

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**RATLARDA METOTREKSATLA İNDÜKLENEN  
KUTANÖZ OKSİDATİF STRES ÜZERİNE KAFEİK ASİT  
FENETİL ESTER'İN KORUYUCU ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Ayşegül ALTUNTAŞ**

**DERMATOLOJİ ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANLARI**

**I. DANIŞMAN  
Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM**

**II. DANIŞMAN  
Doç. Dr. H. Ramazan YILMAZ**

**ISPARTA - 2010**

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**RATLARDA METOTREKSATLA İNDÜKLENEN  
KUTANÖZ OKSİDATİF STRES ÜZERİNE KAFEİK ASİT  
FENETİL ESTER'İN KORUYUCU ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. AYŞEGÜL ALTUNTAŞ**

**DERMATOLOJİ ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**I. DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM**

**II. DANIŞMAN**

**Doç. Dr. H. Ramazan YILMAZ**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından “1857-TU-09” proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ISPARTA - 2010**

**TEŞEKKÜR**

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü desteklerini esirgemeyen tez danışmanı hocalarım Doç Dr. Mehmet YILDIRIM ve Doç Dr. H. Ramazan YILMAZ başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Vahide BAYSAL AKKAYA, Prof. Dr. Pınar YÜKSEL BAŞAK, Yrd. Doç. Dr. Ali Murat CEYHAN, Yrd. Doç. Dr. İjlal ERTURAN, laboratuvar imkanlarını kullandıran Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e ve laboratuvar çalışmalarında bana yol gösteren ve emeği geçen değerli hocalarım ve asistan arkadaşlarıma, projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, bu vesileyle çalışmalarım sırasında manevi desteği ile hep yanımda olan sevgili eşim ve hayat arkadaşım Dr. Atila ALTUNTAŞ'a, sıkıntılı anlarımda bana neşe kaynağı olan sevgili çocuklarım Ahmet Burak ve Ahsen Dila'ya, bana hep inanan ve destekleyen canım annem ve babama en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Ayşegül ALTUNTAŞ

**İÇİNDEKİLER**

BAŞLIK	Sayfa No
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER	v
TABLolar	vi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Metotreksat	3
2.1.1. Metotreksat'ın Yapısı ve Farmakokinetiği	3
2.1.2. Metotreksat'ın Etki Mekanizması	5
2.1.3. Metotreksat'ın Yan Etkileri ve Toksikite Mekanizmaları	6
2.1.4. Metotreksat'ın Mukokutanöz Toksikitesi	8
2.1.5. Metotreksat Toksikitesi ve Oksidatif Stres İlişkisi	8
2.2. Kafeik Asit Fenetil Ester	9
2.2.1. CAPE'nin Fonksiyonel Özellikleri ve Antioksidan Etkisi	9
2.3. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen/Nitrojen Türleri ve Oksidatif Stres	11
2.4. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri	14
2.4.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	14
2.4.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	14
2.4.3. Nükleik Asitlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	15
2.5. Antioksidanlar	15
2.5.1. Nonenzimatik Antioksidanlar	16
2.5.2. Enzimatik Antioksidanlar	16
2.5.2.1. Glutasyon Peroksidaz	16
2.5.2.2. Katalaz (CAT)	17
2.5.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)	17
3. MATERYAL ve METOD	18

3.1. Materyal	18
3.1.1. Deney Hayvanları	18
3.1.2. Deneyde Kullanılan Cihazlar	18
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
3.2. Metod	19
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması	19
3.2.2. Doku Örneklerinin Alınması	20
3.2.3. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney için Hazırlanması	20
3.2.3.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler	20
3.2.3.2. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması	21
3.2.4. Dokularda Biyokimyasal Analizler	21
3.3. İstatistiksel Analiz	21
4. BULGULAR	23
4.1. Biyokimyasal Parametreler	23
4.1.1. Gruplarda SOD Aktivitesi	24
4.1.2. Gruplarda CAT Aktivitesi	25
4.1.3. Gruplarda MDA Seviyeleri	26
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	27
6. ÖZET	33
7. SUMMARY	34
8. KAYNAKLAR	35

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

MTX	Metotreksat
CAPE	Kafeik asit fenetil ester
SOR	Serbest oksijen radikalleri
GFR	Glomerüler filtrasyon oranı
DHF	Dihidrofolat
THF	Tetrahidrofolat
GAR transformilaz	Glisinamid ribonükleotid transformilaz
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid
ADA	Adenozin deaminaz
SAH	S-adenozil homosistein
MDA	Malondialdehit
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
NO	Nitrik oksit
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit anyon radikali
ROS	Reaktif oksijen ürünü
OH	Hidroksil iyonu
RO <sub>2</sub>	Peroksil
HRO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hidroperoksil
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
PAYA	Poliansatüre yağ asitleri
XO	Ksantin oksidaz
i.p.	İntraperitoneal
A.D.	Anlamlı değil
SF	Serum fizyolojik

**ŞEKİLLER**

- Şekil 1:** Metotreksat'ın moleküler yapısı
- Şekil 2:** Dihidrofolatın moleküler yapısı
- Şekil 3:** Folik asitin moleküler yapısı
- Şekil 4:** Oksidatif Stres
- Şekil 5:** Kontrol, MTX ve MTX+CAPE gruplarında SOD aktivitesi
- Şekil 6:** Kontrol, MTX ve MTX+CAPE gruplarında CAT aktivitesi
- Şekil 7:** Kontrol, MTX, MTX+CAPE gruplarında MDA miktarları

## TABLÖLAR

- Tablo 1:** Deneyde kullanılan cihazlar
- Tablo 2:** Deney gruplarına yapılan enjeksiyonlar
- Tablo 3:** Rat deri dokusunda ölçülen SOD, CAT enzim aktiviteleri ve MDA seviyeleri



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Metotreksat (MTX) kan ve solid organ malignensilerinde, dermatolojik ve romatolojik hastalıklarda, ektopik gebelik sonlandırılmasında yaygın bir şekilde kullanılan folat analogu olan bir antimetabolit ajandır (1). Dermatolojide ise sistemik kortikosteroidlerden sonra en yaygın olarak kullanılan oral immünosüpresif ilaçtır. Dermatolojik kullanım endikasyonları içerisinde psoriasis, kutanöz T hücreli lenfomalar, kollajen vasküler hastalıklar, büllü hastalıklar, vaskülitler, atopik dermatit bulunmaktadır (2).

MTX folatı çoklu intraselüler mekanizmalarla antagonize eder (1). Dihidrofolat redüktaz enziminin potent bir inhibitörüdür, ayrıca timidilat sentaz enzimini de inhibe ettiği bilinmektedir (3). Bu multipl mekanizmalar aracılığıyla, DNA replikasyonu ve RNA sentezi için gerekli de novo nükleotid oluşturulmasının çok büyük öneme sahip olduğu hızlı çoğalan hücreler (malignensiler, gastrointestinal mukoza, kemik iliği, deri) etkilenmiş olur (1). MTX'in yan etkileri arasında hepatotoksisite, lökopeni, trombositopeni, megaloblastik anemi, pansitopeni, akut pnömoni, yavaş ilerleyen pulmoner fibrozis, malignensi gelişimi (özellikle lenfoma), immünosüpresyona bağlı infeksiyonlar, kardiyovasküler hastalıklar ve teratojenite bulunmaktadır (2). Bunun yanı sıra hastaların önemli bir kısmında bulantı, kusma, abdominal rahatsızlık-ağrı, dispepsi, diyare gibi gastrointestinal toksisite ile ilgili yan etkiler de görülür (4). MTX ayrıca mukokutanöz toksisite de oluşturabilen bir ajandır. Mukokutanöz yan etkileri arasında en iyi bilinen ve ciddi olanı mukozit olup tedavide doz azaltılması veya tedavinin kesilmesini gerektirebilir. Diğer yan etkileri arasında kutanöz ülserasyonlar, fotosensitivite, diffüz noninflamatuvar alopesi, ilaç hipersensitivite reaksiyonları (toksik epidermal nekroliz gibi) ve radyasyon geri çağırma reaksiyonları görülebilir (2).

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), oksidatif stres ile ilişkili araştırmalarda son zamanlarda çok yaygın olarak kullanılan bir maddedir. CAPE, bal arısı propolisinin major bir komponenti olup antioksidan etkisinin yanı sıra antiinflamatuvar, antikarsinojenik ve nöroprotektif etkileri de bulunmaktadır (5). Daha önce çeşitli deneysel hayvan modellerinde değişik organlarda MTX'in oksidatif stres markırları

ile ilişkisi gösterilmiştir (5-9). MTX'in deride serbest oksijen radikalleri (SOR) ile ilişkisi ise in vitro hücre kültürü ortamında yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (10). MTX verilmesi sonucunda deride oluşabilecek bir oksidatif hasarlanmanın in vivo olarak gösterilmesi ilerisi açısından SOR'ların, MTX'in deride oluşturduğu doz kısıtlayıcı lezyonlarla ilişkisinin ortaya konmasına ve antioksidanların klinikte kullanımına fayda sağlayabilecektir. Bu çalışmada; ratlarda deneysel olarak MTX'in verilmesi sonucunda deride oksidatif hasara neden olup olmadığı ve böyle bir ilişki varsa bunun önlenmesinde antioksidan etkinliği bilinen CAPE'nin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

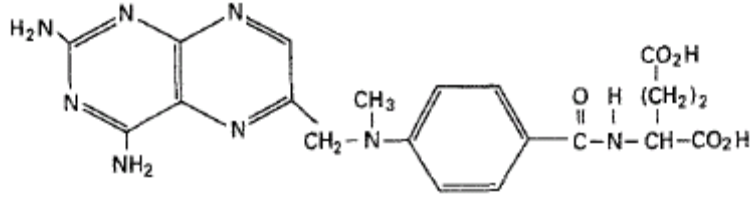
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Metotreksat

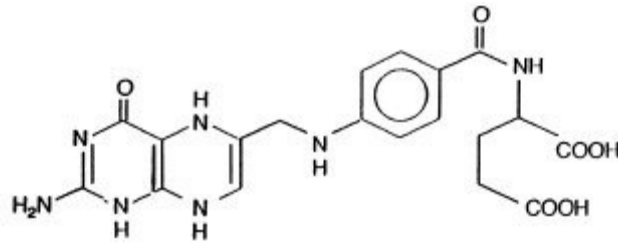
MTX, kan ve solid organ malignansilerinde, dermatolojik ve romatolojik hastalıklarda, ektopik gebelik sonlandırılmasında yaygın bir şekilde kullanılan folat analogu olan bir antimetabolit ajandır (1).

#### 2.1.1 Metotreksat'ın Yapısı ve Farmakokinetiği

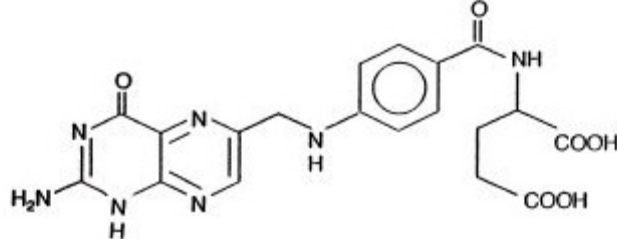
MTX (4-amino-N<sup>10</sup> metil pterogliglutamik asit) bir folik asit analogu olup, yapısı folik asite benzer. MTX geri dönüşümsüz ve yarışmacı olarak dihidrofolat redüktazı inhibe eder (2).



Şekil 1: Metotreksat'ın moleküler yapısı (11).



