

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**RATLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI  
KARACİĞER VE BÖBREK HASARINDA C  
VİTAMİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Mehtap SAVRAN

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Ekrem ÇİÇEK

ISPARTA 2011

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2270-TU- 10

## ÖNSÖZ

Sadece farmakoloji bilgisiyle değil, Atatürkçü duruşuyla da örneğimiz olan değerli hocamız ve tez danışmanım, Yrd. Doç Dr. Ekrem ÇİÇEK' e, tez konumun belirlenmesi ve tez çalışmalarımın ilerlemesinde her aşamada sonsuz katkısı olan, uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel desteğinin yanında başka pek çok konuda bizleri destekleyen ve yüreklendiren, kıymetli hocamız ve Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Mehmet Kaya ÖZER' e, laboratuvar çalışmaları kapsamında histolojik değerlendirmeler için Doç. Dr. Meral ÖNCÜ' ye, biyokimyasal değerlendirmeler için Yrd. Doç. Dr. Duygu Kumbul DOĞUÇ' a, istatistiksel analizlerin yapılmasında katkıda bulunan İnönü Üniversitesinden Doç. Dr. Yılmaz Çiğremiş'e ve Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimine çok teşekkür ederim.

Eğitimimin başladığı günden beri desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Farmakoloji Anabilim Dalından Uzm. Dr. Halil AŞCI' ya, Arş. Gör. Şükriye YEŞİLOT' a, Arş. Gör. Nihan CANKARA' ya, Histoloji Anabilim Dalından Arş. Gör. Aydın CANDAN' a ve çalışmalar sırasındaki katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalından Arş. Gör. Dr. Birsen DAĞDEVİREN' e de teşekkürler.

...ve sabrın, özenin, özverinin ete- kemiğe bürünmüş hali, annem Ferah BULDAÇ' a, bana kitapları ve okumayı sevdiren, sevdiğim ilk adama, babam Hasan BULDAÇ' a, hep 'iyi ki varlar' dediğim kız kardeşlerim, gemi mühendisi Meral POLAT ve mimar Meltem BULDAÇ' a, ve en kıymetlim, İnci taneme sonsuz teşekkürler...

Dr. Mehtap SAVRAN

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir antimetabolit olan Metotreksat (MTX), çocukluk çağı akut lösemilerinde geçici remisyon sağladığı bulunduğundan beri (1948) klinik kullanımda olan bir ajandır. Klasik olarak folik asit antagonisti olarak bilinen MTX, aktif olarak bölünen hücrelerde dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe ederek folik asitin folinik asite dönüşümünü engeller (1, 2) ve bu etkisiyle başta çocukluk çağı lösemi-lenfomaları olmak üzere meme kanseri, osteosarkom, baş ve boyun kanserleri, akciğer kanseri, üroepitelyal kanserler gibi solid organ tümörlerinin tedavisinde kullanılır (3). Son dönemlerde, MTX' in antimetabolit özelliği dışında, antiinflamatuvar, antiproliferatif, immunosupresif, antipsöriatik etkinlikleri de bulunmuş (4, 5, 6) ve bu etkileri nedeniyle MTX, kanser tedavisi dışında, psöriazis, romatizmal hastalıklar gibi inflamatuvar olaylar, dermatomyozit, Wegener granülomatozisi, sarkoidoz, HIV ile ilişkili bakteriyel, parazitik enfeksiyonlar ve ektopik gebelik, ilk trimesterde gebelik terminasyonları ve gestasyonel trofoblastik hastalıklar gibi jinekolojik ve obstetrik durumlarda da tercih edilen bir ajan haline gelmiştir (7, 8, 9, 10 )

Ancak, bu geniş kullanım endikasyonlarına karşın, MTX kullanımı, özellikle pmönomi, nefrotoksisite ve hepatotoksisite gibi bir dizi advers reaksiyonla ilişkilidir (11, 12, 13 ) ve bu reaksiyonlar nedeniyle, zaman zaman ilaç kullanımında doz azaltımına gidilmekte ya da ilaç tamamen kesilmektedir. Yapılan çalışmalar, ilacın başta hepatotoksisite ve nefrotoksisite olmak üzere gelişen yan etkilerinde, çoğunlukla reaktif oksijen radikallerinin(ROS ) meydana getirdiği oksidatif hasarı sorumlu tutmuştur (13, 14, 15 ). Bu çalışmaların ışığında, gelişen yan etkileri önlemek için güçlü antioksidan ajanlar denenmiş ve önemli ölçüde başarılı olunmuştur (13, 16, 15 ). Ancak bu ajanlarla ilgili uygulamaların sonuçları, denen kimyasalların pahalı olması ya da ruhsatlı preparatlarının olmaması gibi nedenlerle, klinik çalışmalara yeterli ölçüde yansımamıştır.

C vitamini, suda çözünen ve insan vücudunda sentez edilemeyen vitaminlerden biridir. Yapıca altı karbonlu monosakkaritlere benzeyen C vitamini, in vivo ve in vitro şartlarda antioksidan özellik gösterir (17, 18 ). Bunun yanı sıra, belirli hidroksilasyon ve amidasyon reaksiyonlarının koenzimi olarak kollajen sentezinde, ksenobiyotiklerin mikrozomal metabolizmasında, hemoglobin sentezinde, nörohipofiz hormonlarının biyosentezinde ve muhtemelen adrenal korteksteki steroid hormon biyosentezinde rol oynar (17, 19). C vitamini, esas olarak skorbüt hastalığının önlenmesi ve tedavisi amacıyla

kullanılır (20). Ayrıca, idrarın asitleştirilmesi, methemoglobinemi (21) ve yanık tedavisi (22) gibi durumlarda da tercih edilmektedir.

Ancak son dönemlerde C vitaminin antioksidan özelliği daha ön plana çıkmış ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri üzerine yapılan çalışmalar ağırlık kazanmıştır (23, 24, 25). Parasetamol ve karbontetraklorür gibi ajanlarla gelişen oksidatif hasarı önleyen C vitamini, ROS gelişimini engelleyerek ilaca bağlı yan etki gelişimini azaltmıştır (18, 26 ). Bu noktadan hareketle biz, ucuz ve kolay ulaşılan, oral uygulamaya olanak veren, in vivo ve in vitro olarak antioksidan özelliği kanıtlanmış C vitaminini, MTX kullanımı ile ilişkili yan etkilere karşı profilaktik olarak kullanmayı planladık



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2. 1. İlaç Aracılı Karaciğer ve Böbrek Hasarı

#### 2. 1. 1. İlaç Aracılı Karaciğer Hasarı

Bir ilacın piyasadan çekilmesine neden olan en yaygın nedenlerden birisi, ilaç kullanımı ile karaciğer (Kc) enzimlerinin yükselmesidir (27 ). Alkol aracılı Kc hasarı, ilaç kaynaklı Kc hasarları içinde en yaygın olanıdır. (28).

#### 2. 1. 1. 1. İlaç Aracılı Karaciğer Hasar Nedenleri

İlaçlarla gelişen Kc hasarı, hepatosellüler hasar (Tablo 1), kolestatik hasar (klorpromazin), hepatosellüler ve kolestatik hasarın bir arada bulunması, karaciğerin vasküler hastalıkları (androjenler) ve karaciğerin neoplastik hastalıkları (polivinil klorür ) şeklindedir.

**Tablo 1:** Hepatosellüler Hasar Tipleri İle ilişkili İlaçlar (28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 )

Sentrolobüler Nekroz	Steatohepatit	Fosfolipidoz	Generalize Hepatosellüler Nekroz	Toksik Siroz
Asetaminofen	Alkol	Amiadaron	INH	MTX
Halotan	Tetrasiklin		Ketokonazol	A vitamini
Aspirin	Sodyum valproat			
Valproat				

#### 2. 1. 1. 2. İlaç Aracılı Karaciğer Hastalıklarının Mekanizmaları

**Tablo 2:** İlaç Aracılı Karaciğer Hastalıklarının Mekanizmaları (39, 27, 40, 41, 42 )

Oto-immunitenin Uyarılması	İdiosenkратik Reaksiyonlar	Kalsiyum Dengesinin Bozulması ve Hücre Membran Hasarı	CYP 450 Enzimlerinin Metabolik Aktivasyonu	Apoptozisin Uyarılması	Mitokondriyal Zedelenme
Halotan	Minosiklin	Lovastatin	Asetaminofen	Asetaminofen (kümülatif dozları )	Aspirin,
Sulfametaksazol	Nitrofurantion	Venlafaksin	Furosemid		Valproik asit
Karbamazepin	Fenitoinin	Falloidin	Diklofenak		Tetrasiklin
Nevirapin	Amiodaron				Amiodaron
INH	INAH				
Fenitoin	Ketokonazol				
Nitrofurantion					
Trazodon					

### 2. 1. 2. İlaç Aracılı Böbrek Hasarı

İlaçlarla gelişen böbrek hasarı; tübüler epitelyal hücre hasarı (aminoglikozid), hemodinami aracılı böbrek hasarı (ACE inh ), obstrüktif nefropati (intratübüler obstrüksiyon-lovastatin ve nefrolitiazis-triamteren), glomerüler hastalıklar ( NSAİD), tübülointerstisyel hastalıklar ( Tablo 3), renal vaskülit, trombozis ve kolesterol embolisi (hidralazin) şeklindedir.

Tablo 3: Tübülointerstisyel Hasarla İlişkili İlaçlar (43, 44, 45, 46, 47, 48 )

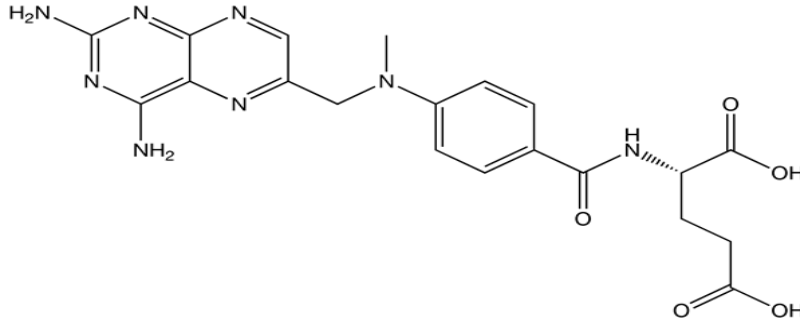
Akut Alerjik İnterstisyel Nefrit	Kronik İnterstisyel Nefrit	Nefrokalsinozis	Papiller Nekroz
β-laktam antibiyotikler (metisilin )	Lityum	Oral sodyum fosfat solüsyonunu	Fenasetin
NSAİD (Fenoprofen )	Siklosporin		
	Aristolochic asid		

### 2. 2. Metotreksat

Metotreksat, yüksek dozlarda pek çok malignite tedavisinde ve görece daha düşük dozlarda otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir terapötik ajandır (49).

### 2. 2. 1. Etki Mekanizması

Bir folik asit antagonisti olarak bilinen Metotreksat (MTX), kimyasal olarak folik asidin 4- amino-N<sup>10</sup>- metil analogudur (50).



Şekil 1: Metotreksatın kimyasal yapısı

MTX' in primer hedefi dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimidir. Bu enzimin inhibisyonu, 5-10 metilen tetrahidrofolik asit ve N-10 formil tetrahidrofolik asit gibi tetrahidrofolat kofaktörlerinin kısmi azalmasıyla sonuçlanır (51) Bu ko-faktörler, timidilat ve pürin nükleotitleriyle serin ve metionin gibi aminoasitlerin sentezi için gereklidir. Sonuçta DNA, RNA ve protein yapımı bozulur.

Ek olarak MTX, fizyolojik karşıtı folatta olduğu gibi, normal ve tümoral hücrelerde bir dizi değişikliğe uğrayarak poliglutamat türevlerini (MTX- PGs ) meydana getirir. Bu poliglutamat türevleri, hücre içinde bir folat kaynağı gibi davranır ve timidilat sentazı belirgin olarak inhibe etmenin yanında, pürin biyosentezinin erken aşamalarında kullanılan iki enzimi de bloke ederler. DHFR enziminin inhibe olmasıyla birikmiş olan dihidrofolatpoliglutamat türevleri de timidilat sentaz ve diğer enzimler için inhibitör etki gösterir (52).

### 2. 2. 2. Farmakokinetik Özellikleri

Oral yoldan uygulanan MTX, 25 mg/ kg dozdan daha az miktarlarda gastrointestinal sistemden tama yakın oranda absorbe olduğu halde, artan dozlarda bu oran azalacağından IV yol tercih edilir. IV uygulama sonrası, ilaç plazmadan 3 fazlı bir şekilde temizlenir. Hızlı distribüsyon fazını, renal klerensi gösteren ikinci faz takip eder.(2-3 saatlik yarı ömür). Üçüncü fazdaki yarılanma ömrü, yaklaşık olarak 8- 10 saat sürer. Eliminasyonun bu son döneminde, böbrek hasarı yüzünden meydana gelecek uzama, ilacın kemik iliği, gastrointestinal epitel ve cilt üzerindeki toksik etkilerinin artmasına neden olur. MTX' in plevral ya da peritoneal kavite gibi vücut boşluklarına dağılımı yavaştır. Ancak, asit ya da plevral efüzyon gibi nedenlerle meydana gelecek genişlemelerde, bu bölgeler ilaç deposu gibi davranıp ilacın yavaş salınımına neden olurlar. Bu nedenle plazma konsantrasyonundaki artış devam eder ve daha ciddi toksisite bulguları gelişebilir.

MTX' in yaklaşık olarak %50' si plazma proteinlerine bağlanır ve sulfonamid, salisilat, tetrasiklin gibi ilaçlarla birlikte kullanımda plazma düzeyi artar. Verilen dozun %90' a kadar olan kısmı, 48 saat içinde, en çok da ilk 8- 12 saat içinde değişmeden idrarla atılır. MTX' in böbreklerden atılımı, glomerüler filtrasyon ve aktif tübüler sekresyonun kombinasyonu ile olur. Bu yüzden, renal kan akımını azaltan, nefrotoksik ya da zayıf organik asit yapısındaki ilaçlarla birlikte kullanımı, renal atılımı azaltarak daha ciddi myelosupresyona neden olabilir. MTX metabolizması, insanlarda genellikle minimal düzeydedir ancak yüksek doz ilaç uygulaması ardından 7- hidroksi-MTX gibi metabolitler belirlenebilir. MTX' in santral sinir sistemine, sistemik dolaşımdaki dozunun yaklaşık %3' ü kadar geçer. (51 )

### **2. 2. 3. Endikasyonları**

Antifolat tedavi, 1948 yılında aminopterin kullanıma girmesinden beri, çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde uzun süreli ve etkinliği net olarak ortaya konan bir role sahiptir. 1960' lardan sonra ise, aminopterin oranla toksisitesi daha belirlenebilir olan MTX, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi ve non- Hodgking lenfoma tedavisinde bir köşe taşı haline gelmiştir (53). Çocuklara gelişen ALL tedavisinde, hem remisyon indüksiyonunda, hem de konsolidasyon sırasında yüksek dozda intramusküler MTX kullanımında kür şansı, oldukça yüksektir. Ancak erişkinlerde görülen lösemilerde, lösemik menenjitin önlenmesi ve tedavisi dışında tedavi etkisi daha sınırlıdır. MTX, meningeal karsinomatosis tedavisinde, meningeal lösemi ve lenfomanın profilaksi ve tedavisinde intratekal olarak kullanılır (54). Burkitt ve diğer non- Hodgking lenfomaların kombinasyon tedavisinde faydalı etkileri olan MTX, ayrıca göğüs, baş- boyun, ovaryum ve mesane kanserinde kullanılan bir ajandır. Lökoverin kurtarma

tedavisi ile birlikte uygulanan yüksek doz MTX, osteosarkomun adjuvan tedavisinde kullanılan standart protokolün bir parçasıdır (55). Koryokarsinomada ve ya ilişkili trofoblastik tümörlerde düşük doz MTX tedavisi, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma yaparak, kaspaz 9 enzimini aktive ederek, Bax/ Bcl- 2 gen ekspresyonunda up- regülasyon yaparak hücrelerde apoptozisi indüklemiştir (57)

MTX, aktif romatoid artrit ve juvenil romatoid artrit için (JRA), hastalığı modifiye edici ilaçlar arasında ilk seçenek olmaktadır. Aslında MTX, JRA' lı hastalarda yapılmış çift kör, randomize bir çalışmada, plaseboya karşı üstünlük gösteren tek ilaçtır (57). MTX, DHFR enzim inhibisyonunun yanında, 5- aminoimidazol- 4- karboksamid ribonükleotit transformilaz enzimini inhibe ederek, intrasellüler ve ekstrasellüler adenozin düzeyini artırmaktadır. Adenozinin, anti-inflamatuar sitokinler olan IL-1 reseptör antagonist( IL-1 ra) ve IL- 10 seviyelerini yükselttiği bilinmektedir (58). MTX, makrofajlardaki IL üretimini ex vivo ve in vivo olarak inhibe eder (59). Hatta, monosit içindeki IL-1 ra/ IL-1 oranını artırarak, bu hücrelerdeki inflamatuvar aktiviteyi baskılıyor olabilir (60). MTX' in JRA' lı hastalarda, tümör nekroz faktör alfa ( TNF $\alpha$  ) ve IL- 6 yapımı üzerindeki etkileri ise tartışmalıdır (61, 62, 63). Sonuç olarak antiinflamatuvar ve immünsüpresif etkilerinden dolayı, düşük doz MTX, reflakter romatoid artrit, JRA ve dirençli psöriazis hastalarının tedavisinde de kullanılmaktadır (54, 52, 64)

MTX' in romatizmal hastalıklarda varsayılan etki mekanizmasını özetlemek gerekirse;

- 1- Hücre proliferasyonunun azalması
- 2- T hücrelerinin apoptozisinde artış
- 3- Endojen adenozin salınımında artış
- 4- Hücresel adezyon moleküllerinin ekspresyonunda değişikliklik
- 5- Sitokin yapımı, humoral yanıt ve kemik formasyonu üzerine etki (65 )

Kalıtsal geçişli bir dermatoz olan Hailey- Hailey hastalığının tedavisinde de kullanılan MTX, burada muhtemelen lökosit fonksiyonlarını baskılamının yanında, nötrofil ve monosit kemotaksisini inhibe ederek ve epidermal hücre bölünmesini baskılayarak etki göstermiştir (65).

#### **2. 2. 4. Yan Tesirleri**

MTX, folat metabolizmasını antagonize ederek antineoplastik özellik gösterirken, kanser hücreleri yanında hızlı bölünen hücrelerde de nükleik asitlerin yapımını engeller (66). Sonuçta, antifolat tedavinin primer toksisitesi ve yaygın etkileri, kemik iliği, cilt ve intestinal epitelyum hücreleri üzerindedir. Normal hücreler üzerindeki bu toksik etkileri önlemek için, (özellikle yüksek doz MTX tedavisine bağlı ) MTX ile birlikte başka bir folat analogu olan 5-formil- tetrahidrofolat kullanımı yaygın olarak uygulanan bir protokoldür (67). Yan etkiler genellikle iki hafta içinde geri döner, ancak renal fonksiyonu bozulmuş hastalarda, ilaç atımındaki azalmaya bağlı olarak myelosupresyon uzayabilir.

Bu yaygın etkilerin yanında, alopesi, dermatit, interstisyel pnömoni, nefrotoksisite, hepatotoksisite, oogenez/ spermatogenezde defektler, düşük ve teratojenite gibi yan etkiler de izlenebilir.

Karaciğer enzimlerinde artış, yüksek doz ya da uzun süreli MTX kullanımında beklenen bir bulgudur, ancak genellikle geri dönüşümlüdür.(51) Lösemi, psöriazis ve romatoid artrit MTX ile tedavisi sırasında gelişen hepatotoksisite, non- spesifik yağlı değişiklikler, nükleer polimorfizm, hepatosit nekrozu, kronik portal inflamasyon, fibrozis ya da siroz şeklinde ortaya çıkabilir. Karaciğer hasarının mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, intrasellüler MTX-PG birikimi ve folat azalmasının sorumlu olabileceği düşünülmektedir (68)

Lökoverin eklenmiş, 1000 mg/m<sup>2</sup> ve üzeri MTX uygulaması, yüksek doz MTX olarak tanımlanır. Lökoverinle birlikte uygulanan yüksek doz MTX, hastaların çoğu tarafından iyi tolere edilse de, MTX ve metabolitlerinin renal tübüllerde birikmesi ile potansiyel olarak yaşamı tehdit edici olabilen nefrotoksisite gelişebilir. Asidik idrarda presipite olan MTX, obstrüktif üropati nedeniyle oligo- anürik böbrek hasarı oluşturabilir. Yüksek doz MTX' e bağlı gelişen nefrotoksisite, 1970' li yıllarda ilaca bağlı morbidite ve mortalitenin primer nedenini oluşturmaktaydı. (69, 70)

MTX'in akut, subakut ve kronik sendromları içeren pek çok değişik nörolojik komplikasyonla ilişkili olduğu bilinmektedir (71, 72) Klinik sendrom ve bunun ciddiyeti, ilaç uygulama yoluna, dozuna, birlikte kullanılan diğer nörotoksik ajanlara ve hastanın yaşına bağlıdır.

İntestinal epitel hücreleri de, hızlı çoğalan hücreler olduğundan MTX ile kolaylıkla inhibe olurlar. MTX, sıklıkla oral ve intestinal mukozada inflamasyona neden olur. Bu hasara, hücre çoğalmasının inhibe olmasının sonucu olarak ortaya çıkan intestinal bariyer fonksiyonlarında azalma ve ksenobiyotik ve endotoksinlerin invazyonu eşlik eder. Dolayısıyla

makrofaj ve nötrofiller gibi fagositer hücreler, inflamasyon alanına infiltre olur ve ROS üretilir (66)

Gastrointestinal yan tesirlerin, MTX' in hücre içinde biriken metabolitlerinin folat seviyelerini azaltmasına bağlı olduğu da ileri sürülmüştür. Folat, santral sinir sitemindeki nörotransmitterlerin metabolizmasında ve sentezinde kullanılmaktadır. Bu bağlantıya dayanarak, MTX' e bağlı gelişen gastrointestinal yan etkilerin santral sinir sistemine bağlı yan etkiler olduğu ve bunun hücre içi folat düzeyindeki azalma sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir.

