubuna göre önemli düzeyde artış ($p<0,05$) tespit edilmiştir.

Metotreksat uygulanmasından sonra karaciğerde LPO'da artış olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Abdel-Daim ve ark., 2017; Abo-Haded ve ark., 2017; Akbulut ve ark., 2014; Ali ve ark., 2014b; Çetinkaya ve ark., 2006; Dalaklıoğlu ve ark., 2013; Moghadam ve ark., 2015; Vardi ve ark., 2012). Çetinkaya ve ark. (2006) sıçanlarda MTX ile indüklenen karaciğer hasarına karşı N-asetil sisteinin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX (20 mg/kg c.a p.i) verilen grupta kontrol grubuna göre MDA düzeyinde anlamlı bir azalma ($p<0,001$) olduğunu bildirmişlerdir. Coleshowers ve ark. (2010) Wistar sıçanlara 6 hafta süreyle, 13,4 mg/kg dozunda (haftalık bir kez) ağızdan MTX uyguladıkları çalışmada, MTX gruplarında 2., 3., 4., 5. ve 6. haftalarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer dokularında MDA düzeyinde anlamlı bir artış ($p<0,05$) olduğunu belirtmişlerdir. Vardi ve ark. (2012) sıçanlarda MTX ile (20 mg/kg c.a p.i) indükledikleri hasara karşı klorojenik asitin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta serebellar Purkinje hücrelerinde kontrol grubuna göre MDA düzeyinde önemli bir artış ($p=0,009$) olduğunu bildirmişlerdir. Dalaklıoğlu ve ark. (2013) MTX ile indüklenen hepatotoksisiteyi araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre MDA düzeyinde artış ($p<0,05$) görüldüğünü ifade etmişlerdir. Ali ve ark. (2014b) sıçanlarda MTX ile indüklenen karaciğer hasarında, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre, karaciğer dokusunda MDA düzeylerinde önemli artış ($p<0,001$) olduğunu bildirmişlerdir. Akbulut ve ark. (2014) MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesinde, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre, MDA düzeyinde önemli bir artış ($p<0,05$) görüldüğünü saptamışlardır. Moghadam ve ark. (2015) sıçanlara MTX uyguladıkları çalışmada, karaciğer dokusunda MDA düzeylerinde kontrole göre önemli düzeyde ($p<0,05$) artış tespit etmişlerdir. Abo-Haded ve ark. (2017) MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesinde, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre, karaciğer dokusunda MDA düzeyinde anlamlı artış ($p<0,001$) olduğunu bildirmişlerdir. Abdel-Daim ve ark. (2017) biyolojik olarak aktif bir flavonoid olan diosminin, farelerde MTX kaynaklı karaciğer, böbrek ve kalp hasarlarına karşı etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada, MTX verilen grupta dokularda kontrol grubuna göre MDA düzeylerinde önemli bir artış ($p<0,01$) olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları, bizim çalışmamızla uyum göstermektedir. Çalışmamızda, Apig+MTX'in birlikte verildiği grupta, MTX'in tek başına verildiği grupta artan MDA

düzeyinde önemli düzeyde düşüş ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Singh ve ark. (2004) sıçanlarda deneysel olarak NDEA ile başlattıkları ardından fenobarbital ile geliştirdikleri karaciğer kanseri üzerine Apig'in (25 mg/kg c.a p.i) etkinliğini araştırdıkları çalışmada kanda, Apig'in kanserojen ajanlarla birlikte verildiği grupta, sadece kanserojen ajanların verildiği gruba göre MDA düzeylerinde anlamlı bir düşüş ($p<0,05$) olduğu bildirilmiştir. Panda ve Kar (2007) deneysel olarak alloksan ile diyabet oluşturulan farelerde Apig'in (0,78 mg/kg deri altı) koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada karaciğer dokularında Apig+alloksanın birlikte verildiği grupta, alloksanın tek başına verildiği gruba göre MDA düzeylerinde anlamlı bir düşüş ($p<0,001$) olduğunu belirtmişlerdir. Wang ve ark. (2014) farelerde furan ile indüklenen hasara karşı Apig'in (5, 10 ve 20 mg/kg c.a gavajla) koruyucu olarak kullanıldığı araştırmada, Apig+furan birlikte verildiği grupta, furanın tek başına verildiği grupta azalan MDA düzeyinde önemli bir azalma ($p<0,05$) olduğunu ifade etmişlerdir. Hassan ve ark. (2017) farelerde sisplatin ile indüklenen nefrotoksisiteye karşı Apig'in (3 mg/kg c.a p.i) koruyucu olarak kullanıldığı çalışmalarında, Apig+sisplatinin birlikte verildiği grupta, sisplatinin tek başına verildiği grupta azalan MDA düzeyinde önemli bir azalma ($p<0,05$) olduğunu bildirmişlerdir. Anusha ve ark. (2017) sıçanlarda rotenonla oluşturdukları nöroinflamasyona karşı Apig'in (10 ve 20 mg/kg c.a p.i) koruyucu etkinliğini araştırmışlar ve Apig+rotenonun birlikte verildiği grupta, rotenonun yalnız verildiği grupta artan MDA düzeyinde önemli bir azalma ($p<0,05$) olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, Apig'in MDA düzeylerini kontrol değerlerine oldukça yaklaştırdığını belirtmişlerdir. Raskovic ve ark. (2017) sıçanlarda parasetamol ile indüklenen hepatotoksisite üzerine Apig'in (10 mg/kg ağızdan) etkisini inceledikleri çalışmalarında, Apig+parasetamolün birlikte verildiği grupta, parasetamolün tek başına verildiği grupta artan MDA düzeylerinde önemli bir azalma ($p<0,05$) olduğunu bildirmişlerdir. Wang ve ark. (2017) farelerde alkol (Erguotu şarabı) kaynaklı karaciğer hasarına karşı Apig'in (150-300 mg/kg c.a ağızdan) etkisini araştırdıkları çalışmada, Apig+alkolün birlikte verildiği grupta alkolün tek başına verildiği grupta artan MDA düzeyinde önemli bir düşüş ($p<0,01$) olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları, bizim çalışmamızla uyum göstermektedir.

