

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı

METOTREKSAT UYGULANAN RATLARIN SİYATİK SİNİR VE
MEDÜLLA SPİNALİSİNDE OKSİDAN / ANTİOKSİDANLARIN
DURUMU: KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN ANTİOKSİDAN
KORUYUCU ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ertuğrul UZAR

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Hasan Rifat KOYUNCUOĞLU

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 0994-TU-05 proje numarası ile deteklenmiştir.

ISPARTA-2006

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü desteklerini esirgemeyen tez danışmanım ve emektar hocam Yrd. Doç. Dr. Hasan Rifat KOYUNCUOĞLU başta olmak üzere değerli hocalarım Doç. Dr. Süleyman KUTLUHAN ve Doç. Dr. Serpil DEMİRCİ'ye, laboratuvar imkanlarını kullandıran Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e ve laboratuvar çalışmalarımda bana yol gösteren Doç. Dr. H. Ramazan YILMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Efkan UZ'a, laboratuvar imkanlarını kullandıran Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Namık DELİBAŞ'a, yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ'ye ve Dr. Hicran HİLYILMAZ'a, laboratuvar çalışmamda emeği geçen başta Dr. Serkan KILBAŞ, Dr. Vedat Ali YÜREKLİ ve Dr. Mustafa YILMAZ olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, bu vesileyle sevgisiyle hep yanımda olan sevgili eşim ve hayat arkadaşıma ve sıkıntılı anlarımda bana neşe kaynağı olan sevgili oğlum Melih'e en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

KISALTMALAR

MTX.	Metotreksat,
CAPE.	Kaffeik asit fenetil ester
NAD.	Nikotinamid adenin dinükleotid
MDA.	Malondialdehit
BOS.	Beyin omuruluk sıvısı
SAM.	S-adenozil metionin
SOD.	Süperoksit dismutaz
GSH-Px.	Glutasyon peroksidaz
DHF.	Dihidrofolat
DHFR.	Dihidrofolat redüktaz
GAR.	Glisinamid ribozil 5 fosfat
AICAR.	Aminoimidazol karboksamid ribozil 5 fosfat
RA.	Romatoit artrit
SAH.	S-adenozil homosistein
ALL.	Akut lenfoblastik lösemi
SSS.	Santral sinir sistemi
PSS.	Periferik sinir sistemine
THF.	Tetrahidrofolat
MTHF.	Metilen tetrahidrofolat
NF-κB.	Nükleer Faktör Kappa-B
OH.	Hidroksil
dATP.	Deoksiadenozin trifosfat
NO.	Nitrik oksit
HİV.	Human immunodeficiency virus
i.p.	intraperitoneal
EMİT.	Enzim Multiplied İmmunoassay Yöntemi
HPLC.	High performance liquid chromatographic
GSSG.	Okside glutasyon
GSH.	Redükte glutasyon
LOOH.	Lipid hidroperoksit
DTR.	Derin tendon refleksi

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
KISALTMALAR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Metotreksat'ın Metabolizması	3
2.1.1. Folat Antagonisti olarak MTX'in Mekanizması	4
2.1.2. Metotreksatın Antiproliferatif Etkisi.....	5
2.1.3. Metotreksatın İmmünomodülatör Etkisi	5
2.1.4. MTX in Antiinflamatuvar Etkisi.....	5
2.2. MTX'in Yan Etkileri.....	6
2.3. Metotreksatın Nörotoksitesisi	7
2.4. MTX'e Bağlı Metabolik Değişiklikler ve Olası Klinik Sonuçları.....	9
2.4.1. Folat	9
2.4.2. SAM/SAH.....	10
2.4.3. Homosistein	10
2.4.4. Sülfür İçeren Eksitator Aminoasitler	11
2.5. MTX Toksisitesi ve Oksidatif Stres.....	11
2.6. Kafeik Asit Fenetil Ester	12
2.6.1. CAPE'nin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri	12
2.6.2. CAPE'nin Fonksiyonel Özellikleri	13
2.6.3. CAPE'nin Antioksidan Etkisi	13
2.7. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres	14
2.7.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	16
2.7.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	16
2.7.3. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$).....	17
2.7.4. Tekil oksijen (1O_2)	17
2.7.5. Karbon Merkezli Radikaller (R).....	17
2.8. Serbest Oksijen Radikali Oluşumuna Neden Olan Kaynaklar.....	17
2.9. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri	18
2.9.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	18

2.9.2. Proteinlerde ve Nükleik Asitlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	19
2.10. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler	19
2.10.1. Nonenzimatik Antioksidanlar	19
2.10.2. Enzimatik Antioksidanlar	21
2.10.2.1. Glutasyon Peroksidaz	21
2.10.2.2. Katalaz.....	22
2.10.2.3. Süperoksit Dismutaz	22
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1. Deney Hayvanları.....	24
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması	24
3.3. Anestezi ve Gerekli Materyaller	25
3.4. Kimyasal Maddeler	25
3.5. Deneyde Kullanılan Cihazlar	26
3.6. Numunelerin Korunması, Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması	26
3.6.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler	26
3.6.2. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması.....	26
3.7. Dokularda Biyokimyasal Analizler.....	27
3.7.1. Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivitesinin Tayini	27
3.7.2. Katalaz Enzimi Aktivitesinin Tayini.....	27
3.7.3. GSH-Px Enzimi Aktivitesinin Tayini	28
3.8.4. Malondialdehit Miktarının Tayini.....	28
3.7.5. Ekstraksiyonlu ve Ekstraksiyonsuz Numunelerde Lowry Metodu ile Protein Tayini.....	28
3.8. Enzim Multiplied İmmunoassay Yöntemi ile Metotreksat Düzeyine Bakılması.....	28
3.9. İstatistiksel Analizler.....	29
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	37
6. ÖZET.....	45
7. ABSTRACT.....	46
8. KAYNAKLAR	47

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Metotreksat (MTX) lösemi ve diğer kanserlerde; antimetabolit kemoterapötik ajan olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Bununla birlikte düşük doz MTX, psöriazis ve romatoid artrit (RA) gibi otoimmün hastalıklarda da kullanılmaktadır.

MTX, bir folik asit analogudur. MTX'in asıl etkisi dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşümü için gerekli olan dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe etmesidir. Tetrahidrofolat eksikliği hücre içinde folatın azalmasına yol açar ve bu yüzden hem pürin hem de pirimidin sentezi azalır (2). Pürin ve pirimidin nükleotidleri, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) sentezinde önemli rol oynar. Ayrıca T lenfositlerinin yaşaması ve gelişimi için gereklidir. Pürin ve pirimidin inhibitörü olduğundan MTX immünsüpresif ve antikanser olarak hastalarda kullanılmaktadır (3). Folat eksikliği nedeniyle purin, primidin metabolizması ve biyolojik aminlerin sentezini içeren birçok metabolik yol MTX tarafından etkilenir. Metabolik yollardaki bu değişiklikler MTX'in hem tedavi edici hemde toksik etkilerinden sorumludur (4). MTX'in en çok bilinen yan etkileri böbrek, karaciğer, ince barsak ve santral sinir sistemi üzerinedir. MTX'in SSS üzerine olan nörotoksitesisi periferik sinir sistemine (PSS) göre daha fazla görülmektedir (5-10). MTX'e bağlı nörotoksisite ölümle sonuçlanabilen ciddi bir durumdur (5). MTX nörotoksitesinin mekanizması henüz tam olarak açığa çıkarılmamıştır. Ancak son bilgiler olası mekanizmalardan biri olarak oksidatif stresi sorumlu göstermektedir (6).

MTX'in böbrek, karaciğer ve ince barsak gibi dokularda, kanda ve HeLa hücrelerinde oksidan antioksidan sistem üzerine etkisi araştırılmıştır (7-10). HeLa hücresi mitokondrisinde MTX'in; pirüvat dehidrojenaz, 2 okzogluterat dehidrojenaz ve nikotinamid adenindinükleotid (NAD)'e bağımlı enzimler ile sitozolik nikotinamid adenindinükleotid fosfat (NADP) bağımlı dehidrojenazı inhibe ettiği gösterilmiştir (7). Babiak ve ark. MTX'in HeLa hücrelerinde vücudun önemli antioksidanı olan glutasyon seviyelerini azalttığını saptamışlardır (7). Ratlara MTX verilmesinin; kan, karaciğer, böbrek ve ince barsakta glutasyon seviyelerini azalttığı,

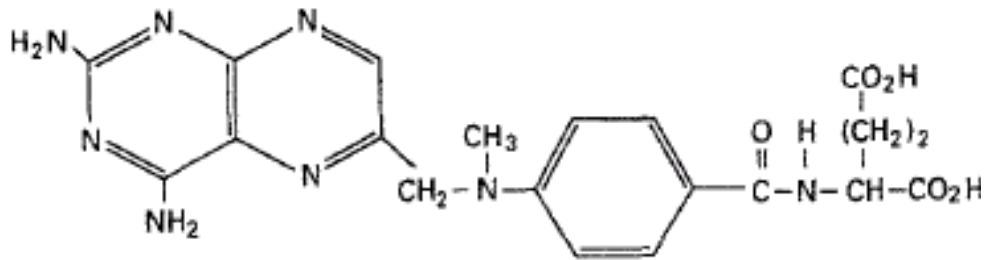
inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz aktivitesini ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) seviyelerini arttırdığı bulunmuştur (8, 9). MTX kullanımına bağlı lökoensefalopati gelişen hastalarda BOS'ta S-adenozil metiyoninde (SAM) azalma olduğu ve MTX nörotoksisitesinin metiyonin metabolizmasında bozulmaya bağlı olabildiği bildirilmiştir (11, 12). Antioksidan olan SAM'ın BOS'ta azalması MTX nörotoksisitesinin mekanizmasının oksidatif stres üzerinden olabileceği hipotezini desteklemektedir.

Bu çalışmada amaç; siyatik sinirde ve medulla spinaliste MTX'in oksidatif hasara neden olup olmadığını ve oluşabilecek oksidatif strese CAPE'nin koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

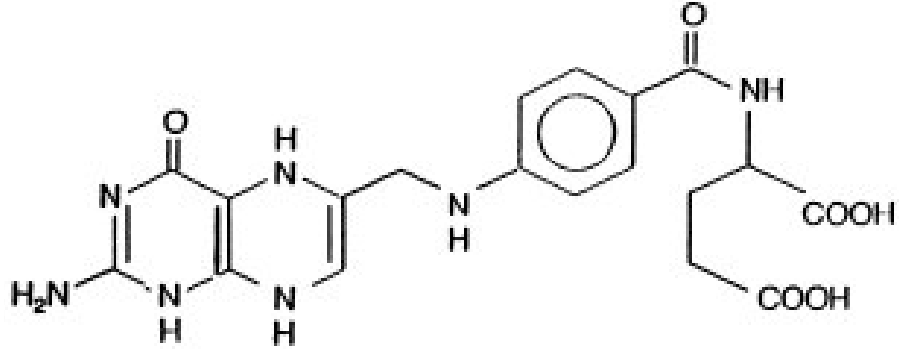
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metotreksat'ın Metabolizması

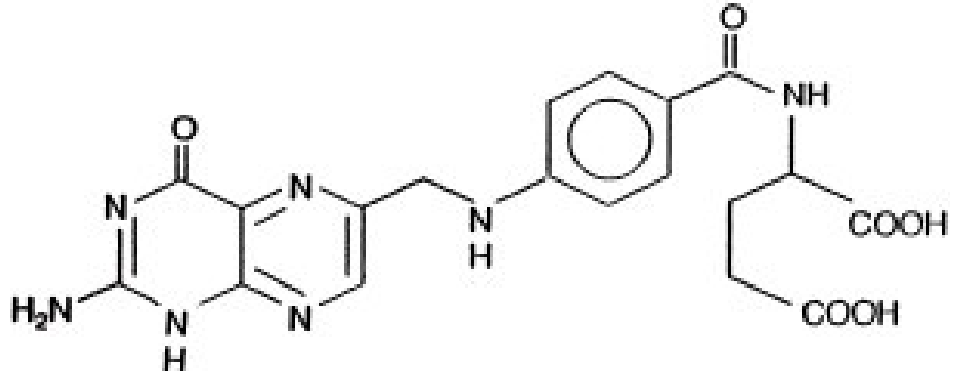
Folata bağlı enzimler tek karbon fragmanların transferi içeren reaksiyonlarda gereklidir. Bunlar arasında en önemlisi DNA sentezi için deoksiüridilat'ın metilasyonu ile timidilat elde edilmesidir. Bu işlem sırasında metilen tetrahidrofolat (MTHF) dihidrofolat'a (DHF) dönüşür. Dihidrofolat (pteroil glutamik asid) ise tekrar kullanılması için tetrahidrofolat'a (THF) dönüşmesi gereklidir. Bu dönüşüm için dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine ve NADPH'ya gereksinim vardır. MTX'in (4-amino 4-deoksi N10 metil pteroil glutamik asid) moleküler yapısı DHF'a benzerdir (Şekil 1 ve 2). MTX'in yapısında birden fazla metil grubu vardır ve DHF'taki OH grubu yerine NH₂ bulunur. 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 büyük oranda böbrek yoluyla elimine olur ve hücrelere aktif taşıma ile girer. 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 ölçümleri yapılmıştır. MTX poliglutamatları hücre içinde tutulur ve DHFR enzimine bağlanarak DHF ile yer değiştirir (2, 13).



Şekil 1: MTX'in moleküler yapısı (2).



Şekil 2: Dihidrofolatın moleküler yapı (13).



Şekil 3: Folik asitin moleküler yapısı (13)

2.1.1. Folat Antagonisti olarak MTX'in Mekanizması

İnsanlarda vücudun ana yapılarından folatı sentezleme özelliği olmadığından diyetle folat alımı zorunludur. DHFR, DHF'yi folat bağımlı yollarda temel bileşen olarak hizmet eden THF'ye dönüştürür. Chabner ve ark. MTX'in folat antagonisti mekanizması olarak iki teoriyi öne sürmüşlerdir (14).

A) Folatın azalma teorisi, intrasellüler folatın azalması DHFR'nin blokajına dayanmaktadır (14).

B) Yarışma teorisi, nükleotidlerin sentezinde görevli basamakları MTX'in doğrudan inhibe etmesine ve DHF birikimine dayanmaktadır (14).

MTX, DHFR'ı inhibe eder bu yüzden tetrahidrofolatın (THF) azalmasına neden olur. MTX poliglutamaları 5,10 metilen THF redüktaz, glisinamid ribozil 5 fosfat (GAR) formiltransferaz ve aminoimidazol karboksamid ribozil 5 fosfat (AICAR) formiltransferaz enzimlerini doğrudan inhibe eder. Bu enzimlerdeki inhibisyon purin ve pirimidin metabolizmasında inhibisyonla sonuçlanır (2). Takiben

DNA ve RNA sentezini inhibe eder. 5-metil THF'ın azalması homosisteinin remilasyonunda azalmaya ve homosistein ile adenosin düzeylerinde artmaya neden olur. MTX, SAM miktarındaki azalmaya ek olarak doğrudan metionin sentetazı ve metionin transportunu inhibe edebilir (6). Transmetilasyonun azalmasını takiben poliaminlerin sentezini de azaltır (2).

2.1.2. Metotreksatın Antiproliferatif Etkisi

MTX, yüksek dozlarda kanser tedavisinde antiproliferatif olarak kullanılır (2, 11). 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 (2, 15).

2.1.3. Metotreksatın İmmünomodülatör Etkisi

İmmün mekanizmalar RA'nın patogenezinde önemli rol oynarlar. B ve T hücrelerindeki aktivite artışının MTX ile baskılandığı gösterilmiştir. RA'lı hastaların idrar, sinovyal sıvı ve lenfositlerinde poliamin seviyeleri yüksek bulunduğu için poliaminler RA'nın patogenezinde rolü olabileceği düşünülmektedir. Poliaminlerin hücre proliferasyonu, farklılaşması ve immün yanıtta önemli görevleri vardır (16). MTX'in immünomodülatör etkisi poliaminlerin sentezindeki inhibisyon ile ilişkili olabilir (2, 16).