Dirençli psöriazis hastalarında, özellikle hepatik ve hematolojik birçok yan etkiye rastlanmaktadır. MTX' e bağlı hematolojik yan etkilerin oluşumunda dihidrofolat redüktaz enziminin inhibisyonu sonucu DNA sentezindeki bozulma ve hızlı hücre değişimine sahip kemik iliğinin baskılanması sorumlu tutulmaktadır (64).

Düşük doz MTX tedavisinde çok nadir de olsa pansitopeni gelişebilmektedir. Mekanizmanın tam olarak bilinemediği bu yan tesirin ortaya çıkışında, yaşlı, böbrek fonksiyonları bozuk, kombine ilaç kullanımı olan hastalar risk grubunu oluşturmaktadır. Literatürde, MTX' in, NSAİD ve trimetoprim- sulfometaksazol gibi antifolat ilaçlarla kombine kullanımında pansitopeni sıklığının arttığını gösteren çalışmalar vardır. Bu nedenle risk grubunda olan hastalarda, MTX ile NSAİD ilaçların aynı gün kullanılmaması önerilir (73).

MTX' e ait osteopati ilk olarak lösemi, kafa içi tümörler, osteosarkom nedeniyle yüksek dozda MTX kullanan pediatrik hasta popülasyonda bildirilmiştir. Osteoporoz, kemik ağrısı ve özellikle distal tibia ve fibulada görülen stres kırıkları üçlüsü, MTX osteopatisini tanımlar. Osteosarkom nedeniyle yüksek doz MTX tedavisi gören 87 hastalık bir popülasyonda %9 oranında osteopati görüldüğü, en çok etkilenen iskelet bölgelerinin de distal tibia, distal radius, proksimal humerus olduğu bildirilmiştir. Yakın zamanlarda sadece yüksek doz değil, uzun süreli düşük doz MTX tedavisi uygulanan romatolojik hasta popülasyonunda da MTX osteopatisi oluşabileceği yönünde pek çok deneysel çalışma ve vaka takdimi vardır (74)

Folat eksikliğinin MTX toksisitesi gelişmesinde bir risk faktörü olduğu belirtilmektedir. Bu amaçla MTX yanına eklenen folik asit ya da folinik asitin toksisiteyi önlemek açısından birbirinden farklı olmadığı bildirilmektedir, ancak folinik asitin maliyeti daha fazladır. Buna karşın, edinilen klinik deneyimler, tedaviye eklenen özellikle fazla miktardaki folik asitin MTX etkinliğini azaltabileceğini ortaya koymuştur (75, 64).

### **2. 3. Oksidanlar ve Antioksidanlar**

### **2. 3. 1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar**

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Serbest oksijen radikalleri (ROS) enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (76).

Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir (77).

Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşan serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. (77).

Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (78).

Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller normalde radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır (79). Normal sağlıklı kişilerde serbest radikaller/antioksidanlar denge halindedir

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon- S-transferaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz, katalaz (CAT) ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (80).

### **2. 3. 2. Antioksidan Enzimler**

#### **2. 3. 2. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD)**

Mc Cord ve Fridovich tarafından 1968'de keşfedilmiştir. 3 tür SOD vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dir



Metalloprotein olan SOD bir süperoksid molekülünü  $O_2$  molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksid molekülünü hidrojen peroksite ( $H_2O_2$ ) indirger. Bu dismutasyon reaksiyonu süperoksid radikalinin anyon ve katyon formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4,8 de kendiliğinden de cereyan eder. Ancak fizyolojik şartlarda yani pH'nın 7,35- 7,45 arasında iken bu reaksiyon çok daha yavaş oluşacaktır (81, 82).

### **2. 3. 2. 2. Katalaz (CAT)**

Sumer ve Dounce tarafından 1937'de kristalize halde saflaştırıldı. Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında  $Fe^{+3}$  bulduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir. SOD'ın oluşturduğu  $H_2O_2$ 'i katalaz peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar. Glutasyon peroksidazın  $H_2O_2$ 'e karşı  $K_m$ 'i katalaza göre daha düşüktür. Yani düşük konsantrasyonlarda  $H_2O_2$ 'i glutasyon peroksidaz parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz aktivite kazanır. Katalaz aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur (81, 82).

### **2. 3. 2. 3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)**

Her birinde selenosistein içeren 4 alt birimden oluşur. Redükte glutasyonu yükseltgerken  $H_2O_2$ 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (83).

E vitamini yetersiz olursa membranı peroksidasyona karşı korur. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidandır. Glutasyon peroksidaz yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir. Çünkü selenyum bu enzimin bir integral parçasıdır (84, 85, 86).

### **2. 3. 2. 4. Glutasyon Redüktaz**

Yükseltgenmiş glutasyonu indirgenmiş hale çeviren 2 subünitten oluşmuş bir dimerdir. Her bir subünit, NADPH bağlayan alan, FAD bağlayan alan ve ara yüz alan olmak üzere 3 tane yapısal alan içerir. Okside glutasyon bir subünitin FAD alanı ve diğer subünitin arayüz alanından oluşan bir bağlanma bölgesi vardır. Glutasyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra subünitlerdeki iki sistein

arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyona aktarılmış olur (81).

### **2. 3. 2. 5. Glutasyon S-Transferaz (GST)**

Toksik metabolitlerle glutasyonun konjugasyonunu katalizleyen GST enzimi de toksik metabolitlerin detoksifikasyonuna yol açan başka bir antioksidan enzimdir (87).

### **2. 3. 3. Antioksidan Vitaminler**

#### **2. 3. 3. 1. E Vitamini**

İlk olarak Evans tarafından 1938 yılında bulunmuştur. Yağda çözünen vitamin olduğu için hem sellüler hem de subsellüler membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur. Membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir. En aktif formu  $\alpha$ -tokoferoldür. Zincir kırıcı antioksidan olarak fonksiyon görür. Hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen  $-OH$  grubu bağlıdır. Bu yüzden lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi yerine  $\alpha$ -tokoferolle birleşerek reaksiyon zinciri kırılmış olur. Böylece  $\alpha$ -tokoferol yeni bir radikal olan  $\alpha$ -tokoferol-O<sup>•</sup> e dönüştürülmüş olur. Bu radikalın ise başka bir yağ asidiyle birleşebilme aktivitesi düşüktür. Sonuçta zincir reaksiyonunu durdurur. Oluşan bu tokoferoksil radikali membran yüzeyinde askorbik asitle (C vitamini) reaksiyona girerek tekrar tokoferole dönüşmektedir (88).

$\alpha$ -tokoferol ve C vitamininin organizmada düşük düzeylerde olması miyokard enfarktüsü ve bazı kanserlerin artmış insidansı ile ilişkili bulunmuştur.

#### **2. 3. 3. 2. A Vitamini**

A vitaminleri görme, üreme, büyüme ve epitel dokusunun sağlamlığı için gerekli olan bir grup bileşiklerdir. Diyetteki retinolün oksidasyonu sonucu oluşan retinoik asit, retinoidlerin görme dışında diğer etkilerinin çoğuna aracılık eder.  $\alpha$ -tokoferolle karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır. İnsan LDL'sinde  $\alpha$ -tokoferol'ün 1/20'si oranında bulunur ve  $\alpha$ -tokoferol bittikten sonra kullanılır (81).

### **2. 3. 3. 3. C Vitamini ( Askorbik Asit )**

C vitamini, doğal olarak bulunan en güçlü indirgeyici ajanlardan birisidir (89) ve vücutta önem taşıyan çeşitli hidroksilasyon reaksiyonlarında işlev görür (90).

#### **2. 3. 3. 3. 1. Kimyası:**

Kimyasal olarak glukoza benzeyen C vitamini (L- askorbik asit), 2-okso-L-gulofuranolaktonun enol şeklidir (91, 90). Beyaz kristal yapılı katı şeklinde olan askorbik asit, suda kolay çözünür. Geri dönüşümlü şekilde yükseltgenerek askorban adı ile bilinen dehidroaskorbik asidi oluşturur (90). Birbirine dönüşebilen bu iki form, insanda biyolojik olarak eşit aktivite gösterir (90). Ancak dehidro şekli, indirgenmiş şeklinden daha dayanıklıdır. Bitkiler ve hayvanların birçoğu, D- glukozu kullanarak D- glukuronik asit ve L- glonik asit üzerinden bu vitamini sentezlerler (90). Ancak insanlarda ve kobay, guinea pig, kuş ve balık gibi hayvanlarda L- gulonolakton oksidaz enziminin olmamasından dolayı C vitamini sentezlenemez (91).

#### **2. 3. 3. 3. 2. C Vitamini Kaynakları**

C vitamininin önemli kaynakları arasında, domates, patates (özellikle kabukları), turunçgiller, ekşi ve kabuksuz meyveler, yeşilbiber, çiğ lahana, kavun, karpuz ve yeşil yapraklı sebzeler bulunur. İnsan sütü de C vitamini içerir.

Besin maddelerindeki askorbik asit, havayla temas ettiğinde oksidasyona uğrar ve vitamin etkisini kaybeder. Fazla pişirme ile de vitamin tahrip olur. Çiğ besin maddelerinde askorbik asidi okside eden enzim, inaktif halde bulunur. Kesme ya da soyma işlemleriyle enzim aktifleşerek askorbik asit oksitlenir. Bu enzimin aktivitesi bakır iyonu varlığında artar. İnce barsaklardan emilen C vitamini, 100 mg' a kadar % 95 oranında emilirken, miktar arttıkça emilim azalır. 1 gr C vitamini alındığında emilim oranı, %70' lere kadar düşer. Bu nedenle besin maddeleri ile alınan C vitamini, saf olarak alınan C vitamininden daha iyi emilir. Suda çözünen C vitamini, vücutta depolanamaz ve her gün alınması gerekir. Fazla C vitamini, idrarla oksalat şeklinde atılır (89, 90).

### 2. 3. 3. 3. 3. Fonksiyonları

C vitamininin bağ doku metabolizmasındaki önemi, 16. yüzyıldan beri bilinmektedir. C vitamini, kollajen sentezinde kritik önemleri olan hidroksiprolin ve hidroksilizin aminoasitlerinin oluşumunu sağlayan protokollagen hidroksilazın yapısında, ko- faktör olarak görev yapar. Kartilaj, dentin ve kemiğin intrasellüler materyallerini, bu kollajen ve ilişkili materyaller oluşturur (92). Benzer şekilde askorbik asitin,  $\beta$ - hidroksi bütirik asit olarak bilinen ve enerji üretiminde yağ asitlerinin mitokondri içine transferini sağlayan karnitin biyosentezinde gerekli bir yapı olduğu ve karnitin sentezi için gerekli  $\gamma$ - bütirobetainin hidroksilasyonunda ko- faktör olarak rol oynadığı düşünülmektedir (93, 94). Buna karşın, son dönemlerde C vitamini sentezinde rol oynayan glukonolaktonaz (-) farelerle yapılmış çalışmalarda, C vitamini sentezi olmamasına rağmen, karnitin sentezinin devam ettiğini gösteren bir çalışma da bulunmaktadır (95).

Tirozin metabolizmasında (tirozinden norepinefrin ve epinefrin sentezinde dopamin  $\beta$ - monooksijenazla birlikte etkilidir )(96), mikrozomal ilaç metabolizmasında, adrenallerde anti-inflamatuar steroidlerin sentezinde, folik asit metabolizmasında ve lökosit fonksiyonlarında C vitamini etkili olmaktadır. Safra asidi sentezinde 7  $\alpha$ - hidroksilaz enzimiyle birlikte çalışır. Bu işlevlerin L- askorbik asidin özellikle  $Fe^{+2}$  enzim sistemleri üzerindeki indirgen etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir.  $Fe^{+2}$  şeklinde demir emilimi, vitaminin oral yolla alınmasından hemen sonra artar.

Oksidatif DNA hasarını ve lipid peroksidasyonunu azaltan C vitamini, santral sinir sistemindeki zararlı oksidanları azaltır (97). Yine bu mekanizmayla okside LDL' ler aracılığıyla meydana gelen endotelial permabilite artışının önlediği gösterilmiştir (98). Sindirim sırasında nitrozaminlerin oluşumunu inhibe eder. Membranda oluşan tokoferol radikallerini rejenere eder.

D- askorbat sıklıkla gıda koruyucusu olarak kullanılır. Biyolojik aktivitesi L- askorbatın 1/20' si kadardır.

Hem süperoksit, hem de hidroksil radikalleriyle reaksiyona giren, güçlü bir elektron vericisi olan C vitamininin, paradoks olarak, pro-oksidan özelliklerinden de söz edilmektedir. Yapılan çalışmalarda, C vitamininin düşük dozlarda primer olarak antioksidan gibi davrandığı, ancak hepatik iskemi- reperfüzyon gibi durumlarda, yüksek dozlarda pro- oksidan etkilerinin olduğu belirtilmiştir (96).

Ek olarak son dönemlerde yapılan çalışmalar, askorbat gibi antioksidanların, bakır gibi geçiş metallerin varlığında da, prooksidan etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu noktadan hareketle, askorbat, bitkisel madde ekstraktları ve bakır uygulanarak sağlanmış reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu temel alan ve katalitik terapi olarak adlandırılan yeni bir kanser tedavi modalitesi gündeme gelmiştir (99).

#### **2. 3. 3. 3. 4. Emilimi, Taşınması ve Metabolizması**

C vitamininin emilimi, bir kısmının dehidro şekline çevrildiği midede hızla gerçekleşir. Fizyolojik pH değerlerinde yüksüz dehidroaskorbik asit hücre membranını, monoanyonik L- askorbata göre daha hızlı geçer. Bazı hücelere, özellikle lökosit ve eritrositlere, C vitamini büyük oranda pasif difüzyon ile alınır. Bunun yanı sıra trombositlere, adrenaller ve retinaya C vitamini alınmasında aktif transport kullanılır. Hücelere serbest olarak diffüze olan dehidroaskorbik asit, hücre içinde indirgenerek daha az difüzyona uğrayan askorbat iyonuna çevrilir. Lökositlerde plazmaya göre daha yüksek konsantrasyonda askorbat bulunması bu şekilde açıklanır. Birçok dokuda bulunan C vitamininin, hipofiz, adrenal korteks, korpus luteum ve timus gibi salgı bezlerindeki miktarı çok daha yüksektir ve retinada, plazma konsantrasyonununun 20- 30 katı kadar C vitamini bulunur. İnsanlarda C vitamininin ortalama yarı ömrü 16 gün kadardır. Askorbat ve dehidroaskorbik asit bulunmasına ek olarak katabolitler daha az miktarlarda idrarla atılır (90).

#### **2. 3. 3. 3. 5. Eksikliği:**

Uzayan C vitamini eksikliği skorbüte yol açar. Bağı dokusunda intrasellüler olarak yeterli miktarda C vitamini bulunmadığında eklemelerde şişme, hassasiyet ve sıklıkla kanama veya çürükler görülmekte, diğer bölgelerde ise doku zayıflamakta ve strese direnç gösterememektedir. Balow's hastalığı olarak bilinen çocuklara özgü skorbüte, sivri kaburga sendromu ortaya çıkar. Özellikle dişler arasındaki bölgelerde dişetleri morarır ve şişer, bazı durumlarda ortaya çıkan 'skorbüt uzantıları' ısırma bölgelerine kadar uzanır. Kutanoz kanamalar, uyluk bölgesinin alt kısımlarında başlar ve kalçalara, karına, ayaklar ile kollara kadar ilerler. Kapillerlerin parçalanmasına bağlı olarak, sıklıkla peteşiyel kanamalar görülür. Daha sonra vücudun hemen her yerinde spontan ekimozlar görülür. Oküler kanamalar, tükürük ve gözyaşı bezlerinin kuruması, parotis şişmesi, femoral nöropati, alt ekstremitelerde ödem ve psikolojik bozuklukların görüldüğü bildirilmiştir. Skorbüt hastalığı olan bazı kişilerde,

anemi gelişebilir, osteoporoz karakteristikleri olan radyolojik bulgular saptanır ve kalp yetmezliğine bağlı ani ölüm görülebilir. Günde 10 mg C vitamini verilmesi, skorbütün klinik belirtilerinin hafifletilmesi ve iyileştirilmesi için yeterli olur (90).

#### **2. 3. 3. 3. 6. Toksisitesi:**

Nezlenin iyileştirilmesi ya da önlenmesinde yüksek doz C vitamini uygulaması tartışmalıdır. Bazı kişilerde görülen gastrointestinal semptomlar dışında yüksek doz C vitamini verilmesinin toksik olmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte önemli yan etkiler gözlenmiş ve oral olarak alınan B12 vitamininin indirgenerek bozulması, demir emiliminin aşırı kolaylaşması, katabolizmanın azalması sonucu gereksinimin artması (bağımlılık), oksalat oluşumunun artmasına bağlı olarak böbrekler ve safra kesesinde kalsiyum oksalat taşlarının birikmesi (özellikle konjenital familial hiperoksalürili kişilerde) ve ürikozüri gibi potansiyel hasarlardan kuşkulandır (90).

### **3. MATERİYAL METOD**

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### **3. 1. Materyal**

##### **3. 1. 1 Deney Hayvanları**

Bu çalışmada ağırlıkları 200- 250 gram arasında değişen Wistar Albino cinsi toplam 36 adet erkek sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi. Sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat aydınlık), ısıda (25°C), yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) ile toplam 3 gün süreyle beslendiler.

##### **3. 1. 2. Kullanılan İlaçlar**

Metotreksat	%10' luk ketamin HCl
C vitamini	%2' lik ksilazin

#### **3. 2. Metod**

##### **3. 2. 1. Deney Planı**

Çalışmamız, 6' şar adet rat içeren 6 gruptan oluştu.

Gruplar; Sağlıklı Kontrol, Metotreksat, C Vitamini ( 1 gün ), C Vitamini ( 3 gün ), Metotreksat + C Vitamini ( 1 gün ) ve Metotreksat + C vitamini ( 3 gün ) şeklinde oluşturuldu.

**Tablo 4:** Deney Planı

<b>Deney Grupları</b>	<b>1. Gün</b>	<b>2. Gün</b>	<b>3. Gün</b>	<b>4. Gün</b>
<b>I</b>	-	-	-	sakrifikasyon
<b>II</b>	20 mg/kg i.p MTX	-	-	sakrifikasyon
<b>III</b>	250 mg/kg oral VİT C	-	-	sakrifikasyon
<b>IV</b>	250 mg / kg oral VİT C	250 mg / kg oral VİT C	250 mg / kg oral VİT C	sakrifikasyon
<b>V</b>	250 mg/ kg oral VİT C + 20 mg/kg i.p MTX	-	-	sakrifikasyon
<b>VI</b>	250 mg/ kg oral VİT C + 20 mg/kg i.p MTX	250 mg / kg oral VİT C	250 mg / kg oral VİT C	sakrifikasyon

**Grup I:** Sağlıklı kontrol grubu olan bu hayvanlara hiçbir madde verilmedi.

**Grup II:** Bu gruptaki hayvanlara uygulanan sıvı formdaki MTX, çalışmanın ilk günü 20 mg/kg dozda i. p. olarak tek doz uygulandı.

**Grup III:** Bu gruptaki hayvanlar, sadece tek doz C vitamini aldı. Bunun için 500 mg C vitamini içeren tabletler, 5 cc çeşme suyunda çözülerek bir solüsyon hazırlandı ve bu solüsyon, 250 mg/ kg dozunda gavaj yoluyla uygulandı.

**Grup IV:** Bu gruptaki hayvanlara, üç gün boyunca, hazırlanan C vitamini solüsyonundan gavaj yoluyla uygulama yapıldı. C vitamini içeren solüsyon, her gün taze olarak hazırlandı.

**Grup V:** Önce 250 mg/ kg dozunda C vitamini solüsyonu uygulanan hayvanlara, gavajdan 1 saat sonra, 20 mg/ kg olacak şekilde tek doz i. p. MTX uygulandı. Takip eden günlerde hayvanlara başka ilaç uygulaması yapılmadı.

**Grup VI:** İlk gün, uygulanan oral C vitamininden 1 saat sonra hayvanlara diğer gruplarda uygulandığı şekilde, MTX verildi. Takip eden ikinci ve üçüncü günlerde, 250 mg/ kg dozunda C vitamini uygulaması devam etti.



Ratlar, son enjeksiyondan 24 saat sonra, yani deneyin dördüncü günü, gruplar halinde i.m. olarak uygulanan %10' luk ketamin HCl (Ketalar) ve %2' lik ksilazin (Alfazin) anestezisi altında cerrahi ekzanguinasyon ile sakrifiye edildi.

### 3. 2. 2. Biyokimyasal Çalışmalar

Çalışma bitiminde uygun anestezi (%10' luk ketamin HCl ve %2' lik ksilazin ) altında dekapite edilen sıçanların böbrek ve karaciğer dokuları ph 7. 4 olan fosfat tamponu ile dolu cam tüplere konuldu. Herbir sıçanın böbrek ve karaciğer dokuları tartılarak 50 mM fosfat tamponu (pH 7. 4) ile 10 kat dilue edildi. Janke & Kunkel Ultraturax T-25 (Almanya) marka doku parçalayıcı ile ve daha sonra UW-2070 Bandeun Electronic (Almanya) marka sonikatör ile sonike edilerek homojenizasyonu tamamlandı. Doku örneği, Eppendorf 5415-R (Almanya) soğutmalı santrifüj ile 5000 devir/dk. da 15 dk. santrifüj edildi ve süpernatanı alınarak eppendorf tüplere aktarıldı. Homojenize edilen örneklerin süpernatantlarında Lowry yöntemi kullanılarak protein tayini yapıldı. Daha sonra doku homojenatları yedeklenerek -80 °C'de saklandı. Herbir parametre öncesi bir örnek çıkarılarak çözdürüldü.