Organ yetmezliği ve hasarlarında, biyokimyasal parametrelerde önemli değişiklikler görülür. Serum ALT ve AST enzim düzeylerindeki artışlar karaciğer hasarının, kreatinin ve üre gibi biyokimyasal parametrelerdeki artışlar böbrek hasarı veya yetmezliğinin belirteçleridir (Ali ve ark., 2014b). Serumdaki bu enzimlerin önemli artışı, MTX metabolizması sonucu üretilen ROS tarafından plazma zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu karaciğer hücre plazma zarındaki hasarın bir göstergesidir. Metotreksatın biyokimyasal parametreler üzerine etkileri ile ilgili daha önce yapılmış araştırmalar mevcuttur (Abdel-Daim ve ark., 2017; Abo-Haded ve ark., 2017; Akbulut ve ark., 2014; Ali ve ark., 2014b; Dalaklıoğlu ve ark., 2013; Moghadam ve ark., 2015). Dalaklıoğlu ve ark. (2013) MTX ile indüklenen hepatotoksisiteye karşı resveratrolun etkilerini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre ALT ve AST enzim değerlerinde önemli düzeyde ($p<0,05$) bir artış olduğunu belirtmişlerdir. Akbulut ve ark. (2014) sıçanlarda yaptıkları çalışmada, MTX (20 mg/kg p.i tek doz) uygulanan grupta sadece ALT enziminde önemli yükselme ($p<0,001$) olduğunu tespit etmişlerdir. Ali ve ark. (2014b) sıçanlarda MTX ile indüklenen karaciğer hasarı üzerine krisinin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre serum ALT ve AST düzeylerinde önemli bir artış ($p<0,001$) olduğunu ifade etmişlerdir. Moghadam ve ark. (2015) sıçanlara MTX ile indükledikleri oksidatif hasara karşı zerdeçalın koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrole göre serum ALT ve AST enzim seviyelerinde önemli düzeyde ($p<0,05$) artış olduğunu tespit etmişlerdir. Abdel-Daim ve ark. (2017), farelerde MTX kaynaklı karaciğer, böbrek ve kalp hasarlarına karşı diosminin etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada, MTX verilen grupta dokularda kontrol grubuna göre ALT ve AST enzim düzeyleri ile kreatinin seviyesinde önemli bir artış ($p<0,01$) olduğunu bildirmişlerdir. Abo-Haded ve ark. (2017) MTX ile indüklenen karaciğer toksisitesine karşı sitagliptinin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre ALT ve AST enzim seviyelerinde önemli düzeyde bir artış ($p<0,001$) olduğunu belirtmişlerdir. Bizim alışmamızda da, diğer araştırmacıların araştırmalarıyla (Abo-Haded ve ark., 2017; Akbulut ve ark., 2014; Ali ve ark., 2014b; Dalaklıoğlu ve ark., 2013; Moghadam ve ark., 2015) benzer şekilde MTX verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum ALT ve AST değerlerinde önemli düzeyde bir artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca

bu çalışmada MTX verilen grupta kontrol grubuna göre kreatinin değerlerinde Abdel-Daim ve ark. (2017) yaptıkları çalışmalara benzer şekilde önemli düzeyde bir artış olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada Apig+MTX uygulanan farelerde ALT ve AST enzimleri ile kreatinin düzeyinde önemli düşüş ($p<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Böylece Apig, MTX kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarına karşı koruyucu bir rol oynadığı belirlenmiştir. Apigeninin ALT ve AST enzimlerinin serum seviyelerini düşürme potansiyeli, flavonoidlerin serbest radikal temizleme potansiyeline bağlanabilir, böylece karaciğer hücrelerinin plazma zarının zarar görmesini önleyebilir (Ali ve ark., 2014a). Raskovic ve ark. (2017) sıçanlarda parasetamol ile indüklenen hepatotoksisite üzerine Apig'in (10 mg/kg ağızdan) etkisini inceledikleri çalışmalarında, Apig+parasetamol verilen grupta, sadece parasetamol verilen gruba göre ALT düzeylerinde önemli bir azalma ($p<0,05$) olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Ali ve ark. (2014a) tarafından yapılan çalışmada, NDEA ile indüklenen hepatotoksisitede NDEA ile birlikte Apig verilmesinin, ALT ve AST enzimlerinin serum yoğunluğunu önemli ölçüde azalttığı ortaya konmuştur. Tsaroucha ve ark. (2016) karaciğerde iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturmuşlar ve bu hasara karşı Apig'in (5 mg c.a p.i) koruyucu etkinliğini incelemişlerdir. İskemi/reperfüzyon grubunda yükselen ALT ve AST değerlerinin, Apig verilen grupta anlamlı düzeyde düştüğü belirtilmiştir. Yang ve ark. (2013) asetaminofen ile indüklenen akut karaciğer hasarına karşı Apig'in (100 ve 200 mg/kg c.a ağızdan) koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, asetaminofen tek başına verildiğinde artan AST ve ALT düzeylerinin Apig verilmesi ile anlamlı düzeyde düştüğünü bildirmişlerdir. Hassan ve ark. (2017) farelerde sisplatin ile indüklenen nefrotoksisiteye karşı Apig'in (3 mg/kg c.a p.i) koruyucu olarak kullanıldığı araştırmada, Apig+sisplatinin birlikte verildiği grupta, sisplatinin tek başına verildiği grupta artan kreatinin düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir.

