

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**PROBİYOTİKLERİN RATLARDA METOTREKSAT
TOKSİSİTESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

DR. OZAN YILMAZ

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. HASAN ŞENOL COŞKUN**

2008 - ISPARTA

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**PROBİYOTİKLERİN RATLARDA METOTREKSAT
TOKSİSİTESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

DR. OZAN YILMAZ

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. HASAN ŞENOL COŞKUN**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
996-TU05 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2008 - ISPARTA

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü destekte bulunan tez danışmanım Doç. Dr. Hasan Şenol COŞKUN ve tezimin yapılmasında büyük emekleri olan Prof. Dr. Mehmet İŞLER başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. M. Numan TAMER, Prof. Dr. M. Tuğrul SEZER, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR, Prof. Dr. Ülkü SARITAŞ, Doç.Dr. Ş. Ercan TUNÇ, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, Doç. Dr. M. Cem Koçkar, Yrd. Doç. Dr. Güçhan ALANOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Z. Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Altuğ ŞENOL, Yrd. Doç. Dr. Banu Kale KÖROĞLU'na, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Metin ÇİRİŞ'e, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Hüseyin VURAL'a, birlikte çalışma imkanı bulduğum tüm asistan arkadaşlarıma, bugüne kadar geçen sürede maddi ve manevi desteklerini hiç eksiltmeyen anneme, babama ve kardeşime, ailemize yeni katılarak neşe kaynağımız olan biricik kızım İpek'e, her zaman yanımda olan ve tez çalışmalarım esnasındaki yorucu günlerde bana hep destek olan sevgili eşim Selda'ya en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr.Ozan YILMAZ

İÇİNDEKİLER

No	Başlık	Sayfa No
	Teşekkür	i
	İçindekiler	ii
	Kısaltmalar	v
	Şekiller	vi
	Tablolar	vii
1	Giriş	1
2	Genel bilgiler	2
2.1	Metotreksat	2
2.1.1	Metotreksat'ın metabolizması	2
2.1.2	Folik asit antagonisti olarak Metotreksat'ın mekanizması	3
2.1.3	Metotreksat'ın antiproliferatif etkisi	4
2.1.4	Metotreksat'ın antiinflamatuvar etkisi	4
2.1.5	Metotreksat'ın immunmodülatör etkisi	5
2.1.6	Metotreksat'ın yan etkileri	5
2.1.7	Metotreksat'ın hepatotoksitesisi	6
2.1.8	Metotreksat toksitesisi ve oksidatif stres	6
2.2	Probiyotikler	7
2.2.1	Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri	7
2.2.2	Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	8
2.2.3	Probiyotiklerin etki mekanizmaları	9
2.2.3.1	Probiyotiklerin antibakteriyal mekanizması	9
2.2.3.2	Probiyotiklerin adezyon mekanizması	10
2.2.3.3	Probiyotiklerin antiapoptotik etkisi	10
2.2.3.4	Probiyotiklerin antioksidan etkisi	11
2.3	Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif stres	11
2.3.1	Serbest oksijen radikal türleri	12
2.3.2	Serbest oksijen radikali oluşumuna neden olan kaynaklar	13
2.3.3	Serbest radikallerin hücreler üzerindeki etkileri	13

2.3.3.1	Lipidlerde meydana gelen yapısal değişiklikler	13
2.3.3.2	Proteinlerde ve nükleik asitlerde meydana gelen yapısal değişiklikler	14
2.3.4	Enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistemler	14
2.3.4.1	Nonenzimatik antioksidanlar	14
2.3.4.2	Enzimatik antioksidanlar	16
2.4	Apoptozis	17
2.4.1	Kaspazlar	18
2.4.1.1	Kaspazların genel özellikleri	19
2.4.2	Apoptozis işleyiş mekanizmaları	19
2.4.3	Apoptozis ve Bcl-2 / Bax	20
2.4.4	Apoptozis ve Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)	20
3	Materyal ve metod	22
3.1	Yöntem	22
3.2	Probiyotik karışım	22
3.3	Deney protokolü	23
3.4	Histolojik değerlendirme	24
3.5	İmmünohistokimyasal incelemeler	25
3.5.1	TNF- α , Bax, kaspaz-8 ve kaspaz-3 ekspresyonu	25
3.6	Biyokimyasal ölçümler	26
3.7	İstatistik değerlendirme	26
4	Bulgular	27
4.1	Ratlardaki ağırlık değişiklikleri	27
4.2	Ratların gayta kültürleri	27
4.3	Karaciğerde myeloperoksidaz aktivitesi	27
4.4	Malondialdehid aktivitesi	28
4.5	Glutatyon aktivitesi	29
4.6	Karaciğer fonksiyon testleri ve folik asit	30
4.6.1	Karaciğer fonksiyon testleri	30
4.6.2	Folik asit	32
4.7	Patoloji sonuçlarının değerlendirilmesi	34
4.7.1	Histolojik değerlendirme	34
4.7.2	Karaciğer dokusunda TNF- α ekspresyonu	34

4.7.3	Karaciğer dokusunda Bax ekspresyonu	35
4.7.4	Karaciğer dokusunda kaspaz-3 ekspresyonu	36
4.7.5	Karaciğer dokusunda kaspaz-8 ekspresyonu	37
5	Tartışma	39
6	Özet	45
7	Summary	46
8	Kaynaklar	47
9	Ekler	53

KISALTMALAR

FA	Folik asit
MTX	Metotreksat
RA	Romatoid artrit
THF	Tetrahidrofolat
DHFR	Dihidrofolat redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
MPO	Myeloperoksidaz
MDA	Malondialdehid
MTHF	Metilen tetrahidrofolat
OH ⁻	Hidroksil
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alfa
ADA	Adenozin deaminaz
dATP	Adenozin trifosfat
SAH	S-adenozil homosistein
SAM	S-adenozil metionin
NADP	Nikotinamid adenozin difosfat
NAD	Nikotinamid adenindinükleotid
SOR	Serbest oksijen radikalleri
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
SF	Serum fizyolojik
SM	Skim milk
PB	Probiyotik
Cas	Kaspaz
Cas3	Kaspaz-3
Cas8	Kaspaz-8

ŞEKİLLER

Şekil 1:	Metotreksat'ın moleküler yapısı
Şekil 2:	Dihidrofolatın moleküler yapısı
Şekil 3:	Folik asidin moleküler yapısı
Şekil 4:	Folik asit metabolizması
Şekil 5:	Glutatyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü
Şekil 6:	Karaciğerde MPO aktivitesinin gruplara göre karşılaştırması
Şekil 7:	Karaciğerde GSH aktivitesinin gruplara göre karşılaştırması
Şekil 8:	Serum ALT seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması
Şekil 9:	Serum AST seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması
Şekil 10:	Serum ALP seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması
Şekil 11:	Serum FA seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması
Şekil 12:	Karaciğer dokusunda TNF- α ekspresyonunun gruplara göre karşılaştırılması
Şekil 13:	Karaciğer dokusunda Bax ekspresyonunun gruplara göre karşılaştırılması
Şekil 14:	Karaciğer dokusunda Cas3 ekspresyonunun gruplara göre karşılaştırılması
Şekil 15:	Karaciğer dokusunda Cas8 ekspresyonunun gruplara göre karşılaştırılması

TABLÖLAR

Tablo 1:	Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar
Tablo 2:	Deney protokolü
Tablo 3:	Çalışma öncesi ve sakrifikasyon öncesi ratların ortalama ağırlıkları
Tablo 4:	Karaciğerde myeloperoksidaz aktivitesi
Tablo 5:	Malondialdehid aktivitesi
Tablo 6:	Glutasyon aktivitesi
Tablo 7:	Karaciğer fonksiyon testleri
Tablo 8:	Serum folik asit seviyesi
Tablo 9:	Karaciğer dokusunda TNF- α ekspresyonu
Tablo 10:	Karaciğer dokusunda Bax ekspresyonu
Tablo 11:	Karaciğer dokusunda Cas3 ekspresyonu
Tablo 12:	Karaciğer dokusunda Cas8 ekspresyonu

1.GİRİŞ

Bir folik asit (FA) antagonisti olan metotreksat (MTX) lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri ve bazı diğer kanser tiplerinde kemoterapötik ajan olarak kullanıldığı gibi psöriasis, dermatomyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit (RA) gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda da yaygın şekilde kullanılmaktadır (1).

MTX dihidrofolatı (DHF) tetrahidrofolata (THF) çeviren dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe eder (2). Tetrahidrofolat purin ve pirimidin sentezinin önemli bir parçası olan timidilatın üretiminde rol oynar (3). Purin ve pirimidin nükleotidleri deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) sentezinde rol oynarlar. Bu nedenle MTX THF eksikliğine yol açarak purin, pirimidin metabolizması ve DNA sentezini içeren pek çok metabolik yolu etkiler. Bu metabolik yollar üzerinde yaptığı değişiklikler ile MTX'in hem tedavi edici etkileri hem de toksik etkileri ortaya çıkmaktadır (4).

MTX'in gastrointestinal, hepatik, renal ve kemik iliği toksisiteleri en sık görülen yan etkileridir (5). Akut lösemilerde uygulanan yüksek doz MTX uygulamasında da, psöriasis tedavisinde uygulanan uzun süreli düşük doz MTX uygulamasında da ilerleyici fibrosis ve siroza kadar gidebilen hepatik toksisite görülebilmektedir (6). Hepatik toksisite MTX'in kullanımını kısıtlayan ciddi bir yan etkidir (5).

Ratlara MTX verilmesinin; kan, karaciğer, böbrek ve ince barsakta glutatyon (GSH) seviyelerini azalttığı, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesini ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) seviyelerini arttırdığı bulunmuştur (7).

Probiyotikler son zamanlarda sık olarak kullanılmakta ve probiyotiklerle ilgili olarak çok geniş çalışmalar yapılmaktadır. Değişik sistemlerde toksik etkisi bilinen metotreksatın yan etkisinin probiyotiklerce engellenip engellenemeyeceğinin ortaya konulması probiyotiklerin yeni kullanım alanlarını ortaya koyacaktır. Aynı zamanda kemoterapötik ajanların yan etkilerinin sınırlandırılmasında farklı bir bakış açısı sunabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

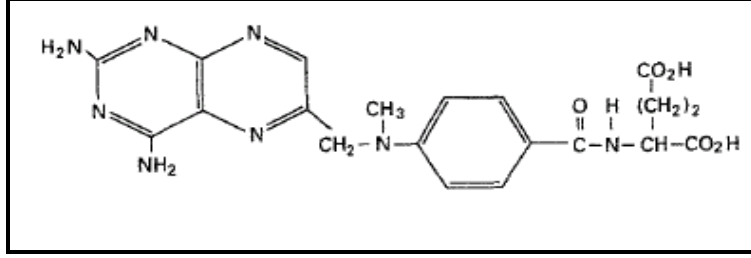
2.1. Metotreksat

Kliniklerde çok yaygın olarak kullanılan antimetabolit etki mekanizmasına sahip bir antineoplastik ilaçtır.

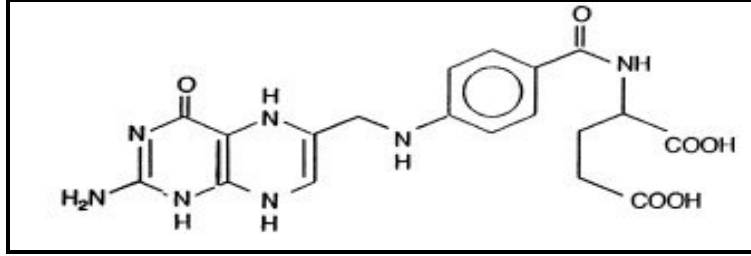
2.1.1. Metotreksat'ın metabolizması

Folik aside bağlı enzimler tek karbon fragmanların transferini içeren reaksiyonlarda gereklidir. Bunlar arasında en önemlisi DNA sentezi için deoksiüridilat'ın metilasyonu ile timidilat elde edilmesidir. Bu işlem sırasında metilen tetrahidrofolat (MTHF) DHF'a dönüşür. DHF'ın ise tekrar kullanılması için THF'a dönüşmesi gereklidir. Bu dönüşüm için DHFR enzimine ve NADPH'ya gereksinim vardır. THF, DNA ve RNA sentezi için gerekli olan purin ve pirimidin nükleotidlerinin sentezinin önemli bir komponenti olan timidilatın üretiminde rol oynar (3). Bu nedenle MTX THF eksikliğine yol açarak purin, pirimidin metabolizması ve DNA sentezini içeren pek çok metabolik yolu etkiler (4). MTX'in moleküler yapısı DHF'a benzer (Şekil 1 ve 2). MTX'in yapısında birden fazla metil grubu vardır ve DHF'taki hidroksil (OH) grubu yerine NH₂ bulunur. MTX DHF'ı THF'a çeviren DHFR enzimini inhibe eder (2). MTX folilpoliglutamil sentetaz ile 1-4 glutamat gruplarının eklenmesiyle poliglutamat forma dönüştürülen bir ilaçtır. Poliglutamat yapı muhtemelen tüm hücrelerde bulunur. Poliglutamat formun ölçümleri eritrosit, karaciğer, fibroblastlar ve kemik iliği myeloid serisinde yapılmıştır. MTX poliglutamatları hücre içinde tutulur ve DHFR enzimine bağlanarak DHF ile yer değiştirir (8, 9).

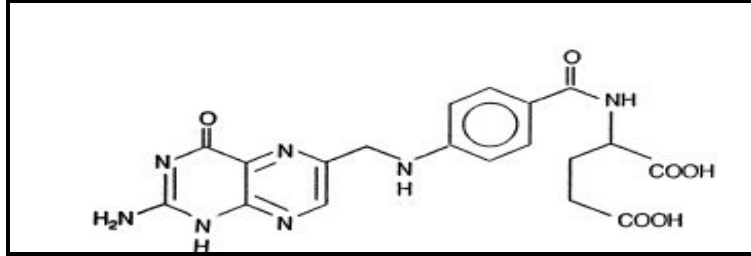
MTX düşük dozlarda oral olarak hemen hemen tamamen emilir. Başlangıç yarı ömrü (dağılımı) 1,5-3,5 saattir. Terminal yarı ömrü 8-15 saattir. MTX ve metabolitleri hücrelere aktif taşıma ile girer ve büyük oranda böbrek yoluyla elimine olur.



Şekil 1: Metotreksat'ın moleküler yapısı (8).



Şekil 2: Dihidrofolatın moleküler yapısı (9).



Şekil 3: Folik asidin moleküler yapısı (9).

2.1.2. Folik asit antagonisti olarak Metotreksat'ın mekanizması

İnsanlarda vücudun ana yapılarından FA'i (Şekil 3) sentezleme özelliği olmadığından diyetle FA alımı zorunludur. Dihidrofolat redüktaz, DHF'yi FA'e bağımlı yollarda temel bileşen olarak hizmet eden THF'ye dönüştürür (Şekil 4). Chabner ve ark. MTX'in FA antagonisti mekanizması olarak iki teoriyi öne sürmüşlerdir. Folik asit azalma teorisi: İntrasellüler FA'in azalması DHFR'nin blokajına dayanmaktadır. Yarışma teorisi: Nükleotidlerin sentezinde görevli basamakları MTX'in doğrudan inhibe etmesine ve DHF birikimine dayanmaktadır (10). MTX, DHFR'ı inhibe eder bu yüzden THF'in azalmasına neden olur. MTX poliglutamatları 5,10 metilen THF redüktaz, glisinamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz ve aminoimidazol-karbokzamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz enzimlerini doğrudan inhibe eder. Bu enzimlerdeki inhibisyon purin ve pirimidin

metabolizmasında inhibisyonla sonuçlanır (8). Bu yapı taşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA sentezini ve enerji üretimi için gerekli ATP üretimini inhibe eder. Ayrıca THF'a dönüşmeden kalan dihidrofolatpoliglutamalar ve MTX'in poliglutamat türevleri toksik inhibitör metabolitler şeklinde birikir. Timidilat sentezinin ve purinin sentezinde rol oynayan transformilaz enzimlerinin inhibisyonu, MTX'in iki poliglutamat metaboliti tarafından yapılır (11). MTX'in hücrelerdeki toksik etkileri dışarıdan ilaç olarak verilen folinik asit (N5-formiltetrahidrofolat) tarafından antagonize edilir; folik asidin kendisi ise bu durumda THF'a dönüşemediğinden antidotal etkinlik göstermez.



Şekil 4: Folik asit metabolizması

2.1.3. Metotreksat'ın antiproliferatif etkisi

MTX, yüksek dozlarda lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri gibi kanserlerin tedavisinde antiproliferatif olarak kullanılır (8). Bununla birlikte, RA'da düşük doz MTX tedavisinin mekanizması antiproliferatif etki ile açıklanmaz. Hirata; RA'da düşük doz MTX ile endotel hücre proliferasyonunun doğrudan inhibe olduğu görüşünde olmakla birlikte bazı araştırmacılar lenfosit proliferasyonunun inhibisyonu hakkında zıt görüşler bildirmişlerdir (8, 12).