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA kolorimetrik olarak Cayman marka ticari kit ile ölçüldü. Standartlar ve numune duplike çalışıldı. 530 nm de absorbansları alınarak standart/absorbans grafiği çizildi ve numuneler bu grafif esas alınarak hesaplandı. Sonuçlar µM/gr. protein olarak verildi.

SOD aktivitesi Randox marka ticari kit ile spektrofotometrik yöntem ile göre ölçüldü. Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla ksantinden ürik asit ve süperoksit radikali oluşur. Oluşan süperoksit radikali kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak üzere INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5 phenil tetrazolium chloride ile reaksiyona girer. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür. SOD aktivitesi U/gr. protein şeklinde verildi.

GSH-Px aktivitesi Randox marka ticari kit ile spektrofotometrik yöntem ile göre ölçülmüştür. GSH-Px kümen hidroperoksit varlığında glutasyonun oksidasyonunu katalizler. Ortamda glutasyon redüktaz ve NADPH varlığında ise okside glutasyon redükte glutatyona dönüştürülürken NADPH' da NADP<sup>+</sup> ya dönüşür. NADPH'ın 340 nm' deki absorbans düşüklüğü spektrofotometrik olarak ölçülür. SOD ve GSH-Px aktiviteleri U/gr. protein cinsinden ifade edildi.

CAT aktivitesi Aebi yöntemine göre çalışıldı. CAT hidrojen peroksidin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalizler. Çalışmada CAT aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle tayin edilmiştir. CAT tarafından parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile katalaz aktiviteleri tayin edildi CAT aktivitesi kU/gr protein olarak verildi. (100, 101)

### 3. 2. 3. Histopatolojik Doku Takip Çalışmaları

Deney sonunda sıçanların KC dokuları alınarak loblara bölündü. Loblar %10'luk nötral formaldehitte tespit edildi. Dokular rutin ışık mikroskopik takip aşamalarından geçirildikten sonra parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan alınan 3–5 µm'lik kesitler hematoksilin-eozin (H-E) boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Bütün histopatolojik değerlendirmeler kör şartlar altında iki kez yapıldı.

#### A) Dehidratasyon

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
%70	1 gece
%80	1 saat
%90	1 saat
%100	1 saat
%100	1 saat

## **B) Şeffaflandırma**

Ksilol	½ saat
Ksilol	½ saat

## **C) Emdirme**

Ksilol+parafin (60°C etüvde)	15 dakika
Yumuşak parafin (60°C etüvde)	1 saat
Sert parafin (60°C etüvde)	4 saat

## **D) Gömme**

Hazırlanan parafin bloklardan, Leica tipi kızaklı mikrotom kullanılarak 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Histolojik değerlendirme için preparatlar Hematoksilen-Eozin ve Verhoeff ile boyandı. Boyanan örnekler Olympus BX50 tipi bin oküler mikroskopta incelendi ve fotoğraflar elde edilerek değerlendirildi

## **Değerlendirme:**

Kontrol grubu ve deney grubuna ait Kc doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının (102) yapmış oldukları skorlamaya göre değerlendirildi.

Deneysel parametrelerin histolojik (yapısal) değerlendirmesi skorlandı.

( - ) skor (negatif skor): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,

( + ) skor (1 pozitif skor): hafif derecede,

( ++ ) skor (2 pozitif skor): orta derecede,

( +++ ) skor (3 pozitif skor): ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir (102)

### **3. 2. 4. İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistik incelemede, SPSS for Windows istatistik paket programının 15. 0 versiyonu kullanıldı. Değerler ortalama ( $X$ ) ve standart sapma ( $SD$ ) olarak ifade edildi. Veriler öncelikle Kolmogorov-Smirnov testine tabii tutuldu ve verilerin normal dağılıma sahip olduğu bulundu. Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildikten sonra, gruplar arası karşılaştırmalar Tukey HSD çoklu testi ile yapıldı. P değerinin 0, 05 den küçük olduğu farklar istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4. 1. Biyokimyasal Bulgular

#### 4. 1. 1. Biyokimyasal Kc Bulguları

Deney ve kontrol gruplarına ait Kc dokusunda MDA, CAT, SOD ve GPx düzeylerinin aritmetik ortalamaları +/- standart sapma şeklinde Tablo 5’de verilmiştir.

**Tablo 5:** Deney ve kontrol gruplarına ait Kc dokusunda MDA, CAT, SOD ve GPx değerlerinin aritmetik ortalamaları

GRUPLAR(Kc)	MDA	CAT	SOD	GPx
I	26,8±6,23	20,3±5,60	670,2±52,85	137,3±3,86
II	63,6±13,80 <sup>a</sup>	12,2±3,05 <sup>a</sup>	502,3±55,89 <sup>a</sup>	94,3±13,14 <sup>a</sup>
III	26,1±6,82	17,7±5,80	647,3±96,35	129,9±7,28
IV	27,1±8,25	18,5±3,88	709,2±100,73	149,3±28,91
V	47,5±11,23	11,9±1,94	613,7±85,25	142,7±21,53
VI	32,7±8,24 <sup>b</sup>	16,4±4,72	667,0±109,45 <sup>b</sup>	189,7±24,24 <sup>b</sup>

a: Kontrole göre anlamlı, p<0,05

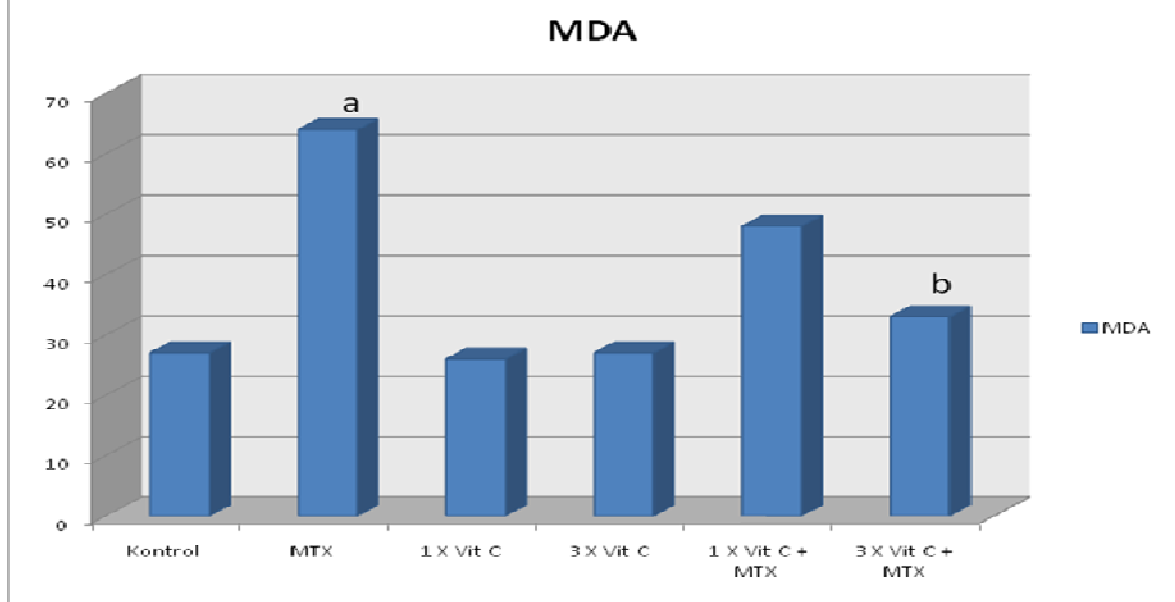
b: MTX’e göre anlamlı, p<0,05

Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda Kc’ de lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA değerlerinde, kontrol grubuna göre, MTX kullanılan ratlarda anlamlı bir artış gözlenmiş ve bu artış MTX’ le birlikte C vitamini kullanılan her iki deney grubunda da azalmıştır. Ancak bu azalma, sadece MTX yanında 3 gün süreyle C vitamini kullanılan grupta anlamlıdır (Tablo 5, Grafik 1 ).

Antioksidan enzimler olan CAT, SOD ve GPx düzeyleri, MTX kullanımına bağlı olarak anlamlı ölçüde azalmıştır. SOD ve GPx düzeylerindeki bu azalma, MTX yanında 1 günlük ve 3 günlük C vitamini kullanımıyla artmış, ancak bu artışlardan 3 günlük C vitamini kullanılan gruptaki değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir (Tablo 5, Grafik 3, 4 ).

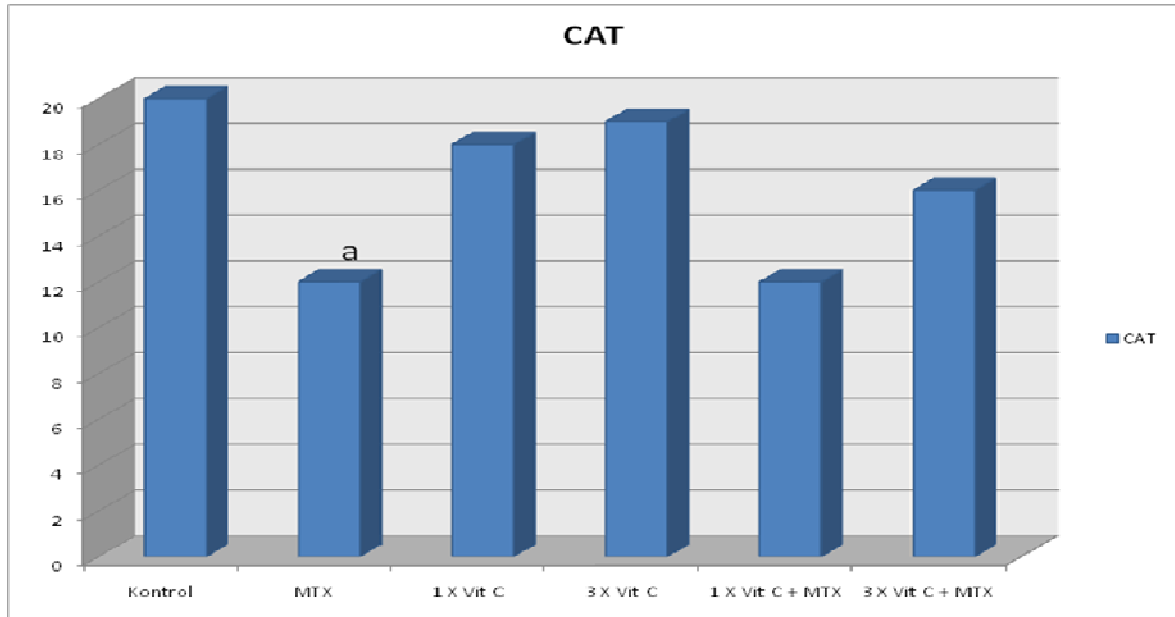
MTX kullanımıyla azalan CAT değerleri, MTX yanında 1 gün süreyle verilen C vitamini ile yükselmeyip, 3 günlük C vitamini kullanımıyla artmıştır. Ancak bu artış istatistik olarak anlamlı değildir ( Tablo 5, Grafik 2 ).

**Grafik 1:** Deney ve kontrol gruplarına göre Kc dokusunda MDA değerlerinin aritmetik ortalamaları



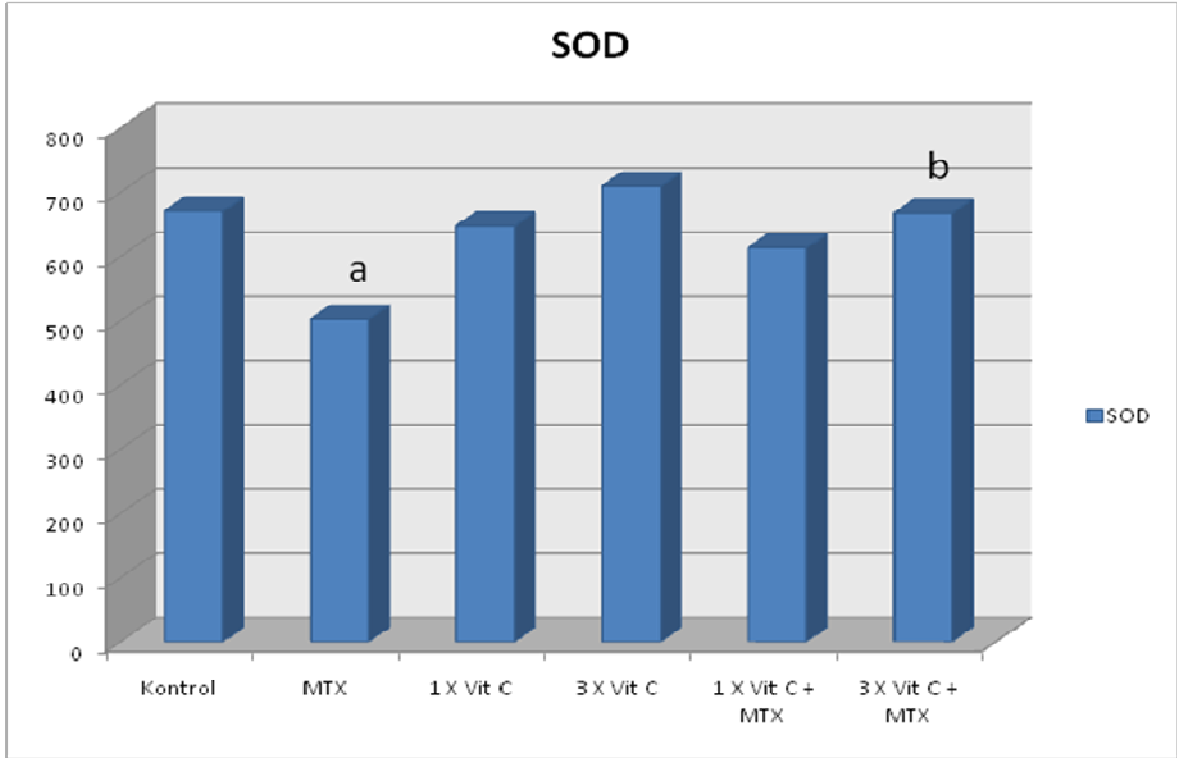
a: Kontrole göre anlamlı,  $p < 0,05$   
b: MTX'e göre anlamlı,  $p < 0,05$

**Grafik 2:** Deney ve kontrol gruplarına göre Kc dokusunda CAT değerlerinin aritmetik ortalamaları



a: Kontrole göre anlamlı,  $p < 0,05$   
b: MTX'e göre anlamlı,  $p < 0,05$

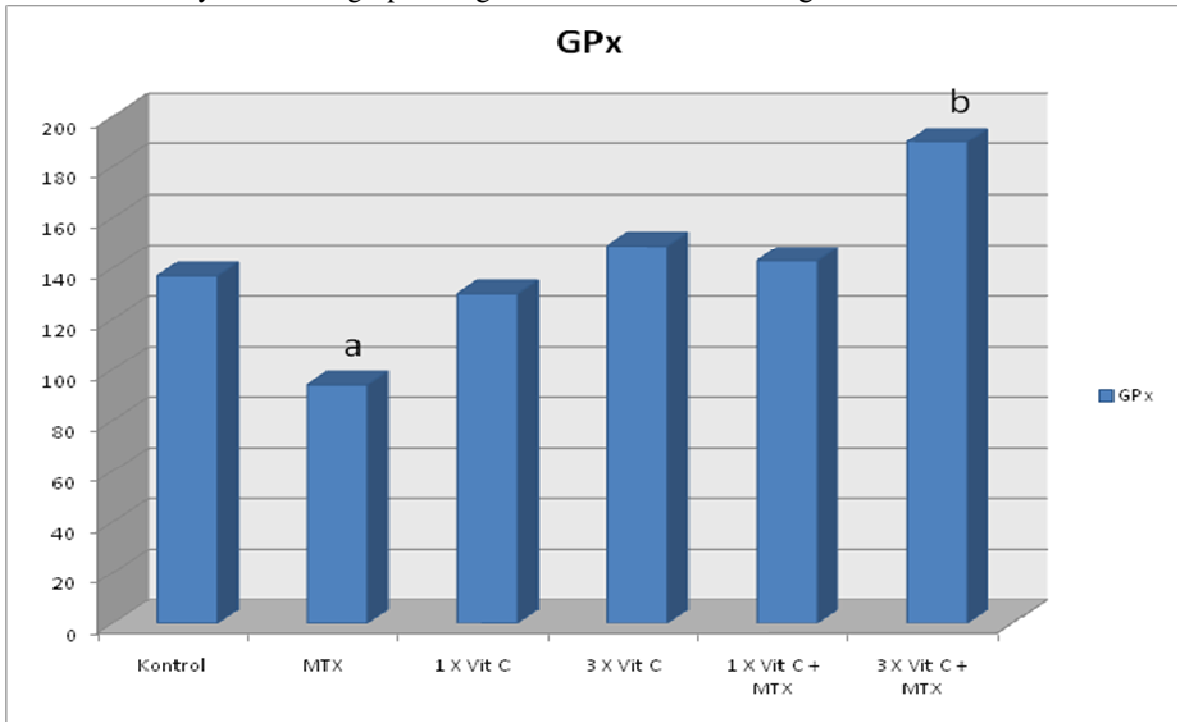
**Grafik 3:** Deneysel ve kontrol gruplarına göre Kc dokusunda SOD değerlerinin aritmetik ortalamaları



a: Kontrolle göre anlamlı,  $p < 0,05$

b: MTX'e göre anlamlı,  $p < 0,05$

**Grafik 4:** Deneysel ve kontrol gruplarına göre Kc dokusunda GPx değerlerinin aritmetik ortalamaları



a: Kontrolle göre anlamlı,  $p < 0,05$

b: MTX'e göre anlamlı,  $p < 0,05$

#### 4. 1. 2. Biyokimyasal Böbrek Bulguları

Deney ve kontrol gruplarına ait böbrek dokusunda MDA, CAT, SOD ve GPx düzeylerinin aritmetik ortalamaları +/- standart sapma şeklinde Tablo 6'de verilmiştir.

**Tablo 6:** Deney ve kontrol gruplarına ait böbrek dokusunda MDA, CAT, SOD ve GPx düzeylerinin aritmetik ortalamaları

GRUPLAR(Böbrek)	MDA	CAT	SOD	GPx
I	14,7±5,01	17,6±6,89	540,9±164,41	978,7±54,56
II	26,7±1,97 <sup>a</sup>	7,7±2,92 <sup>a</sup>	196,3±9,09 <sup>a</sup>	682,7±62,63 <sup>a</sup>
III	15,1±4,98	18,8±5,82	674,9±162,80	824,0±95,83
IV	21,0±4,14	22,3±5,81	529,3±147,60	895,0±78,38
V	18,1±5,87	17,9±4,04 <sup>b</sup>	372,7±136,06	658,5±61,02
VI	17,4±3,42 <sup>b</sup>	18,2±3,18 <sup>b</sup>	459,1±146,56 <sup>b</sup>	842,2±97,41 <sup>b</sup>

a: Kontrole göre anlamlı, p<0,05

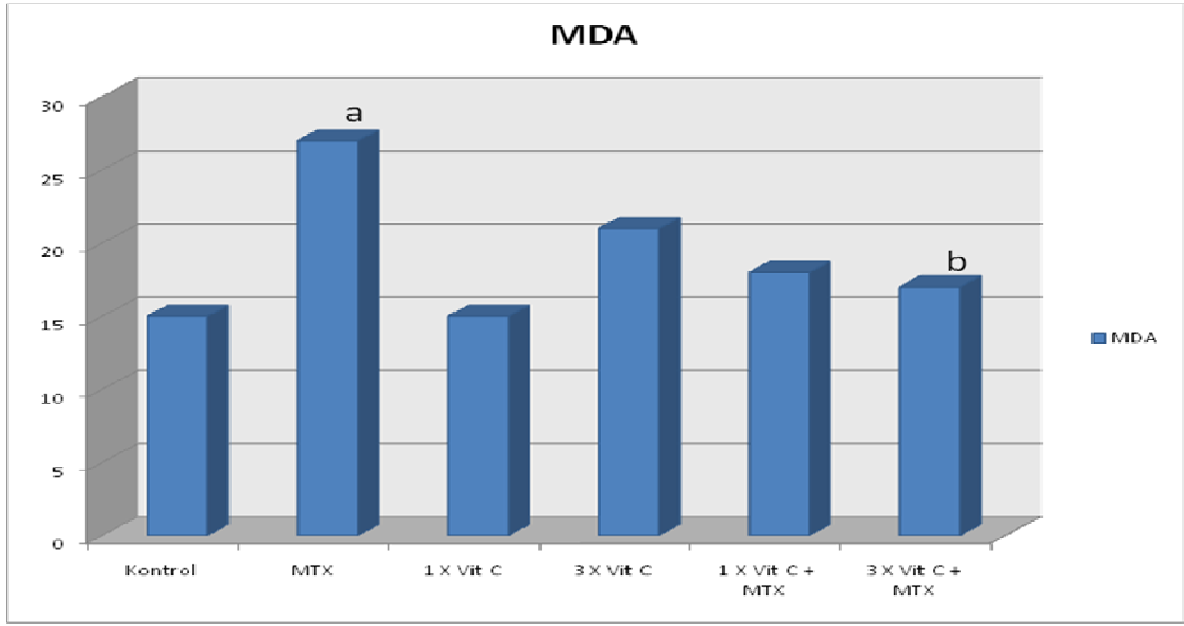
b: MTX'e göre anlamlı, p<0,05

Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda böbrekte lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA değerlerinde, kontrol grubuna göre, MTX kullanılan ratlarda anlamlı bir artış gözlenmiş ve bu artış MTX' le birlikte C vitamini kullanılan her iki deney grubunda da azalmıştır. Ancak bu azalma, sadece MTX yanında 3 gün süreyle C vitamini kullanılan grupta anlamlıdır (Tablo 6, Grafik 5).