2.1.4. MTX in Antiinflamatuvar Etkisi

Metotreksat, RA'da ve psöriatik artrit tedavisinde antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. TNF- α , interlökin 1- β gibi sitokinler ile metalloproteinazlar gibi inflamasyonun mediatörlerinin RA'da MTX tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir (17). Cronstein, MTX'in iki biyokimyasal mekanizma ile antiinflamatuvar etkide rolünün olduğunu öne sürmüştür (18).

1) Homosisteinin yeniden metilasyonunun inhibisyonu (18).

2) Adenozin salınması. İn vitro çalışmalarda fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde düşük doz MTX'in adenozin salınımına yol açtığı gösterilmiştir Adenozin antiinflamatuvar etkide merkezi rolü vardır. (18).

2.2. MTX'in Yan Etkileri

MTX tedavisi esnasında ortaya çıkan yan etkiler oldukça yaygındır. Yan etkinin şiddeti değişiktir. 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 (2).

MTX toksisitesinin mekanizması hala tam anlaşılmamıştır. Ancak bazı yan etkiler bahsedilen pürin, pirimidin, poliamin ve folat gibi metabolik yolların bozuklukları ile doğrudan ilişkilendirilmiştir. Kremer ve ark. ilk kez RA'lı hastaların karaciğer biyopsisinde MTX poliglutamalarının birikmesine folat eksikliğinin eşlik ettiğini göstermiştir (19).

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 (2). Baggott ve ark. MTX tedavisi ile ADA inhibisyonu geliştiğini destekleyen veriler elde etmişlerdir (20).

MTX'in vasküler hastalık için risk faktörü olarak bilinen hiperhomosisteinemiye sebep olduğu bilinmektedir (2, 17). Metilasyon reaksiyonlarının belirleyicisi olan SAM/SAH oranında azalmaya neden olur. Metilasyon reaksiyonlarının inhibisyonu toksisiteye neden olabilir (2). Son bir çalışmada metionin metabolizmasında polimorfizm ile lökoensefalopati arasında ilişki kurulmuştur (12).

2.3. Metotreksatın Nörotoksitesisi

Metotreksat kanser tedavisinde sık kullanılan antimetabolit yapıdaki antifolat bir ilaçtır. Antifolatlar, DHFR'ı inhibe eder ve purin ve timidin biyosentezinin inhibe olmasına yol açar. Metotreksat lösemiler, lenfomalar, meme kanseri, baş ve boyun kanserlerinde kullanılır. MTX'in intratekal olarak tümörün leptomeningeal yayılımını önlemek veya profilaksi için uygulanır (22). Yıllardır düşük doz MTX psöriazis ve RA gibi otoimmün hastalıklarda da kullanılmaktadır (2). Lösemi tedavisinde yüksek doz intravenöz veya intratekal MTX eklenmesi akut lenfoblastik lösemili (ALL) çocuklarda artan yaşam oranı ile ilişkilendirilmiştir. Fakat ilacın santral sinir sistemine belirgin toksik etkisi de vardır ve potansiyel olarak şiddetli nörolojik morbiditeye yol açabilir. Toksik etkiler tedaviden hemen sonra akut olarak ortaya çıkabilir veya uzun süre sonra progresif nörolojik ve kognitif bozukluklara yol açabilir (23). MTX'in neden olduğu nörotoksitenin yaygın ve nadir görülen farklı tipleri bildirilmiştir. Yaygın olarak ortaya çıkan klinik bulgular bulantı, kusma, başağrısı, meningeal irritasyon ve tremordur. Nörotoksitenin daha ağır formları olarak parapleji, ensefalopati, epileptik nöbetler hatta ölüm görülebilir. MTX'in çocuklarda zeka düzeyini geriletmediği, dikkat ve hafıza problemlerine neden olduğuna dair yayınlar vardır (24, 25).

MTX intravenöz verildiğinde santral sinir sistemine (SSS) penetrasyonu dozla ilişkilidir. SSS'de ilaç konsantrasyonunu artırmak için intratekal yol yaygın olarak kullanılır. ALL'li hastalarda intratekal MTX tümörün leptomeningeal yayılımının tedavisinde kullanılır. MTX alan lösemi hastalarında yaşam süresinde uzama ve radyoterapi gerekliliğinin azalma ile ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte intratekal MTX tedavisinde nörotoksitenin sık görülen komplikasyondur. MTX nörotoksitesisi saptanan kişilerin serebral korteks, serebellum, bazal ganglionlarında fibrinoid nekroz, hyalin kalınlaşma ve kalsifikasyon gibi vasküler yapıda değişiklikler bulunmuştur (23).

MTX nörotoksitesisi akut, subakut ve kronik olmak üzere 3 farklı klinik tanımlanmıştır. Orta doz sistemik MTX verilmesinden 5-10 gün sonra subakut toksisite tipik olarak ortaya çıkar. Semptomlar hemiparezi, ataksi, konfüzyon ve epileptik nöbetlerdir. Genellikle MTX nedenli subakut toksisite hafiftir ve geriye

dönüşümlüdür. Sekel azdır veya hiç yoktur. Medulla spinalis ve beyindeki değişiklikler subakut ve kronik toksisite ilişkilidir (23, 25). Kronik toksisite MTX verilmesinden sonra aylar sonra ortaya çıkar ve primer olarak lökoensefalopati görülür. Yürüme bozukluğu, nöbetler, ataksi, spastisite, görme defektleri, hemiparezi, afazi, koma ve ölümle seyredebilir. Kronik toksisite subklinik veya yavaş progresif seyirli olabilir (23). MTX'in intratekal verilmesini takiben aseptik menenjiti içeren akut toksisite tanımlanmıştır.

Akut toksisitede; MTX enjeksiyonunu takiben 2-4 saat içinde baş ağrısı, ense sertliği, bulantı, kusma ve ateş ortaya çıkar. Bazen bacaklara yayılan bel ağrısı, takiben duyu kaybı, parapleji, barsak veya mesane disfonksiyonu ile beyin ve spinal kordda demiyelinizasyon oluşabilir. Tranvers myelopati intratekal metotreksat tedavisinin nadir komplikasyonu olup genellikle birkaç enjeksiyondan sonra ortaya çıkar (23).

MTX tedavisi ile nörotoksisite uzun süredir bilinmesine rağmen mekanizması tam olarak hala anlaşılmamıştır. Fakat multifaktoriyal olabileceğine inanılmaktadır. MTX; folat, eksitatör aminoasitler, homosistein, SAM/SAH, adenozin ve biopterinlerin metabolik yollarını etkiler (25). Beyinde kronik folat azalması, eksitatör aminoasitlerin artışı ile birlikte rölatif homosistein artışı, biopterin ve adenozin metabolizmasındaki değişiklikler akut veya kronik nörotoksisitenin olası mekanizmalarıdır. Akut toksisitenin adenozin düzeylerinde artışla kronik toksisitenin ise homosistein, eksitatör aminoasitler ve biopterinlerin artışı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. MTX'in BOS'ta yüksek oranda olması, BOS'tan eliminasyonunun gecikmesi, sık aralarla kullanılması ve birikici etkisi MTX tedavisine bağlı nörotoksisite riskini artırmaktadır (23).

MTX'in ana hedefi DHFR enziminin inhibisyonudur. Bu nedenle DHF'ın THF'a dönüşümünü azalır. THF eksikliği intrasellüler folatın azalmasına yol açar. Böylece hem pürin hemde pirimidin sentezi azalır ve takiben tümör hücrelerinde ve normal hücrelerde DNA sentezinde bozulmaya yol açar (26). Metotreksat; proteinler, lipidler ve myelinin şekillenmesi için çok önemli olan transmetilasyon reaksiyonlarına da belirgin olarak müdahale eder. Muhtemelen demiyelinizasyona MTX'in transmetilasyon reaksiyonlarına etkisi yol açar. BOS'ta metionin ve

SAM'da azalma, SAH ve homosistein seviyelerinde artmaya neden olur. Artmış kan homosistein seviyeleri endotel hücre hasarı ve infarktlarla neden olduğu bilinmektedir. Bu MTX nörotoksitesinin vasküler yönünü açıklayabilir (27). Transmetilasyon reaksiyonlarında SAM'ın metil vericisi olması ile miyelinizasyonun sürdürülmesinde önemli rol oynar. Folat metabolizmasının konjenital bozukluğunda, human immunodeficiency viruse (HİV) bağlı ensefalopatide ve beslenmeyle ilgili folat eksikliği olanlarda da BOS'ta SAM düzeylerinde azalma bulunmuştur (2, 28, 29). SAH metilasyon reaksiyonları yoluyla SAM'a dönüşür. BOS'ta azalmış SAM ve artmış SAH seviyeleri HİV pozitif bir hastada bildirilmiştir (30). Beyinde bulunan metil transferaz enzim aktivitesi; beyindeki SAM'ın konsantrasyonu ile yakından ilgilidir ve doğrudan SAH tarafından inhibe edilir. BOS'ta azalmış SAM/SAH oranı (metilasyon oranı) metil transferaz enzimini inhibe edebilir. Böylece SSS'de hipometilasyona ve sonucunda da demyelinizasyona yol açabilir. ALL'li hastalarda MTX'in SAM eksikliği yaparak demyelinizasyona neden olabileceği ileri sürülmüştür (11). Benzer olarak Vitamin B12 eksikliği ile ilişkili nöropatinin (subakut kombine dejenerasyon) patogenezinin SSS'de metilasyon reaksiyonları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (31). Oksidatif stresle ilişkili çeşitli deney modellerinde SAM'ın antioksidan etkisi gösterilmiştir. Beyin iskemi/reperfüzyon ile ilgili deneysel çalışmasında SAM'ın dışarıdan verilmesi ile beyin lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir (32).

2.4. MTX'e Bağlı Metabolik Değişiklikler ve Olası Klinik Sonuçları

Metotreksatın birçok metabolik yolu etkilediğinin kanıtları vardır. SAM/SAH oranında azalma, sülfür içeren aminoasitler, homosistein, adenozin seviyesinde yükselme, tetrahidrobiyopterin seviyesinde azalma MTX'in yol açtığı akut, subakut ve kronik nörotoksitesinin sebebi olabilirler (25, 27).

2.4.1. Folat

MTX ile tedavi olan hastaların BOS'unda 5-MTHF seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Folat eksikliği ile ilişkili nörolojik semptomlar; uykusuzluk, unutkanlık, nöbetler, huzursuzluk, depresyon ve psikozdur. Folat metabolizması, homosistein ve biopterin metabolizması ile ilişkili olduğundan patolojik bulguların

direkt olarak folat azalması yüzünden olup olmadığını değerlendirmek güçtür. Folat eksikliği olan hastalarda SAM seviyelerinde azalma gösterilmiştir (25, 27).

2.4.2. SAM/SAH

Katekolaminler, indolaminler, kolin, kreatin, nükleik asitler, proteinler ve fosfolipidler gibi çeşitli moleküllerin metil verici SAM'dır. Beyinde SAM seviyesinin azalması hipometilasyona yol açabilir. Depresyon, Alzheimer Hastalığı ve Parkinson Hastalığı gibi çeşitli nöropsikiyatrik hastalıklarda BOS'ta ve SAM seviyesinde azalma bulunmuştur (25). SAM eksikliğinin SSS'de demiyelinizasyona neden olduğu öne sürülmüştür (33). Beyinde, spinal kordda demiyelinizasyonu ve metil transfer bozukluğu olan yenidoğanların BOS'unda SAM'ın azaldığı bulunmuştur (25). Bununla birlikte beyindeki metilasyon kapasitesini belirlemek için SAH seviyesi de göz önünde bulundurulmalıdır. SAH metilasyon reaksiyonlarının güçlü bir inhibitörüdür. Bu yüzden SAM/SAH; metilasyon oranı olarak değerlendirilmektedir (25, 27).

Kishi ve arkadaşları, aynı tedavi protokünü alan toksik lökoensefalopatisi olan ve olmayan ALL hastalarında SAM/SAH oranını karşılaştırmışlar ve toksik lökoensefalopatisi olan hastalarda daha düşük bulmuşlardır (11). Bu nedenle MTX'in neden olduğu lökoensefalopatiden metionin metabolizmasındaki bozukluğun sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir (11,12).

2.4.3. Homosistein

Homosistein son derece reaktif olan sülfidril grubunu içeren bir aminoasittir. Ateroskleroz, miyokard infarktüsü ve inme için bağımsız risk faktörü olarak bilinmektedir. Sistatyonin beta sentaz veya metionin sentaz enzimlerinin eksikliği; homosistinüri, tromboembolizm, nöbetler ve mental retardasyon için yüksek risk oluşturmaktadır (24). Homosisteinin farklı patofizyolojik mekanizmaları vardır. Homosistein artışı; vasküler endotele ve intima doğrudan toksiktir ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunun artmasına sebep olur (34). Ayrıca kanda koagülasyon oranlarında değişmeye yol açmakta, tromboza eğilimi artırmakta ve oksidatif strese neden olmaktadır (35).

MTX'in yüksek ve düşük doz tedavilerinin plazma homosistein düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (12, 25). MTX tedavisinden sonra görülen iskemik beyaz cevher değişiklikleri, mikroanjiopati ve fokal nörolojik defisitlerin BOS'ta artmış homosistein yüzünden olduğu düşünülmektedir (25).

2.4.4. Sülfür İçeren Eksitatör Aminoasitler

Sülfür içeren aminoasitler, homosisteinden elde edilmektedir. Sülfür içeren aminoasitler, aspartat ve glutamat salınımı sağlar ve eksitatör aminoasitlerin nöronal ve glial membranlardan geri alımını inhibe eder. MTX'in oluşturduğu astrosit hasarı; eksitatör aminoasit geçişindeki artışa bağlı olabilir (25). Retrospektif bir çalışmada Quin ve arkadaşları; kanser tedavisi için MTX alan hastaların BOS'unda sülfür içeren aminoasit düzeylerine bakmışlar. Sülfür içeren aminoasit düzeyleri nörotoksitesi olan hastalarda yüksek saptanmışken kontrol grubunda saptanamamıştır (24).

Yapılan bir deneysel çalışmada Wistar sıçanlara intraventriküler MTX verilmesini takiben hipokampusün CA4 bölgesinin etkilendiği saptanmıştır. MTX'in beyin dokusundaki sitotoksik etkisinin nedeni olarak da monoaminlerin dağılımındaki bozulma gösterilmiştir (4).

2.5. MTX Toksisitesi ve Oksidatif Stres

Antikanser ilaçlarla yapılan son zamanlardaki toksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerinde durulmaktadır. Karaciğer, böbrek, ince barsak ve SSS'deki MTX'in yan etki mekanizması olarak oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır (6-10, 37, 38). HeLa hücresi mitokondrisinde pirüvat dehidrojenaz, 2-okzogluterat dehidrojenaz ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağımlı enzimler ile sitozolik nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) bağımlı dehidrojenazın MTX tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (7). Babiak ve ark. MTX'in HeLa hücrelerinde vücudun önemli antioksidanı olan glutatyon seviyelerini azalttığını göstermişlerdir (7). Jahovic ve ark. 20 mg/kg tek doz MTX i.p. uygulanan sıçanların kanında, karaciğer ve böbrek dokularında; myeloperoksidaz aktivitesinde artış, glutatyon seviyelerinde azalma ve MDA seviyelerinde belirgin artış olduğunu bulmuşlardır (8). Miyazono ve ark. MTX'in yan etkisi olarak sıçan ince barsağında SOD ve CAT aktivitelerinde

artma, glutasyon seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX'in yol açtığı ince barsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdir (9). Benzer şekilde Devrim ve ark. MTX nefrotoksisitesinde oksidatif stresin önemli rolünü koymuşlardır (37). Uz ve arkadaşları benzer şekilde MTX alan sıçanların böbrek dokularında NO seviyelerinde artışı bildirmişlerdir (38). Bu nedenle MTX toksisitesinden korunmak için antioksidan ajanlarla birlikte kullanması gerekliliği öne çıkmaktadır.

2.6. Kafeik Asit Fenetil Ester

Yapılan çalışmalarda bal arılarının ürettiği propolisin aktif bir komponenti olan CAPE'nin antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, immünomodülatör ve nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (39-47).