2.1.4. Metotreksat'ın antiinflamatuvar etkisi

MTX, RA'da ve psöriatik artrit tedavisinde antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interlökin 1-beta gibi sitokinler ile metaloproteinazlar gibi inflamasyonun mediatörlerinin RA'da MTX tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir (13). Cronstein, MTX'in iki biyokimyasal mekanizma ile antiinflamatuvar etkide rolünün olduğunu öne sürmüştür.

1) Homosisteinin yeniden metilasyonunun inhibisyonu (14).

2) Adenozin salınması. İn vitro çalışmalarda fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde düşük doz MTX'in adenozin salınımına yol açtığı gösterilmiştir Adenozinin antiinflamatuvar etkide merkezi rolü vardır (14).

Adenozinin antiinflamatuvar etkisinin başlıca nötrofiller üzerinde olduğu, nötrofil adezyonunu ve serbest oksijen radikallerinin üretimini engellediği gösterilmiştir. Bu MTX'in gösterdiği antiinflamatuvar etkiyi açıklamaktadır (15).

2.1.5. Metotreksat'ın immunmodülatör etkisi

İmmün mekanizmalar RA'nın patogeneğinde önemli rol oynarlar. B ve T lenfositlerdeki aktivite artışının MTX ile baskılandığı gösterilmiştir. RA'lı hastaların idrar, sinovyal sıvı ve lenfositlerinde poliamin seviyeleri yüksek bulunduğu için, poliaminlerin RA'nın patogeneğinde rolü olabileceği düşünülmektedir. Poliaminlerin hücre proliferasyonu, farklılaşması ve immün yanıtta önemli görevleri vardır (16). MTX'in immünmodülatör etkisi poliaminlerin sentezindeki inhibisyon ile ilişkili olabilir (8).

2.1.6. Metotreksat'ın yan etkileri

MTX tedavisi esnasında ortaya çıkan yan etkiler oldukça yaygındır. Yan etkinin şiddeti değişkendir. En sık rastlanan yan etkiler hafif ve geri dönüşümlüdür. Bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme ve stomatit gibi yan etkiler sıklıkla dozla ilişkilidir. MTX tedavisi alan RA'lı hastaların yaklaşık %30'unda ilaç toksisitesi nedeniyle tedavi kesilir (8).

MTX toksisitesinin mekanizması hala tam anlaşılamamıştır. Ancak bazı yan etkiler; pürin, pirimidin, poliamin ve FA gibi metabolik yolların bozuklukları ile doğrudan ilişkilendirilmiştir. Kremer ve ark. ilk kez RA'lı hastaların karaciğer biyopsisinde MTX poliglutamatlarının birikmesine, FA eksikliğinin eşlik ettiğini göstermiştir (17). Değişik yollarda adenozin deaminazın (ADA) MTX tarafından inhibisyonu deoksiadenozin ve deoksiadenozin trifosfat (dATP) gibi adenozin metabolitlerinin birikimine yol açar. Adenozin, deoksiadenozin ve metilli adenozin metabolitleri yüksek konsantrasyonlarda muhtemelen doğrudan toksik etkilidirler. Deoksiadenozin kromozom kırıklarına ve S-adenozil homosistein (SAH) hidrolaz enziminde inaktivasyona yol açar. SAH-hidrolaz metilasyon reaksiyonları için

gereklidir. dATP, DNA sentezi için gerekli olan ribonükleotid redüktazı inhibe eder (8). Baggott ve ark. MTX tedavisi ile ADA inhibisyonu geliştiğini destekleyen veriler elde etmişlerdir (18). MTX'ın vasküler hastalık için risk faktörü olarak bilinen hiperhomosisteinemiye sebep olduğu bilinmektedir (8, 13).

Metilasyon reaksiyonlarının belirleyicisi olan S-adenozil metionin (SAM)/SAH oranında azalmaya neden olur. Metilasyon reaksiyonlarının inhibisyonu toksisiteye neden olabilir (8).

2.1.7. Metotreksat'ın hepatotoksitesisi

MTX'ın hepatotoksik etkisinin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (1). MTX karaciğerde enzimatik bir sistem aracılığıyla major ekstrasellüler metaboliti olan 7-hidroksimetotreksata dönüşür (19). MTX hücre içinde poliglutamata formunda tutulur. MTX kullanımı ile hücre içindeki poliglutamata formunun miktarı artar ve FA seviyeleri düşer. Bu da hepatosit nekrozuna sebep olur (20). Poliglutamata formunun seviyesinin artması intrasellüler alanda ilacın varlığını artırır. Bu mekanizmanın MTX'ın hepatotoksik etkisinin sebebi olduğu düşünülmektedir (17). Ayrıca MTX piruvat dehidrojenaz, 2-oksooglutarat dehidrojenaz, ve sitosolik nikotinamid adenozin difosfat (NADP) bağımlı dehidrojenazı inhibe eder. Nikotinamid adenozin difosfat glutatyon redüktaz enzimi tarafından, reaktif oksijen radikallerine karşı koruyucu bir antioksidan olan, redükte glutatyonun üretilmesi için kullanılır (21). MTX kullanımına bağlı olarak düşen NADP seviyeleri, hepatositleri reaktif oksijen radikallerine (süperoksid anyonları, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hipoklorit radikalleri gibi) karşı duyarlılaştıran glutatyon seviyelerinin düşmesine ve bu da hepatosit hasarına sebep olur (22).

2.1.8. Metotreksat toksisitesi ve oksidatif stres

Antikanser ilaçlarla yapılan toksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerine dikkat çekilmektedir. Karaciğer, böbrek, ince barsak ve merkezi sinir sistemindeki MTX'ın yan etki mekanizması olarak oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır (23, 24, 25, 26). HeLa hücresi mitokondrisinde piruvat dehidrojenaz, 2-oksooglutarat dehidrojenaz ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağımlı enzimler ile sitozolik NADP bağımlı dehidrojenazın MTX tarafından inhibe edildiği

gösterilmiştir. Babiak ve ark. MTX'in HeLa hücrelerinde vücudun önemli antioksidanı olan glutasyon seviyelerini azalttığını göstermişlerdir (21).

Jahovic ve ark. 20 mg/kg tek doz MTX intraperitoneal uygulanan ratların kan, karaciğer, böbrek ve ince barsak dokularında glutasyon seviyelerinde azalma, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan MPO aktivitesinde artma ve MDA seviyelerinde belirgin artma olduğunu bulmuşlardır (24). Miyazono ve ark. MTX'in yan etkisi olarak rat ince barsağında süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitelerinde artma, GSH seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX'in yol açtığı ince barsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdir (27). Benzer şekilde Devrim ve ark. MTX nefrotoksitesinde oksidatif stresin önemli rolünü ortaya koymuşlardır (25). Uz ve arkadaşları benzer şekilde MTX alan ratların böbrek dokularında nitrik oksid seviyelerinde artışı bildirmişlerdir (26). Bu nedenle MTX toksisitesinden korunmak için antioksidan ajanlarla birlikte kullanması gerekliliği öne sürülmektedir.

2.2. Probiyotikler

Bu yüzyılın başlarında Metchnikoff, faydalı mikroorganizmalara dikkat çekerek ilk probiyotik kavramını öne sürmüştür. Metchnikoff, intestinal flora bakterilerinin protein hidrolizi sonucu oluşturduğu amonyak, aminler ve indol gibi maddelerin konakta intoksikasyona neden olduğunu ve enerjisini protein hidrolizi yerine karbonhidrat fermantasyonundan sağlayan laktik asit bakterilerinin kullanımının faydalı sonuçlar verdiğini bildirmiştir. Ancak, bilimsel olarak bu organizmaların tanımlanması yirminci yüzyılın sonlarında mümkün olmuştur. Lilly ve Stillwell'in 1965'de, Parker'in de 1974 yılında kullandıkları probiyotik kavramını, 1989 yılında Fuller canlı mikrobiyal besin olarak, konağın mikrobiyal florasını düzenleyen, konak için faydalı mikroorganizmalar olarak tekrar tanımlamıştır (28). Probiyotikler, yeterli miktarlarda tüketildiğinde konakçıya sağlık kazandıran yaşayan mikroorganizmalardır (29).

2.2.1. Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri

Probiyotik bakteriler, mide asit salgısına diğer bakterilere göre daha dayanıklı, safra tuzlarına ve lizozim enzimine daha dirençlidir. Lactobacillus türleri ince barsakta fazla sayıda bulunurken Bifidobacterium'lar kalın barsakta

bulunurlar. Probiyotik bakteriler laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler üreterek, barsaklarda istenmeyen mikrofloranın çoğalma hızını kontrol ederler ve mikrofloranın dengede olmasını sağlarlar (30).

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda bazı özelliklerin olması gereklidir. Güvenilir olmalı, kullanıldığı insan ve hayvanda yan etki oluşturmamalı, sağlıklı insan bağırsağından alınmış olmalı ve stabil olmalıdır. Düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden bağırsakta metabolize olmalıdır. Barsak hücrelerine tutunabilmeli ve kolonize olabilmelidir. Karsinojenik ve patojenik bakterilere antagonistik etki yapmalıdır. Antimikrobiyal maddeler üretmelidir. Konakçıda hastalıklara direnç gibi yararlı etkiler oluşturabilmelidir. Antibiyotiklere dirençli olmalı, antibiyotiğe bağlı ortaya çıkan hastalıklarda barsak florasını düzenlemek amacı ile kullanılabilirdiğinden, bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemelidir. Üretim ve depolama sırasında canlılığını ve aktivitesini koruyabilmelidir. Probiyotikler patojenik olmamalı ve toksin üretmemelidir. Çok suşlu preparatların hazırlanmasına uygun olmalıdır. Probiyotik üretiminde kullanılan suşlar aktarılabılır antibiyotik direnç genleri içermemelidir (31, 32).

2.2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Probiyotik üretiminde yaygın olarak kullanılan laktik asit bakterileri *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, ve *Enterococcus* cinsine ait türlerdir. Bu mikroorganizmaların ortak özelliği karbonhidratları fermente ederek laktik asit oluşturmalarıdır. Laktik asit bakterileri dışında probiyotik olarak kullanılan diğer mikroorganizmalar ise *Bacillus*, *Saccharomyces* ve *Aspergillus*'tur. Her iki grubun etki mekanizmaları ve antibiyotik duyarlılıkları birbirinden farklıdır (33). Sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalar tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1: Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar (34)	
Lactobacillus türleri	<i>L. bulgaricus, L.cellebiosis, L. delbrueckii, L.lactis, L.acidophilus, L.reuteri, L. brevis, L.casei, L. curvatus, L.fermentum, L.plantarum, L. johnsonii, L.rhamnosus, L.helveticus, L.salivarius, L.gasseri, L.crispatus</i>
Bifidobacterium türleri	<i>B.adolescentis, B.bifidum, B.breve, B.infantis, B.longum, B.thermophilum</i>
Bacillus türleri	<i>B.subtilis, B.pumilus, B.lentus, B.licheniformis, B.coagulans, B.cereus</i>
Pediococcus türleri	<i>P.cerevisiae, P.acidilactici, P.pentosaceus</i>
Streptococcus türleri	<i>S.cremoris, S.thermophilus, S.intermedius, S.lactis, S.diacetilactis</i>
Bacteriodes türleri	<i>B.capillus, B.suis B.ruminicola, B.amylophilus</i>
Propionibacterium türleri	<i>P.shermanii, P.freudenreichi</i>
Leuconostoc türleri	<i>L.mesenteroides</i>
Küfler	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>
Mantarlar	<i>Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces Boulardii, Candida torulopsis</i>

2.2.3. Probiyotiklerin etki mekanizmaları

Probiyotikler, konak canlıyı patojenlere karşı koruyarak ve immün sistemini güçlendirerek etki gösterirler.

2.2.3.1. Probiyotiklerin antibakteriyel mekanizması

Probiyotiklerin ürettiği antimikrobiyal moleküller patojen mikroorganizmaların çoğalmasını sınırlar. Probiyotik suşlar hidrojen peroksit, organik asit, bakteriosin gibi etken maddeler sayesinde antibakteriyel özellik gösterirler (35). İn vitro olarak yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; laktobasillusların bir çoğu asetik asit ve laktik asit gibi metabolitlerinden ve pH'ı düşürmelerinden dolayı bakteriyel patojenlerin çoğalmasını engeller. Bazı laktobasiller (*Lactobacillus lactis, Lactobacillus casei* Shirota yada *Lactobacillus acidophilus* YIT 0070 suşları) hidrojen peroksit üreterek, *Escherichia coli* 0157:H7

çoğalmasını sınırlandırmışlardır (36). *L. Casei subsp. rhamnosus* Lcr35 suşunun süpernatantı dokuz insan patojeni bakterinin (enterotoksijenik *E.coli* –*ETEC*-, enteropatojenik *E. coli* –*EPEC*-, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* ve *Clostridium difficile*) üremesini inhibe etmiştir (37). İnsan sindirim sisteminden izole edilen lactobasillus suşlarının gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına neden olduğu bilinen dört patojenin (*Helicobacter pylori*, *campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *C. difficile*) üremesini sınırlandırdığı saptanmıştır (38). *L. casei* GG, in vitro olarak gram pozitif ve gram negatif bakterilerin çoğuna karşı ‘mikrosin’ adı verilen hücre dışı inhibitör madde üretir (39). Ancak, bu bileşiklerin sağlık üzerine etkide, anahtar rol oynadığını gösteren her hangi bir sonuç in vivo olarak belirtilmemiştir (40).

2.2.3.2. Probiyotiklerin adezyon mekanizması

Probiyotiklerin patojen mikroorganizmalara karşı intestinal sistemde bir bariyer oluşturarak, epitel hücrelerin bu mikroorganizmalarla bağlanma derecesini azalttığı düşünülür. Laktik asit bakterilerinin intestinal epitel hücrelerle adezyonunu sağlayan çeşitli yüzey determinantları vardır. Laktik asit bakterilerinin mikrobiyal adezyonu; pasif kuvvetler, elektrostatik ilişkiler, hidrofobik, sterik kuvvetlerle ve lipoteikoik asit, lektinlerle kaplı özgün yapılarla ilişkilidir (41). Toksin ve patojenlerin bağlanmasının engellenmesi, musin gibi konak faktörlerin uyarımı ya da reseptörlere kompetitif bağlanma hipotezinin öne sürülmesine karşın, inhibisyon mekanizması henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır (40).

2.2.3.3. Probiyotiklerin antiapoptotik etkisi

Yoğun probiyotik içeriği olan kefirin ratlarda radyasyonla-indüklenen apoptozise karşı koruyucu etkisi saptanmıştır. Matsuu ve ark. kolonda X-ışını ile indüklenen apoptozis üzerine kefirin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada, radyasyon verilmeden önce 12 gün fermente süt kefirini verilen ratlarla kontrol grubunu karşılaştırdıklarında, kefir verilen ratlarda apoptotik indeksin ve aktif kaspaz-3 (Cas3) ekspresyonunun önemli oranda azaldığını göstermişlerdir (42). Bu etki en belirgin olarak kriptomlarda stem hücrelerinin olduğu bölgede izlenmiştir. Kefirin anti-apoptotik etkisi Cas3 aktivasyonunun inhibe olmasına bağlanmıştır.

Yine insan melanoma hücrelerinde ultraviyole ile indüklenen apoptozise karşı kefirin koruyucu bir etkisi olduğu bildirilmiştir (43). Fermente süt ürünlerinin pelvik malignansilerde radyasyon tedavisinden sonra ortaya çıkan kronik barsak rahatsızlıklarını azalttığı bilinmektedir (44).

2.2.3.4. Probiyotiklerin antioksidan etkisi

Kefirin antioksidan etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Güven ve ark. farelerde karbon tetraklorür (CCl₄) ile indüklenen oksidatif hasarda kefirin GSH ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) seviyelerini arttırarak, lipid peroksidasyonunu ise azaltarak vitamin E'den daha koruyucu etki gösterdiğini saptamışlardır (45).

Farelerde probiyotiklerle yapılmış bir çalışmada probiyotiklerin D-galaktozamin ile oluşturulmuş karaciğer hasarında hepatosit hasarını, inflamasyonu ve proinflamatuvar sitokinleri azalttığı ve antioksidan aktiviteyi arttırdığı saptanmıştır (46). Yine başka bir çalışmada probiyotiklerin karaciğerdeki iskemi-reperfüzyon hasarından SOD'ü artırarak koruyucu etki gösterdikleri saptanmıştır (47). Kefirle yapılmış bir çalışmada azoxymethane verilerek kolonik kriptlerde anormal formasyon oluşturulan ratlarda kefirin GSH, nitrik oksid gibi antioksidanları arttırdığı saptanmış ve kefirin antioksidan rol oynadığı belirtilmiştir (48).