Antioksidan enzimler olan CAT, SOD ve GPx düzeyleri, MTX kullanımına bağlı olarak anlamlı ölçüde azalmıştır. MTX yanında kullanılan C vitamini, karaciğerden farklı olarak böbrek dokusunda, her iki kullanım şeklinde de, (1 gün ve 3 gün) CAT düzeylerini anlamlı olarak artırmıştır (Tablo 6, Grafik 6). MTX yanında kullanılan C vitamini, her iki tedavi grubunda da SOD değerlerinde (1 günlük ve 3 günlük) artış meydana getirmiş, ancak bunlardan 3 günlük tedavi grubundaki artış anlamlı bulunmuştur (Tablo 6, Grafik 7). MTX yanına eklenen 1 günlük C vitamini, GPx değerini artıramamış, ancak C vitaminin 3 günlük kullanımıyla bu değer, anlamlı olarak yükselmiştir (Tablo 6, Grafik 8).



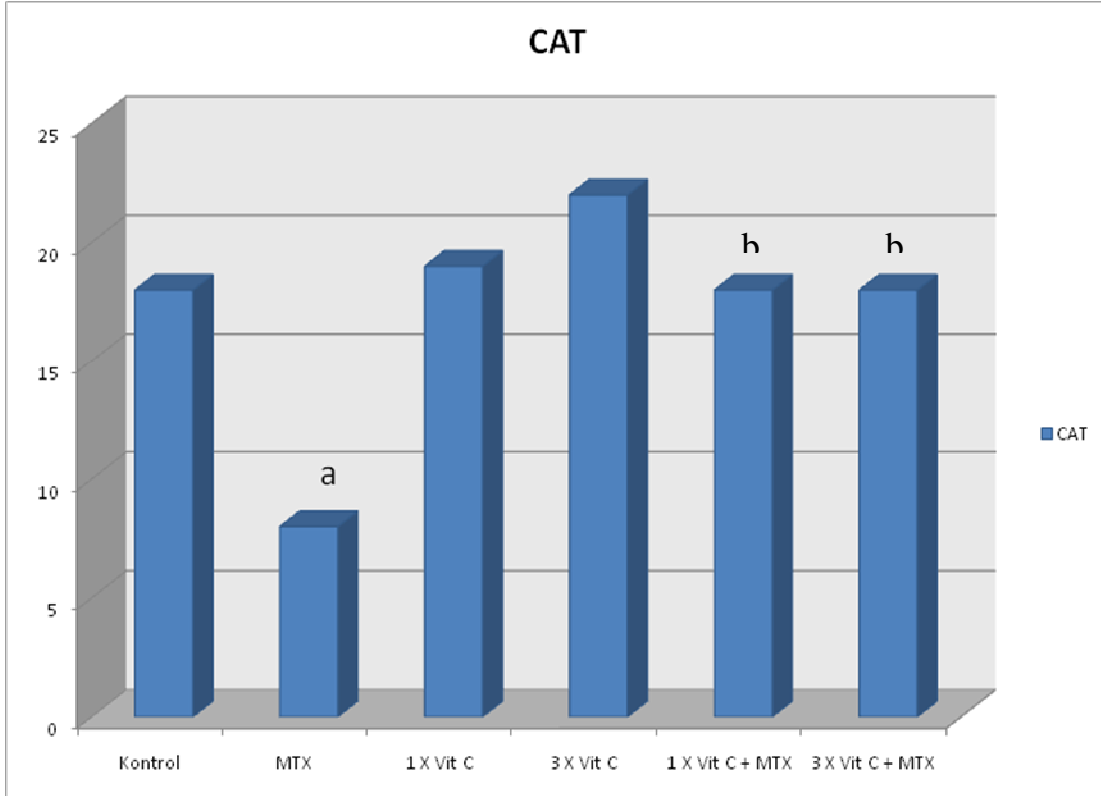
**Grafik 5:** Deney ve kontrol gruplarına göre böbrek dokusunda MDA değerlerinin aritmetik ortalamaları



a: Kontrole göre anlamlı,  $p < 0,05$

b: MTX'e göre anlamlı,  $p < 0,05$

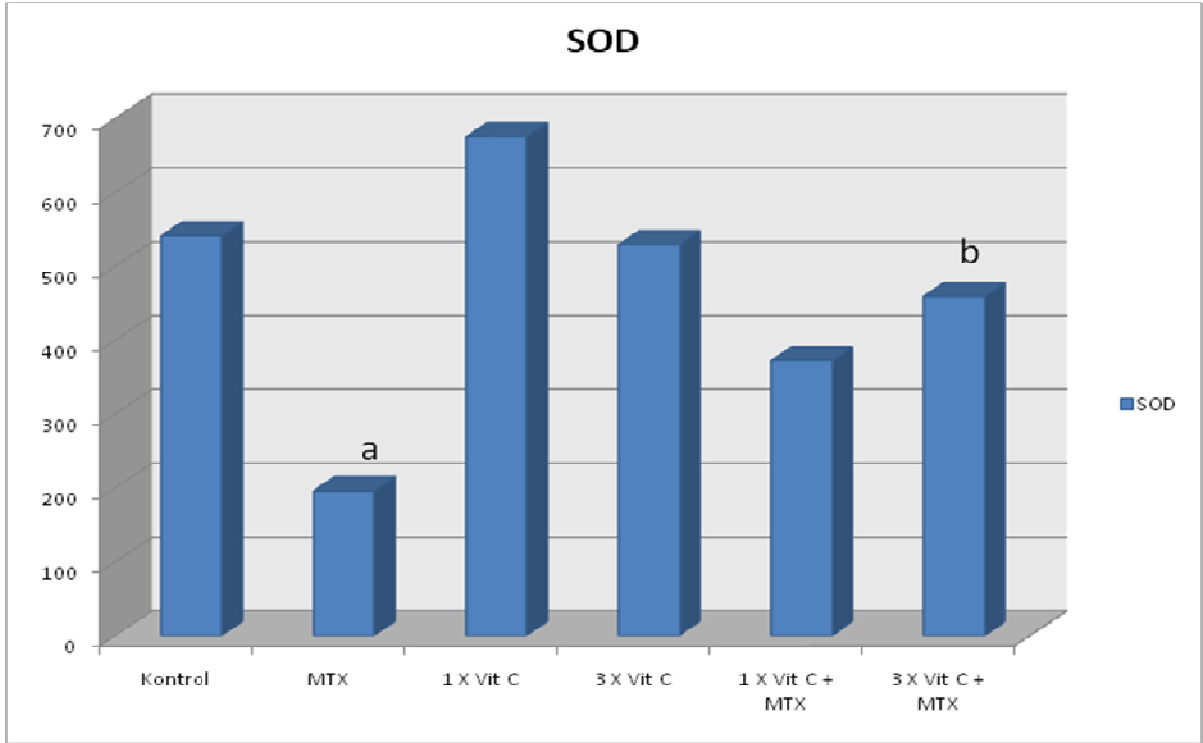
**Grafik 6:** Deney ve kontrol gruplarına göre böbrek dokusunda CAT değerlerinin aritmetik ortalamaları



a: Kontrole göre anlamlı,  $p < 0,05$

b: MTX'e göre anlamlı,  $p < 0,05$

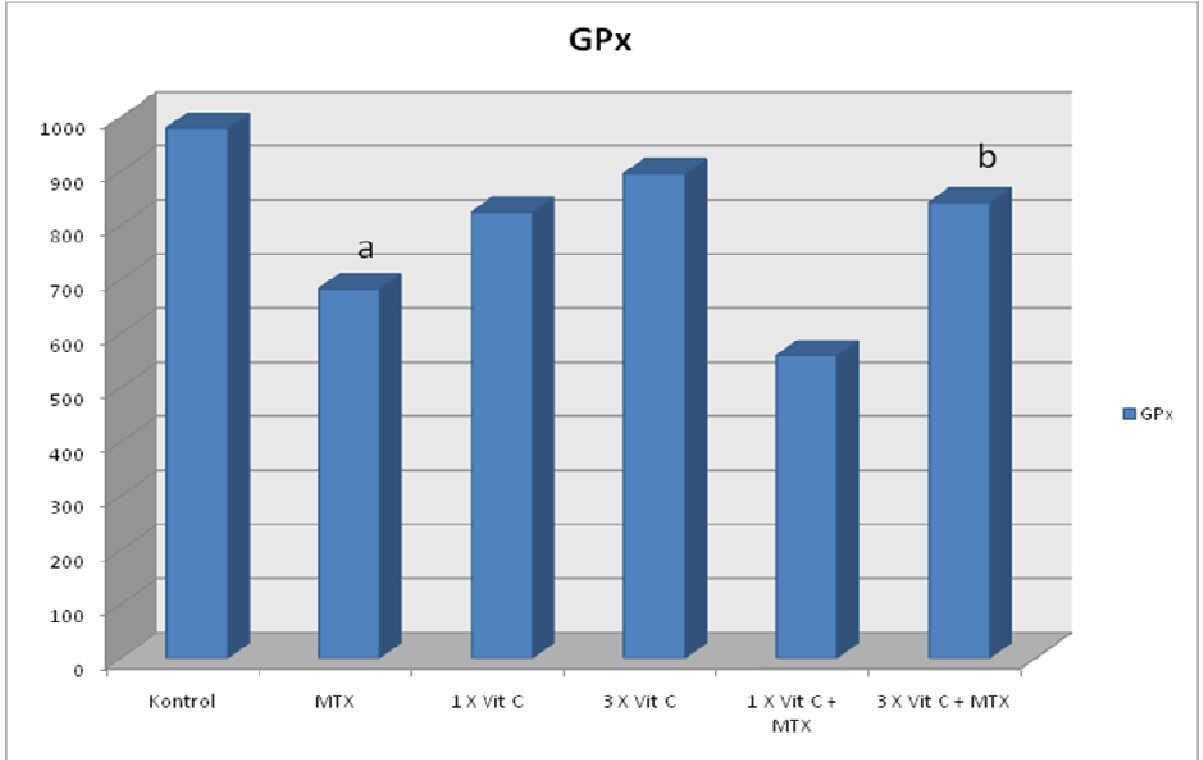
**Grafik 7:** Deney ve kontrol gruplarına göre böbrek dokusunda SOD değerlerinin aritmetik ortalamaları



a: Kontrole göre anlamlı,  $p < 0,05$

b: MTX'e göre anlamlı,  $p < 0,05$

**Grafik 8:** Deney ve kontrol gruplarına göre böbrek dokusunda GPx değerlerinin aritmetik ortalamaları

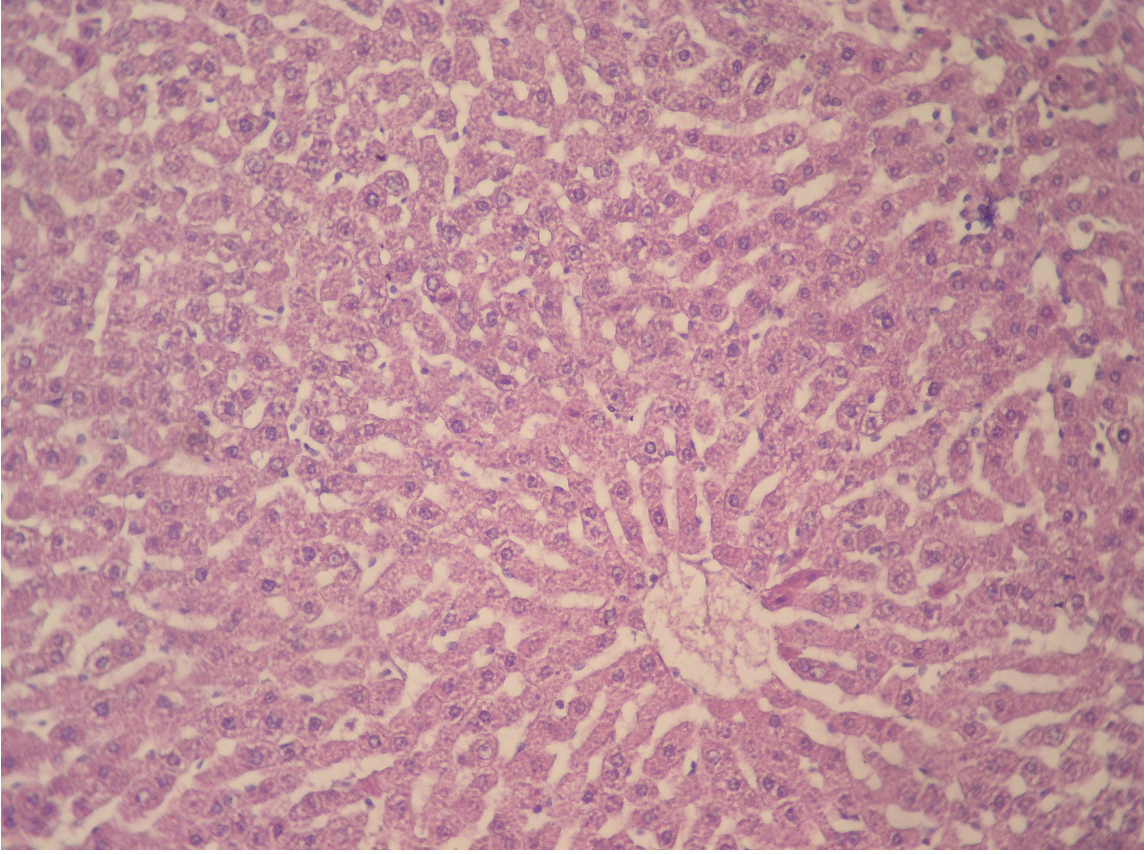


a: Kontrole göre anlamlı,  $p < 0,05$

b: MTX'e göre anlamlı,  $p < 0,05$

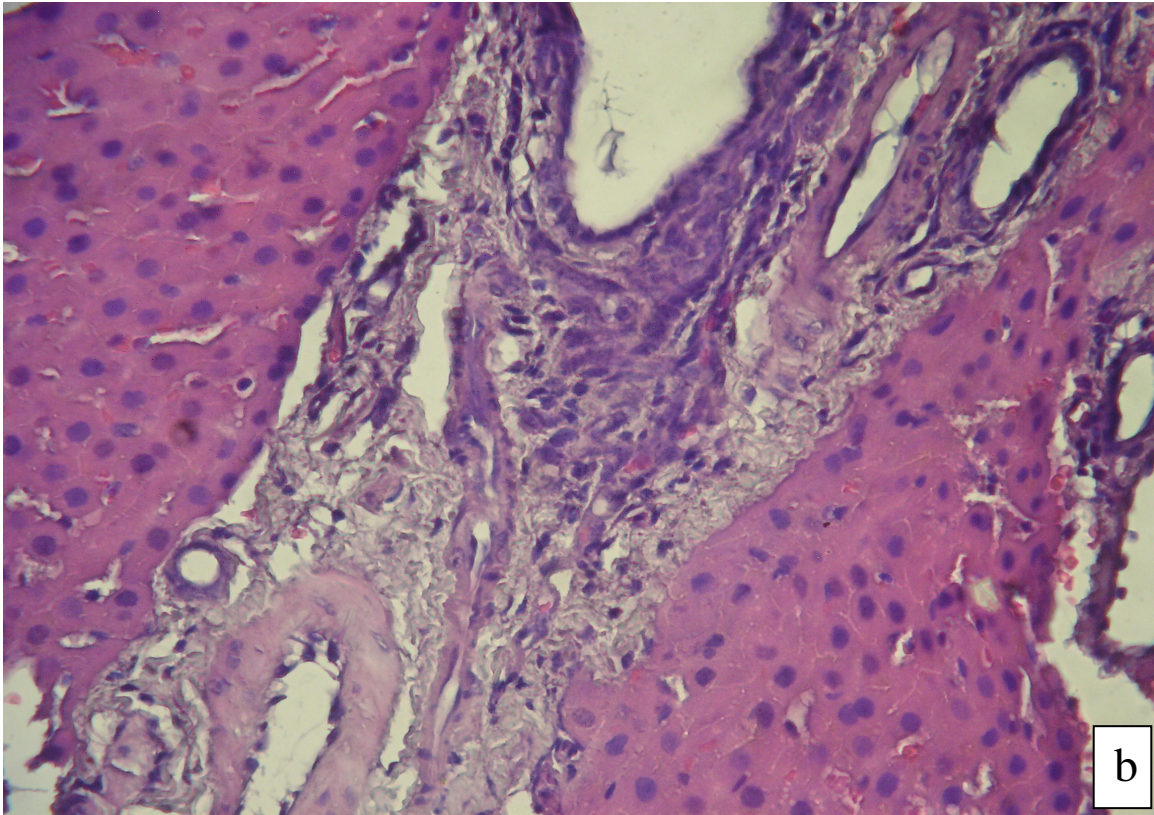
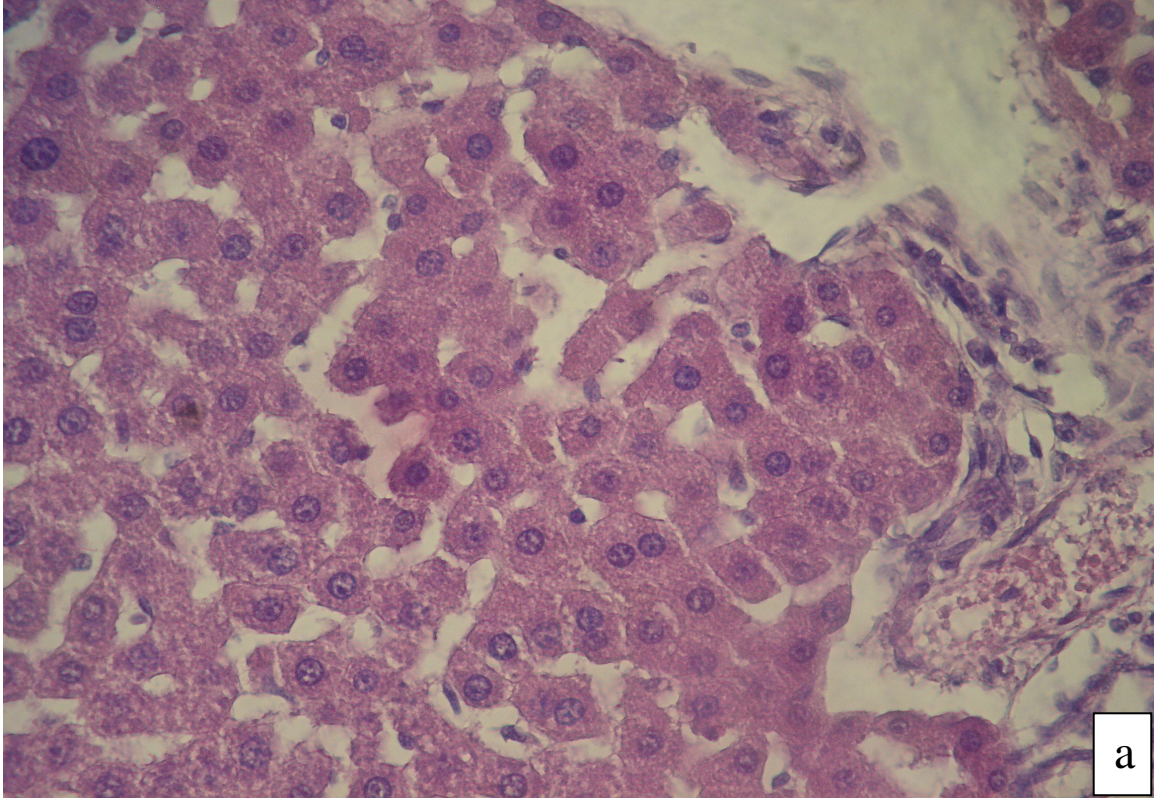
## 4. 2. Histolojik Bulgular

### 4. 2. 1. Histopatolojik Karaciğer Bulguları



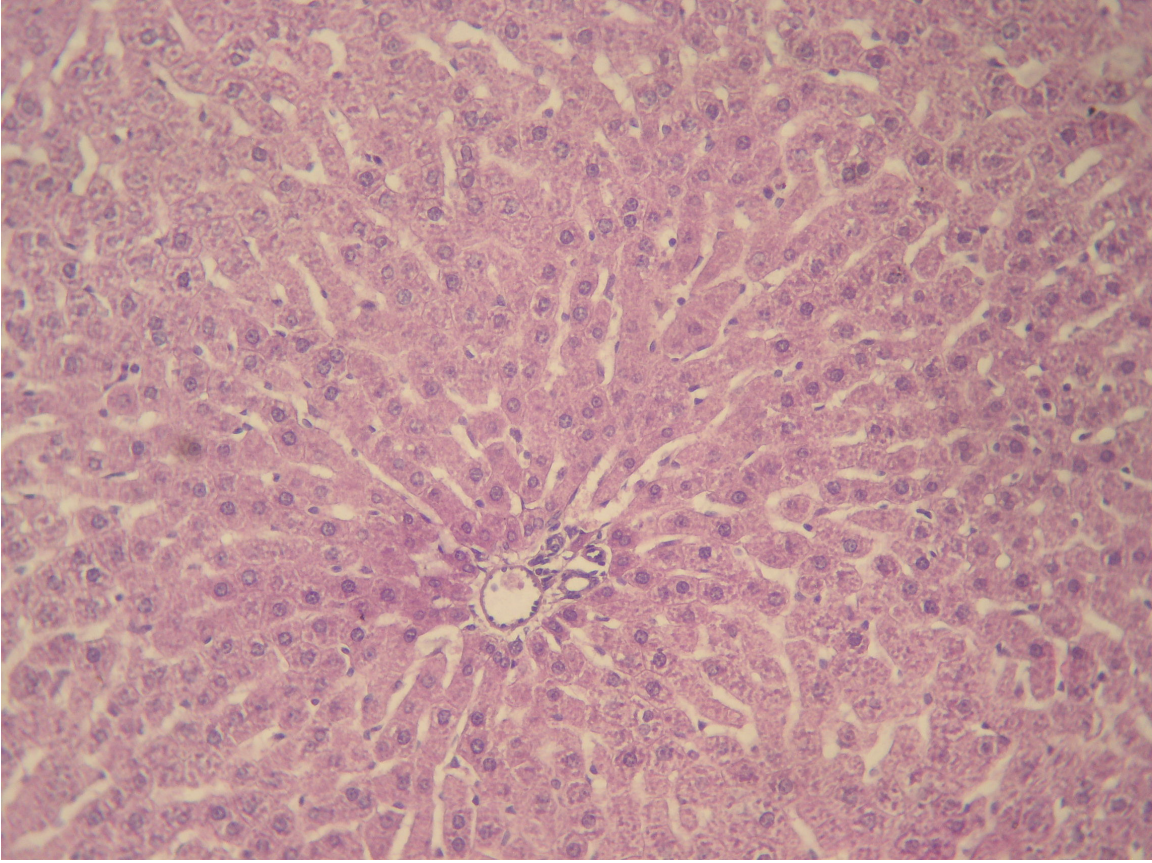
**Resim 1.** Kontrol grubuna ait sıçan Kc dokusu (H-E; x120)