Arı kovanlarının çatlak ve hasarlanmış yerlerinin tamirinde, dış ortamdan izole edilmesinde, giriş deliklerinin daraltılmasında, kovanın içine giren zararlı maddeler, mikroorganizmalar ve böceklerin muflanarak etkisiz duruma getirilmesi işlemlerinde "*propolis*" kullanılmaktadır (47, 48). Propoliste yaklaşık 100 çeşitten fazla bileşen bulunmuştur. Propolis, arıların bitkilerden topladığı maddelere göre değişmektedir. Flavonoidler, kafeik asit ve esterleri propoliste en fazla bulunan ve propolisin biyolojik olarak aktif bileşenleridir (46, 49, 50).

2.6.1. CAPE'nin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri

Yapıca flavonoidlere benzeyen CAPE'nin iki halkasal yapısı vardır (41). Halkalardan bir tanesinde molekülün hemen hemen bütün kimyasal özelliklerini gösteren ve fonksiyonel olan iki "-OH" gruba vardır (şekil 4). Hidroksil grupları, aktif bir şekilde elektron alıp vererek oksitleyici ve redükleyici özellik gösterirler. Çok uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özelliğindedir (39, 46). Böylece molekülün kolayca hücre membran yapılarından geçmesi ve etki edeceği bölgeye ulaşması kolaylaşır. Hücre kültürü ve deney hayvanı araştırmalarında CAPE her türlü yoldan rahatlıkla verilebilmekte ve ilgili vücut bölgesine ulaşımı kolay olmaktadır (51).

2.6.2. CAPE'nin Fonksiyonel Özellikleri

CAPE, arıların bitkilerden topladığı maddeler içinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bileşenlerinden biridir. Eskiden propolis ampirik olarak antienflamatuar, immünomodülatör, antioksidan, antimikrobik gibi birçok sebeple tedavi amaçlı kullanılmış, iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir (46, 49, 52).

CAPE; ornitin karboksilaz, 5-alfa redüktaz, proteaz, lipooksijenaz, HIV-1 integras gibi bazı enzimlerin potansiyel engelleyicisidir. Ayrıca nükleer transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör Kappa-B (NF-κB)'nin aktivasyonunu etkili ve spesifik olarak inhibe eder (39-41, 53). Pentilentetrazolün neden olduğu nöbete bağlı SSS'deki hasara karşı CAPE'nin nöroprotektif ve antioksidan etkisi de gösterilmiştir (44).

2.6.3. CAPE'nin Antioksidan Etkisi

CAPE, linoleik asit ve araşidonik asitin 5- lipooksijenaz tarafından oluşturulan oksijenasyonunu inhibe eder. Yaklaşık olarak 10 micromol/L konsantrasyonda in vitro koşullarda nötrofiller veya ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke eder (38, 39, 54, 55).

İlhan ve ark. tavşanlarda spinal kordda iskemi/reperfüzyon hasarına karşı CAPE'nin ve metil prednizolonun koruyucu etkisini ve spinal kord dokusunda MDA, SOD, CAT ve histolojik değişikliklere araştırmışlar. MDA seviyeleri CAPE grubunda metil prednizolon grubuna göre belirgin olarak düşük bulmuşlardır, kontrol grubuyla kıyaslandığında CAPE grubunda ek doku hasarı saptamamışlardır (54). Şahin ve ark. spinal kord iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulan ratların spinal kord dokusunda NO'da artışı saptamışlar. Spinal kord iskemi/reperfüzyonu yapılan ve CAPE tedavisi uygulanan ratların spinal kordunda NO seviyesini kontrol grubu ile benzer olduğunu bildirmişlerdir (55). Sonuç olarak, spinal kord iskemi/reperfüzyon hasarından koruyucu ilaç olarak CAPE'yi ileri sürmüşlerdir (54, 55).

Diyabetik rat karaciğerinde, intestinal reperfüzyon hasarında ve testiküler torsiyon-detorsiyondan sonra CAPE'nin antioksidan koruyucu etki üzerinde durulmuştur (56-58). Yılmaz ve ark. streptozosinle diyabetik olan ratların

karaciğerinde MDA seviyeleri, SOD ve CAT aktivitelerini araştırmışlar. Diyabetik ratların karaciğerinde MDA seviyelerinin kontrol ratlara kıyasla artmış olduğunu ve MDA seviyelerinin CAPE grubunda kontrol grubunun düzeyinde kaldığını bildirmişlerdir. CAPE tedavisi verilen diyabetik rat karaciğerinde SOD ve CAT aktivitelerinin azaldığını saptamışlardır. CAPE serbest oksijen radikallerini süpürücü etkisinden dolayı diyabetik rat karaciğerinde SOD ve CAT aktivitelerinde yükselmeyi engellediği öne sürülmüştür. Sonuçta, diyabetik rat karaciğerinde oksidatif hasarı CAPE'nin önlediği gösterilmiştir (57).

Özyurt ve ark. kanser tedavisinde kullanılan antikanser antibiyotiklerden "*bleomisin*"e bağlı olarak gelişen akciğer fibrozisinin mekanizması konusunda oksidatif stresi araştırmışlar. Çalışma kapsamında, CAPE'nin fibrozis üzerine etkisi incelenmiş, antioksidan enzimlerden SOD ve CAT aktivitelerinde bleomisin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalma olurken myeloperoksidaz aktivitesinde artış görülmüştür. CAPE; CAT ve SOD aktivitelerini kontrol grubu seviyelerine yükseltirken myeloperoksidaz aktivitesini kontrol grubu seviyelerinde kalmasını sağlamıştır. Fibrozisli dokudaki NO, MDA ve OH-prolin seviyelerinde bleomisin grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlenmiş ve CAPE grubunda biyokimyasal parametreler kontrol ile benzer düzeyde bulunmuştur. Bu sonuçlar, CAPE'nin yüksek antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisine sahip olduğunu göstermiştir (59).

Yağmurca ve ark. antikanser olan "*doksorubisin*"in böbrek üzerine toksik etkisi ve bu toksik etkiye CAPE'nin koruyucu etkisini araştırmışlar. Doksorubisin grubunda kontrol grubuna kıyasla myeloperoksidaz, NO, MDA seviyeleri renal dokuda artmış ve CAT ve GSH-Px aktiviteleri azalmış olarak bulmuşlardır. Doksorubisinle birlikte CAPE verilmesinin lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunda azalmaya neden olduğunu görmüşlerdir (60). Benzer şekilde Fadillioğlu ve ark. doksorubisinin neden olduğu nöronal oksidatif hasara karşı CAPE'nin nöroprotektif etkisini göstermişlerdir (61).

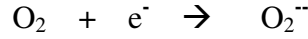
2.7. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, hücre metabolizması esnasında biyokimyasal reaksiyonlarla ortaya çıkan, en dış tabakasında bir süre için bile eşleşmemiş

elektron taşıyan atom olarak tanımlanmaktadır. Eşleşmemiş elektronlar bitişiğindeki lipidler, proteinler ve karbonhidratlar gibi moleküllere karşı çok reaktiftir ve hücrelerde hasara 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. Ayrıca vücutta serbest oksijen radikalleri birçok hastalığın progresyonunda ve etyolojisinde rol oynamaktadır (62-64).

Antioksidan savunma mekanizmaları ile serbest radikal oluşumunu hızlandıran etmenler arasındaki denge bozulduğunda oksidatif veya oksidan stres ortaya çıkar. Beyin geniş oranda oksijen tüketir ve oksidatif hasara hassastır. Mitokondrial elektron taşıma sisteminde norepinefrin, dopamin gibi bazı nörotransmitterlerin otooksidasyonu hipoksi ve iskemi sırasında oksidan yapılanmayla ve doku hasarıyla sonuçlanır. Süperoksit ve nitrik oksitin birleşmesiyle oksidatif hasar gelişir. Her iki molekül kan akımı regülasyonu ve nörotransmisyonunda önemli görevler görür. Bu moleküllerin metabolizması veya üretilmesindeki bozulma patolojik sonuçları ortaya çıkarabilir (62). Serbest radikallerin oksidatif stres veya oksidatif hasar nedeniyle birçok hastalıkla ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Örneğin Alzheimer hastalarının beyinlerindeki majör biyomoleküllerin oksidatif hasarı artırdığı çalışmalarda gösterilmiştir (65). Kanser, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus'u içeren birçok hastalıkta oksidatif hasarın rol oynadığı düşünülmektedir. Oksidatif hasar hastalığın başlangıcında veya patolojisinde rol oynuyorsa başarılı antioksidan tedavi hastalığı önleyebilir veya başlangıcını geciktirebilir (62-65).

Serbest radikal denildiğinde ilk olarak akla gelen biyolojik ortamlarda bulunan serbest oksijen radikalleridir. Oksijen molekülüne bir elektronun transfer edilmesi yoluyla oksijenin indirgenmesi ile süperoksit serbest radikal anyonu ($O_2^{\cdot-}$) oluşmaktadır (63).



Oksijen molekülüne 2 elektron aktararak indirgenmesi sonucunda ise hidrojen peroksit serbest radikali (H_2O_2) oluşmaktadır (52).



Hidrojen peroksit, serbest radikaller arasında özel bir öneme sahiptir. Çünkü ortamda geçiş metal iyonları bulunuyorsa, kolaylıkla parçalanarak biyolojik sistemlerde daha fazla hasar oluşturan ve oksijen radikallerinin daha reaktifi olan hidroksil radikaline ($\cdot OH$) dönüşür. Örneğin; Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu demir iyonlarını katalizlemektedir. Formülü; $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$ 'dır (64).

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

Süperoksit molekülü, serbest radikal olarak bilinmesine rağmen, biyolojik dokularda fazla hasar oluşturmaz. Bu molekülün önemli olan yönü, bir hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarını indirgeyici özelliğinin bulunmasıdır (63, 64). Aynı zamanda $O_2^{\cdot -}$; NO ile reaksiyona girerek peroksinitriti ($ONOO^{\cdot -}$) oluşturmaktadır. Süperoksit radikali, ortam pH'sının düşük olduğu durumlarda bir proton alarak daha reaktif olan hidroperoksil radikaline ($HO_2^{\cdot -}$) dönüşür. Fakat ortam pH'sı fizyolojik sınırlarda iken oluşan hidroperoksil formu %1'in altındadır (64).

2.7.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit normal olarak her aerobik hücrede bulunur. Hücre solunumu sırasındaki çeşitli metabolik işlemler ve oksidatif stres sonucunda üretilir (64).

Bu molekülün kendisi reaktif değildir. Fakat diğer molekülleri okside etme yeteneği vardır. Ultraviyole ışınları ile kolaylıkla parçalanabilmektedir. Enzimatik olarak CAT ve glutatyon peroksidaz ile non-enzimatik olarak da piruvat, fenton reaksiyonunu etkileyerek hidrojen peroksit zararsız hale getirilir (66, 67).

2.7.3. Hidroksil Radikali ($\cdot\text{OH}$)

Yüksek reaktivite yeteneği olmasından dolayı hemen hemen tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilen bir serbest radikaldir. Çok kısa ömürlü olmasından dolayı reaksiyona girmeden önce hücreye diffüzyonu güçtür. Ancak bu radikalın çok küçük miktarları bile üretilmiş olduğu dokularda aşırı hasar yapabilmektedir (63).

2.7.4. Tekil oksijen ($^1\text{O}_2$)

Bu molekül gerçekte bir serbest radikal değildir. Ancak serbest radikal reaksiyonları esnasında üretilmesinden dolayı serbest oksijen radikalleriyle birlikte değerlendirilen reaktif oksijen türüdür (64).

2.7.5. Karbon Merkezli Radikaller ($\text{R}\cdot$)

Okside edici bir serbest radikalın biyolojik bir molekülü etkilemesi sonucunda karbon merkezli radikaller oluşmaktadır. Karbon merkezli radikal, moleküler bir düzenleme ile izole çift bağ formundan, konjuge dien formuna geçer. Bu biyolojik moleküller, protein, karbonhidrat, lipid veya nükleik asit olabilir. Bu radikaller ilgili peroksil radikallerini ($\text{ROO}\cdot$) oluşturmak üzere oksijen molekülü ile çok hızlı bir şekilde birleşirler. Ayrıca peroksil radikalleri, alkoksil radikallerini ($\text{RO}\cdot$) oluşturan reaksiyonlara da katılabilmektedir (63-65, 68).

2.8. Serbest Oksijen Radikali Oluşumuna Neden Olan Kaynaklar

Serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasında iki önemli kaynak rol oynamaktadır (69):

A) Serbest oksijen radikali oluşumuna neden olan endojen kaynaklar;

- Ksantin oksidaz, adenozin deaminaz gibi pürin katabolizmasında rol alan enzimler (38).

- İntoksikasyon, iskemi, travma gibi durumlara bağlı olarak meydana gelen oksidatif stres (55-60).

- Hücre mitokondriumunda bulunan elektron transport sistemi (69).

- NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetazı içeren plazma membranı enzimleri ve lipid peroksidasyonu (40).

- Peroksizomlarda bulunan enzimler ve nükleus membranı ve endoplazmik retikulumda bulunan elektron transport sistemleri (71).

- Makrofaj gibi fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlama (72).

-Tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiyotikler gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu (73, 74).

- Yaşlanma (74, 75).

B) Serbest oksijen radikali oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklar;

- İyonizan ve non iyonizan radyasyon (76).

- Güneş ışığı (77).

- Elektromagnetik alan (78).

- Metotreksat, cisplatin, doksorubisin, bleomisin gibi çeşitli antineoplastik ajanlar (37, 38, 59, 79).

- Anestezik maddeler, aromatik hidrokarbonlar, solventler, hava kirliliği, sigara (73, 80).

- Stres ve egzersiz (81).

- Alkol gibi bağımlılık yapan maddeler ve yiyeceklerde bulunan çeşitli maddeler (73, 82, 83).

2.9. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

2.9.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Hücrelerin membranlarında bulunan poliansatüre yağ asitleri (PUFA), okside edici serbest radikaller tarafından kolaylıkla etkilenebilmektedirler. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif hasarı lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir (74). Lipid peroksidasyonu sonucunda hücrede kendiliğinden devam eden zincirleme reaksiyonlar başlamaktadır. Oksidasyon sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri (LOO[•]) bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonları başlatırlar (74). Zincirleme reaksiyonlar sonucunda hidroperoksitler oluşmaktadır. Hidroperoksitler de daha zararlı radikal özelliği olan

türlere, özellikle aldehitlere çevrilirler. Aldehitlerin çoğu biyolojik olarak aktiftirler ve lipid hidroperoksitler parçalandığı zaman oluşurlar. Bunlardan en çok bilineni 4-hidroksi-2-nonenaldir (84, 85). Bu bileşikler oluştukları yerlerden hücrenin diğer kısımlarına geçerek hasar oluşturabilmektedirler. Hidroksinonenal; Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı, Diyabetes Mellitus ve Ateroskleroz gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (86).

2.9.2. Proteinlerde ve Nükleik Asitlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Poliansatüre yağ asitleri serbest radikal etkilerine duyarlı olmalarına karşın protein ve nükleik asitler bu zararlı etkilere karşı daha dirençlidir. Bunun başlıca sebebi, şiddetli hasar oluşturucu zincirleme reaksiyonların protein ve nükleik asit moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır (87). Serbest radikaller DNA molekülüne çok yakın bir bölgede meydana geliyorsa, okside edici radikaller tarafından DNA molekülü kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir (88).

2.10. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler

2.10.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

S-adenozil metionin: Tüm hücrelerde metioninden sentezlenir. Hücrenin büyüme ve farklılaşmasında önemli rolü vardır. Beyin iskem/reperfüzyon rat modelinde dışardan SAM verilmesi lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir. SAM'ın in vivo antioksidan aktivitesi glutatyon prekürsörü olarak tanımlanmıştır (32).

Glutatyon: Oksidatif stresin ölçümünde kullanılan antioksidandır. Redükte glutatyon (GSH)/ okside glutatyon (GSSG) oranı, oksidatif durumlarda azalır. GSH ve GSSG, high performance liquid chromatographic (HPLC) ve spektrofotometrik tekniklerle tespit edilir (80). Tripeptid yapısında olan bu molekül; karaciğerde sistein, glisin ve glutamattan sentezlenebilmektedir. Bir antioksidan olarak önemli görevleri olan glutatyon, peroksitlerle ve serbest radikallerle reaksiyona girerek onları zararsız ürünlere çevirir. Bu sayede hücreleri serbest radikallerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı koruyabilmektedir. Glutatyon, proteinlerdeki -SH gruplarını da indirgenmiş halde tutarak onların okside olmasını engelleyebilir (81).