2.3. Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif stres

Serbest oksijen radikalleri (SOR), hücre metabolizmasında ortaya çıkan, en dış tabakalarında eşlenmemiş elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğiliminde olan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller hücrede lipit, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşiklere etkilidir. Membranı oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler gibi doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri radikaller için oldukça çekici hedeflerdir (49). Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizmanın maruz kaldığı "oksidatif stres", sonuçta bozulan hücresel metabolizma, moleküler yıkım ve doku hasarını getirir. Oksidatif hasarın olduğu dokuda artan radikal metabolitler ve bunların oluşturduğu lipit peroksidasyonu ile protein ve DNA oksidasyonu sonucu hücre membranında kontrol kaybolur; geçirgenlik artışı ve hücresel ölüm gelişir (49). İnsan vücudunda bütün hücrelere

hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküler oksijen, yapısı itibariyle radikal olmaya çok uygun olduğundan serbest radikal denilince aslında SOR akla gelmektedir. Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan SOR ile antioksidan defans sistemi bir denge halindedir. Antioksidan savunma mekanizmaları ile serbest radikal oluşumunu hızlandıran etkenler arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres ortaya çıkar. Yani yoğun SOR üretimi ya da antioksidan defansın azalması, biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açarak oksidatif strese neden olur. Hücrede mitokondrial respirasyon, hücrenin sinyal mekanizmasında ve bakterileri fagosite etmek gibi fonksiyonlarda reaktif oksijen türleri yaşam için gereklidir. Hücrelerin çoğu koruyucu mekanizma olarak da serbest radikalleri ortaya çıkarabilir. Karaciğer detoksifikasyon için serbest radikalleri kullanırken, nötrofiller patojenleri yok etmek için serbest radikalleri üretebilir. Nötrofillerin aktive olması ile ortaya çıkan solunum patlamasında rol alan NADPH oksidaz, SOD, nitrik oksit sentaz ve MPO gibi enzimler; süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit ve hidroklorik asit gibi reaktif ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar (51). Aşırı reaktif bu maddeler, diğer atom ve moleküllerle elektron alışverişine girerek, onların kimyasal yapılarını değiştirmek suretiyle kararsız (reaktif) bir atom haline gelmesine yol açabilirler.

Günümüzde serbest radikaller ve reaktif moleküller ile bunların reaksiyonları ve ürünlerindeki artışın hücresel yaşamı tehdit ve tahrip ettiği, genetik mutasyonlara da yol açtığı bilinmektedir (52). Kanseri, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitusu içeren birçok hastalıkta oksidatif hasarın rol oynadığı düşünülmektedir. Oksidatif hasar hastalığın başlangıcında veya patolojisinde rol oynuyorsa başarılı antioksidan tedavi hastalığı önleyebilir veya başlangıcını geciktirebilir. Bu bağlamda SOR'un seviyelerini arttırıcı etkenler olarak özellikle oksidatif strese yol açan nedenlerin bilinmesi, bunlardan uzak durulması oldukça önemlidir.

2.3.1. Serbest oksijen radikal türleri

Serbest radikal denildiğinde ilk olarak akla gelen biyolojik ortamlarda bulunan serbest oksijen radikalleridir. İskemi, hemoraji, intoksikasyon, radyoaktivite gibi durumlarda mitokondrilerde aerobik oksidatif fosforilasyon

dengesi etkilenir ve elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları oluşur. Oksijen molekülüne bir elektronun transfer edilmesi yoluyla oksijenin indirgenmesi ile süperoksit serbest radikal anyonu (O_2^-) oluşmaktadır ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$). Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi ise hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur ($O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) (53).

Hidrojen peroksit, geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla parçalanıp oksijen radikallerinin daha reaktifi ve biyolojik sistemlerde daha fazla hasar oluşturan hidroksil radikalini (OH^\cdot) oluşturur, bu nedenle serbest radikal biyokimyasında önemli yeri olan bir bileşiktir. ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$). Bu ifade edilen reaksiyon Fenton reaksiyonu (Demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonu) olarak adlandırılmaktadır (50).

2.3.2. Serbest oksijen radikali oluşumuna neden olan kaynaklar

Serbest oksijen radikallerinin eksojen ve endojen olmak üzere iki önemli kaynağı vardır. Eksojen kaynaklar olarak; ultraviyole ışınları, radyasyon, uyuşturucu ve alkol gibi bağımlılık yapan maddeler, ksenobiyotikler gibi bazı yiyeceklerde bulunan çeşitli toksik maddeler, hava kirliliği, hiperoksit, pestisitler, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar, sigara dumanı, MTX, cisplatin ve bleomisin gibi antineoplastik ajanlar, katekolamin seviyesini artıran stres durumları; ve elektromanyetik alanlar sayılabilir (54, 57). Endojen kaynaklar olarak ise; mitokondrial elektron transport sistemi, peroksizomlarda bulunan enzimler, küçük moleküllerin otooksidasyonu; tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiotikler vs., endoplazmik retikulum ve nükleus membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450), makrofaj gibi fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlama, plazma membranı enzimleri (NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu vs.) sayılabilir (58).

2.3.3. Serbest radikallerin hücreler üzerindeki etkileri

2.3.3.1. Lipidlerde meydana gelen yapısal değişiklikler

Plazma membranı, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi biyolojik membranlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinde serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasara lipid peroksidasyonu denilmektedir (59). Lipid

peroksidasyonu, bir lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks bir olaydır. Lipid peroksidasyonu sonucunda hücrede kendiliğinden devam eden zincirleme reaksiyonlar başlamaktadır. Oksidasyon sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonları başlatırlar (59). Bu ürünlerin daha ileri parçalanmaya uğraması ile hidroperoksidlere, hidroperoksidler de daha zararlı radikal özelliği olan aldehidlere dönüşürler. Bu aldehidler içinde en çok bilineni MDA'dır. Dolayısıyla bir dokuda MDA seviyesinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir (60). Malondialdehidin kendisi de üretildiği yerde iki yönlü hareket edebilir; hem dış ortama hem de hücrenin iç kısmına yönelebilir. Hücre içinde bir çok yapıya zararlı etkileri vardır. Dolayısıyla serbest oksijenlerin lipidlere etkisi sonucu açığa çıkan patolojik ürün olan MDA da daha ileri yıkımlara sebep olabilir. Hücre membranlarının lipid kısmının büyük çoğunluğu fosfolipid ve bunların yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinden oluşmuştur. Bu hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozulur.

2.3.3.2. Proteinlerde ve nükleik asitlerde meydana gelen yapısal değişiklikler

Serbest radikal etkilerine karşı protein ve nükleik asitler, poliansatüre yağ asitlerine göre daha dirençlidir. Bunun başlıca sebebi, hasar oluşturucu zincir reaksiyonlarının protein ve nükleik asit moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır. Serbest radikaller DNA molekülüne çok yakın bir bölgede meydana geliyorsa, okside edici radikaller tarafından DNA molekülü kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir (61).

2.3.4. Enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistemler

Antioksidanlar enzimatik ve non enzimatik antioksidanlar olarak iki ana gruba ayrılabilirler.

2.3.4.1. Nonenzimatik antioksidanlar

Glutasyon: Oksidatif stresin ölçümünde kullanılan antioksidandır. Redükte glutasyon (GSH)/ okside glutasyon (GSSG) oranı, oksidatif durumlarda azalır. GSH

ve GSSG “high performance lipid chromatography” (HPLC) ve spektrofotometrik yöntemlerle tesbit edilir (55). Glutasyon karaciğerde glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Çok önemli bir antioksidan olan glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girip onları zararsız ürünlere çevirerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Proteinlerdeki sülfidril gruplarını da indirgenmiş halde tutarak onların okside olmasını engeller (56).

S-adenozil metionin: Tüm hücrelerde metioninden sentezlenir. Hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli rolü vardır. Antioksidan aktivitesi glutasyon prekürsörü olarak tanımlanmıştır (62).

E Vitamini: E vitamini tokoferol yapısındadır. Dört tipi vardır. α -tokoferol en fazla bulunan ve antioksidan etkisi en fazla olan şeklidir. E vitamini dokularda en önemli zincir kırıcı antioksidandır ve lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki korunma mekanizmasıdır (59). Membranların lipid kısmında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Hücre membranlarında O_2^- , OH^- gibi radikalleri inaktive eder ve lipid peroksit zincirini kırarak lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını durdurur (63).

C vitamini: Ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Süperoksit ve hidroksil radikalini doğrudan temizleme özelliği vardır (63).

Seruloplazmin: Süperoksid dismutaz benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Demirin +2 değerlikli halden +3 değerlikli hale yükseltgenmesini sağlayarak Fenton reaksiyonunu inhibe eder. Bu sayede serbest radikal oluşmasını inhibe eder (64).

Transferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir (65).

Ürik asit: Normal plazma konsantrasyonlarında süperoksit, hidroksil ve peroksil radikallerini temizler (64).

Albümin: Geçiş metallerini bağlar, lipidhidroperoksid ve hipoklorid toplayıcısıdır (64).

Bilirubin: Serbest radikal tutucusudur, süperoksit ve hidroksil radikal toplayıcısıdır (65).

Glukoz: Hidroksil radikal tutucusudur (66).

Piruvat: Güçlü antioksidandır ve H_2O_2 bağlayıcı özelliği vardır (67).

Taurin: Yarı esansiyel bir aminoasittir. Lipid peroksidasyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek antioksidan etkili olduğu gösterilmiştir. Taurin

ratlarda MTX'in yol açtığı doku hasarını önlemiştir. Ksenobiotiklere bağlanma yeteneği vardır. Hipoklorit ile de reaksiyona girerek etkisini azaltır (68).

β-Karoten: A vitamininin prekürsürüdür. Hücre membranlarında bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir. Peroksitlere karşı doğrudan etki ederek onları inaktif hale getirir (69).

Melatonin: Pineal bezden salgılanan indolamin yapısında bir hormondur. Yüksek lipofilik özelliği olup membranları kolaylıkla geçer. Melatonin antioksidan olarak özellikle OH radikalini ortadan kaldırmada çok etkilidir (57).

Sistein: Serbest radikal ve hipoklorit toplayıcısıdır (59).

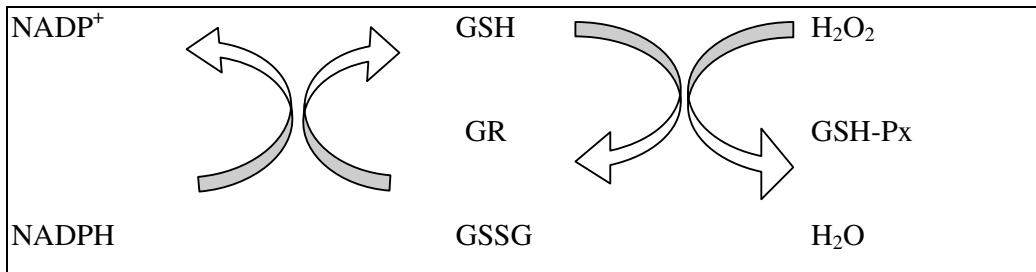
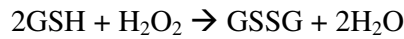
2.3.4.2. Enzimatik antioksidanlar

Başlıca antioksidan enzimler; GSH-Px, katalaz ve SOD'dur (56).

Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz yapısında bir metal olan selenyumu bulundurduğu için metaloenzim grubunda değerlendirilir. Bu enzim, redükte glutasyonun okside glutatyona çevrildiği in vitro ortamda gerçekleşen reaksiyonda H₂O₂'i yüksek spesifite ile kullanarak onu detoksifiye etmektedir (Şekil 5). GSH'un GSSG haline dönüştüğü reaksiyonda GSH-Px enzimi H₂O₂'i suya indirger. Daha sonra glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak okside glutasyon tekrar redükte hale dönüştürülebilir (56).

Reaksiyon şu şekildedir:



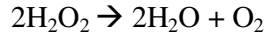
Şekil 5: Glutasyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü (GSH=Redükte glutasyon, GSSG=Okside glutasyon, GSH-Px=Glutasyon peroksidaz, GR=Glutasyon redüktaz, H₂O₂=Hidrojen peroksit).

Hidrojen peroksidin düşük konsantrasyonda olması durumunda GSH-Px katalaza göre daha etkilidir (70).

Katalaz

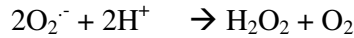
Katalaz enzimi, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Özellikle hidrojen peroksite yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda etkilidir (70). Okside edici enzimlerin etkisiyle ortamda oluşan hidrojen peroksiti direkt olarak suya dönüştürür. Bu enzimin aktivitesi, ortamdaki hidrojen peroksit konsantrasyonunun çok fazla arttığı durumlarda belirgin olarak artmaktadır. Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonunun düşük olduğu hallerde ise hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdaki uzaklaştırırlar (71). Katalaz ve GSH-Px enzimleri, benzer etkisi olmasına rağmen hücre içindeki yerleşim yerleri ve etki yerleri bakımından farklılık göstermektedirler. Katalaz enzimi peroksizomlarda daha etkili iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkilidir.

Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



Süperoksid dismutaz

Tek bir enzim değil, süperoksite radikallerinin hidrojen peroksite dönüşmesini katalizleyen enzim grubudur. Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



Süperoksid dismutaz enzimi metal ihtiva ettiği için metaloenzim grubundandır. Hücreyi radikallerin etkisinden koruyan savunma mekanizması arasında SOD enzimi ilk rolü oynar. SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürünün birikimi CAT enzimi tarafından önlenmektedir. (72).

2.4. Apoptozis

Yunanca'da "yaprak dökümü" anlamına gelmektedir. İlk olarak 19. yüzyılda söz edilmiş olmakla birlikte, apoptozisin kapsamlı tanımını Kerr ve arkadaşları "mitozun tersi ama tamamlayıcısı" olarak yapmışlardır (73). Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (74). Birçok hastalığın patogenezinde

uygunsuz apopitozis sonrası hücre sayısında anormal azalma veya daha sık olarak apopitozisteki kusur sonrası hücrelerin aşırı birikimi yattığı için, bu hastalıkların tedavisinde apopitozisi hedefleyen ajanların kullanılabilceği düşünölmektedir (75).

Apopitozise uğrayan hücrelerde görölen değişikliklerin çoğu, intranökleozomal DNA yıkımı ve karakteristik morfolojik değişimlerdir. Bu değişimler değişik hücre içi peptitlerin seçici proteolitik bölünmesini yansıtır. İntranökleozomal DNA yıkımı, apopitozisin biyokimyasal işaretidir (76). Apopitozisin diğer bir biyokimyasal işareti normalde plazma membranının iç yüzeyinde yerleşim gösteren fosfatidilserinin dış yüzeye çıkmasıdır. Bu durum fagositik hücreler tarafından tanınma sinyalinin oluşturur (77). Apopitotik kromatin yoğunlaşması, morfolojik değişikliklerin ilk belirtisidir (76). Hücreler özelleşmiş yüzey yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçölür, büzölürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı, organellerin birbirine yaklaştığı görölür. Membranlar bütönlüklerini korurlar. Organeller genel olarak sağlamdırlar. Bazen ribozomlarda çökme izlenir. Sitoplazmada yüzeye paralel yerleşmiş mikrofilaman kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görölür. Mitokondriler genellikle genel yapılarını korurlar. Apopitotik süreç ilerledikçe sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara “apopitotik cisim” adı verilir. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında çekirdek parçaları da mevcuttur (74). Apopitozise uğrayan hücre, makrofajları uyarmak suretiyle apopitotik cisimlerin fagosite edilmesini sağlamakta ve süreç tamamlanmaktadır (78).

Apopitozis, nekrozdaki farklı bir hücre ölümü yoludur; nekroze olan hücrede membran bütönlüğünün kaybolmasını izleyerek, hücre içeriğinin bozulması ve eksudatif inflamasyon gelişmesi söz konusudur. Apopitozis ve nekroz, aynı uyarılarla aktive olabilmektedir; hücre içi ATP miktarı yeterliyse apopitozis, yetersizse nekroz geliştiği gösterilmiştir (79).

2.4.1. Kaspazlar

Apopitozis değişik şekildeki sinyallerle harekete geçirilebilir. Bu mekanizmalardan biri sitoplazmada bulunan proteazların aktivasyonudur. Bu

proteazlardan en önemlisi kaspaz (Cas) adı verilen proteaz grubudur. Kaspaz, “*cysteinyl aspartate specific protease*”ın kısaltılmış adıdır.

2.4.1.1. Kaspazların genel özellikleri

Kaspazlar, inaktif proenzim olarak sentezlenirler. Hücre apoptozise başladığında çözünerek aktif enzime dönüşürler (79). Spesifik aspartat bölünme bölgelerinde bölünmeyi takiben aktive olurlar (80).

Günümüzde 14 Cas ailesi bulunmuştur. Kaspazlar; *prodomain*, büyük alt parça ve küçük alt parça olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. *Prodomain*; “ölüm parçaları” (DD), “ölüm efektör parçaları” (DED) ve “Kaspaz yeniden oluşum parçası”ndan (CARD) meydana gelmektedir. Temel olarak üç gruba ayrılırlar (81):

Grup 1: İnflamatuvar Cas’lar (uzun *prodomain* taşırlar): Cas1, 4, 5, 11, 12, 13, 14 bu gruptadır.

Grup 2: Başlangıç Cas’lar (uzun *prodomain* taşırlar): Cas2, 8, 9, 10 bu gruptadır.

Grup 3: Effektör Cas’lar (kısa *prodomain* taşırlar): Cas3, 6, 7 bu gruptadır.