Şekil 2: Dihidrofolatın moleküler yapısı (12).



**Şekil 3:** Folik asitin moleküler yapısı (12).

MTX oral, intravenöz, intramüsküler, subkutanöz ve intratekal yolla verilebilir. Kötü perkutanöz emilim nedeni ile topikal kullanımı önerilmez. İntramüsküler ve subkutan biyoyararlanımı çok yüksektir. Biyoyararlanımı oral yolla %35, intramüsküler olarak %93 olarak bildirilmektedir (13). Düşük dozlarda (7.5 mg/hafta) oral biyoyararlanımı parenteral yola yakındır; ancak artan dozlarda (15mg veya üstü) absorpsiyon %30'a varan oranlarda azalmaktadır. Çoğu araştırmada erişkinlerde MTX absorpsiyonunun yiyeceklerden etkilenmediği gösterilmiştir, ancak bir raporda yiyeceklerle birlikte alındığında serum MTX konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bildirilmiştir (2). Kalsiyum içeren süt ve süt ürünleri ile beraber alındığında biyoyararlanımı azalır (13).

Absorpsiyondan sonra MTX'in %10'u karaciğerde 7-hidroksimetotreksata metabolize edilir (14). Dolaşımında MTX ve onun aktif metaboliti olan 7-hidroksimetotreksat sırasıyla %35-50 ve %90-95 oranlarında proteine bağlanır. Bu nedenle MTX'i albüminden ayırabilecek bazı ilaçlar (salisilatlar, probenesid, barbitüratlar, sülfonamidler, tetrasiklin, kloramfenikol ve sülfonilüreler) MTX'in etkinliği ve toksisitesini artırabilir (2).

MTX'in alımından sonraki ilk 12-24 saatte MTX ve 7-hidroksimetotreksat hücreler tarafından hızlı bir şekilde aktif transportla alınır. Hepatik hücreler, myeloid prekürsör hücreler, eritrositler ve fibroblastların bu ilaca karşı özellikle afinitesi mevcuttur. Hücrede MTX poliglutamine formuna dönüştürülür ki bu predominant aktif form, ilacın etkisinin uzun süreli olmasını ve haftalık olarak uygulanabilirliğini sağlar (2).

MTX'in temel atılımı büyük oranda değişmeksizin idrar yoluyla (% 80) olur (13). MTX'in serum yarı ömrü 6-8 saattir (2). Glomerüler filtrasyon veya tübüler sekresyondaki azalmalar MTX toksisitesine yol açabilir (15). Dolayısıyla böbrek yetmezliği olanlarda ve yaşlılarda glomerüler filtrasyon oranına (GFR) göre doz ayarlaması yapılmalıdır. GFR'yi azaltan salisilatlar ve nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar potansiyel olarak MTX toksisitesini arttırabilirler. Yine tübüler sekresyona zarar veren salisilatlar, sülfonamidler, probenesid, ve kolşisin de aynı etkiyi oluşturabilir (2).

### **2.1.2. Metotreksat'ın Etki Mekanizması**

Günümüzde MTX aktivitesi ile ilgili değişik farmakolojik mekanizmalar öne sürülmektedir. Bunlar; pürin ve pirimidin sentezi inhibisyonu, poliamin birikimi ile birlikte transmetilasyon reaksiyonlarının baskılanması, antijen bağımlı T-hücre proliferasyonunun azaltılması ve inflamasyonun adenzin aracılı süpresyonu ile birlikte adenzin salınımının arttırılması mekanizmalarıdır. Muhtemelen tüm bu mekanizmaların kombinasyonları MTX'in etkilerinden sorumludur (14).

MTX, DNA ve RNA sentezi için gerekli olan folat bağımlı çeşitli enzimleri potent olarak bloke edebilen bir folik asit analogudur. Bu enzimlerden dihidrofolat redüktazı geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Dihidrofolat redüktaz enzimi dihidrofolatın (DHF) tetrahidrofolata (THF) dönüşümünü sağlar. THF ise pirimidin ve pürin nükleotidleri sentezinde çeşitli anahtar enzimlerin kofaktörü olarak görev alır. THF'nin kofaktörü olduğu enzimler timidilat sentetaz, glisinamid ribonükleotid transformilaz (GAR transformilaz), 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid transformilaz (AICAR transformilaz), metionin sentaz olup bu enzimler de novo pürin ve pirimidin sentezi ile DNA metilasyonunda görevlidirler. Tüm bu etkilerinden dolayı MTX'in etkileri S-fazına spesifik olup, tümöral, hemopoietik, mukozal ve diğer hızlı çoğalan hücrelerin bölünmesini inhibe eder (2).

MTX'in antineoplastik etkisinin mekanizması folik asit yolunun inhibisyonu ile açıklanabilmektedir. Ancak aynı mekanizma MTX'in inflamatuvar hastalıklardaki etkisini yeterli şekilde açıklayamaz. MTX'in antiinflamatuvar etkilerinin primer olarak lenfosit proliferasyonunun inhibisyonu aracılığıyla meydana geldiği öne

sürülmektedir (2). Son çalışmalarda ise inflamasyonu baskılamada MTX'in daha direk bir rolü olduğu ve bunun da adenozin üzerindeki etkilerinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (16, 17). MTX'in direk veya dolaylı olarak AICAR transformilaz ve metionin sentazı inhibe etmesiyle intraselüler olarak AICAR (5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid) ve homosistein birikir ve bunlar da adenozin salınımına neden olur. Bu durumda cAMP'de artış sonucu anti-inflamatuar ve immünosüpresif etkiler oluşur. Fibroblast ve endotelial hücrelerden ekstraselüler olarak salgılanan adenozin, nötrofil bağlanmasını ve nötrofil aracılı doku hasarını azaltır; interlökin, TNF ve interferon sekresyonunu baskılar (4).

MTX'in olası hedeflerinden biri de immün sistemdir. Keratinositlerde apoptoz indüksiyonu yapar, epidermal hücre kinetiklerini değiştirir. Nötrofil ve monosit kemotaksisini ve bazofillerden histamin salınımını inhibe eder (13). MTX'in aktive olmuş, çoğalan CD4+ T hücrelerinin apoptozunu dinlenmekte olan T hücrelere oranla 6 kat daha yüksek oranda indüklediği gösterilmiştir (2).

### 2.1.3. Metotreksat'ın Yan Etkileri ve Toksikite Mekanizmaları

MTX'in yan etkileri genellikle önemsiz olmakla birlikte yaşamı tehdit edici boyut da kazanabilir (13). Uzun dönem düşük dozda MTX tedavisi alan hastalarda % 30 ile % 80 arasında yan etki insidansı bulunmakta, % 5-35 oranında bu yan etkiler nedeni ile tedavi bırakılmaktadır (4) Yan etkiler içerisinde en yaygın olarak görülenler bulantı, iştahsızlık ve halsizliktir (2). MTX'in gastrointestinal yan etkileri arasında kusma, diyare, abdominal ağrı, dispepsi ve gastrik ülser de görülür (4). Hepatik yan etkileri arasında transaminaz yüksekliği, hepatit, fibrozis ve siroz; hematopoyetik yan etkileri arasında lökopeni, trombositopeni, anemi ve pansitopeni; renal yan etkileri arasında üremi, hematüri ve renal hasar; pulmoner yan etkileri arasında idiyosinkratik olarak oluşan akut pnömonit ve yavaş ilerleyen pulmoner fibrozis bulunmaktadır (2). İmmünosüpresyon nedeniyle çeşitli enfeksiyonlar ve *Pneumocystis carini* pnömonisi görülebilir (4). MTX'in karsinojenik, mutajenik ve teratojenik yan etkileri de bilinmektedir (15).

MTX ayrıca mukokutanöz toksisite de oluşturabilen bir ajandır. Mukokutanöz yan etkileri arasında en iyi bilinen ve ciddi olanı mukozit olup tedavide doz

azaltılması veya tedavinin kesilmesini gerektirebilir. Bunun dışında kutanöz ülserasyonlar, fotosensitivite, diffüz noninflamatuvar alopesi, ilaç hipersensitivite reaksiyonları (toksik epidermal nekroliz gibi) ve radyasyon geri çağırma reaksiyonları görülebilir (2). Lawrence ve Dahl, MTX kullanan psoriazisli hastalarda 2 paternde deri ülserasyonları tanımlamıştır. Bunlardan Tip I ülserasyon MTX başladıktan sonra psoriatik plakların ağırlı hale gelip daha sonra erode olması şeklinde görülür. Tip II ülserasyonlar ise klinik olarak tutulmamış ancak başka bir patoloji (örn: staz dermatiti-skar) bulunan deri bölgelerinde gözlenir (18, 19). Özellikle bacaklarda gelişen deri ülserasyonları kemik iliği toksisitesinin habercisidir. Psoriazis için MTX tedavisi alan hastalarda psoriatik plaklar üzerinde gelişen ülserasyonlar da toksisite göstergelerindedir (15). Deri ülserasyonları psoriatik hastalar dışında da bildirilmiştir (20-22). Ayrıca akral eritem ve vaskülit de MTX'in yan etkileri arasında bulunmaktadır (15).

MTX toksisitesinin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak bazı yan etkiler pürin, adenzin, folat metabolizması ile homosistein-metionin-poliamin yolu gibi metabolik yolların bozulmasına bağlanmaktadır (11). Kremer ve arkadaşları ilk kez romatoid artritli hastaların karaciğer dokusunda MTX'in daha çok poliglutamat formunda bulunduğunu ve hepatik folat depolarında azalmanın da buna eşlik ettiğini göstermiştir (23). Değişik yollarda adenzin deaminazın (ADA) MTX tarafından inhibisyonu, deoksiadenozin ve deoksiadenozin trifosfat (dATP) gibi adenzin metabolitlerinin birikimine yol açar. Muhtemelen adenzin, deoksiadenozin ve metilli adenzin metabolitleri yüksek konsantrasyonlarda doğrudan toksik etkilidirler. Deoksiadenozin kromozom kırıklarına yol açar ve transmetilasyon reaksiyonları için gerekli olan S-adenozil homosistein (SAH) hidrolaz enzimini inaktive eder. dATP ise DNA sentezi için gerekli olan ribonükleotid redüktazı inhibe eder (11). Baggott ve arkadaşları da MTX tedavisi ile ADA inhibisyonu geliştiğini destekleyen veriler elde etmişlerdir (24). MTX'in vasküler hastalık için risk faktörü olarak bilinen hiperhomosisteinemiye sebep olduğu bilinmektedir. MTX ayrıca metilasyon reaksiyonlarının belirleyicisi olan S-adenozil metionin (SAM)/ S-adenozil homosistein (SAH) oranında azalmaya neden olur. Metilasyon reaksiyonlarının inhibisyonu toksisiteye neden olabilir (11).

#### 2.1.4. Metotreksat'ın Mukokutanöz Toksisitesi

MTX tedavisi sırasında hiç de nadir olmayarak ortaya çıkan ağrılı oral ülserasyon-stomatit gibi yan etkiler, çoğu yayında ilaç toksisitesi ile ilişkilendirilmiştir. Düşük doz MTX tedavisi ile ilişkili oral yan etkileri araştıran 18 ayrı çalışmanın sonuçları karşılaştırılmış ve ortalama %14 oranında oral ülserasyon geliştiği saptanmıştır. Stomatitin gelişme mekanizması deneysel olarak gösterilmemiştir; ancak doza bağımlı bir etki olduğu düşünülmektedir (4). MTX ayrıca tükürükte de salgılanmakta olup, stomatit gelişmesinde ilacın topikal etkisinin rol oynayabileceği de öne sürülmektedir (25).

