

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**METOTREKSAT İLE KARACİĞER HASARI OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA SİLMARİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Nevin KOCAMAN**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Durrin Özlem DABAK**

**ELAZIĞ
2012**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. İ.Enver Ozan_____

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Durrin Özlem DABAK_____

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

..... _____
..... _____
..... _____
..... _____
..... _____

TEŞEKKÜR

Uzmanlık sürecimde desteğini hep hissettiğim değerli hocam Doç.Dr. Durrin Özl m DABAK' a, asistanlığım süresince eğitim faaliyetlerinde ki katkılarını unutmayacağım hocalarım Prof. Dr. İ.Enver Ozan, Prof. Dr. Leyla Canpolat Koyutürk'e Prof. Dr. Neriman  olakoğlu'na, Yrd. Doç. Dr. Tuncay Kuloğlu'na, tez aŐamasındaki katkılarından dolayı Farmakoloji ana bilim dalı oğretim  yesi Yrd. Doç. Dr. Selçuk İlhan'a ve Tıbbi Biyoloji ana bilim dalı oğretim  yesi Yrd. Doç. Dr. Ebru  nalan'a teŐekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimin hazırlanmasında finansman desteği sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne de teşekkür ederim.

ÖZET

Metotreksat (MTX), pek çok kanser tedavisi yanında, bazı inflamatuvar hastalıklarda da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Hepatotoksisite başta olmak üzere birçok yan etkileri vardır. Bu çalışmada MTX'in, sıçan karaciğer dokusunda meydana getirdiği hasara karşı silmarinin koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 36 adet erişkin Sprague Dawley tipi erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. 5 günlük deney süresince Grup I'e 0,5 ml intraperitoneal (i.p) tek doz serum fizyolojik, Grup II'ye karboksi metil selüloz (CMC) oral olarak, Grup III'e 300 mg/kg silmarin oral yolla, Grup IV'e tek doz 20 mg/kg (i.p) olarak MTX, Grup V'e tek doz 20mg/kg (i.p) MTX ile birlikte oral olarak 300mg/kg dozunda silmarin, Grup VI'ya ise tek doz 20mg/kg (i.p) metotreksat ile birlikte oral yolla CMC uygulandı. Deney sonunda sıçanlar dekapite edilerek karaciğer dokuları çıkartıldı. Rutin ışık mikroskobu takibi yapılarak dokular parafin bloklara gömüldü. Bloklardan alınan kesitlere histokimyasal boyamalar yapıldı. Elde edilen bulgular incelenerek fotoğraflandı.

Histolojik incelemelerde, kontrol grupları arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi. Grup IV ve Grup VI'da ki histopatolojik bulgular benzerdi. Bu bulgular; vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon, periportal inflamasyon, piknotik çekirdekli hepatositler, yer yer dejenere hepatositler ve glikojen depolarında önemli derecede azalma şeklindeydi. Bununla birlikte bu gruplarda TUNEL pozitifliği, Bax ve Kaspaz 3 pozitif hücreler diğer deney gruplarına göre artmış olarak tesbit edildi. Tedavi olarak Silmarin verilen Grup V deki doku hasarının nispeten daha az olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak metotreksatın karaciğerde önemli derecede doku hasarına yol açtığı, Silmarinin bu hasarı hafifletmek ile birlikte tam anlamıyla tedavi edemediği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, Silmarin, TUNEL, Bax, Kaspaz, Karboksi Metil Selüloz

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF SILYMARIN ON THE METOTREXATE-INDUCED HEPATOTOXICITY IN RATS

Metotrexate (MTX) is a widely used drug for treatment of many kind of cancer and also some inflammatory diseases. However, there are many side effects including hepatotoxicity. In this study, it was purposed to examine the protective effects of Silymarin on rat liver damage caused by MTX administration.

Total of 36 adult Sprague Dawley rats were used. The animals were divided for 6 groups including 6 animals each group. During 5 days of experimental stage, a single dosage of 0.5 ml saline was applied intraperitoneally (i.p.) to Group I, orally (CMC) was applied to Group II, 300 mg/kg Silymarin were orally given to Group III, intraperitoneally a single 20 mg/kg dosage of MTX was applied to Group IV, intraperitoneally a single 20 mg/kg dosage of MTX and orally 300 mg/kg Silymarin were applied to Group V, i.p. a single 20 mg/kg dosage of MTX and orally CMC were applied to Group VI. At the end of the experimental stage, the rats were decapitated and liver tissue removed for further research. For the routine light microscopic evaluation, the tissues were blocked in paraffin. The histochemical stains were applied to the section obtained from the blocked tissue. The observed findings were evaluated and photographed.

In histological evaluation, there were no statistically differences between first 3 groups. However, histopathological findings were similar in Group IV and Group VI. These findings are including vascular congestion, sinusoidal dilatation, periportal inflammation, hepatocyte with pyknotic nuclei, fragmentary degenerate hepatocyte, important decrease in glycogen stores and minimal hepatic steatosis. In addition, in these two groups, TUNEL positivity, Bax and Caspase 3 positive cells were found to be high compared to other experimental groups. However, the tissue damaged was relatively low in Group V in which Silymarin applied.

As a conclusion, tissue damage caused by MTX did not totally restored by silymarin application but partially improvement was observed.

Key words: Methotrexate, Silymarin, TUNEL, Bax, Caspase, CMC

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	I
ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO LİSTESİ	XI
ŞEKİL LİSTESİ	XII
KISALTMALAR LİSTESİ	XVI
1. GİRİŞ	1
1.1. Karaciğer	2
1.1.1. Karaciğer Embriyolojisi	2
1.1.2. Karaciğer Anatomisi	3
1.1.2.1. Kanlanması	4
1.1.2.2. Karaciğerin Lenf Sistemi	5
1.1.2.3. Karaciğerin İnnervasyon Sistemi	5
1.1.3. Karaciğer Histolojisi	5
1.1.3.1 Karaciğerin Yapısal Organizasyonu	6
1.1.3.1.1. Parankim	6
1.1.3.1.2. Bağ Dokusu Stroma	9
1.1.3.1.3. Sinüzoidal Kapillerler (Sinüzoidler)	10
1.1.3.1.4. Perisinüzoidal Aralıklar (Disse aralıkları)	11
1.1.3.2. Safra Yolları	12
1.1.4. Karaciğer Fizyolojisi	13
1.1.4.1. Karaciğerin Depo İşlevi	13
1.1.4.2. Karaciğerin Kan Temizleme İşlevi	13
1.1.4.3. Karaciğerin Metabolik İşlevleri	13
1.1.4.3.1. Karbonhidrat Metabolizması	14
1.1.4.3.2. Protein Metabolizması	14
1.1.4.3.3. Yağ Metabolizması	14

1.1.4.3.4. Safranın Sentezlenip Salgılanması	14
1.1.4.3.5. Bilirubin Oluşumu	15
1.1.4.3.6. Karaciğerin Diğer Metabolik Fonksiyonları	16
1.1.5. Karaciğerin Rejenerasyonu	16
1.2. Metotreksat	17
1.2.1. Farmakolojik Etkileri	17
1.2.1.1. Folat Antagonisti Mekanizması	17
1.2.1.2. Metotreksatın Antiproliferatif Etkisi	18
1.2.1.3. Metotreksatın immünomodülatör Etkisi	19
1.2.1.4. MTX'ın Antiinflamatuvar Etkisi	19
1.2.2. Farmakokinetik Özellikleri	19
1.2.2.1. Absorpsiyon	19
1.2.2.2. Dağılım	20
1.2.2.3. Metabolizma	20
1.2.2.4. Eliminasyon	20
1.2.3. Tedavide kullanımı	20
1.2.4. Yan Etkileri	21
1.2.4.1. Karaciğere Toksik Etkisi	22
1.3. Serbest Radikaller Ve Oksidatif Stres	23
1.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri	24
1.3.1.1. Süper oksit radikali	25
1.3.1.2. Hidrojen Peroksit	25
1.3.1.3. Hidroksil Radikali	25
1.3.1.4. Hipokloröz Asit	25
1.3.1.5. Singlet Oksijen	25
1.3.1.6. Nitrik Oksit	26
1.3.1.7. Karbon Merkezli Radikaller	26
1.3.2. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri	27
1.3.2.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	27
1.3.2.2. Serbest Radikallerin Karbohidratlar Üzerine Etkileri	28
1.3.2.3. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri	28
1.3.2.4. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri	29

1.3.2.4.1. DNA Onarımı	29
1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	30
1.4.1. Enzimatik Antioksidanlar	31
1.4.1.1. Süperoksit Dismutaz	31
1.4.1.2. Sitokrom Oksidaz	31
1.4.1.3. Katalaz	31
1.4.1.4. Glutasyon Peroksidaz	31
1.4.1.5. Glutasyon Redüktaz (GSH-R)	31
1.4.1.6. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)	31
1.4.1.7. Paraoksonaz	32
1.4.2. Nonenzimatik Antioksidanlar	32
1.4.2.1. S-adenozil metionin	32
1.4.2.2. Glutasyon	32
1.4.2.3. C vitamini	32
1.4.2.4. E Vitamini	33
1.4.2.5. Karoten	33
1.4.2.6. Koenzim Q10'un Antioksidan Fonksiyonu	33
1.4.2.7. Seruloplazmin	33
1.4.2.8. Transferrin	33
1.4.2.9. Bilirubin	33
1.4.2.10. Ürik asit	33
1.4.2.11. Albümin	33
1.4.2.12. Glukoz	33
1.4.2.13. Piruvat	34
1.4.2.14. Sistein	34
1.4.2.15. Taurin	34
1.4.2.16. Melatonin	34
1.4.2.17. Alfa Lipoik Asit (ALA)	34
1.5. Nekroz	35
1.5.1. Hücre Ölümünün Morfolojisi	35
1.5.1.1. Sitoplazma Değişiklikleri	35
1.5.1.2. Çekirdek değişiklikleri	35

1.6. Apoptozis	37
1.6.1. Apoptozisin İnhibisyonu ile İlişkili Hastalıklar	39
1.6.2. Apoptozisin Aktivasyonu İle İlişkili Hastalıklar	39
1.6.3. Apoptozisin Regülasyonu	39
1.6.3.1. p53 gen aracılı apoptozis	39
1.6.3.2. Bcl-2/Bax	39
1.6.3.3. Kaspazlar	40
1.6.3.4. Apoptozisin Sitotoksik Regülasyonu	42
1.6.3.4.1. Granzim veya Perforin Sistemi	42
1.6.3.4.2 Fas-Fas Ligandı veya CD95 Yolu	42
1.6.4. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	43
1.6.4.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri	43
1.6.4.1.1. Işık Mikroskobu Kullanımı	43
1.6.4.1.2. Floresan Mikroskobu ve Lazerli Konfokal Mikroskobu	44
1.6.4.1.3. Elektron Mikroskobu	44
1.6.4.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu Kullanımı	44
1.6.4.2. Histokimyasal Yöntemler	44
1.6.4.2.1. Anneksin V Yöntemi	44
1.6.4.2.2. TUNEL Yöntemi	44
1.6.4.2.3. M30 Yöntemi	45
1.6.4.2.4. Kaspaz-3 Yöntemi	45
1.6.4.3. Biyokimyasal Yöntemler	45
1.6.4.3.1. Agaroz jel Elektroforezi	45
1.6.4.3.2. Western Blotting Yöntemi	45
1.6.4.3.3. "Flow" Sitometri	45
1.6.4.4. İmmunolojik Yöntemler	46
1.6.4.4.1. ELISA	46
1.6.4.4.2. Fluorimetrik Yöntem	46
1.6.4.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	46
1.6.4.5.1. DNA Microarray	46
1.7. Silmarin	46
1.7.1. Farmakolojisi	47

1.7.1.1. Etki Mekanizması	47
1.7.1.2. Absorbsiyonu	47
1.7.1.3. Eliminasyon	48
1.7.2. Silmarinin Etkileri	48
1.7.2.1. Karaciğer Üzerine Etkileri	50
2. GEREÇ VE YÖNTEM	53
2.1. Deney Hayvanları	53
2.2 Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulama	53
2.3. Dokuların Alınması	54
2.3.1. Histokimyasal İnceleme	54
2.3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme	54
2.3.3. TUNEL Metodu	56
2.3.4. Agaroz jel Elektroforezi İle DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi	58
3. BULGULAR	61
3.1. Histokimyasal bulgular	61
3.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	78
3.2.1. Bax İmmünreaktivitesi	78
3.2.2. Kaspaz 3 immünreaktivitesi	81
3.3. Tunel Bulguları	85
3.4. DNA Fragmantasyon Bulguları	91
4. TARTIŞMA	92
5. KAYNAKLAR	98
6. ÖZGEÇMİŞ	110

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Oksijen kaynaklı reaktif bileşikler	24
Tablo 2. Serbest radikal kaynakları	27
Tablo 3. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar	35
Tablo 4. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi	53
Tablo 5. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü	55
Tablo 6. İmmünohistokimyasal boyamada immünreaktivitenin değerlendirilmesi	56
Tablo 7. TUNEL boyama prosedürü	57
Tablo 8. TUNEL boyamada immünreaktivitenin değerlendirilmesi	57

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Karaciğerin alttan görünümü	4
Şekil 2. Karaciğer lobülünün histolojik sınıflandırılması	7
Şekil 3. Karaciğer lobülünün fonksiyonel sınıflandırılması	8
Şekil 4. Karaciğer lobülünün yapılanması	10
Şekil 5. Karaciğerdeki kan ve safra akış yönleri	11
Şekil 6. Serbest radikallerin oluşum ve enzimatik detoksifikasyonu	23
Şekil 7. Baz kesip çıkarma onarımı	30
Şekil 8. Glutatyonun oksidasyon-redüksiyon siklusu	32
Şekil 9. Apoptozis ve nekroz	37
Şekil 10. Apoptotik süreç ve bu süreçte yer alan proteinler	41
Şekil 11. Apoptozisin Şekillenmesi	43
Şekil 12. Silmarinin etki mekanizmaları	49
Şekil 13. Kontrol grubunda normal görünümdeki; portal alan, hepatositler, sinüzoidler ve sinüzoidal hücreler.	61
Şekil 14. Kontrol grubunda vena sentralis, hepatositler ve sinüzoidlerin normal yapıdaki görünümleri.	62
Şekil 15. Kontrol grubunda vena sentralis etrafında bulunan normal görünümlü hepatositler.	62
Şekil 16. Kontrol grubunda vena sentralis etrafındaki hepatositlerin yoğun glikojen içerikleri.	63
Şekil 17. Kontrol grubunda periportal alandaki hepatositlerin yoğun miktarda glikojen içerikleri.	63
Şekil 18. Kontrol grubunda normal görünümlü portal alan ve hepatositler.	64
Şekil 19. CMC grubunda normal yapıdaki portal alan ve hepatositler.	64
Şekil 20. CMC uygulanan grupta normal yapıda portal alan ve zon I'deki sinüzoidler, sinüzoidlerdeki endotel hücreleri ve Kupffer hücreleri.	65
Şekil 21. CMC uygulanan grupta normal yapıdaki; portal alan, hepatositler ve hepatositlerin glikojen içeriği.	65
Şekil 22. CMC uygulanan grupta Zon III'deki hepatositlerin belirgin glikojen içeriği.	66

Şekil 23. GrupII. Normal yapıda vena sentralis ve hepatositler.	66
Şekil 24. Silmarin uygulanan grupta normal yapıda; vena sentralis, hepatositler, sinüzoidler ve sinüzoidal hücreler.	67
Şekil 25. Silmarin uygulanan grupta hepatositler, portal alan, hepatositlerin glikojen içeriği normal olarak izlenmekte.	67
Şekil 26. Silmarin uygulanan grupta Zon III'deki hepatositlerin glikojen içeriği.	68
Şekil 27. Silmarin uygulanan grupta normal yapıdaki portal alan, hepatositler sinüzoidler ve sinüzoidal hücreler.	68
Şekil 28. Metotreksat uygulanan grupta periportal alanda mononükleer hücre infiltrasyonu.	69
Şekil 29. Metotreksat uygulanan grupta vasküler konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon.	69
Şekil 30. Metotreksat grubunda vasküler konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon.	70
Şekil 31. Metotreksat grubunda periportal bölgedeki hepatositlerin bazılarındaki glikojenin varlığı.	70
Şekil 32. Metotreksat grubunda vasküler konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon.	71
Şekil 33. Metotreksat uygulanan grupta mononükleer hücre infiltrasyonu, Zon III'de glikojen depoları boşalmış hepatositler yanında glikojen içeren hepatositler.	71
Şekil 34. Metotreksat uygulanan grupta vasküler konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon varlığı.	72
Şekil 35. Metotreksat uygulanan grupta Zon'III de piknotik çekirdekli hepatositler.	72
Şekil 36. Metotreksat uygulanan grupta nekroze bir alan.	73
Şekil 37. Metotreksat uygulanan grupta hepatositlerde makroveziküler yağlanma varlığı.	73
Şekil 38. Metotreksat uygulanan grupta periportal bölgede az sayıda heterokromatik çekirdekli hepatositler.	74
Şekil 39. Tek doz metotreksat ile birlikte silmarin uygulanan grupta glikojen depoları boşalmış ve glikojen içeren hepatositler.	75

Şekil 40. Tek doz metotreksat ile birlikte silmarin uygulanan grupta hepatositlerde glikojen varlığı.	75
Şekil 41. Tek doz metotreksat ile birlikte silmarin verilen grupta zon I'de glikojen depoları dolu hepatositler.	76
Şekil 42. Tek doz metotreksat ile birlikte silmarin uygulanan grupta normal görünümlü hepatositler.	76
Şekil 43. Tek doz metotreksat ile birlikte silmarin uygulanan grupta vasküler konjesyon.	77
Şekil 44. Metotreksat ile birlikte karboksi metil selüloz uygulanan grupta yer yer glikojen içeren hepatositlerin.	77
Şekil 45. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda +1 pozitifliğinde bax immunreaktivitesi.	78
Şekil 46. Karboksi metil selüloz verilen grupta +1 pozitifliğinde bax immunreaktivitesi.	79
Şekil 47. Silmarin grubunda +1 pozitifliğinde bax immunreaktivitesi.	79
Şekil 48. Metotreksat grubunda +3 pozitifliğinde bax immunreaktivitesi	80
Şekil 49. Metotreksat ile birlikte karboksi metil selüloz uygulanan grupta +3 pozitifliğinde bax immunreaktivitesi.	80
Şekil 50. Metotreksat ve silmarin verilen grupta +2 pozitifliğinde bax immunreaktivitesi.	81
Şekil 51. Negatif kontrol.	81
Şekil 52. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda +1 pozitifliğinde kaspaz immunreaktivitesi.	82
Şekil 53. Karboksi metil selüloz verilen gruba ait karaciğer dokusunda +1 pozitifliğinde kaspaz immunreaktivitesi.	83
Şekil 54. Silmarin verilen gruba ait karaciğer dokusunda +1 pozitifliğinde kaspaz immunreaktivitesi.	83
Şekil 55. Metotreksat verilen gruba ait karaciğer dokusunda +3 pozitifliğinde kaspaz immunreaktivitesi.	84
Şekil 56. Metotreksat ve Karboksi metil selüloz verilen gruba ait karaciğer dokusunda +3 kaspaz pozitifliğinde immunreaktivitesi.	84

Şekil 57. Metotreksat ve silmarin verilen gruba ait karaciğer dokusunda +2 pozitifliğinde kaspaz immunreaktivitesi.	85
Şekil 58. Negatif kontrol.	85
Şekil 59. Kontrol grubunda TUNEL pozitif hücreler.	86
Şekil 60. Silmarin grubunda TUNEL pozitif hücreler.	87
Şekil 61. Karboksi metil selüloz grubunda TUNEL pozitif hücreler.	87
Şekil 62. Metotreksat grubunda artmış TUNEL pozitif hücreler.	88
Şekil 63. Metotreksat + Karboksi metil selüloz grubunda artmış TUNEL pozitif hücreler.	88
Şekil 64. Metotreksat + Silmarin grubunda TUNEL pozitif hücreler.	89
Şekil 65. TUNEL pozitif kontrol. Meme dokusu.	89
Şekil 66. TUNEL negatif kontrol.	90
Şekil 67. DNA fragmentasyon jel görüntüsü.	91

KISALTMALAR LİSTESİ

AIF	: Apoptozis uyarıcı faktör
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Faktor 1
CAD	: Kaspaz Aktive Deoksiribonükleaz
CAT	: Katalaz
CMC	: Karboksi Metil Selüloz
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
FADD	: Fas Bağımlı Protein
FMN	: Flavin mononükleotid
G6PD	: Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyonu
GSSG-R	: Glutasyon Reduktaz
ICAM	: İntraselüler Adezyon Molekülleri
IL-1	: İnterlökin-1
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
MDA	: Malondialdehid
Mtx	: Metotreksat
NADPDH	: Nikotinamid Adenin Fosfatdehidrojenaz
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
PARP	: Poli ADP-Riboz Polimeraz
RA	: Romatoid Artrit
RIP	: Reseptörler Arası Aktive Protein
SAM	: S Adenozil Metiyonin
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TdT	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TNFR-1	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör-1
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör - α
TUNEL	: TdT- Aracılı işaretleme tekniği

1. GİRİŞ

Metotreksat (MTX), çeşitli malignite ve kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılan antiproliferatif, antiinflamatuvar ve antikanserojen etkili bir folik asit antagonistidir (1). Tedavi amaçlı kullanılmasının yanı sıra klinik ve prelinik olarak çok sayıda deneysel çalışmada da kullanılmıştır (2). Antimetabolit etkisi dışında immünosupresif etkileri de bulunmaktadır (3). MTX, akut lenfoblastik lösemi, non hodgkin lenfoma, osteosarkoma gibi maligniteler yanında, juvenil idiopatik artrit, psoriasis, psoriatik artrit, vaskülit, wegener granülomatozu, henoch schonlein purpurası vaskuliti, sarkoidoz, sistemik lupus eritematozus, eozinofilik fasiit, crohn hastalığı, ülseratif kolit ve juvenil idiopatik artritte görülen uveitte de kullanılmaktadır (4).

MTX; akut lösemilerin tedavisinde aralıklı ama yüksek doz kullanımı yanında psöriazisteki gibi tedavinin uzun sürmesi nedeniyle, progresif hepatik fibrosis ve siroza gidebilen karaciğer hasarına sebep olmaktadır. Düşük dozda uzun dönem takip edilen hastaların yaklaşık %8'inde, transaminazların normalin üç katına yükseldiği gösterilmiş olup, MTX tedavisi alan psöriazisli hastalardaki siroz gelişme riski de %7 civarındadır (5). Bu yan etkiler; tedavinin aksamasına, hatta kesilmesine bile neden olmaktadır. Gastrointestinal, hepatik, renal ve kemik iliği toksisiteleri, MTX'in en sık görülen yan etkileridir (6). Ayrıca alopesi, dermatit, defektif oogenezis veya spermatogenezis, abortus ve teratojenite, akciğer, cilt ve merkezi sinir sistemi üzerine toksik etkileri bulunmaktadır (7). Öncelikli atılım yeri (%80-90) böbrekler olduğundan, böbrek işlevleri bozulduğunda toksisite riski artıp pansitopeniye neden olabilmektedir (1, 8). Hepatik toksisite MTX kullanımını ciddi anlamda kısıtlamaktadır (9). Bu etkiler, çoğunlukla reaktif oksijen radikallerinin (ROS) meydana getirdiği oksidatif stres sebebiyle olmaktadır (10). Serbest oksijen radikal düzeylerinin artması risk oluştururken, antioksidanlar bu riskleri ortadan kaldırmaktadır (11). Antioksidanlar kimyasal yapıları nedeniyle; zincir yapısını bozan, serbest radikal temizleyici ve metal bağlayıcılar olarak etki ederler (12).

Silmarinin de üyesi olduğu flavonoidler, düşük moleküler ağırlıklı polifenolik bileşenler içeren geniş bir antioksidan grup olup antiinflamatuvar ve antikanserojen etkileri de bulunmaktadır. Süperoksit anyonu, H₂O₂, perhidroksi, hidroksil, alkoksil ve peroksil radikalleri gibi serbest oksijen türevlerinin oluşumunu engellemektedir.

Silmarinin viral hepatit, toksik hepatit, karaciğer yağlanması, siroz, iskemik hasar ve radyasyon toksisitesinde güçlü antioksidan özelliği kanıtlanmıştır (13). Yine silmarinin glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin yapımını da uyardığı bilinmektedir (14). Silmarinin tümör nekroz faktör alfa'nın (TNF- α) neden olduğu apoptotik hücre ölümüne karşıda koruyucu etkileri vardır (15).