Yaptığımız çalışmanın histopatolojik incelemesinde tek başına MTX uygulanan grupta, karaciğer dokularında hiperemi, yer yer kanama ve bazı hepatositlerde yağlanma (lipidozis); böbrek dokularında ise şiddetli hiperemi, yer yer kanama ve glomeruluslarda sklerozis gözlenmiştir. Metotreksatla yapılan *in vivo* çalışmalarda, bizim bulgularımıza benzer histopatolojik bulgular tespit edilmiştir

(Abdel-Daim ve ark., 2017; Abo-Haded ve ark., 2017; Akbulut ve ark., 2014; Dalaklıoğlu ve ark., 2013; Moghadam ve ark., 2015; Şener ve ark., 2006). Şener ve ark. (2006) sıçanlara tek doz MTX (20 mg/kg p.i) verdikleri çalışmada, hepatositlerde dejenerasyon, sinüzoidlerde genişleme ve kanama, aktif Kupffer hücrelerinin sayısında artış, karaciğer parenkimasındaki santral ve portal ven çevresinde yangısal hücre infiltrasyonu görüldüğünü belirtmişlerdir. Dalaklıoğlu ve ark. (2013) sıçanlara MTX (3 gün boyunca 7 mg/kg p.i) verdikleri çalışmada, karaciğer dokularında, hepatositlerde dejenerasyon, sinüzoidlerde kanama ve genişleme ile aktif Kupffer hücrelerinin sayısında artış olduğunu tespit etmişlerdir. Akbulut ve ark. (2014) tek doz MTX (20 mg/kg p.i) uyguladıkları sıçanların karaciğer dokularının histopatolojik incelemesinde, karaciğerde sinüzoidal genişleme, yangısal hücre infiltrasyonu, kanama, hidropik dejenerasyon, portal bölge etrafındaki hepatositlerde eozonofilik sitoplazma gözlendiğini ve glikojen depolarında önemli azalma olduğunu bildirmişlerdir. Moghadam ve ark. (2015) sıçanlara tek doz MTX (20 mg/kg) verdikleri çalışmada, karaciğer dokusunda, santral ve portal venlerde şiddetli kanama ve genişleme görüldüğünü, perisantral bölgede hepatositlerin yoğun çekirdekli ve dejenere olduğunu ve yangı odakları olduğunu ifade etmişlerdir. Abo-Haded ve ark. (2017) farelere tek doz MTX (20 mg/kg p.i) verdikleri grupta karaciğer dokularında, fokal nekroz, apoptoz, şişme ve hidropik dejenerasyon görüldüğünü tespit etmişlerdir. Abdel-Daim ve ark. (2017) tek doz MTX (20 mg/kg p.i) verilen grupta, farelerin karaciğer dokularında santral venlerin çevresinde fokal nekroz odakları, sinüzoidal genişleme, vakuoler dejenerasyon ve fokal lökosit (zellikle lenfosit) infiltrasyonu görüldüğünü belirtmişlerdir. Çalışmamızda MTX+Apig uygulanan grupta ise, tek başına MTX uygulanan grupta böbrek ve karaciğerde oluşan bulguların belirgin bir şekilde azaldığı ve organların normal görünümde olduğu tespit edilmiştir. Apigeninin yalnız verildiği grupta, karaciğer ve böbreklerde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır. Farklı ksenobiyotiklerle indüklenen hasara karşı Apig'in koruyucu olarak kullanıldığı *in vivo* alışmalarda, bizim bulgularımıza benzer histopatolojik bulgular bulunmaktadır (Ahmad ve ark., 2019; Ali ve ark., 2014a; Hassan ve ark., 2017; Raskovic ve ark., 2017; Wang ve ark., 2017). Ali ve ark. (2014a) tarafından yapılan çalışmada, NDEA tarafından indüklenen sıçanlarda hepatotoksisiteye karşı Apig'in etkisi araştırılmış, NDEA'ya (0,1 mg/ml) maruz kalan grupta sinüzoidal

seyrelme, şişmiş ve boş hepatositler, çekirdeklerde büyüme, karaciğer hücrelerinde vakuolar dejenerasyon görülürken; Apig (10, 20 ve 40 mg/ml)+NDEA ile birlikte verildiği gruplarda normal hepatosit yapılarının gözlemlendiğini ortaya koymuşlardır. Hassan ve ark. (2017) farelerde sisplatinle indüklenen böbrek hasarına karşı Apig'in (3 mg/kg c.a p.i) etkinliğini incelemişler, sisplatin verilen grupta böbrek dokusunda proksimal tübüllerde genişleme ve şiddetli nekroz, tübüler hücrelerde vakuolizasyon ve dejenerasyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Apigenin+sisplatinin birlikte verildiği grupta, böbreklerde görülen histopatolojik bulguların gerilediği tespit edilmiştir. Wang ve ark. (2017) farelerde alkol (Erguotou şarabı) kaynaklı karaciğer hasarına karşı Apig'in (150-300 mg/kg c.a ağızdan) etkisini araştırdıkları çalışmada alkol ile hasar oluşturulan grupta yağ damlacıkları ile dolu çok sayıda hepatosit görülürken, Apig+Alkolün eşzamanlı oral uygulamasından sonra, hepatik yağlanma derecesinin önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir. Raskovic ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada sıçanlarda parasetamol ile indüklenen hepatotoksisiteye Apig'in (10 mg/kg c.a ağızdan) etkisini incelemişlerdir. Toksik parasetamol dozu verilen grupta, karaciğer dokusunda ciddi dejenerasyon, hepatositlerin sitoplazmasında şişkinlik ve çekirdeklerde küçülme; Apig+Parasetamol verilen grupta ise, parasetamol kaynaklı değişikliklerin iyileştiği tespit edilmiştir. Ahmad ve ark. (2019) sıçanlarda organik fosforlu (OF) bir pestisit olan edifenfos ile oluşturdukları karaciğer ve böbrek hasarında Apig'in (10 mg/kg c.a ağızdan) koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Edifenfosun tek başına verildiği grupların hepatositlerinde nekroz, şişme ve hiperplazi görünümü, pinotik çekirdekler, aktif lökosit infiltrasyonları, sinüzoidlerinde genişleme ile böbrekte tübüllerde genişleme ve şiddetli nekroz görüldüğünü tespit etmişlerdir. Apigenin+edifenfosun birlikte verildiği sıçanlarda karaciğer ve böbrekte belirgin iyileşme görüldüğünü bildirmişlerdir.