MTX'in indüklediği epitelyum toksisitesinin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (10). Bazı vaka yayınlarında MTX'in neden olduğu kutanöz yan etkilerin genellikle doza bağımlı olduğu, direkt toksik etki veya ilacın antiproliferatif etkileri sonucu ortaya çıktığı öne sürülmüştür (19, 21, 22, 26). Maiguma ve arkadaşları, normal insan epidermal keratinosit hücre serilerinde MTX ve 5-Flourourasil'in indüklediği sitotoksisiteyi araştıran çalışmalarında, MTX ile indüklenen toksisitenin oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri (ROS) ile yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir. MTX'in spesifik olarak normal insan epidermal keratinositlerinde (in vitro hücre kültürü ortamında) intraselüler süperoksit radikallerinin aktivasyonu aracılığı ile sitotoksisiteye neden olduğunu ortaya koymuşlardır. MTX'in ayrıca insan epidermal keratinosit hücrelerinin yaşayabilirliğini azalttığını göstermişlerdir (10). Yapılan başka bir in vitro çalışmada insan epidermal keratinosit hasarının yüksek MTX konsantrasyonundan ziyade MTX maruziyetinin süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (27).

#### 2.1.5. Metotreksat Toksisitesi ve Oksidatif Stres İlişkisi

Antikanser ilaçlarla ilgili son zamanlardaki toksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerinde durulmaktadır. MTX'in karaciğer, böbrek, ince barsak ve santral sinir sistemindeki yan etkilerinin mekanizması olarak 'oksidatif stres' ön plana çıkmaktadır (6, 7, 8, 9, 28). Çetinkaya ve arkadaşları, MTX uygulanan ratların karaciğer dokusunda glutatyon seviyeleri ile süperoksit dismutaz ve katalaz



aktivitelerinde azalma; malondialdehit düzeyleri ile myeloperoksidaz aktivitesinde ise artış saptamışlardır. Sonuç olarak MTX'in karaciğerde oksidatif hasara neden olduğunu öne sürmüşlerdir (6). Jahovic ve arkadaşları, MTX uygulanan ratların kan, karaciğer ve böbrek dokularında myeloperoksidaz düzeylerinde artış, glutatyon düzeylerinde azalma ve malondialdehit düzeylerinde belirgin artış saptamışlardır. MTX'in hepatorenal oksidatif hasara neden olduğu sonucuna varmışlardır (7). Babiak ve arkadaşları, MTX'e maruz bırakılan HeLa hücrelerinde pentoz yolu enzimleri ve reaktif oksijen türlerine karşı gelişmiş defans mekanizmaları enzimlerini çalışmışlar; bu çalışmada MTX'in HeLa hücrelerinde vücudun önemli antioksidanı olan glutatyon seviyelerini azalttığını göstermişlerdir (28). Çıralık ve arkadaşları MTX'in ratların ince barsak epitelinde oksidatif stresi arttırıcı etkisi olduğunu saptamışlardır (9). Uzar ve arkadaşları, MTX verilen ratların serebellum dokularında kontrol gruba göre anlamlı derecede yükselmiş malondialdehit, süperoksit dismutaz ve katalaz düzeyleri saptamışlardır (8). Vardi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada rat testisinde MTX ile indüklenen toksisite ve depresyonun patogenezinde oksidatif hasarın rolü olabileceğini öne sürmüşlerdir (29).

## **2.2. Kafeik Asit Fenetil Ester**

CAPE çeşitli bitkilerden elde edilmiş polifenolik bir bileşiktir. Arı propolisinde bulunan biyoaktif bir komponent olup farmakolojik uygulamaları olabilmektedir (30). Geleneksel tıpta yıllardır kullanılmaktadır ve normal hücreler üzerinde bilinen zararlı bir etkisi bulunmamaktadır (31). Hücre membranlarından geçerek kolaylıkla hücrelerin içine girebilen bir maddedir (32). Antiinflamatuvar, antioksidan, immünmodülatör, antimitojenik, antikarsinojenik, antiklastojenik (kromozom yapısını bozucu etkileri önleyici) olmak üzere çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahiptir (31, 33).

### **2.2.1. CAPE'nin Fonksiyonel Özellikleri ve Antioksidan Etkisi**

CAPE birçok hastalığın önlenmesinde potansiyel terapötik özellikler gösteren bir bileşiktir (34). CAPE malign hücrelerin apoptozunu indükler; transforme malign

hücrelerde redoks dengesini değiştirerek ya da matriks metalloproteinazlarının (MMP-2, MMP-9) anjiogenik enzim aktivitesini baskılayarak tümör gelişimini inhibe eder. CAPE'nin aynı zamanda HIV integras enziminin potent bir inhibitörü olduğu saptanmıştır (30). CAPE ile ilgili bazı çalışmalar, siklooksijenaz (COX) enzim aktivitesinin inhibisyonu veya COX gen ekspresyonunun down-regülasyonu aracılığı ile prostaglandin ve lökotrien sentezini bloke ettiğini ifade etmişlerdir (35, 36). Diğer bazı çalışmalarda, CAPE'nin nükleer faktör kappa B (NF-κB) inhibisyonu, aktive T hücrelerinin nükleer faktörünün down-regülasyonu ve gastrik epitelyal hücrelerde *Helicobacter pylori*'nin indüklediği aktivatör protein-1 (AP-1) baskılanması gibi transkripsiyonel faktörlerin değiştirilmesi suretiyle antiinflamatuvar etkiler gösterdiği ortaya konmuştur (37-39). CAPE'nin ayrıca mikromolar konsantrasyon aralığında 5-lipoksijenaz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir (40).

CAPE hayvan modellerinde oluşturulan çeşitli oksidatif stres çalışmalarında antioksidan olarak sıklıkla kullanılan bir maddedir (32). CAPE'nin 10 µM konsantrasyonda insan nötrofilleri ve ksantin/ksantin oksidaz sisteminde ROS üretimini tamamen bloke ettiği bilinmektedir (40). Son dönemde yapılan bir çalışmada; genç, yaşlı ve antioksidan (CAPE /melatonin) verilen yaşlı ratların beyin ve serebellum dokularında pro-oksidan durum glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) seviyeleri çalışılarak ortaya konmuş ve CAPE'nin sinir sisteminde yaş ile ilişkili hücre hasarını geciktirici etkileri olduğu öne sürülmüştür (41). Koyu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; CAPE'nin rat karaciğerinde 900 MHz elektromanyetik alanın indüklediği ROS'u azaltıp, antioksidan enzim aktivitesini arttırarak koruyucu etkisi olduğu öne sürülmüştür (42). Kart ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, torsiyon ile iskemi/reperfüzyon modeli oluşturulan tavşan overlerinde CAPE'nin iskemi/reperfüzyon ile indüklenen oksidatif hasarı önleyici etkisi olduğu ortaya konmuştur (43). Benzer sonuçlar başka bir çalışmada, intestinal iskemi/reperfüzyon hasarı modelinde de gözlenmiştir (32). Albukhari ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, dişi ratlarda tamoxifen ile oluşturulan hepatotoksisite modelinde CAPE'nin koruyucu etkileri olduğu öne sürülmüştür (44). Armağan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, rat testislerinde MTX'in tek başına oksidatif stresi arttırdığı ve beraberinde CAPE verilmesi durumunda CAPE'nin oksidatif

stresten koruyucu etkisi olduğu öne sürülmüştür (31). Serarşlan ve arkadaşlarının ratlarda yara iyileşmesi modeli oluşturularak yaptıkları çalışmada, ratların derilerinde tam kat insizyon yapıp sütün atılmış ve ratlar 2 gruba ayrılmıştır. Tedavi grubuna CAPE ve kontrol grubuna ise salin verilmiştir. İnsizyonun 1, 3, 7 ve 14. günlerinde her gruptan 5'er hayvan sakrifiye edilerek doku düzeyinde MDA, nitrik oksit (NO), GSH, SOD ve CAT aktivitelere bakılmıştır. GSH düzeyleri insizyonun özellikle 7. gününden itibaren CAPE grubunda kontrol gruba oranla yüksek seyretmiştir. MDA seviyeleri CAPE verilen grupta kontrol gruba göre daha düşük olarak saptanmıştır. CAPE grubunda doku NO düzeylerinde özellikle 3. günden sonra kontrol gruba oranla anlamlı yükseklik gözlenmiştir. SOD aktiviteleri CAPE grubunda kontrole göre daha düşük olarak belirlenmiştir. CAT aktivitelerinde ise 2 grup arasında fark görülmemiştir. Histopatolojik bulgular sonucunda CAPE ile tedavi edilen grupta daha hızlı epitelyum gelişimi saptanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, CAPE'nin yara iyileşmesini arttırdığı ve bu etkinin multipl antiinflamatuvar özelliklerinin yanı sıra antioksidan ve ROS'u temizleyici etkisi aracılığıyla olabileceği öne sürülmüştür (45).

### **2.3. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen/Nitrojen Türleri ve Oksidatif Stres**

Serbest radikaller atomik veya moleküler yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküllerdir. Bu eşlenmemiş elektronlar serbest radikale oldukça önemli oranda reaktivite kazandırır (46). Böylece fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar esnasında başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozabilirler (47).

Serbest radikaller hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Eksojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasallar, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunmaktadır (48). Hücrelerde ayrıca bir çok endojen radikal üretim kaynağı mevcuttur. Bunlar mitokondrial ve mikrozomal elektron transport zinciri,

aktive fagositler, iskemi reperfüzyon durumları (bazı damar tıkanma tipleri, mikrosirkülasyon kaybı, bütün hipoksi halleri, şok, organ transplantasyonu, cerrahi müdahale bölgesindeki kansızlık ve damarların klemplenmesi), araşidonik asit kaskadının aktivasyonu, endojenöz bileşiklerin oksidasyonu, sitokrom P 450, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz gibi enzimlerin katalizlediği reaksiyonlardır (49). Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötr olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (50).

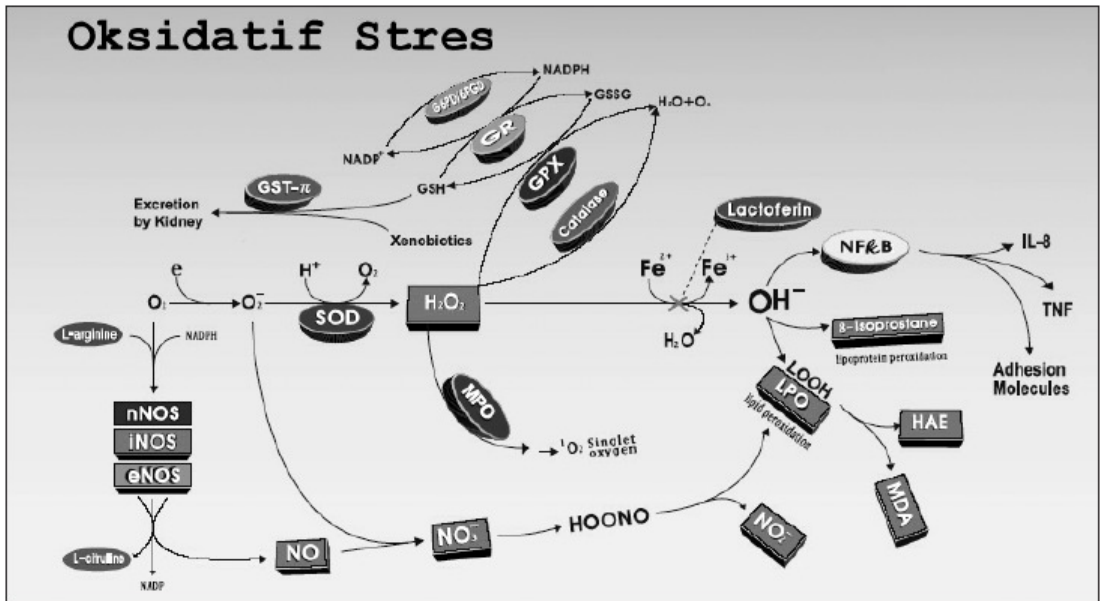
Eşlenmemiş elektron biyolojik önemi olan birçok atomda bulunabilir ve sülfür, karbon, hidrojen veya nitrojen kaynaklı radikaller oluşabilir (49). Canlı sistemlerde oluşan radikal türlerinin içerisinde oksijenden kaynaklanan radikaller en önemli grubu oluşturmaktadır. Moleküler oksijen (dioksijen) benzersiz bir elektronik konfigürasyona sahiptir ve kendisi bir radikaldir. Dioksijen formlarına bir elektron ilavesi ile süperoksit anyon radikali meydana gelir. Metabolik işlemlerden veya fiziksel irradyasyon tarafından oluşturulan oksijen aktivasyonundan kaynaklanan süperoksit anyonu 'primer' ROS olarak tanımlanır. Eğer süperoksit anyonu direkt veya enzim/metallerin katalizlediği reaksiyonlar aracılığı ile başka diğer moleküllerle daha ileri etkileşime girerse 'sekonder' ROS oluşur (46).