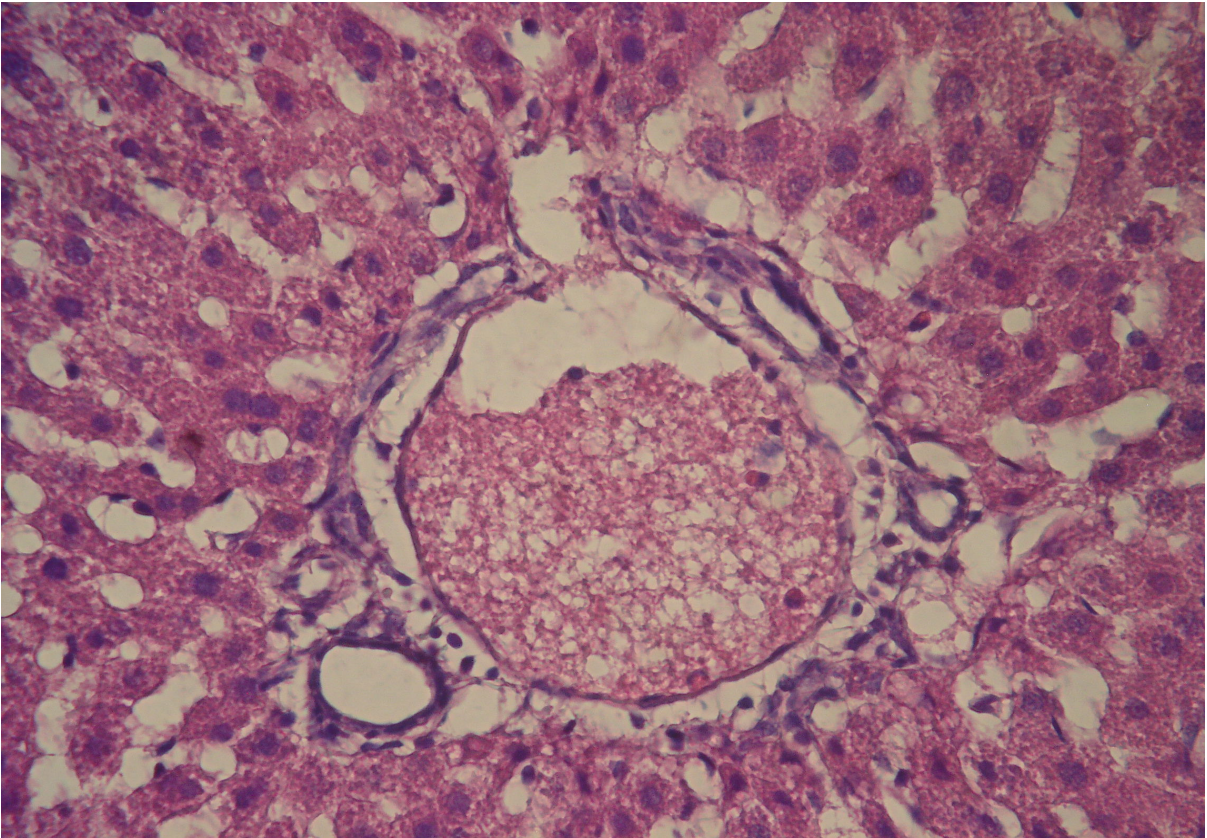


**Resim 2 a,b.** MTX grubuna it sıçan Kc dokusu(H-E; x480).



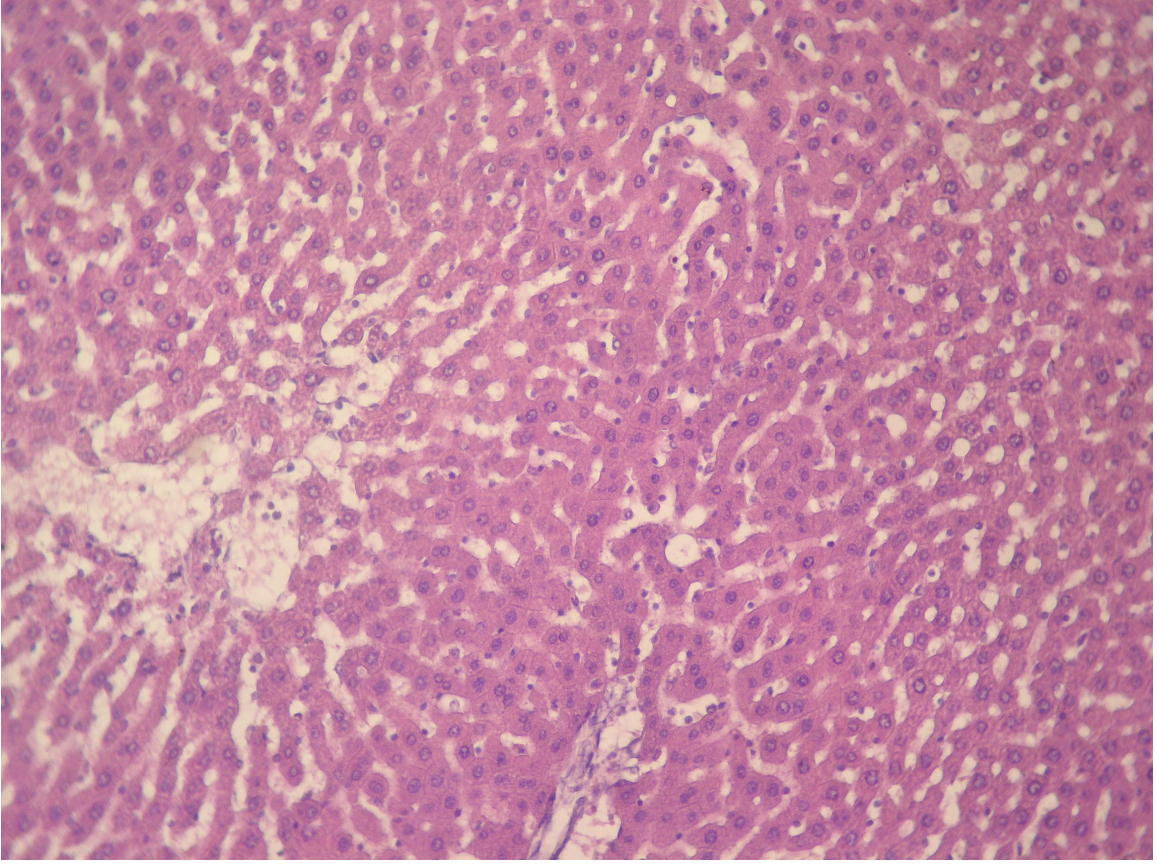


**Resim 3.** Tek doz C vitamini uygulanan sıçanlara ait Kc dokusu ( H-E; x240).



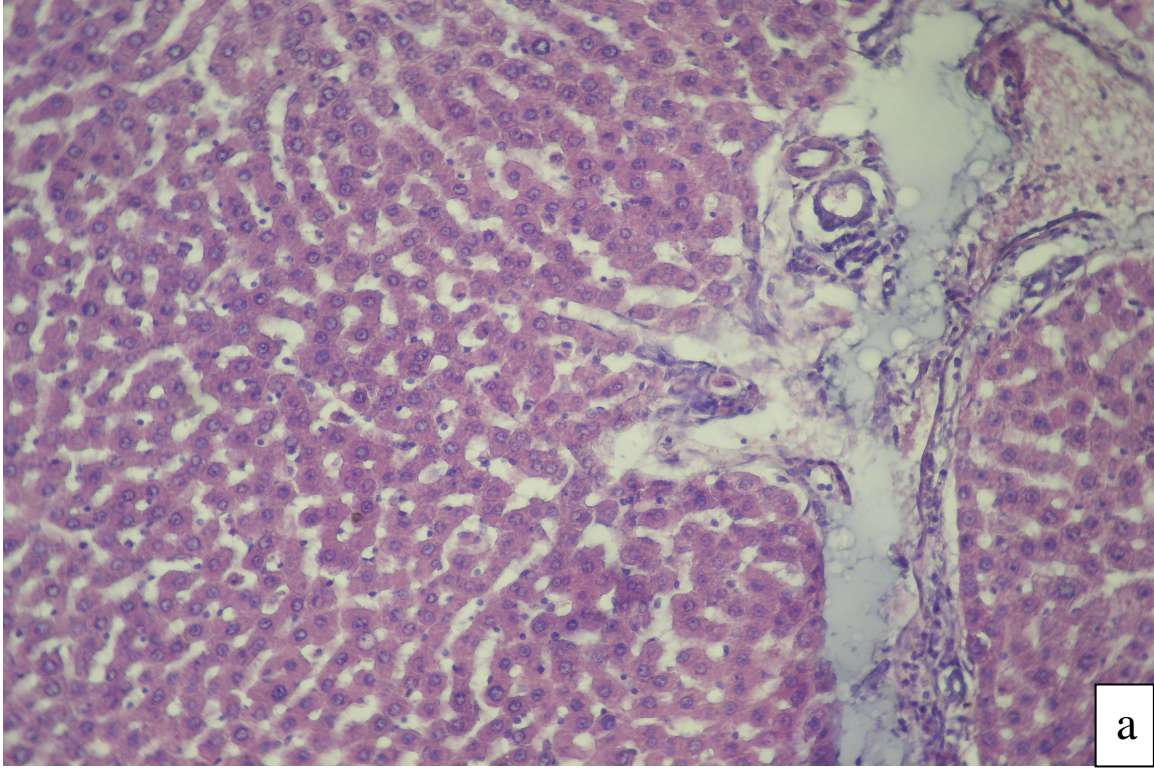
**Resim 4.** Üç gün C vitamini uygulanan sıçanlara ait Kc dokusu(H-E; x480).



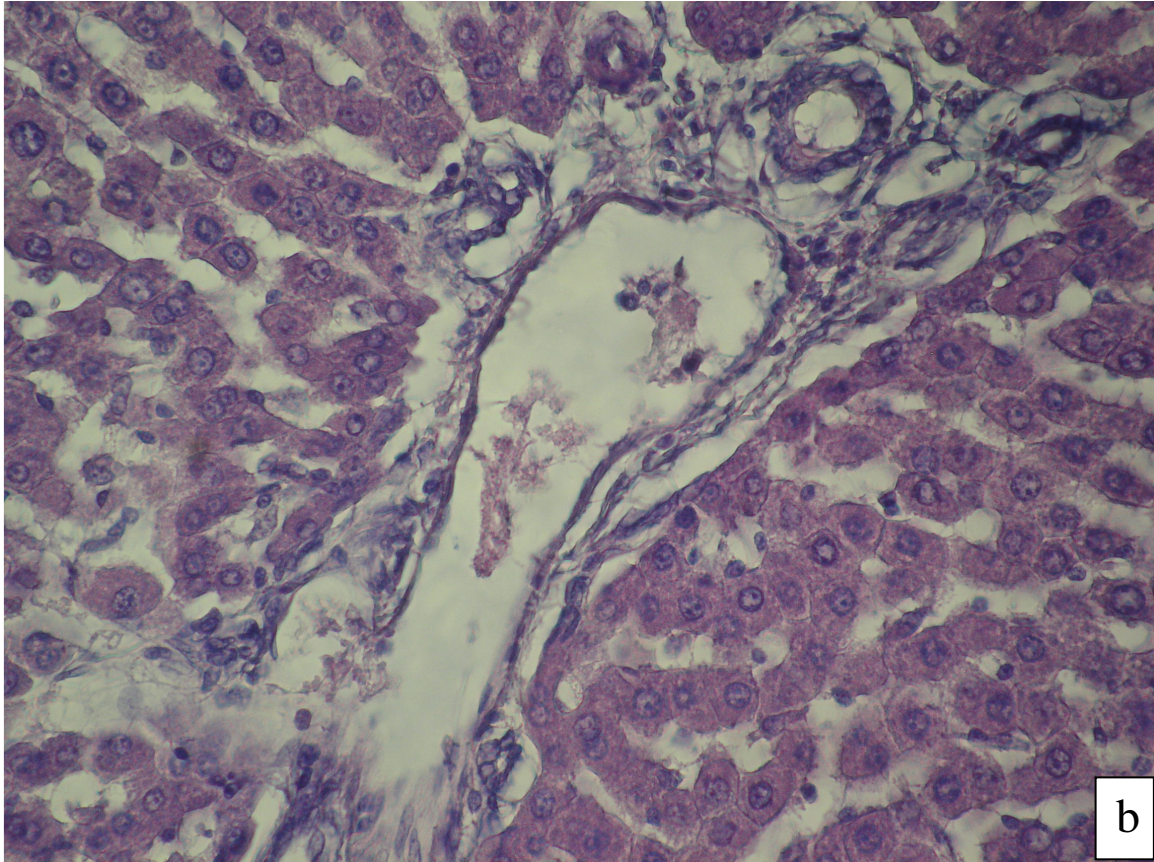


**Resim 5.** MTX ve tek doz C vitamini uygulana sıçanlara ait Kc dokusu (H-E; x240).





a



b

**Resim 6 a,b.** MTX ve 3 gün süreyle C vitamini uygulanan sıçanlara ait Kc dokusu (H-E; a. x240, b. x480).

Kontrol grubuna ait sıçanların Kc dokuları normal histolojik görünümde izlendi (Resim 1, Tablo 7). MTX grubuna ait sıçanların Kc dokularında önemli histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Hepatositlerde granüler dejenerasyon ve portal alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonları belirgin bir şekilde izlendi. Portal alanda bağ dokusu artışı ve safra kanalı proliferasyonu mevcuttu. Ayrıca, hepatositlerde piknotik çekirdekler, sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyon düşük düzeylerde izlendi (Resim 2a, b, Tablo 7). 1 gün süreyle C vitamini uygulanan grupta sıçanların Kc dokuları normal histolojik görünümde gözlemlendi (Resim 3, Tablo 7). 3 gün süreyle sadece C vitamini verilen gruptaki sıçanların Kc dokularında, hepatositlerde belirgin granüler dejenerasyon mevcuttu, ayrıca düşük düzeylerde portal alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonları, sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyon izlendi (Resim 4, Tablo 7). MTX' le birlikte tek doz C vitamini uygulanan grupta histopatolojik değişikliklerde önemli ölçüde düzelme gözlemlendi. Bu grupta sadece düşük düzeylerde hepatositlerde granüler dejenerasyon ve piknotik çekirdekler ve vasküler konjesyon gözlemlendi (Resim 5, Tablo 7). MTX ve 3 gün süreyle C vitamini kullanılan grupta ise MTX grubuna göre histopatolojik değişikliklerde düşük oranda bir düzelme gözlemlendi. Bununla beraber, bu grupta, MTX-tek doz C vitamini grubuna göre önemli histopatolojik değişiklikler izlendi. Bu değişiklikler, hepatositlerde orta derecede granüler dejenerasyon ve portal alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonları, ayrıca düşük düzeylerde hepatositlerde piknotik çekirdekler, safra kanalı proliferasyonu, sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyon şeklinde izlendi (Resim 6 a, b, Tablo 7).

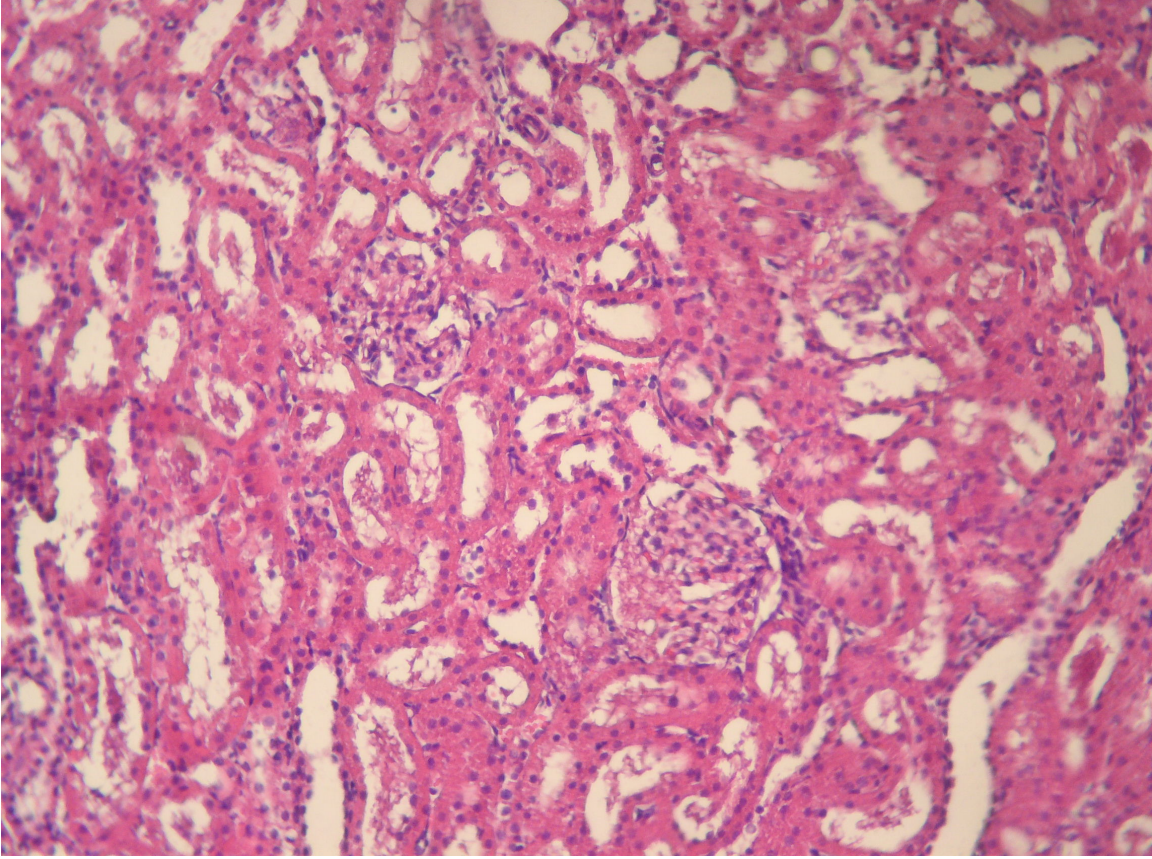
**Tablo 7:** Kc dokusunda deney gruplarında gözlenen yapısal değişikliklerin skorlanması

	Hepatositlerde granüler dejenerasyon	Hepatositlerde piknotik çekirdekler	Portal alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonları	Safra kanalı proliferasyonu	Sinüzoidal dilatasyon	Vasküler konjesyon
<b>I.</b>	-	-	-	-	-	-
<b>II</b>	+3	+1	+3	+2	+1	+1
<b>III</b>	-	-	-	-	-	-
<b>IV</b>	+2	-	+1	-	+1	+1
<b>V</b>	+1	+1	-	-	-	+1
<b>VI</b>	+2	+1	+2	+1	+1	+1

(-) skor (negatif skor): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması, +1 skor (1 pozitif skor) : hafif derecede, +2 skor (2 pozitif skor) : orta derecede, +3 skor (3 pozitif skor) : ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir (102).