C vitamini: Ekstrasellüler sıvılarda bulunmaktadır. Hidroksil ve süperoksit radikallerini direkt olarak temizleme yeteneği vardır (89).

E Vitamini: Hücre membranlarının lipid kısımlarında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunarak lipid peroksitlerinin inaktivasyonunu sağlar. Lipid peroksit zincirini kırarak zincirleme olarak devam eden lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını durdurur (89).

β-Karoten: Vitamin A'nın prekürsürüdür. Hücre membranlarında bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir. Peroksitlere karşı doğrudan etki ederek onları inaktif hale getirir (79, 81).

Seruloplazmin: SOD enziminin 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 (90, 91).

Transferrin: Dolaşımda serbest halde bulunan demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir (90, 91).

Bilirubin: Serbest radikalleri tutma yeteneği vardır. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin temizleyicisidir (90, 91).

Ürik asit: Plazmada normal konsantrasyonlarda bulunduğu, hidroksil, peroksil ve süperoksit radikallerini temizleme yeteneği vardır (90, 91).

Albümin: Geçiş metallerini bağlama özelliği vardır. Lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) bağlayıcısıdır (90).

Glukoz: Hidroksil radikalini tutarak onun zararlı etkilerini engeller (92).

Piruvat: Güçlü antioksidandır ve H₂O₂ bağlayıcı özelliği vardır (93).

Sistein: Hipoklorit ve serbest radikal temizleyici özelliği bulunmaktadır(74).

Taurin: Memelilerin beyin, kalp ve böbreğinde yüksek oranda bulunan yarı esansiyel aminoasittir. Taurinin yararlı etkisi lipid peroksidasyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek antioksidan etkisi gösterilmiştir. Taurin ratlarda

MTX'in yol açtığı doku hasarını önlemiştir. Ksenobiotiklere bağlanma yeteneği vardır. Hipoklorit ile de reaksiyona girerek etkisini azaltır (94).

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 (8, 78).

2.10.2. Enzimatik Antioksidanlar

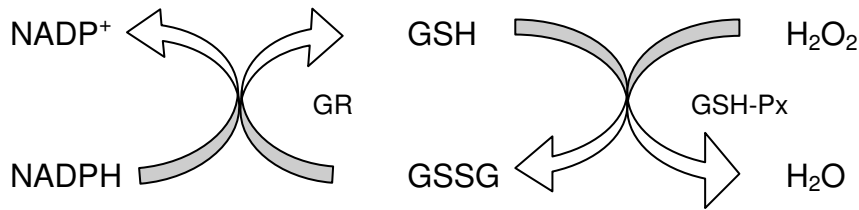
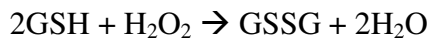
Başlıca antioksidan enzimler; Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), CAT (CAT) ve Süperoksit Dismutaz (SOD)'dir (81, 87).

2.10.2.1. Glutasyon Peroksidaz

GSH-Px yapısında bir metal olan selenyumu bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. Bu enzim, redükte glutasyonun okside glutatyona çevrildiği in vitro ortamda gerçekleşen reaksiyonda hidrojen peroksidi yüksek spesifite ile kullanarak onu detoksifiye etmektedir (şekil 5).

Şekil 5'te gösterildiği gibi GSH'un GSSG haline dönüştüğü reaksiyonda glutasyon peroksidaz enzimi hidrojen peroksiti suya indirger. Daha sonra glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak okside glutasyon tekrar redükte hale dönüştürülebilir (81, 87).

Reaksiyon şu şekildedir;



Şekil 5: Glutasyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü (78). (GSH=Redükte glutasyon, GSSG=Okside glutasyon, GSH-Px=Glutasyon peroksidaz, GR=Glutasyon redüktaz, H₂O₂=Hidrojen peroksit)

Hidrojen peroksitin düşük konsantrasyonda olması durumlarında glutasyon peroksidaz enzimi CAT enzimine göre daha etkilidir (95).

2.10.2.2. Katalaz

Bu antioksidan enzim, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Bu enzimin molekül kütlesi 240.000 daltondur. Her biri ferriprotoporfirin grubu içeren dört alt üniteden oluşmuştur. Ferriprotoporfirin, prostetik grubunda +3 değerlikli Fe atomu bulunan protoporfirin IX halkasıdır (95).

Hemen hemen bütün memeli hücrelerinde katalaz enzimi bulunur ve özellikle hidrojen peroksitin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda etkilidir (95).

Çeşitli dokuların katalaz enzimi aktiviteleri oldukça büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Katalaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokular karaciğer ve böbrektir. Bu enzimin aktivitesinin en düşük seviyede görüldüğü yerler ise destek dokularıdır. Bu enzim dokularda başlıca mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunmaktadır. Buna ek olarak endoplazmik retikulumda ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir. 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 (glutasyon peroksidaz gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (96).

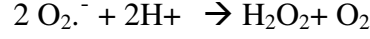
Katalaz ve glutasyon peroksidaz enzimleri, benzer etkisi olmasına rağmen hücre içindeki yerleşim yerleri ve etki yerleri bakımından farklılık göstermektedirler. Katalaz enzimi peroksizomlarda daha etkili iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkilidir.

Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir; $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

2.10.2.3. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz, tek bir enzim değil aslında bir enzim grubudur. Bu enzim grubu, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dönüşmesini katalize etmektedir.

Bu enzim grubunun katalizlediği reaksiyon ařađıda gösterilmiştir;



Metalloenzim grubundan sayılmaktadır. Bunun nedeni yapısında metal bulunmasıdır. Bu enzimin insanda var olan iki farklı tipi olan Cu-Zn SOD ve Mn-SOD dir. Bu enzim grubunun canlıda bulunduğu bölgeye göre değişiklik gösteren üç farklı izoformu tespit edilmiştir. Eğer enzim ekstrasellüler alanda bulunuyorsa ekstrasellüler SOD (ec-SOD), sitoplazmada bulunuyorsa sitoplazmik SOD (Cu, Zn-SOD) ve mitokondride bulunuyorsa mitokondrial SOD (Mn-SOD)'dur (97). Hücrenin sitoplazmasında bulunan Cu, Zn-SOD'un moleköl ağırlığı 32.000 daltondur. İki alt ünitesi bulunan bu SOD izoformunun bir ünitesinde Cu atomu, diğer ünitesinde ise Zn atomu bulunmaktadır. Hücrenin mitokondrisi içinde bulunan Mn-SOD ise 23.000 dalton ağırlığındadır ve iki alt biriminden her birisi bir Mn atomu içermektedir. Bu birimlerdeki mangan atomları +3 değerliklidir (78, 98, 99).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada; 8-12 haftalık ve ağırlıkları 200–250 gram arasında olan 19 adet Wistar-Albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Deney hayvanlarının bilimsel amaçla kullanılması için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu onayı alındı ve çalışmamız etik kurul kurallarına uygun olarak yapıldı.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Deney, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Araştırma Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütüldü. Ratlar rastgele olarak üç gruba ayrıldı. Grup 1; Kontrol grubu (n=6), Grup 2; MTX grubu (n=6), Grup 3; MTX + CAPE grubu (n=7) Her çalışma grubundaki ratlar standart mevsimsel ışık ve ısı koşullarında (~22° C) bulunduruldu. Her biri ayrı kafeslere konan ratlara yeteri kadar içme suyu ve standart rat pellet yemi verildi.

Deney sırasında gruplara yapılan enjeksiyonlar Tablo 3’de gösterilmiştir. Çalışmanın ilk günü kontrol ve MTX grubuna intraperitoneal (i.p.) olarak serum fizyolojik (grup 3’e uygulanan CAPE ile aynı hacimde) verilirken MTX + CAPE grubuna 10 µmol/kg CAPE i.p. uygulandı. Çalışmanın 2. günü MTX ve MTX + CAPE gruplarına metotreksat 20 mg/kg/gün i.p. yoldan tek doz verildi. Ayrıca MTX+CAPE grubuna 10 µmol/kg CAPE i.p olarak aynı gün verildi ve kontrol grubuna aynı hacimde serum fizyolojik i.p. verildi. Daha sonra 5 gün boyunca MTX + CAPE grubuna 10 µmol/kg/gün CAPE’ye devam edildi. Toplam olarak MTX CAPE grubuna CAPE 7 gün verilmiş oldu. Kontrol ve MTX grubuna ise 7 gün boyunca aynı hacimde serum fizyolojik verildi.

Tablo 3. Deneyde gruplara yapılan injeksiyonlar

Günler	Kontrol Grup	MTX grup	MTX+CAPE grup
1. gün	SF	SF	CAPE
2. gün	SF	MTX	MTX+CAPE
3. gün	SF	SF	CAPE
4. gün	SF	SF	CAPE
5. gün	SF	SF	CAPE
6. gün	SF	SF	CAPE
7. gün	SF	SF	CAPE

SF; serum fizyolojik, MTX; metotreksat, CAPE; Kafeik asid fenetil ester

3.3. Anestezi ve Gerekli Materyaller

Ratlar, son injeksiyondan 24 saat sonra (deneyin 8. günü) intramusküler 25 mg/kg ketamin hidroklorid (ketalar, Eczacıbaşı) ile anestezi yapılarak sakrifiye edildi ve portal venden ve intrakardiyak kan alındı. Siyatik sinir ve medulla spinalis doku örnekleri alındı. Doku örnekleri biyokimyasal çalışmalar yapılana kadar -20°C 'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.4. Kimyasal Maddeler

Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent (2N), kloroform, n-Butanol, etanol MERCK firmasının; glutathione redüktaz, glutathione-reduced form (GSH C10H17N3O6S), glycine (amino asetic acid; aminoethanoic acid; glycoll) (C2H5NO2), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form NADPH; C21H27N7O14P2Na2) nitroblue tetrazolium (NBT C40H30Cl2N10O6), Xanthine (C5H4N4O2), Xanthine Oxidase, Caffeic acid phenethyl ester SIGMA firmasının; potassium cyanide (MW:65.12 g/mol), potassium ferrocyanide (MW:422,41 g/mol) J.T.Baker firmasının; Methotrexate assay Dade Dehring firmasının üretimidir.

3.5. Deneyde Kullanılan Cihazlar

1	Soğutmalı santrifüj	Eppendorf MR 5415 (Almanya)
2	Derin dondurucu	Facis (Fransa)
3	Hassas terazi	Scaltec (İsviçre)
4	Vorteks (karıştırıcı)	Nüve NM 100 (Türkiye)
5	Otomatik pipetler	Gilson (Fransa), Eppandörf
6	UV spektrofotometre	Shimadzu UV 1601 (Japonya)
7	Homojenizatör	Ultra Turrax T25 (Almanya)
8	Viva (ilaç düzeyi ölçüm cihazı)	Dade Dehring (Almanya- ABD)

3.6. Numunelerin Korunması, Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması

3.6.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler

Dokuların homojenizasyonunda pH: 7,5, 0,2 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı (100). Biyokimyasal çalışmalarda bu tampon kullanıldı.

3.6.2. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması

Dokuların ağırlıkları yaş olarak tartıldı ve dokular soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe aktarıldı. Doku üzerine 2 ml Tris-HCl tamponu eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 16000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlığının az veya çok olmasına bağlı olarak doku ağırlığının 2.5 katı olacak şekilde tampon ilave edilerek tampon miktarları kaydedildi. Tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenatın ısı artırılmadan eppendorf tüplerine aktarıldı ve tüplerin üzeri numaralandı. Yaş doku ağırlığı ve ilave edilen tampon miktarları kaydedildi. Elde edilen homojenatlardan MDA ve homojenat protein tayini (Lowry metodu ile) yapıldı.

Homojenatlar, 5000 devir/dakika hızında 30 dakika süreyle +4 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan CAT, GSH-Px ve protein tayinleri yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol

(3/5, v/v) ile vortexlenip cam tüpte 3200 devir/dakika hızında 40 dakika süreyle +4°C 'de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

3.7. Dokularda Biyokimyasal Analizler

Enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

3.7.1. Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivitesinin Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (101).

Kullanılan Reaktifler;

SOD reaktifi [0.3 mmol/litre ksantin, 0.6 mmol/litre EDTA (2 Na tuzu), 150 µmol/litre NBT, 400 mmol/litre Na₂CO₃, 1g/litre bovine serum albumin (BSA)], 167 Ü/litre ksantin oksidaz (XO), 0.8 mmol/litre CuCl₂ .

3.7.2. Katalaz Enzimi Aktivitesinin Tayini

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (102). Hidrojen peroksit (H₂O₂) 240 nm 'de maksimum absorbans verir. Deney ortamına ilave edilen H₂O₂ katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumunda absorbans azalması şeklinde göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Reaksiyon şu şekildedir:



Kullanılan reaktifler;

Fosfat tamponu (pH 7.50 mM), absorbansı 0.500 nm'ye H₂O₂ ile ayarlanmış olan H₂O₂ 'li fosfat tamponu (H₂O₂ çözeltisi).

3.7.3. GSH-Px Enzimi Aktivitesinin Tayini

GSH-Px (EC 1.11.1.9) aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (103).

Kullanılan Reaktifler;

150 mM redükte GSH, 8 mM NADPH, 1 M NaN₃, GSH redüktaz, 2 mM H₂O₂, fosfat tamponu (pH=7.50 mM).

3.8.4. Malondialdehit Miktarının Tayini

Hardly ve Dropper'in metoduna göre çalışıldı (104).

Kullanılan reaktifler;

29 mmol/litre tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi (pH'sı 2.8), 6 M HCl ve n-Butanol kullanıldı.

3.7.5. Ekstraksiyonlu ve Ekstraksiyonsuz Numunelerde Lowry Metodu ile Protein Tayini

Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (105).

Kullanılan reaktifler;

CuSO₄, Na₃Sitrat, Na₂CO₃, NaOH, Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi.

3.8. Enzim Multiplied İmmunoassay Yöntemi ile Metotreksat Düzeyine Bakılması

Enzim Multiplied İmmunoassay (EMİT) ayırma basamağı olmayan bir yöntem olarak bilinir. Haptene bağlı bir işaret olarak enzim ve belirleyici sistem olarak enzim substrat reaksiyonu kullanılır. Bu yöntem ilk olarak Rubenstein ve arkadaşları tarafından 1972'de tanımlanmıştır. EMİT'in temeli hapten antikor ilişki miktarının enzim işareti olarak belirlenebilmesine dayanır. Bizim çalışmamızda ratların medulla spinalis süpernatant örneklerinde EMİT yöntemi ile otomatik ilaç

analizörü ile MTX düzeylerine bakıldı (84). Fakat deney grublarımızda MTX düzeyi <0.0001 'in altında çıkan sonuçlar nedeniyle anlamlı bir fark bulunmadı.