ROS; süperoksit ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), hidroksil ( $\bullet\text{OH}$ ), peroksil ( $\bullet\text{RO}_2$ ) hidroperoksil ( $\bullet\text{HRO}_2^-$ ) gibi serbest radikaller ve hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve hidrolorus asid ( $\text{HOCl}$ ) gibi nonradikal türlerden oluşur. Reaktif nitrojen türleri ise nitrik oksit ( $\bullet\text{NO}$ ) ve nitrojen dioksit ( $\bullet\text{NO}_2^-$ ) gibi serbest radikaller ile peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), nitrozoksit ( $\text{HNO}_2$ ) ve alkil peroksinitratlar ( $\text{RONOO}$ ) gibi nonradikal türlerden oluşurlar (51, 52).

İnsanlarda en yaygın üretilen serbest radikal süperoksit olup bir kez oluştuğunda diğer radikalleri oluşturan hızlı gerçekleşen reaksiyonlar kaskadını tetikler (53). Süperoksit bakırlı bir enzim olan SOD aracılığıyla hidrojen peroksit ve oksijene çevrilir. Hidrojen peroksit ise dokularda bulunan CAT, peroksidaz ve glutasyon peroksidaz ( $\text{GSH Px}$ ) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır (48). Aslında moleküler oksijenin redüksiyonu esnasındaki ara basamaklarda üretilen bu reaktif oksijen türleri (süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve moleküler oksijen); düşük düzeylerde hücre

proliferasyonu, apoptozis, immün yanıtlar ve hücre farklılaşması gibi çeşitli hücrel işlemlerde görev almaktadır (54, 55) (Şekil 4).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur (48). Potansiyel biyolojik hasara neden olan serbest radikallerin zararlı etkileri 'oksidatif stres' ve 'nitrozatif stres' olarak adlandırılır. Oksidatif stres canlı organizmalarda oksijeni kullanan ve prooksidan/antioksidan durum dengesini bozan reaksiyonlar sonucu oluşur (46). ROS'un fazlalığı hücrel lipidler, proteinler ve DNA'da hasara neden olup hücrenin normal fonksiyonlarını inhibe eder (46, 56, 57). Bu nedenle oksidatif stres birçok hastalık ve yaşlanma süreci ile ilişkilendirilmektedir (46, 58). Ayrıca deride de eritem, ödem, kırıışıklanma, fotoyaşlanma, inflamasyon, otoimmün reaksiyonlar, hipersensitivite, keratinizasyon anormallikleri, preneoplastik lezyonlar ve deri kanseri gibi bazı hastalıkların oluşumuna katkıda bulunmakta veya indüklemektedir (54). Dolayısıyla hücrel redoks ortamı deri homeostasında kilit role sahiptir (59). Deride oksidatif strese neden olan ajanlar içerisinde endüstriyel kaynaklı gazlar, çevre kirlenmeler, UV radyasyonu, yiyecek katkıları ve koruyucuları, kozmetik ürünler ve ilaçlar bulunmaktadır (60).



Şekil 4: Oksidatif Stres (www.woongbee.com)

## 2.4. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

### 2.4.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Oksijen radikalleri poliansatüre yağ asitlerine (PAYA) etki ederek lipid peroksidasyonuna yol açar. Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin, PAYA'nın metilenik karbonlarından hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atakla başlar. Hidrojen atomunun zincirden çıkarılması karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir elektron bıraktığından karbon merkezli bir radikal oluşur. Bu radikal sıklıkla konjuge dien şekline çevrilir ve sonra moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksi radikali ( $LOO^-$ ) oluşur. Bir peroksi radikali diğer bir peroksi radikali ile birleşebilir veya membran proteinleri ile etkileşebilir. Membrandaki komşu yan zincirlerden H atomlarını çıkararak peroksidatif zincir reaksiyonunu yayabilir (49). Devam eden zincirleme reaksiyonlar sonucu MDA'nın prekürsörleri olan endoperoksitlere ve daha sonra peroksidasyon işleminin son ürünü olan MDA'ya dönüşürler. Lipid peroksidasyonunun MDA dışındaki diğer major aldehit ürünü 4-hidroksi-2-noneal (HNE) dir (46). Lipid peroksidasyonunun oksidatif stresin en önemli göstergesi olduğu düşünülmektedir, MDA'nın da lipid peroksidasyonunun spesifik bir belirteci olduğu kabul edilmektedir (61). Membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu membran akışkanlığında değişime yol açar ve permeabilite özellikleri değişir. Örneğin hücre içine anormal kalsiyum girişine yol açarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve oksidasyonla fosforilasyonun ayrılmasına neden olur (49).

### 2.4.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Serbest radikal atağı sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılabilir. Bunlardan birincisi aminoasit modifikasyonu, ikincisi proteinlerin fragmentasyonu, üçüncüsü ise proteinlerin agregasyonu ve çapraz bağlanmalardır. Özellikle aromatik aminoasitler ve sülfürlü aminoasitler oksidatif ataklara karşı çok hassastırlar. Radikaller membran proteinleri ile reaksiyona girebilir, enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarını bozabilirler. Sonuçta

membran iyon ve metabolit transportunda bozulma ile kontraktıl fonksiyonlarda bozulma oluşur (49).

### **2.4.3. Nükleik Asitlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler**

DNA molekülleri nükleusta bulunup sıkı heliks yapısında düzenlendiği için serbest radikallerle temasa bağlı değişimler daha azdır. Ayrıca DNA molekülünün çoğu histonlarla korunmaktadır. Ancak yine de DNA peroksidasyonu iyonizan radyasyona bağlı oluşabilir. Başta pirimidinler (timin) olmak üzere, pürinler ve deoksiriboz peroksidasyona hassastır. Peroksidasyon DNA zincirlerinin kopmasına neden olabilir. DNA çift sarmalı ayrılması kromozomal delesyona veya anormal gen ifadesine sebep olarak hücre ölümüne yol açabilir. DNA hasarı ise mutasyonlara ve karsinogeneze neden olabilir (49).

### **2.5. Antioksidanlar**

ROS oluşumu ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek için vücut birçok savunma sistemi geliştirmiştir. Bunlar antioksidanlar olarak bilinirler (47, 50). Antioksidanlar peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya ROS'u toplayarak hücre yapı taşlarının peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın oluşumunu önleyenler ve mevcut olanı etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzimatik ve enzimatik olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar (47).

Antioksidanlar etki mekanizmalarını serbest radikalleri tutarak veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek, serbest radikalle etkileşip aktivitelerini azaltarak, serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak ya da onarım yaparak gösterirler (47).

### 2.5.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

Non enzimatik antioksidanlar içerisinde vitamin A, C, E, B1, B2, B6 ve B12, GSH,  $\alpha$ -lipoik asit, karotenoidler, eser elementlerden bakır, çinko ve selenyum, koenzim Q 10, folik asit, ürik asit ve albümin gibi kofaktörler bulunmaktadır. (51, 56) Tioller, izoflavonlar, polifenoller ve flavonoidler gibi fitokimyasallar ve erdostein de nonenzimatik antioksidanlar içinde sayılmaktadır (56, 62, 63). Ayrıca sistein, serüloplazmin, transferin ve albümin de enzimatik olmayan antioksidanlardır (47). Pineal bezin hormonu olan melatonin de çok güçlü ve etkili bir endojen radikal toplayıcısıdır (49).

### 2.5.2. Enzimatik Antioksidanlar

Başlıca antioksidan enzimler içerisinde GSH-Px, CAT ve SOD bulunmaktadır (64). Bu üç enzim hücrelerin yaşaması için gerekli enzimlerdir (65). Bunlar dışında glutatyon S-transferaz, glutatyon redüktaz ve sitokrom oksidaz da enzimatik antioksidanlardır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (50)

#### 2.5.2.1. Glutatyon Peroksidaz

Selenyum bağımlı GSH-Px hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin GSH tarafından indirgenmesini katalize eden birçok peroksidazdan biridir. Diyetteki selenyum desteği enzim aktivitesini modüle eder. Bu enzim sitozol veya mitokondride bulunabilir ve enzim aktivitesi pentoz fosfat şantında üretilen NADPH ile bağımlıdır. Düşük konsantrasyonda hidrojen peroksit öncelikle GSH-Px tarafından temizlenir. Hidrojen donörü olarak GSH (redükte glutatyon) kullanılır. Bu reaksiyon GSH'nın okside formu olan GSSG (okside glutatyon)'e dönüşmesine yol açar. Yeterli GSH düzeyleri glutatyon redüktaz tarafından sağlanır ve GSSG'den GSH üretilir (49).



### 2.5.2.2. Katalaz

CAT, SOD'un süperoksit ile reaksiyona girmesi sırasında oluşan  $H_2O_2$ 'yi su ve moleküler oksijene parçalayarak elimine etmektedir. CAT  $H_2O_2$ 'ye spesifik olup diğer organik peroksitlere etki etmez (47). CAT aerobik hücrelerin çoğunda bulunur ve HEM bulunduran bir enzimdir (49). GSH-Px ile aynı reaksiyonu gerçekleştirmesine rağmen GSH-Px sitozolde, CAT ise temel olarak peroksizomlarda etkindir (66).

### 2.5.2.3. Süperoksit Dismutaz

SOD oksidatif stresin anahtar bileşeni olan bir grup metalloenzimdir (49, 66). Endojen SOD enzimlerinin 3 major tipi bulunmaktadır. Cu,Zn-SOD (SOD 1) özellikle sitozolik ve lizozomal fraksiyonlarda bulunur. Mn-SOD (SOD 2) özellikle mitokondrial matrikste mevcuttur. SOD 3 ise ekstraselüler SOD olarak bilinir (66). SOD'un en önemli fonksiyonu süperoksitin hidrojen peroksit dismutasyonunu katalize etmektir. Bu reaksiyon genellikle vücudun primer antioksidan savunması olarak kabul edilir. Çünkü daha fazla serbest radikal oluşumunu önler (53). Oluşan hidrojen peroksit daha az oksidatif potansiyele sahiptir ve kolaylıkla hücre membranlarından geçer (66). Hidrojen CAT veya GSH-Px tarafından  $H_2O$  ve  $O_2$ 'e çevrilebilir ya da demirin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonu (Fenton reaksiyonu) ile hidroksil (OH) radikaline dönüştürülebilir (51, 66, 67).