Karboksi metil selüloz bir polisakkarit olup sodyum monoklor asetatın selülozla reaksiyonundan hazırlanır. Isıya dayanıklı olup solusyonları şeffaf, yarı jelatinöz bir sıvı olup besin, kozmetik ve farmasötik sanayinde kullanılır. Molekül ağırlığı 350000 dir. Eritici özelliği olup adezyonları önlemek için abdomen cerrahisinde kullanılır (16).

1.1. Karaciğer

1.1.1. Karaciğer Embriyolojisi

Karaciğer, safra kesesi ve safra yolları, embriyolojik yaşamın 4. haftasında, ön bağırsağın kaudal kısmından, ventral bir çıkıntı olarak gelişir (17). Son çalışmalara ait bulgular, hepatik divertikül denen bu çıkıntının ve pankreasın ventral tomurcuğunun embriyonik endoderme ait iki farklı hücre topluluğundan geliştiğini ileri sürmektedir. Gelişmekte olan kalp belirli düzeyde Fibroblast Growth Faktör salgılar ve bipotent hücreleri etkileyerek hepatik divertikül oluşumunu uyarır (18). Karaciğer tomurcuğu olarak nitelenebilen bu çıkıntı, gelişen kalp ile orta bağırsak arasındaki splanknik mezoderm kitlesine, septum transversum'a doğru uzanır. Septum transversum, diyaframın bir kısmını ve buradaki, ventral mezenter yapar. Karaciğer divertikulumu, ventral mezenter yaprakları arasında büyürken, iki kısma ayrılır. Divertikulum'un kranial daha büyük parçası, karaciğer taslağıdır. Çoğalan endoderm hücreleri karaciğer hücre kordonları ağını ve safra sisteminin intrahepatik kısmının epitel örtüsünü meydana getirir (19). Bu hepatik hücre kordonları, endotelle döşeli boşlukların çevresinde ağ oluşturarak karaciğer sinüzoidlerinin taslaklarını meydana getirirler (18).

Karaciğerin fibröz ve hematopoetik dokuları ve Kupffer hücreleri mezenşimden köken alırlar. Karaciğer 5. haftadan 10. haftaya kadar çok hızlı büyür ve karın boşluğunun büyük bir kısmını doldurur (19).

Umbilikal venden gelen kanın oksijen miktarı, karaciğerin gelişimini ve fonksiyonel segmentasyonunu belirler. 6. haftada başlayan hematopoez karaciğere parlak kırmızı bir renk verir. 9. haftayla birlikte karaciğer fetusun toplam ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturur. 12.haftada karaciğer hücreleri safra üretimine başlar (18).

Önceleri sağ ve sol loblar aynı büyüklüktedirler ancak sağ lob, kısa zamanda daha çok büyür. (19).

Başlangıçta, ekstrahepatik safra kanalları epitel hücreleriyle tıkalı iken daha sonra bu hücrelerin dejenerasyonu ile vakuoller oluşur ve kanal gelişir. Hepatik divertikülün küçük kaudal parçası safra kesesini, divertikülün sapıda sistik kanalı oluşturur. Hepatik ve sistik kanalları duodenuma bağlayan kordondan safra kanalı (kole-dok) gelişir. Bu kanal başlangıçta duodenum halkasının ön yüzüne bağlıdır ancak duodenumun büyümesi ve rotasyonu ile arka yüze taşınır. 13. haftadan sonra kanaldan geçerek duodenuma giren safra, mekonyuma koyu yeşil bir renk verir.

Bu ince ve iki yapraklı membrandan aşağıdaki yapılar gelişir.

1. Küçük omentum, karaciğerden midenin küçük kurvaturuna (hepatogastrik lig.) ve karaciğerden duodenuma (hepatoduodenal lig.) uzanır.
2. Falsiform ligament, karaciğerden karın ön duvarına uzanır.

Umbilikal ven, umbilikal kordon (göbek kordonu) çıkıp karaciğere ulaşırken falsiform ligamentin serbest kenarı boyunca uzanır. Mezogastriyumdan kaynaklanan ventral mezenter aynı zamanda karaciğerin visseral peritonunu da oluşturur. (18).

1.1.2. Karaciğer Anatomisi

Vücudun en büyük bezi ve organı olan karaciğer, karın boşluğunun üst tarafında, regio hypochondriaca dextra'nın tümünü, regio epigastrica'nın büyük bir kısmını doldurur. Regio hypochondriaca sinistra'da ise, linea medioclavicularis sinistra'ya kadar uzanır. Erkeklerde 1400 ile 1800 gr, kadınlarda ise 1200 ile 1400 gr ağırlığındadır. Fetüste karaciğerin vücut ağırlığına oranı, erişkinlerdekinden daha fazladır. Erişkinde vücut ağırlığının %2'si, yeni doğanlarda ise %5'i kadardır. Kırmızımtırak kahverengi olan karaciğer, sağlam ve elastiki olmasına rağmen, gevrek ve kolaylıkla parçalanabilen bir yapıya sahiptir. Çok damarlı olması nedeniyle, yaralanmaları büyük kanamalara yol açmaktadır (20).

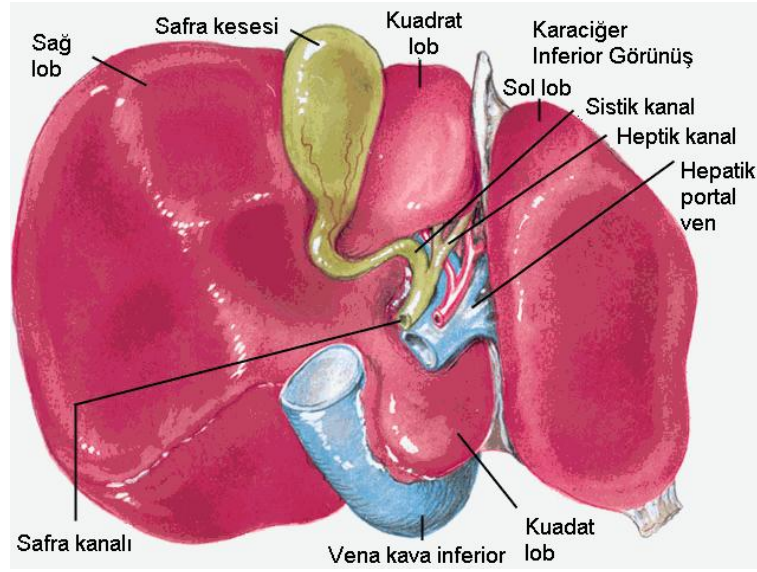
Karaciğer 4 lobdan oluşur;

1. Lobus hepatis dexter: Altında safra kesesi bulunan en büyük kısımdır. Regio hypochondriaca dextra'da bulunur. Tüm karaciğerin 5/6 sını oluşturur.

2. Lobus hepatis sinister: Karaciğerin ikinci büyük parçası olan bu kısım regio hypochondriaca sinistra ve regio epigastrica'da bulunur. Karaciğerin 1/6 sını oluşturur.

3. Lobus caudatus: Sağ lobun visseral yüzünde ve porta hepatis'in arka tarafında bulunur.

4. Lobus quadratus: Sağ lobun visseral yüzünde ve porta hepatis'in ön tarafında bulunur (20).



Şekil 1. Karaciğerin alttan görünümü (21).

1.1.2.1. Kanlanması

1- V. portae hepatis (%70)

2- A. hepatica propria (%30) ile olmaktadır.

V. lienalis ile v. mesenterica superior'un L2 seviyesinde pankreas başı arkasında birleşmesi ile v. porta hepatis oluşur. Porta hepatis, barsaklardan absorbe edilen besin maddeleri ve toksik maddeleri, dalakta harap olmuş kan hücrelerini ve pankreasın endokrin salgısı ile gastrointestinal kanalın enteroendokrin hücrelerinin salgısını içerir ve gastrointestinal sistemin abdominopelvik bölümünden aldığı oksijenden

fakir kanı karaciğere taşır. A. hepatica communis'in bir dalı olan a. hepatica propria ise aorta'dan aldığı oksijenden zengin kanı karaciğere taşır.

A. hepatica ve v. porta hepatis, karaciğer içerisinde birlikte dallanarak karaciğerin segmentasyonuna uyarlar ancak v. hepatica'lar bu segmentasyona uymazlar. Karaciğerde, portal venin dalları, hepatik arter ve safra kanal sisteminin dalları 'portal triad' olarak adlandırılan bir oluşumda bir arada bulunurlar.

Hepatik arter, hepatositleri kanlandıran sinüzoidal kapillerleri destekler. Sinüzoidler, hepatositlerle sıkı ilişki içinde olup kan ve karaciğer hücreleri arasında maddelerin değişimi sağlanmış olur. Sinüzoidler santral vene, santral ven ise sublobüler venlere boşalır. Kan, karaciğeri hepatik venler aracılığı ile terkeder.

Karaciğerin v. sentralis'lerinin birleşmesiyle oluşan v.hepatica'lar diaphragmanın hemen altında v. cava inferior'a açılırlar (22).

1.1.2.2. Karaciğerin Lenf Sistemi

Karaciğer lenf üreten büyük bir organ olup, ductus thoracicus'a gelen lenfa'nın yaklaşık 1/4-1/2'si arasındaki kısmı karaciğerden gelir. Karaciğerin her iki yüzünün ön bölümünün lenf damarları, nodi lymphatici coeliaci'ye oradanda cisterna chyli'ye drene olur. Her iki yüzünün arka bölümlerinin lenf drenajı ise nodi lymphatici phrenici'ye ya da nodi lymphatici mediastinales posteriores'e drene olurlar (23).

1.1.2.3. Karaciğerin İnnervasyon Sistemi

Karaciğerin innervasyonu, plexus coeliacus'dan köken alan sempatik ve parasempatik liflerle olur. Safra kesesi ise mideden duodenuma yağlı besinlerin geçisi sırasında, duodenum mukozasında üretilen kolesistokinin hormonunun etkisiyle kasılır (24).

Sinir lifleri torasik ganglia, çölyak pleksus, vagus, safra yolu, portal ven ve hepatik arter pleksusunu oluşturan sağ frenik sinirden meydana gelir. Arterler daha çok sempatik lifler, safra yolları ise hem sempatik hem de parasempatik liflerle innerve olur. Miyelinsiz sempatik lifler hepatositlere dalcıklar gönderir (25).

1.1.3. Karaciğer Histolojisi

Karın boşluğunda diyaframa altında, sağ üst kadranda yer alan karaciğer, vücudun deriden sonra en büyük organı ve bezi olarak kabul edilir (26).

Hem endokrin hemde ekzokrin sekresyon yapan bir organdır. Karaciğer ürettiği safrayı safra kanalları yoluyla duodenuma boşaltması nedeniyle ekzokrin, sentez-

lediği bazı maddeleri doğrudan kana vermesi özelliğiyle de endokrin bir bez niteliği taşımaktadır (27). Karaciğer, kollajen ve elastik lif içeren bir kapsül (Glisson kapsülü) ile çevrelenmiş olup, periton ile kaplıdır (28).

1.1.3.1 Karaciğerin Yapısal Organizasyonu

1.1.3.1.1 Parankim

Karaciğer, parankim hücreleri olan hepatositlerden meydana gelir. Parankim, birbirleriyle bağlantılı ve bir-iki hücre kalınlığında olan ve bir binanın duvarlarını andıran tabakalar ağını içerir. Her bir tabakadaki hepatositler bu duvarın tuğlalarına ve karaciğer sinüzoidleri de duvardaki boşluklara benzetilebilir. Karaciğer parankiminin organizasyonu ile ilgili üç önemli karaciğer lobül modeli vardır (29).

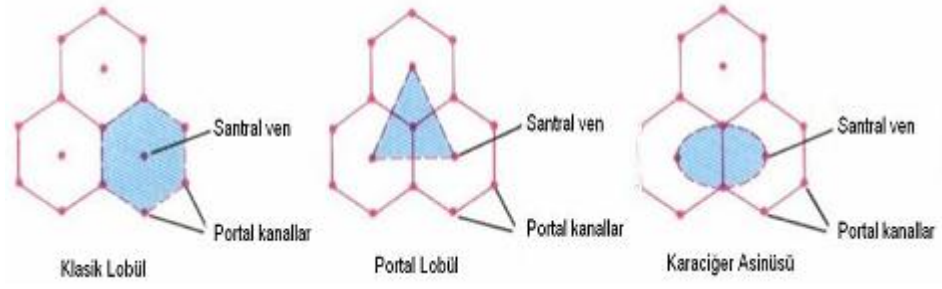
Bunlar; klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsüdür.

1. Klasik lobül; Klasik hepatik lobül, kabaca altıgen şeklinde doku kütesidir. Herbir lobülün merkezinde, santral ven bulunur. Santral ven içine sinüzoidler direne olur. Santral venden çevreye doğru hücre tabakaları ve sinüzoidler ışınal tarzda yayılır. Lobüllerin köşeleri portal alanlar olarak isimlendirilir ve portal triad olarak isimlendirilen gevşek bağ dokusunu içerir. Bu bağ dokusu, karaciğerin dışına doğru ilerleyerek fibröz kapsül (Glisson) ile devam eder. Portal alan, lobüllerin en dışındaki hepatositler ile sınırlıdır. Lobülün periferinin son sırasındaki hepatositler ile bağ dokusu elemanları arasında kalan dar mesafeye Mall aralığı denir. Bu aralığın, karaciğerde lenfatiklerin orijin aldığı aralıklardan biri olduğu düşünülmektedir (27, 30).

2. Portal lobül; Üç santral ven arasında yer alan üçgen şekilli alandır. Ortada portal alan bulunur. Dış kenarları, portal triada yakın üç santral ven arasında çizilen hayali çizgilerdir.

Karaciğerin ekzokrin fonksiyonunu vurgular. Karaciğerin esas ekzokrin fonksiyonu, safra salınımıdır. Klasik lobülün bu parçalarında safra salgılanır ve aksiyal safra kanalına direne edilir (27, 30).

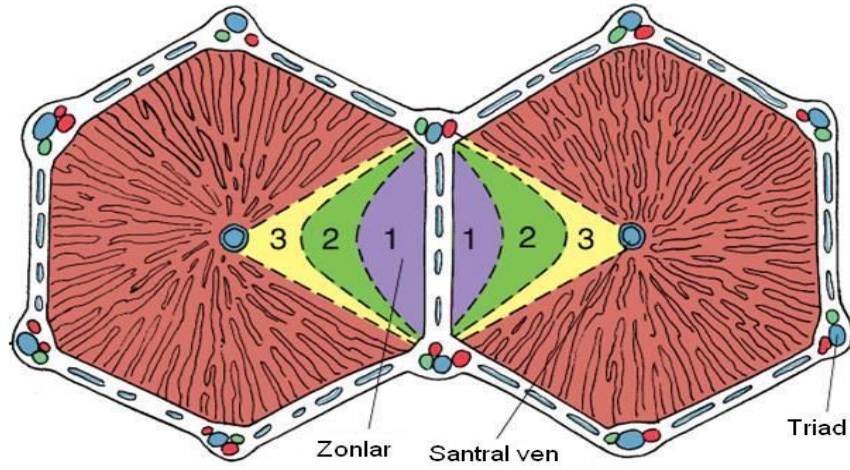
3. Karaciğer asinusu; Kan perfüzyonu, metabolik aktivite ve karaciğer patolojisi arasında en iyi korelasyonu sağlayan yapısal ünitidir. Karaciğer asinusu, hepatik parankimin en küçük fonksiyonel üniti gösterir. Asinusun kısa ekseni, iki portal alan arasında, uzun ekseni iki santral ven arasında bulunan baklava şeklinde alandır. Kısa eksene en yakın bölüm zon 1, en uzak bölüm zon 3 olarak bilinir. 2. zon karaciğer asinüsünün santral bölgesidir (27).



Şekil 2. Karaciğer lobülünün histolojik sınıflandırılması (21)

Zonlara ayırma, karaciğer parankiminde hepatik hücrelerin vasküler perfüzyonunun derece ve kalitesiyle ilgili dejenerasyon, rejenerasyon ve spesifik toksik etkilerin tanımlanması ve yorumlanması açısından önemlidir. Sinüzoidal kan akışının bir sonucu olarak, hepatositlerin oksijen basıncı, metabolik aktivitesi ve hepatik enzimlerin dağılımı her üç zonda değişiklik gösterir. İskemi ve toksik maddelere maruz kalmaya bağlı oluşan karaciğer hasarının dağılımı, bu zonal yorumlamayı kullanarak açıklanabilir.

Zon 1'deki hücreler, sinüzoidal kandan gelen oksijen, toksik maddeler ve besin maddelerini ilk alan hücrelerdir ve safra kanalı stazını takiben oluşan morfolojik değişiklikleri ilk gösteren bölgedir. Bu hücreler, aynı zamanda dolaşım bozulursa ilk ölen hücreler olup aynı zamanda ilk rejenere olan hücrelerdir. Diğer yandan, zon III'teki hücreler azalmış perfüzyon durumunda iskemik nekrozu ilk olarak gösteren hücrelerdir. Yağ birikimini de ilk olarak bu hücreler gösterirler. Bu hücreler, toksik maddelere ve safra stazına ise en son yanıt verirler. Zon I ve III arasında, aynı zamanda enzim aktivitesi, sitoplazmik organellerin sayısı ve boyutları ve sitoplazmik glikojen depozitlerinin boyutları arasında değişiklikler bulunmaktadır. Zon II'deki hücrelerin fonksiyonel ve morfolojik karakteristikleri, zon I ve III arasındadır (27, 30).



Şekil 3. Karaciğer lobülünün fonksiyonel sınıflandırılması (31)

Santral vendede lobülün periferine doğru ışmsal şekilde uzanan tek ya da iki hücre kalınlığında hücre kordonları oluştururlar. Erişkin karaciğerinde pekçok hücre çift çekirdeklidir. Her bir çekirdekte iki veya daha fazla iyi gelişmiş çekirdekçik bulunur

Her hücrenin 3 tip yüzü vardır

1. Perisinüzoidal aralığa bakan yüz,
2. Komşu karaciğer hücresiyle arasında tübüler bir aralık (safra kanalikülü) bırakan, dolayısıyla safra kanalikülünü oluşturan yüz,
3. Komşu karaciğer hücresiyle sıkıca temas eden yüz.

Perisinüzoidal aralığa bakan yüzde çok sayıda, düzensiz şekil ve büyüklükte uzun mikrovilluslar bulunur. Böylece bu yüz 6 kat genişleyerek, sekresyon ve absorpsiyon için geniş bir yüzey oluşturulabilir (32). Hepatosit yüzeyinden kanaliküle doğru uzanan mikrovilluslar ATPaz gibi enzimleri taşıyan membran alanlarını barındırırlar. Safra kanalikülleri lobülün periferinde yer alan tek katlı kübik epitel ile döşeli Herring kanalları ile devam eder. Herring kanallarının epitel hücrelerinin yüzeyinde de mikrovilluslar bulunur.

Hepatositler aktif sentez ve sekresyon yapan hücreler olduklarından dolayı organelden zengin olmaları doğaldır. Agranüler endoplazmik retikulumları sayesinde zararlı toksik maddelerin detoksifikasyonunu gerçekleştirebilirler. Toksik ürünler veya ilaçların yıkımı ve konjugasyonu için gerekli enzimler agranüler endoplazmik retikulumu membranlarında bulunmaktadır. Toksik ajanlara maruz kalındığında, al-

kol, ilaç kullanımı sonrasında agranüler endoplazma retikulumu genişler. Agranüler endoplazma retikulumu kolesterol ve lipid sentezinden sorumlu enzimleri de içerir (27).

Düz endoplazmik retikulumunun membranlarında yerleşik enzimler şu fonksiyonlardan sorumludur.

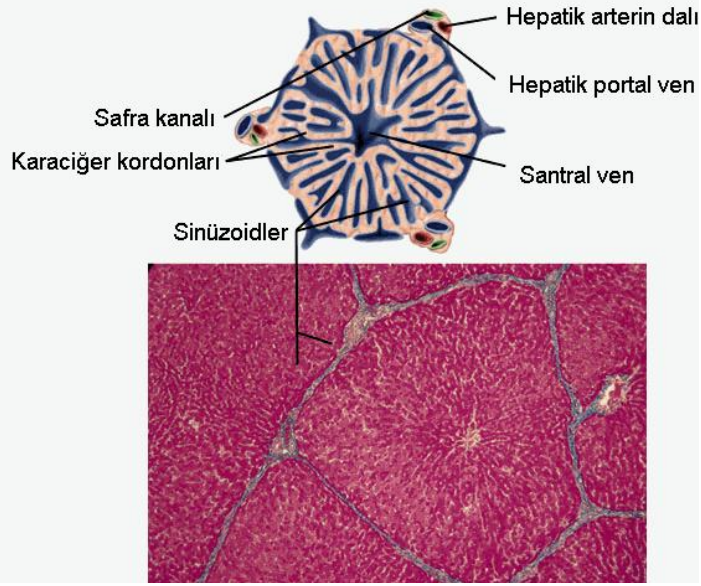
1. Kolesterol ve safra tuzlarının sentezi
2. Bilurubin, steroidler ve ilaçların glukronik asit ile konjugasyonu,
3. Glikojenin glikoza yıkımı,
4. Serbest yağ asitlerinin trigliseritlere yıkılımı,
5. Tiroid hormonlarından iyodun uzaklaştırılması,
6. Lipid de eriyebilen ilaçların detoksifikasyonu.

Golgi aparatının safra kanallarına yakın yerleşmesi safra sekresyonunda rolü olduğunu akla getirir (27).

Peroksizomlar; Hepatositler hücre başına yaklaşık olarak 200-300 peroksizom içerir. Bir peroksizom, değişik metabolik yollarda kullanılacak olan yaklaşık olarak 50 adet enzimi içermektedir (33). Mitokondriyonlar gibi oksijen kullandıklarından dolayı serbest radikal oluşumuna neden olurlar. Peroksizomlarda hidrojen peroksiti, su ve oksijene yıkan katalaz enzimi vardır. Peroksizomlar, yağ asitlerinin β oksidasyonu, glukoneogenez ve purin metabolizmasında da görev alırlar. Yine hepatosit stoplazmasında lipid ve glikojen de depolanır (27).

1.1.3.1.2 Bağ Dokusu Stroma

Karaciğeri en dıştan saran seröz zara, visseral periton adı verilir. Tek katlı yassı bir epitel türü olan mezotelyum ve altındaki ince bir bağ dokusundan oluşur. Hilumda Glisson kapsülü içeriye doğru girer ve porta hepatisten itibaren organ içine doğru dallanan ve karaciğere giren hepatik arterle portal venin damar yoluna ve safra kanallarına eşlik eden bağ dokusu şeklinde devam eder (29). Böylece karaciğer loblara ve lobüllere ayrılır. Sonuçta karaciğer bu bağ dokusu bölmeleri ile sayıları yaklaşık 1 milyonu bulan 1 mm çapında ve 1-2 mm uzunluğunda “karaciğer lobüllerine” ayrılmış olur. Stroma içinde, kan damarları, sinirler, lenfatik damarlar ve safra kanalları da bulunur (30).



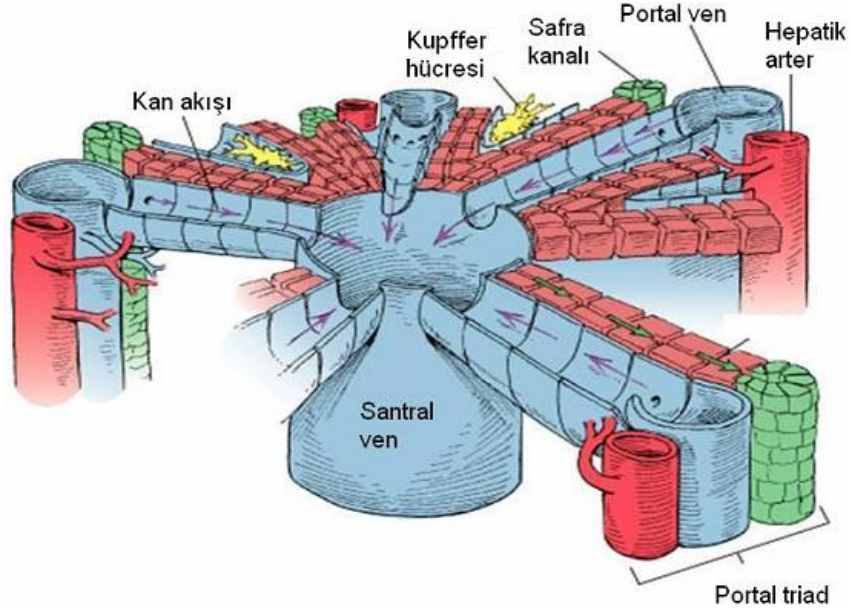
Şekil 4. Karaciğer lobülünün yapılanması (34)

1.1.3.1.3. Sinüzoidal Kapillerler (Sinüzoidler)

Hepatosit tabakaları arasındaki vasküler kanallardır (30). Portal aralıkta bulunan portal venin ve hepatik arterin dalları, kanlarını karaciğer hücre kordonları arasında bulunan düzensiz şekilli, özel, her yerde rastlanan kapillerlerden daha büyük damar sistemine (sinüzoidlere) boşaltırlar (32). Hepatik sinüzoidler ince, devamlı olmayan bir endotelle sınırlıdır. Bu devamlı olmayan sinüzoidal endotel, devamlı olmayan bir bazal laminaya sahiptir. Komşu endotelyal hücreler arasında büyük pencereler bulunur.