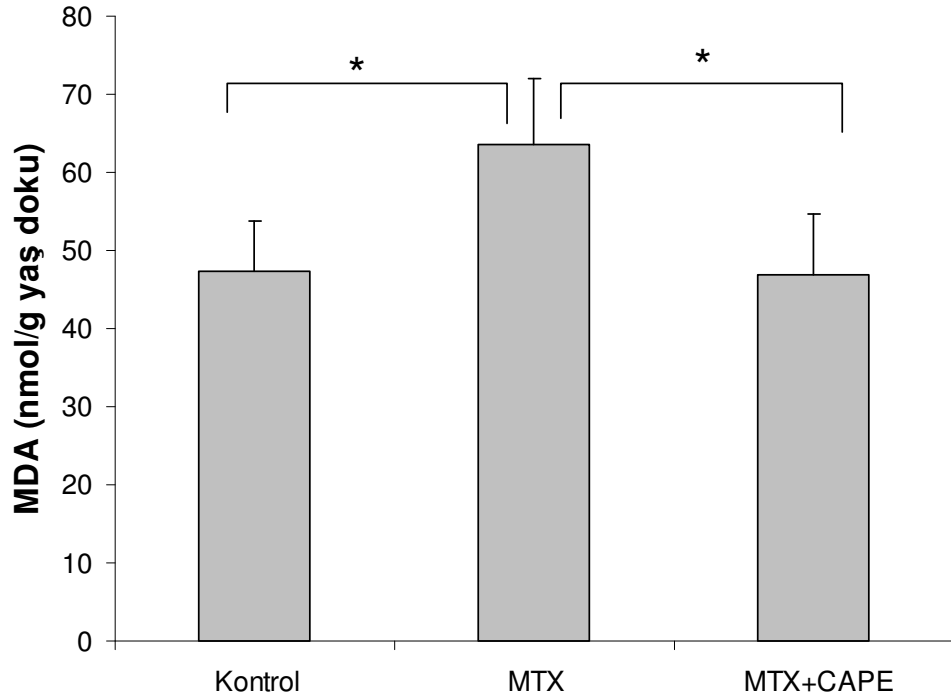
3.9. İstatistiksel Analizler

İstatistikler, Windows® uyumlu SPSS® 9.0 programı ile yapıldı. Gruplarda yer alan sonuçların normal dağılıma sahip olup olmadıklarını belirlemek için non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Gruplar normal dağılım gösterdiğinden, grupların karşılaştırılmasında parametrik testlerden one-way ANOVA testi uygulandı. Post Hoc testlerden LSD (Least Significant Difference) ile gruplar arası anlamlılık incelendi. Değerler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak verildi ve istatistiksel anlamlılık için; $p<0.05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Rat medulla spinalisinde MDA seviyeleri ve SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivite sonuçları, Tablo 1 ve Şekil 1-4’de gösterilmiştir.

Medulla spinalis dokusunda MTX grubunda; SOD, CAT, GSH-Px aktiviteleri ve MDA seviyeleri kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptandı (Sırayla; $p= 0.002$, $p= 0.0001$, $p= 0.0001$, $p= 0.003$). MTX+CAPE grubu, MTX grubu ile karşılaştırıldığında medulla spinalis SOD, CAT, GSH-Px aktiviteleri ve MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşme belirlendi (sırayla; $p=0.005$, $p=0.0001$, $p=0.002$, $p=0.002$). MTX+CAPE grubunda medulla spinalis SOD, CAT ve MDA değerleri ile kontrol grubunun değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. MTX+CAPE grubunda GSH-Px aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0.022$).

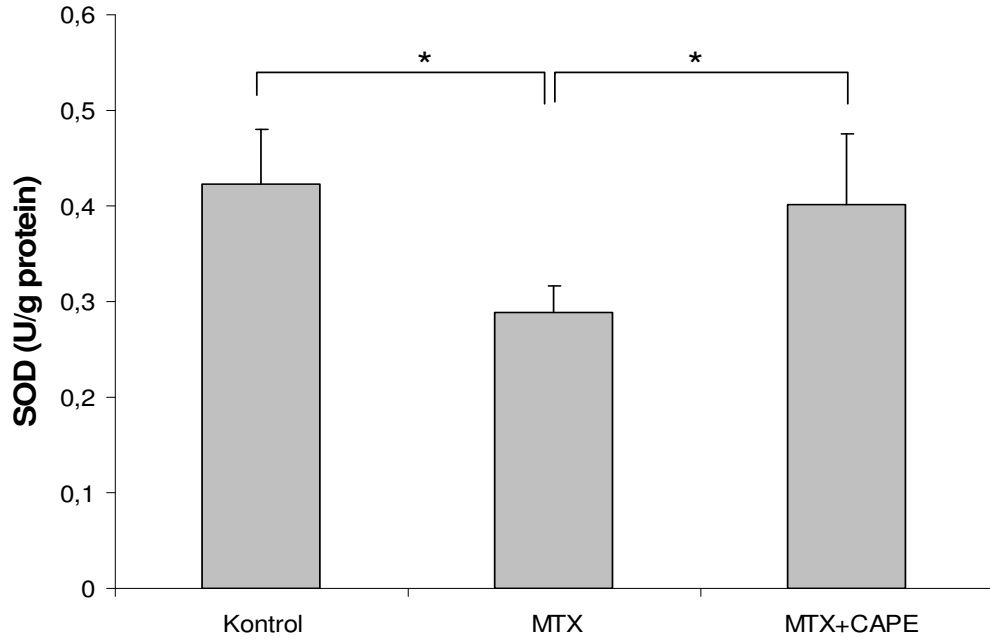


Şekil 1. Medulla spinaliste malondialdehit (MDA) seviyeleri.
*; Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

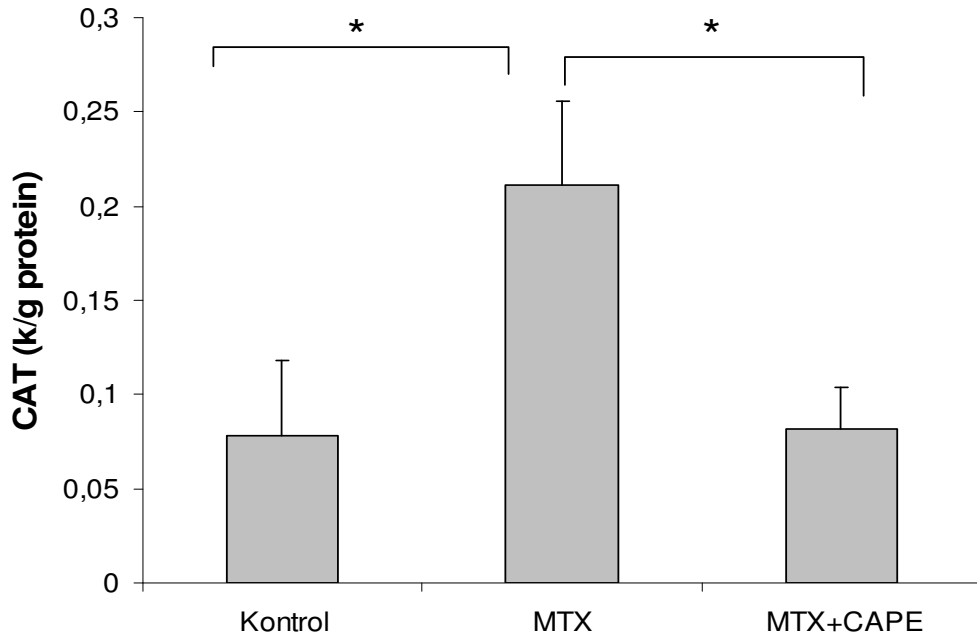
Tablo 1: Rat medulla spinalisinde malondialdehit seviyeleri ve süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri.

Gruplar	SOD U / g protein	CAT k / g protein	GSH-Px U/g protein	MDA nmol / g yaş doku
(I) Kontrol (n=6)	0.423 ± 0.057	0.078 ± 0.040	5.62 ± 0.75	47.23 ± 6.57
(II) MTX (n=6)	0.288 ± 0.029	0.211 ± 0.045	8.80 ± 1.15	63.49 ± 8.62
(III) MTX+CAPE(n=7)	0.401 ± 0.074	0.082 ± 0.022	6.86 ± 0.84	46.95 ± 7.79
P değerleri				
I-II	0.002	0.0001	0.0001	0.003
I-III	İAD	İAD	0.022	İAD
II-III	0.005	0.0001	0.002	0.002

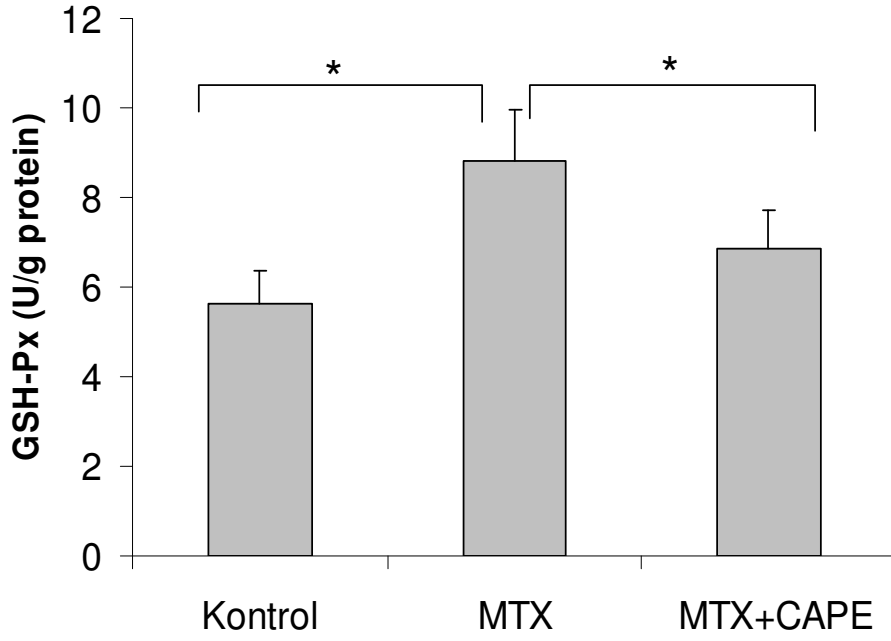
İAD: istatistiksel olarak anlamlı değil; MTX: metotreksat; CAPE: Kafeik asit fenetil ester; MDA: Malondialdehid; SOD: Süperoksit dismutaz; CAT: Katalaz; GSH-Px: Glutatyon peroksidaz



Şekil 2. Medulla spinaliste süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri.
* ; Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 3. Medulla spinaliste katalaz (CAT) aktiviteleri.
* ; Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4. Medulla spinalis dokusunda gruptaki GSH-Px aktiviteleri.
*; Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

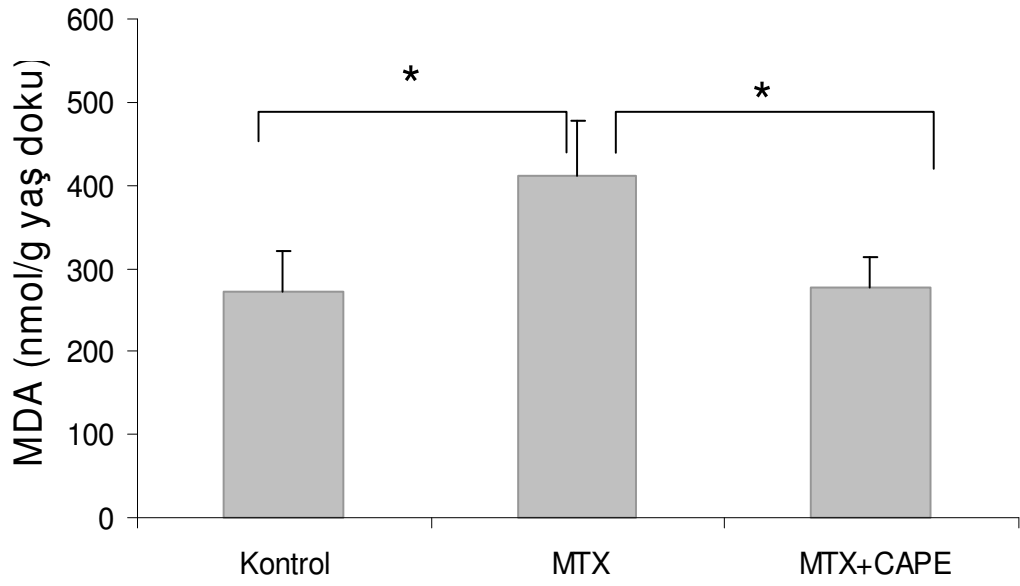
Rat siyatik sinirinde MDA seviyeleri ve SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivite sonuçları, Tablo 2 ve Şekil 5-8'de gösterilmiştir.

MTX grubu, siyatik sinir dokusunda CAT, GSH-Px aktiviteleri ve MDA seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde istatistiksel olarak artış saptandı (sırayla; $p = 0.0001$, $p = 0.0001$, $p = 0.0001$). MTX+CAPE grubunda ise CAT ve GSH-Px aktiviteleri ve MDA seviyesi MTX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu (sırayla; $p = 0.0001$, $p = 0.002$, $p = 0.002$). MTX+CAPE grubunda siyatik sinir SOD ve CAT aktiviteleri ile MDA seviyeleri kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ancak GSH-Px aktivitesi MTX+CAPE grubunda kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p = 0.022$). Gruplar arasında siyatik sinir SOD aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Table 2. Rat siyatik sinirinde malondialdehit seviyeleri ve süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri.

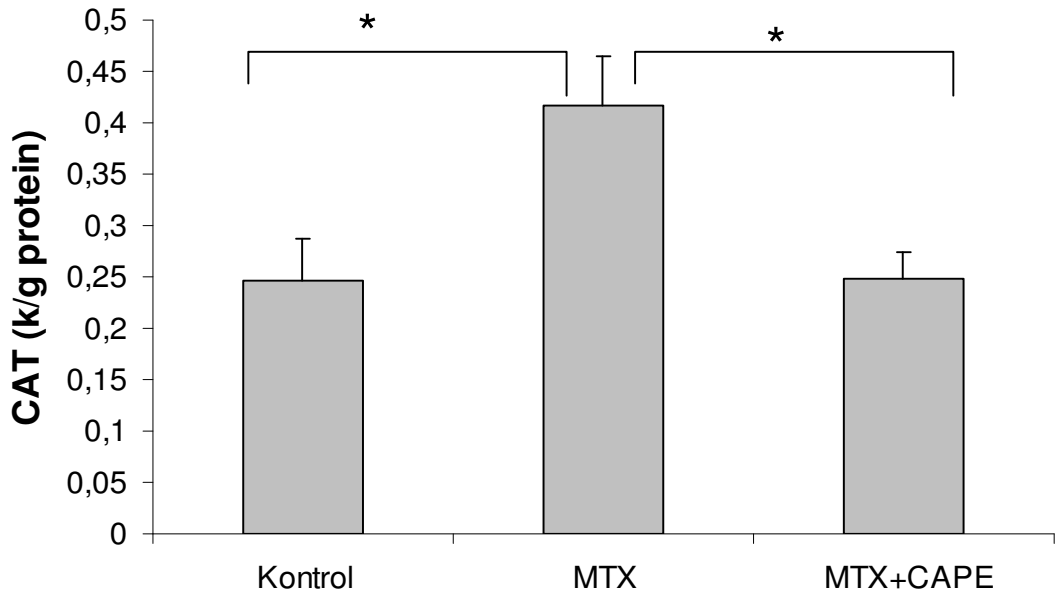
Gruplar	SOD U / g protein	CAT k / g protein	GSH-Px U/g protein	MDA nmol / g yaş doku
(I) Kontrol (n=6)	0.735 ± 0.147	0.246 ± 0.041	6.201 ± 2.404	271.56± 48.07
(II) MTX (n=6)	0.833 ± 0.157	0.417 ± 0.048	14.259 ± 3.284	411.62± 65.65
(III) MTX+CAPE (n=7)	0.740 ± 0.158	0.249 ± 0.026	9.517 ± 1.257	276.06± 37.14
p değerleri				
I – II	İAD	0.0001	0.0001	0.0001
I – III	İAD	İAD	0.016	İAD
II – III	İAD	0.0001	0.002	0.0001

İAD: istatistiksel olarak anlamlı değil; MTX: metotreksat; CAPE: Kafeik asit fenetil ester; MDA: Malondialdehid; SOD: Süperoksit dismutaz; CAT: Katalaz; GSH-Px: Glutatyon peroksidaz



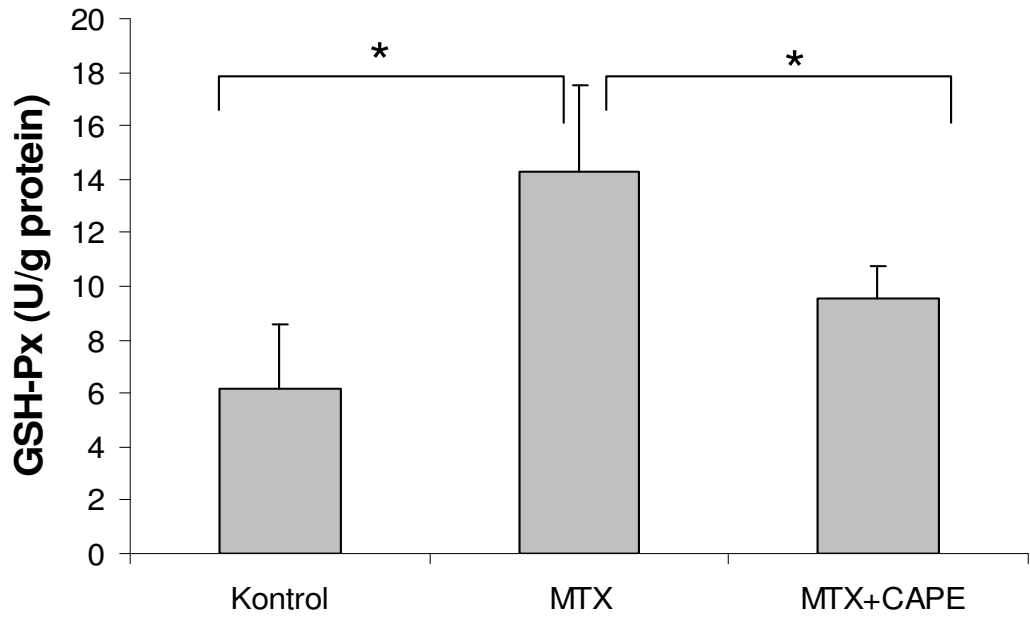
Şekil 5. Siyatik sinir dokusunda MDA seviyeleri.