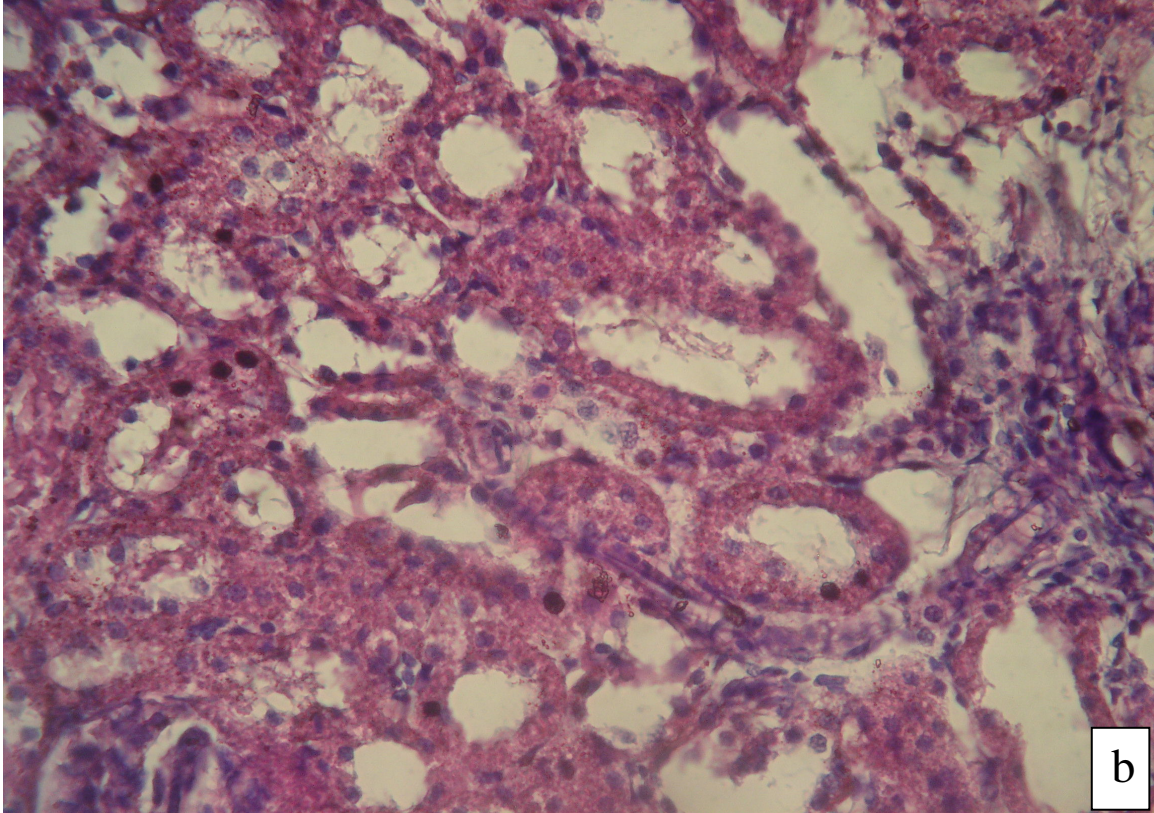
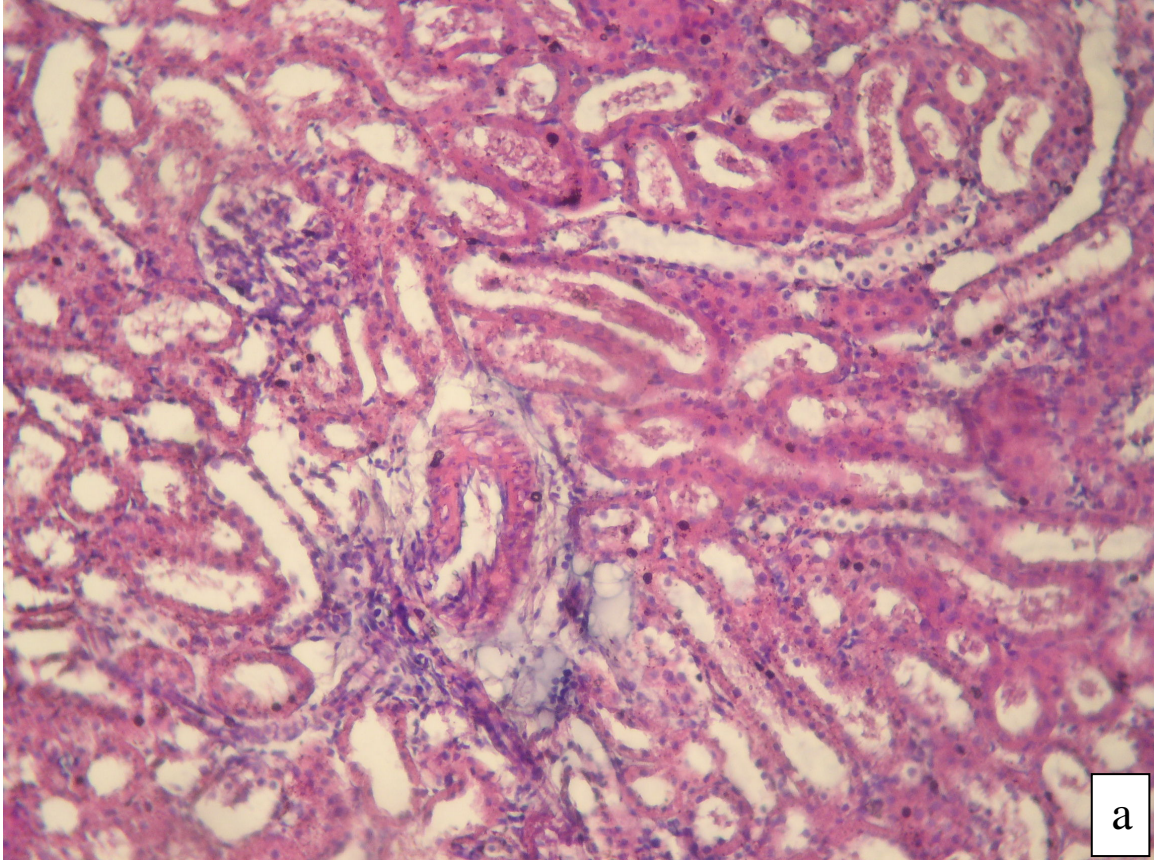


#### 4. 2. 2. Histopatolojik Böbrek Bulguları



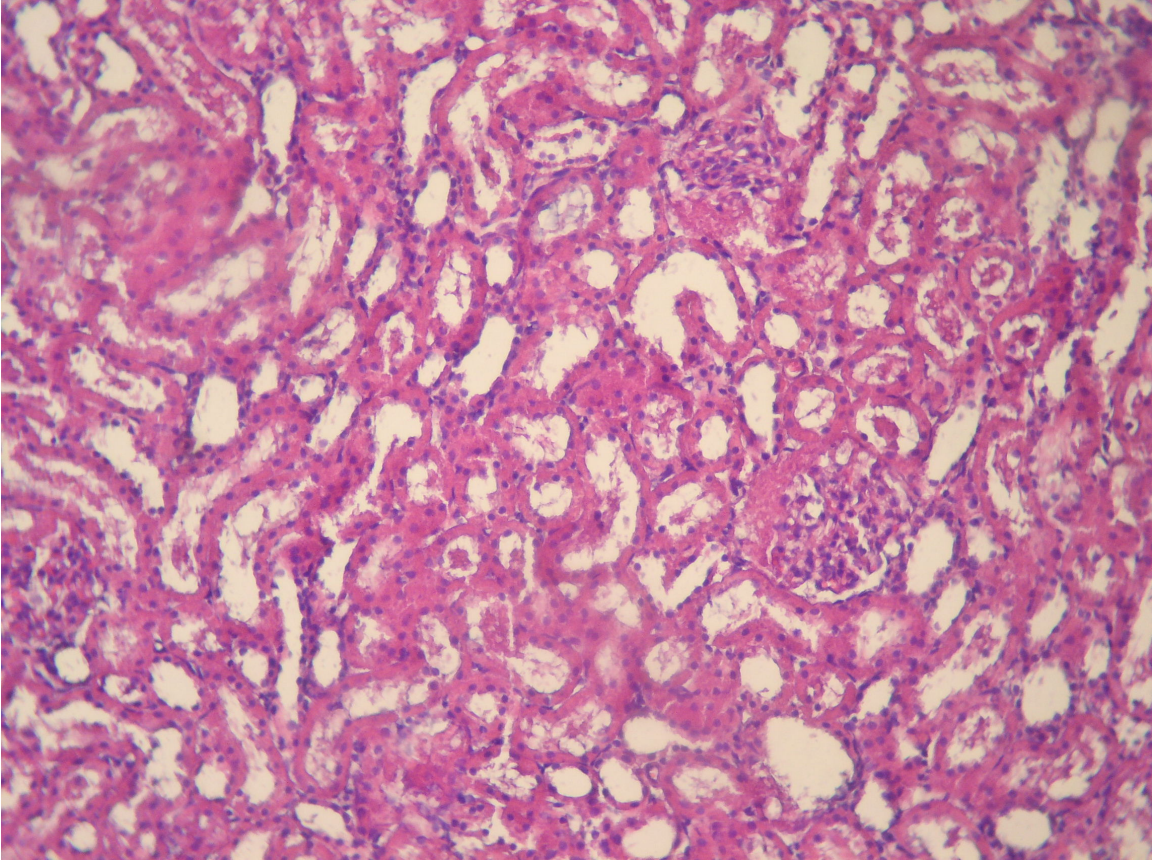
**Resim 7.** Kontrol grubuna ait sıan böbrek dokusu (H-E; x 120)



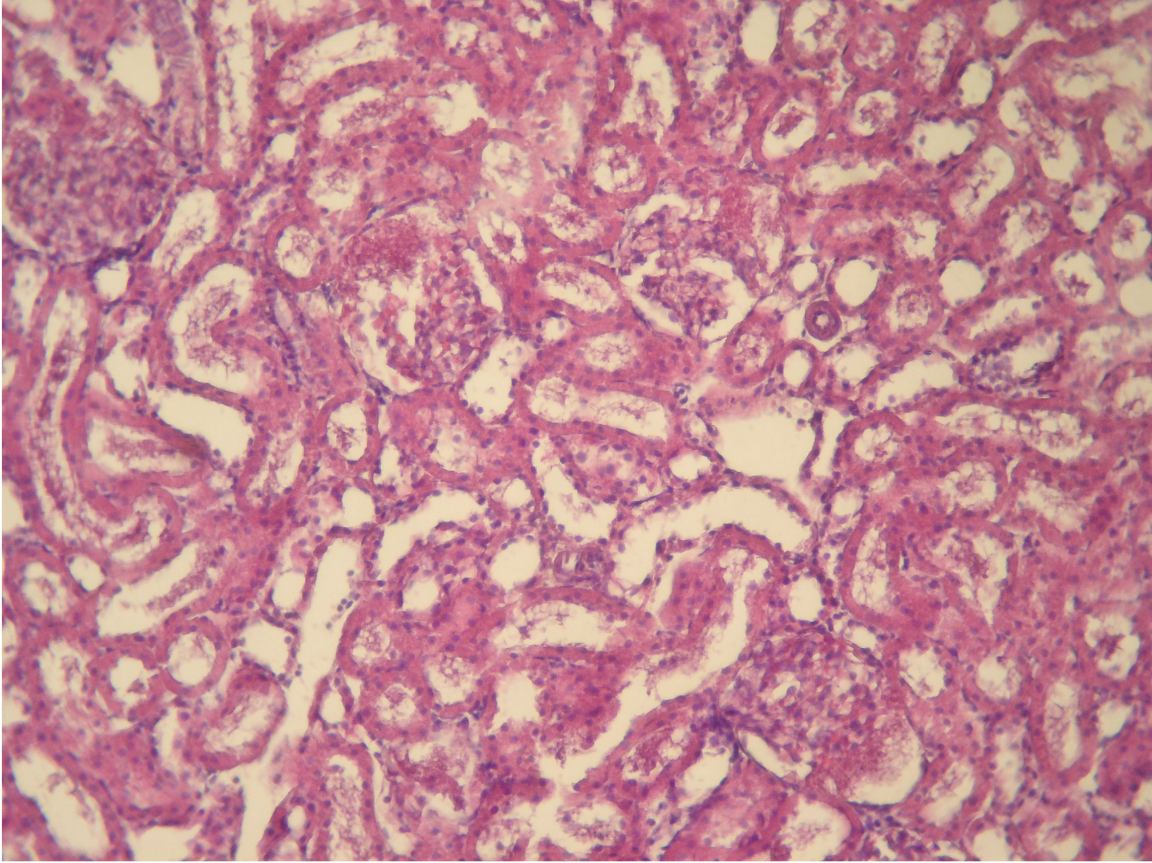


**Resim 8 a,b.** MTX grubuna ait sıçan böbrek dokusu (H-E; **a.**x240, **b.** x48



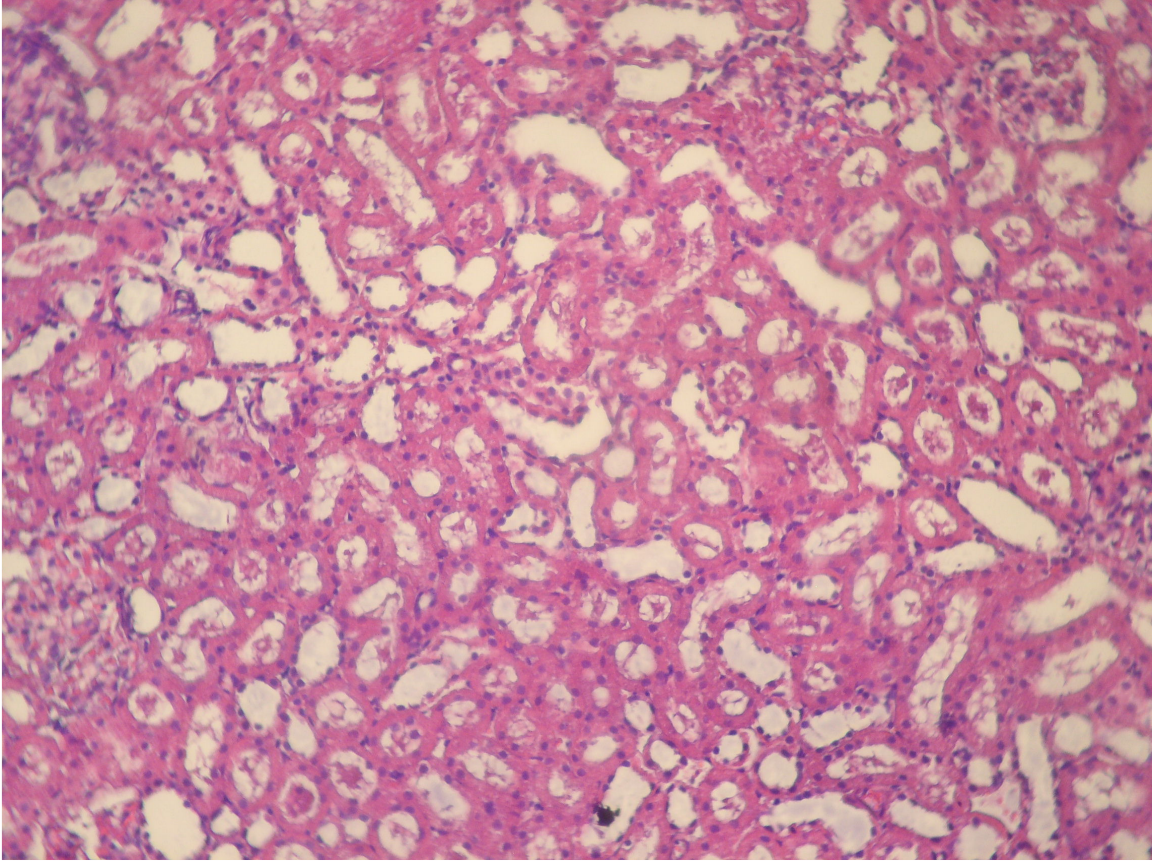


**Resim 9.** Tek doz C vitamini uygulanan sıçanlara ait böbrek dokusu (H-E; x240).



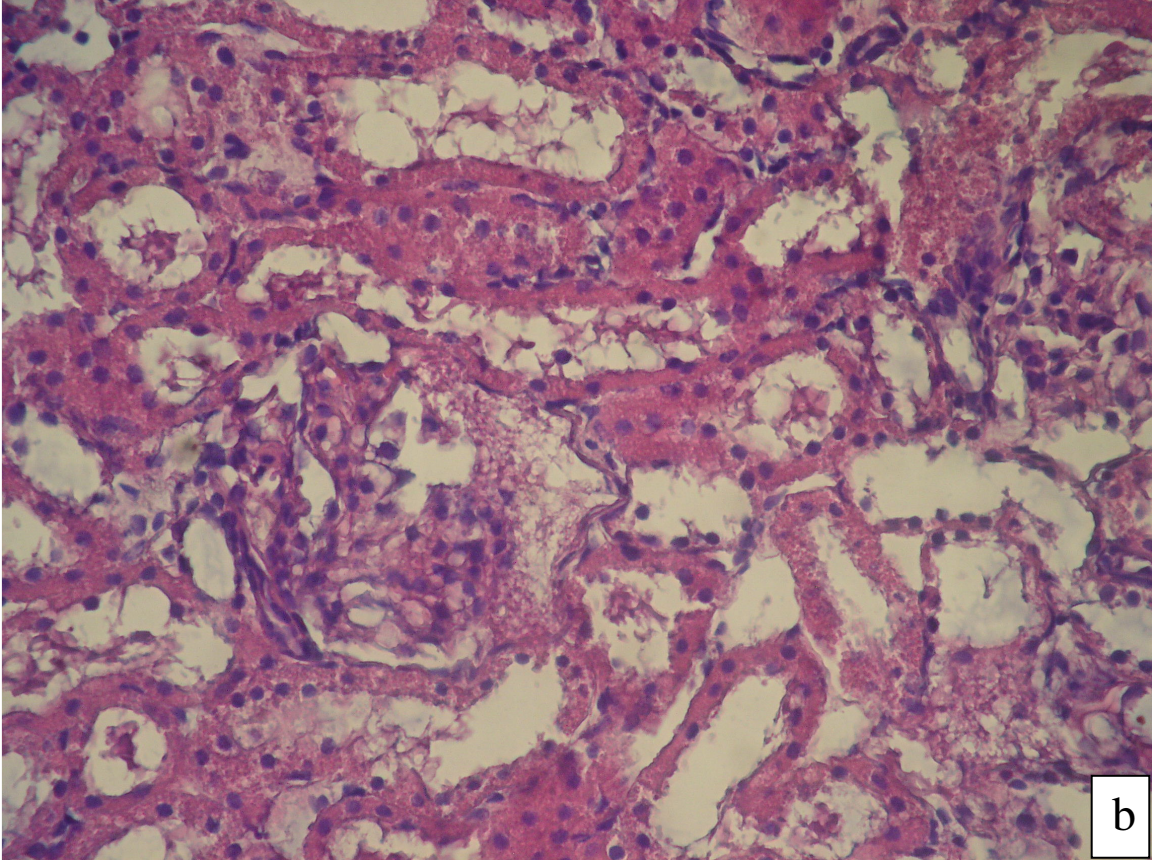
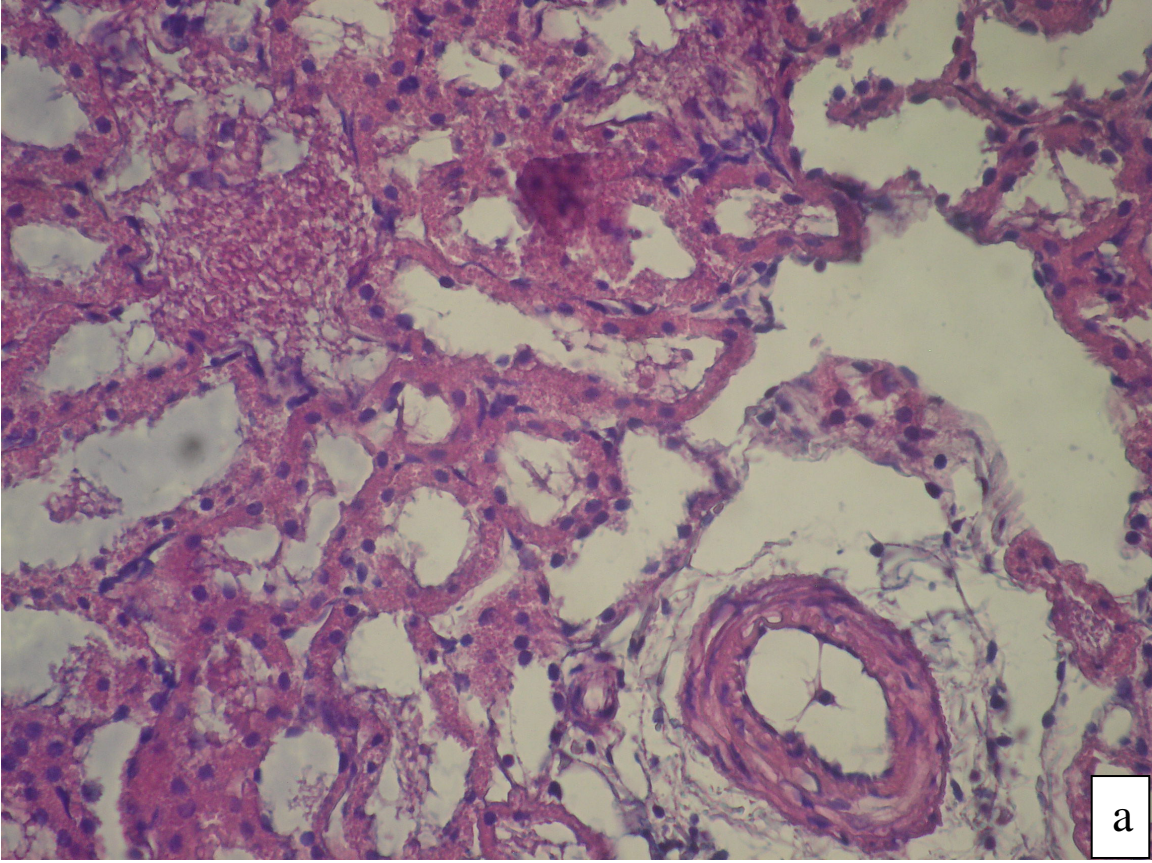
**Resim 10.** 3 gün C vitamini uygulanan sıçanlara ait böbrek dokusu (H-E; x240).