Hepatik sinüzoidler, diğer sinüzoidlerden farklı bir hücre tipi içerir. Bunlar sinüzoidal makrofajlar (Kupffer hücreleri)'dir. Kupffer hücreleri, mononükleer fagositik sisteme aittir (30). Bu hücrelerin gelişimi kemik iliğinde sırası ile promonosit, monoblast ve monosit farklılaşması ile başlar. Monositler kanda kupffer hücrelerine dönüşerek karaciğerde yerleşirler. Stoplazmik uzantıları ile sinüzoid duvarına tutunurlar. Bu hücreler kan yolu ile gelen antijenleri ve hasarlanmış eritrositlerden kaynaklanan stoplazmik parçaları ve demiri fagosit ederler. Ferritin hemosiderin granülleri şeklinde depolanabilir. Bu hücreler dışında karaciğerde pit hücreleri olarak isimlendirilen bir lenfosit subpopülasyonu bulunur. Parankimal olmayan hücrelerin yaklaşık %1'ini oluşturan bu büyük granüler lenfositler diğer organlarda yerleşen Natural Killer hücrelerin karşılığıdır. Bu hücrelerde kupffer hücreleri gibi kemik iliği

kökenlidirler. Karaciğerde kalma süreleri yaklaşık iki hafta kadardır. Hayatta kalma-
ları kupffer hücrelerine bağımlıdır (27).



Şekil 5. Karaciğerdeki kan ve safra akış yönleri (35)

1.1.3.1.4. Perisinüzoidal Aralıklar (Disse aralıkları)

Sinüzoid endoteli ile hepatositler arasında bulunur. Perisinüzoidal aralık, kan ve karaciğer hücreleri arasında materyallerin değişim alanıdır. Perisinüzoidal aralık (Disse aralığı), hepatositlerin bazal yüzeyi ile sinüzoidleri çevreleyen endotelial hücrelerin ve Kupffer hücrelerinin bazal yüzeyi arasında bulunur. Bu aralığa, hepatositlerin bazal yüzeyinden, küçük, düzensiz mikrovilluslar uzanır (30).

Endotelial tabakadaki büyük yarıklardan ve devamlı bir bazal laminanın yokluğundan dolayı, sinüzoidlerdeki kan plazması ve hepatosit plazma membranı arasında önemli bir engel oluşmaz. Hepatosit tarafından sentezlenen protein ve lipoproteinler, perisinüzoidal aralıkta kana transfer edilir. Bu yol, safradan ziyade karaciğer salgıları içindir. Fetal karaciğerde, kan damarları ve hepatositler arasındaki aralık, kan oluşturan hücre adalarını içerir. Erişkinlerde kronik anemi durumlarında, perisinüzoidal aralıkta kan oluşturan hücreler tekrar görülebilir (30). Sinüzoidal alanda yerleşen liposit veya ito hücresi olarak (yağ depolayan hücre, stellat hücre) bilinen hücrelerde bulunur. Mezenkimal orjinli olan bu hücreler stoplazmik lipid

damlalarında retinil esterleri şeklinde A vitamini depolarlar. Altın kloridle de belirlenebilen bu hücreler rutin yöntemlerle stoplazmalarında yer alan lipid damlaları nedeniyle kolay tanınırlar. Bu hücrelerden retinol olarak sallanan A vitamini proteinlere bağlanarak retinaya taşınırlar. Burada içerdiği 11-cis retinal opsin proteini ile bağlanarak rodopsini oluşturur. Rodopsin görmeyi sağlayan bir retina pigmentidir.

İto hücrelerinin ekstrasellüler matriks proteinlerini ve proteoglikanları, büyüme faktörleri ve sitokinleri salgılayabildikleri ve prostoglandin ve tromboksan A2 gibi regülatuar maddelere cevap olarak sinüzoid lümeninin çapını ayarlayabildikleri bilinmektedir. Normal şartlarda karaciğer hücrelerinin %5-8'ini oluşturan ito hücrelerinin lipid depolamaları yanı sıra lipid yapısındaki antijenleri Natural Killer hücrelerine sunarak onların proliferasyonunu stimüle eden antijen sunan hücreler olabilecekleri öne sürülmüştür. Karaciğer hasarını takiben ito hücreleri aktive olur. Hücrelerde proliferasyon, kontraktilite ve kemotaksis görülür. İçerdikleri desmin ve α aktin sayesinde kasılarak sinüzoidin vasküler rezistansını artırır (27).

Kronik inflamasyon, siroz gibi belirli patolojik şartlarda, İto hücreleri lipid ve A vitamin depolama yeteneklerini kaybederler ve miyofibroblast karakteristikleri olan hücrelere dönüşürler. Bu hücrelerin hepatik fibrojeneziste önemli rol oynadıkları gözlenmiştir. Bunlar, Tip I ve tip III kollajeni sentezler ve perisinüzoidal aralıklarda depolarlar ve karaciğer fibrozisine yol açarlar. Bu kollajen, portal aralığın bağ dokusu ile ve santral veni çevreleyen bağ dokusu ile devam eder. Perisinüzoidal fibroz stromadaki artış, karaciğerin toksik maddelere karşı erken bir sinyalidir. İlâveten, İto hücreleri karaciğer hasarından sonra ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanmasında da rol oynarlar (30).

1.1.3.2. Safra Yolları

Safra kanalikülleri, hepatositlerin yüzeyinde bitişik oluklardan oluşan küçük kanallardır. İki bitişik hepatositin mikrovillusları, kanaliküler lümene yayılır. Kanaliküllerin plazma membranında ATPaz ve diğer alkalin fosfatazlar lokalize edilebilir, safra sekresyonu, aktif bir işlemdir. Safra akımı, santral ven bölgesinden portal alana doğrudur (kan akışının tersi yönde). Portal alan yakınında fakat hala lobülün içindeyken safra kanalikülleri birleşerek kısa intrahepatik kanalları oluşturur. Bunlar Hering kanallarıdır ve kübik non-hepatik hücrelerle döşelidir. Bu kanal epiteli, safra

yollarının distal bölümü gibi devamlı bir bazal lamina ile sınırlıdır. İntrahepatik safra kanalları safrayı, hepatik kanallara taşırlar. Ekstrahepatik safra kanalları ise safrayı safra kesesi ve duodenuma taşırlar (30).

1.1.3. Karaciğer Fizyolojisi

1.1.4.1. Karaciğerin Depo İşlevi

Karaciğer genişleyebilen bir organ olduğu için, kendi kan damarlarında büyük miktarlarda kan depolayabilir. Hepatik venlerdeki ve hepatik sinüslerdeki kan ile birlikte karaciğer normal volümü 450 ml yani yaklaşık olarak vücudun toplam kan hacminin %10'u kadardır. Karaciğer, kan hacmi azaldığında ekstra kan sağlama yeteneği olan ve kan hacmi aşırı şekilde arttığında ise kan deposu olarak görev yapabilen venöz bir organdır (36).

1.1.4.2. Karaciğerin Kan Temizleme İşlevi

Barsak kapillerlerinden akan kan barsaklardan birçok bakteriyi de beraberinde götürür. Gerçektende, karaciğere girmeden önce portal venlerdeki kan örneğinden kültür yapıldığı zaman hemen hemen daima kolon basili ürer. Oysa sistemik dolaşımdaki kanda kolon basili üremesi son derece nadirdir (41).

Hepatik venöz sinüslerde yer alan, büyük fagositik makrofajlar olan Kupffer hücrelerinin, sinüsler içinden geçen kanı son derece etkili bir şekilde temizleyebildikleri gösterilmiştir. Barsaklardan portal kana girerek karaciğer içinden geçip sistemik dolaşıma ulaşmayı başaran bakterilerin sayısı muhtemelen yüzde birden fazla değildir (36).

1.1.4.3. Karaciğerin Metabolik İşlevleri

1.1.4.3.1. Karbonhidrat Metabolizması

Karbonhidrat metabolizmasında karaciğer şu işlevleri yürütür:

1. Büyük miktarda glikojen depolama,
2. Galaktoz ve fruktozu glikoza çevirme,
3. Glikoneogenez,
4. Karbonhidrat metabolizmasının ara ürünlerinden birçok önemli maddelerin oluşturulması (36)

1.1.4.3.2. Protein Metabolizması

Karaciğer karbonhidrat ve yağ metabolizmasındaki fonksiyonlarının çoğunu yapmasa bile vücut canlı kalmaya devam edebilir. Ancak vücut, karaciğerin protein metabolizmasındaki işlevlerinden vazgeçemez (36).

Karaciğerin protein metabolizmasındaki fonksiyonları şöyle sıralanabilir.

1. Yeni amino asitlerin yapımı,
2. Üre oluşumu ile amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılması,
3. Plazma proteinlerinin oluşumu,

Gama globulinlerin bir bölümü dışında hemen bütün plazma proteinleri ve albumin karaciğer hücrelerinde yapılır.

4. Vücuttaki metabolik olaylar için önemli amino asitlerin ve öteki maddelerin birbirine dönüşümleri ve esansiyel olmayan aminoasitlerin sentezi (36).

1.1.4.3.3. Yağ Metabolizması

Karaciğerin lipit metabolizması ile ilgili fonksiyonları şöyle özetlenebilir.

1. Diğer vücut fonksiyonları için enerji sağlayacak yağ asitlerinin oksidasyonu,
2. Lipoproteinlerin sentezi,
3. Kolesterol ve fosfolipit sentezi,
4. Karbonhidrat ve proteinlerin lipitlere dönüştürülmesi,

İnce bağırsaklarda yağların emilmesinde rolü olan safra tuzları karaciğerde yapılır (36).

1.1.4.3.4. Safranın Sentezlenip Salgılanması

Karaciğerin önemli fonksiyonlarından biri, normal düzeyi 500 – 1000 ml/gün olan safra salgısı salgılamaktır. Safranın iki önemli işlevi vardır. Bunlardan birincisi, yağların sindirimi ve emilimi, diğeri ise kandan önemli yıkım ürünlerinin atılmasıdır. Bunlar arasında özellikle, hemoglobinin parçalanma ürünü olan bilirubin ve karaciğer hücrelerinde sentezlenen kolesterol yer alır.

Safra, su ve elektrolitlere ek olarak safra tuzları, safra pigmentleri, kolesterol, inorganik tuzlar, yağ asitleri, bilirubin, lesitin birkaç esansiyel komponente de sahiptir. Safranın bileşiminde en fazla bulunan madde safra tuzlarıdır (36, 37).

İnsanda bulunan safra asitleri dört çeşittir. Bunlar kolit asit, kenodeoksikolik asit, deoksikolik asit, litokolik asittir. Kolit asit ve kenodeoksikolik asit karaciğerde

kolesterolden sentezlenen primer safra asitleridir. Bunlar glisin ya da taurin aminoasitleri ile konjuge olmuş sodyum tuzları formunda safraya salgılanırlar (36). Primer safra asitleri bağırsak lümeninde bakteriler tarafından dehidroksile edilerek deoksikolik asit ve litokolik asit denilen sekonder safra asitlerine dönüştürülürler (37). Deoksikolik asit geri emilip enterohepatik dolaşıma girer, karaciğere gelir ve tekrar salgılanır. Safra tuzları bağırsaklarda iki önemli etkiye yol açarlar. Öncelikle besindeki yağ parçacıkları üzerinde deterjan etkileri vardır. Bu etki ile partiküllerin yüzey gerilimini azaltarak yağ partiküllerinin küçük parçalara ayrılmasına imkân sağlar. Buna safra tuzlarının emülsifiye edici veya deterjan fonksiyonu denir. İkinci olarak, safra tuzları; yağ asitlerinin, monogliseridlerin, kolesterol ve diğer lipidlerin barsak kanalından emilimine yardım ederler. Bunu lipidlerle kompleks oluşturarak yaparlar. Oluşan komplekslere miçel adı verilir. Miçeller safra tuzlarının elektriksel yükleri nedeniyle ileri derecede çözünür maddelerdir. Lipidler bu yapı içinde mukozadan geçebilir özellik kazanırlar ve daha sonra absorbe olurlar (36).

1.1.4.3.5. Bilirubin Oluşumu

Bilirubin hem (demir) metabolizmasının son ürünü olup, karaciğer ve dalakta yıkılan yaşlı kırmızı kan hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Hemoglobin hem ve globinden oluşur. Globin genel protein havuzuna dâhil olurken, hem'den demirin ayrılmasıyla da bilirubin oluşur. Daha sonra ayrılan bu demir tekrar kullanılır. Bilirubinün yaklaşık % 80'i mononükleer fagositik sistem de hem'in yıkılmasıyla oluşurken, geri kalan kısmı da olgunlaşmamış kırmızı kan hücrelerinden, miyoglobulin ve sitokromlardan kaynaklanır.

Bilirubin lipofiliktir ve salınmadan önce hepatik enzimlerle konjuge hale gelmelidir. Serbest bilirubin plazmada proteine, başlıca albumine bağlı olarak taşınır. İndirekt bilirubin olasılıkla karaciğer hücrelerinin membranlarındaki reseptöre bağlandıktan sonra hücre içine alınır. Ligandin, bilirubini glukuronil transferaz ile konjuge edilerek bilirubin diglukuronit'e çevrildiği Endoplazmik Retikulum'a taşır. Daha ileri aşamada enerji gerektiren bir işlemle bilirubin glukuronit (konjuge=direkt bilirubin) safra kanallıklarına salınır. Direkt bilirubin polardır bu nedenle ince bağırsaktan emilemez. Kolonda bakterilerce indirgenerek ürobilinojen denen renksiz bileşiğe dönüşür. Ürobilinojenin çoğu bağırsak bakterileri tarafından okside edilerek sterkobilin'e dönüştürülür. Dışkıının rengini veren madde sterkobilindir. Ürobilinoje-

nin çok az bir kısmı kolon mukozasından emilerek portal dolaşıma aktarılır ve böbreğe gelir. Burada sarı renkli ürobiline çevrilerek atılır ve idrarın rengini verir (36, 38).

1.1.4.3.6. Karaciğerin Diğer Metabolik Fonksiyonları

Vitaminlerin depo edilmesi; Karaciğerin iyi bir vitamin kaynağı olduğu bilinmektedir. Özellikle A vitamini başta olmak üzere, D ve B₁₂ vitaminleri de depolanır. A vitamini eksikliğini on ay, D vitamini eksikliğini üç-dört ay, B₁₂ vitamini ise en az bir yıl ya da daha uzun süre eksikliklerini önleyecek kadar depo edilebilir (36).

İlaçların, hormonların ve diğer zararlı maddelerin karaciğer tarafından detoksifiye edilip atılması; Karaciğerdeki aktif kimyasal reaksiyonlar çeşitli ilaçları zehirsizleştirerek safra ile vücuttan uzaklaştırmaktadır. Aynı şekilde iç salgı bezlerinden salgılanan östrojen, kortizol, aldosteron gibi tüm steroid hormonlar ve tiroksin de karaciğer tarafından ya kimyasal olarak değiştirilir ya da dışarı atılır. Böylece karaciğer harabiyetinde, çok defa bu hormonlardan birinin ya da birçoğunun vücut sıvılarında birikmesi, hormonal sistemin aşırı faaliyetine yol açar (36).

Kan pıhtılaşması ile karaciğerin ilişkisi; kanda koagülasyon işleminde kullanılan maddelerin çoğu karaciğerde yapılır. Bu maddeler fibrinojen, protrombin, globulin, faktör V, faktör VII, faktör IX ve faktör X'dur. K vitamini yokluğunda bu maddelerin konsantrasyonu çok düştüğünden pıhtılaşma hemen hemen tamamen ortadan kalkar (36).

Demir depo edilmesi; Vücutta kandaki hemoglobinde bulunan demir dışında, demirin en büyük bölümü normalde karaciğerde ferritin şeklinde depolanır. Karaciğer hücrelerinde, demirle az ya da çok miktarlarda birleşebilen bir protein olan apoferritin bol miktarda bulunur. Böylece vücut sıvılarında demir miktarı arttığı zaman, apoferritinle birleşerek ferritini oluşturur ve gerektiğinde başka bir yerde kullanılmak üzere saklanır. Dolaşımdaki vücut sıvılarında demir düşük bir düzeye indiğinde ferritin demiri serbestlenir. Böylece, karaciğerdeki apoferritin-ferritin sistemi bir demir deposu görevi yapar (36).

1.1.5. Karaciğerin Rejenerasyonu

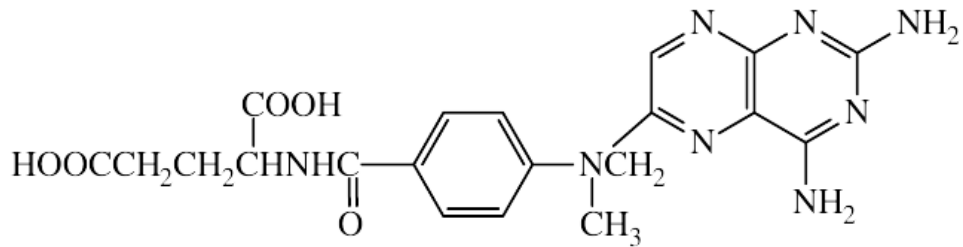
Hepatositler metabolik olarak son derece aktif hücrelerdir. Çeşitli patolojik durumlardan, toksik ajanlardan ve iskemiden kolay etkilenirler. Hücreye zarar veren ajanların en önemli hedeflerinden biri membran sistemi olduğundan dolayı memb-

randan zengin endoplazmik retikulum, mitokondriler gibi organeller çabuk zarar görür. Endoplazmik retikulum dilatasyonu, mitokondri ödemi, krista kaybı, myelin fiğür oluşumu en sık rastlanan organel değişiklikleridir. Hepatositler etkene bağlı olarak apoptoz veya nekrozla ölüme gidebilirler (27). Karaciğer olağanüstü bir yenilenme yeteneğine sahip olup cerrahi yolla çıkarılmasından ya da hepatotoksik hasar sonrası kısa bir zaman içinde normal ağırlığını yeniden kazanabilir (39).

Akut karaciğer hasarı sonrasında parankimal hücreler yenilenir ve yerini nekrotik ve apoptotik hücreler alır. Disse mesafesinde normalde bol miktarda tip1 ve tip III kollajen ve elastin ile birlikte glikoproteinler ve saf karbohidratlarda bulunur (40). Rejenerasyon geride kalan hepatositlerin mitozu ve büyümeleri ile sağlanır. Rejenere olan karaciğerde parankimal hücrelerin normalden büyük olduğu ve binükleer hücrelerin çoğaldığı görülür. Hepatositlerde meydana gelen mitoz kanda dolaşan şalon (Chalon) denen mitoz inhibitörü maddelerle kontrol edilir. Doku hasarında ya da karaciğerin bir parçasının çıkarılmasıyla kandaki şalon miktarı düşer, mitoz baskısı kalktığından hızlı bir mitoz görülür. Rejenerasyon ilerledikçe, yapılan şalon miktarı artar, mitoz giderek azalır (32). Sürekli ve tekrarlanan karaciğer hasarlarında karaciğer hücre rejenerasyonu ile birlikte bağ dokusu artımı da hızlandığından, giderek karaciğer bağ dokusu artar ve siroz denen patolojik bir durum ortaya çıkar.

1.2. Metotreksat

Metotreksat, kimyasal olarak N-(4(((2,4-diamino-6-pteridinil) metil) metil-amino)benzoil)-L-glutamik asittir.



Metotreksatın kimyasal formülü

1.2.1. Farmakolojik Etkileri

1.2.1.1. Folat Antagonisti Mekanizması

İnsanlar vücudun ana yapılarından olan folatı sentezleyemez bundan dolayı diyetle dışardan almak zorundadır. Dihidrofolat redüktaz, dihidrofolat'ı folat bağımlı yollarda etkin rol oynayan tetrahidrofolat'a dönüştürür. MTX'in folat antagonisti mekanizması; ya dihidrofolat redüktaz'ı bloke ederek intrasellüler folatın azalması

veya nükleotidlerin sentezinde görevli basamakları, doğrudan inhibe edip dihidrofolatın birikmesi şeklinde olmaktadır (41).

MTX, sentez fazındaki hücreleri etkileyip hücre replikasyonunda anahtar enzim olan dihidrofolat redüktaz'a bağlanarak pürin ve primidin yapımı için gerekli tetrahidrofolat sentezini inhibe eder (41). Folik aside bağlı enzimler tek karbonlu bileşiklerin transferini içeren reaksiyonlarda gereklidir. Bunlar arasında en önemlisi DNA sentezi için deoksiüridilat'ın metilasyonu ile timidilat elde edilmesidir. Bu sırada metilen tetrahidrofolat, dihidrofolat'a dönüşür. Dihidrofolat'ın tekrar kullanılabilmesi için tetrahidrofolat'a dönüşmesi gereklidir. Bu dönüşüm için Dihidrofolat redüktaz enzimine ve NADPH'ya ihtiyaç vardır (9, 42). Metotreksat, dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek DNA, RNA ve ATP sentezi için gerekli olan tetrahidrofolat sentezini durdurur, sonuçta timidilat, pürin nükleotidleri ve aminoasitlerin sentezinde azalmaya neden olurlar. Böylece nükleik asid ve protein sentezini önlerler (43). Metotreksatın sitotoksik etkisini gösterebilmesi için folil poliglutamata sentaz enzimi tarafından poliglutamasyona uğratılması gerekmektedir. Poliglutamasyon vücutta hem normal dokular hemde malign dokularda yapılır. İşte bu poliglutamaların hücre içinde birikmesi folat metabolizmasını etkileyen enzimler üzerinde inhibitor etki gösterir (41). MTX poliglutamaları, özellikle hücre içinde birikip dihidrofolat redüktaz enzimine bağlanır ve dihidrofolat ile yer değiştirerek etki eder (44). Takiben DNA ve RNA sentezi inhibe olur tetrahidrofolat'ın azalması homosisteinin uzaklaştırılmasında azalmaya buda homosistein ile adenzin düzeylerinde artmaya sebep olurken, SAM (S Adenzil Metyonin) miktarında azalmaya neden olur. İlaveten doğrudan metionin sentetazı ve metionin transportunu inhibe edebilir (45).

1.2.1.2. Metotreksatın Antiproliferatif Etkisi

MTX, yüksek dozlarda kanser tedavisinde antiproliferatif olarak kullanılır (46, 47). Romatoid Artrit'de (RA) düşük doz MTX'in endotel hücre proliferasyonunu doğrudan inhibe ettiğini savunanlar yanında lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiği görüşüne karşı çıkan araştırmacılar da vardır (46, 48).

1.2.1.3. Metotreksatın immünomodülatör Etkisi

RA'nın patogeneğinde immün mekanizmalar önemli rol oynarlar. MTX, B ve T hücrelerindeki aktivite artışını baskılamış olup RA patogeneğinde rolü olduğu düşünülen poliaminlerin, sentezini inhibe etmiştir. Poliaminlerin hücre proliferasyonu, farklılaşması ve immün yanıtta önemli görevleri vardır (49, 50).

1.2.1.4. MTX in Antiinflamatuvar Etkisi

Metotreksat, RA'da ve psöriatik artrit tedavisinde antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. MTX tedavisi ile TNF- α (Tümör Nekrotizan Faktör- α), interlökin 1 β gibi sitokinler ve metalloproteinazlar gibi inflamasyon mediatörleri azaltılmıştır (51). MTX'in homosisteinin yeniden metilasyonunun inhibisyonu ve adozin salınmasını artırması gibi iki biyokimyasal mekanizma ile antiinflamatuvar etkinlik gösterebileceği öne sürülmüştür (41). Baggott ve ark. MTX tedavisi ile adozin deaminaz inhibisyonu geliştiğini destekleyen veriler elde etmişlerdir (52).

MTX'in, in vitro çalışmalarda fibroblast ve endotel hücrelerinde adozin salınımına yol açtığı gösterilmiştir (53). Adozinin antiinflamatuvar etkisi nötrofil adezyonunu ve serbest oksijen radikallerinin üretimini baskılaması şeklinde olmaktadır (54). Metotreksat antiinflamatuvar etkiye sahip olup proinflamatuvar sitokinler olan IL-1, 2, 6 (İnterlökin-1, 2, 6) ve interferon γ 'nın gen ekspresyonunu azaltır, Siklooksijenaz-2 sentezini ve nötrofil kemotaksisinide inhibe eder (4).