*;Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).



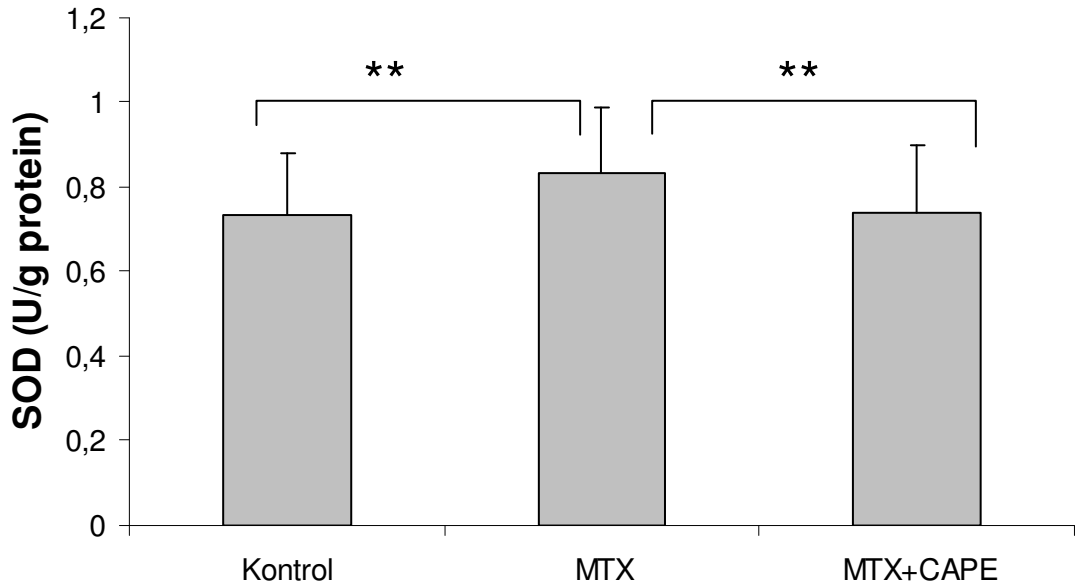
Şekil 6. Siyatik sinir dokusunda CAT aktiviteleri.

*;Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).



Şekil 7. Siyatik sinir dokusunda GSH-Px aktiviteleri.

* ; Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 8. Siyatik sinir dokusunda SOD aktiviteleri.

** ; Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık yok ($P > 0.05$).

5. TARTIŞMA

Metotreksatin hem düşük doz hem de yüksek dozda nörotoksisiteye neden olduğu bildirilmektedir (23-25). Ancak MTX nörotoksisitenin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Son araştırmalarda antineoplastiklerin hücre toksisitesi mekanizmasından oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır (8-10). Medline taramalarında MTX'in medulla spinalis ve siyatik sinir üzerine toksik etkisiyle ilgili olgu bildirimleri olmakla birlikte MTX'in oksidatif stres üzerinden toksik etkisi olduğuyla ilişkili bilimsel çalışmalara rastlayamadık. Bundan dolayı bu çalışmada MTX'in siyatik sinir ve medulla spinalis üzerinde nörotoksisitesinin oluşmasında oksidatif stres üzerinden bir etkisi olup olmadığını araştırdık. Bunun yanı sıra oksidatif stresin varlığında, MTX nörotoksisitenin CAPE ile önlenip önlenemeyeceği de çalışmamızın ikinci amacı olmuştur.

Oksidatif stres varlığının göstergesi olan SOD, CAT, GSH-Px gibi antioksidan enzim aktiviteleri ile glutasyon, NO ve MDA parametreleri ölçülür. Biz araştırmamızda bunlardan imkanlarımız dahilinde SOD, CAT, GSH-Px ve MDA'yı değerlendirdik.

Krokower ve Kamen, 10 mg/kg (düşük doz) i.p. MTX'in rat beyinde hızlı bir şekilde birikip bir hafta boyunca MTX poliglutamatların yüksek seviyelerde bulunduğunu göstermişlerdir (107). Kobaylarda deneysel olarak düşük doz MTX'in serebellumun purkinje hücrelerinde dejenerasyona yol açtığı El-Badawi ve ark. tarafından gösterilmiştir (108). Yapılan birçok deneysel çalışmada i.p. yolla 20 mg/kg MTX'in ratlara verilmesi ile rat, böbrek, karaciğer ve incebarsak dokularında oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda MTX ile ilgili doku toksisite çalışmalarında daha önceden tanımlandığı gibi tek doz i.p. 20 mg/kg MTX ratlara verildi (8-10).

Deneysel olarak MTX'in nöral tüp defekti yaptığı bilinmektedir (109). Klinik olarak hastalarda MTX'in paraparezi, nörojen mesane, afazi, hemiparezi, bilinç bulanıklığı gibi SSS ve polinöropati, kauda equina sendromu, radikülit gibi periferik sinir sistemi (PSS) semptomlarına neden olabilmektedir. MTX'in bu yan etkileri kanser hastalarında tedaviye uyumu bozmaktadır (110, 111). MTX'in ALL

hastalarında medulla spinalisi de içine alan somatosensoryal yolun bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir (112).

Brock ve ark. ALL'li 40 yaşındaki bir hastada tek doz 12 mg intratekal MTX verilmesini takiben akut fatal ensefalomyelit vakasını takip etmişler. Bu hastada bel ağrısı, üriner retansiyonu takiben assendan paralizi ve solunum yetmezliği geliştiğini ve MTX verildikten 12 gün sonra hastanın öldüğünü bildirmişlerdir (23). Moore ve ark. benzer bir vakaya otopsi yapmışlar. Beta amiloid prekürsör protein ile boyanan mikroskopik incelemede beyin, medulla spinalis ve sinir köklerinde multifokal aksonal hasara ilişkin kanıtları bulmuşlardır (113). MTX kullanımı sonrası serebral fonksiyonlarda bozulma ve polinöropati gelişen bir olgu Cinbiş ve ark. tarafından bildirilmiştir (111). Bu hastada ALL tanısı konulduğunda SSS tutulumu yokken 2 kez yüksek doz (1 g/m²) MTX tedavisinden sonra jeneralize tonik klonik konvülsiyonları takiben uykuya meyil, afazi, flask paralizi gelişmiş ve DTR'leri alınamamış. T1 ağırlıklı beyin MRG' de nükleus kaudatus ve putamen hipointens, T2 ağırlıklı incelemede yaygın hiperintensite değişiklikleri ile ENMG'de yaygın duyuşsal ve motor polinöropati ile uyumlu bulgular bildirmişlerdir (111). Sonuçta MTX nörotoksitesisi tanısı konulan hastada yaklaşık 6 ay geçmesine rağmen DTR'lerin alınamadığı ve yaygın parezinin devam ettiğini saptamışlardır (111). Birtaş ve ark. intratekal MTX tedavisinden iki gün sonra nörojen mesane gelişen ALL hastasının lumbosakral MR görüntülemesinde kauda equina bölgesinde kontrast madde sonrası opaklaşma görmüşler fakat BOS incelemesinde lösemik tutulum bulgusuna rastlamamışlar. Aynı zamanda konstipasyonu da olan hasta "MTX'e bağlı kauda equina sendromu" olarak değerlendirilmiştir. Nörolojik bulguların başlangıcından altı ay sonra tüm semptomları kaybolmuş ve yapılan ultrasonografik ölçümde rezidü idrarının olmadığı bildirilmiştir (110). Bay ve ark. intratekal MTX ile tedavi edilen kanserli vaka serisinde, kemoterapi sonrası dört ALL ve iki lenfomalı hastada tedaviye bağlı myelopati geliştiğini rapor etmişlerdir (114).

Metotreksat nörotoksitesisinin PSS ve SSS'ye toksik etkisinin patofizyolojik mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Fakat son zamanlardaki çalışmalarda oksidatif stresin sorumlu olduğu düşünülmektedir (6). Oksidatif stres organizmada moleküler hasarlara sebep olarak önemli hücreşel yapıları ve fonksiyonları etkileyen reaktif oksijen radikallerinin konsantrasyonlarındaki artışla

seyreden bir durumdur. Antioksidan savunma sistemini etkileyerek oksidatif strese yol açan pek çok neden vardır. Bunların bir kısmı egzersiz ve psikolojik stresler gibi endojen orijinli, diğer bir kısmı da yiyecekler, çeşitli antikanser ilaçlar, alkol, sigara, çevre kirliliği gibi faktörler ile iyonize (Gamma ışınları) ve non-iyonize radyasyonu (elektro manyetik alan) içine alan eksojen orijinli nedenlerdir (78).

Serbest radikaller, zincir reaksiyonları ile yeni ürünler oluşturabilen oldukça reaktif ve stabil olmayan maddelerdir. Birçoğu normal biyolojik süreçlerde ortaya çıksalar da potansiyel olarak hasar oluşturma özellikleri vardır. Serbest radikal oluşumlarını önleyen veya oluşabilen ürünleri etkisizleştiren birçok mekanizma bulunur. Bunlar arasında beslenmeyle ilgili olanlar (non-enzimatik) ve endojen enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları yer alır. Oksidan ve antioksidan maddeler arasındaki var olan denge artan reaktif oksijen türlerine bağlı olarak veya antioksidanların azalmasıyla ilgili olarak bozulabilmektedir. Bunun sonucu olarak kanser türlerini bile içine alan bir çok hastalık meydana gelebilmektedir (62-64, 87). Reaktif oksijen ürünlerinin oksidatif hasara yol açma mekanizmalarının başında poliansatüre yağ asitlerinin fosfolipid zincirlerinin lipid peroksidasyonu gelmektedir. Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan “malondialdehit” seviyesi bir biyomarker olarak bilinmektedir (84, 85).

Başlıca antioksidan enzimler; süperoksit anyonlarını ortadan kaldıran SOD, hidrojen peroksit miktarını azaltan GSH-Px ve CAT'dır. Dokularda ortaya çıkan oksijen radikalleri antioksidan enzim aktivitelerini değiştirmektedir. Ortamda süperoksit radikalının artmış olması SOD enzim aktivitesini, hidrojen peroksit radikallerinin artmış olması GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerini dolaylı olarak artırmaktadır (62). MTX nörotoksitesinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Fakat son zamanlarda oksidatif stresin, muhtemel mekanizma olabileceği üzerinde durulmaktadır. Tıptaki son araştırmalarda antitümör ilaçların yan etkilerinin oksijen radikalleri ve süperoksit radikalleri ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (9, 10). MTX'in ratların karaciğer, böbrek ve ince barsak dokularında oksidatif strese yol açtığı bildirilmektedir (8-10). Jahovic ve ark. tarafından 20 mg/kg tek doz MTX i.p. uygulanan ratların kanında, karaciğer ve böbrek dokularında myeloperoksidaz aktivitesinde artma, antioksidan etkinliği olan glutatyon seviyelerinde azalma ve MDA miktarında belirgin artışa yol açtığını

göstermişlerdir. Jahovic ve ark. antioksidan bir madde olan melatoninin MTX'le birlikte ratlara verilmesi ile MTX'in artırdığı oksidan parametreleri normal seviyelere düşürdüğünü göstermişlerdir. Benzer şekilde Jahoviç ve ark. başka bir çalışmada, MTX'in yan etkisi olarak rat ince barsağında glutasyon seviyelerinde azalma ve MDA seviyesinde artış olduğunu göstermişlerdir (8). MTX'in yol açtığı ince barsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdir. MTX'in gastrointestinal sistem toksisitesi üzerinde Miyazono ve ark. benzer bir çalışma yapmışlardır. İntravenöz olarak ratlara 20 mg/kg MTX verilmesi ile rat ince barsağında oluşturulan oksidatif hasarı nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan myeloperoksidaz aktivitesi ile ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca antioksidan özellikli N-asetilsisteinin rat ince barsağında oksidatif stresi önlediğini göstermişlerdir (9). Çetiner ve ark. MTX'in toksik etkisi nedeniyle hepatik, renal ve intestinal dokularda glutasyon seviyelerinde belirgin azalma ile birlikte myeloperoksidaz aktivitesinde, kollojen içeriğinde ve lipid peroksidasyonunda artışı bulmuşlardır. Ek olarak serumda sitokin TNF- α yükselmesi ve histolojik analizler ile MTX'in neden olduğu sistemik inflamatuvar cevabı göstermişlerdir (94).

Miketova ve ark. MTX tedavisi alan ALL'li hastalarda MTX nörotoksitesinin olası mekanizmalarından biri olan oksidatif hasarı araştırmışlar. SSS'de en yaygın fosfolipid olan fosfotidilkolinin oksijenle birleşmiş ve oksijenle birleşmemiş düzeylerine BOS'ta bakmışlar. ALL tedavisi sırasında BOS'ta oksijenle birleşmiş fosfotidilkolin düzeylerinin MTX'in yoğun verildiği konsolidasyon döneminde en yüksek seviyede olduğunu bulmuşlar ve MTX nörotoksitesi ile ilgili olarak SSS membran fosfolipidlerinde oksidatif hasar oluşma hipotezini öne sürmüşlerdir (6). MTX, DHFR'yi inhibe ettiğinden dolayı timidilat sentezini dolaylı olarak etkileyerek DNA sentezini baskılamaktadır. Birde ATP sentezini azaltarak enerji metabolizması üzerine MTX'in olumsuz etkisi vardır. Ayrıca MTX, nikotinamid adenzin difosfat dehidrojenaz ve malik enzimi inhibe ederek NADPH'nın azalması ile hücrelerdeki reaktif oksijen türlerine karşı en önemli antioksidan olan glutasyonun azalmasını sağlar (7). Sonuç olarak hücrelerin antioksidan savunma mekanizması bozularak MTX nedeniyle oksidatif strese maruz kalabilir ve dokularda SOD, CAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzim düzeylerinde artma ve ortamda serbest radikallerin çoğalmasıyla lipid peroksidasyonu

gerçekleşebilir. Yaptığımız literatür taramalarında MTX'in neden olduğu nörotoksisite ile ilgili olarak medulla spinalis ve siyatik sinirde antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA seviyeleri ile ilgili veriye rastlamadık. Çalışmamızda; MTX alan ratların medulla spinalis ve siyatik sinir dokularında MDA seviyeleri, kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu da MTX ile ilgili doku hasarını ve tek doz 20 mg/kg i.p. MTX alan Wistar ratlarının medulla spinalis ve siyatik sinirinde lipid peroksidasyonuna neden olduğunun bir göstergesidir. Lipid peroksidasyonu; serbest oksijen radikalleri ve hücre membranlarının hasarı ile ilişkilidir. MTX+CAPE grubunda medulla spinalis ve siyatik sinirdeki MDA seviyeleri, MTX grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunurken kontrol grubu MDA değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı. CAPE'nin MTX alan ratlarda profiltik olarak verilmesi ile siyatik sinir ve medulla spinalis dokularında lipid peroksidasyonunu (hücre membranı hasarını) ve oksidatif stresi önlediğini söyleyebiliriz. Sud'ına ve ark. CAPE'nin 10µmol/litre konsantrasyonda ksantin/ksantin oksidaz sisteminde serbest oksijen radikallerinin oluşmasını bloke ederek antioksidan (serbest oksijen radikalini önleyici) etkisi olduğunu bildirmişlerdir (39). CAPE'nin düşük konsantrasyonlarda NO oluşumunu inhibe ettiği ve serbest oksijen radikali oluşumunda önemli bir faktör olan Nüklear Faktör Kappa-B (NF-kB) aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (44, 45).