Kaspazların bağlanabileceği 250 kadar substrat vardır; bu substratlar, Cas’ların aspartik asit çözünme noktalarına bağlanarak, etkilerini göstermelerini sağlarlar (79). Hücre apoptozisinde, Cas’a bağımlı olmayan yollar da bulunmakla beraber, karakteristik olarak apoptozis, Cas aktivasyonu ve bunun sonucunda oluşan hücre içi özgün proteinler yoluyla meydana gelmektedir (82). Apoptozis, başlangıç, ölüm ve yıkım safhalarına ayrılır. Başlangıç Cas’ları, başlangıç kompleksleri adı verilen ve içinde çok sayıda başlangıç Cas zimojeni bulunan yapılarda etkinleşmektedir. Bunlar da efektör Cas’ları uyararak apoptozisi yürütmektedir (83).

2.4.2. Apoptozis işleyiş mekanizmaları

Apoptozisi başlatan iki alternatif yol vardır. Bunlardan birincisi ekstrinsek yol olarak bilinen hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği yoldur. İkincisi ise intrinsek yol olarak da bilinen mitokondrilerin aracılık ettiği yoldur (84). Bilinen bu iki yol da hücrel substratları bölen, apoptozisin biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerine yol açan Cas sistemini aktive etmektedir.

1-Ekstrensek yol (Ölüm reseptör yolu): Ölüm reseptörleri aracılı apopitozis adı da verilmektedir. Özellikle immün sistemin iç dengesini korumada önemli roller üstlenmektedir (85). Ölüm reseptörleri, DD ve DED'in bağlanması ile etkinleşirler. Ölüm reseptörlerinden ayrılan Fas (CD95), "ölüm indükleme sinyal kompleksi"ni (DISC) oluşturarak, procaspase-8'i etkinleştirir. DD ve DED parçaları olan proteinler procaspase-8'e bağlanarak, otokatalitik bir reaksiyon oluştururlar ve procaspase-8 konsantrasyonu artar (86). Bu artış sonucu, bir efektör Cas olan kaspaz-3 (Cas3) etkinleşir. Başka formdaki ölüm reseptörleri, "tümör nekroz faktör ilişkili apopitozis sağlayan ligand" (TRAIL) ile uyarılarak benzer reaksiyonları geçirirler.

2-İntrensek yol (Mitokodriyal yol): "Mitokondri aracılı yolak" adı da verilir. Hücre dışı sinyallerle veya DNA hasarı ile etkinleşen yolaktır. Mitokondriden salınan apopitotik proteaz aktive eden faktör-1 (Apaf-1) ve sitokrom c tarafından uyarılır. Sitokrom c, Apaf-1 ile birleşerek, kaspaz-9'u (Cas9), o da Cas3'ü etkinleştirerek apopitozisi sağlar. Başlangıç Cas'ları, proapopitotik sinyaller (örneğin inflamatuvar sitokinler, DNA hasarı) tarafından aktive edildikten sonra, efektör Cas'ları (Cas3, Cas6 ve Cas7) uyarırlar. Effektör Cas'lar ise nükleer proteinleri uyararak apopitozisi sağlarlar (87).

2.4.3. Apopitozis ve Bcl-2 / Bax

İlk kez folliküler B lenfomada t (14:18) noktasında bulunan Bcl-2'nin, proapopitotik ve antiapopitotik protoonkojenleri bir arada bulunduran Bcl-2 ailesinin üyesi olduğu saptanmıştır (78). Bcl-2, temel olarak mitokondriye bağlanarak apopitozisi engeller. Bax ise aynı ailenin proapopitotik bir üyesidir. Bcl-2 ailesinin pro ve antiapopitotik üyeleri bir sinerji içinde çalışarak hücrenin apopitotik sinyale olan duyarlılığını belirlerler (88). Mitokondri, özellikle intrensek apopitotik yolağın merkezidir; Bax, mitokondriye bağlanarak intrensek yolağı başlatırken, Bcl-2, Bax'ın aktive olmasını engellemektedir (78).

2.4.4. Apopitozis ve Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)

TNF- α , aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanan, proinflamatuvar, pirojen, akut faz reaktanı olan bir sitokindir. Endotoksin, inflamatuvar olaylar,

immün kompleksler, fiziksel hasar ve toksinler salınımını uyarmaktadır. TNF- α , endotel aktivasyonuna yol açarak, nitrik oksit salınımını ve inflamasyonu körükler, prokoagülan ortam hazırlar, fibroblastları uyararak kollagen sentezini artırır ve lökositleri aktive ederek inflamatuvar sitokin salınımına yol açar (89). TNF- α ayrıca, apoptozisin ekstrinsek yolağında, özellikle Cas3 aktivasyonunda önemli rol oynadığı gibi, intrinsek apoptozis yolağında da başlangıç Cas'larını aktive etmek suretiyle etkin olduğu gözlenmiştir. Proapoptotik bir sinyal olarak kabul edilen TNF- α 'nın antagonistleri, antiapoptotik etkinlik göstermektedirler (78).

3. MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda; MTX uygulanan ratlarda, probiyotiklerin oksidatif stres ve apopitozis yolunda oluşturduğu değişiklikler incelendi. Denejde kullanılan malzemeler Ek 1’de gösterilmiştir.

3.1. Yöntem

Çalışmada; 8-12 haftalık, ortalama 250 gr ağırlığında 48 adet erkek Wistar-albino rat kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (23° C) bulunduruldu ve standart rat yemi ile beslendi. Son gün işlemlerinden 24 saat önce katı besin, 2 saat önce su alımları kesildi. Kaprofajiyi önlemek için kafes içine tel altlıklar yerleştirildi.

Çalışmamız, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı ve tüm çalışma boyunca etik kurallara uyuldu.

3.2. Probiyotik karışım

Çalışmada daha önce Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Gıda Mühendisliği Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında dışkı örneklerinden elde edilen izolatlardan hazırlanan probiyotik karışım kullanılmıştır. Bu karışım başka bir çalışmada da başarı ile kullanılmış ve daha önce tanımlanmıştır (90).

Probiyotik karışımında, 10 Laktobasil ve 3 Enterokok suşu bulunmaktadır (8 *Lactobacillus plantarum*, 2 *Lactobacillus rhamnosus* ve 3 *Enterococcus faecalis*). Her bir izolattan ml’de 10^9 bakteri olacak şekilde MRS Broth’a %1’lik inokülasyon yapıp anaerob ortamda 37° C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Üreyen bakteri sayısını kontrol etmek için MRS Broth’tan MRS Agar’a damla kültürü yapıp anaerob ortamda 37° C’de 48 saat inkübe edilerek koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında sıvı kültürler falkon tüplerine aktararak hücre pelletlerinin elde edilmesi için 5000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiş ve daha sonra süpernatant kısmı atılarak PBS ile 3 defa yıkanmıştır. Probiyotik karışım bir sıçanın günlük oral alımı olan 0.2 ml skim milk besiyerinde her bir bakteriden 10^9 hücre, toplam 13×10^9 hücre olacak şekilde süspanse edilmiştir. Skim milk içinde hazırlanan canlı bakteri süspanسیونları steril cam tüplere dağıtılıp üzeri parafinle kapatılarak -80° C’de kullanım için saklanmıştır.

3.3. Deney protokolü

Deney hayvanları Metotreksat (MTX), folik asit (FA), serum fizyolojik (SF), probiyotik (PB), skim milk (SM) kullanımına göre 8 gruba ayrıldı.

Grup 1 (SF-SM): Temel kontrol grubu olan bu gruptaki ratlara birinci gün intraperitoneal yolla SF (MTX volümüne ml/kg eşit olacak şekilde) verildi. Günlük 0.2 ml SM plasebo olarak 7 gün boyunca orogastrik yolla verildi.

Grup 2 (SF-PB): Birinci gün intraperitoneal yolla SF (MTX volümüne ml/kg eşit olacak şekilde) verildi. Probiyotik karışım, 7 gün boyunca karışım içindeki her bir bakteriden günde 10^9 hücre olacak şekilde 0.2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi.

Grup 3 (FA-SM): Birinci gün intraperitoneal yolla 20 mg/kg FA verildi. Orogastrik yoldan günlük 0.2 ml SM plasebo olarak 7 gün boyunca orogastrik yolla verildi.

Grup 4 (FA-PB): Birinci gün intraperitoneal yolla 20 mg/kg FA verildi. Probiyotik karışım, 7 gün boyunca karışım içindeki her bir bakteriden günde 10^9 hücre olacak şekilde 0.2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi.

Grup 5 (MTX-SM): Birinci gün intraperitoneal yolla MTX 20 mg/kg dozda uygulandı. Günlük 0.2 ml SM plasebo olarak 7 gün boyunca orogastrik yolla verildi.

Grup 6 (MTX-PB): Birinci gün intraperitoneal yolla MTX 20 mg/kg dozda uygulandı. Probiyotik karışım, 7 gün boyunca karışım içindeki her bir bakteriden günde 10^9 hücre olacak şekilde 0.2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi.

Grup 7 (MTX-FA-SM): Birinci gün intraperitoneal yolla MTX 20 mg/kg ve FA 20 mg/kg verildi. Günlük 0.2 ml SM plasebo olarak 7 gün boyunca orogastrik yolla verildi.

Grup 8 (MTX-FA-PB): Birinci gün intraperitoneal yolla MTX 20 mg/kg ve FA 20 mg/kg verildi. Probiyotik karışım, 7 gün boyunca karışım içindeki her bir bakteriden günde 10^9 hücre olacak şekilde 0.2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi.

Tablo 2: Deney protokolü

	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün	8.gün
Grup 1	SF-SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	EX
Grup 2	SF-PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	EX
Grup 3	FA-SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	EX
Grup 4	FA-PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	EX
Grup 5	MTX-SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	EX
Grup 6	MTX-PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	EX
Grup 7	MTX-FA-SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	EX
Grup 8	MTX-FA-PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	EX

(MTX: Metotreksat, FA: Folik asit, PB: Probiyotik, SM: Skim milk SF: Serum fizyolojik EX: Sakrifikasyon)

Deney başlangıcında ve 8. gün sakrifikasyondan önce ratların ağırlıkları tartıldı. Deney başlangıcında ve 8. gün sakrifikasyondan önce kafeslerden gaita örnekleri alınarak gaita kültürleri ekildi. İlaç uygulamaları hayvanların ağırlıklarına göre yapıldı. Son gün işlemlerinden 24 saat önce katı besin, 2 saat önce de su alımları kesildi. Orogastrik uygulamalar gavaj iğnesi ile gerçekleştirildi. Deneyin beşinci günü Grup 5'deki (MTX-SM grubu) 2 rat ex oldu. Hayvanların sakrifiye edilmesi genel anestezi ile gerçekleştirildi. Genel anestezi için intraperitoneal yolla 1 mg/kg xylazine + 0.5 ml/kg ketamin yapıldı. Sakrifiye edilen ratların median hattan yapılan insizyonla batınları açılarak kalp içinden kan alındı. Daha sonra histopatolojik, immunhistokimyasal ve biyokimyasal incelemeler için karaciğer doku örnekleri alındı. Histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme için doku örnekleri %10 formaldehit içinde saklandı. Biyokimyasal incelemeler için alınan örnekler hassas terazi ile tartılarak ağırlıkları kaydedildi ve Eppendorf tüplerinin içine yerleştirilerek biyokimyasal çalışmalar yapılana kadar -20° C'de saklandı.

3.4. Histolojik değerlendirme

Doku örnekleri, Hematoksilen ve Eosin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Hematoksilen ve Eosin ile boyamada MTX'ın akut hepatotoksik etkisinin değerlendirilmesinde karaciğerde nekroz ve yağlanma ön planda değerlendirildi.

3.5. İmmünohistokimyasal incelemeler

Karaciğer hepatositlerinde meydana gelen ve apoptozis regülasyonunda çeşitli aşamalarda rol alan protein ekspresyonları değerlendirildi. TNF- α , Bax, Cas8 ve Cas3 ekspresyonu formol fikse parafin bloklarından hazırlanan kesitlerde immünohistokimyasal yöntemle araştırıldı. Değerlendirme, hepatositlerde boyanma şiddeti ve boyanma yaygınlığı dikkate alınarak yapıldı. Boyanmanın şiddeti; zayıf (1 puan), kuvvetli (2 puan) olarak, boyanmanın yaygınlığı; fokal (1 puan) ve yaygın (2 puan) olarak derecelendirildi. Hepatositlerdeki sitoplazmik boyanma, pozitif boyanma olarak alındı.

3.5.1. TNF- α , Bax, kaspaz-8 ve kaspaz-3 ekspresyonu

Formol fikse parafin bloklardan kesitler lizinli lama alınarak, 0,4 mikron kalınlığında kesildi ve 37 °C'lik etüvde bir gece bekletildi ve ardından 10 dakika ksilende bekletilerek deparafinizasyon yapıldı. Daha sonra, 5 dakika absolu alkolde, hemen ardından, 5 dakika % 96'lık alkolde bekletilerek dehidratasyon işlemi yapıldı. İşlem sonrası 3 dakika kadar distile su ile yıkandı. Kesitler, *antiijen retrieval* uygulaması için *citrate buffer tamponu*, pH: 6,00 içinde 98 °C de 20 dakika boyunca ısıtıldı ve yine aynı tampon içinde 20 dakika oda ısısında soğutuldu. Distile sudan geçirilen kesitlere % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) *blocking* damlatılarak 20 dakika inkübasyon yapıldı. PBS ile yıkanarak, Ultra V blok (Labvision-TA-125-UB) ile *blocking* yapılan kesitlere 5 dakika inkübasyon yapıldı. Bu işlem sonrası, kesitler yıkanmadan, üstündeki blocking solüsyonu silkelenerek *primary antibody* damlatıldı. TNF *alpha clone P/T2 mouse monoclonal*, 1/100 dilüsyon, (Histopathology-Macaristan), Bax *rabbit polyclonal (Ab 16837)* 1/100 dilüsyon, (Santa Cruz - Amerika Birleşik Devletleri), Caspase-3 *Ab-4 rabbit polyclonal*, 1/50 dilüsyon, (Labvisison-Fremont-Kaliforniya-Amerika Birleşik Devletleri), Caspase-8 *Ab-4 rabbit polyclonal*, 1/50 dilüsyon, (Labvisison-Fremont-Kaliforniya-Amerika Birleşik Devletleri) primer antikolarıyla sırasıyla 60, 60, 30 ve 30 dakika inkübe edildi. Yapılan işlemler sonrası PBS'te 3 dakika süreyle yıkanan kesitlere *Biotinylated Goat Ant-Polyvalent* (Labvision TP-125-BN) damlatılarak 20 dakika süreyle inkübasyon uygulandı ve PBS'te tekrar yıkandı. *Large Volume Streptavidin Peroxidase* (Labvision TS-HR-125) damlatıldıktan

sonra 20 dakika süreyle inkübasyon yapıldı ve bir daha PBS'te yıkandı. *DAB Chromogen* damlatılan kesitlere 15 dakika kadar inkübasyon yapıldı ve ardından distile suda 3 dakika süreyle yıkandı. Zıt boyama için Mayers hematoksilen ile kesitler 1 dakika boyandı ve ardından distile suda 3 dakika süreyle yıkandı. Yıkama işlemleri tamamlanan preparatlar % 96'lık alkolden geçirilerek havada kurutuldu. Son olarak ksilene konulan preparatlar Entelan ile kapatıldı.

3.6. Biyokimyasal ölçümler

Malondialdehid seviyesinin tayini Mateos ve arkadaşlarının dinitrofenilhidrazin ile türevlenme esasına dayanan HPLC metodu kullanarak ölçüldü (91). Glutasyon ölçümü Beutler ve arkadaşlarının uyguladıkları yöntemlere göre yapıldı (92). Dokuya nötrofil infiltrasyonunu gösteren MPO enziminin aktivitesi, MPO aracılı H₂O₂ ile yapılan oksidasyon için substrat olarak 4-aminoantipyrine/phenol solusyonu kullanılarak yapıldı (93).

Serum alanin amino transferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST) ve alkalin fosfataz (ALP) seviyeleri Abbott Aeroset (USA) otoanalizöründe kolorimetrik yöntemle çalışıldı. Folik asit seviyesi ise Roche ELCSYS 2010 (Tokyo/Japan) cihazında kemilüminesans yöntemi ile çalışıldı.