1.2.2. Farmakokinetik Özellikleri

1.2.2.1. Absorpsiyon

MTX'in oral absorpsiyonu uygulanan doza bağlıdır. Önceki çalışmalar düşük dozda MTX'in oral absorpsiyonunun %70 civarında olduğunu göstermiştir (55). Ancak son zamanlarda düşük doz uygulamada biyoyararlanımının %50'den daha az olduğu göstermiştir (56). Besinler MTX'in absorpsiyonunu etkilemezler. Yüksek doz oral uygulamaları takiben gastrointestinal kanaldaki taşıyıcıların doyurulması nedeniyle absorpsiyon azalmaktadır. İntramüsküler olarak uygulamalarda ise absorpsiyon tamdır (57).

1.2.2.2. Dağılım

MTX hücre membranlarından aktif transport ile taşınır. Serum konsantrasyonu 0,1 µmol/ml'yi aştığında hücreler arası geçişte pasif difüzyon rol oynar. MTX'in dokulara dağılımı iyidir ve özellikle böbrek, safra kesesi, dalak, karaciğer ve deride yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Deney hayvanlarına oral ve i.v. yoldan uygulandığında inflamasyonlu eklemlere dağılımı, inflamasyon olmayanlardan daha fazladır. MTX plasentayı da geçebilmektedir (57).

1.2.2.3. Metabolizma

MTX absorbe edildikten sonra, karaciğer hücre içinde tekrar serbest MTX'e dönüşen poliglutamat formuna dönüştürülür. Etkin formu olan MTX-poliglutamat dokularda uzun süre kalmaktadır. MTX karaciğerde aldehid oksidaz enzimi aracılığı ile %10-15 oranında 7-hidroksi metabolitine dönüştürülmektedir (57).

1.2.2.4. Eliminasyon

Romatoid artrit ve psoriasis olan veya düşük dozda kemoterapi alan hastalarda (30 mg/m² ve daha az dozda) MTX'in yarılanma ömrünün 3-10 saat arasındadır. Yüksek dozlarda uygulandığında ise eliminasyon yarılanma ömrü 8-15 saat olarak rapor edilmiştir. (57). MTX temel olarak böbreklerden glomerüler filtrasyon ve aktif tübüler sekresyon aracılığı ile atılmakta ve eliminasyonu doza ve uygulama yoluna bağlı olarak değişmektedir. İnsanda i.v. bolus uygulama sonrasında uygulanan dozun %80-90'ı 24 saat içinde değişmeden idrar ile atılmaktadır. %10 veya daha az oranda ise safra ile atıldığı gösterilmiştir. MTX klirensi oldukça değişkenlik göstermekte olup yüksek dozlarda klirens azalmaktadır. MTX'in klirensinin azalması toksisitesinden sorumlu temel faktörlerden biri olarak gösterilmiştir (57). Ortalama yarı ömrü 8-10 saattir (4).

1.2.3. Tedavide kullanımı

Folik asit antagonisti bir antimetabolit olup lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri gibi birçok kanser yanında psoriasis, dermatomyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (58). Ayrıca otoimmün hastalıklar dışında transplantasyon sonrası graft versus host hastalığının önlenmesinde kullanılır. Hücre bölünmesini inhibe etmesi nedeni ile kanser tedavisinde uzun zamandan beri kullanılan ilacın, santral sinir sistemi hariç, oral ve intravenöz uygu-

lamalarında, doku dağılımı iyidir (59). Yüksek doz MTX uygulanması, uzun süreli intravenöz infüzyon şeklinde yapılır. Lenfoma, akut lenfoblastik lösemi, meme kanseri, osteosarkoma, baş ve boyun kanseri gibi çeşitli kanserlerin tedavi protokollerinin önemli bir parçasını teşkil etmektedir (57). MTX meningeal karsinomatozis, meningeal lösemi ve lenfomanın profilaksi ve tedavisinde intratekal olarak kullanılır (57). Lökoverin kurtarma tedavisi ile birlikte uygulanan yüksek doz MTX, osteosarkomun adjuvan tedavisinde kullanılan standart bir protokoldür (9). MTX 'ın hem tedavideki etkinliği hemde toksik etkileri hastadan hastaya değişkenlik gösterebilir (2). Bu yüzden diğer antineoplastik ilaçlardan farklı olarak MTX geniş bir doz aralığında kullanılmaktadır. Akut lenfoblastik lösemi idame tedavisinde ve romatoid artrit, psöriazis gibi hastalıkların tedavisinde haftada 20 mg/m² dozda kullanılırken, onkolojik hastalıklarda 1000-33000 mg/m² gibi yüksek dozlarda uygulanmaktadır (57).

1.2.4. Yan Etkileri

Akut toksisitede; MTX enjeksiyonunu takiben 2-4 saat içinde başağrısı, 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 (60). Pürin ve pirimidin sentezini inhibe etmesi apoptozisle sonuçlanan DNA defektlerine yol açabilir (5). RA'lı hastaların karaciğer biyopsisinde, hem folat eksikliği hemde MTX poliglutamalarının birikimi gösterilmiştir (1). Astımda, MTX kullanımının bronkodilatatör kullanım ihtiyacını %22 oranında azalttığı ve semptomların şiddetini hafiflettiği (dispne, öksürük) gösterilmiştir (61).

MTX, vasküler hastalık için risk faktörü olan hiperhomosisteinemiye de sebep olmaktadır (51). MTX kullanımına bağlı lökoensefalopati gelişen hastalarda BOS'ta bir antioksidan olan SAM (S-adenozil metiyonin)'daki azalma, MTX nörotoksitesinin, metiyonin metabolizmasındaki bozukluğa bağlı olabileceğini göstermiştir (47, 62). MTX'in neden olduğu nörotoksitesite de yaygın klinik bulgular; bulantı, kusma, başağrısı, meningeal irritasyon ve tremor olup nadiren parapleji, ensefalopati, epileptik nöbetler hatta ölüm görülebilir. MTX'in çocuklarda zekâ düzeyini geriletmediği, dikkat ve hafıza problemlerine neden olduğu bir çok çalışmada gösteri-

miştir (63, 64). Folat, santral sinir sistemindeki nörotransmitterlerin metabolizma ve sentezinde kullanılmaktadır. Eksikliği metotreksat toksisitesi gelişiminde bir risk faktörü olup hastalarda tedaviye folik asit eklenmesi ile yan etkilerin azaltılabileceği düşünülmektedir (65). Ancak çoğu yan etkiler; pürin, pirimidin, poliamin ve fenil alanin metabolizması bozukluklarına bağlanmıştır (66).

1.2.4.1. Karaciğere Toksik Etkisi

MTX'in neden olduğu hepatotoksitenin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte toksisiteyi açıklayacak birkaç mekanizma öne sürülmüştür. MTX temel metaboliti olan 7-hidroksimetotreksat'a karaciğerde dönüşmekte ve karaciğer hücrelerinde poliglutamat formunda depolanmaktadır. Uzun süre MTX tedavisi, poliglutamat formunun birikimi ve folat seviyesinin azalması nedeniyle hepatotoksitenin sebebidir.

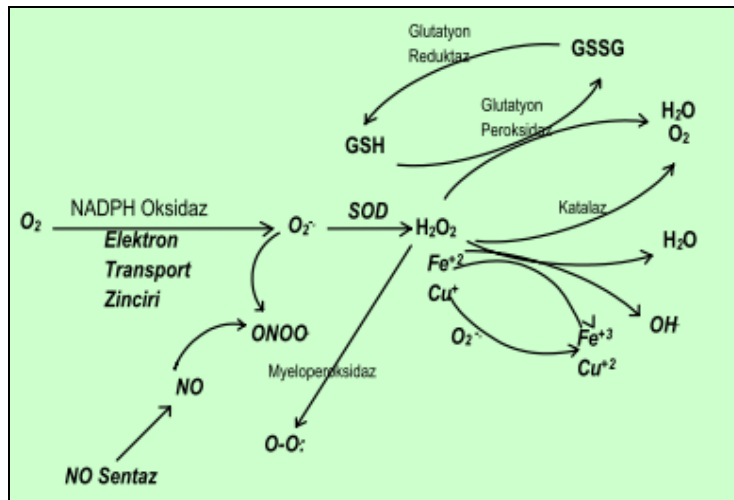
Yine MTX, sitozolik NADPDH (nikotinamid adenin fosfatdehidrojenaz) ve NADP bağımlı malik enzimi inhibe ederek hücre içi NADPH'nin azalmasına neden olmaktadır. NADPH, sitozolik antioksidan olan indirgenmiş GSH (glutatyonun)'nın devamlılığını sağlayan GSSG-R (glutatyon redüktaz) enzimi için gerekmektedir. MTX tedavisi nedeniyle GSH seviyesinin azalması, reaktif oksijen radikallerine karşı hücreleri koruyan antioksidan savunma sisteminin etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır (58). MTX kullanımına bağlı olarak azalan NADPH seviyeleri, hepatositleri reaktif oksijen radikallerine karşı koruyan redükte glutatyon seviyelerinin düşmesine, bu da hepatosit hasarına neden olmaktadır (5).

Bir çalışmada MTX verilen sıçanların kan, karaciğer, böbrek ve ince barsakta glutatyon (GSH) seviyelerinin azalmasına, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) seviyelerinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (10). Bu durum steatozis (vücutta aşırı yağ toplanması), kolestazis (safra akımının kesilmesi), fibrozis (bağ dokusu artımı) ve sonuç olarak siroz gibi karaciğer hasarı yanında böbrek hasarı, kemik iliği supresyonu, mukozit, pulmoner fibrozis gibi ciddi yan etkilerin de sebebi olabilmektedir (58). Kronik MTX kullanımında karaciğerde histolojik olarak, yağ infiltrasyonu, inflamasyon, hücresel nekroz ve bunların sonucunda da fibrozis gelişebileceği gibi klinik ve biyokimyasal bulgular yıllarca görülmeyebilir. Karaciğer toksisitesi en iyi biyopsisi ile gösterilir ki bulgular, genellikle MTX'ın 10 yıl

gibi uzun süre kullanımı ya da MTX dozunun 1,5- 2,5 gramı geçmesi halinde görülebilmektedir (5). Tüm bu nedenlerden dolayı MTX toksisitesinden korunmak için antioksidan ajanların kullanılması gerekliliği öne sürülmüştür (67).

1.3. Serbest Radikaller Ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşan reaktif atom veya moleküllerdir. Çeşitli metabolik reaksiyonlar esnasında süperoksit anyonu, nitrik oksit, peroksil radikali ve hidroksil radikali gibi çok sayıda serbest radikaller oluşmaktadır (68, 69). Serbest radikaller; pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler (70). Moleküler oksijen, insan vücudunda bütün hücrelere kolayca girebilen ve en çok kullanılan bir molekül olup serbest radikal denilince akla SOR (Serbest Oksijen Radikalleri) gelmektedir (71). Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan SOR ile antioksidan koruyucu sistemi bir denge halindedir. Antioksidan savunma mekanizmaları ile serbest radikal arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizmanın maruz kaldığı “oksidatif stres” sonucu hücresel mekanizmalar bozulur (72). Eşleşmemiş elektronlar; bitişindeki lipidler, proteinler ve karbonhidratlar gibi moleküllere karşı çok reaktif olup onlarla hemen reaksiyona girebilirler. Böylece moleküler yıkım olur ve doku hasarı meydana gelir (73).



Şekil 6. Serbest radikallerin oluşum ve enzimatik detoksifikasyonu (74).

Hücrelerin çoğu, koruyucu mekanizma olarak da serbest radikalleri ortaya çıkarabilir. Karaciğer detoksifikasyon için serbest radikalleri kullanırken, nötrofiller

patojenleri yok etmek için serbest radikalleri üretebilir. Nötrofillerin aktive olması ile ortaya çıkan NADPH oksidaz, SOD, nitrik oksit sentaz ve Myeloperoksidaz gibi enzimler; süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroklorik asit gibi reaktif ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar. Dokuda artan radikaller membranlarda hasara dolayısıyla geçirgenlik artışı ve hücre ölümüne neden olurlar (71). Beyin yüksek oranda oksijen tüketir bundan dolayıdır ki oksidatif hasara oldukça hassastır. Mitokondrial elektron taşıma sisteminde norepinefrin, dopamin gibi bazı nörotransmitterler otooksidasyona uğrayabilir. Hipoksi ya da iskemi gibi bir durumda oksidan etki ve doku hasarı meydana gelebilir (72).

Tablo 1. Oksijen kaynaklı reaktif bileşikler (68)

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit, ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit, (H_2O_2)
Hidroksil, (OH^{\cdot})	Hipokloröz asit, ($HOCl$)
Peroksil, (ROO^{\cdot})	Singlet oksijen, ($^1O_2^{\cdot}$)
Alkoksil, (RO^{\cdot})	Ozon, (O_3)
Nitrik oksit, (NO^{\cdot})	Peroksinitrit, ($ONOO^-$)
Azot dioksit, (NO^{\cdot}_2)	Lipid hidroperoksit, ($LOOH$)

1.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri (SOR), hidroksil, süper oksit, nitrik oksit ve lipid peroksid radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (75). SOR içinde en önemlileri süper oksit radikali, hidroperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, singlet oksijendir. Aslında H_2O_2 ve 1O_2 serbest radikal değildirler ancak serbest radikal özelliği gösterebilirler. Biyolojik açıdan diğer önemli serbest radikaller veya onların benzerleri ise lipid hidroperoksid, lipid peroksid radikali, lipid alkoksi radikali, nitrik oksit ve nitrojen dioksit, peroksinitrit, diazot trioksit ve hidrojen nitrit gibi radikallerdir (75).

1.3.1.1. Süper oksit radikali

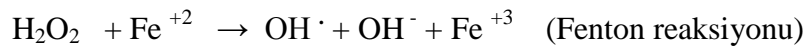
İnsan vücudundaki pek çok molekül (örneğin mitokondriyal elektron transport sistemi elemanlarının bir kısmı) oksijenle direkt olarak reaksiyona girerek süperoksit oluşturabilir. Süperoksit radikali bu şekilde fizyolojik olarak oluştuğu gibi yabancı mikroorganizmaları öldürmek üzere aktif fagositler tarafından koruyucu amaçla da üretilebilir. (73)

1.3.1.2. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit normal olarak her aerobik hücrede bulunur ve hücre solunumu sırasındaki çeşitli metabolik işlemler ve oksidatif stres sonucunda üretilir (73). Bu molekülün kendisi reaktif değildir. Fakat diğer molekülleri okside etme yeteneği vardır. Hidrojen peroksit (H₂O₂), oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik/nonenzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki ferril demir (Fe IV) ve perferril demir (Fe V) oluşumuna neden olur. Bu formdaki reaktif demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler. Ultraviyole ışınları ile kolaylıkla parçalanabilmektedir. Enzimatik olarak Katalaz ve glutatyon peroksidaz ile non-enzimatik olarak da piruvat, fenton reaksiyonunu etkileyerek hidrojen peroksit zararsız hale getirilir (76).

1.3.1.3. Hidroksil Radikali

Yüksek reaktivite yeteneği olmasından dolayı hemen hemen tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilir. Çok kısa ömürlü olmasından dolayı reaksiyona girmeden önce hücreye diffüzyonu güçtür. Ancak bu radikalın çok küçük miktarları bile dokularda aşırı hasar yapabilmektedir (77). Biyolojik sistemlerde üretilen en güçlü reaktiviteye sahip radikal olup Fenton Reaksiyonu ile üretilmektedir (78).



Hidroksil radikali ayrıca hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda da meydana gelebilir.



1.3.1.4. Hipokloröz Asit

Nötrofillerdeki primer granüllerde bol bulunan myeloperoksidaz (MPO) enzimi ile hidrojen peroksit ve klor iyonlarından hipokloröz asit sentezlenir (80).

1.3.1.5. Singlet Oksijen

Oksijenin yüksek enerjili ve mutajenik formudur. Singlet oksijen (1O_2), serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır. Singlet oksijen, oksijenin elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünden ters yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi ile oluşabilir (81). Bu molekül gerçekte bir serbest radikal olmamasına rağmen serbest radikal reaksiyonları esnasında üretilmesinden dolayı serbest oksijen radikalleriyle birlikte değerlendirilir. (77).

1.3.1.6. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO) birçok biyolojik olayda görev alan çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. NO'in arjininden sentezi Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi ile gerçekleşir. Bu reaksiyonda O_2 ve NADPH'a ihtiyaç vardır. Flavin mononükleotid (FMN), Flavin Adenin Dinükleotid (FAD) ve Tetrahidrobiopterin bu enzimin koenzimleri olup, reaksiyon sonucunda L-sitrülin ve NO açığa çıkar (82, 83). Nitrik Oksit Sentaz enziminin üç izoformu tanımlanmıştır; nöronal NOS (Tip I NOS, nNOS), indüklenebilir NOS (Tip II NOS, iNOS) ve endotelial NOS (Tip III, eNOS) Endotelial NOS ve nöronal NOS, yapısal NOS olarak da bilinir ve bunların aktiviteleri hücre içi kalsiyumu tarafından düzenlenir (82). NO bir dizi nitrojen oksitlere dönüşebilir. (84).

1.3.1.7. Karbon Merkezli Radikaller

Okside edici bir serbest radikalın biyolojik bir molekülü etkilemesi sonucunda karbon merkezli radikaller oluşmaktadır (77). Karbon merkezli radikal, moleküler bir düzenleme ile izole çift bağ formundan, konjuge dien formuna geçer (85). Bu radikaller ilgili peroksil radikallerini oluşturmak üzere oksijen molekülü ile çok hızlı bir şekilde birleşirler. Ayrıca peroksil radikalleri, alkoksil radikallerini oluşturan reaksiyonlara da katılabilmektedir (86).

Tablo 2. Serbest radikal kaynakları (87, 89).

Endojen kaynaklar

Mitokondriyal elektron transport zinciri

Oksidan enzimler: ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, galaktoz oksidaz, siklooksijenaz,

Lipooksijenaz, monoamin oksidaz

Nötrofil, makrofaj, monosit, endotelyal hücreler

Otooksidasyon reaksiyonları

Ekzojen kaynaklar

İyonize Radyasyon

Hava Kirliliği

Sigara

Güneş Işığı

Isı Şoku

İlaçlar

1.3.2. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

1.3.2.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Hücrelerin membranlarında bulunan poliansatüre yağ asitleri, okside edici serbest radikallerden kolaylıkla etkilenebilirler. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif hasarı, lipid peroksidasyonudur (90). Lipid peroksidasyonu tepkimeleri metal katalizörler eşliğinde, serbest radikallerin; doymamış yağ asiti zincirinin alfa-metilen gruplarından bir hidrojen uzaklaştırması ile başlar. Uzaklaşan hidrojen atomu sebebiyle, karbon atomu üzerinde ortaklaşmamış bir adet elektron kalır, bu da yağ asidi zinciri üzerinde radikal oluşmasına neden olur. Oluşan lipid radikali kararsız bir bileşiktir. Molekül, stabil duruma gelebilmek için, molekül içi bağlarını tekrar düzenler ve konjuge dien yapısına dönüşür. Bu konjuge dien, fizyolojik koşullarda oksijen ile birleşmeye eğilimli olduğundan okside olur ve peroksil radikalini oluşturur.

Lipid peroksil radikali, membran yapısında bulunan diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkiler ve yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açar. Lipid peroksil radikali ise açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksite dönüşür. Böylece tek bir substrat radikal diğer yağ asitlerini tetikleyerek birden fazla lipid

hidroperoksit oluşmasına neden olur. Bu tetikleme olaylar ortamda bulunan oksijen ve antioksidan miktarına bağlı olarak devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu SOR'leri hücre membranındaki doymamış yağ asitleri, fosfolipidler ve glukolipidlerin peroksidasyonuna neden olarak membran hasarı ve fonksiyon kaybına sebep olur. İnsanlarda birçok hastalığın etyopatogenezinde, bu hasar suçlanmaktadır. Lipid peroksidasyonuna neden olan SOR eksojen ya da endojen kaynaklı olabilir (91, 92). Kemoterapi, Radyoterapi, iskemi ve bazı ilaçlarla oluşan SOR'leri, lipid peroksidasyonuna neden olmakta ve bunun sonucunda aldehitler, hidrokarbon gazları ve malondialdehit (MDA) oluşmaktadır. Mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşik olan MDA; doku, kan komponentleri ve vücut sıvılarında ölçülerek lipid peroksidasyonunun derecesi değerlendirilebilir. MDA, üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin SOR ile peroksidasyonu sonucunda meydana gelir. MDA ve diğer ürünler, hücrelerde geçirgenlik ve inflamasyon artışına, araşidonik asid salınımına ve bunun sonucu olarak organellerde şişme ve membran rüptürüne neden olmaktadır. Aynı zamanda, DNA'da bazlar ile reaksiyona girerek zincir kopmalarına yol açmaktadır (91, 93).

Malondialdehit (MDA); Lipid peroksidasyonu hücresel komponentlere en çok zarar veren reaksiyonlardan biri olup reaksiyon sonucunda malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal gibi ürünler oluşur. MDA üç karbonlu bir ketoaldehitdir. Biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonunun ve serbest radikal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan en kolay ve yaygın yöntem, MDA'nın Tiobarbitürik asit ile tepkimesidir. Ancak yüksek performanslı sıvı kromatografisi, serbest MDA ölçümünde en güvenilir yöntemdir (94, 95).

1.3.2.2. Serbest Radikallerin Karbohidratlar Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine önemli etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak bazal zar kalınlaşmasına neden olur. Serbest radikaller, bu etkilerinden dolayı diyabet, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriasis, romatoid artrit, kanser gibi birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır (95).

1.3.2.3. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinlerin oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları olarak enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (95).

1.3.2.4. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açabilir. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere neden olur. Hidrojen peroksit hücre zarından kolayca geçerek hücre çekirdeğine ulaşır ve DNA hasarına hatta hücre ölümüne neden olabilir. Süperoksit anyonu, guanin gibi yüksek elektron içeren bölgelerdeki moleküllerle daha kolay tepkimeye girer (96).

Oksidatif DNA hasarı 6 alt başlıkta değerlendirilebilir.

1. DNA baz hasarı
2. DNA şeker hasarı
3. 8-5'-siklopürin-2'-deoksinüklosidler
4. DNA protein çapraz bağları
5. Abazik bölgeler
6. Tek ve çift DNA zincir kırıkları

Oksidatif hasar sonucu oluşan modifiye DNA bazları birçok kanser türünde artmaktadır. Bu durum, spontan mutasyonlara neden olup kanser etiolojisinde rol oynayabilir. İnflamasyon ve infeksiyon sonucu bakterisidal aktivitenin artmasına bağlı oluşan oksidatif patlamanın DNA hasarına neden olduğunu gösteren çalışmalar vardır (97). Sonuç olarak, oluşan serbest radikaller hedef DNA molekülünde hasara neden olurlar (75).

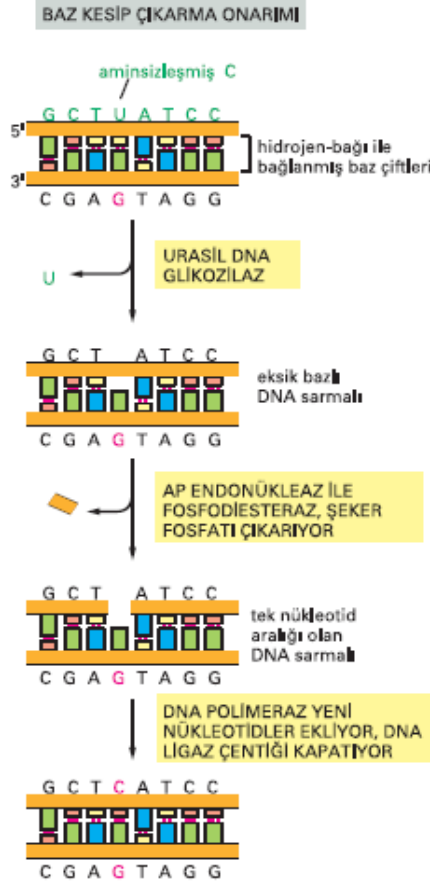
1.3.2.4.1. DNA Onarımı

DNA'daki hasar, transkripsiyon ya da replikasyonu durdurabilir ve yüksek oranda mutasyonlara neden olabilir. Bu durum hücre çoğalması açısından kabul edilemez sonuçlardır. Her Hücre genomundaki bütünlüğü korumak için, hasarlı DNA'yı onaran mekanizmalar geliştirmişlerdir. DNA onarım mekanizmaları şunlardır. (98).