Bu çalışmada MTX'in SOD1, CAT ve GSH-Px enzim etkinliği ile GSH düzeylerinde azalmaya, MDA düzeylerinde ise artmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Apigeninin ise MTX'in sebep olduğu antioksidan sistem/enzimler üzerindeki düşüşü ve MDA düzeylerindeki artışı tersine çevirdiği saptanmıştır. Apigeninin hücrel antioksidan savunma sistemini artırma kabiliyeti çeşitli mekanizmalarla açıklanabilir. Apigenin yapısının 4', 5 ve 7. pozisyonlarında bulunan OH grupları sayesinde serbest

radikalleri yok eder ya da enzimatik antioksidan savunma sistemlerini uyarır. Bununla birlikte, Apig'in C halkasının karbon atomları (C2 ve C3) arasında çift bağ (C2=C3) ile A ve C halkalarındaki 4 okso yapısı sayesinde antioksidan özellik gösterir (Noroozi ve ark., 1998; Ratty ve Das, 1988). Apigenin *in vitro* ve *in vivo* biyolojik etkilerinin çoğu antioksidan etkilerinden veya serbest radikalleri yok etme özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Kuo ve ark., 1992). Yapılan literatür taramaları ışığında, araştırmacılar tarafından Apig 0,78-300 mg/kg c.a doz aralığında uygulanmış (gavaj, deri altı ve p.i yolla) ve çeşitli organ hasarlarına karşı koruyucu ya da sağaltıcı etki oluşturduğunu belirtmişlerdir (Anusha ve ark. 2017; Hassan ve ark., 2017; Panda ve Kar, 2007; Raskovic ve ark., 2017; Singh ve ark., 2004; Tsaroucha ve ark., 2016; Wang ve ark., 2014; Yang ve ark. 2013). Apigeninin kullanılan doz aralığının geniş olması hem koruyucu hem de sağaltıcı amaç için istenilen bir özelliktir. Bu çalışmada Apig 3 mg/kg c.a dozunda p.i yolla uygulanmış ve MTX'la indüklenen oksidatif stres ile karaciğer ve böbrek hasarına karşı koruyucu etki oluşturduğu histopatolojik, biyokimyasal ve oksidan/antioksidan parametrelerle tespit edilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Metotreksat çeşitli kanser türleri (lösemi, meme ve testis kanseri gibi) ile otoimmün hastalıklar, romatoid artrit, sedef ve çeşitli yangısal bozuklukların tedavisinde kullanılan folat antimetaboliti olarak bilinen bir ajandır. MTX karaciğerde mikrozomal enzim sistemi tarafından metabolize edilir ve özellikle Faz 1 tepkimesi sonucu oluşan metabolitlerinin oksidatif strese ve özellikle karaciğer, böbrek gibi organlarda hasarlara yol açtığı vurgulanmıştır. Reaktif metabolitler protein, lipid ve nükleik asit gibi hücrel makromoleküllerle etkileşime girerek protein sentezinin bozulmasına, lipid peroksidasyonuna, DNA hasarına yol açarlar. Ayrıca MTX NADP sentezini engelleyerek GSH depolarının tükenmesi yoluyla da oksidatif strese yol açmaktadır.

Gıdalardaki çeşitli biyoaktif bileşiklerin canlılar üzerinde çok yönlü etkileri vardır. Bu biyoaktif bileşiklerin en önemlileri arasında polifenolik yapıda bulunan maddeler yer alır. Polifenolik bileşiklerin en önemli üyeleri flavonoidlerdir. Apigenin, meyve ve sebzeler de dahil olmak üzere çeşitli doğal kaynaklarda en fazla bulunan flavonoidlerden birisidir ve flavonların bir alt üyesidir. Diğer flavonoidler gibi Apig'in kanser önleyici, antioksidan ve yangı önleyici etkileri başta olmak üzere çok sayıda biyolojik etkilere sahip olduğu yapılan araştırmalarda belirtilmiştir. Bu çalışmada tek doz 20 mg/kg c.a p.i uygulanan MTX'in oksidatif stres ve organ (karaciğer ve böbrek) hasarına yol açtığı biyokimyasal, antioksidan/oksidan parametreler ve histopatolojik bulgularla ortaya konulmuştur. Apigeninin MTX'in yol açtığı lipid peroksidasyonu azalttığı ve antioksidan enzimler/sistemler ile biyokimyasal parametreler üzerinde düzeltici etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca histopatolojik olarak Apig'in MTX'in yol açtığı hasarı önlediği de belirlenmiştir. MTX ile indüklenen oksidatif hasara karşı Apig'in antioksidan koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Daim MM, Khalifa HA, Abushouk AI, Dkhil MA, Al-Quraishy SA (2017).** Diosmin attenuates methotrexate-induced hepatic, renal, and cardiac injury: a biochemical and histopathological study in mice. *Oxid Med Cell Longev*, 2017.
- Abo-Haded HM, Elkablawy MA, Al-Johani Z, Al-ahmadi O, El-Agamy DS (2017).** Hepatoprotective effect of sitagliptin against methotrexate induced liver toxicity. *PloS one*, **12(3)**, e0174295.
- Abouzari A, Fakheri BA (2015).** Reactive oxygen species: generation, oxidative damage, and signal transduction. *Int J Life Sci.*, **9(5)**, 3-17.
- Aebi H (1984).** Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, **105**, 121-126.
- Aggarwal P, Naik S, Mishra KP, Aggarwal A, Misra R (2006).** Correlation between methotrexate efficacy & toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation. *Indian J Med Res.*, **124(5)**, 521-6.
- Ahmad A, Kumari P, Ahmad M (2019).** Apigenin attenuates edifenphos-induced toxicity by modulating ROS-mediated oxidative stress, mitochondrial dysfunction and caspase signal pathway in rat liver and kidney. *Pestic Biochem Physiol.*, **159**, 163-172.
- Akbulut S, Elbe H, Eris C, Dogan Z, Toprak G, Otan E, Erdemli E, Turkoz Y (2014).** Cytoprotective effects of amifostine, ascorbic acid and N-acetylcysteine against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *World J Gastroenterol*, **20(29)**, 10158.
- Alarcóan GS, Tracy IC, Blackburn Jr WD (1989).** Methotrexate in rheumatoid arthritis. Toxic effects as the major factor in limiting long-term treatment. *Arthritis Rheum.*, **32(6)**, 671-676.
- Ali F, Naz F, Jyoti S, Siddique YH (2014a).** Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.*, **767**, 13-20.
- Ali F, Rahul, Naz F, Jyoti S, Siddique YH (2017).** Health functionality of apigenin: A review. *Int J Food Prop.*, **20(6)**, 1197-1238.
- Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Sultana S (2014b).** Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis. *Mol Cell Biochem.*, **385(1-2)**, 215-223.
- Ameen AM, Mansour MF, Mostafa EM, Hosny MM, Mansour SF (2019).** Protective Effect of Mesenchymal Stem Cells on Methotrexate-Induced Acute Toxicity on Liver of Adult Albino Rats. *Int J Rec Innov Acad Res.*, **1(3)**, 1-17.