### 3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Tıp Fakültesi Dermatoloji ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın işbirliği ile Tıbbi Biyoloji ve Deneysel Hayvanları Laboratuvarlarında yapılmıştır. SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1857-TU-09 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışma, deney hayvanlarının bilimsel amaçla kullanılabilmesi için SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulundan onay alınarak etik kurul kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Deneysel Hayvanları

Bu projede ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen, Wistar Albino cinsi 30 adet erkek rat kullanıldı. Deneyde kullanılan ratlar, SDÜ Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Ratlar çalışma süresince standart ısı (25<sup>0</sup>C) ve ışık (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık)'da tutuldu. Ratlara içme suyu ve standart rat pellet yemi serbest olarak verildi.

##### 3.1.2. Deneyde Kullanılan Cihazlar

Deneyde kullanılan cihazlar tablo 2'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** Deneyde kullanılan cihazlar

1	Soğutmalı santrifüj	Eppendorf MR 5415 (Almanya)
2	UV spektrofotometre	Shimadzu UV 1601 (Japonya)
3	Derin dondurucu	Facis (Fransa)
4	Vortex (karıştırıcı)	Nüve NM 100 (Türkiye)
5	Hassas terazi	Scaltec (İsviçre)
6	Otomatik pipetler	Eppendorf (Almanya)
7	Homojenizatör	Ultra Turrax T25 (Almanya)

### 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kafeik Asit Fenetil Ester Sigma, Folin & Ciocalteus's Phenol Reagent (2N), Sodyum Karbonat, Sodyum Hidroksit, Tri Sodyum Sitrat Dihidrat, Bakır Sülfat, Triklor Asetik Asit, Tiobarbiturik Asit, Ksantin, Ksantin Oksidaz, Etil Alkol, Sodyum EDTA, Amonyum Sulfat, Kloroform, Nitro Blue Tetrazolyum ve Fosfat tamponları kullanılmıştır.

## 3.2. Metod

### 3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Çalışmada ratlar rastgele 3 gruba ayrıldı: Grup1, Kontrol grubu (n=10); Grup 2, MTX grubu (n=10); Grup 3, MTX + CAPE grubu (n=10). Deney gruplarına yapılan enjeksiyonlar Tablo 1'de gösterildiği gibi düzenlendi.

Grup 1 (Kontrol grubu): 7 gün boyunca günde bir kez serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (i.p.) yoldan verildi.

Grup 2 ( MTX grubu): 7 gün boyunca günde bir kez SF i.p. yoldan verildi. 2. gün MTX (Ebewe Arzneimittel Ges. M.b.H Pharmaceutical Laboratories, Unterach, Australia) 20 mg/kg tek dozda i.p. olarak Miyazono (68), Çetiner (69) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara uygun şekilde enjekte edildi .

Grup 3 (MTX + CAPE grubu): Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya (70) uygun şekilde 7 gün boyunca günde bir kez 10 µmol/kg CAPE i.p. yoldan verildi ve 2. gün MTX (Ebewe Arzneimittel Ges. M.b.H Pharmaceutical Laboratories, Unterach, Australia) 20 mg/kg tek dozda i.p. olarak enjekte edildi (68, 69).

Bütün grupların enjeksiyonu i.p. yoldan aynı gün başlandı ve 7 gün boyunca yapıldı. Son enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Daha sonra deri dokuları alındı.

**Tablo 2.** Deney gruplarına yapılan enjeksiyonlar

<b>Günler</b>	<b>Grup 1 Kontrol</b>	<b>Grup 2 MTX</b>	<b>Grup 3 MTX+CAPE</b>
1. gün	SF	SF	CAPE
2. gün	SF	MTX	MTX+CAPE
3. gün	SF	SF	CAPE
4.gün	SF	SF	CAPE
5.gün	SF	SF	CAPE
6.gün	SF	SF	CAPE
7.gün	SF	SF	CAPE

### 3.2.2. Doku Örneklerinin Alınması

Ratlara, son enjeksiyondan 24 saat sonra (deneyin 8. günü) i.p. ketamin (Alfamin, Alfasan IBV) 80 mg/kg + ksilazin (Alfamin, Alfasan IBV) 10 mg/kg ile anestezi yapıldı. Ratların derileri Ayata (71) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer şekilde torakoabdominal bölgedeki derinin kılları kesilip temizlendikten sonra alındı. Alınan deri örnekleri kurutma kağıdında temizlendi ve analizin yapıldığı tarihe kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

### 3.2.3. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması

#### 3.2.3.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler

Deri dokusunun homojenizasyonunda pH: 7.4, 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı (72).

### **3.2.3.2. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması**

Deri dokusunun ağırlıkları yaş olarak tartıldı ve dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe kondu. Dokuların üzerine 2 ml Tris-HCl tamponu eklendi. Cam tüpteki dokular buz ile doldurulmuş plastik kapların içerisine yerleştirilerek 16000 devir/dakika hızda 3 dakika homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edilerek miktarları kaydedildi. Elde edilen homojenatlarda MDA seviyesi ve protein tayini yapıldı.

Homojenatlar, 5000 devir/dakika hızında 30 dakika süreyle +4 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant sağlandı. Ayrılan süpernatantlardan CAT enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile 3200 devir/dakika hızında 40 dakika süreyle +4 °C'de santrifüj edilerek ekstrakt hazırlandı. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzimi aktivite tayini yapıldı.

### **3.2.4. Dokularda Biyokimyasal Analizler**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında spektrofotometrik yöntemle MDA seviyesi ile CAT ve SOD enzim aktiviteleri ölçüldü.

MDA düzeyini tayin için Draper ve Hadley çift ısıtma yöntemi kullanıldı (73). SOD enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre (74), CAT enzim aktivitesi Aebi metoduna göre (75), çalışıldı. Protein tayini ise Lowry metoduna göre yapıldı (76).

### **3.3. İstatistiksel Analiz**

İstatistikler bilgisayar ortamında SPSS 9.0 programında yapıldı. Gruplarda yer alan sonuçların normal dağılıma sahip olup olmadıklarını belirlemek için non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Gruplar normal dağılım gösteriyordu. Grupların karşılaştırılmasında one-way ANOVA testi kullanıldı ve gruplar arası anlamlılık Post Hoc testlerden LSD (Least Significant

Difference) ile yapıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0.05$  olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Deney esnasında MTX grubunda, MTX enjeksiyonundan 48 saat sonra 2 rat öldü ve bu ratlara yapılan otopside belirgin bir organ hasarı veya kanama odağı saptanmadı.

### 4.1. Biyokimyasal parametreler

Kontrol grubunun ortalama SOD, CAT ve MDA değerleri sırasıyla  $0.729 \pm 0.042$ ,  $0.203 \pm 0.013$  ve  $46.93 \pm 4.65$  olarak bulundu. MTX grubunun ortalama SOD, CAT ve MDA değerleri sırasıyla  $0.636 \pm 0.045$ ,  $0.339 \pm 0.017$  ve  $54.01 \pm 8.44$  olarak saptandı. MTX+CAPE grubunun ise ortalama SOD, CAT ve MDA değerleri sırasıyla  $0.684 \pm 0.032$ ,  $0.290 \pm 0.011$  ve  $40.34 \pm 3.39$  olarak tespit edildi. Ortalama sonuçlar ve istatistiksel değerlendirmeler Tablo 3’de özetlenmiştir.

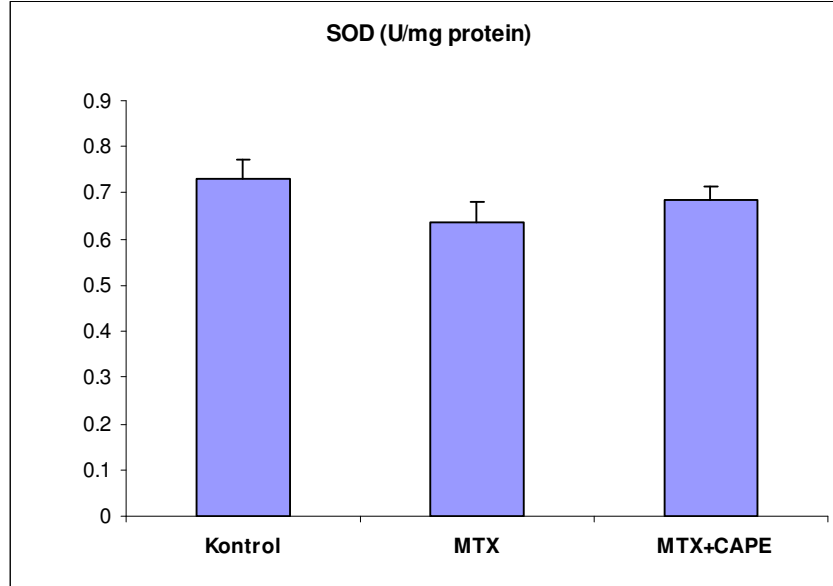
**Tablo 3:** Rat deri dokusunda ölçülen SOD, CAT enzim aktiviteleri ve MDA seviyeleri.

Gruplar	n	Süperoksit Dismutaz (U/mg protein)	Katalaz (k/g protein)	Malondialdehit (nmol/g protein)
<b>1- Kontrol</b>	10	$0.729 \pm 0.042$	$0.203 \pm 0.013$	$46.93 \pm 4.65$
<b>2- MTX</b>	8	$0.636 \pm 0.045$	$0.339 \pm 0.017$	$54.01 \pm 8.44$
<b>3- MTX+CAPE</b>	10	$0.684 \pm 0.032$	$0.290 \pm 0.011$	$40.34 \pm 3.39$
<i>P</i> -değerleri				
<b>1-2</b>		AD	0.0001	AD
<b>1-3</b>		AD	0.0001	AD
<b>2-3</b>		AD	0.021	AD

Not: n = rat sayısı. Veriler, ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. AD: anlamlı değil.