1. Anında onarım
2. Baz kesip çıkarma onarımı

3. Nükleotid kesip çıkarma onarımı
4. DNA çift zincir kırığı onarımı
5. Zincirler arası çapraz bağların onarımı
6. Yanlış eşleştirme (mismatch) onarımı

Oksidatif hasar sonucu oluşan modifiye bazlar baz kesip çıkarma onarımı ile düzeltilebilir.



Şekil 7. Baz kesip çıkarma onarımı (97).

1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek yapıların oksidasyonunu önleyen veya azaltan maddelere antioksidanlar, olaya ise antioksidan savunma sistemleri denilmektedir. Antioksidan sistemler organ, yaş, cinsiyet ve çevresel faktörlerden etkilenebilir. Antioksidan sistemler hücre içi ve dışı ortamlarda farklıdır (99). Normal şartlarda SOR üretimi ve yıkımı arasında bir denge vardır. Organizmada oluşan oksijen radikalleri ile koruyucu antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin radikaller lehine bozulması oksidatif stres olarak

tanımlanır. Antioksidan sistemler, enzimatik ve nonenzimatik olarak ikiye ayrılır (70).

1.4.1. Enzimatik Antioksidanlar

1.4.1.1. Süperoksit Dismutaz

SOD aerobik hücrelerde oksidatif strese karşı temel savunma sistemi olarak bilinen bir metalloenzimdir. SOD, süperoksit anyonunun, enzimatik dismutasyonunu gerçekleştirerek süperoksit anyonunu, hidrojen peroksite dönüştürür. Yani SOD oksijen toksisitesinden koruyucu sistemin en önemli ve ilk basamağında rol alır. Oluşan H_2O_2 , Katalaz ve GSH-Px (Glutasyon Peroksidaz) tarafından oksijen ve suya parçalanır (93).

1.4.1.2. Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin bir enzimi olan sitokrom oksidaz süperoksiti detoksif eder (100).

1.4.1.3. Katalaz

Yapısında demir içeren bir tetramer olup, H_2O_2 'i doğrudan parçalayarak etki eder (100).

1.4.1.4. Glutasyon Peroksidaz

Bu enzim; GSH-Px, SOD, O_2 'i yok ederken ortaya çıkan H_2O_2 ve lipid hidroperoksitlerinin redükte glutasyon (GSH) varlığında redüklenmesi reaksiyonunu katalizler. GSH-Px, başta karaciğer olmak üzere eritrositler, kalp, akciğer, böbrek, göz ve beyin gibi dokularda bulunmaktadır (101). Redükte glutasyonu yükseltirken H_2O_2 'yi de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidatif strese karşı korur. Glutasyon peroksidaz yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir (74, 102).

1.4.1.5. Glutasyon Redüktaz (GSH-R)

Okside glutasyonu (GSSG) redükte hale çevirir. Glutasyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra GSH'ın iki sisteini arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer ederek okside glutasyona aktarmış olur (74, 102).

1.4.1.6. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)

Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz, pentoz fosfat yolunun hız kısıtlayıcı enzimi olup intrasellüler NADPH'ın da başlıca kaynağıdır. Üretilen NADPH serbest radikal-

lerin detoksifikasyonunda görev alan GSH-Px enziminin aktivitesi için gerekli olan indirgenmiş GSH'yı oluşturur (103).

G6PD, vasküler endotelial hücreler ve düz kas hücrelerinde serbest radikallerle karşı koruyucu olup vasküler endotelial hücrelerde NADPH'ı kofaktör olarak kullanan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin aktivitesi için de gereklidir. Eksikliğinde eNOS yeterli aktivite göstermez ve süperoksit radikali üretmeye başlar. Böylece LDL (Düşük Dansiteli Lipoprotein) oksidasyonu tetiklenebilir (104).

1.4.1.7. Paraoksonaz

Paraoksonaz bir organofosfat olan paration'un vücuttaki aktif metaboliti olan paraoksonun hidrolize edilmesiyle oluşur ki aktivite ve stabilitesi için Ca^{+2} iyonu gereklidir (105).

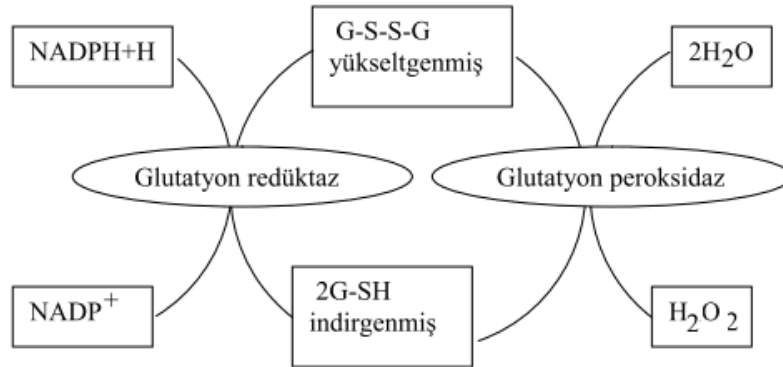
1.4.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

1.4.2.1. S-adenozil metionin

Hücrenin büyüme ve farklılaşmasında önemli rolü olan SAM'ın in vivo antioksidan aktivitesi, glutatyon prekürsörü olmasından kaynaklanmaktadır (106).

1.4.2.2. Glutatyon

Oksidatif stresin ölçümünde kullanılır. (107). Karaciğerde sistein, glisin ve glutamattan sentezlenmektedir. Peroksitlerle ve serbest radikallerle reaksiyona girerek onları zararsız ürünlere çevirir (108).



Şekil 8. Glutatyonun oksidasyon-redüksiyon siklusu (109)

1.4.2.3. C vitamini

Hidroksil ve süperoksit radikallerini direkt olarak temizleme yeteneği vardır (110).

1.4.2.4. E Vitamini

Hücre membranlarında lipid peroksit zincirini kırarak lipid peroksidasyonunu durdurur (110).

1.4.2.5. Karoten

Vitamin A'nın prekürsörüdür. Hücre membranlarında bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir (111).

1.4.2.6. Koenzim Q10'un Antioksidan Fonksiyonu

Hücre ve organellerin membranlarında CoQ10'un özellikle indirgenmiş formu (ubikinol) bulunur. Ubikinol antioksidan özelliği ile lipid peroksidasyonunu engeller. Ubikinol, lipid peroksil radikallerinin oluşumunu engeller (112, 113).

1.4.2.7. Seruloplazmin

Demiri +2 değerlikli halden +3 değerlikli hale yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu inhibe eder. Böylece serbest radikal oluşumunu engeller (114).

1.4.2.8. Transferrin

Dolaşımda serbest halde bulunan demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir (114).

1.4.2.9. Bilirubin

Serbest radikalleri tutma yeteneği vardır. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin temizleyicisidir (114).

1.4.2.10. Ürik asit

Plazmada normal konsantrasyonlarda bulunduğu; hidroksil, peroksil ve süperoksit radikallerini temizleme yeteneği vardır. Ürik asit, pH'sı 5.75 olan zayıf bir organik asittir. Fizyolojik pH'da monosodyum ürat formundadır. İnsanlarda pürin yıkımının son ürünü olup singlet oksijen ve peroksinitriti temizler ve geçiş metalleriyle şelat oluşturur. Lipid peroksidasyonunu önler. Ayrıca, ürik asit LDL'yi Cu^{+2} aracılı oksidasyondan korur (114).

1.4.2.11. Albümin

Geçiş metallerini bağlayabilir. Lipid hidroperoksit ve hipoklorit bağlayıcısıdır (115, 116).

1.4.2.12. Glukoz

Hidroksil radikalini tutarak onun zararlı etkilerini engeller (115, 116).

1.4.2.13. Piruvat

Güçlü antioksidan olup H₂O₂ bağlar (115, 116).

1.4.2.14. Sistein

Hipoklorit ve serbest radikal temizleyici özelliği bulunmaktadır (90).

1.4.2.15. Taurin

lipid peroksidasyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek antioksidan etki gösterir. Taurin ratlarda MTX'in yol açtığı doku hasarını önlemiştir. Ksenobiotiklere bağlanma yeteneği vardır. Hipoklorit ile de reaksiyona girip etkisini azaltır (117).

1.4.2.16. Melatonin

Melatoninin güçlü antioksidan kapasitesi elektron verme özelliğine bağlıdır. Melatonin hidroksil radikallerini nötralize eder ve hidroksimelatonin oluşur. Ayrıca, melatoninin peroksil radikaller, singlet oksijen ve hidrojen peroksit ile etkileşebilir. Melatoninin metabolitleri olan 6-hidroksimelatonin, N-asetil-N-formil-5-metoksikinuramin ve N-asetil-5-metoksikinuraminin serbest radikalleri detoksifiye edebilir. Melatonin reaktif oksijen ürünleriyle direk etkileşmesi yanında glutatyon, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın aktivitelerini artırıp; nitrik oksit sentaz ve lipoksijenaz gibi prooksidan enzimlerin etkisini azaltabilir (118).

1.4.2.17. Alfa Lipoik Asit (ALA)

Mitokondrisi olmayan hücrelerde, ALA; NADPH yoluyla glutatyon ve tiyoredoksin redüktaz ile dihidrolipoik asit 'e indirgenebilir. ALA okside veya redükte olabilen iki sülfür molekülü içerir. Bu özelliği ALA'ya güçlü bir antioksidan özellikle birlikte bazı enzimler için kofaktör olma özelliği sağlar. Piruvat dehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz gibi enzimlerin kofaktörü olup piruvatın asetil-CoA'ya oksidatif dekarboksilasyonunda rol oynar. ALA reaktif oksijen ürünlerini temizler, ekzojen ve endojen antioksidanların rejenerasyonu, metal iyonları şelasyonu, membran lipid peroksidasyonun önlenmesi ve okside proteinlerin onarımını sağlar (119).

1.5. Nekroz

Hücre ölümü, nekroz ve apoptoz olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşir. Nekroz hücrenin kendi içinde gerçekleşen olaylardan ziyade dış faktörler sonucu ortaya çıkar. Nekrotik ölüm çoğunlukla bir hücre hasarı ile ortaya çıkar. Hasarlanan hücre önce su alarak şişer ve sonra parçalanır. Hücrelerin parçalanması sonucu ortaya çıkan prostoglandinler, lökotrienler, serotonin, histamin gibi vazoaaktif aminler, yakınlarındaki damar endotelini uyarır. Bu, selektin yapımını uyarır. Selektin ise plazma membranının dış yüzeyine yapışarak lökositlerin burada yavaşlaması ve yapışmasını sağlar. Daha sonra integrin ligandları aynı hücre parçalanma ürünleri ile uyarılır ve lökositler hücre hasarının olduğu bölgeye doğru çekilmeye başlarlar. Bu olayların ardından kızarıklık, ödem ve ağrı ile tanımlanan inflamatuvar reaksiyonlar başlar (120).

Nekroz, eş zamanlı gerçekleşen iki olaydan kaynaklanır

1. Hücrenin enzimatik sindirimi

- a. Hücrenin kendi enzimleri tarafından sindirimi (otoliz)
- b. Hücrenin lökositler tarafından sindirimi (heteroliz)

2. Protein denatürasyonu

1.5.1. Hücre Ölümünün Morfolojisi

1.5.1.1. Sitoplazma Değişiklikleri

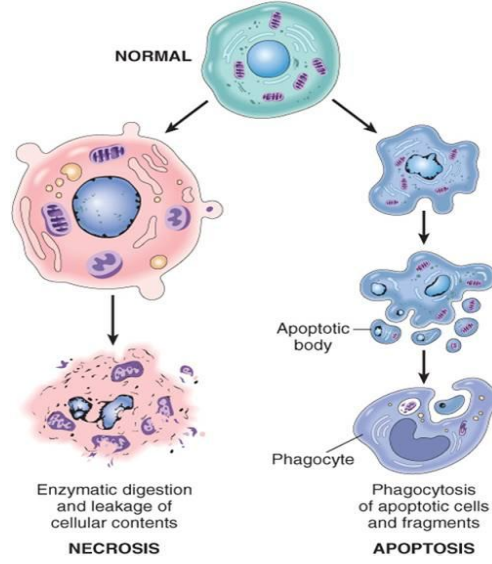
- a. Eozinofili artışı (asitlik artar) olur.
- b. Hücre içi protein yapısı bozulur.
- c. Sitoplazmik RNA miktarı (bazofili) azalır.
- d. Sitoplazmada vakuolizasyon olur.
- e. Hücre içi organel parçalanması görülür

1.5.1.2. Çekirdek değişiklikleri

- Karyoliz; Piknotik çekirdeğin parçalanmasıdır. 1-2 gün içinde çekirdek tamamen kaybolur. DNAaz aktivitesi artar. Çekirdek bazofilisi azalır.
- Piknoz; Çekirdeğin büzülmesi ya da DNA'nın parçalanmasıyla oluşan DNA fragmentlerinin diffüzyonla çekirdek dışına çıkmasıyla gerçekleşen bir nevi çekirdek değişimidir. Kromatin yoğunlaşması da belirgin olarak görülür.
- Karyoreksis; Piknotik çekirdeğin parçalanmasıdır (121)

Tablo 3. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar

	NEKROZ	APOPTOZİS
NEDEN	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Litik viral enfeksiyon, Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları, Şiddetli oksidatif stres.	Büyüme faktörü eksikliği, Hücre yaşlanması, HIV, Kanser ilaçları, Radyasyon, Yüksek doz glukokortikoid, Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin Aktivasyonu, Sitotoksik T lenfositler, Çok şiddetli olmayan oksidatif stres.
MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı, Kromatin“ <i>flocculation</i> ”u, Hücre şişmesi, Organellerin parçalanması, Endoplazmik retikulumun Dilatasyonu, Büyük vakuollerin oluşumu, Hücre lizisi	Hem fizyolojik hemde patolojik şartlarda görülür, Hücre büzüşür, Membranlarda tomurcuklanmalar görülür, Kromatin nükleer membranın altında yoğunlaşır, Apoptotik hücre membranla kaplı, içerisinde nükleus ve organelleri içeren apoptotik cisimciklere parçalanır.
BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER	ATP gerekmez, +4 derecede gerçekleşir, DNA rastgele parçalanır, Hücreler gruplar halinde ölür, Patolojik etkiler sonucu oluşur, İnflamasyona neden olur.	ATP gerekir +4 derecede gerçekleşmez, DNA 180-200 baz çifti veya katları olacak şekilde kırılır ve bu DNA parçaları agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü verir, Fosfatidilserin translokasyonu vardır, Apoptotik cisimcikler makrofajlarca fagosit edilir, Hücreler tek veya birkaçı bir arada ölür, Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir, İnflamasyon görülmez.



Şekil 9. Apoptozis ve nekroz (122)

1.6. Apoptozis

Hücrenin intiharı olarak da bilinen apoptozis, organizmada; biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen, programlı, biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin meydana geldiği bir hücre ölümüdür. Bu fenomen, Kerr tarafından “**büzüşme nekrozu**” olarak tanımlandı ancak 1972’de Andrew Wyllie ve Alistair R. Currie, bu süreci nekrozdan ayırt etmek için “apoptozis” terimini kullandılar (123). Apoptozis, nekrozdan tamamen farklıdır. Nekrozda hücre membran bütünlüğü bozulur, hücre şişer ve lizise uğrar. Yine nekroz bir grup hücre veya dokuda bir bölgeyi tutarken, Apoptozis tek bir hücreyi tutar. Apoptozis ile hücre, genetik bir program dahilinde ölüm sürecine girer ve bu olay, DNA’nın parçalanması ile sağlanır (124, 125). Oksidatif stres, hücre içi elektron dengesi bozulduğunda ortaya çıkar. Mitokondriyal işlev bozulması sonucu enerji kaynağının yok olması neticesinde apoptozis meydana gelir. Hasarlanma, antioksidan savunma düzeneklerinin yetersiz kaldığı durumlarda gerçekleşir (126). Serbest radikal olan peroksinitrit, nitrik oksit ve süperoksitin etkileşiminin bazı hücre serilerinde apoptozu indüklediği görülmüştür (127, 128).

Apoptozis birkaç aşamada gerçekleşir

1. İçeriden ya da dışarıdan gelen bir faktörle apoptozis başlatılır. DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları meydana gelir (125).

2. Hücre içerisindeki proteazlar aktive olur. Hücre içinden ve dışından gelen sinyaller hücre içindeki kaspaz adı verilen proteazları aktive etmektedir. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığıyla, iç sinyaller ise mitokondri aracılığıyla kaspazları aktive eder. Sinyaller mitokondri dışı zarında geçirgenliği artırır. Mitokondri dışı zarının geçirgenliği bazı proteinler ile sağlanmaktadır. Bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir. Bu proteinlerin bir kısmı pro-apoptotik iken diğer kısmı anti-apoptotiktir. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salınmasını baskırlar (129).

3. Hücre büzüşür, mikrovillus ve bağlantı bölgelerini kaybederek komşu hücrelerden ayrılır. Bu görünüm muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Hücre birkaç dakika içinde yaklaşık 1/3 lük hacmini kaybeder (130).

4. Nükleer kromatin yoğunlaşarak nükleer membran altında toplanır. Endonükleazlar DNA'yı parçalar. Bu sırada organeller sağlamdır. Endoplazmik retikulumda dilatasyon, mitokondride şişme olur.

5. Plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş DNA parçaları ve organellerden oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır (131).

6. Hücre yüzeyi moleküllerinin değişmesinden dolayı bu apoptotik yapılar komşu hücreler ya da fagositer hücrelerce kolaylıkla tanınarak inflamasyona yol açmadan ortadan kaldırılır (132).

Histolojik olarak, apoptotik cisimler, bazofilik nükleer materyali olan veya olmayan yuvarlak, oval sitoplazmik kitleler halinde görünürler. Kromatin kümeleri intrastrüktürel olarak hilal şeklinde görülür (133). Apoptotik cisimler, dokuda dağınık kümeler halindedir ve fagosite edildiklerinde makrofajlardan inflamatuvar mediatör salgılamaz (134). Rezidüel hücrelerin, boşlukları doldurmasından dolayı, dokunun büzüşmesi normal yapının çok az bozulması ile sonuçlanır. Bu sebeple

atrofinin tamamlanması sürecinde olarak tamamen normal görünümündedir (135).

1.6.1. Apoptozisin İnhibisyonu ile İlişkili Hastalıklar

1. Kanserler: Foliküler lenfoma P53 mutasyonları ile oluşan karsinomlar, Hormon bağımlı tümörler, Akciğer kanseri, Prostat kanseri, Over kanseri

2. Otoimmün bozukluklar: Sistemik lupus eritamatozus, İmmün ilişkili glomerulonefritler, Otoimmün diabet, Greft rejeksiyonu

3. Viral infeksiyonlar: Herpes virüs, Poliovirus, Adenovirus

1.6.2. Apoptozisin Aktivasyonu İle İlişkili Hastalıklar

1. AIDS

2. Nörodejeneratif hastalıklar: Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz, Retinitis pigmentosa, Serebellar dejenerasyon

3. Miyelodisplastik sendromlar: Aplastik anemi

4. İskemik hasarlar: Myokard infarktüsü, İnme, Reperfüzyon hasarı (136)

1.6.3. Apoptozisin Regülasyonu

1.6.3.1. p53 gen aracılı apoptozis

Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır.

Genotoksik hasar (kemoterapi, radyasyon, kimyasallar vb.), eritropoietin gibi sitokinlerin olmaması durumunda süreç çeşitli uyarılarla veya DNA'nın tek yada çift iplik parçacıkları, nükleozitlerin azalması veya DNA'ya bağlı transkripsiyon faktör p53 gibi faktörlerde apoptozisi başlatabilir (137). Ölüm sinyali, gen ekspresyonu ile kontrol edilir. p53 apoptozu uyarıcı bir proteindir. Birçok anti-tümör ilaç, hedef olarak hücre DNA'sını seçer ve p53 seviyesini artırır. Bu aktivasyon ya hasarın tamirine ya da apoptoza yol açar (138). P53 normalde inaktiftir. Ancak DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21'i harekete geçirir. Bu da hücrenin geç G1 fazında kalıp S fazına geçişini engelleyerek hücre döngüsünün durmasına neden olur. Hücre DNA'sını tamir edebilirse blokaj kalkar, edemezse p53 geni tekrar harekete geçip Bcl-2 gen ailesi üyelerinden proapoptotik olarak bilinen bax proteinini aktive eder ve hücreyi apoptoze götürerek DNA' sını hasarlı hücreyi ortadan kaldırır (139, 140).

1.6.3.2. Bcl-2/Bax

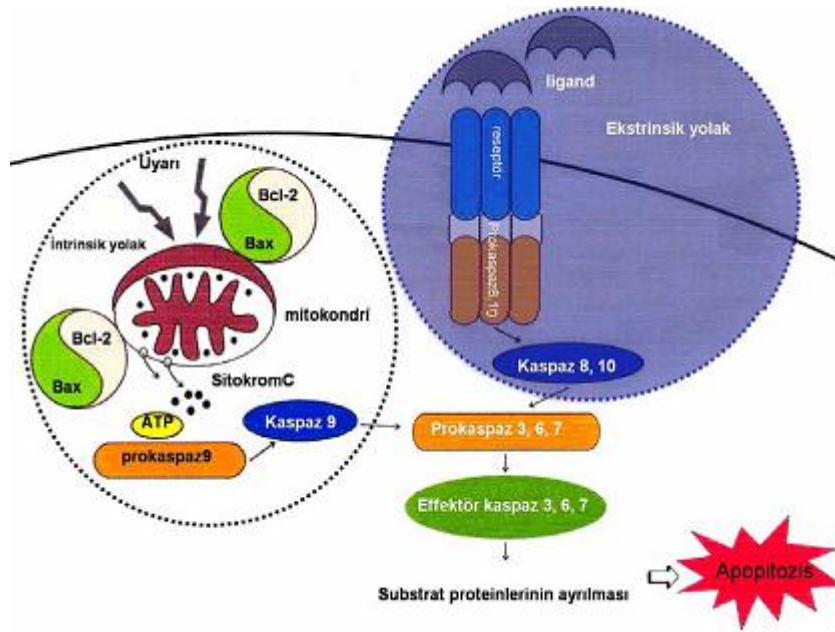
Bcl-2/Bax gen ailesi apoptozisin düzenlenmesinden sorumludur. Hücrenin yaşaması için bunlar denge halindedir. Bcl-2 anti-apoptotik bir protein olup, aşırı

salınımı, sitokrom c salınmasını ve kaspaz 3'ün aktive olmasını inhibe eder (141). Eğer Bax/Bcl-2 oranı artarsa, sitokrom c mitokondriden salınıp bir seri olaylarla kaspaz 3'ü aktive eder (142). Bax/Bcl-2 gen ailesinin ürünleri, ayrıca mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarında da bulunur (143). Bcl-2, 24-26 kD'luk protein kodlayan bir proto-onkogendir ve ürettiği protein, mitokondri- nin dış zarı üzerinde yerleşmiştir (144). Bu protein, iyon alışverişini düzenler ve zarın parçalanmasını engeller. Özellikle antiapoptotik olan Bcl-xL'nin, mitokondriyal hasarı engelleyerek apoptozisi inhibe etmektedir. Bax ise sitozolde bulunur ve apoptotik uyarılar sonucu mitokondri membranına bağlanıp "pore" oluşmasını sağlar (141). Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF, çekirdeğe doğru giderken, sitoplazmadaki sitokrom c ise bir sitoplazma proteini olan Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1)'in aktive eder. (137). Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive ederek "apoptosom" denilen kompleksi oluşturur (145). Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonuna neden olur. Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır (137). Bu durumda apoptozis enerji gerektiren bir mekanizma ile başlatılmış olur (141).

1.6.3.3. Kaspazlar

Kaspazlar, sitoplazmada zimojen (inaktif prekürsör) olarak bulunan ve aktif merkezlerindeki sisteinden dolayı sistein proteazlar olarak isimlendirilen bir enzim grubu olup bunlar aspartik asitten sonraki peptid bağına kırarlar. Şimdiye kadar 14 tanesi tanımlanmış olup çoğu apoptozisde rol oynamaktadır (146, 147). Kaspazlar, DNA endonükleazını bağlayan proteini yıkarak DNA kırıklarına sebep olurlar. Membran iç yüzünde bulunan fosfotidilserini, membranın dış yüzeyine geçirir, intrasellüler adhezyon molekülleri (ICAM) ve trombospondini açığa çıkarırlar (129). Kaspazların çoğu sitoplazmada bulunurlar. Bazı üyeleri, örneğin kaspaz 12, golgi aparatında, kaspaz 2, kaspaz 3 ve kaspaz 9 mitokondride bulunabilir (148). En önemli başlatıcı kaspazlar, tip I apoptozis (mitokondri aracılı, intrinsik) için kaspaz 8, tip II apoptozis (ekstrinsik) için kaspaz 9, tip III apoptozis (endoplazmik retikulum aracılı) için kaspaz 12'dir. Kaspaz 3 aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde geri dönüşümsüz olayların en önemli göstergesi olmaktadır (149).