Bu çalışmada; siyatik sinirdeki SOD aktivitesi gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Medulla spinalis dokusunda ise SOD aktivitesi MTX grubunda kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüş görüldü. SOD vücudumuzda serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasara karşı anahtar rol oynayan endojen antioksidan bir enzimdir. SOD enzimi, süperoksit radikalini daha az reaktif olan hidrojen peroksite dönüştürür. Süperoksit radikali ortmadan uzaklaşmaz ise nitrik oksitle reaksiyona girerek güçlü bir oksidan ajan olan peroksinitrite dönüşür. Neticede SOD enzimi süperoksit radikaline ve peroksinitrite maruziyetten hücreleri korumaktadır (98). MTX alan ratların medulla spinalisinde SOD enzim aktivitesinin düşmesi, oksidatif stres yüzünden in vivo ortamda artmış süperoksit radikalleri nedeniyle SOD enzimi medulla spinaliste aşırı tüketilmiş olabilir. MTX+CAPE grubunda medulla spinalisteki SOD enzim aktivitesi

MTX grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak bir yükselme görülürken, kontrol grubu ile MTX+CAPE grubu arasında SOD değerlerinde bir fark görülmedi. Bu bulgular MTX nedeniyle ortaya çıkan süperoksit radikalini CAPE'nin serbest radikal süpürücü etkisiyle azalttığını ve SOD enzim aktivitesinde değişikliğe gerek olmadan normal değerler arasında kaldığını göstermektedir.

Tek başına MTX alan ratların medulla spinalis ve siyatik sinir dokusunda CAT ve GSH-Px aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin olarak yüksek bulundu. Endojen antioksidan enzimlerden olan CAT ve GSH-Px ortamdaki hidrojen peroksiti suya indirgeyerek zararsız hale dönüştürür. MTX nedeniyle nöronal dokulardaki bozulmaya karşı adaptif bir cevap yüzünden ya da in vivo uzun süreli ortamdaki aşırı hidrojen peroksit birikimi nedeniyle oksidatif streten dokuları korumak için GSH-Px ve CAT aktiviteleri artmış olabilir. MTX+CAPE grubunda hem medulla spinalis hemde siyatik sinirde CAT ve GSH-Px aktiviteleri MTX grubundan anlamlı olarak düşüktü. Bu sonuçlarımız oksidatif stresle ilgili literatürle uyumlu olup nöronal dokularda MTX tarafından oluşturulan oksidan maddelere karşı CAPE'nin güçlü antioksidan ve radikal süpürücü etkisini göstermektedir. Benzer olarak Fadillioğlu ve ark. doksorubusunin neden olduğu nöronal oksidatif hasarı, CAPE'nin önlediğini göstermişlerdir (61). İlhan ve ark. tarafından yapılan deneysel alerjik ensefalomyelit çalışmasında oluşan lipid peroksidasyonunu, NO artışını, antioksidan enzim aktivitelerindeki değişiklikleri, nörolojik defisitleri ve histopatolojik bozulmayı CAPE'nin düzelttiği gösterilmiştir (115). Bir başka çalışmada Parkinson hastalığı'nın deneysel modelinde 6-hidroksidopamininin neden olduğu nöronal dokudaki mitokondiyal hasarın CAPE tarafından önlenildiği gösterilmiştir ve Parkinson hastalığında CAPE'nin nöroprotektif etkisinin olabileceği öne sürülmüştür (45). İlhan ve ark.'nın bir başka çalışmasında pentilentetrazolün indüklediği nöbetleri olan farelerde CAPE'nin nöbet şiddetini azalttığı, beyin dokusunda reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu önleyerek nöroprotektif etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır (44). Glutamatın neden olduğu serebellar hücre ölümüne ve hipoksik iskemik beyin hasarını içeren nörotoksisiteye karşı CAPE'nin nöroprotektif ajan olduğu gösterilmiştir (115, 116). NF-kB'nin güçlü olarak blokajı, caspase-1, caspase-3 ve caspase-9'un inhibisyonu kadar reaktif oksijen türlerinin inhibisyonu CAPE'nin nöroprotektif etkisi ile ilişkili olabilir (118, 119). CAPE

reaktif oksijen türlerinin neden olduğu nörotoksisiteyi belirgin olarak bloke ettiği için, bu çalışmadaki bulgular MTX nörotoksisitesinde oksidatif strese karşı CAPE'nin nöroprotektif etkisi olduğunu desteklemektedir.

Metotreksat ile ilgili toksisitenin oksidatif stresle ilişkisi SOD, CAT ve GSH-Px enzimi dışında adenozin deaminaz ve ksantin oksidaz gibi pürin yıkan enzimlerle ilişkisi araştırılmıştır (38). Adenozin deaminaz enzimi, adenozini inozine ve deoksiadenozini deoksiinozine dönüştürerek pürin metabolizmasını etkileyen önemli bir enzimdir. Pürin metabolizmasındaki diğer enzim ksantin oksidazdır. Bu enzim hipoksantini ksantine, ksantini ürik aside dönüştürür ve pürin katabolizmasının son reaksiyonunu sağlayarak toksik süperoksit radikalini üretir. Bu nedenle pürin ve serbest oksijen radikali arasında ksantin oksidaz önemli bir enzimdir. Adenozin, adenozin deaminazın substratıdır. Ksantin ise ksantin oksidazın substratıdır. Hasarlı dokularda adenozin ve ksantin artışı bu enzimlerin aktivitelerin veya gen ekspresyonlarını artırır. Ksantin oksidazın artmış aktivitesi ile ortaya çıkan süperoksit radikali ile yüksek miktardaki nitrik oksit reaksiyona girerek peroksinitrite dönüşür. Peroksinitrit ise takiben dokuda hasara neden olur. Uz ve ark.'nın yaptığı çalışmada MTX injekte edilen ratların böbrek dokularında adenozin deaminaz, ksantin oksidaz enzim aktivitelerinde ve nitrik oksit seviyesinde artış saptamışlardır. CAPE ile birlikte MTX verilen grup, sadece MTX verilen grupla karşılaştırıldığında adenozin deaminaz ve ksantin oksidaz enzim aktiviteleri ile nitrik oksit seviyesinde anlamlı bir düşüş görülmüştür. DNA katabolizmasının belirteci olarak düşünülen adenozin deaminaz ve ksantin oksidazın MTX ile ilişkili olarak artması renal dokuda nükleik asit yıkımını ve reaktif oksijen radikallerinin ortaya çıktığı öne sürülmüş ve CAPE'nin MTX'in yol açtığı oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir (38).

Santral sinir sisteminde MTX'in oksidatif strese neden olmasının olası mekanizmalarından biri de MTX'in homosisteini artırması ve glutatyonun öncüsü olan SAM'yi azaltması olabilir. MTX tedavisinden sonra homosistein akut yükselmesi MTX ile ilgili nörotoksisitenin homosistein ile ilişkisi araştırma konusu olmuştur (27). Hiperhomosisteinürinin eşlik ettiği MTHFR enzim eksikliği olan hastalarda şiddetli nörolojik defisitler, nöbetler ve zeka geriliği görülür. Nöbetler, ataksi, hemipareziyi içeren nörotoksisite özellikle intratekal veya sistemik MTX gibi antifolat tedavi ile ilişkilendirilmiştir. Methotreksat, nükleik asit sentezi için gerekli

olan 5,10 MTHF oluşumunu inhibe eder. Ek olarak MTHF metionin sentezinde yani homosisteinin metionine remetilasyonunda görevli metionin sentazın substratıdır. Metioninin aktif formu SAM'dır. SAM, SSS miyelinizasyonu için gerekli metil grubu vericisidir. MR görüntüleme ile yüksek doz MTX kemoterapisinin demiyelinizasyona yol açtığı görülmüştür (11). MTX; BOS'ta SAM'ın azalmasına dolayısıyla metionin sentezinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. MTX tedavisinin toksisitesinde MTHFR'in polimorfik genotipinin etkili olduğu öne sürülmüştür (12). Bu veriler MTX nörotoksitesinde oksidatif stresin rol oynadığını desteklemektedir. Çünkü SAM aslında vücudumuzda doğal olarak bulunan antioksidan bir maddedir ve SAM'nin azalması oksidatif olayın oluşması lehine yorumlanabilir. MTX ile eşzamanlı artışı gösterilen homosistein aminoasiti ise oksidatif stresi başlattığı, tau proteinini hiperfosforile ettiği ve apoptozise yol açarak birçok nöropatolojik sürece katıldığı bilinmektedir (120). SAM'ın in vivo oksidatif stresle ilişkili deneysel çalışmalarda beyin iskemi/reperfüzyon modelinde antioksidan olduğu gösterilmiştir. SAM'ın in vivo olarak antioksidan aktivitesi ana hücrel antioksidan olan glutatyonun öncü maddesi olmasına bağlanmaktadır. SAM'ın dışardan verilmesi intasellüler SAM'ın seviyesini, transmetilasyon ve transsülfürasyon reaksiyonlarını etkilediği, demirin otooksidasyonunu doğrudan inhibe ettiği ve endojen glutatyon seviyelerini artırdığı bilinmektedir (32).

Sonuç olarak; MTX antioksidan enzim aktivitelerinde yaptığı değişiklikleri ile lipid peroksidasyonuna yol açarak rat medulla spinalinde ve siyatik sinirinde oksidatif strese neden olmaktadır. MTX nörotoksitesinde oksidatif stresin önemli rolü anlaşılmaktadır. MTX'in neden olduğu oksidatif stres belirteçleri olan antioksidan enzim aktivitelerindeki değişiklikler ve lipid peroksidasyonu üzerine CAPE'nin önemli derecede koruyucu etkisinin olduğu görülmektedir. Ancak, bu hususta daha çok moleküler ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

Metotreksat yaygın olarak kullanılan sitotoksik antikanser bir ilaçtır. Kanser hastalarında MTX'in neden olduğu nörotoksisite önemli klinik bir problemdir ancak MTX nörotoksisitesinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmanın amaçları;

1). Rat siyatik sinir ve spinal kordunda, MTX'in neden olduğu nörotoksisitenin patogenezinde MDA, SOD, CAT ve GSH-Px'in olası rolünü araştırmak.

2). Rat siyatik sinir ve spinal kordunda MTX'in neden olduğu nörotoksisitede CAPE'nin antioksidan koruyucu etkisinin olup olmadığını belirlemektir.

Toplam 19 adet Wistar rat üç deneysel gruba ayrıldı. Grup 1; Kontrol grup, Grup 2; MTX grup, Grup 3; MTX+CAPE grup. Deneyin 2. gününde tek doz intraperitoneal olarak (i.p.) 20 mg/kg MTX, grup 2 ve 3'e verildi. Grup 3'e CAPE 10 µmol/kg/gün i.p. olarak 7 gün verildi. Deneyin 8. günü ratlar sakrifiye edildi. Ratların siyatik sinir ve medulla spinalis dokularında CAT, GSH-Px, SOD enzim aktiviteleri ve MDA seviyelerine bakıldı. Siyatik sinir ve spinal kord dokusunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CAT ve GSH-Px aktivitelerinde artış bulundu. MTX+CAPE ile MTX grup karşılaştırıldığında CAT ve GSH-Px aktivitelerinde azalma saptandı. MTX grupta spinal kord dokusunda SOD aktivitesi kontrolle karşılaştırıldığında azalma saptanırken siyatik sinirde anlamlı fark bulunmadı. Spinal kord dokusunda SOD aktivitesi MTX+CAPE grubunda MTX grupla karşılaştırıldığında anlamlı derecede artış bulundu. MTX grup ile kontrol grubu arasında SOD aktivitesi açısından anlamlı fark görülmedi. MDA seviyesi MTX grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. MTX+CAPE grubunda MDA seviyeleri MTX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu.

Bu sonuçlar; MTX'in rat siyatik sinir ve medulla spinalisinde oksidatif stresi artırdığını ve CAPE'nin antioksidan etkisi nedeniyle oksidatif strese karşı koruyucu etkisini gösterir.

Anahtar kelimeler: Kafeik asit fenetil ester, Metotreksat, Oksidatif stres, Siyatik sinir, Medulla spinalis.

7. ABSTRACT

Methotrexate (MTX) is widely used as a cytotoxic chemotherapeutic drug. MTX-associated neurotoxicity is an important clinical problem in cancer patients, but the mechanisms of MTX-induced neurotoxicity have not yet been known exactly.

The aims of the current study were (1) to investigate the possible role of MDA, SOD, CAT and GSH-Px in the pathogenesis of MTX-induced neurotoxicity and (2) to determine whether there is a putative protective effect of CAPE on MTX-induced neurotoxicity in the spinal cord and sciatic nerve of rats. A total of 19 adult Wistar male rats were divided into three experimental groups. Group I, control group; group II, MTX-treated group; group III, MTX+CAPE-treated group. MTX was administered to MTX and MTX+CAPE groups intraperitoneally (i.p.) with a single dose of 20 mg kg⁻¹ on the second day of experiment. CAPE was administered to MTX+CAPE group i.p. with a dose of 10 µmol kg⁻¹ day⁻¹ for 7 days. The rats were sacrificed at the 8th day of experiment. The activities of the enzymes SOD, CAT and GSHP-x, and levels of MDA were studied in the sciatic nerve and spinal cord tissues of the rats. In the sciatic nerve and spinal cord tissue, the activities of CAT and GSH-Px were increased in MTX group in comparison with control group. CAPE treatment with MTX decreased CAT and GSH-Px activities in the neuronal tissues of rats significantly in comparison with MTX group. In the spinal cord tissue, the activity of SOD in the MTX group decreased to comparison with control group but in the sciatic nerve not significant difference. In the spinal cord of rats, the activity of SOD was increased in CAPE+MTX group when compared with the MTX group. There were no significant differences in the activity of SOD between the rats in the MTX+CAPE group and the control group. The level of MDA was higher in MTX group than the control group. CAPE administration with MTX injection caused a significant decrease in MDA level when compared with MTX group.

These results reveal that MTX increases oxidative stress in sciatic nerve and spinal cord of rats and CAPE has a preventive effect on the oxidative stress via its antioxidant capacity.

Key words: Caffeic acid phenethyl ester, methotrexate, oxidative stress, sciatic nerve, spinal cord.

8. KAYNAKLAR

1. Mahoney DH, Shuster JJ, Nitschke R. Acute neurotoxicity in children with B-precursor acute lymphoid leukemia: an association with intermediate-dose intravenous methotrexate and intrathecal triple therapy: A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 16:1712-1722, 1998.
2. 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. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 27:277-292, 1998.
3. Quemeneur L, Gerland LM, Flacher M, Ffrench M, Revillard JP, Genestier L. Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J Immunol* 170(10):4986-4995, 2003.
4. Madhyastha S, Somayaji SN, Rao MS, Nalini K, Bairy KL. Hippocampal brain amines in methotrexate induced learning and memory deficit. *J Physiol Pharmacol.* 80:1076–1084, 2002.
5. Drachtman RA, Cole PD, Golden CB et al. Dextromethorphan is effective in the treatment of subacute methotrexate neurotoxicity. *Pediatr Hematol Oncol* 19:319-27, 2002.
6. Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M et al. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs* 6:187-95, 2005.
7. Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct* 16:283-293, 1998.
8. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 34:282-287, 2003.
9. Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol* 39:1119-1127, 2004.
10. Jahovic N, Sener G, Cevik H, Ersoy Y, Arbak S, Yegen BC. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct* 22:169-178, 2004.
11. Kishi T, Tanaka Y, Ueda K. Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy. *Cancer* 89:925-931, 2000.
12. Linnebank M, Pels H, Kleczar N. MTX-induced white matter changes are associated with polymorphisms of methionine metabolism. *Neurology* 64:912-913, 2005.
13. Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci* 764(1-2):217-54, 2001.