#### 4.1.1. Gruplarda SOD aktivitesi:

MTX grubu deri dokusundaki SOD aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MTX grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). MTX+CAPE grubunda ise SOD aktivitesi MTX grubuna göre yüksek, kontrol grubuna göre düşük olmakla birlikte her iki grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). (Şekil 5)

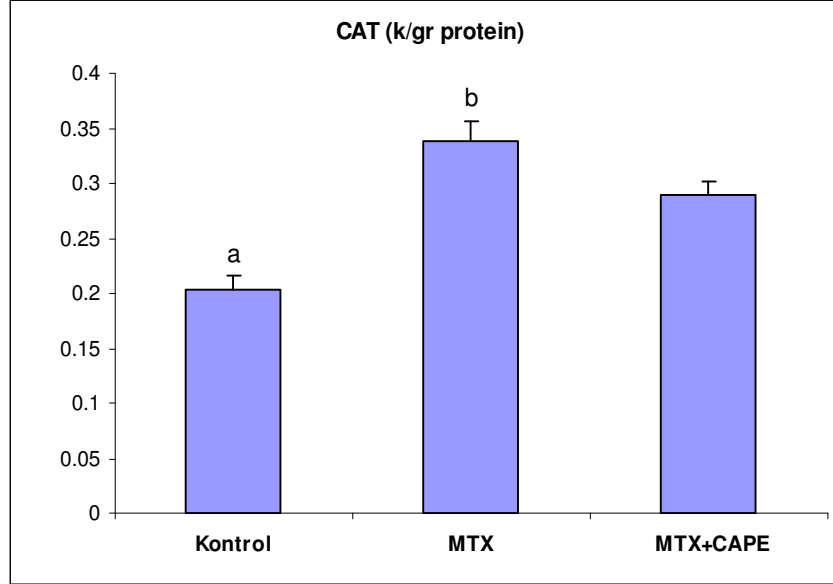


Şekil 5: Kontrol, MTX ve MTX+CAPE gruplarında SOD aktivitesi



#### 4.1.2. Gruplarda CAT aktivitesi:

MTX grubu deri dokusundaki CAT aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı ( $p=0.0001$ ). MTX+CAPE grubundaki CAT aktivitesi ise MTX grubundakinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olmasına karşın ( $p=0.021$ ), kontrol grubu CAT aktivitesinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0.0001$ ). (Şekil 6)



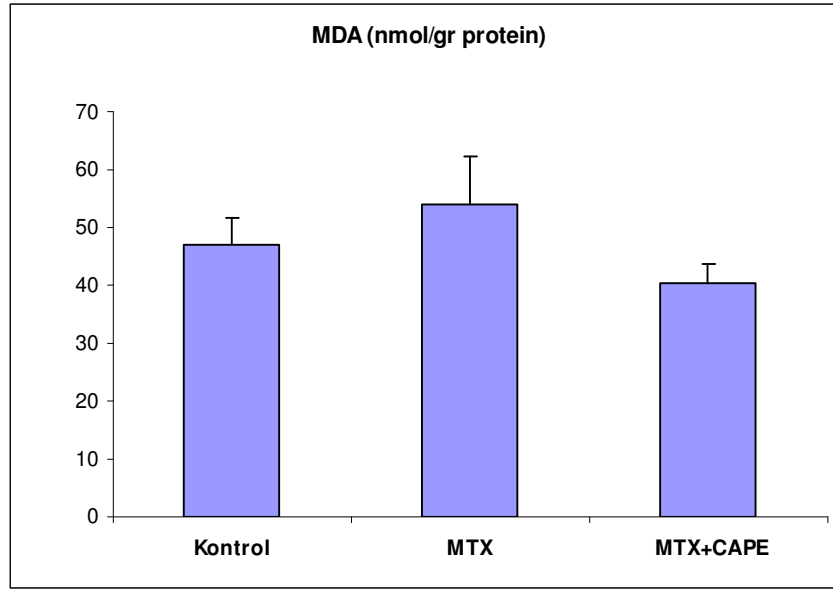
**Şekil 6:** Kontrol, MTX ve MTX+CAPE gruplarında CAT aktivitesi

a: Kontrol grubu ile MTX ve MTX+CAPE karşılaştırıldığında  $p: 0.0001$

b: MTX grubu ile MTX+CAPE karşılaştırıldığında  $p: 0.021$

#### 4.1.3. Gruplarda MDA Seviyeleri:

MTX grubu MDA miktarı, kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). MTX+CAPE grubunda ise MDA miktarı MTX ve kontrol gruplarına göre düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmedi ( $p>0.05$ ). (Şekil 7)



Şekil 7: Kontrol, MTX, MTX+CAPE gruplarında MDA miktarları

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

'Ratlarda metotreksatla indüklenen kutanöz oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil ester'in koruyucu etkisinin araştırılması' isimli çalışmamızda ratlara intraperitoneal olarak 20 mg/kg dozda MTX uygulayarak deri dokusunda SOD ve CAT enzim aktiviteleri ile MDA düzeyleri çalışıldı. MTX grubu deri dokusundaki SOD enzim aktivitesi kontrol grubundaki ile karşılaştırıldığında; MTX grubundaki enzim aktivitesi daha düşük bulunmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. MTX+CAPE grubundaki SOD enzim aktivitesi sadece MTX verilen gruba göre yüksek, kontrol grubuna göre düşük olmakla beraber her iki gruba karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. CAT enzim aktivitesi MTX grubu deri dokusunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı. MTX+CAPE grubunda CAT enzim aktivitesi ise MTX grubundakinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük; kontrol grubu CAT aktivitesinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Sadece MTX verilen gruptaki MDA miktarı kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. MTX+CAPE grubunda ise MDA miktarı MTX ve kontrol gruplarına göre düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı azalma bulunmadı. Yapılan literatür taramalarında MTX'in deri üzerindeki etkisinin oksidatif stres açısından araştırıldığı in vivo çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra oluşabilecek muhtemel oksidatif stresin varlığında, MTX'in bu etkisinin CAPE ile önlenip önlenemeyeceğini belirten bir literatür de tespit edilmemiştir.

MTX kan ve solid organ malignensilerinde, dermatolojik ve romatolojik hastalıklarda, ektopik gebelik sonlandırılmasında yaygın şekilde kullanılan bir antimetabolit ajandır (1). Dermatolojide ise sistemik kortikosteroidlerden sonra en yaygın olarak kullanılan oral immünoşüpresif ilaçtır (2). Uzun dönem düşük dozda MTX tedavisi alan hastalarda %30 ile %80 arasında yan etki insidansı bulunmakta, %5-35 oranında bu yan etkiler nedeni ile tedavi bırakılmaktadır (4). Yan etkiler içerisinde en yaygın olarak görülenler bulantı, iştahsızlık ve halsizliktir (2). MTX'in gastrointestinal yan etkilerinin yanı sıra karaciğer, kemik iliği, böbrek ve akciğerde toksik etkileri bulunmaktadır. İmmünoşüpresif etkisi nedeniyle çeşitli enfeksiyonlara

neden olabilmektedir. Yapılan bilimsel çalışmalarda MTX'in karsinojenik, mutajenik ve teratojenik yan etkileri bildirilmektedir (2, 4, 15). MTX ayrıca mukokutanöz toksisite de oluşturabilen bir ajandır. Mukokutanöz yan etkileri arasında en iyi bilinen ve ciddi olanı mukozit olup tedavide doz azaltılması veya tedavinin kesilmesini gerektirebilir. Diğer yan etkileri arasında kutanöz ülserasyonlar, fotosensitivite, diffüz noninflamatuvar alopesi, ilaç hipersensitivite reaksiyonları (toksik epidermal nekroliz gibi) ve radyasyon geri çağırma reaksiyonları görülebilir (2). MTX'in tüm bu toksik etkilerinin mekanizmasının oksidatif stres ile ilişkisini değişik organlar üzerinde araştıran pek çok çalışma bulunmaktadır. Uraz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada rat karaciğerinde MTX'in oksidatif stresi arttırdığını, oluşan hepatosit hasarının ursedeoksikolik asit ile önlenebildiğini rapor etmişlerdir (77). Benzer şekilde yapılan diğer bazı çalışmalarda ratlarda MTX'in hepatik oksidatif stresi arttırdığı, bu hepatotoksik etkinin N-asetilsistein, melatonin, kurkumin ve üzüm çekirdeği ekstresi ile geri döndürülebileceği rapor edilmiştir (6, 7, 78, 79). Dadhania ve arkadaşları, ratlarda MTX'in indüklediği intestinal toksisite ve oksidatif stres üzerinde alfa-lipoik asitin koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir (80). Maeda ve arkadaşları, ratlarda MTX'in indüklediği intestinal permeabilite artışında ROS'un önemli rol oynadığını ve bu durumun N-asetilsistein ile önlenebileceğini rapor etmişlerdir (81). Rat testisinde, MTX ile indüklenen toksisite ve depresyonun patogenezinde oksidatif stresin rolü olduğu; beta karoten ve CAPE'nin bu oksidatif stres üzerinde koruyucu etki yaptığı iki ayrı çalışmada bildirilmiştir (29, 31). Diğer bazı deneysel çalışmalarda, MTX'in özofagus, böbrek, serebellum ve spinal korda oksidatif stresi arttırdığı gösterilmiştir (5, 8, 82, 83, 84). Maiguma ve arkadaşları, normal insan epidermal keratinosit hücre serilerinde MTX ve 5-Fluorourasil'in indüklediği sitotoksisiteyi araştıran çalışmalarında, MTX ile indüklenen toksisitenin oksidatif stres ve ROS ile yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir. MTX'in spesifik olarak normal insan epidermal keratinositlerinde (in vitro hücre kültürü ortamında) intraselüler süperoksit radikallerinin aktivasyonu aracılığı ile sitotoksisiteye neden olduğunu ortaya koymuşlardır. MTX'in ayrıca insan epidermal keratinosit hücrelerinin yaşayabilirliğini azalttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada hidroksil radikali temizleyicisi bir antioksidan olan amifostinin MTX'in indüklediği hücre hasarını geri çevirdiği gösterilmiştir (10). Tüm bu

sonuçlar MTX ile indüklenen kutanöz toksisitede oksidatif stresin rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedirler.

CAPE birçok hastalığın önlenmesinde potansiyel terapötik özellikler gösteren bir bileşiktir (34). CAPE hayvan modellerinde oluşturulan çeşitli oksidatif stres modellerinde antioksidan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (32). Gökçe ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, siklosporin A ile indüklenen lipid peroksidasyonu aracılı nefrotoksisitede CAPE'nin koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır (85). Koyu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, CAPE'nin rat karaciğerinde 900 MHz elektromanyetik alanın indüklediği oksidatif değişiklikler üzerinde ROS'u azaltıp, antioksidan enzim aktivitesini artırarak koruyucu etkisi olduğu öne sürülmüştür (42). Gürel ve arkadaşları, rat derisinde ciddi termal (yanık) hasarı oluşturarak yaptıkları çalışmada hayvanların akciğer ve böbrek dokularında oksidan ve antioksidan enzim düzeylerine bakmışlar ve oksidatif stresin arttığını saptamışlardır ve bu oksidatif hasarın CAPE ile düzeldiğini öne sürmüşlerdir (86). CAPE'nin deride oluşturulan deneysel oksidatif stres durumlarında da koruyucu etkinliği çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Serarslan ve arkadaşlarının ratlarda, yara iyileşmesi modeli oluşturularak yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre CAPE'nin yara iyileşmesini arttırdığı ve bu etkinin multipl antiinflamatuvar özelliklerinin yanı sıra antioksidan ve ROS'u temizleyici etkisi aracılığıyla olabileceği öne sürülmüştür (45). Aydoğan ve arkadaşlarının ratlarda kaudal tabanlı dikdörtgen fleplerin sırtta kaydırılması şeklinde yaptıkları çalışmada, CAPE'nin antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği ile deri fleplerinin yaşayabilirliğini arttırdığı, iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu etki yaptığı sonucuna varılmıştır (87). Bu çalışmaların sonuçları deride herhangi bir yolla oluşabilecek oksidatif hasarın CAPE ile azaltılabileceğini düşündürmektedir.

Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan ROS ile antioksidan defans bir denge halindedir. Yoğun ROS üretimi ya da antioksidan defansın azalması, oksidatif strese neden olarak biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açar (67). ROS, hücredeki ksantin-ksantin oksidaz sistemi, mitokondri ve NADPH oksidaz aracılığı ile üretilmektedir (88). ROS'un fazlalığı hücresel lipidler, proteinler ve DNA'da hasara neden olup hücrenin normal fonksiyonlarını inhibe eder (46, 56, 57). Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü MDA'dır. Üç ya da daha fazla çift bağ

içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alıverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (89). MDA, oksidatif stres aracılı lipid peroksidasyonunun güvenilir bir belirteçidir (84). Bu özelliği nedeni ile lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir biyomarkerdir. Literatürde MTX veya başka ilaçlarla ilişkili deneysel oksidatif stres modellerinde değişik organlarda çalışılan MDA düzeyleri çelişkili olarak saptanmıştır. Vardi ve arkadaşlarının rat karaciğerinde yaptıkları çalışmada (90), Devrim ve arkadaşlarının rat böbreğinde yaptıkları çalışmada (91), Uzar ve arkadaşlarının rat serebellumunda yaptıkları çalışmada (8), Cıralık ve arkadaşlarının rat intestinal dokusunda yaptıkları çalışmada (9) MTX'in MDA düzeylerini anlamlı derecede arttırdığı saptanmıştır. Alkreathy ve arkadaşlarının ratlara doksorubisin uygulayarak yaptıkları bir çalışmada plazma MDA düzeylerinin anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir (92). Dillioğlugil ve arkadaşları sisplatinin rat böbrek dokusunda MDA düzeylerinde anlamlı yükseklik oluşturduğunu saptamışlardır (93). Bazı çalışmalarda ise MDA düzeylerinde anlamlı değişiklik saptanmamıştır. Örneğin Yılmaz ve arkadaşlarının rat karaciğerinde sisplatin toksisitesi ile ilgili yaptıkları çalışmada gruplar arasında MDA ve adenoazin deaminaz düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmamıştır (94). Demirkaya ve arkadaşlarının doksorubisinin indüklediği kardiyotoksisite üzerinde sarımsak ekstraktı, üzüm çekirdeği ve fındığın kardiyoprotektif rolünü araştırdıkları çalışmalarında, MDA düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir (95). Bizim yaptığımız çalışmada ise, MTX grubundaki MDA miktarı, kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptanmadı. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: Ortamda oluşmuş olan hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve CAT enzimleri aracılığı ile yüksek oranda su ve oksijene çevrilmiş olabilir. Bu durumda hidrojen peroksitten fenton reaksiyonu ile oluşacak olan hidroksil radikali miktarı da azalmış ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA miktarı da düşük seviyede kalmış olabilir. Yılmaz ve arkadaşlarının (94) çalışmasında olduğu gibi anlamlı değişiklik

saptanmamış MDA seviyesi MDA'nın hızlı bir katabolik yola girmiş olabileceğini de akla getirmektedir. Dokudaki lipid peroksidasyonu sonucu ortama salınan MDA, mitokondrial bir MDA-metabolize edici enzim (aldehit dehidrojenaz) aracılığı ile hızla metabolize edilmiş ve böylece MDA seviyesinde bir artış gözlenmemiş olabilir.

SOD, vücutta ROS'un oluşturduğu hasara karşı hayati rol oynayan endojen antioksidan bir enzimdir. SOD enzimi süperoksit radikalini daha az reaktif bir ürün olan hidrojen peroksite dönüştürür. Süperoksit radikali ortamdan uzaklaşmaz ise nitrik oksit ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitrite dönüşür. Sonuçta SOD enzimi hücreleri süperoksit radikale ve peroksinitrite maruziyetten korumaktadır (96). CAT ise hidrojen peroksinin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen önemli bir antioksidan enzimdir (43). Oksidatif stres modelleri oluşturularak yapılan daha önceki çalışmalarda hücre içi antioksidan olan bu enzimlerin aktivitelerinde çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Uzar ve arkadaşlarının MTX verilen ratların serebellum dokusunda yaptıkları çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTX grubunda anlamlı düzeyde artmış SOD ve CAT aktiviteleri tespit edilmiştir (5). Garipardıç ve arkadaşları ise ratlarda MTX'in indüklediği özofageal hasar modelinde MTX grubu ratlarda SOD ve CAT enzim aktivitelerini anlamlı derecede düşük olarak saptamışlardır (82). Yılmaz ve arkadaşlarının sisplatinin indüklediği hepatotoksisite modeli çalışmasında ise SOD aktivitesi sisplatin grubunda kontrole göre düşük saptanmış, CAT aktivitesinde ise anlamlı değişiklik olmamıştır (94). Armağan ve arkadaşlarının çalışmasında ise rat testisinde MTX grubu SOD aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek saptanmakla beraber CAT aktiviteleri arasında anlamlı fark bulunmamış (31). Koyu ve arkadaşlarının 900 MHz'lik elektromanyetik alana maruz kalan ratların karaciğerindeki oksidatif stresi araştıran çalışmalarında, elektromanyetik alana maruz kalan grupta kontrol gruba göre anlamlı düzeyde düşük SOD aktivitesi ve anlamlı yükselmiş CAT aktivitesi tespit edilmiştir (42). Bizim çalışmamızda ise MTX grubu ile kontrol grubu arasında deri dokusundaki SOD enzim aktivitesi karşılaştırıldığında; MTX grubundaki enzim aktivitesi daha düşük bulunmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. MTX ve CAPE'nin birlikte verildiği grupta ise SOD enzim aktivitesi MTX grubuna göre yüksek, kontrol grubuna göre düşük olmakla beraber her iki gruba karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. MTX alan

ratların derisinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da SOD enzim aktivitesinin düşmesi, oksidatif stres yüzünden in vivo ortamda artmış süperoksit radikalleri nedeni ile SOD enzim aktivitesinin baskılanmış olmasından kaynaklanıyor olabilir. SOD enzimi ayrıca transkripsiyon ya da translasyon aşamalarında da baskılanmış olabilir.

Çalışmamızda CAT enzim aktivitesi MTX grubu deri dokusunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı. Bunun nedeni ortamda uzun süreli aşırı bir hidrojen peroksit birikiminin neden olduğu MTX ile indüklenen oksidatif strese karşı adaptif bir yanıt olarak bu enzimin aktivitesinde artış olabilir. MTX+CAPE grubundaki CAT aktivitesi ise MTX grubundakinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük; kontrol grubu CAT aktivitesinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. CAPE'nin enzim aktiviteleri üzerindeki etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte CAPE'nin ortamdaki serbest oksijen radikallerini süpürücü etkisinden dolayı MTX+CAPE grubundaki CAT enzim aktivitesi daha düşük saptanmış olabilir. Burada SOR'lar CAPE tarafından süpürüldüğünden, ortamda daha az miktarda hidrojen peroksit oluşmuş olabilir. Hidrojen peroksit miktarı azaldığı için de CAT aktivitesi düşük saptanmış olabilir.

Sonuç olarak MTX'in deri dokusunda, oksidatif stresi arttırabileceği ve bir antioksidan olan CAPE'nin verilmesi ile bu oksidatif stresin azaltılabileceği söylenebilir. Bu, bize MTX'in deri üzerinde oluşturduğu toksik etkilerinin mekanizmasında oksidatif hasarlanmanın da rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, antioksidanların da MTX'in deri üzerinde oluşturduğu toksisitenin önlenmesinde önemli bir etki oluşturabileceğini ortaya koymaktadır.



## 6. ÖZET

### **Ratlarda Metotreksatla İndüklenen Kutanöz Oksidatif Stres Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester'in Koruyucu Etkisinin Araştırılması**

Bu çalışmada ratlarda metotreksat (MTX) ile indüklenen kutanöz oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla malondialdehit (MDA) düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri çalışıldı.

Çalışmamıza 30 erkek Wistar-albino rat alınarak, her grupta 10 rat olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 7 gün boyunca günde bir kez serum fizyolojik (SF), intraperitoneal (i.p.) yoldan verildi. MTX grubuna 7 gün boyunca günde bir kez SF i.p. olarak verildi ve 2. gün MTX 20 mg/kg tek dozda i.p. olarak enjekte edildi. MTX + CAPE grubuna 7 gün boyunca günde bir kez 10 µmol/kg CAPE i.p. yoldan verildi ve 2. gün MTX 20 mg/kg tek dozda i.p. olarak enjekte edildi. Son enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Ratların derileri alındı. Deri dokularında MDA seviyeleri ile SOD ve CAT enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.

MTX grubu ile kontrol grubu arasında deri dokusundaki SOD aktivitesinde ve MDA düzeylerinde istatistiksel olarak fark saptanmadı. CAT aktivitesi, MTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı ( $p=0.0001$ ). MTX+CAPE grubundaki CAT aktivitesi ise MTX grubundakinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulundu ( $p=0.021$ ).

Sonuç olarak MTX'in ratların deride oksidatif stres oluşturabileceği ve CAPE'nin bu oksidatif stresi azaltabileceği söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Metotreksat, Kafeik asit fenetil ester, Oksidatif stres, Deri, Rat

## 7.SUMMARY

### **Investigation of the Protective Effect of Caffeic Acid Phenylethyl Ester on Methotrexate-Induced Cutaneous Oxidative Stress in Rats**

In this study, we have measured the malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activity levels in order to investigate whether caffeic acid phenylethyl ester has a protective effect on cutaneous oxidative stress induced by methotrexate (MTX) in rats.

A total of 30 male Wistar-albino rats were included in this study. Animals were equally and randomly separated into three groups. Control group was given daily intraperitoneal saline injection for seven days. MTX group was treated with intraperitoneal saline injection for seven days and with single dose of intraperitoneal MTX (20 mg / kg) injection at day 2. MTX plus CAPE group was given CAPE at 10  $\mu$ mol/kg/day intraperitoneally for seven days and this group was also treated with MTX at a dose of 20 mg/kg at day 2. All animals were sacrificed 24 hours after the last injection and skin tissue samples were collected. MDA levels, SOD and CAT enzyme activity levels were measured from tissue samples by using spectrophotometry method.

There was no statistically significant difference between the MTX group and controls by means of SOD activity and MDA levels, whereas CAT activity level was found prominently higher in MTX group ( $P=0.0001$ ). The CAT activity of MTX plus CAPE group was significantly lower than the MTX group ( $p=0.021$ ).

As a result, it can be suggested that MTX can lead to oxidative stress in rat skin and CAPE may decrease oxidative stress.

**Keywords:** Methotrexate, Caffeic acid phenylethyl ester, Oxidative stress, Skin, Rat.

## 8. KAYNAKLAR

1. Smith SW, Nelson LS. Case files of the New York City Poison Control Center: antidotal strategies for the management of methotrexate toxicity. *J Med Toxicol* 2008; 4(2):132-40.
2. Bangert CA, Costner MI. Methotrexate in dermatology. *Dermatol Ther* 2007; 20(4):216-28.
3. Wollina U, Ständer K, Barta U. Toxicity of methotrexate treatment in psoriasis and psoriatic arthritis--short- and long-term toxicity in 104 patients. *Clin Rheumatol* 2001; 20(6):406-10.
4. Kalantzis A, Marshman Z, Falconer DT, Morgan PR, Odell EW. Oral effects of low-dose methotrexate treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100(1):52-62.
5. Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, Bas O, Kilbas S ve ark. 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; 218(2-3):125-33.
6. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit* 2006; 12(8):BR274-8.
7. Jahovic N, Cevik H, Sehirlı AO, Yeğen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 2003; 34(4):282-7.
8. Uzar E, Koyuncuoglu HR, Uz E, Yilmaz HR, Kutluhan S, Kilbas S ve ark. The activities of antioxidant enzymes and the level of malondialdehyde in cerebellum of rats subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem*. 2006; 291(1-2):63-8.
9. Ciralik H, Bulbuloglu E, Cetinkaya A, Kurutas EB, Celik M, Polat A. Effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced small intestinal damage in rats. *Mt Sinai J Med*. 2006; 73(8):1086-92.
10. Maiguma T, Kaji H, Makino K, Teshima D. Protective effects of amifostine and cyclooxygenase-1 inhibitor against normal human epidermal keratinocyte toxicity induced by methotrexate and 5-fluorouracil. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009; 105(1):1-9.
11. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum*. 1998; 27(5):277-92.
12. Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001; 764(1-2):217-54.
13. Özkan AŞ, Alper S. Sistemik Tedavi. Tüzün Y, Gürer MA, Serdaroğlu S, Oğuz O, Aksungur VL. Ed. *Dermatoloji*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri 2008; 2195-7
14. Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2007; 65(3):168-73.
15. High WA, Fitzpatrick JE. Cytotoxic and Antimetabolic Agents. İn: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ. Eds. Volume 2, 7 th Edition, New York: The Mc Graw Hill Companies, 2008:2163-81.
16. Montesinos MC, Desai A, Cronstein BN. Suppression of inflammation by low-dose methotrexate is mediated by adenosine A2A receptor but not A3 receptor activation in thioglycollate-induced peritonitis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8(2):R53.
17. Chan ES, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res*. 2002; 4(4):266-73.