An F, Cao X, Qu H, Wang S (2015). Attenuation of oxidative stress of erythrocytes by the plant-derived flavonoids vitexin and apigenin. *Int J Pharm Sci Invent.*, **70(11)**, 724-732.

Andlauer W, Kolb J, Furst P (2000). Absorption and metabolism of genistein in the isolated at small intestine. *FEBS Lett.*, **475**, 127–130.

Anusha C, Sumathi T, Joseph LD (2017). Protective role of apigenin on rotenone induced rat model of Parkinson's disease: Suppression of neuroinflammation and oxidative stress mediated apoptosis. *Chem Biol Interact.*, **269**, 67-79.

Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 373-399.

Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB (1998). Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct.*, **16(4)**, 283-293.

Babu PV, Liu D, Gilbert ER (2013). Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem.*, **24(11)**, 1777-1789.

Bagchi K, Puri S (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease: A review. *East Mediterr Health J.*, **4(2)**, 350-360.

Balis FM, Savitch JL, Bleyer WA (1983). Pharmacokinetics of oral methotrexate in children. *Cancer Res.*, **43(5)**, 2342-2345.

Buchbinder R, Barber M, Heuzenroeder L, Wluka AE, Giles G, Hall S, Harkness A, Lewis D, Littlejohn G, Miller MH, Ryan PF, Jolley D (2008). Incidence of melanoma and other malignancies among rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Arthritis Care Res.*, **59(6)**, 794-799.

Caetano NN, Campello AP, Carnieri EG, Kluppel ML, Oliveira MB (1997). Effect of methotrexate (MTX) on NAD (P)⁺ dehydrogenases of HeLa cells: malic enzyme, 2-oxoglutarate and isocitrate dehydrogenases. *Cell Biochem Funct.*, **15(4)**, 259-264.

Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Piantelli M (2000). Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer.*, **87(4)**, 595-600.

Çetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B (2006). N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit.*, **12(8)**, 274-278.

Chan ES, Cronstein BN (2013). Mechanisms of Action of Methotrexate. *Bull Hosp Joint Dis.*, **71(1)**, 5-8.

Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.*, **49(3)**, 481-493.

Chen SX, Schopfer P (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. *Eur J Biochem.*, **260(3)**, 726-735.

Cirmi S, Ferlazzo N, Lombardo GE, Maugeri A, Calapai G, Gangemi S, Navarra M (2016a). Chemopreventive agents and inhibitors of cancer hallmarks: may Citrus offer new perspectives?. *Nutrients*, **8(11)**, 698.

Cirmi S, Ferlazzo N, Lombardo GE, Ventura-Spagnolo E, Gangemi S, Calapai G, Navarra M (2016b). Neurodegenerative diseases: might citrus flavonoids play a protective role?. *Molecules*, **21(10)**, 1312.

Coleshowers CL, Oguntibeju OO, Ukpong M, Truter EJ (2010). Effects of methotrexate on antioxidant enzyme status in a rodent model: peer reviewed original article. *Med Tech SA.*, **24(1)**, 4-9.

Conner EM, Grisham MB (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*, **12(4)**, 274-277.

Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C (1999). Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol.*, **277**, 120-126.

Cronstein BN (2005). Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev.*, **57(2)**, 163-172.

Çakır T, Baştürk A, Polat C, Aslaner A, Durgut H, Şehirli AÖ, Gül M, Öğünç AV, Gül S, Sabuncuoğlu MZ, Oruç MT (2015). Does alfa lipoic acid prevent liver from methotrexate induced oxidative injury in rats?. *Acta Cir Bras.*, **30(4)**, 247-252.

Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcıt F, Gumuslu S (2013). Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol.*, **32(6)**, 662-671.

Dalrymple JM, Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Barclay ML (2008). Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **58(11)**, 3299-3308.

David AVA, Satyanarayana N, Parasuraman S, Bharathi S, Arulmoli R (2016). Ameliorative effect of quercetin on methotrexate induced toxicity in sprague-dawley rats: A histopathological study. *Indian J Pharm Educ Res.*, **50**, 200-208.

Deisseroth A, Dounce AL (1970). Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev.*, **50(3)**, 319-375.

Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.*, **52**, 794-804.

Erlund I (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res.*, **24(10)**, 851-874.

Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N (2005). Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **204(3)**, 263-273.

Ghogare AA, Greer A (2016). Using singlet oxygen to synthesize natural products and drugs. *Chem Rev.*, **116(17)**, 9994-10034.

Gilani AH, Khan AU, Shah AJ, Connor J, Jabeen Q (2005). Blood pressure lowering effect of olive is mediated through calcium channel blockade. *Int J Food Sci Nutr.*, **56**, 613-620.

Gornal AC, Bardawill CJ, David MM (1949). Protein-Biuret colorimetric method. *J Biol Chem.*, **177**, 751-766.

Gradolatto A, Basly JP, Berges R, Teyssier C, Chagnon MC, Siess MH, Canivenc-Lavier MC (2005). Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. *Drug Metab Dispos.*, **33(1)**, 49-54.

Gradolatto A, Canivenc-Lavier MC, Basly JP, Siess MH, Teyssier C (2004). Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver. *Drug Metab Dispos.*, **32**, 58-65.

Grim J, Chládek J, Martínková J (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clin pharmacokinet.*, **42(2)**, 139-151.

Gupta S, Afaq F, Mukhtar H (2001). Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, **287(4)**, 914-920.

Hadi NR, Al-Amran FG, Swadi A (2012). Metformin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Pharmacother.*, **3(3)**, 248.