3.7. İstatistik değerlendirme

Gruplar arasındaki kantitatif verilerin farklılaşmasının önemi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi ve varyans analizinde anlamlı farklılaşma saptanmışsa *post hoc* Tukey testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Deney grupları arasındaki immunohistokimyasal skorların farklılığını değerlendirmek için Kruskal–Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi önemli farklılaşma gösterirse, hangi grubun diğerinden farklı olduğu Mann-Whitney *u* testi ile araştırıldı. Önemlilik düzeyi $P < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Ratlardaki ağırlık değişiklikleri

Tüm gruplarda ratların ortalama ağırlıkları deneyin sonunda artarken, MTX-SM grubunda düştü. MTX-SM grubundaki 2 rat deneyin beşinci günü ex oldu. Ratların çalışmaya başlamadan ve sakrifikasyon öncesi ortalama ağırlıkları tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3: Çalışma öncesi ve sakrifikasyon öncesi ratların ortalama ağırlıkları			
Gruplar	Grup açıklaması	çalışma öncesi (gr)	alışma sonrası (gr)
Grup 1	SF-SM	241	251
Grup 2	SF-PB	238	254
Grup 3	FA-SM	242	254
Grup 4	FA-PB	236	248
Grup 5	MTX-SM	247	226
Grup 6	MTX-PB	240	252
Grup 7	MTX-FA-SM	241	250
Grup 8	MTX-FA-PB	242	256

4.2. Ratların gayta kültürleri

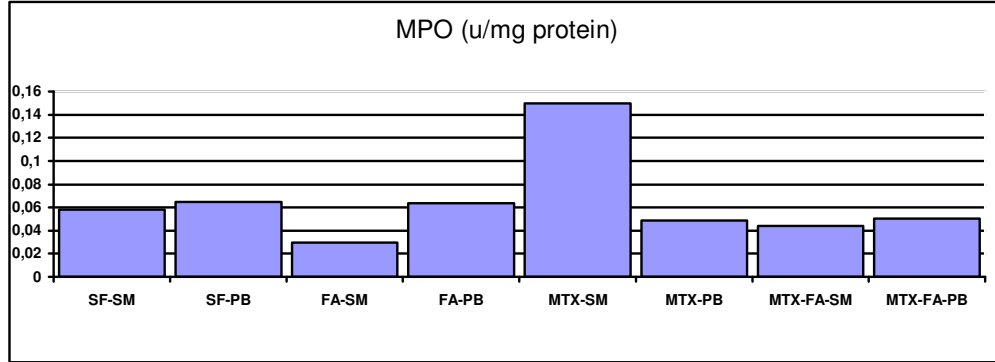
Deneyin ilk günü ve son günü ratlardan alınan gayta örnekleri Man Rogosa Sharp Agar, Azide Dextroz Broth, Kanlı Agar ve McConkey Agar besiyerlerine ekildi. Probiyotik alan grupların son gün alınan gayta kültürlerinde belirgin şekilde laktobasil üremesi gözlendi.

4.3. Karaciğerde myeloperoksidaz aktivitesi

MTX-SM grubunda karaciğerdeki MPO seviyesi diğer bütün gruplara göre anlamlı şekilde yüksek saptandı ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılaşma saptanmadı. Karaciğer doku homojenatlarında bakılan MPO seviyeleri tablo 4’de ve şekil 6’da gösterilmiştir.

Tablo 4: Karaciğerde myeloperoksidaz aktivitesi		
Gruplar	Grup açıklaması	MPO (U/mg protein)
Grup 1	SF-SM	0,058±0,010
Grup 2	SF-PB	0,065±0,015
Grup 3	FA-SM	0,029±0,017
Grup 4	FA-PB	0,064±0,010
Grup 5	MTX-SM	0,150±0,029 ^{1,2,3,4,5,6,7}
Grup 6	MTX-PB	0,048±0,011
Grup 7	MTX-FA-SM	0,044±0,009
Grup 8	MTX-FA-PB	0,050±0,014

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.¹SF-SM grubuna göre p=0,006, ²SF-PB grubuna göre p=0,008, ³FA-SM grubuna göre p=0,001, ⁴FA-PB grubuna göre p=0,007, ⁵MTX-PB grubuna göre p=0,01, ⁶MTX-FA-SM grubuna göre p=0,0001, ⁷MTX-FA-PB grubuna göre p=0,001



Şekil 6: Karaciğerde MPO aktivitesinin gruplara göre karşılaştırması

4.4. Malondialdehid aktivitesi

Karaciğer MDA seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Serum MDA seviyeleri MTX-PB grubunda SF-SM, SF-PB alan gruplara göre anlamlı şekilde yüksek saptandı. Eritrosit MDA seviyeleri MTX-FA-SM grubunda FA-SM ve FA-PB grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptandı. Karaciğer, serum ve eritrositlerdeki MDA seviyeleri tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5: Malondialdehid aktivitesi				
Grup	Grup açıklaması	Karaciğer MDA (nmol/MI)	Serum MDA (nmol/MI)	Eritrosit MDA (nmol/MI)
Grup 1	SF-SM	19,56±2,27	1,55±0,38	3,73±0,46
Grup 2	SF-PB	18,04±2,09	0,99±0,20	7,53±2,15
Grup 3	FA-SM	12,70±3,13	1,23±0,10	9,02±0,80
Grup 4	FA-PB	14,39±2,85	1,12±0,11	8,72±1,48
Grup 5	MTX-SM	15,31±0,68	1,40±0,09	5,86±2,09
Grup 6	MTX-PB	17,91±4,32	1,83±0,09 ^{1,2}	5,33±0,85
Grup 7	MTX-FA-SM	24,63±5,90	1,45±0,15	1,74±0,47 ^{3,4}
Grup 8	MTX-FA-PB	16,50±3,64	1,61±0,16	4,07±1,70

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.¹SF-SM grubuna göre p=0,012, ²SF-PB grubuna göre p=0,035, ³FA-SM grubuna göre p=0,004, ⁴FA-PB grubuna göre p=0,004.

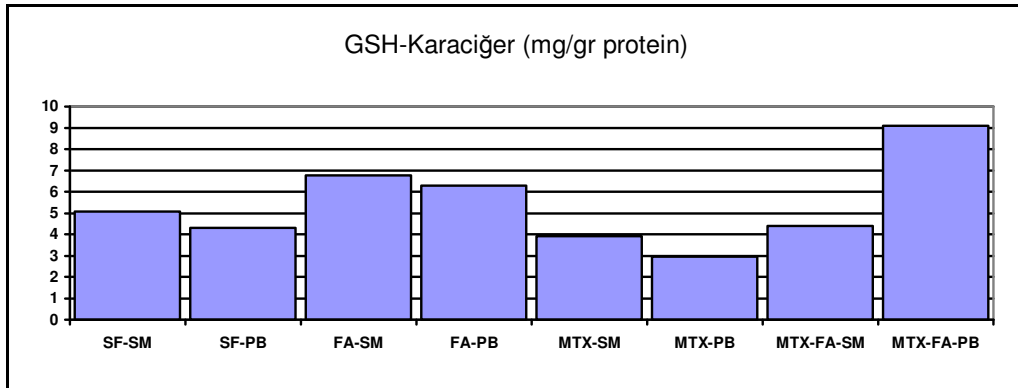
4.5. Glutasyon aktivitesi

Karaciğer GSH seviyeleri MTX-PB grubunda FA-SM grubuna ve MTX-FA-PB grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptandı. MTX-FA-PB grubunda SF-SM, SF-PB, MTX-SM, MTX-PB ve MTX-FA-SM grubuna göre anlamlı şekilde yüksek saptandı. Serum ve eritrosit GSH değerlerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Tablo 6 ve şekil 7’de çalışmada elde ettiğimiz GSH seviyeleri gösterilmiştir.

Tablo 6: Glutasyon aktivitesi

Grup	Grup açıklaması	Karaciğer GSH (mg/gr protein)	Serum GSH (mg/gr protein)	Eritrosit GSH (mg/gr Hb)
Grup 1	SF-SM	5,06±0,70	0,70±0,08	0,42±0,07
Grup 2	SF-PB	4,31±1,28	0,40±0,05	0,37±0,07
Grup 3	FA-SM	6,76±0,56	0,60±0,04	0,47±0,13
Grup 4	FA-PB	6,30±0,58	0,58±0,04	0,24±0,04
Grup 5	MTX-SM	3,91±0,34	0,64±0,14	0,58±0,08
Grup 6	MTX-PB	2,95±0,74 ¹	0,43±0,06	0,45±0,06
Grup 7	MTX-FA-SM	4,38±1,09	0,63±0,10	0,44±0,08
Grup 8	MTX-FA-PB	9,10±0,85 ^{2,3,4,5,6}	0,59±0,08	0,49±0,08

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ¹FA-SM grubuna göre p=0,048, ²SF-SM grubuna göre p=0,019, ³SF-PB grubuna göre p=0,006, ⁴MTX-SM grubuna göre p=0,005, ⁵MTX-PB grubuna göre p=0,0001, ⁶MTX-FA-SM grubuna göre p=0,004.

**Şekil 7:** Karaciğerde GSH aktivitesinin gruplara göre karşılaştırması (GSH: Glutasyon aktivitesi)

4.6. Karaciğer fonksiyon testleri ve folik asit

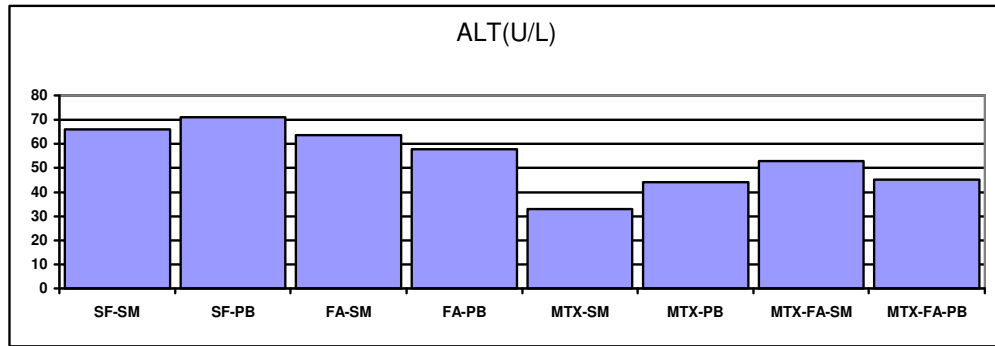
4.6.1. Karaciğer fonksiyon testleri

Serum ALT seviyeleri MTX-SM grubunda SF-SM grubuna ve SF-PB grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptandı. Serum AST seviyeleri MTX-SM grubunda SF-SM grubuna ve FA-SM grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptandı. Serum ALP seviyeleri MTX-SM grubunda SF-SM, SF-PB, FA-SM, FA-PB, MTX-FA-SM gruplarına göre anlamlı şekilde düşük saptandı. Serum ALP seviyeleri

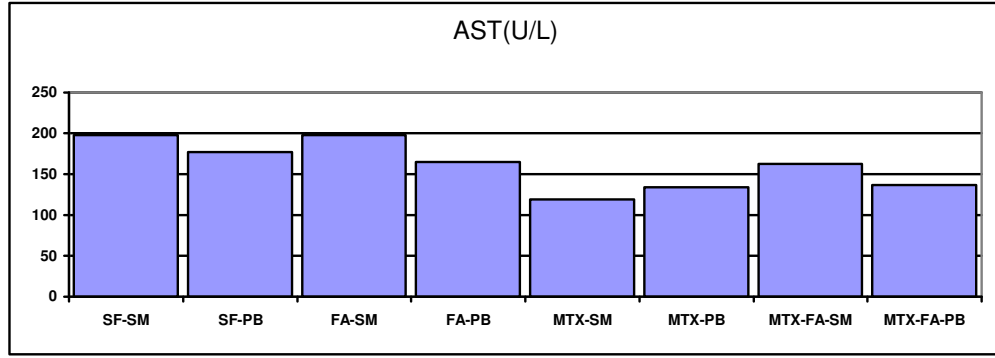
MTX-PB grubunda SF-SM grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptandı. Tablo 7’de serum AST, ALT ve ALP seviyeleri gösterilmiştir. Şekil 8’de ALT seviyeleri, şekil 9’da AST seviyeleri, şekil 10’da ALP seviyeleri grafik şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 7: Karaciğer fonksiyon testleri				
Gruplar	Grup açıklaması	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)
Grup 1	SF-SM	66,0±4,9	197,7±18,3	311,8±30,6
Grup 2	SF-PB	71,0±6,4	177,5±15,0	293,0±27,8
Grup 3	FA-SM	63,7±7,2	197,5±18,6	295,7±40,9
Grup 4	FA-PB	57,8±6,3	165,0±7,7	270,3±39,5
Grup 5	MTX-SM	33,0±5,1 ^{1,2}	119,0±21,5 ^{3,4}	113,2±18,0 ^{5,6,7,8,9}
Grup 6	MTX-PB	44,0±8,2	134,2±12,8	164,3±20,6 ¹⁰
Grup 7	MTX-FA-SM	52,8±9,3	162,8±15,4	277,3±39,3
Grup 8	MTX-FA-PB	45,0±2,2	136,5±6,6	191,7±12,1

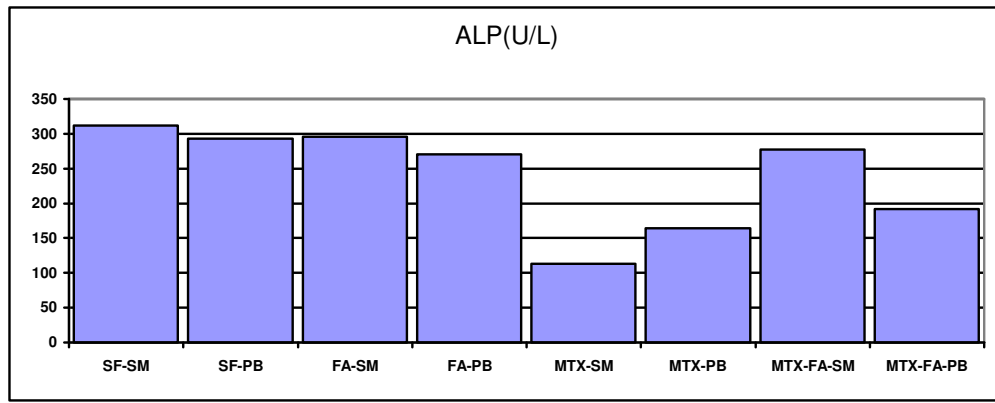
Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ¹SF-SM grubuna göre p=0,05, ²SF-PB grubuna göre p=0,015, ³SF-SM grubuna göre p=0,03, ⁴FA-SM grubuna göre p=0,031, ⁵SF-SM grubuna göre p=0,005, ⁶SF-PB grubuna göre p=0,014, ⁷FA-SM grubuna göre p=0,012, ⁸FA-PB grubuna göre p=0,047, ⁹MTX-FA-SM grubuna göre p=0,033, ¹⁰SF-SM grubuna göre p=0,032.



Şekil 8: Serum ALT seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması



Şekil 9: Serum AST seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması



Şekil 10: Serum ALP seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması

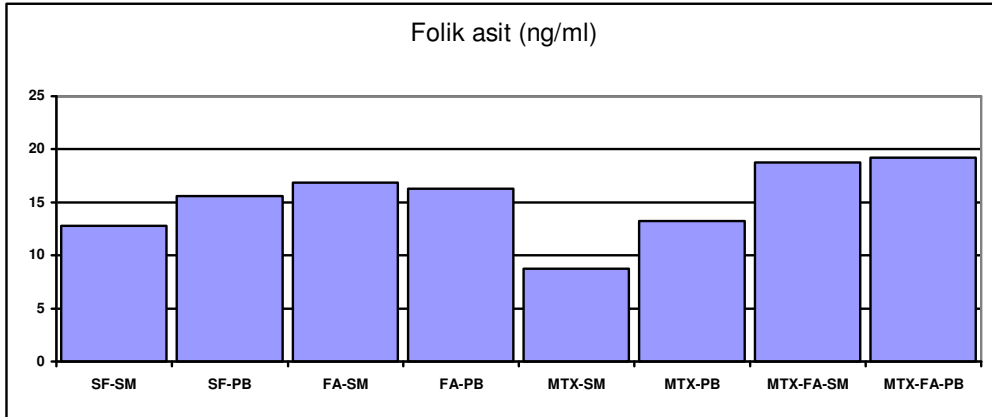
4.6.2. Folik asit

Serum FA seviyeleri MTX-SM grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı şekilde düşük saptandı. MTX-PB grubunda FA-SM, FA-PB, MTX-FA-SM, MTX-FA-PB gruplarına göre anlamlı şekilde düşük saptandı. MTX-FA-PB grubunda SF-SM grubuna göre anlamlı şekilde yüksek saptandı. SF-SM grubunda FA-SM, FA-PB, MTX-FA-SM, MTX-FA-PB gruplarına göre düşük saptandı. Tablo 8’de ve şekil 11’de elde ettiğimiz folik asit seviyeleri gösterilmiştir.