14. Chabner BA, Allegra A, Curt C. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* 76:907-912, 1985.
15. Hirata S, Matsubara T, Saura R, Tateisbi H, Hirohata K. Inhibition of in vitro vascular endothelial cell proliferation and in vivo neovascularization by low-dose methotrexate. *Arthritis Rheum* 32:1065-73, 1989.
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* 36(5):814-25, 2004.
17. 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*. 50(10):3286-95, 2004.
18. Cronstein BN. Molecular therapeutics. Methotrexate and its mechanism of action. *Arthritis Rheum* 39:1951-1960, 1996.
19. Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients: Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum* 29:832-835, 1986.
20. Baggott JE, Morgan SL, Ha TS, Alargon GS, Kopman WJ, Krumdieck CL. Antifolates in rheumatoid arthritis: A hypothetical mechanism of action. *Clin Exp Rheum* 11 (8):101-105, 1993.
21. Surtees R, Clelland J, Hann I. Demyelination and single-carbon transfer pathway metabolites during the treatment of acute lymphoblastic leukemia: CSF studies *J Clin Oncol* 16(4):1505-1511, 1998.
22. Quinn CT, Kamen BA. A biochemical perspective of methotrexate neurotoxicity with insight on nonfolate rescue modalities. *J Invest Med* 44:522-30, 1996.
23. Brock S, Jennings H.R. Fatal acute encephalomyelitis after a single dose of intrathecal methotrexate. *Pharmacotherapy* 24:673-676, 2004.
24. Krajcinovic M, Robaey P, Chiasson S, Lemieux-Blanchard E, Rouillard M, Primeau M, Bournissen FG, Moghrabi A. Polymorphisms of genes controlling homocysteine levels and IQ score following the treatment for childhood ALL. *Pharmacogenomics* 6(3):293-302, 2005.
25. Vezmar S, Becker A, Bode U, Jaehde U. Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. *Chemotherapy* 49:92-104, 2003.
26. Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkiewicz IM, Shear NH. Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatocytotoxicity. *Clin Biochem* 32(7): 519-536, 1999.
27. Kishi S, Griener J, Cheng C, Das S, Cook EH, Pei D, Hudson M, Rubnitz J, Sandlund JT, Pui CH, Relling MV. Homocysteine, Pharmacogenetics, and Neurotoxicity in Children With Leukemia. *J Clin Oncol* 21:3084-3091, 2003.

28. Di Rocco A, Bottiglieri T, Werner P, Geraci A, Simpson D, Godbold J, Morgello S. Abnormal cobalamin-dependent transmethylation in AIDS-associated myelopathy. *Neurology* 58(5): 730-735, 2002.
29. Al-Gazali LI, Padmanabhan R, Melnyk S, Yi P, Pogribny IP, Pogribna M, Bakir M, Hamid ZA, Abdulrazzaq Y, Dawodu A, James SJ. Abnormal folate metabolism and genetic polymorphism of the folate pathway in a child with Down syndrome and neural tube defect. *Am J Med Genet* 103(2):128-32, 2001.
30. Keating JN, Trimble KC, Mulcahy F, Scott JM, Weir DG. Evidence of brain methyltransferase inhibition and early brain involvement in HIV-positive patients. *Lancet*. 337(8747):935-939, 1991.
31. Weir DG, Scott JM. Brain function in the elderly: role of vitamin B12 and folate. *Br Med Bull* 55:669-82, 1999.
32. Caro AA, Cederbaum AI. Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine in Fe (2+)-initiated oxidations. *Free Radic Biol Med* 36:1303-1316, 2004.
33. Bottiglieri T, Hyland K, Reynolds EH. The clinical potential of ademetionine (S-adenosylmethionine) in neurological disorders. *Drugs* 48(2):137-52, 1994.
34. Manrique J, Diaz A, Gavira JJ, Hernandez A, Pujante D, Errasti P. Preliminary results of the effect of treatment of hyperhomocysteinemia and its relationship with inflammation, coagulation status, and endothelial function after renal transplantation. *Transplant Proc* 37(9):3782-3784, 2005.
35. Yüce A, Aksakal M. Ratlarda Homosisteinin Oksidan-Antioksidan Sistem ve Koroner Damarlarda Oluşturduğu Değişiklikler Üzerine Melatoninin Etkisi. *FÜ Sağlık Bil Dergisi* 20(1), 51-59, 2006.
36. Quinn CT, Griener JC, Bottiglieri T, Hyland K, Farrow A, Kamen BA. Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the methotrexate for the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 15:2800-2806, 1997.
37. Devrim E, Cetin R, Kilicoglu B, Erguder BI, Avci A, Durak I. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail* 27(6):771-773, 2005.
38. Uz E, Oktem F, Yilmaz HR, et al. 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* 277: 165-170, 2005.
39. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva GA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 329: 21-24, 1993.
40. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res* 59:2347-2352, 1999.
41. Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre E, Hiroguchi S, Yung J, Kohn KW. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem Pharmacol* 48:595-608, 1994.

42. Chen C, Wu C, Lin J. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells. *Biochem Pharmacol* 67:53-66, 2004.
43. Park EH, Kahng JH. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arch Pharm Res* 22:554–558, 1999.
44. İlhan A, Iraz M, Gürel A, Armutcu F, Akyol O. Caffeic acid phenethyl ester exerts a neuroprotective effect on CNS against pentylentetrazol-induced seizures in mice. *Neurochem Res* 29:2287-2292, 2004.
45. Noelker C, Bacher M, Gocke P, Wei X, Klockgether T, Dub Y, Dodel R. The flavanoid caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett* 383:39–43, 2005.
46. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73:21-29, 2002.
47. Orsolich N, Terzic S, Mihaljevic Z, Sver L, Basic I. Effects of Local Administration of Propolis and Its Polyphenolic Compounds on Tumor Formation and Growth. *Biol Pharm Bull* 28:1928-1933, 2005.
48. Aliyazicioglu Y, Deger O, Ovali E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioglu Y, Karahan SC. Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *Int Immunopharmacol* 5:1652-1657, 2005.
49. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73:1-6, 2002.
50. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 96:67-202, 2002.
51. Da Cunha FM, Duma D, Assreuy J, Buzzi FC, Niero R, Campos MM, Calixto JB. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free Radic Res* 38(11):1241-1253, 2004.
52. Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 73:53-63, 2002.
53. Lin MW, Yang SR, Huang MH, Wu SN. Stimulatory Actions of Caffeic Acid Phenethyl Ester, a Known Inhibitor of NF-Kappa B Activation, on Ca²⁺-activated K⁺ Current in Pituitary GH3 Cells. *J Biol Chem* 279:26885-26892, 2004.
54. İlhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg* 16:458–463, 1999.
55. Şahin S, Söğüt S, Özyurt H, Uz E, İlhan A, Akyol O. Tissue xanthine oxidase activity and nitric oxide levels after spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: comparison of caffeic acid phenethyl ester and metylprednisolone. *Neurosci Res Com* 31:111-121, 2002.

56. Uz E, Söğüt S, Şahin S, Var A, Özyurt H, Güleç M, Akyol O. The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World J Urol* 20:264-270, 2002.
57. Yılmaz HR, Uz. E, Yücel N, Altuntas İ, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *Biochem Mol Toxicol* 18:234-238, 2004.
58. Koltuksuz U, Özen S, Uz E, Aydıncı M, Karaman A, Gültek A, Akyol Ö, Aydın E. Caffeic acid Phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 34:1458-1462, 1999.
59. Özyurt H, Söğüt S, Yıldırım Z, Kart L, Iraz M, Armutçu F, Temel İ, Özen S, Uzun A, Akyol Ö. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. *Clin Chim Acta* 339:65-75, 2004.
60. Yağmurca M, Erdoğan H, Iraz M, Songur A, Uçar M, Fadillioğlu E. Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clin Chim Acta* 348: 27-34, 2004.
61. Fadillioğlu E, Erdogan H, Iraz M, Yagmurca M. Effects of caffeic acid phenethyl ester against doxorubicin-induced neuronal oxidant injury. *Neurosci Res Commun* 33:132-138, 2003.
62. Warner DS, Sheng H, Batinic İ. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 207:3221-3231, 2004.
63. Hajieva P, Behl C. Antioxidants as a potential therapy against age-related neurodegenerative diseases: amyloid Beta toxicity and Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 12(6):699-704, 2006.
64. 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* 21: 24-28, 2005.
65. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142: 231-255, 2004.
66. Hydrogen peroxide: A review. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Anonymous 71(2):671-89, 1999
67. Varma SD, Hegde KR, Kovtun S. Oxidative damage to lens in culture: reversibility by pyruvate and ethyl pyruvate. *Ophthalmologica* 220(1):52-57, 2006.
68. Lim P, Wuenschell GE, Holland V, Lee DH, Pfeifer GP, Rodriguez H, Termini J. Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. *Biochemistry* 43(49):15339-15448, 2004.
69. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52:794-804, 2004.
70. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovas Res* 68:26-36, 2005.

71. Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 12: 2478-2503, 2005.
72. Gwinn MR, Vallyathan V. Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B* 9(1):27-39, 2006.
73. Kim H, Oh E, Im H, Mun J, Yang M, Khim JY, Lee E, Lim SH, Kong MH, Lee M, Sul D. Oxidative damages in the DNA, lipids, and proteins of rats exposed to isofluranes and alcohols. *Toxicol* 220(2-3):169-178, 2006
74. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. Mimoza Yayınları, Konya 1-132, 1995
75. Burçak G, Andican G. Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med* 35:159-169, 2004.
76. Park EC, Yoon JB, Seong JS, Choi KS, Kong ES, Kim YJ, Park YM, Park EM. Effect of ionizing radiation on rat tissue: proteomic and biochemical analysis. *Prep Biochem Biotechnol* 36(1):19-35, 2006.
77. Carballo M, Alvarez S, Boveris A. Cellular stress by light and rose bengal in human lymphocytes. *Mutat Res* 288(2): 215-22, 1993.
78. Mollaoğlu H. GSM 900 MHz telefonların oluşturduğu manyetik alanın etkisiyle meydana gelen oksidatif değişiklikler üzerine melatoninin etkisi. Uzmanlık tezi. Süleyman Demirel Üni. Tıp Fak Fiziyojoloji A.D. 2003.
79. Drisko JA, Chapman J, Hunter VJ. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecologic Oncol* 88:434-439, 2003.
80. Delogu G, Antonucci A, Moretti S, Marandola M, Tellan G, Signore M, Famularo G.J Oxidative stress and mitochondrial glutathione in human lymphocytes exposed to clinically relevant anesthetic drug concentrations. *Clin Anesth* 16(3):189-194, 2004.
81. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol* 189:41-54, 2003.
82. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Res Health* 27:277-285, 2003
83. Choe E, Min DB. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 46(1):1-22, 2006.
84. Esterbauer H, Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde on related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81-128, 1991.
85. Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation. *ISI Atlas Sci* 1:311-317, 1988.
86. Pugazhenth S, Phansalkar K, Audesirk G, West A, Cabell L. Differential regulation of c-jun and CREB by acrolein and 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 40(1):21-34, 2006.

87. Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku superoksit dismutaz, CAT ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri. Uzmanlık Tezi. Ankara Uni. Tıp Fak. Biyokimya A.D., 1994.
88. Kayalı R, Çakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. *Cerrahpaşa J Med* 35: 83-89, 2004.
89. 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* 42(3):289-306, 2006.
90. 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* 26(2):257-64, 2005.
91. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr* (2005) 164: 775-778.
92. 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*. 7:676-81, 1999.
93. Zhou FQ. Advantages of pyruvate over lactate in peritoneal dialysis solutions. *Acta Pharmacol Sin* 5:385-92, 2001.
94. Çetiner M, Şener G, Şehirli AÖ, Eksioğlu-Demiralp E, Ercan F, Şirvancı S, Gedik N, Akpulat S, Tecimer T, Yeğen BÇ. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol* 209:39-50, 2005.
95. Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto* 73:1075-1086, 1974.
96. Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest* 77:319-321, 1986.
97. Extracellular Superoxide Dismutase In Biology And Medicine. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. *Free Radical Biology & Medicine* 35: 236–256, 2003.
98. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine* 26:340–352, 2005.
99. Keele BB, McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese-containing enzyme. *J Biol Chem* 245:6176-6181, 1970.
100. Akkuş İ. Klinik biyokimya laboratuvarı el kitabı. Öz Eğitim Bas Yay Dağ Konya 314-315, 1997.
101. Sun Y, Oberley LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34:497-500, 1988.
102. Aebi H. Catalase In: Bergmeyer U, ed. Methods of enzymatic analysis. New York and London: Academic Press 673-677, 1974.

103. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158-169, 1967.
104. Draper HH, Hadley M: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186: 421-431, 1990.
105. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
106. Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF. "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. *Biochem Biophys Res Comm* 47: 846-851, 1972.
107. Krokower GR, Kamen BA. In situ methotrexate polyglutamate formation in rat tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 227:633-638, 1983.
108. El-Badawi MG, Fatani JA, Bahakim H, Abdalla MA. Light and electron microscopic observations on the cerebellum of guinea pigs following low-dose methotrexate. *Exp Mol Patho* 53: 211-222, 1990.
109. Vatansever HS, Umur AF, İnan VS, Selçuki M. The Effects of Methotrexate on the Development of Neural Tube Defects in the Chick Embryo. *Turk J Vet Anim Sci* 27:1119-1125, 2003.
110. Birtaş E, Tuğlular TF, Kaygusuz I, Noyan F, Adıgüzel C, Çetiner M, Bayık M. ALL Hastasında İntratekal Metotreksata Bağlı Kauda Equina Sendromu:Vaka Sunumu. *Turk J Haematol (Suppl)* 21:3, 2004.
111. Cinbiş M, Polat A, İnan M, Bican M. Metotreksat Nörotoksisitesi Gelişen Çocuk ALL Olgusu. *Turkish Journal of Haematology (Supplement)* 20:3, 2003.
112. Vainionpa L, Kovala T, Tolonen U, Lanning M Chemotherapy for Acute Lymphoblastic Leukemia May Cause Subtle Changes of the Spinal Cord Detectable by Somatosensory Evoked Potentials. *Med Ped Oncol* 28:41-47, 1997.
113. Moore BE, Somers NP, Smith TW. Methotrexate-Related Nonnecrotizing Multifocal Axonopathy Detected by b-Amyloid Precursor Protein Immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 126: 79-81, 2002.
114. Bay A, Oner AF, Etlik O, Yilmaz C, Caksen H. Myelopathy Due to Intrathecal Chemotherapy Report of Six Cases. *J Pediatr Hematol Oncol* 27:270-273, 2005.
115. İlhan A, Akyol Ö, Gurel A, Armutcu F, İraz M, Öztas E. Protective Effects Of Caffeic Acid Phenethyl Ester Against Experimental Allergic Encephalomyelitis-Induced Oxidative Stress In Rats. *Free Rad Biol Med* 37:386-394, 2004.
116. Amodio R, De Ruvo C, Sacchetti A, Di Santo A, Martelli N, Di Matteo V, Lorenzet R, Poggi A, Rotilio D, Cacchio M, Esposito E. Caffeic acid phenethyl ester blocks apoptosis induced by low potassium in cerebellar granule cells *Int J Dev Neurosci* 21:379-389, 2003.

117. Wei X., Zhao L., Ma Z., Holtzman DM, Yan C., Dodel RC, Hampel H, Oertel W, Farlow MR, Du Y. Caffeic acid phenethyl ester prevents neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Brain* 127:2629-2635, 2004.
118. Natarajan K, Singh S, Burke TR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93:9090–9095, 1996.
119. McEleny K, Coffey R, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW. Caffeic acid phenethyl ester-induced PC-3 cell apoptosis is caspase dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int* 94:402–406, 2004.
120. Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea T.B. Multiple Aspects of Homocysteine Neurotoxicity: Glutamate Excitotoxicity, Kinase Hyperactivation and DNA Damage. *J Neurosci Res* 70:694–702, 2002.