**Resim11.** MTX ve tek doz C vitamini uygulanan gruba ait sıçan böbrek dokusu (H-E; x120)





**Resim 12 a,b.** MTX ve 3 gün süreyle C vitamini uygulanan sıçanlara ait böbrek dokusu (H-E; x480).

Kontrol grubuna ait sıçanların böbrek dokusu normal histolojik görünümde izlendi (Resim 7, Tablo 8). MTX grubuna ait sıçanların böbrek dokularında önemli histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde belirgin hidropik dejenerasyon ve perivasküler ve intertübüler alanlarda önemli inflamatuvar hücre infiltrasyonları izlendi. Ayrıca vasküler ve glomerular konjesyon, tübüler dilatasyon, bazı atrofik tübüller ve bazı Bowman kapsüllerinde daralma gözlemlendi (Resim 8 a, b, Tablo 8). Tek doz C vitamini uygulanan grupta böbrek dokusu normal histolojik görünümde izlendi (Resim 9, Tablo 8). 3 gün süreyle C vitamini uygulanan gruba ait böbrek dokularında orta düzeylerde proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon ve vasküler konjesyon izlendi. Ayrıca düşük düzeylerde inflamatuvar hücre infiltrasyonları ve tübüler dilatasyon gözlemlendi (Resim 10, Tablo 8). MTX- tek doz C vitamini verilen grupta, böbrek dokularında düşük düzeylerde proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, tübüler dilatasyon ve vasküler konjesyon gözlemlendi (Resim 11, Tablo 8). MTX ve 3 gün süreyle C vitamini uygulanan gruba ait sıçanların böbrek dokularında ise önemli histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon ve vasküler konjesyon belirgindi. Ayrıca, intertübüler ve perivasküler alanlarda orta derecede inflamatuvar hücre infiltrasyonları ve tübüler dilatasyon gözlemlendi (Resim 12 a,b, Tablo 8).

**Tablo 8:** Böbrek dokusunda deney gruplarında gözlenen yapısal değişikliklerin skorlanması

	<b>Hidropik dejenerasyon</b>	<b>İnflamatuvar hücre infiltrasyonları</b>	<b>Atrofik tübüller</b>	<b>Vasküler konjesyon</b>	<b>Tübüler dilatasyon</b>	<b>Bowman kapsülünde daralma</b>
<b>I</b>	-	-	-	-	-	-
<b>II</b>	+3	+3	+1	+1	+1	+1
<b>III</b>	-	-	-	-	-	-
<b>IV</b>	+2	+1	-	+2	+1	-
<b>V</b>	+1	-	-	+1	+1	-
<b>VI</b>	+3	+2	-	+2	+2	-

(-) skor (negatif skor): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması, +1 skor (1 pozitif skor) : hafif derecede, +2 skor (2 pozitif skor) : orta derecede, +3 skor (3 pozitif skor) : ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir (102).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bir folik asit antimetaboliti olan MTX, kanserden inflamatuvar hastalıklara kadar geniş bir alanda kullanılmaktadır. Bu yaygın kullanımına karşın, MTX kullanımıyla gelişen başta hepatotoksisite ve nefrotoksisite olmak üzere mukozit, myelosupresyon, pulmoner toksisite gibi pek çok ciddi yan etki bildirilmiştir (103).

Çalışmamızda kullandığımız MTX, mevcut literatürlerde gösterildiği gibi, Kc ve böbrek dokularında belirgin histolojik değişiklikler meydana getirdi. Yapılan biyokimyasal analizler de, histolojik bulguları destekledi. Biyokimyasal değerlendirmede, Kc ve böbrek dokularında lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, buna karşılık SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzim düzeylerinin ise azaldığı gözlemlendi.

MTX kullanımına bağlı gelişen nefrotoksisite ve hepatoksisitenin mekanizması henüz net olarak ortaya konmasa da, son dönemde yapılan çalışmalar bu hasarların oksidatif stres kaynaklı olduğunu göstermektedir (104, 10). MTX, DHFR enzimine ek olarak sitozolik nikotinamid adenozin difosfat ( NADP) bağımlı dehidrogenazları ve NADP malik enzimini de inhibe eder. Böylece hücrelerin NADPH' ı kullanılabilirliği azalır. Normal şartlarda NADPH, önemli bir sitozolik antioksidan enzim olan ve dokuları ROS' a karşı koruyan glutatyon redüktaz tarafından, azalmış hücresel glutatyon düzeyini artırmak için kullanılır. MTX tarafından meydana getirilen glutatyon düzeyindeki bu belirgin azalmanın iki olumsuz sonucu olabileceği gösterilmiştir. İlk olarak, azalan glutatyonla birlikte, reaktif moleküllerin inaktivasyonu da azalır ve bu moleküllerin diğer makromoleküllere kovalent bağla bağlanma eğilimleri artar. İkinci olarak, azalmış glutatyonun hücre homeostazisi üzerine olan pek çok olumsuz etkileri nedeniyle reaktif metabolitlerin toksik etkileri şiddetlenir (102). Sonuç olarak, antioksidan enzim sisteminde bir zayıflamaya ve hücrelerde ROS' a karşı duyarlılıkta artışa neden olur (103).

GSH ve MTX' in toksik etkileri arasındaki bu ilişki göz önüne alındığında, ilaca bağlı Kc ve böbrek hasarının önlenmesi konusunda, dikkatler GSH sentezini artıran ve antioksidan özellik gösteren maddelere yoğunlaşmıştır (13). Örneğin, ratlarda MTX kullanımıyla kan, Kc ve böbrek dokularında artan MDA düzeyleri, MTX yanında melatonin kullanılan ratlarda anlamlı olarak düzelmiş, MTX ile kan ve dokularda miktarı azalan GSH düzeyleri, tedaviye

melatonin eklenmesiyle yükselmiştir (13). Benzer şekilde yapılan bir çalışmada, ratlarda MTX kullanımı ile Kc dokusunda düzeyi artan MDA ve aktiviteleri azalan GSH, SOD ve CAT, tedaviye N-asetil sistein eklenmesi ile normal düzeylere çekilmiştir (106). MTX kullanımıyla gelişen Kc hasarında, tedaviye eklenen ursodeoksikolik asit, rat Kc dokusunda biyokimyasal ve histopatolojik düzelmeye sağlamış (107), kurkimin ve üzüm çekirdeği ekstresi gibi ajanlarla da, Kc dokusunda MTX' e bağlı gelişen oksidatif hasarın biyokimyasal olarak düzeltilebildiği gösterilmiştir (108, 109). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, MTX ile oluşturulan Kc hasarında kullanılan  $\beta$ -karoten, radikal süpürücü etkisiyle histolojik ve biyokimyasal iyileşme sağlamıştır (110).

Kc hasarında olduğu gibi, renal hasarda da oksidatif stres ve nötrofil infiltrasyonunun sorumlu olduğunu gösteren çalışmaları doğrular şekilde (14, 111), MTX' e bağlı gelişen renal hasarda, potansiyel bir serbest radikal süpürücü olan kafeik asit fenetil ester (CAPE) kullanımı, oksidan/ antioksidan dengelerini düzenleyerek koruyucu özellik göstermiştir (112). MTX verilen ratlarda artan MDA, MPO düzeyleri ve kollajen içeriği, L- carnitin uygulanan grupta anlamlı olarak azalmış, MTX' e bağlı gelişen GSH azalması düzelmiştir (113). Benzer bulgular, taurin kullanımı ile de elde edilmiş, serbest radikal süpürücü taurin kullanımı, böbrek ve Kc' de MTX ile gelişen oksidatif doku hasarını biyokimyasal ve histopatolojik olarak düzeltmiştir (114)

Bu çalışmaların ışığında, biz de MTX kullanımına bağlı gelişen Kc ve böbrek toksisitesini engellemek için, ekstrasellüler sıvılarda, bilinen en potent antioksidan olan C vitamini kullandık. Çalışma sonunda kullandığımız C vitaminiyle, MTX kullanımı sonucu oluşan Kc ve böbrek dokularındaki hasarın histopatolojik olarak azaldığını tesbit ettik. Biyokimyasal değerlendirmelerde, MTX ile birlikte C vitamini uygulanan her iki grupta da, MDA seviyelerinde azalma izlenmekteyken, bu değerlerden, 3 gün süreyle C vitamini eklenen gruptaki azalma istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Kc ve böbrek dokularında, antioksidan enzimler olan GPx ve SOD düzeylerinde MTX ile meydana gelen azalma, MDA değerlerine benzer şekilde yalnızca 3 gün C vitamini verilen grupta anlamlı olarak düzelmiştir. MTX ile azalan CAT düzeyleri, Kc dokusunda iki vitamin grubuyla da düzelmezken, böbrekte MTX ile beraber verilen her iki vitamin uygulaması da anlamlı olarak iyileştirici özellik sağlamıştır.

Zincir kırıcı ve radikal süpürücü bir antioksidan olan C vitamini, E vitamini ve ROS' u direk olarak baskılayan glutatyon döngüsü için de gereklidir (14). Araştırmalar, glutatyon ve



C vitamininin serbest radikalleri temizlemede birlikte çalıştıklarını ve birbirlerine bağlı bir koruyucu etkiye sahip olduklarını göstermektedir (115). Bu özellikler aracılığıyla, oksidatif mekanizmalarla oluşturulmuş pek çok deneysel organ hasarı modelinde, doku harabiyetine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.

Farelerde yapılan bir çalışma, tarımda sıklıkla kullanılan organofosfatlardan birisi olan klorprifosun, lipit peroksidasyonunda artışa ve GSH, SOD ve CAT aktivitesinde ise azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur (116). Çalışmaya eklenen C vitamini, klinik, hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde düzelmeye sağlamıştır. Ek olarak bu ve buna benzer önceki çalışmalarda, C vitamininin, organofosfat kaynaklı toksisiteye karşı iyileştirici olmasında antioksidan aktivite yanında başka özelliklerden de söz edilmektedir. Örneğin C vitamininin organofosfatları detoksifiye etmeye yardımcı bir enzim olan paraoksonaz aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (117). C vitamini, ayrıca  $\alpha$ - tokoferol, glutatyon, ürat ve  $\beta$ - karoten gibi diğer küçük moleküler antioksidanların rejenerasyonunda da yer alır. Bu, antioksidan özelliğinin artmasına yardımcı olur (116).

Yakın zamanda herbisid bir ajan olan paraquat ile yapılan çalışmada, bu ajanın oksidatif hasarla meydana getirdiği membran harabiyeti ve multi-sistem toksisitesine karşı C vitamini kullanılmıştır. İnsanda paraquat toksistesinin tam mekanizması net olarak bilinmese de, hayvan modellerinde olduğu gibi, NADPH miktarındaki azalmanın hücreleri lipit peroksidasyona karşı daha duyarlı kıldığı düşünülmektedir. Hidroksil radikali, aquoz peroksil radikali ve süperoksit anyonları için etkili bir radikal süpürücü olan C vitamini, paraquat ile meydana gelen histolojik ve histopatolojik değişiklikleri düzeltmiştir. Bu düzeltici etki açıklanırken, antioksidan etkisinin yanında diğer antioksidanların rejenerasyonunu artırıcı özelliğinin de altı çizilmiştir (118).

Ratlarda,  $CCl_4$  kullanımı ile oluşturulan Kc hasarında, serbest radikal ve lipit peroksidasyonunda artışı doğrular şekilde MDA düzeylerinde artış, SOD, CAT ve GSH düzeylerinde ise azalma meydana gelmiş, tedaviye eklenen C vitaminiyle, histopatolojik ve biyokimyasal düzelmeye sağlanmıştır (26).

C vitamininin koruyucu etkisi, koroner arterlerde de çalışılmıştır. Mikrovasküler endotel hücrelerin kullanıldığı bir hücre kültürü çalışmasında, hiperglisemik ortam sağlanarak oksidatif stres meydana getirilmiş, kullanılan C ve E vitaminleri, prooksidan/antioksidan enzim sistemlerindeki değişikliklerle koroner endotel hücreleri koruyucu özellik göstermiştir (119). Sigara içen ve içmeyenlerden oluşan küçük bir hasta grubuyla yapılan

başka bir çalışmada, sigaranın prooksidan özelliği çalışılmış ve C vitamininin sigara içenlerde bozulmuş koroner mikrosirkülasyonu ve koroner akım rezervini düzelttiği belirtilmiştir (120). Ratlarda periodontitis kullanılarak oluşturulan deneysel aterosklerozun da, oksidatif stresi azaltan C vitamini ile gerilediği belirtilmiştir (121).

C vitamini ile ilgili yapılan çalışmaların bir kısmında, ajan farklı miktarlarda kullanılarak doz- sonuç karşılaştırmaları yapılmıştır. Örneğin, farelerde sisplatin kullanımı sonucu meydana gelen nefrotoksisitede, 250 mg/ kg ve 500 mg/ kg dozlarında C ve E vitamini denenmiş, sisplatinle yükselen BUN ve Scr değerleri her iki vitaminin her iki dozunda da gerilemiştir. Antioksidan enzimler olan ve sisplatin kullanımıyla miktarları azalan SOD, CAT ve GPx, C ve E vitamininin sadece 500 mg/ kg dozunda kullanıldığı grupta düzelmiş, düşük doz grubunda anlamlı bir değişiklik olmamıştır. GSH değerleri ise, hem düşük hem de yüksek doz vitamin uygulamasıyla yükselmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, yüksek doz vitamin uygulamasının oksidatif hasara karşı renal korumada daha etkin olduğu, ayrıca C vitamininin E vitamininden daha renoprotektif bir ajan olduğu ortaya konmuştur (122).

Yine sisplatin ve C vitamini kullanılarak yapılan bir çalışmada, ratlara 50 mg/ kg, 100 mg/ kg ve 200 mg/ kg dozlarında C vitamini verilmiştir. Sisplatin aracılı glutatyon azalmasının oksidatif hasarda ve sonrasında gelişen böbrek toksisitesinde belirleyici basamak olarak düşünüldüğü bu çalışmada böbrek dokusunda bakılan glutatyon düzeylerinin, 100 mg/ kg (orta doz) ve 200 mg/ kg (yüksek doz) dozunda C vitamini uygulanan gruplarda anlamlı olarak düzeldiği gösterilmiştir. Lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak değerlendirilen TBARS sonuçları da, GSH sonuçlarına benzer şekilde, orta ve yüksek doz C vitamini gruplarında anlamlı olarak artmıştır. Çalışma sonunda, C vitamininin oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin doz bağımlı olduğu söylenmiştir (123).

Bir glutatyon presürsörü olan N- asetil sistein, parasetamol kullanımıyla gelişen hepatotoksisteyi düzeltirken, böbrek hasarını engelleyememesi noktasından hareketle, parasetamol aracılı böbrek hasarında C vitamini çalışılmış. Farklı dozlarda (250, 500, 1000 mg/ kg) ve farklı zamanlarda (parasetamol uygulamasının ardından 1.5, 6, 9, 16 saat sonra) uygulanan C vitamini, düşük dozlarda erken uygulama saatlerinde renal hasarı önlerken, daha geç zamanlarda uygulanan gruplarda ancak yüksek dozlarda koruyucu etki göstermiştir (18)

Meme kanseri 60 post-menapozal kadıla yapılan bir çalışmada, tamoksifen kullanan kadınlarda tedaviye eklenen C vitamini, antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GPX değerlerinin normale dönmesini sağlamıştır (124).

Sonuç olarak, MTX ile meydana gelen oksidatif Kc ve böbrek hasarı, C vitamini ile azaltılabilir. nceki mevcut literatür bilgileri ve bizim çalışmamızın sonuçlarına göre, C vitamininin koruyucu etkisi, glutatyon düzeylerindeki artışa bağlı gibi gözükmektedir. Daha önce de bahsedildiği gibi, C vitamini glutatyon döngüsünde yer alan bir vitamindir. Biz, alışmamızda olanaklar dahilinde sadece GPx değerlendirmesi yapabildik. İleriki alışmalarda, GPx yanında glutatyon düzeyine ve glutatyon düzeyiyle Kc- böbrek fonksiyon testleri arasındaki olası ilişkiye bakılarak değerlendirmeler yapılabilir

Histolojik değerlendirmelerde, her iki vitamin grubunda gordugumuz iyileşme, biyokimyasal değerlere sadece 3 gunluk vitamin grubunun korucu etkisi şeklinde yansımıştır. Bir gunluk vitamin uygulamasında, MDA ve antioksidan değerleri düzelmiş ancak bu düzelme istatistiki olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Bu noktada, MTX aracılı Kc- böbrek hasarında, lipit peroksidasyonun olası tek mekanizma olmayabileceği ya da, duşuk doz C vitamini kullanımının iyileştirici etkisinin antioksidan özellikten başka mekanizmalarla açıklanabileceği sonuçlarına varılabilir. Bu detaylar, ileri deneysel çalışmalar için hareket noktası oluşturacaktır.

## ÖZET

### Ratlarda Metotreksat Kaynaklı Karaciğer ve Böbrek Hasarında C vitamininin Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Bir folat antagonisti olan ve kanser tedavisi yanında pek çok sistemik inflamasyonun tedavisinde kullanılan MTX, hepatokside ve nefrotokside gibi önemli yan etkilere neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda oksidatif hasarın sorumlu olduğu gösterilen bu yan etkileri önleme konusunda, potent bir antioksidan olan C vitaminin alternatif bir profilaktik seçenek olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda kullanılan 36 adet Wistar albino erkek rat, her birinde 6 hayvan bulunan 6 gruba ayrıldı. Gruplar; Kontrol, MTX ( 20 mg/ kg, i.p, tek doz ), C vitamini ( 250 mg/ kg, oral, 1 gün ), C vitamini ( 250 mg/ kg, oral, 3 gün ), MTX ( 20 mg/ kg, i.p, tek doz ) + C vitamini ( 250 mg/ kg, oral, 1 gün ) ve MTX ( 20 mg/ kg, i.p, tek doz ) + C vitamini ( 250 mg/ kg, oral, 3 gün ) şeklinde oluşturuldu. Deney sonunda karaciğer ve böbrek dokularının histopatolojik değerlendirilmesi yapıldı. Yine bu dokularda MDA, SOD, CAT ve GPx gibi biyokimyasal parametrelere bakıldı.

Yapılan biyokimyasal değerlendirmeler sonunda, karaciğer dokusunda MTX kullanımı ile artan MDA değerleriyle, azalan SOD ve GPx düzeyleri, MTX tedavisine eklenen 3 günlük C vitamini ile kontrol grubuna göre anlamlı olarak düzeldi. MTX kullanımı ile azalan CAT değerini, her iki vitamin uygulaması da düzeltmedi. Böbrek dokusunda da MTX kullanımı ile artan MDA değerleriyle, azalan SOD ve GPx değerleri, 3 günlük C vitamini kullanımı ile düzeldi, MTX ile azalan CAT değerlerini her iki vitamin uygulaması da anlamlı olarak artırdı. Bu biyokimyasal bulgulara paralel olarak, MTX rubuna ait karaciğer ve böbrek dokularının histolojik incelemelerinde oksidatif hasar bulguları izlendi. MTX grubuyla karşılaştırıldığında, MTX ile beraber uygulanan her iki vitamin grubunda bu histolojik bulgularda anlamlı ölçüde düzelme izendi.

Sonuç olarak, MTX' in rat karaciğer ve böbrek dokusu üzerine olan toksik etkilerinin C vitamini ile düzelebileceği ve bu sonuçların doz bağımlı olabileceği sonucuna ulaştık.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, C vitamini, Metotreksat, Oksidatif doku hasarı,

## SUMMARY

### **Investigation of The Protectif Effect of Vitamin C On Methotrexate Induced Liver and Kidney Injury in Rats**

Methotrexate, a folat antagonist used for the treatment of cancer and inflammation, causes potential side effects, like hepatotoxicity and nephrotoxicity. Scientific evidences have shown that oxidative damage is the causative reason for the MTX toxicity; thereby vitamin C could be an alternative prophylactic agent aganist MTX-induced hepatotoxcity and nephrotoxicity.

A total of thirty- six male Wistar albino rats were included in this study. Animals were equally divided into six groups as follows: Controls, only MTX ( 20 mg/ kg, i.p, single dose ) given group, vitamin C ( 250 mg/ kg, orally, for 1 day) group, vitamin C ( 250 mg/ kg, orally, for 3 days ) group, MTX ( 20 mg/ kg, i.p, single dose ) + vitamin C ( 250 mg/ kg, orally, for 1 day) and MTX ( 20 mg/ kg, i.p, single dose ) + vitamin C ( 250 mg/ kg, orally, for 3 days ). At the end of the study, liver and kidney tissues were evaluated histopathologically and the biochemical analysis for MDA, SOD, CAT and GPx were performed.

According to the biochemical findings, MDA levels were increased and SOD and GPx were decreased by the use of MTX in the liver tissues and these levels were improved in the group that vitamin C was administered for three days. CAT levels which decreased by MTX could not be increased by none of vitamin C treatment group.

In renal tissues, increased MDA levels and decreased SOD and GPx levels by MTX were significantly restored after the administration of vitamin C for three days. CAT levels were decreased after MTX, and increased significantly in both vitamin C treatment groups.

Similar to the biochemical findings, the evidences of oxidative damage were seen in both liver and kidney tissues by histopathologic examination. Compare to the control group, findings of both vitamin C treatment groups were significantly improved.

As a result, vitamin C can ameliorate the toxic effect of MTX on the rat liver and kidney tissues and this effect could be dose-dependent. .