Tablo 8: Serum folik asit seviyesi

Gruplar	Grup açıklaması	FA(ng/ml)
Grup 1	SF-SM	12,80±0,48 ^{1,2,3,4}
Grup 2	SF-PB	15,62±1,27
Grup 3	FA-SM	16,87±1,12
Grup 4	FA-PB	16,32±0,46
Grup 5	MTX-SM	8,77±1,07 ^{5,6,7,8,9,10,11,}
Grup 6	MTX-PB	13,22±0,35 ^{12,13,14,15,}
Grup 7	MTX-FA-SM	18,77±0,11
Grup 8	MTX-FA-PB	19,21±0,32 ¹⁶

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ¹FA-SM grubuna göre p=0,004, ²FA-PB grubuna göre p=0,018, ³MTX-FA-SM grubuna göre p=0,0001, ⁴MTX-FA-PB grubuna göre p=0,0001, ⁵SF-SM grubuna göre p=0,014, ⁶SF-PB grubuna göre p=0,0001, ⁷FA-SM grubuna göre p=0,0001, ⁸FA-PB grubuna göre p=0,0001, ⁹MTX-PB grubuna göre p=0,005, ¹⁰MTX-FA-SM grubuna göre p=0,0001, ¹¹MTX-FA-PB grubuna göre p=0,0001, ¹²FA-SM grubuna göre p=0,013, ¹³FA-PB grubuna göre p=0,05, ¹⁴MTX-FA-SM grubuna göre p=0,0001, ¹⁵MTX-FA-PB grubuna göre p=0,0001, ¹⁶SF-SM grubuna göre p=0,023

**Şekil 11: Serum FA seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması**

4.7. Patoloji sonuçlarının değerlendirilmesi

4.7.1. Histolojik değerlendirme

Hematoksilen eosin ile boyanan karaciğer doku örnekleri ışık mikroskobu altında incelendi. İncelenen dokuların hiçbirinde MTX'in hepatotoksik etkisinin belirtisi olan yağlanma veya nekroz izlenmedi.

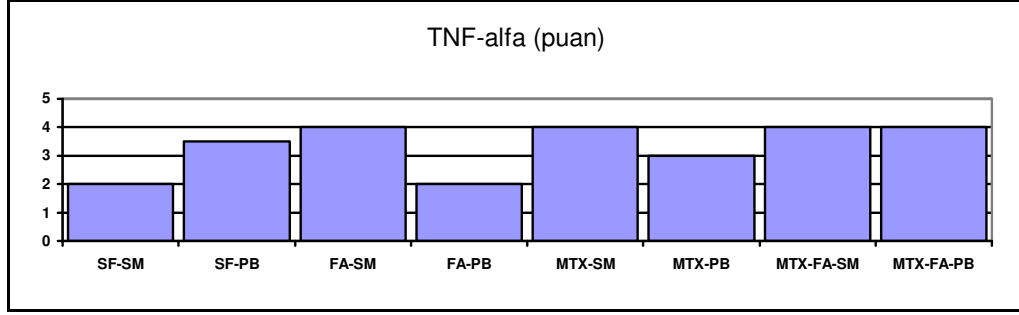
4.7.2. Karaciğer dokusunda TNF- α ekspresyonu

Karaciğer dokusunda TNF- α ekspresyonu SF-SM grubunda SF-PB, FA-SM, MTX-SM, MTX-FA-SM ve MTX-FA-PB gruplarına göre anlamlı şekilde düşük saptandı. SF-PB grubunda FA-PB grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptandı. FA-SM grubunda FA-PB grubuna göre anlamlı şekilde yüksek saptandı. FA-PB grubunda MTX-SM, MTX-FA-SM ve MTX-FA-PB gruplarına göre anlamlı şekilde düşük saptandı. MTX-SM grubunda MTX-PB grubuna göre anlamlı şekilde yüksek saptandı. MTX-PB grubunda MTX-FA-PB grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptandı. Elde ettiğimiz TNF- α sonuçları tablo 9'da ve şekil 12'de gösterilmiştir.

Tablo 9: Karaciğer dokusunda TNF- α ekspresyonu

Gruplar	Grup açıklaması	TNF- α (puan)
Grup 1	SF-SM	2,0 (2-3) ^{1,2,3,4,5}
Grup 2	SF-PB	3,5 (2-4) ⁶
Grup 3	FA-SM	4,0 (3-4) ⁷
Grup 4	FA-PB	2,0 (2-3) ^{8,9,10}
Grup 5	MTX-SM	4,0 (4-4) ¹¹
Grup 6	MTX-PB	3,0 (2-4) ¹²
Grup 7	MTX-FA-SM	4,0 (3-4)
Grup 8	MTX-FA-PB	4,0 (4-4)

Veriler, ortanca (min-max) olarak verilmiştir. ¹SF-PB grubuna göre p=0,041, ²FA-SM grubuna göre p=0,007, ³MTX-SM grubuna göre p=0,006, ⁴MTX-FA-SM grubuna göre p=0,007, ⁵MTX-FA-PB grubuna göre p=0,002, ⁶FA-PB grubuna göre p=0,041, ⁷FA-SM grubuna göre p=0,007, ⁸MTX-SM grubuna göre p=0,006, ⁹MTX-FA-SM grubuna göre p=0,007, ¹⁰MTX-FA-PB grubuna göre p=0,002, ¹¹MTX-PB grubuna göre p=0,05, ¹²MTX-FA-PB grubuna göre p=0,021.



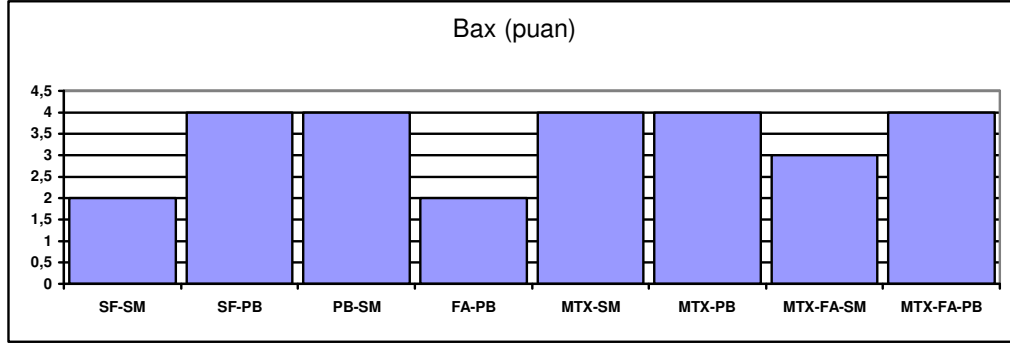
Şekil 12: Karaciğer dokusunda TNF- α ekspresyonunun gruplara göre karşılaştırılması

4.7.3. Karaciğer dokusunda Bax ekspresyonu

Karaciğer dokusunda Bax ekspresyonu SF-SM grubunda FA-SM grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptandı. MTX-SM grubunda MTX-FA-SM, FA-PB ve SF-SM gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek saptandı. MTX-PB grubunda SF-SM, FA-PB ve MTX-FA-SM gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek saptandı. MTX-FA-SM grubunda SF-SM grubuna göre anlamlı şekilde yüksek saptandı. MTX-FA-PB grubunda SF-SM ve FA-PB gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek saptandı. Elde ettiğimiz Bax sonuçları tablo 10'da ve şekil 13'de gösterilmiştir.

Grup No	Grup	Bax (puan)
Grup 1	SF-SM	2,0 (2-3) ¹
Grup 2	SF-PB	4,0 (2-4)
Grup 3	FA-SM	4,0 (2-4)
Grup 4	FA-PB	2,0 (2-4)
Grup 5	MTX-SM	4,0 (4-4) ^{2,6,9}
Grup 6	MTX-PB	4,0 (3-4) ^{3,7,10}
Grup 7	MTX-FA-SM	3,0 (3-4) ⁴
Grup 8	MTX-FA-PB	4,0 (2-4) ^{5,8}

Veriler, ortanca (min-max) olarak verilmiştir. ¹FA-SM grubuna göre p=0,027, ²SF-SM grubuna göre p=0,006, ³SF-SM grubuna göre p=0,004, ⁴SF-SM grubuna göre p=0,018, ⁵SF-SM grubuna göre p=0,015, ⁶FA-PB grubuna göre p=0,018, ⁷FA-PB grubuna göre p=0,014, ⁸FA-PB grubuna göre p=0,04, ⁹MTX-FA-SM grubuna göre p=0,014, ¹⁰MTX-FA-SM grubuna göre p=0,027.



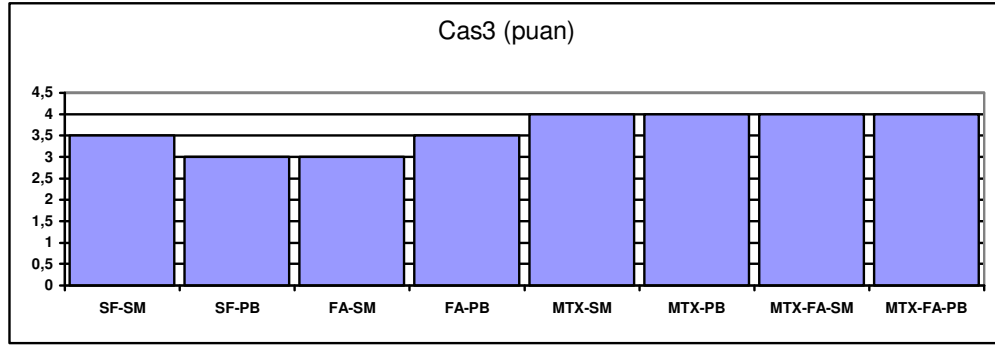
Şekil 13: Karaciğer dokusunda Bax ekspresyonunun gruplara göre karşılaştırılması

4.7.4. Karaciğer dokusunda kaspaz-3 ekspresyonu

Karaciğer dokusunda Cas3 ekspresyonu SF-PB grubunda MTX-SM, MTX-PB ve MTX-FA-PB gruplarına göre anlamlı şekilde düşük saptandı. FA-SM grubunda MTX-SM, MTX-PB ve MTX-FA-PB gruplarına göre anlamlı şekilde düşük saptandı. Elde ettiğimiz sonuçlar tablo 11’de ve şekil 14’de gösterilmiştir.

Gruplar	Grup açıklaması	Cas3 (puan)
Grup 1	SF-SM	3,5 (2-4)
Grup 2	SF-PB	3,0 (2-4) ^{1,2,3}
Grup 3	FA-SM	3,0 (3-4) ^{4,5,6}
Grup 4	FA-PB	3,5 (3-4)
Grup 5	MTX-SM	4,0 (4-4)
Grup 6	MTX-PB	4,0 (4-4)
Grup 7	MTX-FA-SM	4,0 (3-4)
Grup 8	MTX-FA-PB	4,0 (4-4)

Veriler, ortanca (min-max) olarak verilmiştir. ¹MTX-SM grubuna göre p=0,05, ²MTX-PB grubuna göre p=0,021, ³MTX-FA-PB grubuna göre p=0,021, ⁴MTX-SM grubuna göre p=0,046, ⁵MTX-PB grubuna göre p=0,019, ⁶MTX-FA-PB grubuna göre p=0,019.



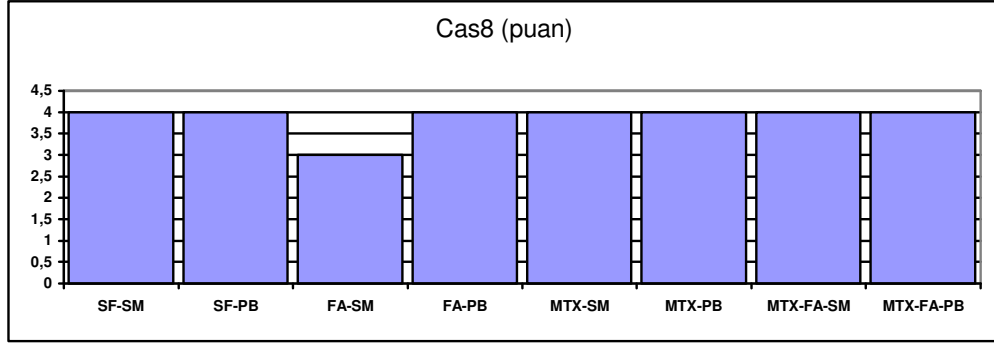
Şekil 14: Karaciğer dokusunda Cas3 ekspresyonunun gruplara göre karşılaştırılması

4.7.5. Karaciğer dokusunda kaspaz-8 ekspresyonu

Karaciğer dokusunda Cas8 ekspresyonu FA-SM grubunda FA-PB, MTX-SM, MTX-PB, MTX-FA-SM, ve MTX-FA-PB gruplarına göre anlamlı şekilde düşük saptandı. Elde ettiğimiz sonuçlar tablo 12 ve şekil 15’de gösterilmiştir.

Gruplar	Grup açıklaması	Cas8 (puan)
Grup 1	SF-SM	4,0 (3-4)
Grup 2	SF-PB	4,0 (3-4)
Grup 3	FA-SM	3,0 (3-4) ^{1,2,3,4,5}
Grup 4	FA-PB	4,0 (4-4)
Grup 5	MTX-SM	4,0 (4-4)
Grup 6	MTX-PB	4,0 (4-4)
Grup 7	MTX-FA-SM	4,0 (4-4)
Grup 8	MTX-FA-PB	4,0 (4-4)

Veriler, ortanca (min-max) olarak verilmiştir. ¹FA-PB grubuna göre p=0,019, ²MTX-SM grubuna göre p=0,046, ³MTX-PB grubuna göre p=0,019, ⁴MTX-FA-SM grubuna göre p=0,019, ⁵MTX-FA-PB grubuna göre p=0,019.



Şekil 15: Karaciğer dokusunda Cas8 ekspresyonunun gruplara göre karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

MTX bazı kanser türlerinde bir kemoterapi ajanı olarak, psöriasis, dermatomyozit, RA gibi inflamatuvar hastalıklarda antiinflamatuvar bir ajan olarak yaygın şekilde kullanılan bir FA antagonistidir. MTX'ın kısa ve uzun dönem kullanımlarına bağlı olarak pek çok yan etkileri hem klinik gözlemlerde hem de yapılmış olan deneysel hayvan çalışmalarında saptanmıştır. Bu çalışmamızda deney hayvanlarında probiyotiklerin MTX'ın bu hepatotoksik etkisini azaltmada bir faydasının olup olmadığını araştırmayı hedefledik. Bu amaçla karaciğer fonksiyon testleri, GSH, MPO, MDA gibi biyokimyasal parametreleri, doku düzeyinde de TNF- α , Bax, Cas3 ve Cas8 gibi proinflamatuvar sitokinler ve proapoptotik proteinlerin durumunu değerlendirdik.

Yapılan deneysel çalışmalarda MTX ratlara farklı dozlarda ve farklı uygulama şekilleri ile verilmiştir. Biz ratlara MTX'ı daha önceden doku toksisite çalışmalarında tanımlandığı gibi intraperitoneal yolla tek seferde 20 mg/kg dozdan verdik (1, 5, 24). Yapılan bazı çalışmalarda ratların sakrifikasyon işlemleri intraperitoneal ilaç uygulamalarından sonra beşinci ve altıncı günlerde yapılmıştı (1, 22, 24). Bu çalışmada sakrifikasyon, probiyotiklerin etkin olabilmesi için barsak florasında yerleşmeleri için belli bir zamana gerek duyulması nedeniyle daha geç bir zamanda, intraperitoneal ilaç uygulamalarından sonraki sekizinci günde yapıldı. Deneyde ratların gaita kültürleri alınarak ratlarda barsak florası değişimi gösterildi. İlk kültür intraperitoneal enjeksiyon öncesi ve ikinci kültür sakrifikasyon öncesinde yapıldı. Probiyotik alan gruplarda belirgin şekilde flora değişimi gözlemlendi. Bu yolla probiyotiklerin etki mekanizmasının temelini oluşturan flora değişimi gösterilmiş oldu.

MTX'ın hepatotoksik etkisinin mekanizması henüz tam olarak açıklanamayan karmaşık bir sistemdir (1). Kemoterapi ilaçlarının yan etkilerinin oluşmasından oksidatif stres de sorumlu tutulmaktadır. Bazı çalışmalarda; karaciğer, böbrek, ince barsak ve merkezi sinir sistemi üzerindeki MTX toksisitesinden oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır (23, 24, 25, 26). Biz de çalışmamızda daha önceki çalışmalarda antioksidan özelliği gösterilmiş olan probiyotiklerin MTX'ın hepatotoksik etkisini azaltıp azaltamayacağını araştırmayı hedefledik (45).

Babiak ve ark. MTX'in HeLa hücrelerinde glutasyon seviyelerini azalttığını, SOD ve katalaz seviyelerini değiştirmediğini göstermişlerdir (21). Miyazono ve ark. MTX'in yan etkisi olarak ratların ince barsağında SOD ve katalaz aktivitelerinde artma, glutasyon seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX'in yol ağtığı ince barsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdir (27).

Bizim çalışmamızda tablo 6'da da gösterildiği gibi MTX-SM ile MTX-PB grupları arasında karaciğer GSH seviyelerinde anlamlı bir fark izlenmedi. MTX-FA-PB grubunda ise MTX alan diğer tüm gruplara göre GSH seviyelerinde anlamlı bir yükseklik saptandı. Buna göre; bizim kullandığımız probiyotik karışımın MTX verilen ratlarda tek başına GSH seviyelerini yükseltmediği, ancak FA ile birlikte verildiğinde GSH seviyelerini anlamlı şekilde yükselttiği saptandı. Çalışmamızda grupların serum ve eritrosit GSH seviyelerinde anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 6). Literatür taramalarında probiyotiklerin MTX toksisitesi üzerine etkilerini araştıran bir çalışma saptayamadığımızdan probiyotiklerin MTX verilen ratlardaki GSH seviyesi üzerine olan etkisini bilmiyoruz. Ancak bir çalışmada trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) verilerek deneysel kolit yapılan ratlarda *L. fermentum* adlı probiyotiğin kolondaki GSH seviyelerini anlamlı şekilde yükselttiği saptanmıştır (94).