Hücrede inaktif olarak bulunan kaspazlar, birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir olaylar dizisine neden olurlar. Kaspaz 2, 8, 9, 10 *başlatıcı kaspazlar*, Kaspaz 3, 6, 7 ise *efektör kaspazlar* olarak bilinir (150). Proteolitik enzimler olan kaspaz 3, 6 ve 7 aktive olduklarında kinazlar, sitoskeletal proteinler ve transkripsiyonel regülatörle gibi çeşitli proteinleri parçalarlar. CAD (Caspase activated deoxyribonuclease) ve PARP (poly ADP-ribose polymerase) apoptozu gösteren DNA parçalanmasına katkıda bulunan iki aktive kaspaz olup CAD sitozolden çekirdeğe geçerek DNA'yı parçalar (151).



Şekil 10. Apoptotik süreç ve bu süreçte yer alan proteinler (152)

Ölüm sinyallerini alan efektör kaspazlar hücre iskelet proteinini olan aktin, nukleer membran proteinini laminin A, DNA tamirinde rolü olan poli adenzin difosfat riboz polimeraz gibi proteinleri parçalayarak apoptotik hücre yapısını oluştururlar. Kaspazlar indirekt olarak Ca^{+2} bağımlı endonukleazları aktive ederek DNA'da 180–200 ve katları olacak şekilde baz çifti ayrılmalarına (fragmentasyon) neden olurlar. İnflamatuvar kaspazlar ise (kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) lenfokin üretiminden sorumludur (153, 154).

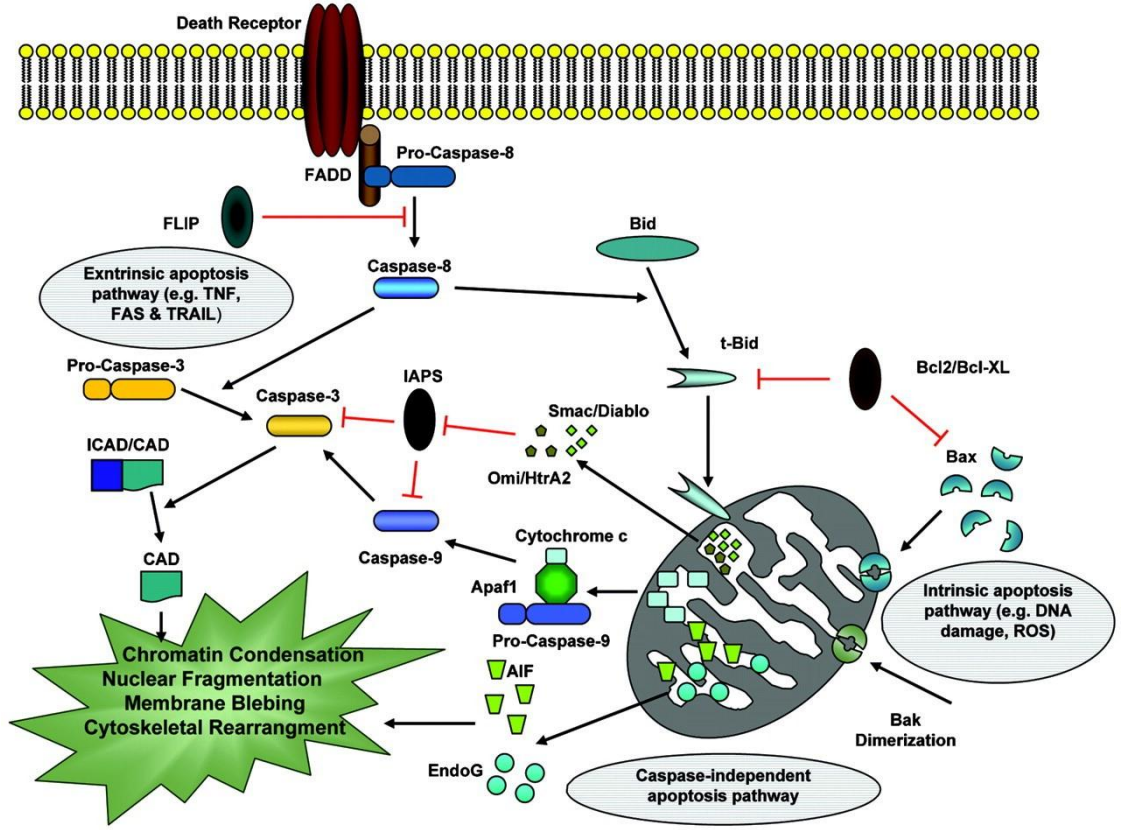
1.6.3.4. Apoptozisin Sitotoksik Regülasyonu

1.6.3.4.1. Granzim veya Perforin Sistemi

Patojenle infekte olmuş hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında rol alırlar. Granzim ve Perforinler, sitotoksik T lenfositler ve Naturel Killer, hücrelerinin stoplazmik salgı granüllerinde bulunurlar (137). Sitotoksik T lenfosit reseptörü hedef hücreye bağlandığında, perforinler salgılanır ve bunlar hedef hücre üzerinde dairesel bir por meydana getirirler. Bu perforin poru, hücre içi kalsiyumda hızlı bir artışa neden olur. Granzim B, reseptör aracılığı ile vezikül içinde açılan delikten hedef hücreye girer. Bu andan itibaren granzim B, DNA parçalanmasını ve apoptozis ile birlikte prokaspaz aktivasyonunu başlatır. Granzim A ise perforinle sinerjik etki yapar ve kaspaz bağımsız yolda apoptozisde görev alır (137).

1.6.3.4.2 Fas-Fas Ligandı veya CD95 Yolu

Apoptozisin salgıdan bağımsız mekanizması; hipoksi, hipertermi, radyasyon ve kemoterapi gibi DNA hasarına neden olan hücre dışı sinyallerin hücre zarındaki ölüm reseptörlerini aktive edip apoptotik süreci başlatmasıdır. Bu membran proteinleri içinde en önemlisi tümör nekrosis faktör reseptör ailesi olup, bu reseptörlerin en önemlileri FAS (CD-95) ve TNFR-1 reseptörleridir (155, 156). TNF'nin TNFR-1'e bağlanmasıyla da benzer olaylar oluşabilir. Fas ve TNFR-1'in sitoplazmik uzantısı, bir ölüm bölgesini kapsamaktadır. Fas'ın sitoplazmik bölümü FADD (Fas Associating protein with a Death Domain protein) ve RIP (Receptör Interacting Protein) ile etkileşim halindedir. Ölüm bölgeleri içeren FADD ve RIP proteinleri, prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozisi doğrudan aktiveleştirir. Aktive olan kaspaz-8 de diğer kaspazları uyarır. Bu mekanizma; bir immün uyarı sonucu aktive olmuş T hücrelerinin ortadan kaldırılması, virüs ile infekte hedef hücrelerin yok edilmesi, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılması gibi olayları içerir (137).



Şekil 11. Apoptozisin Şekillenmesi (157)

1.6.4. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

- Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri
- İmmunohistokimyasal Yöntemler
- Biyokimyasal Yöntemler
- İmmunolojik Yöntemler
- Moleküler Biyoloji Yöntemleri (152).

1.6.4.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

1.6.4.1.1. Işık Mikroskobu Kullanımı

Hemotoksilen boyama, morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve en kolay olanıdır. Hücre küçülmesi, sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olarak nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi gibi değişiklikler gözlemlenebilir. Giemsa boyamada ise nükleus morfolojisine dayanılarak apoptotik hücreler saptanır (152).

1.6.4.1.2. Floresan Mikroskobu ve Lazerli Konfokal Mikroskobu

Hoechst boyası, propidium iyodur gibi floresan maddelerin DNA'ya bağlanıp hücrenin kromatini, dolayısıyla nükleusu görünür hale getirmesine dayanan bir yöntemdir (158).

1.6.4.1.3. Elektron Mikroskobu

Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği yöntemdir.

Apoptotik hücrelerdeki sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmantasyonu, hücre zarı, nükleus zarı ve mitokondrideki gibi olaylar incelenebilmektedir (158).

1.6.4.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu Kullanımı

Sadece hücrelerin kültür ortamında, "flask" veya "plate"lerde büyütüldüğü çalışmalarda kullanılmaktadır (158).

1.6.4.2. Histokimyasal Yöntemler

1.6.4.2.1 Anneksin V Yöntemi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoze giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne geçer. Dış yüzdeki fosfatidilserinler, floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir, böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (158).

1.6.4.2.2. TUNEL Yöntemi (TdT-mediated nick and labeling technique)

Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling kelimelerinin kısaltmasıdır.

TUNEL, apoptotik sinyal kaskadında DNA kırıklarının saptanmasında yaygın kullanılan bir yöntemdir ve ilk defa 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (159). Bu yöntemde oluşan DNA kırık uçları, kimyasal olarak spesifik uçlardır. Apoptotik hücrelere ait DNA'lar hızla parçalandıklarında kromatin ağ bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı artar (160). Terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) enzimi, ortama eklenen biotin-dUTP'yi, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer eder (161). Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları avidin eklendiğinde görünür hale gelirler (160). DNA parçalarının serbest 3'OH kısmı biotin, digoxigenin ya da florescein gibi nükleotidler vasıtasıyla modifiye edilmiş enzimatik etiketler ile belirlenebilir (162).

Bu teknikte flovsitometriyle apoptotik hücrelerin yüzdelerini ölçmek mümkündür. DNA kaybından kaçınmak için kesitler dondurma mikrotomuyla alınabilir. Parafinle bloklanan kesitler ise sırasıyla deparafine ve dehidrate edilir sonra birçok tampon ve çözeltinin kullanıldığı bir dizi işlemde geçirilir. Doku kesitleri üzerinde genellikle hematoksilin ile zıt boyama yapıldıktan sonra preparatlar incelenir. Çokça kullanılan bir yöntemdir. Ancak tüm bu çalışmalarda apoptozu belirlemek için kullanılmış olan terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP labeling (TUNEL) güvenilirliği kısıtlıdır. TUNEL incelemesi, DNA dizisinde kırığı olan tüm hücreleri, hücre hasarı tipinin nekroz (DNA çözülmesi daha rastgeledir) veya apoptoz (DNA dizi kırılması çok bol miktardadır) olmasını ayırt etmeden boyamaktadır (163).

1.6.4.2.3. M30 Yöntemi

Apoptotik hücrelerde sitokeratin 18'in kaspazlarla kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgelerin immunohistokimyasal yöntemle boyanmasıdır. Sadece sitokeratin 18 salgılayan epitelyal kaynaklı dokularda kullanılabilir (158).

1.6.4.2.4. Kaspaz-3 Yöntemi

Yalnızca apoptotik hücrelerdeki aktif kaspaz-3 belirlenebilmektedir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 salgılayıp salgılamadığı belirlenmeli ve çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'e etkisi bilinmelidir (158).

1.6.4.3. Biyokimyasal Yöntemler

1.6.4.3.1. Agaroz jel Elektroforezi

DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptoziste DNA 180 baz çifti ve katlarına karşılık gelen internükleozomal bölgelerden kırıldığı için merdiven görüntüsü oluşmaktadır. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekrozla ayırımın yapılmasında da önem arzeder (158).

1.6.4.3.2. Western Blotting Yöntemi

Apoptozise özgü bazı proteinlerin salınımları (örn. bcl-2) veya kırıkların (örn. Kasp3) saptanması mümkün olmaktadır (158).

1.6.4.3.3. "Flow" Sitometri

Floresan bir madde ile işaretlenmiş antikör kullanılarak apoptoziste salındıkları bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanmasında rol oynar. Kolay uygulanabilir olması, kısa sürede ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte

apoptozisin saptanmasında kullanışlı bir yöntemdir. İki farklı şekilde uygulanmaktadır:

- a- Floresan bir madde olan propidium iyodur kullanılarak,
- b- Anneksin V kullanılarak yapılmaktadır. (158).

1.6.4.4. İmmunolojik Yöntemler

1.6.4.4.1. ELISA

Kültürü yapılmış hücre populasyonlarında, insan plazmasında DNA fragmantasyonunun tespiti, aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkün olmaktadır (158).

1.6.4.4.2. Fluorimetrik Yöntem

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir (158).

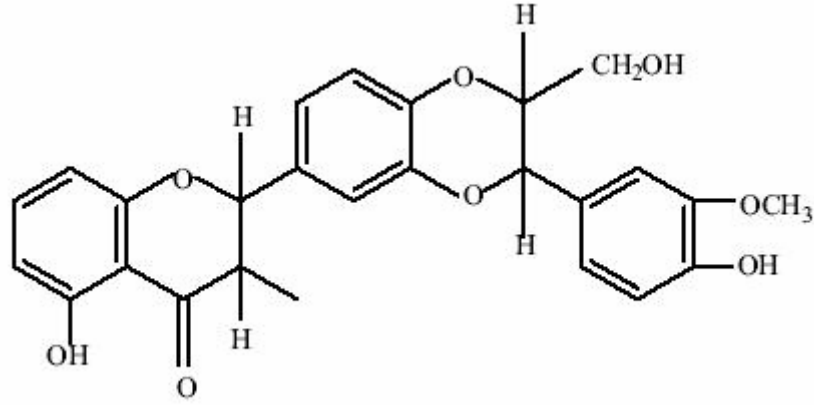
1.6.4.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

1.6.4.5.1. DNA Microarray

Yeni ve çok pahalı bir yöntem olması yanında gelecekte bu yöntemle aynı anda ve kısa bir sürede yüzlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA' larının) tespiti mümkün olabilecektir. Böylece, apoptozise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin salınımı hakkında geniş bilgi elde edilebilecektir (158).

1.7. Silmarin

Silybum marianum L. Gaertn (devedikeni), *Asteraceae* familyasına ait bir bitkidir. Bu bitkinin tohumları, karaciğer ve safra kesesi hastalıkları ile toksin zehirlenmelerine karşı karaciğeri korumada; aynı zamanda mantar zehirlenmeleri, yılan sokması, böcek ısırıkları gibi durumların tedavisinde de 2000 yıldan beri kullanılmaktadır. *S. marianum* L. tohumlarında bol miktarda silmarin içermektedir. Kimyasal olarak silmarin; silibin (silibinin), izosilibin, silikristin, silidianin ve dehidrosilibinin adı verilen izomer flavanolignanlardan oluşmaktadır (164). Yani silmarin birden çok flavonolignan izomerinin karışımından oluşmuş kompleks bir yapıdır. Bu bileşik hemen hemen sadece karaciğer için koruyucu olarak kullanılmakta ve düşük oral biyoyararlanımı nedeniyle, çözünürlüğünü ve oral biyoyararlanımını dolayısı ile terapötik aktivitesini artırmak için nanoemülsiyon formülleri elde edilmiştir (165). Silmarinin ana maddesi olan silibin yaklaşık olarak %60'ını kapsar (166).



Silmarinin kimyasal yapısı

1.7.1. Farmakolojisi

1.7.1.1. Etki Mekanizması

Silmarinin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte literatürde 4 farklı mekanizması açıklanmıştır:

1. GSH'ın hücresel içeriğini artırır ve serbest radikal temizleyicilerle birlikte lipit peroksidasyonuna karşı etki gösterir.
2. Hepatotoksik ajanların hepatositlere girmesini önleyen hücre membranı stabilizatörü gibi davranır.
3. Karaciğerin rejenerasyonunu stimüle ederek RNA polimerazın hücre çekirdeğindeki aktivitesini uyarıcı etki yapar.
4. Hepatositlerin siroza neden olan kollajen fibrillerin yapımından sorumlu olan miyofibroblastlara dönüşmesini baskılar (167). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda Silmarinin östrojenik aktivitesinin olduğu, ilaç taşıyıcıların (P-glycoprotein) düzenlenmesinde görev aldığı ve nükleer faktör kappa B'nin baskılanmasıyla DNA ekspresyonu üzerine spesifik etkilerinin olduğu ortaya konmuştur (168, 169). Silmarin suda çözünmediğinden dolayı bitkisel çay olarak tüketilemez. Standart kapsüllü bitki ekstresi kullanılır.

1.7.1.2. Absorbsiyonu

Oral alımı sonrası emilim nispeten az olup, yapılan çalışmalarda sıçanlarda oral uygulamadan 24 saat sonra safrada %2-3 oranında tespit edilmiştir. Hayvanlarda

ve insanlarda oral alımı takiben pik plazma konsantrasyonuna 4 ila 6 saat sonra ulaşır (170).

1.7.1.3. Eliminasyon

Karaciğerde sulfat ve glukuronik asit ile konjuge edilerek safrayla atılır. Sonra bağırsak florası etkisiyle hidrolize uğrar ve yeniden emilir. Silmarin hayvan modellerinde oral olarak alındığında, emilim oranının %35 civarında olduğu gösterilmiştir (171). Silmarinin ortalama yarılanma ömrü 6–8 saat olup genelde safra yoluyla, daha az miktarda idrar yoluyla atılır (172, 173).

1.7.2. Silmarinin Etkileri

Silmarin, bazı kimyasalların karsinojenik etkilerini inhibe eder. İnsan prostat karsinomunda, silmarinin mitojenik sinyal yollarını ve hücrel döngü düzenleyicilerini baskıladığı görülmüştür. Silmarin ayrıca steroid hormonlara bağlı tümörleri inhibe eder ve antianjiojenik etki gösterir (169, 174, 175). Silmarinin hepatoprotektif etkilerinde ana mekanizmalar antioksidasyon etki olup lipid peroksidasyonunu engelleyip, güçlü detoksifikasyon ve glutatyon azalmasına karşı koruyucu etkiler yapar. Yine çalışmalarda liopoksijenazı inhibe ederek karaciğerde lökotrien oluşumunu engellediği, hepatositlerde protein sentezini arttırdığı, tümör öncüllerinin aktivitesini azalttığı, mast hücre stabilizasyonunu sağladığı, immun fonksiyonları düzenlediği gösterilmiştir (176). Antioksidan özelliğine bağlı olarak silmarinin bazı bazı nörodegeneratif hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmüştür (177, 178).

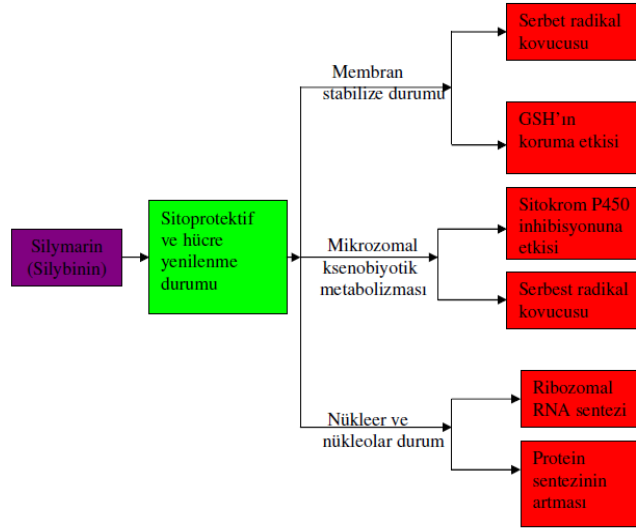
Silmarinin hücre kültürlerinde farklılaşmayı baskıladığı ve oksidatif stresin tetiklediği apoptoza karşı primer hippokampal nöronları koruduğu; glutatyon peroksidaz, süperoksid dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin pankreatik aktivitesini uyardığı, makrofajlardaki ve T-lenfositlerdeki interlökin 1 β , interferon- γ , interferon- α gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ederek pankreastaki β hücrelerini de koruduğu gösterilmiştir (169, 175, 177, 179).

Böbrek nakillerinde kullanılan soğuk iskemi/reperfüzyon işlemi sırasında oluşan serbest radikaller, böbrek tübül hücrelerini etkileyerek; protein-DNA biyosentezinde ve laktat dehidrogenaz aktivitesinde artışa sonuç olarak kimyasal hasara neden olmuşlardır. Silmarin kullanımı bu gibi nefropatolojik etkileri ya azaltılmış ya da tamamen ortadan kaldırılmıştır (169). Yine sıçanlarda cisplatin ile oluşturulan nefrotoksisitede silmarinin koruyucu etkisi araştırılmış ve cisplatinden önce silmarin

uygulanmasının glomerular ve böbrek toksisitesinde önemli düşümlere neden olduğu gözlenmiştir (169, 180).

Anti-anjiojenik etkisi ise insan göbek kordonu toplar damar endotel hücreleri üzerinde çalışılmış, etkisinin doz bağımlı olduğu ve vasküler endotel büyüme faktörünün azaltılmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Aynı etki insan ovaryum kanserinde de kanıtlanmıştır. (169, 181). Silmarinin fotokarsinogenesisine karşı koruyucu olduğu, deride lokal silmarin uygulamasını takiben Ultra Viyole B nedenli tümörün, silmarin uygulanmamış hayvanlardaki tümör büyüklüğüyle karşılaştırıldığında azaldığının tesbiti ile anlaşılmıştır. (182, 183). Aynı şekilde insan melanoma hücrelerinde de ultra viyole uygulamasına karşı koruyuculuğu göstermiştir (184).

Silmarin ultraviyolenin tetiklediği oksidatif stres, inflamasyon, immün cevap ve DNA hasarı gibi tehlikeli etkileri baskılar ve azaltır. Silmarin sitotoksiteyi ve kaspaz aktivitesini ortadan kaldırır. Bcl ve Bax oranını artırır. Ayrıca silmarin ateroskleroza karşı adhezyon moleküllerini’de etkiler (169, 185, 186).



Şekil 12. Silmarinin etki mekanizmaları (168).

Fakat silmarinin asıl aktivitesi içerdigi flavano-lignanlar ve diğer polifenolik bileşikler ile antioksidan gibi davranması ve buna bağılı olarak serbest radikal önleyici etki göstermesidir (187).

1.7.2.1. Karaciğer Üzerine Etkileri

Silmarin birçok yararlı etkilerinden dolayı dikkat çekmiştir. Karaciğeri kimyasallara karşı koruma ve antioksidan etkileri dışında kolesterol düşürme, kardiyoprotektivite ve nöroprotektif aktiviteleri’de vardır (169). Temel aktivitesi polifenolik içeriğinin antioksidan etkisidir. Bu yüzden bu konudaki çoğu çalışma polifenolik içeriği üzerinde odaklanmıştır (188). In vivo ve in vitro çalışmalarda çeşitli toksinlere karşı koruyucu etkisi farklı organ ve hücre tipleri üzerinde farklı mekanizmalarla kanıtlanmış olup özellikle oksidatif stresle mücadelede serbest oksijen ürünlerini ortadan kaldırmasıyla dikkat çekmektedir (169). Silmarin 30 yılı aşkın bir süredir klinik olarak alkole bağlı karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (189). Silmarin KC hastalıklarının tedavisinde oldukça iyi araştırılmış bir bitkidir (190). Eczanelerde kapsül halinde satılan bu madde özellikle karaciğerde çoklu etkileri sebebiyle birçok karaciğer hastası tarafından kullanılmaktadır (13). Silmarinin medikal uygulamalarında en çok siroz, hepatit gibi karaciğer hastalıklarından koruyucu olması üzerinde durulmaktadır (191, 192). Bu hastalıklarda silmarin, destekleyici tedavi amaçlı kullanılmaktadır (193, 194). Birçok toksin serbest radikal mekanizmalarla hasar verici etkiler oluşturur. Silmarinin karaciğer yenilenmesindeki şaşırtıcı etkisi protein sentezini uyarması, hücresel glutasyon seviyesini artırması ve lipid peroksidasyonunu baskılamasıyla açıklanabilir (169). Hayvan modellerinde ve insan hepatositlerinin primer kültüründe karbon tetraklorid, D galaktozamin, tioasetamid, etanol, parasetamol, benzopiren, thallium, bakteriyel endotoksinleri, viral hepatit, toksik hepatit, alkol nedenli karaciğer hastalıklarına bağlı karaciğer hasarına karşı koruyucudur (195). Hepatoprotektif bir ajan olarak tanımlanan silmarin ve onların preparasyonları alkol tüketimi ile ilişkili karaciğer hastalıkları, kronik hepatit, siroz tedavisi ve çevresel toksin etkilerinin tedavisinde destekleyici olarak kullanılmaktadır (13, 14).