**Key Words:** Antioxidant, Methotrexate, Oxidative tissue damage, Vitamin C

## KAYNAKLAR

1. Perez A, Woods A, Grattan CE . Methotrexate: a useful steroid-sparing agent in recalcitrant chronic urticaria. Br J Dermatol. 2010 Jan; 162(1): 191-4. Epub 2009 Nov 6.
2. Bleyer WA, Poplack DG. Prophylaxis and treatment of leukemia in the central nervous system and other sanctuaries [Review]. Semin Oncol 12: 131–148 (1985)
3. Panetta JC, Sparreboom A, Pui CH, Relling MV, Evans WE PLoS Comput Biol. Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells 2010 Dec 2; 6(12): e1001019.
4. Fiehn C. Methotrexate in rheumatology. Z Rheumatol. 2009 Nov; 68(9 ): 747-56; quiz 757
5. Sathasivam S. Steroids and immunosuppressant drugs in myasthenia gravis. Nat Clin Pract Neurol. 2008 June; 4(6 ): 317-27. Epub 2008 May 20
6. Salim A, Tan E, Ilchysyn A, Berth-Jones J. Folic acid supplementation during treatment of psoriasis with methotrexate : a randomized , double blind, placebo-controlled trial. Br J Dermatol 2006; 154: 1169-74
7. Koyama S, Sato E, Takamizawa A, Tsukadaira A, Haniuda M, Kurai M, Numanami H, Nagai S, Izumi T. Methotrexate stimulates lung epithelial cells to release inflammatory cell chemotactic activities. Exp Lung Res. 2003 Mar; 29(2): 91-111.
8. Turesson C, Matteson EL. Genetics of rheumatoid arthritis. Mayo Clin Proc. 2006 Jan; 81(1):94-101
9. Conaghan PG, Brooks P. Disease-modifying antirheumatic drugs, including methotrexate, gold, sulfasalazine, antimalarials, and D-penicillamine. Curr Opin Rheumatol 1996; 8(3): 176–82.
10. van Outryve S, Schrijvers D, van den Brande J, Wilmes P, Bogers J, van Marck E, Vermorken JB. Methotrexate-associated liver toxicity in a patient with breast cancer: case report and literature review. Neth J Med. 2002 Jun; 60(5): 216- 22
11. Pesce C, Mansi C, Bogliolo G, Tobia F, Pannacciulli I. Pulmonary toxicity in mice after high-dose methotrexate administration with and without leucovorin rescue. Eur J Cancer Clin Oncol. 1985 Jul;21(7):875-80.
12. Abraham P, Kolli VK, Rabi S. Melatonin attenuates methotrexate-induced oxidative stress and renal damage in rats. Cell Biochem Funct. 2010 Jul;28(5):426-33.
13. Jahovic N, Cevik H, Sehirli Ao, Yeğen BC, Sener G. Melatonin prevents Methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. J Pineal Res. 2003 May; 34(4): 282-7
14. Kolli VK, Abraham P, Isaac B, Selvakumar D. Neutrophil infiltration and oxidative stress may play a critical role in methotrexate-induced renal damage. Chemotherapy. 2009;55(2):83-90. Epub 2009 Jan 15.
15. Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. Scand J Gastroenterol. 2004 Nov;39(11):1119-27.

16. Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, Bas O, Kilbas S, Yılmaz HR, Yurekli VA, Kucuker H, Songur A. The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology* . 2006 Feb 1; 218 ( 2-3 ) : 125-33. Epub 2005 Dec 2
17. Pinnell SR .Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale J Biol Med*. 1985 Nov-Dec;58(6):553-9.
18. Abraham P. Vitamin C may be beneficial in the prevention of paracetamol- induced renal damage. *Clin Exp Nephrol* ( 2005 ) 9: 24-30
19. Choi HI, Park JI, Kim HJ, Kim DW, Kim SS. A novel L-ascorbic acid and peptide conjugate with increased stability and collagen biosynthesis. *BMB Rep*. 2009 Nov 30;42(11):743-6
20. Cole JA, Warthan MM, Hirano SA, Gowen CW Jr, Williams JV Scurvy in a 10-Year-Old Boy. *Pediatr Dermatol*. 2010 Jun 16.
21. Boran P, Tokuc G, Yegin Z. Methemoglobinemia due to application of prilocaine during circumcision and the effect of ascorbic acid. *J Pediatr Urol*. 2008 Dec;4(6):475-6. Epub 2008 Jun 10.
22. Grau Carmona T, Rincón Ferrari MD, García Labajo D .Nutritional support in burnt patients. *Nutr Hosp*. 2005 Jun;20 Suppl 2:44-6.
23. Harrison FE, Meredith ME, Dawes SM, Saskowski JL, May JM. Low ascorbic acid and increased oxidative stress in gulo(-/-) mice during development. *Brain Res*. 2010 Jun 20.
24. Naziroğlu M, Kilinç F, Uğuz AC, Celik O, Bal R, Butterworth PJ, Baydar ML Oral vitamin C and E combination modulates blood lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in maximal exercising basketball players. *Cell Biochem Funct*. 2010 Jun;28(4):300-5
25. Kaida S, Ohta Y, Imai Y, Kawanishi M. Protective effect of L-ascorbic acid against oxidative damage in the liver of rats with water-immersion restraint stress. *Redox Rep*. 2010;15(1):11-9.
26. Ozturk IC, Ozturk F, Gul M, Ates B, Cetin A. Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. *Cell Biochem Funct* 2009; 27: 309-315
27. Lee W. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003;349:474–485.
28. Lewis J. Drug-induced liver disease. *Med Clin North Am* 2000;84:1275– 1311.
29. Navarro V, Senior J. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2006;354:731–739.
30. Belay ED, Bresee JS, Holman RC, et al. Reye's syndrome in the United States from 1981 through 1997 [see comments]. *N Engl J Med* 1999;340:1377–1382.
31. Monto AS. The disappearance of Reye's syndrome—A public health triumph [editorial; comment] [see comments]. *N Engl J Med* 1999;340:1423– 1424.
32. Leo MA, Lieber CSJ. Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: Adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1071–1085.
33. Agarwal DP, Goedde HW. Human aldehyde dehydrogenases: Their role in alcoholism. *Alcohol* 1989;6:517–523

34. Lee WM. Acute hepatic failure. *N Engl J Med* 1993;329:1862–1872.
35. König SA, Schenk M, Sick C, et al. Fatal liver failure associated with valproate therapy in a patient with Friedreich's disease: Review of valproate hepatotoxicity in adults. *Epilepsia* 1999;40:1036–1040.
36. Lullman H, Lullman R, Wasserman O. Drug-induced phospholipidosis, II. Tissue distribution of the amphiphilic drug chlorphentermine. *CRC Crit Drug Rev Toxicol* 1975;4:185–218.
37. Tsagaropouou-Stinga H, Matakis-Emmanouilidou R, Karida-Kavalioti S, et al. Hepatotoxic reactions in children with severe tuberculosis treated with isoniazid-rifampin. *Pediatr Infect Dis* 1985;4:270–273.
38. Van Puijenbroek EP, Metselaar HJ, Berghuis PH, et al. [Acute hepatocytic necrosis during ketoconazole therapy for treatment of onychomycosis. National Foundation for Registry and Evaluation of Adverse Effects.] *Ned Tijdschr Geneesk* 1998;142:2416–2418.
39. Fernandes NF, Martin RR, Schenker S. Trazodone-induced hepatotoxicity: A case report with comments on drug-induced hepatotoxicity. *Am J Gastroenterol* 2000;95:532–535.
40. Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:489–499
41. Leonard PA, Clegg DO, Carson CC, et al. Low dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis: An 8-year experience with hepatotoxicity. *Clin Rheumatol* 1987;6:575–582.
42. Cullen P. Mechanistic classification of liver injury. *Toxicol Pathol* 2005;33:6–8.
43. Rossert J. Drug-induced acute interstitial nephritis. *Kidney Int* 2001;60:804–817.
44. Choudhury D, Ahmed Z. Drug-associated renal dysfunction and injury. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2:80–91.
45. Silva FG. Chemical-induced nephropathy: A review of the renal tubulointerstitial lesions in humans. *Toxicol Pathol* 2004;32 Suppl 2:71–84.
46. Cosyns JP. Aristolochic acid and “Chinese herbs nephropathy”: A review of the evidence to date. *Drug Saf* 2003;26:33–48.
47. Gonlusen G, Akgun H, Ertan A, et al. Renal failure and nephrocalcinosis associated with oral sodium phosphate bowel cleansing: Clinical patterns and renal biopsy findings. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:101–106.
48. Brix AE. Renal papillary necrosis. *Toxicol Pathol* 2002;30:672–674.
49. Oktem F, Yılmaz R, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzar E, Uz E. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology and Industrial Health* 2006; 22: 241–247
50. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 1. Cilt. 11. baskı. Ankara. Hacettepe-taş Yayıncılık 2005. 317- 347
51. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, 2006. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, Mc Graw- Hill Companies, New-York



52. Bertram G. Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, 9. Edition, Singapore : The McGraw- Hill Companies, 2004 : 898- 931
53. Norris RE, Adamson PC. Clinical potency of methotrexate, aminopterin, talotrexin and pemetrexed in childhood leukemias. *Cancer Chemother Pharmacol* (2010) 65:1125–1130 DOI 10.1007/s00280-009-1120-8
54. Goodman and Gillmann, Tedavinin Farmakolojik Temeli, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009: 1315- 1405
55. Jolivet jj, Cowan KH, Clendennin Nj, Chabner BA. The pharmacokinetics and clinical use of methotrexate. *N Engl j med* 1983; 309: 1094-104
56. Chen YX, Lv WG, Chen HZ, Ye f, Xie X. Methotrexate induces apoptosis of human choriocarcinoma cell line JAR via a mitochondrial pathway. *Eur j Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Apr; 143(2): 107-11. Epub 2009 Jan 31
57. Ginnani EH, Brewer EJ, Kuzima N, Shakiov A, Maximov A, Vorontsov I, Fink CW, Newman AJ, Cassidy JT, Zemel LS. Methotrexate in resistant juvenile rheumatoid arthritis. Results of the USA-USSR double blind placebo controlled trial. The Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group and The Cooperative Study Group. *N Engl J Med* 1992: 326:1043– 1049
58. Cornstein BN. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23: 739–755
59. Chang DM, Weinblatt ME, Schur PH The effects of methotrexate on interleukin 1 in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992 19: 1678–1682
60. Seitz M, Zwicker M, Loetscher P Effect of methotrexate on differentiation of monocytes and production of cytokine inhibitors by monocytes. *Arthritis Rheum* (1998) 41: 2032–2038
61. Wascher TC, Hermann J, Brezineschek R et al Serum levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha are not correlated to disease activity in patients with rheumatoid arthritis after treatment with low dose methotrexate. *Eur J Clin Invest* (1994) 24: 73–75
62. Barrera P, Boerbooms AMT, Janssen EM et al Circulating soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-2 receptors, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 levels in rheumatoid arthritis: longitudinal evaluation during methotrexate and azathioprine therapy. *Arthritis Rheum* (1993) 36: 1070–1079
63. Aggarwal A. Misra R. Methotrexate inhibits interleukin-6 production in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* (2003) 23: 134–137
64. Pınarbaşı A, Akman A, Yılmaz E, Başaran E. Metotreksat verilen Psöriazis Vulgaris Hastalarına Folik Asit Desteği Gerekli mi? *Türk Dermatoloji Dergisi* 2008; 2: 39- 42
65. Tenekeci HÖ, Baflak PY, Baysal V, Karahan N. Metotreksat tedavisine yanıt veren vulvokrural yerleşimli bir Hailey-Hailey olgusu. *TÜRKDERM* 2005; 39: 208-210
66. Maeda T, Miyazono Y, Ito K, Hamada K, Sekine S, Horie T. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats *Cancer Chemother Pharmacol* (2010) 65: 1117–1123

67. Regina Maria V. Babiak, Annibal P. Campello, Eva G. S. Carnieri And Ma. Benigna M. Oliveira. Methotrexate: Pentose Cycle And Oxidative Stres. *Cell Biochem Funct.* 16, 283±293 (1998)
68. Kevat S, Ahern M, Hall P. Hepatotoxicity f Methotrexate in Rheumatic Diseases. *Med Toxicol Adverse Drug Exp.* 1998 May- June; 3(3): 197- 208
69. Widemann BC, Balis FM, Kempf-Bielack B, Bielack S, Pratt CB, Ferrari S, Bacci G, Craft AW, Adamson PC. High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer.* 2004 May 15;100(10):2222-32.
70. Pharmacotherapy- a Pathophysiologic Approach, 7th Ed, 2008,
71. Vezmar S, Becker A, Bode U, Jaehde U: Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. *Chemotherapy* 49: 92–104 2003
72. Bleyer WA: Neurologic sequelae of methotrexate and ionizing radiation: a new classification. *Cancer Treat Rep* 65 (Suppl 1): 89– 98, 1981
73. Nadir I. Şencan M. Düşük Doz Metotreksat'a Bağlı Pansitopeni Gelişen Romatoid Artrit Olgusu. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 24 (2): 81 – 82, 2002
74. Göğüş F. Metotreksat ve Osteopati. *Romatizma*, , 2001 ( 16) ; 1: 52-57
75. Braun J, Rau R An update on methotrexate. *Curr Opin Rheumatol.* 2009 May;21(3):21623.
76. Janos Z, Krishnamurti D. *Oxidative Stres and Disease 10: Nutrients and cell signaling.* Taylor & Francis, 2005: Önsöz
77. Akkuş İ (1995) *Serbest Radikaller ve Fiziopatolojik Etkileri*, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya
78. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE (1992) Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119(6), 598-620
79. Atmaca E. Aksoy A. Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2009, 20 (2), 79 - 83 Derleme. ISSN: 1017-8422; e-ISSN: 1308-3651
80. Altanl N. Dinçel1, A.S Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem]* 2006; 31 (2); 51–56.
81. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C: Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine.* 39: 841 – 852, 2005.
82. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54:176-186, 2001
83. Akkuş I, Kalak S, Vural H, Çağlayan O, Menekşe E, Can G, Durmuş B: Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin c levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta.* 244:221-227, 1996.
84. Chao JC, Huang CH, Wu SJ, Yang SC, Chang NC, Shieh MJ, Lo PN: Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *J Nutr Biochem.* 13:427-434, 2002.
- 85 Steinberg FM, Chait A: Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. *Am J Clin Nutr.* 68: 319-327, 1998.

86. Jialal I, Grundy SM: Effect of combined supplementation with alpha-tocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation. *Circulation*. 88: 2780-2786, 1993
87. Van Haaften RI, Evelo CT, Penders J, Eijnwachter MP, Haenen GR, Bast A: Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives. *Biochim Biophys Acta*. 1548: 23-28, 2001
88. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3: 30-39
89. *Biyokimya*. Prof. Dr. F. Gürdöl, Doç. Dr. E. Ademoğlu. Nobel kitabevi, İst. 2006
90. *Klinik Kimyada Temel İlkeler*, Tietz , 5. Baskıdan Çeviri, Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, Palme Yayıncılık, Ank. 2005
91. *Harper's Biochemistry*, 24th Edition, Robert K. Murray, Darly K. Granner, Peter A. Mayes, Victor w. Rodwell Prentice- Hall Internationals, Inc 1996
92. Pinnell SR .Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale J Biol Med*. 1985 Nov-Dec;58(6):553-9.
93. 225./94 Hulse JD, Ellis SR and Henderson LM: Carnitine biosynthesis-beta hydroxylation of trimethyllysine by an  $\alpha$ -keto glutarate dependent mitochondrial dioxygenase. *J Biol Chem* 1978, 253:1654-1659.
94. [Rebouche CJ](#). Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. [Am J Clin Nutr](#). 1991 Dec;54(6 Suppl):1147S-1152S
95. [Furusawa H](#), [Sato Y](#), [Tanaka Y](#), [Inai Y](#), [Amano A](#), [Iwama M](#), [Kondo Y](#), [Handa S](#), [Murata A](#), [Nishikimi M](#), [Goto S](#), [Maruyama N](#), [Takahashi R](#), [Ishigami A](#). Vitamin C is not essential for carnitine biosynthesis in vivo: verification in vitamin C-depleted senescence marker protein-30/gluconolactonase knockout mice. [Biol Pharm Bull](#). 2008 Sep;31(9):1673-9
96. [Lee HY](#), [Naha N](#), [Ullah N](#), [Jin GZ](#), [Kong IK](#), [Koh PO](#), [Seong HH](#), [Kim MO](#) Effect of the co-administration of vitamin C and vitamin E on tyrosine hydroxylase and Nurr1 expression in the prenatal rat ventral mesencephalon. [J Vet Med Sci](#). 2008 Aug;70(8):791-7.
97. [Santos IM](#), [Tomé Ada R](#), [Saldanha GB](#), [Ferreira PM](#), [Militão GC](#), [Freitas RM](#) . Oxidative stress in the hippocampus during experimental seizures can be ameliorated with the antioxidant ascorbic acid. [Oxid Med Cell Longev](#). 2009 Sep-Oct;2(4):214-21.
98. [May JM](#), [Qu ZC](#) Ascorbic acid prevents increased endothelial permeability caused by oxidized low density lipoprotein. [Free Radic Res](#). 2010 Sep 6. [Epub ahead of print]
99. Hadi SM, Ullah MF, Shamim U, Bhatt SH, Azmi AS Catalytic Therapy of Cancer by Ascorbic Acid Involves Redox Cycling of Exogenous/Endogenous Copper Ions and Generation of Reactive Oxygen Species. *Chemotherapy*. 2010 Aug 11;56(4):280-284.
100. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121–26. Van kampfen EJ, Zjilstra WG. Determination of hemoglobin and ist derivatives. *Adv Clin Chem* 1965; 8: 141
101. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folinphenol reagents. *J Biol Chem*. 193:265-275,1951.

102. A. Abdel- Wahhab, s. A. Nada and m. S. Arbid. Ochratoxicosis: Prevention of developmental toxicity by L-m methionine in rats m. *Journal of applied toxicology, J. Appl. Toxicol.* 19, 7- 12 ( 1999)
103. [Ohbayashi M](#), [Suzuki M](#), [Yashiro Y](#), [Fukuwaka S](#), [Yasuda M](#), [Kohyama N](#), [Kobayashi Y](#), [Yamamoto T](#). Induction of pulmonary fibrosis by methotrexate treatment in mice lung in vivo and in vitro. *J Toxicol Sci.* 2010;35(5):653-61.
104. [Pinheiro FV](#), [Pimentel VC](#), [De Bona KS](#), [Scola G](#), [Salvador M](#), [Funchal C](#), [Moretto MB](#). Decrease of adenosine deaminase activity and increase of the lipid peroxidation after acute methotrexate treatment in young rats: protective effects of grape seed extract. *Cell Biochem Funct.* 2010 Jan;28(1):89-94
105. Regina Maria V. Babiak, Annibal P. Campello, Eva G. S. Carnieri And Ma. Benigna M. Oliveira. Methotrexate: Pentose Cycle And Oxidative Stres. *Cell Biochem Funct.* 16, 283±293 (1998)
106. [Cetinkaya A](#), [Bulbuloglu E](#), [Kurutas EB](#), [Kantarceken B](#). N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit.* 2006 Aug;12(8):BR274-8. Epub 2006 Jul 12
107. [Uraz S](#), [Tahan V](#), [Aygün C](#), [Eren F](#), [Unluguzel G](#), [Yuksel M](#), [Senturk O](#), [Avsar E](#), [Haklar G](#), [Celikel C](#), [Hulagu S](#), [Tozun N](#). Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci.* 2008 Apr;53(4):1071-7. Epub 2007 Oct 13
108. TS 11: Hemeida RA, Mohafez OM.. Curcumin attenuates methotraxate-induced hepatic oxidative damage in rats. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2008 Jun;20(2):141-8
109. [Cetin A](#), [Kaynar L](#), [Kocuyigit I](#), [Hacioglu SK](#), [Saraymen R](#), [Ozturk A](#), [Sari I](#), [Sagdic O](#). Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. *Am J Chin Med.* 2008;36(5):861-72.
110. Vardi N, Parlakpınar H, Cetin A, Erdogan A, Cetin Ozturk I. .Protective effect of beta-carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol Pathol.* 2010 Jun;38(4):592-7. Epub 2010 May 6
- 111 [Devrim E](#), [Cetin R](#), [Kiliçoğlu B](#), [Ergüder BI](#), [Avcı A](#), [Durak I](#). Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail.* 2005;27(6):771-3.
112. Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, Bas O, Kilbas S, Yılmaz HR, Yurekli VA, Kucuker H, Songur A. The activity of adenosine deaminaz and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology .* 2006 Feb 1; 218 ( 2-3) : 125-33. Epub 2005 Dec 2.
113. Sener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N, Yeğen BC L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *Cell Biol Toxicol.* 2006 Jan;22(1):47-60
114. Cetiner M, Sener G, Sehirli AO, Ekşioğlu-Demiralp E, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N, Akpulat S, Tecimer T, Yeğen BC. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Nov 15;209(1):39-50
115. Percival M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights.* Nut 031

116. Ambali S, Akanbi D, Igbokwe N, Shittu M, Kawu M, Ayo J. Evaluation of subchronic chlorpyrifos poisoning on hematological and serum biochemical changes in mice and protective effect of vitamin C. *J Toxicol Sci.* 2007 May;32(2):111-20
117. Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Furlong CE. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Aug 1;22(8):1329-33.
118. Awadalla EA. Efficacy of vitamin C against liver and kidney damage induced by paraquat toxicity. *Exp Toxicol Pathol.* 2010 Dec 2. [Epub ahead of print]
119. Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Antioxidant vitamins C and E ameliorate hyperglycaemia-induced oxidative stress in coronary endothelial cells. *Diabetes Obes Metab.* 2004 Nov;6(6):442-51
120. Kaufmann PA, Gnecchi-Ruscone T, di Terlizzi M, Schäfers KP, Lüscher TF, Camici PG. Coronary heart disease in smokers: vitamin C restores coronary microcirculatory function. *Circulation.* 2000 Sep 12;102(11):1233-8.
121. Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Kokeguchi S, Yamamoto T. Vitamin C intake attenuates the degree of experimental atherosclerosis induced by periodontitis in the rat by decreasing oxidative stress. *Arch Oral Biol.* 2009 May;54(5):495-502. Epub 2009 Mar 17
122. Ajith TA, Usha S, Nivitha V. Ascorbic acid and alpha-tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. *Clin Chim Acta.* 2007 Jan;375(1-2):82-6. Epub 2006 Jun 14
123. Antunes LM, Darin JD, Bianchi MD. Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacol Res.* 2000 Apr;41(4):405-11
124. Muralikrishnan G, Amanullah S, Basha MI, Boopalan S, Vijayakumar S, Shakeel F. Effect of Vitamin C on Lipidperoxidation and Antioxidant Status in Tamoxifen – Treated Breast Cancer Patients. *Chemotherapy.* 2010 Aug 13; 56 (4 ): 298-302