Hafez HM, Ibrahim MA, Ibrahim SA, Amin EF, Goma W, Abdelrahman AM (2015). Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol.*, **768**, 1-12.

Halliwell B (1989). Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med.*, **82(12)**, 747-752.

Halliwell B, Clement MV, Long LH (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.*, **486(1)**, 10-13.

Hassan SM, Khalaf MM, Sadek SA, Abo-Youssef AM (2017). Protective effects of apigenin and myricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Pharm Biol.*, **55(1)**, 766-774.

He X, Li C, Wei Z, Wang J, Kou J, Liu W, Shi M, Yang Z, Fu Y (2016). Protective role of apigenin in cisplatin-induced renal injury. *Eur J Pharmacol.*, **789**, 215-221.

Huang J, Wang S, Zhu M, Chen J, Zhu X (2011). Effects of genistein, apigenin, quercetin, rutin and astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. *Food Chem Toxicol.*, **49**, 1943-1947.

Isaacs JD Jr, McGehee RP, Cowan BD (1996). Life-threatening neutropenia following methotrexate treatment of ectopic pregnancy: a report of two cases. *Obstet Gynecol.*, **88(4)**, 694-696.

Iwakiri Y, Sampson DA, Allen KGD (2002). Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, **67**, 435-443.

Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yeğen BC, Sener G (2003). Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res.*, **34(4)**, 282-287.

Jalilov AS, Zhang C, Samuel EL, Sikkema WK, Wu G, Berka V, Kent TA, Tsai AL, Tour JM (2016). Mechanistic study of the conversion of superoxide to oxygen and hydrogen peroxide in carbon nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces.*, **8(24)**, 15086-15092.

Jeyabal PV, Syed MB, Venkataraman M, Sambandham JK, Sakthisekaran D (2005). Apigenin inhibits oxidative stress-induced macromolecular damage in N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatocellular carcinogenesis in Wistar albino rats. *Mol Carcinog.*, **44(1)**, 11-20.

Jin BH, Qian LB, Chen SA, Li J, Wang HP, Bruce IC, Lin J, Xia Q (2009). Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *Eur J Pharmacol.*, **616**, 200-205.

Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA (1983). The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med.*, **309(18)**, 1094-1104.

Jung WW (2014). Protective effect of apigenin against oxidative stress-induced damage in osteoblastic cells. *Int J Mol Med.*, **33(5)**, 1327-1334.

Kahraman A, Serteser M, Köken T (2002). Flavonoidler. *The Med J Kocatepe.*, **3(1)**, 1-8.

Kamen BA, Nylén PA, Camitta BM, Bertino JR (1981). Methotrexate accumulation and folate depletion in cells as a possible mechanism of chronic toxicity to the drug. *Br J Haematol.*, **49(3)**, 355-360.

Kang HK, Ecklund D, Liu M, Datta SK (2009). Apigenin, a non-mutagenic dietary flavonoid, suppresses lupus by inhibiting autoantigen presentation for expansion of autoreactive Th1 and Th17 cells. *Arthritis Res Ther.*, **11(2)**, R59.

- Kasai H (1997).** Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res.*, **387(3)**, 147-163.
- Kayaalp O (2005).** *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*. Cilt 1, 11. Baskı, Ankara: Hacettepe Taş Yayıncılık, s: 317-343.
- Kerr ME, Bender CM, Monti EJ (1996).** An introduction to oxygen free radicals. *Heart Lung.*, **25(3)**, 200-9.
- Khokhar A, Qayyum A, Khan MWA (2017).** Protective effect of melatonin against methotrexate induced hepatotoxicity in mice. *Pak Armed Forces Med J.*, **67(1)**, 126-30.
- Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP (1999).** Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.*, **58**, 759-765.
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS (2004).** Anti-Inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *J Pharmacol Sci.*, **96**, 229-245.
- Kiraly AJ, Soliman E, Jenkins A, Van Dross RT (2016).** Apigenin inhibits COX-2, PGE2, and EP1 and also initiates terminal differentiation in the epidermis of tumor bearing mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, **104**, 44-53.
- Kohen R, Nyska A (2002).** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.*, **30(6)**, 620-650.
- Koppenol WH (2001).** The Haber-Weiss cycle—70 years later. *Redox Rep.*, **6(4)**, 229-234.
- Kremer JM (2008).** Methotrexate treatment of rheumatic diseases: can we do better?. *Arthritis Rheum.*, **58(11)**, 3279-3282.
- Kuo ML, Lee KC, Lin JK (1992).** Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. *Fundam. Mol. Mech. Mut.*, **270(2)**, 87-95.
- Kurnik D, Loebstein R, Fishbein E, Almog S, Halkin H, Bar-Meir S, Chowers Y (2003).** Bioavailability of oral vs. subcutaneous low-dose methotrexate in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.*, **18(1)**, 57-63.
- Lampropoulos P, Lambropoulou M, Papalois A, Basios N, Manousi M, Simopoulos C, Tsaroucha AK (2013).** The role of apigenin in an experimental model of acute pancreatitis. *J Surg Res.*, **183**, 129-137.

Lemineur T, Deby-Dupont G, Preiser JC (2006). Biomarkers of oxidative stress in critically ill patients: what should be measured, when and how?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, **9(6)**, 704-710.

Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Ambriz-Perez DL, Heredia JB (2016). Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases. *Int J Mol Sci.*, **17(6)**, 921.

Li F, Lang F, Zhang H, Xu L, Wang Y, Zhai C, Hao E (2017). Apigenin alleviates endotoxin-induced myocardial toxicity by modulating inflammation, oxidative stress, and autophagy. *Oxid Med Cell Longev.*, **2017(2302896)**, 1-10.

Li RS, Wang XB, Hu XJ, Kong, LY (2013). Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potential multifunctional acetylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett.*, **23(9)**, 2636-2641.

Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci.*, **16(11)**, 26087-26124.

Li W, Dai RJ, Yu YH, Li L, Wu CM, Luan WW, Meng WW, Zhang XS, Deng YL (2007). Antihyperglycemic effect of *Cephalotaxus sinensis* leaves and GLUT-4 translocation facilitating activity of its flavonoid constituents. *Biol Pharm Bull.*, **30(6)**, 1123-1129.

Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK (1999). Suppression of Inducible Cyclooxygenase and Inducible Nitric Oxide Synthase by Apigenin and Related Flavonoids in Mouse Macrophages. *Carcinogenesis.*, **20**, 1945–1952.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.*, **4(8)**, 118-126.

Losi G, Puia G, Garzon G, de Vuono MC, Baraldi, M (2004). Apigenin modulates GABAergic and glutamatergic transmission in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol.*, **502(1)**, 41-46.

Lv X, Qiu M, Chen D, Zheng N, Jin Y, Wu Z (2014). Apigenin inhibits enterovirus 71 replication through suppressing viral IRES activity and modulating cellular JNK pathway. *Antiviral Res.*, **109**, 30–41.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.*, **79**, 727–747.

McCord JM (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.*, **108(8)**, 652-659.

Mercuri F, Quagliario L, Ceriello A (2000). Oxidative stress evaluation in diabetes. *Diabetes Technol Ther.*, **2(4)**, 589-600.

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.*, **52(4)**, 673-751.

Moghadam AR, Tutunchi S, Namvaran-Abbas-Abad A, Yazdi M, Bonyadi F, Mohajeri D, Mazani M, Marzban H, Los MJ, Ghavami S (2015). Pre-administration of turmeric prevents methotrexate-induced liver toxicity and oxidative stress. *BMC Complement Altern Med.*, **15(1)**, 246.

Ng SP, Wong KY, Zhang L, Zuo Z (2004). Evaluation of the first-Pass glucuronidation of selected flavones in gut by caco-2 monolayer model. *J Pharm Pharm Sci.*, **8**, 1–9.

Nielsen SE, Young JF, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Sandström B, Dragsted LO (1999). Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *Br J Nutr.*, **81**, 447–455.

Nile SH, Keum YS, Nile AS, Jalde SS, Patel RV (2017). Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives. *J Biochem Mol Toxicol.*, **32(1)**, 1-8.

Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME (1998). Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, **67(6)**, 1210-1218.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.*, **95(2)**, 351-358.

Özdamar K (2003). *SPSS ile Biyoistatistik*. 5. Baskı. Eskişehir: Kaan Kitabevi.

Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB (2008). Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. *Mutat Res.*, **655(1-2)**, 59-67.

Paglia DE, Valentine WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Met.*, **70**, 158-169.

Panda S, Kar A (2007). Apigenin (4', 5, 7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol.*, **59(11)**, 1543-1548.

Paredes-Gonzalez X, Fuentes F, Jeffery S, Saw CLL, Shu LM, Su ZY, Kong ANT (2015). Induction of NRF2-mediated gene expression by dietary phytochemical flavones apigenin and luteolin. *Biopharm Drug Dispos.*, **36**, 440–451.

Patel D, Shukla S, Gupta S (2007). Apigenin and Cancer Chemoprevention: Progress, Potential and Promise (Review), *Int J Oncol.*, **30**: 233-245.

Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.*, **30(1)**, 11-26.

Qian S, Fan W, Qian P, Zhang D, Wei Y, Chen H, Li X (2015). Apigenin restricts FMDV infection and inhibits viral IRES driven translational activity. *Viruses*, **7**, 1613–1626.

Rašković A, Gigov S, Čapo I, Kusturica MP, Milijašević B, Kojić-Damjanov S, Martić N (2017). Antioxidative and Protective Actions of Apigenin in a Paracetamol-Induced Hepatotoxicity Rat Model. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.*, **42(5)**, 849-856.

Ratty AK, Das NP (1988). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **39(1)**, 69-79.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010). Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked? *Free Radic Biol Med.*, **49**, 1603–1616.

Reznick AZ, Packer L (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.*, **233**, 357-363.

Ribeiro D, Freitas M, Lima JL, Fernandes E (2015). Proinflammatory pathways: The modulation by flavonoids. *Med Res Rev.*, **35**, 877–936.

Routray W, Orsat V (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioproc Tech.*, **5(2)**, 409-424.

Salah AM, Dongmo AB, Kamanyi A, Bopelet M, Wagner H (2001). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory effect by *Ruellia praetermissa*. *Pharm Biol.*, **39**, 16 – 19.

Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N (2012). Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem.*, **19(28)**, 4850-4860.

Scalbert A, Williamson G (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.*, **130**, 2073–2085.

Schafranski MD, Merlini AB, Chaves de Araujo EA, Bueno de Camargo NL, Arruda P (2012). *Methotrexate: Update on Pharmacology, Clinical Applications and Warnings*. Nova Sci Publishers, ISBN: 978-1-61942-848-5, p: 3-9.

Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs.*, **21(1)**, 24-28.

Schmiegelow K, Al-Modhwahi I, Andersen MK, Behrendtz M, Forestier E, Hasle H, Heyman M, Kristinsson J, Nersting J, Nygaard R, Svendsen AL, Vettenranta K, Weinshilboum R (2009). Methotrexate/6-mercaptopurine maintenance therapy influences the risk of a second malignant neoplasm after childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study. *Blood*, **113(24)**, 6077-6084.

Schornage JH, McVie JG (1983). The clinical pharmacology of methotrexate. *Cancer Treat Rev.*, **10(1)**, 53-75.

Sedlak J, Lindsay RH (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.*, **25**, 192-205.

Şener G, Eksioğlu-Demiralp E, Çetiner M, Ercan F, Yeğen BC (2006). β -glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol.*, **542(1-3)**, 170-178.

Serraj K, Federici L, Maloisel F, Alt M, Andrès E. (2007). Pancytopenia related to low-dose methotrexate: study of five cases and review of the literature. *Rev Med Interne.*, **28(9)**, 584-588.

Shen DD, Azarnoff DL (1978). Clinical pharmacokinetics of methotrexate. *Clin Pharmacokinet.*, **3(1)**, 1-13.

Shukla S, Gupta S (2010). Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharmacol. Res.*, **27(6)**, 962-978.

Sies H (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.*, **4**, 180-183.

Singh JP, Selvendiran K, Banu SM, Padmavathi R, Sakthisekaran D (2004). Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytomedicine*, **11(4)**, 309-314.