Silmarinin aktif komponentlerinden olan *Silybum marianum*’da hasarlı karaciğer dokularının rejenerasyonunda etkilidir (196). Ayrıca *Amanita* mantarı zehirlenmelerinde de koruyucu etkileri bulunmaktadır. Silmarinin antioksidan etkisi, protein sentezini uyarması ve hücre yenilenmesine sebep olması sebebiyle birçok kanser tipinin yayılmasını azaltabileceği düşünülmektedir (180, 197, 198). Hepatik stellat hücreleri karaciğer fibrogenesinde rol oynarlar. Çeşitli etkilere yanıt olarak çoğalıp myofibroblastlara dönüşürler. Silmarin sıçan hepatik stellat hücrelerinin

myofibroblastlara dönüşümünü ve fibrosis için gerekli hücre dışı matriks içeriğinin gen ekspresyonunu da azaltmıştır. Bu çalışmalar silmarinin anti-fibrotik etkisini kanıtlamaktadır (169, 199). KC fonksiyonları; serum Alkalen fosfataz, Alanin amina transferaz, Aspartat amino transferaz, antioksidatif - oksidatif stres parametreleri ve KC histopatolojisi ile değerlendirilir (165). Silmarinin karaciğer ve safra hastalıklarına karşı koruyucu, antikarsinojenik, antiapoptotik, antioksidan, hücre çoğalmasını arttıran, nörotoksinlere ve kardiyotoksinlere karşı koruyucu, östrojenik ve anti östrojenik etkileri vardır (13, 169).

Silmarinin etkileri; serbest radikalleri ve lipid peroksidasyonunu azaltması sebebiyle bir antoksidan olduğu gibi, antifibrotik aktiviteye de sahiptir ve aynı zamanda hepatosit hücre membran reseptörlerindeki toksin bağlayıcıları inhibe ederek toksin blokaj ajanı gibi çalışır (190). Yine hücre içi serbest radikallerini de anlamlı düzeyde azaltmaktadır (200). Farelerde silmarinin Amanita zehirlenmesinden hemen önce uygulanması, karaciğer toksitesini %100 engellediği, ilk 24 saat içinde uygulanması durumunda ise ağır karaciğer hasarı ve ölümünü engellediği görülmüştür (201). Etanol ve karbon tetraklorür gibi etkenler fibrinogenezi indüklediklerinden, stellate hücreler myofibroblastlara dönüşerek, karaciğerde kollajen birikimini sağlarlar (202). Hayvanlarda silmarin; asetaminofen, CCL4, radyasyon ve aşırı doz demir, fenilhidrazin, alkol, soğuk iskemisi ve amanita phalloides'in yol açtığı KC hasarını azaltmaktadır (190). Silmarinin hepatik dokuda belirgin anti-inflamatuvar etkileri pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu etkiler; mast hücre stabilizasyonu, nötrofil migrasyon inhibisyonu, kupffer hücre inhibisyonu, lökotrien ve prostoglandin sentez inhibisyonu ile gerçekleşmektedir (203). Silmarin alkolik KC hasarının, akut ve kronik viral hepatitlerin ve toksinle indüklenen KC hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (190). Hepatik sitokrom P450 enzimini inhibe ettiği (204) ve diyete bağlı hiperkolesterolemide, silmarinin etkisiyle HDL kolesterolünde artış ve total kolesterolda düşüş saptanmıştır (205). Amanitine kullananlarda, viral hepatitlerde, alkolik olmayan steatohepatitlerde, ilaçlarda ve karaciğerin diğer toksik hasarlarında yüksek etkinliği gösterilmiştir (206). Nanoemülsiyon formları ise toksik madde ile karşılaşıldığında; glutamat oxaloasetat transaminaz, pirüvat transaminaz, total bilirubin ve doku lipit peroxidazlarında azalmaya; albumin, globulin ve doku glutatyonunda artmaya neden olmuştur (165).

Promyelositik lösemili 34 yaşında bir kadında 18 ay boyunca Metateraksat ve 6-merkaptopürin ile yapılan kemoterapi sırasında karaciğerde doza bağlı olarak hasarlar oluşmuş ancak hastaya 4 ay süresince bu ilaçlara ek olarak 800 mg silmarin verildiğinde aminotransferaz seviyelerinin normale döndüğü görülmüştür (169). Başka bir çalışmada karaciğer enzim yüksekliği olan hastaların 4 haftalık takibinde 420 mg/gün silmarin uygulanmasının enzimleri belirgin olarak düşürdüğü ve karaciğer biyopsilerinin histolojik incelemelerinde anlamlı düzelmeler görülmüştür (207). Plasebo kontrollü bir çalışmada, siroz yönünden pozitif biopsisi olan 170 hastaya silmarin 3X140 mg/gün verilip, 2–6 yıl takip edilmiş, alkole-bağlı siroz hastalarında anlamlı bir iyileşme saptanırken portal hipertansiyonu olan non-alkolik siroz hastalarında ise etkisiz bulunmuştur (208). Yine hayvan çalışmalarında, ribozomların oluşumunu ve DNA sentezini önemli derecede artırdığı görülmüştür (209, 210). Silmarinin yapısında bulunan isosilybin B'nin prostat kanserinin profilaksi ve tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir (211). Son zamanlarda amanitine bağlı karaciğer sitotoksitesinde TNF- α 'nın rolü araştırılmıştır ve TNF- α 'nın etkilerini önlediği gösterilmiştir (212). Kronik hepatitli hastalarda, 3–12 aylık silmarin tedavisi klinik ve laboratuvar iyileşme ve karaciğer fonksiyonlarında belirgin bir düzelmeye neden olmuştur. (188). Serbest radikallere karşı olan antioksidan yeteneği sayesinde lipid peroksidasyonu'nu engelleyerek membran stabilizasyonu sağlaması ve intrasellüler GSH konsantrasyonunu arttırıcı özelliğiyle açıklanmaktadır. Ayrıca; silmarin, süperoksit anyonu gibi radikallerin ve NO üretimini de azaltmaktadır. Silmarinin, KC koruyucu işlevi de vardır. Koruyucu yapısı pro-apoptotik Bax protein düzeylerinin azalmasına yol açmaktadır (200).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde ve çalışmanın etik onayı, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Etik Kurulundan alınarak yapıldı.

2.1. Deney Hayvanları

Deneylelerde kullanılan en az 8 haftalık erişkin Sprague Dawley tipi erkek sıçanlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezin'den temin edildi. Hayvanların buldukları ortamın sıcaklığı 22-25°C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında ve 12 saat karanlıkta takip edildi. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler özel çelik kaplarda, su ise paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikası'nda özel olarak hazırlanan pelletler halindeki rat yemleriyle beslendi. Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 4'de belirtilmiştir. Ratların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Tablo 4. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29,4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0,6
Kavimix VM 23-Z (%) *	0,2
Methionin (%)	0,2
DCP (%)**	1,6

* 1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0,006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0,32 mg Folic acid, 0,02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca. ** % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur

2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulama

Çalışmada her grupta 6 sıçan (n=6) olmak şartıyla 6 grup oluşturuldu.

Grup I (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına sadece deneyin ilk günü tek doz 0,5 ml Serum fizyolojik intra peritoneal olarak verildi.

Grup II (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına 5 gün süreyle Karboksimetil-selüloz perioral verildi.

Grup III (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına 5 gün süreyle Silmarin, 300 mg/kg/gün perioral uygulandı.

Grup IV (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına 1. gün Metotreksat 20 mg/kg intra peritoneal dozunda uygulandı.

Grup V (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına 1. gün Metotreksat 20 mg/kg dozunda intra peritoneal olarak verildi ilave olarak Karboksimetilselüloz içerisinde çözdürülmüş Silmarin, 300 mg/kg/gün dozunda perioral 5 gün süreyle uygulandı.

Grup VI (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına 1. gün Metotreksat 20 mg/kg tek doz intra peritoneal uygulandı, ilaveten 5 gün süreyle Karboksimetilselüloz perioral verildi.

2.3. Dokuların Alınması

Deneyin sonunda tüm gruptaki sıçanlar ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) intra peritoneal uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların karaciğer dokuları hızla çıkarılıp %10 formaldehitte tespit edilip ardından histolojik ve histokimyasal incelemeler için parafin bloklar hazırlandı.

2.3.1. Histokimyasal İnceleme

Her gruptan alınan karaciğer dokuları, % 10'luk formaldehit tespit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkamaya alındı. Musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirildi. Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Alınan 5µm lik kesitlere Hematoksilen Eozin (H&E), Massonun üçlü boyası ve Periodic acid Schiff (PAS) teknikleri ile boyama yapıldı.

2.3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme

Karaciğer dokusunda bax ve kaspaz 3 immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. Boyama metodu aşağıdaki Tablo 6'da ayrıntılı olarak verilmiştir

Tablo 5. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS (Phosphate Buffered Saline)	3X5 dakika
11	H ₂ O ₂	10 dakika
12	PBS	3X5 dakika
13	Normal blok solüsyonu	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3X5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3X5 dakika
18	Streptavidin HRP (Horse radish peroksidaz)	20 dakika
19	PBS	3X5 dakika
20	AEC (3-Amino-9-ethyl carbazole)	5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	10 saniye
23	Akarsu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma

Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ ile muamele edildi. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block solüsyonu ile muameleden sonra primer antikor (Bax mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, sc–7480, California, USA; caspase 3 Rabbit polyclonal IgG, Abcam, ab2302, London, UK) ile 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biyotinli anti-mouse / rabbit IgG, Diagnostic BioSystems, KP 50A, Pleasanton, USA), streptavidin horseradish peroksidaz ve 3-Amino–9-ethyl carbazole

kromojeni uygulandıktan sonra Mayer's hematoksilenle zıt boyama yapıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine phosphate buffered saline (PBS) kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. PBS ve distile sudan geçirilen dokular uygun kapatma solusyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. Sitoplazmik immün boyanmanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 6).

Tablo 6. İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Şiddetli

2.3.3. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 7).

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Metil Green ile yeşile boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi.

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. TUNEL boyamanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 8).

Tablo 7. TUNEL boyama prosedürü

İşlem	Süre
1 60°C etüv	Bir gece
2 Xylol	3X15 dakika
3 %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4 PBS	5 dakika
5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.
6 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7 PBS	3X5 dakika
8 Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9 PBS	3X5 dakika
10 Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11 Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12 Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14 PBS	3X5 dakika
15 DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16 PBS	3X5 dakika
17 Distile su	5 dakika
18 Harris hematoksilen	1 dakika
19 Distile su	5 dakika
20 %80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21 Xylol	2X5 dakika
22 Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.

Tablo 8. TUNEL boyama yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Şiddetli

2.3.4. Agaroz jel Elektroforezi Ile DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi

Agaroz orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en yaygın destek ortamıdır. Ayrıştırılacak moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak genelde % 0.3 ile 2 agaroz konsantrasyonları kullanılır. En çok 50 kb'a kadar olan nükleik asitler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılabilir. Agaroz konsantrasyonu ayarlanarak jelde moleküllerin hareket ettiği porların çapı değiştirilebilir. Jelin konsantrasyonu arttıkça, porların çapı küçülür. Böylece küçük DNA parçaları için yüksek, büyük DNA parçaları için ise düşük agaroz konsantrasyonları kullanılarak nükleik asitlerin en iyi şekilde ayrılması sağlanır. Agaroz jeller genellikle floresan bir boya olan ethidium bromide ile boyanır ve Ultra Viyole ışığı altında DNA parçaları görüntülenir. DNA'nin jelde görünür hale gelmesi, ethidium bromide'in DNA'nin iki zinciri arasına girerek 300 veya 360 nm dalga boyundaki ışığı soğurması sonucu floresan etki göstermesi ile gerçekleşir. Apoptotik hücrelerdeki endonükleaz aktivasyonu kromatinin oligonükleozomal parçacıklara ayrılmasına neden olur. Bu enzim kalsiyum ve magnezyum bağımlı olup, DNA'da tipik olarak 180-200 baz çifti ve katları biçiminde bir parçalanmaya yol açar. Bu parçalanma paterni, agaroz jel elektroforezinde merdiven biçiminde "ladder pattern" izlenir ve apoptoz için tipiktir. Agaroz jel elektroforez güvenilir sonuçlar veren kalitatif bir analiz yöntemidir (213).

DOKUDAN DNA İZOLASYON PROTOKOLÜ

Proteinaz K Tamponu

EDTA: 4ml 0-5M pH:8

Tris-HCl: 4ml 1M pH:8

NaCl: 6ml 5M

SDS: 10ml %10' luk SDS

24 ml ediyor. Üzerine 176 ml dd su konur.

1gr proteinaz K bir miktar tamponda çözülüp, stoğun üzerine ilave edilir.

Tampon -20 °C de saklanmalıdır.

DTT Stoğu hazırlanması: Su ile 1M'lık stok hazırlanır.

DNA fragmentasyon analizi

1. Mercimek büyüklüğünde doku parçası alındı.
2. Üzerine 500µlt proteinaz K tamponu + 20µlt DTT kondu.
3. 1 gece 37°C'lik benmaride shaker çalıştırılarak bekletildi.
4. 17.000 g'de 20dk + 4 °C de santrifüj edilir.
5. Üstteki süpernatant yeni tüpe alındı.
6. Üzerine 3µlt RNAase konur ve 37°C'lik benmaride 1 saat bekletilir.
7. 600µlt fenolkloroform izoamilalkol (25:24:1) vortekslenir.
8. Aldığın miktara eşit hacimde kloroform, izoamilalkol (24:1) koy. 13.000'de 15dk santrifüj edildi.
9. Üstteki kısmı yeni tüpe al. 1\10 kadar sodyumasetat ekle pipetaj yapıldı.
10. 13500'de 15dk santrifüj edildi.
11. Üstteki süpernatant yeni tüpe aktarıldı.
12. 50µlt amonyum asetat eklenir. Çok hafif vortekslenir.
13. Üzerine -20 °C'de soğutulmuş 800µlt saf alkol eklendi. 5-10 kez alt üst edildi. Oda ısısında 10dk bekletildi.
14. 1 gece -20 °C'de bekletildi.
15. 13.500'de 15dk santrifüj edildi.
16. DNA pelleti dipte görüldü. Üst kısım atıldı ve DNA %70'lik 800µlt alkolle alt üst edilerek yıkandı.
17. 17.000'de 15dk santrifüj edilerek üst kısım atıldı. DNA kurutuldu.
18. 50 µlt suyla (dd H₂O) sulandırıldı (214).

DNA konsantrasyonu ve saflık derecesinin ölçülmesi

DNA konsantrasyonu ve saflık derecesinin belirlenmesi Ultra Viyole spektrofotometresi ile yapılabilmektedir. DNA örneğinin içerisinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen Ultra Viyole miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50 µg/ml'lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir. Ultra Viyole absorbansı DNA'nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de de proteinler pik verir). Saf bir DNA örneğinin 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı (A_{260nm}/

A280nm) 1.8'dir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla bulunduğumuz değer 1.8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. 1.8'den düşük değerler örnekte fenol ya da protein kontaminasyonu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir (215). Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örnekleleri ölçülerek konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi. 1.8'e yakın olmayan değerlere sahip örneklelerin DNA'ları tekrar izole edildi.

Agaroz jel elektroforezi

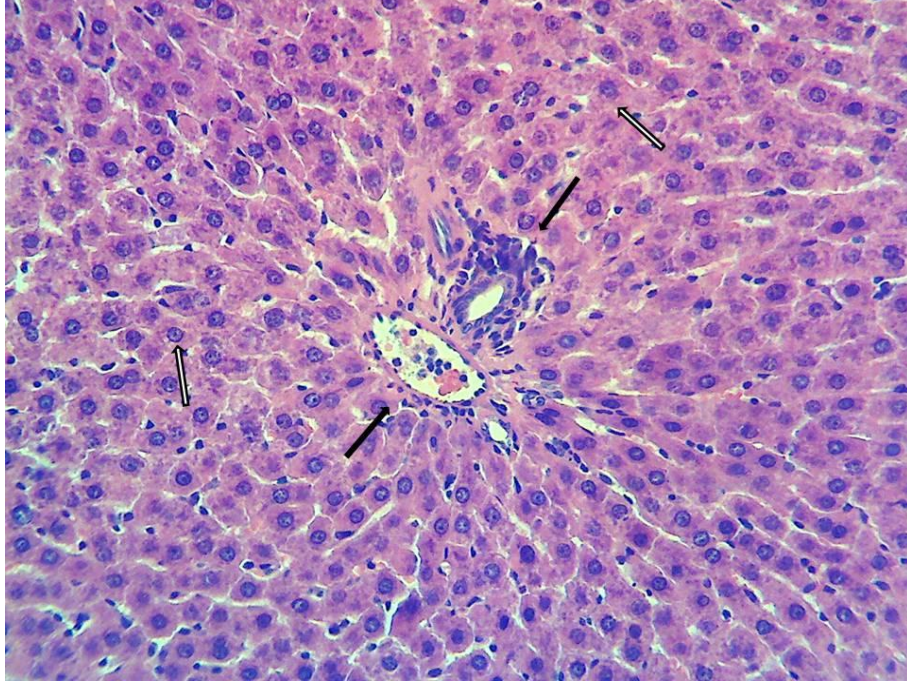
DNA fragmentasyonunun belirlenmesi için jelle 30µg DNA yüklendi. Elde edilen ürünlerin büyüklüklerini tanımlayabilmek için % 1.5'lük jel kullanıldı. Kullanılan elektroforez düzeneğine uygun hacim; toz halindeki agarozun 0.5X TBE tamponunda manyetik karıştırıcı bir mikrodalga fırında kaynatılarak çözülmesi ile oluşturuldu. Ardından kaynamış çözelti 55–60 °C'ye soğutularak 0.25 µg/ml EtBr ilave edildi. Kuyuları oluşturacak olan tarak, tabağına yerleştirildikten sonra hazırlanan jel, hava kabarcığı kalmayacak şekilde buraya döküldü. Jelin polimerizasyonu sonrası tarak dikkatlice çıkarılarak jel platformu 0.5XTBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Bu tampondan jelin üzerini 1–2 mm geçecek kadar eklendi. Örnekler ve belirteç DNA, 6X yükleme boyası ile 5:1 oranında karıştırılarak kuyulara 15'er µl yüklendi. Güç kaynağı açılarak 90 V'a ayarlandı. Yaklaşık yarım saat sonra güç kaynağı kapatıldı. Jel görüntüleme sisteminde Ultra Viyole ışını altında incelendi (216, 217).

NA fragmentasyonunda oluşan bantların yerlerinin belirlenmesi için 1000BP'lik DNA boyut markırı kullanıldı. DNA fragmentasyonunun olup olmadığının belirlenmesi için ise sağlıklı hayvanlardan elde edilen doku örneklelerinden elde edilen DNA kullanılmıştır. DNA fragmentasyon düzeyinin belirlenmesi için LabWorks programı kullanılmıştır (LabWorks 4.0; UVP Inc., Cambridge, UK) (214).

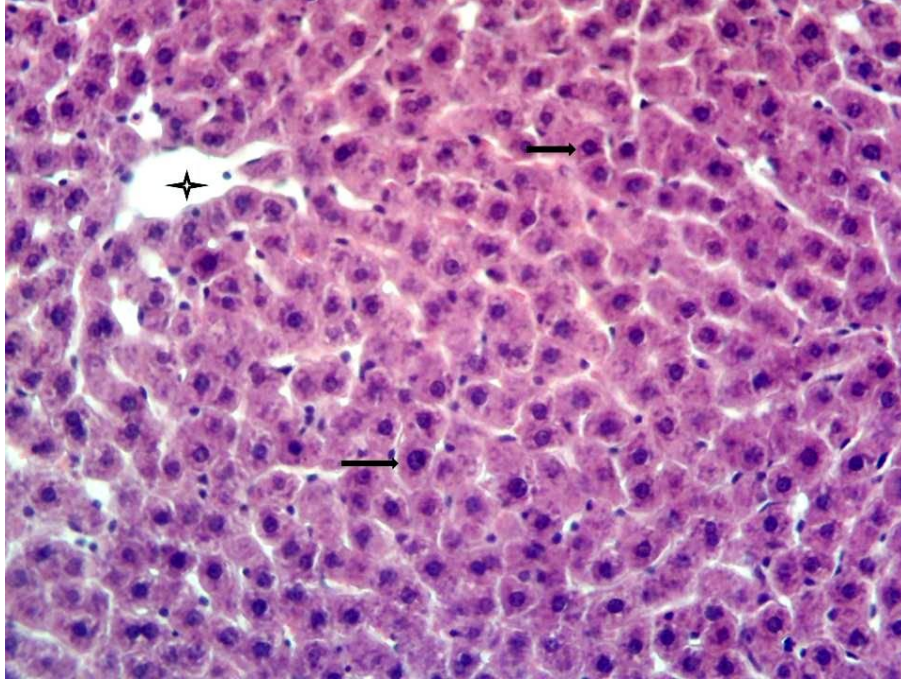
3. BULGULAR

3.1. Histokimyasal Bulgular

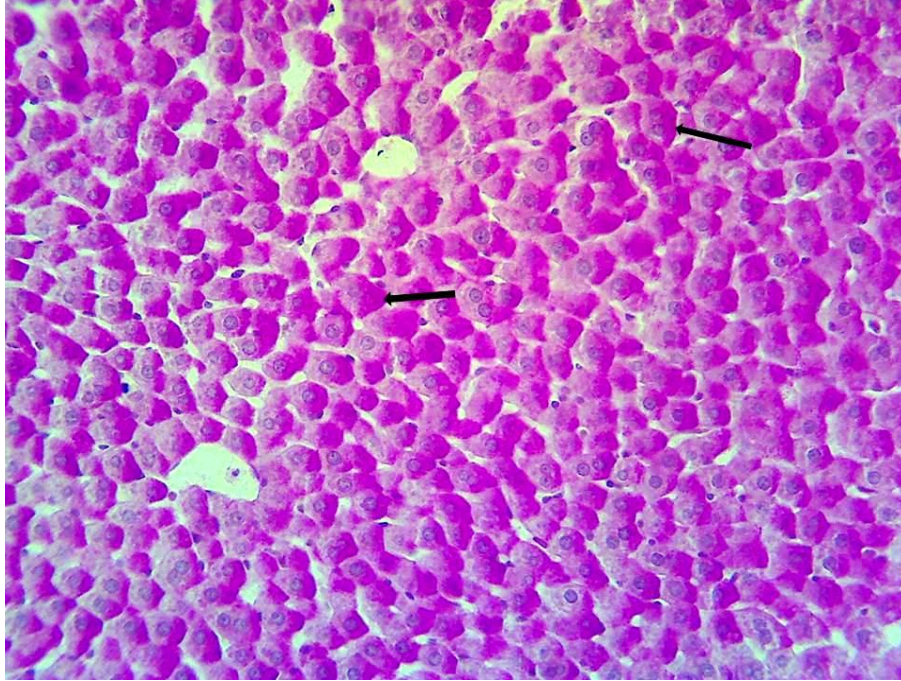
Kontrol grubuna ait sıçanların karaciğer dokuları incelendiğinde v. sentralis, portal alan, hepatositler, sinüzoidler ve sinüzoidal Kupffer hücreleri ve endotel hücreleri normal yapıda gözlemlendi. (Şekil: 13-18)



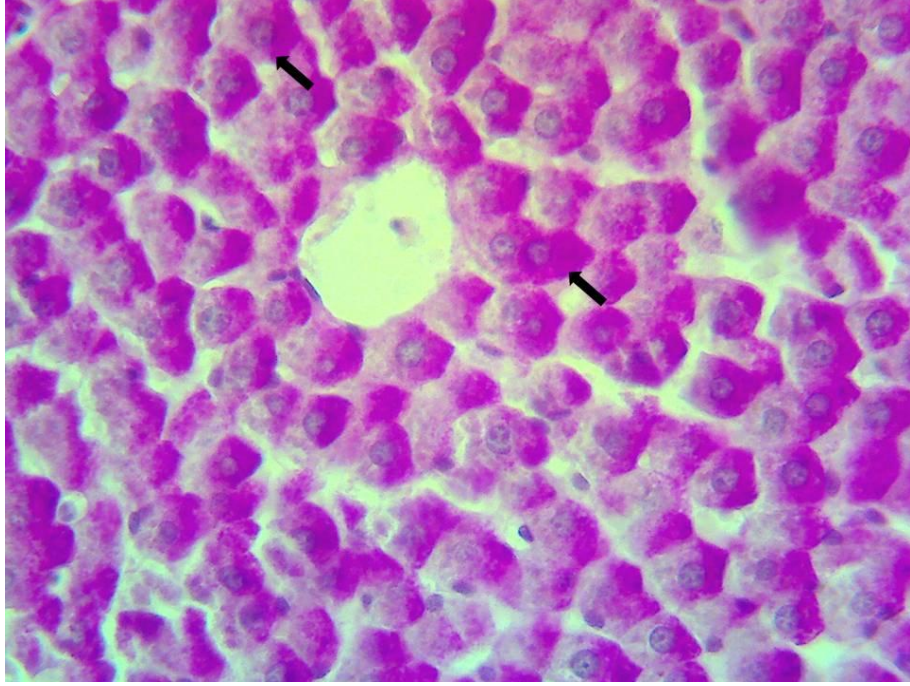
Şekil 13 . Kontrol grubunda portal alan (→), hepatositler(⇔), sinüzoidler ve sinüzoidal hücreler normal yapıda izlenmekte. H &E X 200