Myeloperoksidaz nötrofil infiltrasyonunun bir belirtecidir. Serbest radikaller dokulara olan doğrudan hasar yapıcı etkilerine ilaveten lökositlerin hasarlı dokuya toplanmasını sağlayarak doku hasarının aktive nötrofiller üzerinden daha da kötüleşmesine neden olurlar (95). Fagositik lökositler uygun şekilde uyarıldıkları zaman oksijen tüketimlerini artırırılar. Buna nötrofillerin respiratuvar/oksidatif patlaması denir. Aktive nötrofiller MPO, elastaz, proteaz gibi bazı enzimler salgılar ve oksijen radikalleri ağığa çıkarırılar (96). MPO nötrofillerin oksidan üretiminde baş rol oynar.

Ratlarda yapılmış pek çok çalışmada MTX'in nötrofil infiltrasyonunun bir belirteci olan MPO seviyelerini artırdığı saptanmıştır. Bu çalışmaların bazılarında beta-glukan, melatonin, N-asetil sistein gibi maddelerin MTX'in oluşturduğu MPO artışını baskıladığı saptanmıştır (1, 5, 7).

Peran ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada probiyotiklerin deneysel kolit oluşturulmuş ratlarda MPO seviyelerini azalttığı saptanmıştır (94).

Bizim çalışmamızda da MTX'in MPO seviyelerini anlamlı şekilde artırdığı saptandı. MTX-SM grubundaki MPO seviyeleri diğer bütün gruplara göre anlamlı şekilde yüksekti. MTX-PB grubu ile MTX-FA grubundaki MPO seviyeleri arasında anlamlı bir fark yoktu (Tablo 4). Yani probiyotik karışım MPO seviyelerini en az FA kadar düşürdü. Bu bulgudan yola çıkarak probiyotiklerin MTX'in oluşturduğu doku hasarını en az FA kadar azalttığını söyleyebiliriz. Bu konu ile ilgili detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA seviyelerini daha önce yapılmış olan çalışmalarda MTX'in artırdığı ve bazı antioksidan maddelerin MDA seviyelerini düşürdüğü saptanmıştır (1, 5, 7). Bizim çalışmamızda ratların karaciğer, serum ve eritrosit MDA seviyelerine bakıldı. Karaciğerdeki MDA seviyeleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 5).

MTX'in ratlardaki karaciğer enzimleri üzerinde ciddi etkileri olduğu yapılmış pek çok çalışmada saptanmıştır. Uraz ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ratlara 20 mg/kg dozdan tek doz intraperitoneal olarak MTX verilmiş ve ratlar altıncı günde sakrifiye edilmiş. ALT, ALP ve gama glutamil transferaz (GGT) seviyeleri MTX alan grupta anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır (22). Bu çalışmada MTX verildikten sonra 6. gün bakılan karaciğer enzimleri yüksek saptanmış, buna karşılık biz MTX verdikten sonra 8. gün ratları sakrifiye ettik. Bizim çalışmamızda tablo 7'de de gösterildiği gibi MTX-SM grubunda ALT, AST ve ALP seviyeleri kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde düşük saptandı. Bunun sebebi MTX'in karaciğerdeki akut toksik etkisi geçtikten sonra, yeni hepatositlerin oluşturulması aşamasında kan ve doku örneklerinin alınmış olması olabilir. Bunu destekleyen bir bulgu da MTX-SM grubundan 2 ratın deneyin beşinci günü ex olmasıdır. Yani biz ratları MTX'in akut toksik etkisi geçtikten sonra sakrifiye etmiş olabiliriz. Bunu araştırmak için ratlara bizim verdiğimiz dozdan MTX verilerek gruplara ayrılıp; dört, beş, altı, yedi ve sekiz gün sonra kan ve karaciğer doku örnekleri alınıp karaciğer fonksiyon testlerine ve karaciğer histolojilerine bakılarak MTX'in maksimum toksik etkisinin uygulamadan kaç gün sonra oluştuğunu araştıran bir çalışma yapılabilir. Böyle bir çalışma bizim çalışmamızı destekleyici nitelikte olacaktır.

Çalışmamızda tablo 8'de de gösterildiği gibi MTX-SM grubunda en düşük FA seviyeleri elde edildi. MTX-PB grubunda FA seviyeleri MTX-SM grubuna göre

anlamli şekilde yu'kse'k saptandı. Buna g'ore MTX'in folik asit antagonizmasını probiyotiklerin kısmen azaltabildiğini s'oyleyebiliriz. Ancak bu konuda yapılmış çalışma yoktur.

Doku d'uzeyinde yaptığımız incelemelerde ratlarının karaciğer dokuları HE ile boyanarak nekroz ve yağlanmaya bakıldı. İncelenen dokuların hiçbirinde yağlanma veya nekroz saptanmadı.

Çalışmamızda programlı hucre o'l'umu olarak bilinen apoptozisin işleyişinde o'nemli rol' u olan proapoptotik proteinler Bax, Cas3 ve Cas8 ekspresyonlarını inceledik. Bax ekspresyonu SF-SM grubunda MTX alan t'um gruplara g'ore anlamli şekilde d'uşuk saptandı (Tablo 10). Cas3 ekspresyonu SF-PB ve FA-SM gruplarında MTX alan gruplara g'ore anlamli şekilde d'uşuk saptandı (Tablo 11). Cas8 ekspresyonu FA-SM grubunda MTX alan t'um gruplara g'ore anlamli şekilde d'uşuk saptandı (Tablo 12).

Yapılmış bazı çalışmalarda MTX'in apoptozisi şiddetlendirdiği saptanmış (97). Meme t'um'oru hu'cresi uzerine yapılmış bir çalışmada MTX'in Cas3 ekspresyonunu arttırarak apoptozisi ind'uklediği saptanmış (98). Yine bir çalışmada MTX'in t'um'or hu'crelerinde Cas8 aracılığı ile apoptozisi ind'uklediği belirtilmiş (99).

Matsuu ve arkadaşları X işını uygulayarak apoptozisi ind'ukledikleri rat kolonlarında probiyotik bakterilerin apoptoitik indeksi ve Cas3 ekspresyonunu azalttığını saptamışlardır (42). Brzozowski ve arkadaşları H.pylori enfeksiyonunun gastrik mukozada uyardığı apoptozis ve Bax ekspresyonunun probiyotik bakterilerce azaltıldığını saptamışlar (100).

Bizim çalışmamızda kontrol gruplarımızın doku o'rne'klerinde de Cas3 ve Cas8 ekspresyonu olduğunu g'ozledik. 2003 yılında yayımlanan bir makalede Maliqueo ve arkadaşları, normal ve polikistik over sendromlu (PCOS) proliferatif endometriyum hu'crelerindeki Cas3 ekspresyonlarının aynı olduğunu bildirmişlerdir (101). Aynı çalışmayı 2007 yılında tekrar yapan ve Cas3 ve procaspase-3 ekspresyonlarını Western-Blot y'ontemiyle araştıran çalışmacılar yayımladıkları makalelerinde normal ve PCOS'lu endometrium hu'crelerinin Cas3 ekspresyonlarında o'nemli farklılaşma saptadıklarını, oysa aynı hu'crelerdeki procaspase-3 ekspresyonlarının birbirine benzer olduğunu bildirmişlerdir. 2003 yılında yayımlanan çalışmalarında kullanılan imm'uhistokimyasal boyanın aktif

Cas3'ü göstermediğini belirtmişlerdir (102). Dolayısıyla, kontrol grubunda yaygın olarak gözlediğimiz Cas3 boyanması gerçekte doğal olarak bulunması beklenen procaspase-3'ü gösteriyor olabilir ve aynı durum Cas8 için de geçerli olabilir. Bizim Cas3 ve Cas8'i göstermek için kullandığımız immünohistokimyasal boyalar sırasıyla inaktif Cas3'ü ve hem aktif hem de inaktif Cas8'i boyamaktadır. Cas3'ün inaktif formu bütün hücrelerde bulunmaktadır (103, 104), Cas8 ile ilgili literatüre ulaşamamıştır, ancak bu durumun Cas8 için de geçerli olduğu beklenebilir.

Bu çalışmada hedeflerimizden biri, MTX'in arttırdığı proapoptotik protein ekspresyonuna probiyotiklerin bir etkisinin olup olmadığıydı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre proapoptotik protein ekspresyonlarında MTX-SM ile MTX-PB grupları arasında anlamlı bir farklılık yoktu. Buna göre probiyotiklerin MTX'in arttırdığı proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltmadığını söyleyebiliriz. Ancak yukarıda da bahsedildiği gibi kullandığımız immünohistokimyasal boyaların aktif Cas3'ü göstermediğini düşünürsek, tabii aynı durum Cas8 için de geçerli olabilir, Western-Blot yöntemi ile aktif Kaspaz'ların inceleneceği daha ileri araştırmalarla probiyotiklerin apoptozis üzerine olan etkilerine dair daha ileri bilgilere ulaşılabilir.

TNF- α , aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanan, proinflatuvar, pirojen, akut faz reaktanı olan bir sitokindir. TNF- α ayrıca, apoptozisin ekstrinsek yolağında, özellikle Cas3 aktivasyonunda önemli rol oynadığı gibi, intrinsek apoptozis yolağında da başlangıç kaspazlarını aktive etmek suretiyle etkin olduğu gözlenmiştir. Proapoptotik bir sinyal olarak kabul edilen TNF- α 'nın antagonistleri, antiapoptotik etkinlik göstermektedirler (78).

Bizim çalışmamızda tablo 9'da da gösterildiği gibi TNF- α ekspresyonu MTX-SM grubunda yüksek seviyelerde saptandı. MTX-PB grubunda MTX-SM grubuna göre TNF- α ekspresyonu anlamlı şekilde düşük saptandı. Buna göre probiyotiklerin, MTX'in oluşturduğu TNF- α artışını azalttığını söyleyebiliriz.

Bizim çalışmamıza benzer şekilde endotoksin ve D-galaktosamin verilerek karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda probiyotiklerin karaciğer TNF- α seviyelerini düşürdüğü saptanmış (46). Xing ve arkadaşlarının karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda yaptıkları bir çalışmada probiyotiklerin serum TNF- α seviyelerini düşürdüğü saptanmış (47). Bununla birlikte Chirstensen ve arkadaşları

yaptıkları çalışmada dentritik hücrelerin farklı laktobasil türlerine farklı sitokin yanıtları verdiğini saptamışlar (105). Maassen ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da iki çeşit laktobasil verdikleri ratların barsak villuslarında TNF- α ekspresyonunun arttığını saptamışlar (106). Buna göre probiyotik mikroorganizmaların hepsinin aynı immunmodülatör etkiyi gösterdiğini söylemek güçtür.

Çalışmamızda gaita kültürlerinde flora değişiminin gösterilmesi ve sadece MTX uygulanan sıçanlarda görülen iki ölüm ve bütün gruplarda sıçanlarda kilo artımına karşı bu grupta görülen kilo kaybı nedeniyle genel olarak deneyin, düşünülen hipotezleri karşılama yönünde başarılı olduğu düşünülebilir. Klinik görünümde MTX toksisitesini önleyen FA ve deneyde etkisini araştırdığımız PB'in sadece MTX alan farelere göre diğer grupların daha iyi bir seyir izlemesi nedeniyle MTX toksisitesini önlemede başarılı olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda 20 mg/kg dozdan MTX uygulaması serumdaki karaciğer fonksiyon testlerinin düşmesine sebep oldu. Bunun, daha önce de belirttiğimiz gibi, MTX'in karaciğerdeki akut toksik etkisi geçtikten sonra, yeni hepatositlerin oluşturulması aşamasında kan ve doku örneklerinin alınmış olması nedeniyle olabileceğini düşünmekteyiz. Yine aynı şekilde HE ile boyanarak yapılan karaciğerin histolojik incelemelerinde de MTX verilen gruplarda nekroz izlemeyişimizin sebebi bu olabilir. Bunun için başka çalışmalar yapılmasının faydalı olacağı kanısındayız. Sadece MTX verdiğimiz grupta yüksek bulduğumuz karaciğerdeki TNF- α ekspresyonu MTX ile birlikte probiyotik verilen grupta anlamlı şekilde düşük saptandı. Buna göre probiyotiklerin MTX'in artırdığı TNF- α ekspresyonunu azalttığını söyleyebiliriz. Nötrofil infiltrasyonunun bir belirteci olan MPO seviyelerini MTX alan grupta anlamlı şekilde yüksek saptadık ve probiyotiklerin MPO seviyelerini en az FA kadar düşürdüğünü saptadık. Günümüz onkoloji pratiğinde MTX'in toksik etkilerini azaltmak için FA yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bizim çalışmamız, bu konuda yapılacak başka çalışmalara ışık tutarak, MTX'in toksik etkilerini önlemek için verilen FA gibi kimyasal bir ajana benzer şekilde, doğal yollardan etki eden probiyotiklerin de kullanılabilmesine katkı sağlayacaktır.

6. ÖZET

Probiyotiklerin Ratlarda Metotreksat Toksisitesi Üzerine Olan Etkileri

Metotreksat (MTX); solid ve hematolojik kanserlerde antineoplastik ve bazı inflamatuvar hastalıklarda da antiinflamatuvar olarak yaygın şekilde kullanılan folik asit antagonisti bir ilaçtır. MTX'in gastrointestinal sistem, karaciğer, böbrek, cilt ve kemik iliği üzerine olan toksik etkileri iyi bilinmektedir. Bu toksisite, diğer yollarla beraber antioksidan sistemler üzerinden de oluşmaktadır. MTX toksisitesi folik asit ile önlenabilmektedir. Probiyotikler uzun yıllardan beri insanlığın doğal besin kaynağı olarak kullandıkları yoğurt, kefir ve diğer fermente süt ürünlerinde bulunan mikroorganizmalar olup antioksidan etkinliği ortaya konulmuştur. Bu çalışmada MTX'in karaciğer üzerine olan toksik etkisini önlemede probiyotiklerin rolünü araştırmayı amaçladık.

Deney kırk sekiz adet erkek Wistar Albino rat ile uygulandı. Grupların yarısına ilk gün intraperitoneal MTX, diğer yarısına plasebo olarak serum fizyolojik (SF) ve folik asit (FA) uygulandı. Daha sonra yedi gün boyunca grupların yarısına orogastrik yolla skim milk (SM), diğerlerine probiyotik (PB) verildi. Ratlar MTX, folik asit (FA), SF, PB, SM kullanımına göre; SF-SM, SF-PB, FA-SM, FA-PB, MTX-SM, MTX-PB, MTX-FA-SM, MTX-FA-PB olmak üzere 8 gruba ayrıldı. Sekizinci gün tüm ratlar sakrifiye edilerek intrakardiyak kan alındı ve karaciğer doku örnekleri alındı. Serumda karaciğer fonksiyon testleri, folik asit, MDA, GSH; eritrositlerde MDA, GSH seviyeleri çalışıldı. Karaciğer dokusundan hazırlanan homojenatlarda MPO, GSH, MDA seviyeleri çalışıldı. Karaciğer dokusunun histolojik incelemesi ve immunhistokimyasal olarak Bax, Cas3, Cas8 ve TNF- α ekspresyonları araştırıldı.

MTX verilen gruptan iki rat ex oldu ve ratların ortalama vücut ağırlıkları diğer gruplarda artış gösterirken bu grupta azaldı. Probiyotik verilen gruplarda gaita kültürlerinde flora değişimleri saptandı. Karaciğer fonksiyon testleri MTX verilen grupta anlamlı şekilde düşük saptandı. Karaciğer MPO seviyeleri MTX verilen grupta diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksekti ve probiyotik uygulaması bu yüksekliği düşürdü. Doku düzeyinde baktığımız TNF- α ekspresyonu MTX alan grupta belirgin şekilde yüksekti ve probiyotiklerin bu yüksekliği azalttığını saptadık.

Sonuç olarak ratlarda MTX'in oluşturduğu toksik etkileri probiyotiklerin engelleyebileceğini saptadık. Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak bu konuda yapılacak yeni araştırmalar sayesinde, kemoterapötik ajanların toksik etkilerini azaltmada veya engellemede probiyotiklerin katkısı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Metotreksat, probiyotik, apoptozis, oksidatif stres, hepatotoksisite

7. SUMMARY

The Effects of Probiotics on Methotrexate Toxicity in Rats

Methotrexate (MTX) is a folic acid antagonist which is commonly used as an anti-neoplastic agent in solid and haematologic malignities and as an anti-inflammatory agent in some inflammatory diseases. The toxic effects of MTX on gastrointestinal system, liver, kidneys, skin and bone marrow are well known. This toxicity consists of anti-oxidant systems additionally to the other ways. MTX toxicity can be prevented by folic acid. Probiotics are the microorganisms inside of the yoghurt, kefir and the other types of fermented milk products which are used as natural foods by people in many years and their antioxidant effects have been shown. In this study we aimed to research the role of the probiotics on the hepatotoxicity of MTX.