Singh R, Devi S, Gollen R (2015). Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: larger-than-life. *Diabetes Metab Res Rev.*, **31(2)**, 113-126.

Sirotnak FM, Donsbach RC, Dorick DM, Moccio DM (1976). Tissue pharmacokinetics, inhibition of DNA synthesis, and tumor cell kill after high-dose methotrexate in murine tumor models. *Cancer Res.*, **36(12)**, 4672-4678.

Soliman KF, Mazzio EA (1998). In Vitro Attenuation of Nitric Oxide Production in C6 Astrocyte Cell Culture by Various Dietary Compounds. *Exp Biol Med.*, **218**, 390-397.

Song M, Li L, Li M, Cha Y, Deng X, Wang J (2016). Apigenin protects mice from pneumococcal pneumonia by inhibiting the cytolytic activity of pneumolysin. *Fitoterapia*, **115**, 31-36.

Sparks JA, Barbhuiya M, Karlson EW, Ritter SY, Raychaudhuri S, Corrigan CC, Lu F, Selhub J, Chasman DI, Paynter NP, Ridker PM, Solomon DH (2017). Investigating methotrexate toxicity within a randomized double-blinded, placebo-controlled trial: Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial-Adverse Events (CIRT-AE) Study. *Semin Arthritis Rheum.*, **47(1)**, 133-142.

Sung B, Chung HY, Kim ND (2016). Role of apigenin in cancer prevention via the induction of apoptosis and autophagy. *J Cancer Prev.*, **21(4)**, 216.

Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.*, **104(2)**, 466-479.

Tsaroucha AK, Tsiaousidou A, Ouzounidis N, Tsalkidou E, Lambropoulou M, Giakoustidis D, Chatzaki E, Simopoulos C (2016). Intraperitoneal administration of apigenin in liver ischemia/reperfusion injury protective effects. *Saudi J Gastroenterol.*, **22(6)**, 415-422.

Türkcü G, Alabalık U, Keleş AN, Bozkur, M, İbiloğlu İ, Fırat U, Büyükbayram H (2015). Protective effects of carvacrol and pomegranate against methotrexate-induced intestinal damage in rats. *Int J Clin Exp Med.*, **8(9)**, 15474-81.

Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M, Senturk O, Avsar E, Haklar G, Celikel C, Hulagu S, Tozun N (2008). Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci.*, **53(4)**, 1071-1077.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.*, **27(2)**, 120-139.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, **39(1)**, 44-84.

Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, Van De Putte LB (1998). Methotrexate in rheumatoid arthritis: An update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum.*, **27(5)**, 277-292.

Vardi N, Parlakpınar H, Ates B (2012). Beneficial effects of chlorogenic acid on methotrexate-induced cerebellar Purkinje cell damage in rats. *J Chem Neuroanat.*, **43(1)**, 43-47.

Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E (1999). An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res.*, **29(2)**, 49.

Vogel WH, Snyder R, Schulman MP (1963). The inhibition of dehydrogenases by folic acid and several of its analogs. *Biochem Biophys Res Commun.*, **10(1)**, 97-101.

Wang E, Chen F, Hu X, Yuan Y (2014). Protective effects of apigenin against furan-induced toxicity in mice. *Food Funct.*, **5**, 1804–1812.

Wang F, Liu JC, Zhou RJ, Zhao X, Liu M, Ye H, Xie ML (2017). Apigenin protects against alcohol-induced liver injury in mice by regulating hepatic CYP2E1-mediated oxidative stress and PPAR α -mediated lipogenic gene expression. *Chem Biol Interact.*, **275**, 171-177.

Wang Y, Xu YS, Yin LH, Xu LN, Peng JY, Zhou H, Kang W (2013). Synergistic anti-glioma effect of hydroxygenkwanin and apigenin in vitro. *Chem Biol Interact.*, **206**, 346–355.

Wessels JA, Huizinga TW, Guchelaar HJ (2007). Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, **47(3)**, 249-255.

Widemann BC, Adamson PC. (2006). Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*, **11(6)**, 694-703.

Yang J, Wang XY, Xue J, Gu ZL, Xie ML (2013). Protective effect of apigenin on mouse acute liver injury induced by acetaminophen is associated with increment of hepatic glutathione reductase activity. *Food Funct.*, **4**, 939–943.

Yoshikawa T, Naito Y (2002). What is oxidative stress?. *Japan Med Assoc J.*, **45(7)**, 271-276.

Yüncü M, Bükücü N, Bayat N, Sencar L, Tarakçıoğlu M (2015). The effect of vitamin E and L-carnitine against methotrexate-induced injury in rat testis. *Turk J Med Sci.*, **45(3)**, 517-525.

Zhang Y, Jin T, Zhuo RX (2005). Methotrexate-loaded biodegradable polymeric micelles: preparation, physicochemical properties and in vitro drug release. *Colloids Surf B Biointerfaces.*, **44(2-3)**, 104-109.

Zhou X, Gao T, Jiang XG, Xie ML (2016). Protective effect of apigenin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by increments of lung antioxidant ability and PPAR gamma expression. *J Funct Foods.*, **24**, 382–389.

Zhu ZY, Gao T, Huang Y, Xue J, Xie ML (2016). Apigenin ameliorates hypertension-induced cardiac hypertrophy and downregulates cardiac hypoxia inducible factor-1 alpha in rats. *Food Funct.*, **7**, 1992–1998.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Yeliz AKYOL
Doğum Yeri ve Yılı : Sazak/ BURDUR -1977
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
Uyruğu : T.C.
Telefon No : 0 506 578 33 80
Elektronik Posta : ylzakyl@hotmail.com
İletişim Adresi : Emek Mahallesi Farabi Sokak
No:2 BURDUR



Eğitim Durumu

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Yüksek Lisans : Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı (Devam Ediyor)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

1. Serbest Eczacılık (Şubat 2001-Temmuz 2007)
2. Gölhisar Devlet Hastanesi (Temmuz 2007-Mart 2009)
3. Isparta Gülken Devlet Hastanesi (Mart 2009-Ağustos 2011)
4. Burdur İl Sağlık Müdürlüğü (Eylül 2011-Halen devam ediyor)