18. Lawrence CM, Dahl MG. Two patterns of skin ulceration induced by methotrexate in patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 1984; 11(6):1059-65.
19. Kazlow DW, Federgrun D, Kurtin S, Lebwohl MG. Cutaneous ulceration caused by methotrexate. *J Am Acad Dermatol.* 2003; 49(2 Suppl Case Reports):S197-8.
20. Ben-Amitai D, Hodak E, David M. Cutaneous ulceration: an unusual sign of methotrexate toxicity--first report in a patient without psoriasis. *Ann Pharmacother.* 1998; 32(6):651-3.
21. Del Pozo J, Martínez W, García-Silva J, Almagro M, Peña-Penabad C, Fonseca E. Cutaneous ulceration as a sign of methotrexate toxicity. *Eur J Dermatol.* 2001; 11(5):450-2.
22. Breneman DL, Storer TJ, Breneman JC, Mutasim DF. Methotrexate-induced cutaneous ulceration in patients with erythrodermic mycosis fungoides. *Ther Clin Risk Manag.* 2008; 4(5):1135-41.
23. Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum.* 1986; 29(7):832-5.
24. Baggott JE, Morgan SL, Ha TS, Alarcón GS, Koopman WJ, Krumdieck CL. Antifolates in rheumatoid arthritis: a hypothetical mechanism of action. *Clin Exp Rheumatol.* 1993; 11 Suppl 8:S101-5.
25. Ishii E, Yamada S, Higuchi S, Honjo T, Igarashi H, Kanemitsu S et al. Oral mucositis and salivary methotrexate concentration in intermediate-dose methotrexate therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol.* 1989; 17(5):429-32.
26. Bookstaver PB, Norris L, Rudisill C, DeWitt T, Aziz S, Fant J. Multiple toxic effects of low-dose methotrexate in a patient treated for psoriasis. *Am J Health Syst Pharm.* 2008; 65(22):2117-21.
27. Maiguma T, Hayashi Y, Ueshima S, Kaji H, Egawa T, Chayama K et al. Relationship between oral mucositis and high-dose methotrexate therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2008; 46(11):584-90.
28. Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct.* 1998; 16(4):283-93.
29. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Oflu A. Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril.* 2009; 92(6):2028-33.
30. Wang X, Pang J, Maffucci JA, Pade DS, Newman RA, Kerwin SM et al. Pharmacokinetics of caffeic acid phenethyl ester and its catechol-ring fluorinated derivative following intravenous administration to rats. *Biopharm Drug Dispos.* 2009; 30(5):221-8.
31. Armagan A, Uzar E, Uz E, Yilmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoglu HR ve ark. Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum Exp Toxicol.* 2008; 27(7):547-52.
32. Yildiz Y, Serter M, Ek RO, Ergin K, Cecen S, Demir EM ve ark. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on intestinal ischemia-reperfusion injury. *Dig Dis Sci.* 2009; 54(4):738-44.
33. Yilmaz HR, Uz E, Altunbasak A, Sakalli E, Ozçelik N. Anticlastogenic effect of caffeic acid phenethyl ester on cisplatin-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells. *Toxicol Ind Health.* 2010; 26(1):33-7.
34. Feng Y, Lu YW, Xu PH, Long Y, Wu WM, Li W et al. Caffeic acid phenethyl ester and its related compounds limit the functional alterations of the isolated mouse brain and liver mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation: relationship to their antioxidant activities. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1780(4):659-72.

35. Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996; 55(6):441-9.
36. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res*. 1999; 59(10):2347-52.
37. Natarajan K, Singh S, Burke TR Jr, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(17):9090-5.
38. Abdel-Latif MM, Windle HJ, Homasany BS, Sabra K, Kelleher D. Caffeic acid phenethyl ester modulates *Helicobacter pylori*-induced nuclear factor-kappa B and activator protein-1 expression in gastric epithelial cells. *Br J Pharmacol*. 2005; 146(8):1139-47.
39. Márquez N, Sancho R, Macho A, Calzado MA, Fiebich BL, Muñoz E. Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcription factors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 308(3):993-1001.
40. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett*. 1993; 329(1-2):21-4.
41. Eşrefoğlu M, Gül M, Ateş B, Yılmaz I. The ultrastructural and biochemical evidences of the beneficial effects of chronic caffeic acid phenethyl ester and melatonin administration on brain and cerebellum of aged rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009.
42. Koyu A, Ozguner F, Yilmaz H, Uz E, Cesur G, Ozcelik N. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on oxidative stress in rat liver exposed to the 900 MHz electromagnetic field. *Toxicol Ind Health*. 2009; 25(6):429-34.
43. Kart A, Cigremis Y, Ozen H, Dogan O. Caffeic acid phenethyl ester prevents ovary ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47(8):1980-4.
44. Albukhari AA, Gashlan HM, El-Beshbishy HA, Nagy AA, Abdel-Naim AB. Caffeic acid phenethyl ester protects against tamoxifen-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47(7):1689-95.
45. Serarslan G, Altuğ E, Kontas T, Atik E, Avci G. Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clin Exp Dermatol*. 2007; 32(6):709-15.
46. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1):44-84.
47. Durmuş AS, Ünsaldı E. Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Kırık İyileşmesi. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*. 2005; 20-27
48. Tekcan M. Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis. *Türk Androloji Derneği Androloji Bülteni*. 2009; 37:131-6.
49. Delibaş N, Özcankaya R. Serbest Radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 1995; 2 (3): 11-17
50. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2006; 31 (2); 51-56
51. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol*. 2005; 4(1):5.
52. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004; 142(2):231-55.

53. Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs.* 2005; 21(1):24-8.
54. Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal.* 2002; 4(4):665-73.
55. Zhou Q, Mrowietz U, Rostami-Yazdi M. Oxidative stress in the pathogenesis of psoriasis. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(7):891-905.
56. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.* 2007; 18(9):567-79.
57. Balsano C, Alisi A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(26):3063-73.
58. Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr Res.* 2009; 66(2):121-7.
59. Briganti S, Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003; 17(6):663-9.
60. Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(12):2565-75.
61. Khan R, Satyam A, Gupta S, Sharma VK, Sharma A. Circulatory levels of antioxidants and lipid peroxidation in Indian patients with generalized and localized vitiligo. *Arch Dermatol Res.* 2009; 301(10):731-7.
62. Tunc T, Uysal B, Atabek C, Kesik V, Caliskan B, Oztas E ve ark. Erdosteine and ebselen as useful agents in intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.* 2009; 155(2):210-6.
63. Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O ve ark. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res.* 2004; 50(3):287-90.
64. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003; 189(1-2):41-54.
65. Remacle J, Michiels C, Raes M. The importance of antioxidant enzymes in cellular aging and degeneration. *EXS.* 1992;62:99-108.
66. Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol.* 2004; 207(Pt 18):3221-31.
67. Köken T, Kahraman A, Serteser M, Gökçe Ç. Hemodiyaliz ve Oksidatif Stres. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2004; Ek Sayı 9-13
68. Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2004; 39(11):1119-27.
69. Cetiner M, Sener G, Sehirlı AO, Ekşioğlu-Demiralp E, Ercan F, Sirvanci S ve ark. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 209(1):39-50.
70. Yilmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol.* 2004; 18(4):234-8.
71. Ayata A, Mollaoglu H, Yilmaz HR, Akturk O, Ozguner F, Altuntas I. Oxidative stress-mediated skin damage in an experimental mobile phone model can be prevented by melatonin. *J Dermatol.* 2004; 31(11):878-83.
72. Uz E, Oktem F, Yilmaz HR, Uzar E, Ozgüner F. The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem.* 2005; 277(1-2):165-70.
73. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186:421-31.

74. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988; 34(3):497-500.
75. Aebi H, Bergmeyer U. Catalase. *Methods of enzymatic analysis.* New York and London: Academic Press, 1974; 673-7
76. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.
77. Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M ve ark. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci.* 2008; 53(4):1071-7.
78. Hemeida RA, Mohafez OM. Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2008; 20(2):141-8.
79. Cetin A, Kaynar L, Kocyigit I, Hacioglu SK, Saraymen R, Ozturk A ve ark. Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. *Am J Chin Med.* 2008; 36(5):861-72.
80. Dadhania VP, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Intervention of alpha-lipoic acid ameliorates methotrexate-induced oxidative stress and genotoxicity: A study in rat intestine. *Chem Biol Interact.* 2010; 183(1):85-97.
81. 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(6):1117-23.
82. Garipardic M, Bakan V, Davutoğlu M, Sayar H, Kurutaş EB. Oxidative stress and protective effect of erythropoietin on methotrexate-induced esophageal damage. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010; 32(2):108-12.
83. 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.
84. Oktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzare E ve ark. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health.* 2006; 22(6):241-7.
85. Gökçe A, Oktar S, Yönden Z, Aydın M, İlhan S, Ozkan OV ve ark. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester on cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail.* 2009; 31(9):843-7.
86. Gurel A, Armutcu F, Hosnuter M, Unalacak M, Kargi E, Altinyazar C. Caffeic acid phenethyl ester improves oxidative organ damage in rat model of thermal trauma. *Physiol Res.* 2004; 53(6):675-82.
87. Aydogan H, Gurlek A, Parlakpınar H, Askar I, Bay-Karabulut A, Aydogan N ve ark. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2007; 60(5):563-8.
88. Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100(1):65-72.
89. Mercan U. Toksikolojide Sewrbest Radikallerin Önemi. *YYU Vet Fak Derg.* 2004; 15 (1-2):91-96
90. 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; 38(4):592-7.
91. 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.

- 92.** Alkreathy H, Damanhoury ZA, Ahmed N, Slevin M, Ali SS, Osman AM. Aged garlic extract protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(3):951-6.
- 93.** Dillioglugil MO, Maral Kir H, Gulkac MD, Ozon Kanli A, Ozdogan HK, Acar O ve ark. Protective effects of increasing vitamin E and a doses on cisplatin-induced oxidative damage to kidney tissue in rats. *Urol Int.* 2005; 75(4):340-4.
- 94.** Yilmaz HR, Sogut S, Ozyurt B, Ozugurlu F, Sahin S, Isik B ve ark. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health.* 2005; 21(3-4):67-73.
- 95.** Demirkaya E, Avci A, Kesik V, Kararlioglu Y, Oztas E, Kismet E ve ark. Cardioprotective roles of aged garlic extract, grape seed proanthocyanidin, and hazelnut on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009; 87(8):633-40.
- 96.** Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med.* 2005; 26(4-5):340-52.