The experiment was practiced by forty eight male Wistar Albino rats. In the first day of experiment half of the groups were administered MTX intraperitoneally and the other half of the groups were administered isotonic saline (SF) and folic acid (FA) intraperitoneally as placebo. Then half of the groups were given probiotics (PB) and the other half were given skimmy milk (SM) by orogastric way for seven days. Rats were divided in to eight groups according to their MTX, FA, SF, PB, SM administrations as; SF-SM, SF-PB, FA-SM, FA-PB, MTX-SM, MTX-PB, MTX-FA-SM, MTX-FA-PB. In the eighth day all the rats were sacrificed and taken intracardiac blood samples and liver tissues. The liver function tests, folic acid, MDA, GSH were evaluated in serum, MDA and GSH were evaluated in erythrocytes. MPO, MDA, GSH were evaluated in liver tissue. The liver tissueses histological examination and Bax, Cas3, Cas8 and TNF- α expressions were evaluated.

Two rats died in the group which were administered only MTX and the mean of body weights of this group was reduced while the other groups' were increasing. Flora changes were determined in the faeces cultures in the groups which were given probiotics. Liver function tests were significantly reduced in the Methotrexate group. The liver MPO concentrations were significantly increased according to the other groups and probiotic administration reduced this elevation. The TNF- α expression in the liver tissues were significantly increased and we determined probiotic administration reduced this elevation.

In conclusion we determined that probiotics can inhibit toxic effects of MTX. According to our results we think that probiotics may be contribute to reduce or to prevent the toxic effects of chemotherapeutic agents through the new studies about this issue.

Key Words: Methotrexate, probiotic, apoptosis, oxidative stress, hepatotoxicity

8. KAYNAKLAR

- 1- 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):BR274-278.
- 2- Dutz JP, Ho VC. Immunosuppressive agents in dermatology. An update. *Dermatol Clin.* 1998 Apr;16(2):235-251.
- 3- Flores F, Kerdel FA. Other novel immunosuppressants. *Dermatol Clin.* 2000 Jul;18(3):475-483.
- 4- Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med.* 1983 Nov 3;309(18):1094-1104.
- 5- Sener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Yeğen BC. Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol.* 2006 Aug 7;542(1-3):170-178.
- 6- Hytioglou P, Tobias H, Saxena R, Abramidou M, Papadimitriou CS, Theise ND. The canals of hering might represent a target of methotrexate hepatic toxicity. *Am J Clin Pathol.* 2004 Mar;121(3):324-329.
- 7- Jahovic N, Cevik H, Sehirlı AO, Yeğen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res.* 2003 May;34(4): 282-287.
- 8- 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 Apr;27(5):277-292.
- 9- Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 Nov 25;764(1-2):217-254.
- 10- Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, Drake JC, Jolivet J. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest.* 1985 Sep;76(3):907-912.
- 11- Bram J, Allegra CJ, Fine RL, Chabner BA. Effects of methotrexate on intracellular folate pools in purified myeloid precursor cells from normal bone marrow. *J Clin Invest* 1987; 79:692-697.
- 12- Hirata S, Matsubara T, Saura R, Tateishi H, Hirohata K. Inhibition of in vitro vascular endothelial cell proliferation and in vivo neovascularisation by low dose methotrexate. *Arthritis Rheum.* 1989 Sep;32(9):1065-1073.
- 13- Kane D, Gogarty M, O'leary J, Silva I, Bermingham N, Bresnihan B, Fitzgerald O. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2004 Oct;50(10):3286-3295.
- 14- Cronstein BN. Methotrexate and its mechanism of action. *Arthritis Rheum.* 1996 Dec;39(12):1951-1960.
- 15- Gibson LE, Perry HO. Papulosquamous eruption and exfoliative dermatitis: Dermatology. Third edition. Moschella SL, Hurley HJ(eds) WB Saunders, Philadelphia 1992, S:607-622.
- 16- Kimura E, Nishimura K, Sakata K, Oga S, Kashiwagi K, Igarashi K. Methotrexate differentially affects growth of suspension and adherent cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 May;36(5):814-825.
- 17- 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 Jul;29(7):832-835.

- 18- 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 Mar-Apr;11 Suppl 8:S101-105.
- 19- Chládek J, Martínková J, Sispera L. An in vitro study on methotrexate hydroxylation in rat and human liver. *Physiol Res*. 1997;46(5):371-379.
- 20- Kamen BA, Nysten PA, Camitta BM, Bertino JR. Methotrexate accumulation and folate depletion in cell as a possible mechanism of chronic toxicity to the drug. *Br J Haematol*. 1981 Nov;49(3):355-360.
- 21- Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: Pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct*. 1998 Dec;16(4):283-293.
- 22- Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M, Senturk O, Avsar E, Haklar G, Celikel C, Hulagu S, Tozun N. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate induced liver toxicity. *Dig Dis Sci*. 2008 Apr;53(4):1071-1077.
- 23- Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M, Pasvogel A, Hutter J, Krull K, Moore IM. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs*. 2005 Jan;6(3):187-195.
- 24- Jahovic N, Sener G, Cevik H, Ersoy Y, Arbak S, Yeğen BC. Amelioration of methotrexate induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct*. 2004 May-Jun;22(3):169-178.
- 25- Devrim E, Cetin R, Kiliçoğlu B, Ergüder BI, Avci A, Durak I. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail*. 2005;27(6):771-773.
- 26- Uz E, Oktem F, Yilmaz HR, Uzar E, Özgüner F. The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem*. 2005 Sep;277(1-2):165-170.
- 27- Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol*. 2004 Nov;39(11):1119-1127.
- 28- Fuller R, Perdigon G. Probiotics 3- Immunomodulation by the gut microflora and probiotics. *Kluwer Academic Publishers* 2000.
- 29- Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 39: 237-238.
- 30- Erkmén O. Probiyotik bakterilerin önemi. *Gıda bilimi ve Tek*. 2000;5(1):26-32.
- 31- Gismondo MR, Drago L. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1999, 12;287-292.
- 32- Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mattö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 2000,84;197-215.
- 33- Mombelli B, Gismondo MR. The use of probiotics in medical practice. *Antimicrobial Agents* . 2000, 16;531-536.
- 34- Yılsoy TO, Kurdal E. Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerine etkisi. VI. Süt ve süt ürünleri sempozyumu (Ed. M. Demirci). Tekirdağ, 2000, 279-286.
- 35- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Seppo Salminen. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* 1999, 9;43-52.
- 36- Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Tanaka R, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda T. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology* 2001, 68;135-140.
- 37- Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology* 2001,152;167-173.
- 38- Strus M, Pakosz K, Gościński H, Przędzko-Mordarska A, Rozynek E, Pituch H, Meisel-Mikołajczyk F, Heczko PB. Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria

- strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). *Medycyna Doswiadczalnai Mikrobiologia* 2001, 53;133–142.
- 39- Shah U, Walker WA. Adverse host responses to bacterial toxins in human infants. *J Nutr* 2000; 130(suppl): 420-425.
 - 40- Rastall RA, Gibson GR, Gill HS, Guarner F, Klaenhammer TR, Pot B, Reid G, Rowland IR, Sanders ME. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology* 2005, 52;145-152.
 - 41- Servin AL, Coconnier MH. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best practice & Research Clinical Gastroenterology* 2003, 17(5); 741-754.
 - 42- Matsuu M, Shichijo K, Okaichi K, Wen CY, Fukuda E, Nakashima M, Nakayama T, Shirahata S, Tokumaru S, Sekine I. The protective effect of fermented milk kefir on radiation-induced apoptosis in colonic crypt cells of rats. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2003,44;111-115.
 - 43- Nagira T, Narisawa J, Teruya K. Suppression of apoptosis in UV-damaged human melanoma cells kefir was mediated through the inhibition of caspase-3 activation. by a fermented milk, Kefir. In: *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products*, Eds. A. Bernard et al. 1999, *Kluwer Academic Publishers*. The Netherlands. 437–439.
 - 44- Henriksson R, Franzén L, Sandström K, Nordin A, Arevärn M, Grahn E. Effects of active addition of bacterial cultures in fermented milk to patients with chronic bowel discomfort following irradiation. *Support Care Cancer* 1995; 3:81–83.
 - 45- Guven A, Gulmez M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2003;50:412-416.
 - 46- Osman N, Adawi D, Ahrné S, Jeppsson B, Molin G. Endotoxin- and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and blueberry. *Dig Liver Dis*. 2007 Sep;39(9):849-856.
 - 47- Xing HC, Li LJ, Xu KJ, Shen T, Chen YB, Sheng JF, Chen Y, Fu SZ, Chen CL, Wang JG, Yan D, Dai FW, Zheng SS. Protective role of supplement with foreign *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Apr;21(4):647-656.
 - 48- Cenesiz S, Devrim AK, Kamber U, Sozmen M. The effect of kefir on glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels in mice with colonic abnormal crypt formation (ACF) induced by azoxymethane (AOM). *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 2008 Jan;115(1):15-19.
 - 49- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue damage. *Laboratory Investigation* 1982, 4;412-426.
 - 50- Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs*. 2005, 21;24-28.
 - 51- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993, 49; 479-481.
 - 52- Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease process. *Surgery* 1983; 94: 407-411.
 - 53- Hajieva P, Behl C. Antioxidants as a potential therapy against age related neurodegenerative diseases: amyloid beta toxicity and Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 2006, 12(6):699-704.
 - 54- Park EC, Yoon JB, Seong JS, Choi KS, Kong ES, Kim YJ, Park YM, Park EM. Effect of ionising radiation on rat tissue: proteomic and biochemical analysis. *Preb Biochem Biotechnol* 2006, 36(1): 19-35

- 55- Delogu G, Antonucci A, Moretti S, Marandola M, Tellan G, Signore M, Famularo GJ. Oxidative stress and mitochondrial glutathione in human lymphocytes exposed to clinically relevant anesthetic drug concentrations. *Clin Anesth* 2004, 16(3):189-194.
- 56- Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicol* 2003, 189; 41-54.
- 57- Mollaoglu H. GSM 900 MHz telefonların oluşturduğu manyetik alanın etkisiyle meydana gelen oksidatif değişiklikler üzerine melatoninin etkisi. Uzmanlık tezi. Süleyman Demirel Üniv Tıp Fak Fizyoloji AD 2003.
- 58- Devasagayam TP, Tilak JC, Bolloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 2004, 52:794-804.
- 59- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları*, Konya ,1995. 1-132.
- 60- Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 1984, 222;1-15.
- 61- Kayalı R, Çakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 83-89.
- 62- Caro AA, Cederbaum AI. Antioxidant properties of S-adenosil-L-methionine in Fe (+2) initiated antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2004, 36:1303-1316.
- 63- Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV, Alperi JD. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr* 2006; 42: 289-306.
- 64- Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J* 2005, 26;257-264.
- 65- Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr* 2005, 164;775-778.
- 66- Nakano A, Koyama I, Matsunaga T, Nakajima T, Hirose H, Sato M, Komoda T. Expression of reactive oxygen-related enzymes in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultured with high concentrations of glucose. *Rinsho Byori* 1999; 7: 676-681.
- 67- Zhou FQ. Advantages of pyruvate over lactate in peritoneal dialysis solutions. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 5: 385-392.
- 68- Cetiner M, Sener G, Sehirli AO, Eksioglu-Demiralp E, Ercan F, Sirvancı S, Gedik N, Akpulat S, Tecimer T, Yegen BC. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 209: 39-50.
- 69- Drisko JA, Chapman J, Hunter VJ. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecologic Oncol* 2003, 88:434-439.
- 70- Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto* 1974; 73: 1075-1086.
- 71- Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest* 1986; 77: 319-321.
- 72- McCord JM, Fridowich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
- 73- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic physiological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.
- 74- Öztürk F. Apoptoz. *Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2002, 9, 2, 143-148
- 75- Hetts SW. To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279:300-307.
- 76- Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 2000, 256, 42-49.
- 77- Göncü NE, Pehlivan S. Apoptozisin morfolojik, biyokimyasal ve moleküler isaretleri. *Arsiv*, 2001, 10, 292-307.

- 78- Fadeel B, Orrelius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258:479-517.
- 79- Bonfoco E, Krainc D, Aankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate and nitric oxide/ superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7162-7166.
- 80- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 1997, 326, 1-16.
- 81- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115 :2265-2272.
- 82- Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S. Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ* 1999; 6:495-496.
- 83- Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algericas-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X. c-FLIP (L) is a dual function regulator for caspase 8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J* 2002; 21:3704-3714.
- 84- Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):277-288.
- 85- Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205-219.
- 86- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997; 16:2794-2804.
- 87- Chen CN, Wu CL, Lin JK. Propolis C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67:53-66.
- 88- Yang E, Kormeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996; 88: 386-401.
- 89- Ferraz JG, Tigley AW, Appleyard CB, Wallace JL. TNF-alpha contributes to the pathogenesis of ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1997; 272:809-814.
- 90- Can R. Probiyotiklerin allerji üzerine etkisinin araştırılması. Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, SDÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta, 2003.
- 91- Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005 Nov 15;827(1):76-82.
- 92- Beutler E, Duran O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963, 61:882-888.
- 93- Wei H, Frenkel K. In vivo formation of oxidized DNA bases in tumor promotertreated mouse skin. *Cancer Res* 1991; 51: 4443-4449.
- 94- Peran L, Camuesco D, Comalada M. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Colorectal Dis* (2006) 21: 737-746.
- 95- Vaziri ND. Oxidative stres in uremia: nature, mechanisms, and potential cosequences. *Semin Nephrol* 2004, 24, 469-473.
- 96- Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol* 2000, 67, 591-602.
- 97- Horie T, Li T. Aged garlic extract protects against methotrexate-induced apoptotic cell injury of IEC-6 cells. *J Nutr* 2006 Mar;136(3 suppl): 861-863.
- 98- Hattangadi DK, DeMasters GA, Walker TD. Influence of p53 and caspase 3 activity on cell death and senescence in response to methotrexate in the breast tumor cell. *Biochem Pharmacol.* 2004 Nov 1;68(9):1 699-708.

- 99- Ehrhardt H, Hacker S, Wittmann S. Cytotoxic drug-induced, p53-mediated upregulation of caspase-8 in tumor cells. *Oncogene*. 2008 Jan 31;27(6): 783-793.
- 100- Brzozowski T, Konturek PC, Mierzwa M, Drozdowicz D, Bielanski W, Kwiecien S, Konturek SJ, Stachura J, Pawlik WW, Hahn EG. Effect of probiotics and triple eradication therapy on the cyclooxygenase (COX)-2 expression, apoptosis, and functional gastric mucosal impairment in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils. *Helicobacter*. 2006 Feb;11(1):10-20.
- 101- Maliqueo M, Clementi M, Gabler F, Johnson MC, Palomino A, Sir-Petermann T, Vega M. Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003; 80:812-819.
- 102- Villavicenzo A, Bacallo K, Gabler F, Fuentes A, Albornoz J, Casals A, Vega M. Deregulation of tissue homeostasis in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol* 2007; 104:290-295.
- 103- Exley GE, Tang C, Mcelhinny AS, Warner CM. Expression of caspase and bcl-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod* 1999; 61:231-239.
- 104- Jurisicova A, Antenos M, Varmuza S, Tilly JL, Casper RF. Expression of apoptosis-related genes during human preimplantation embryo development: potential roles for the harakiri gene product and caspase-3 in blastomere fragmentation. *Mol Hum Reprod* 2003; 9:133-141.
- 105- Christensen HR, Frøkiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol*. 2002 Jan 1;168(1):171-178.
- 106- Maassen CB, van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJ, Claassen E. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains. *Vaccine*. 2000 May 22;18(23):2613-2623.

EKLER

EK-1

Deney protokolünde kullanılan malzemeler:

1. Erişkin erkek Wistar albino sıçan (48 adet)
2. Beslenme tüpü 4 F
3. Standart rat yemi
4. Skim milk
5. Eter
6. Bistüri
7. Pens
8. İnsülin enjektörü
9. Eppendorf tüpü
10. Biyokimyasal tüp
11. EDTA'lı tüp
12. Hassas terazi d= 0,1 mg. hassaslığında (SPB 33, Scaltec, İsviçre)
13. Formaldehit
14. Steril idrar kabı
15. Polilizinli lam
16. Milimetrik asetat kâğıdı
17. Glutathione. Sigma G4251
18. DTNB (5-5' ditiobis=2-nitrobenzoik asit). Sigma 8130
19. Metafosforik asit. Sigma M6288
20. Disodyum fosfat (Na₂HPO₄). Sigma S0876
21. Malondialdehid. (HPLC Kiti)
22. Myeloperoksidaz. (ELISA Kiti)
23. PT Modulle Buffer konsantre 1/100 (TA050-PM1X Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
24. Tris Buffer Saline Konsantre Twin 1/20. (TA-999-TT Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
25. Hazır Hidrojen Peroksit
26. HRP kit 125 mlt. Polivalan (TP 125-HL Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)

27. DAB kromojen (TA-125-HD Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
28. TNF- α antikor (02605, Hystopathology, Pecs, Macaristan)
29. Caspase-8 rabbit poliklonal (R-B 1200-P, Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
30. Caspase-3 rabbit poliklonal (R-B 1197, Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
31. Bax mouse monoklonal (AB 16837, Abcam, Cambridge, İngiltere)