Şekil 14. Kontrol grubunda vena sentralis (+), hepatositler (→) ve sinüzoidler normal yapıda gözlenmekte. H &E X 200



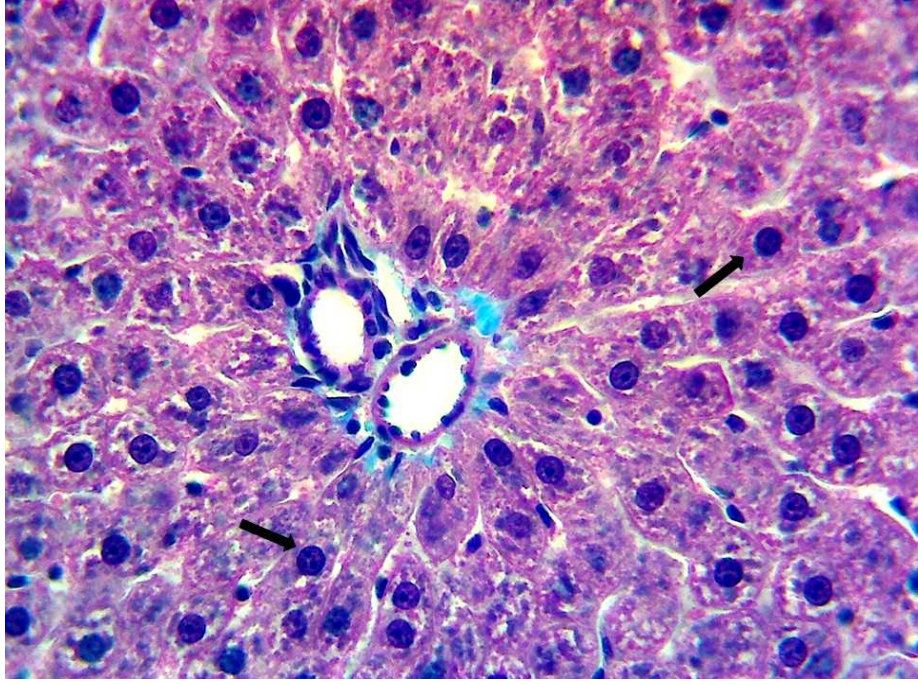
Şekil 15. Kontrol grubunda vena sentralis etrafında zon III'de bulunan hepatositlerdeki (→) glikojen içeriği ayırılmakta. PAS X 200



Şekil 16 . Kontrol grubunda vena sentralis etrafındaki hepatositlerin oldukça yoğun glikojen depoladığı (→) gözlenmekte. PAS X 400

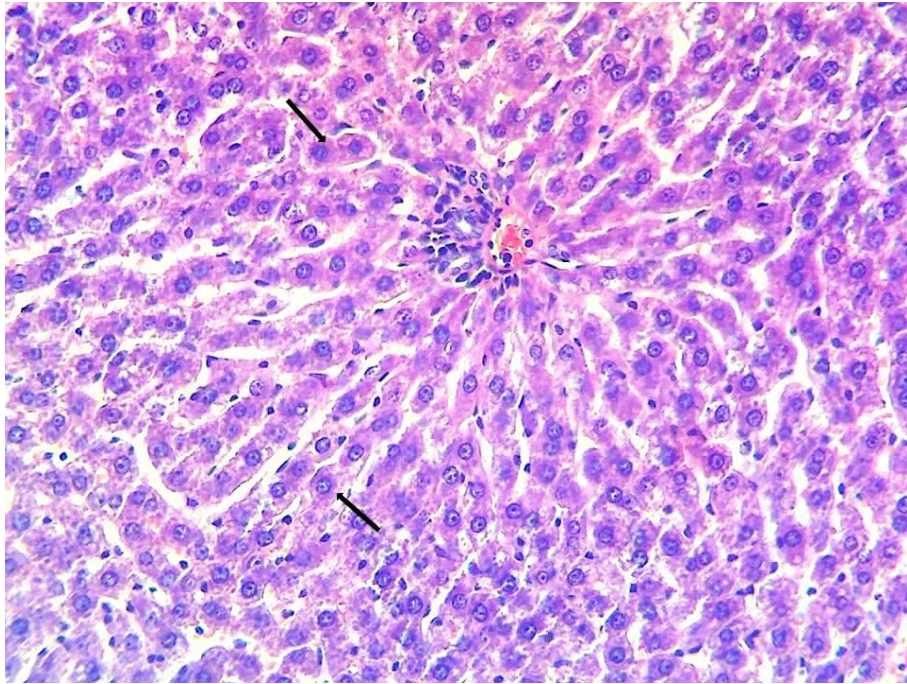


Şekil 17. Kontrol grubunda periportal alandaki hepatositlerin yoğun miktarda glikojen içerdiği (→) izlenmekte. PAS X 400

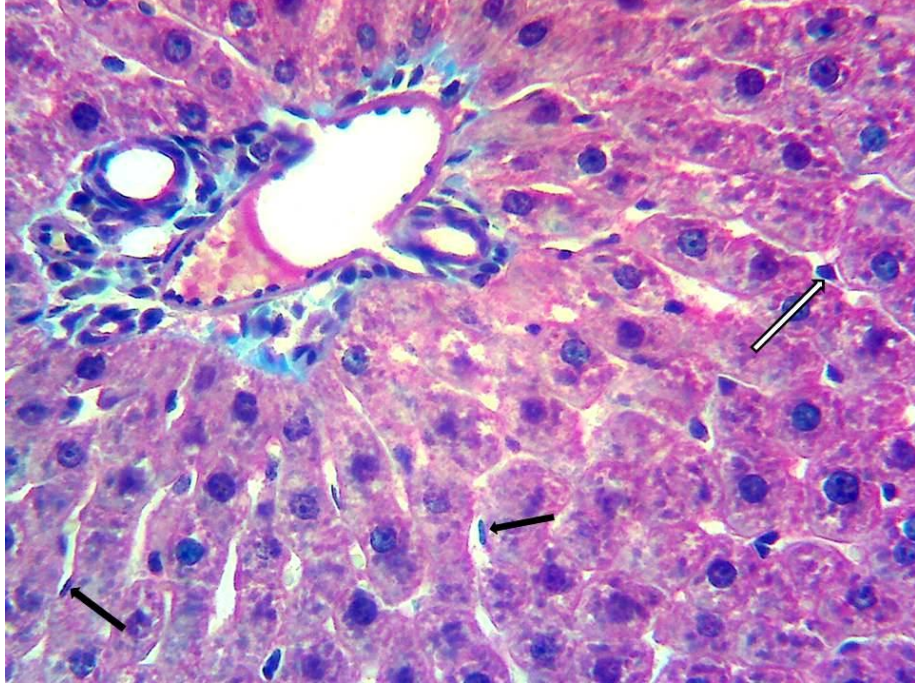


Şekil 18. Kontrol grubunda portal alan, periportal bölgedeki hepatositler (→) normal yapıda izlenmekte. Masson Trikrom X 400

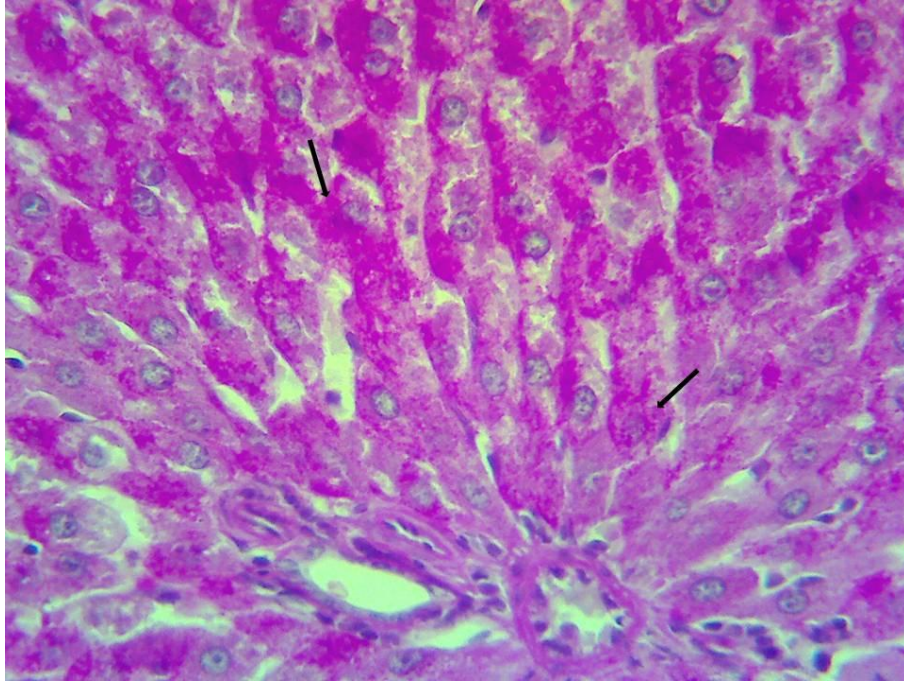
5 gün CMC uygulanan gruba ait karaciğer dokuları kontrol grubuna benzer şekilde ayırtedildi (Şekil: 19-23).



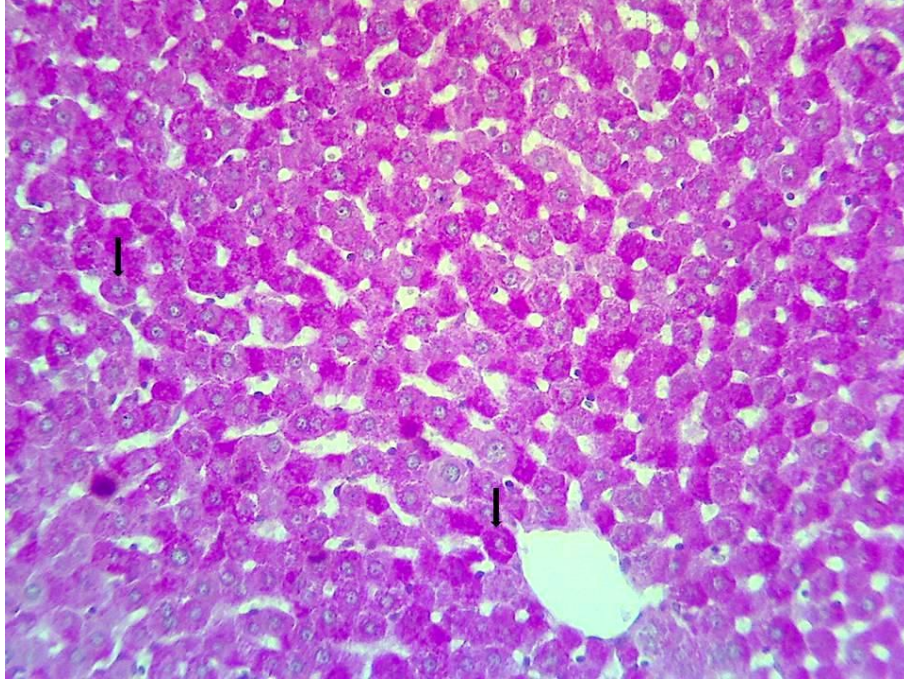
Şekil 19. CMC uygulanan grupta portal alan ve hepatositler (→) normal yapıda gözlenmekte. H &E X 200



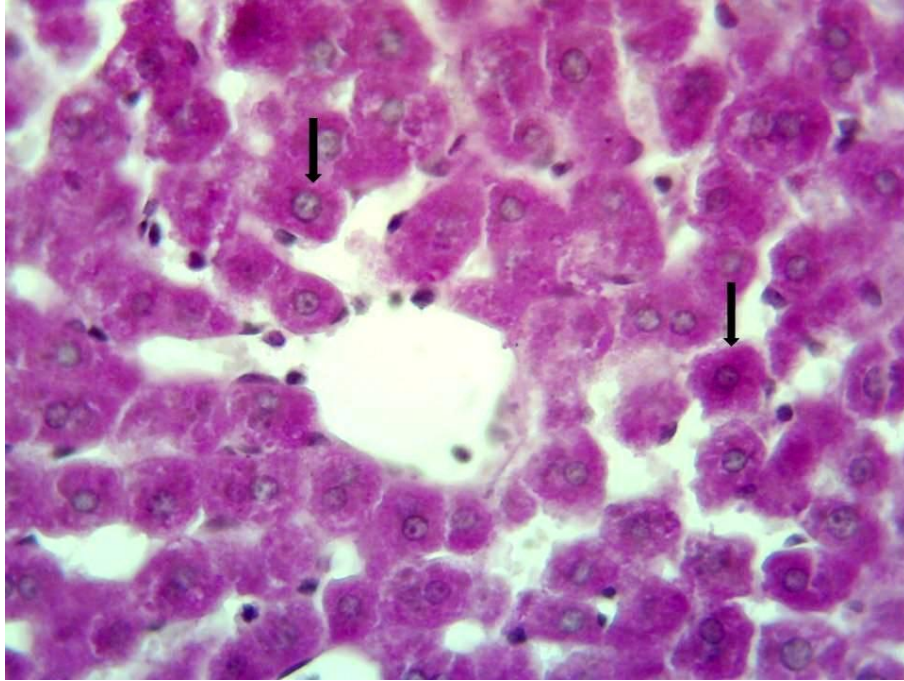
Şekil 20. CMC uygulanan grupta portal alan ve zon I'deki sinüzoidler, sinüzoidlerdeki endotel hücreleri (→) ve Kupffer hücreleri (⇔) normal yapıda izlenmekte.
Masson Trikrom X 400



Şekil 21. CMC uygulanan grupta portal alan, hepatositler (→) ve hepatositlerin glikojen içeriği normal yapıda gözlenmekte. PAS X 400

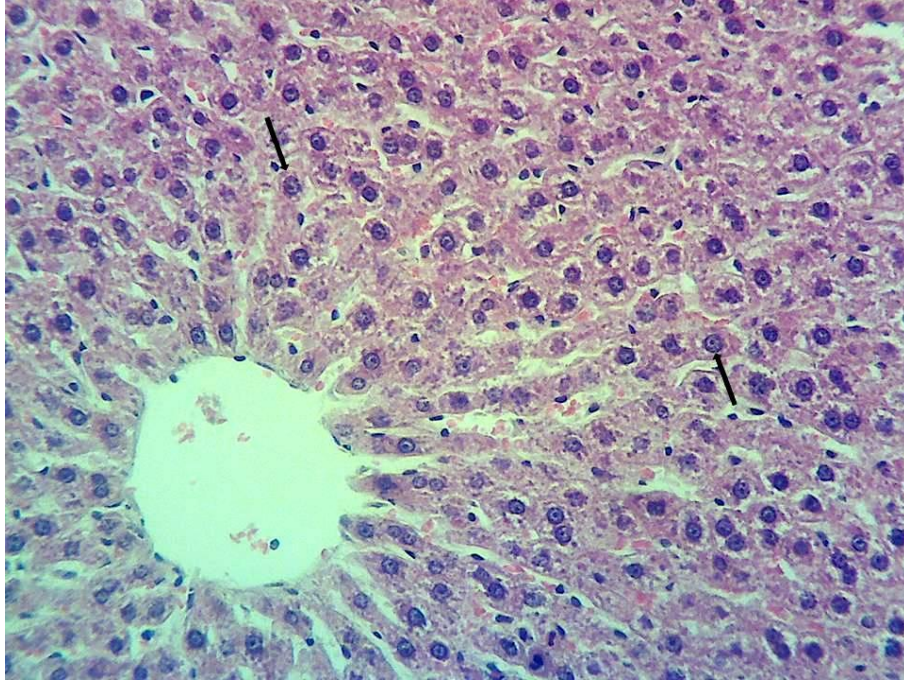


Şekil 22. CMC uygulanan grupta Zon III'deki hepatositlerin glikojen içeriği (→) belirgin olarak izlenmekte. PAS X 200

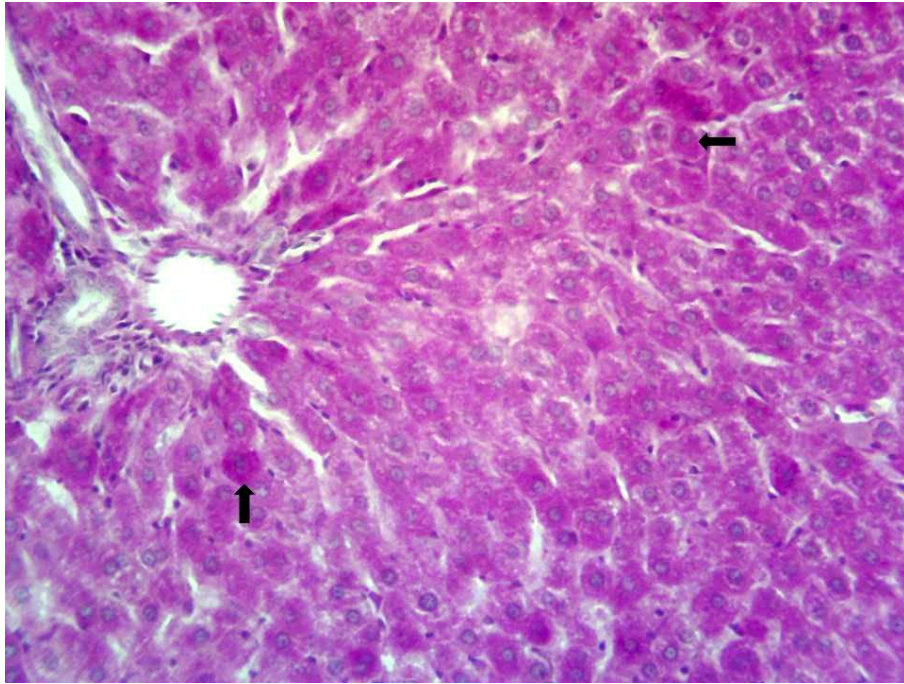


Şekil 23. CMC uygulanan karaciğerde vena sentralis, hepatositler (→) normal yapıda izlenmekte. PAS X 400

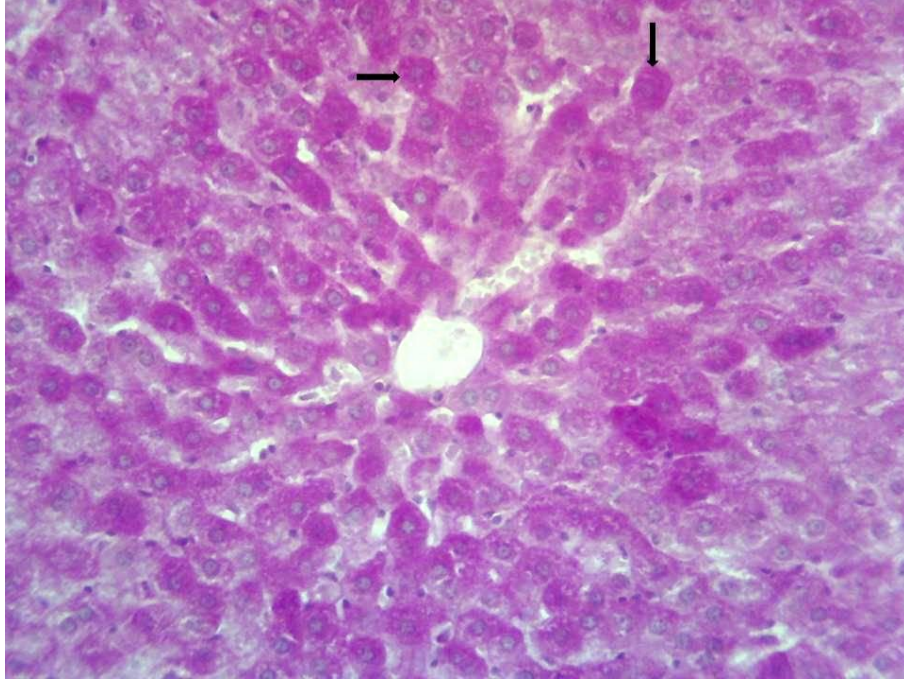
5 gün süresince silmarin uygulanan gruba ait karaciğer dokuları kontrol grubuna benzer olarak tespit edildi (Şekil: 24-27).



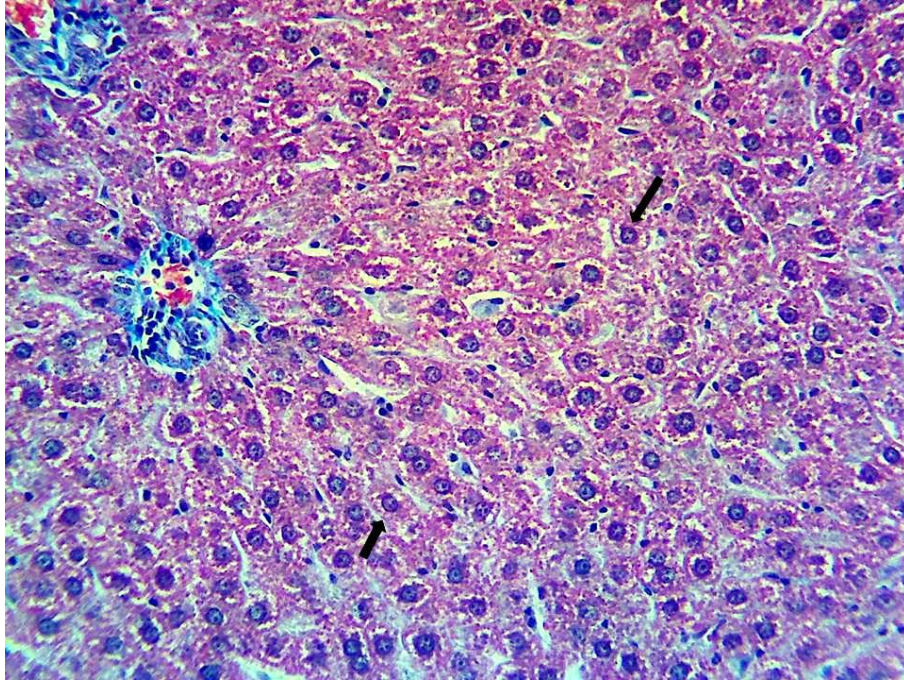
Şekil 24. Silmarin uygulanan grupta vena sentralis, hepatositler (→), sinüzoidler ve sinüzoidal hücreler normal yapıda gözlenmekte. H &E X 200



Şekil 25. Silmarin uygulanan grupta portal alanda hepatositlerin glikojen içeriği (→) normal olarak izlenmekte. PAS X 200



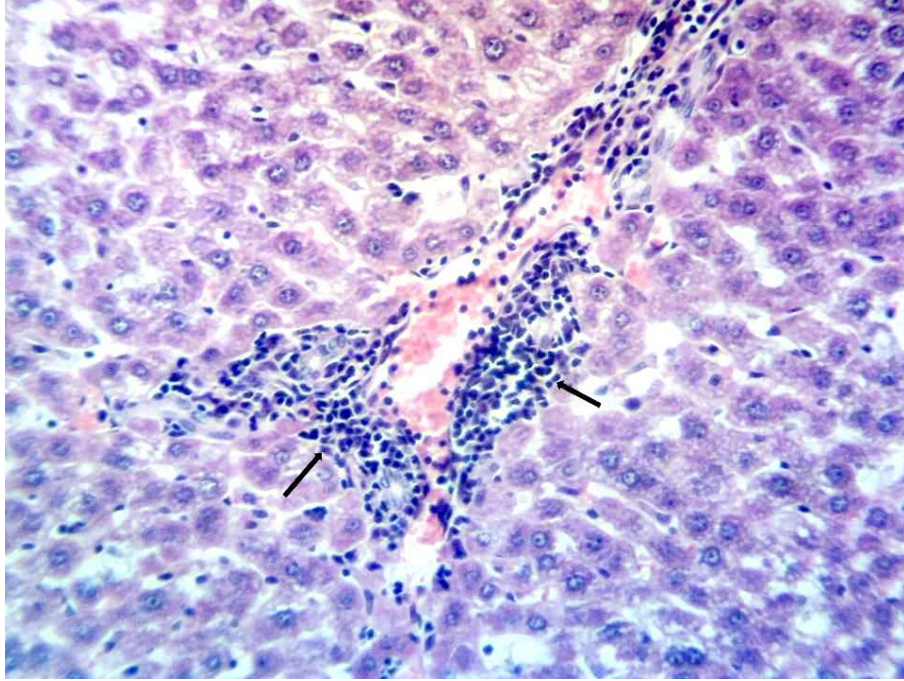
Şekil 26. Silmarin uygulanan grupta Zon III'deki hepatositlerin (→) glikojen içeriği kontrol grubuna benzer şekilde izlenmekte. PAS X 200



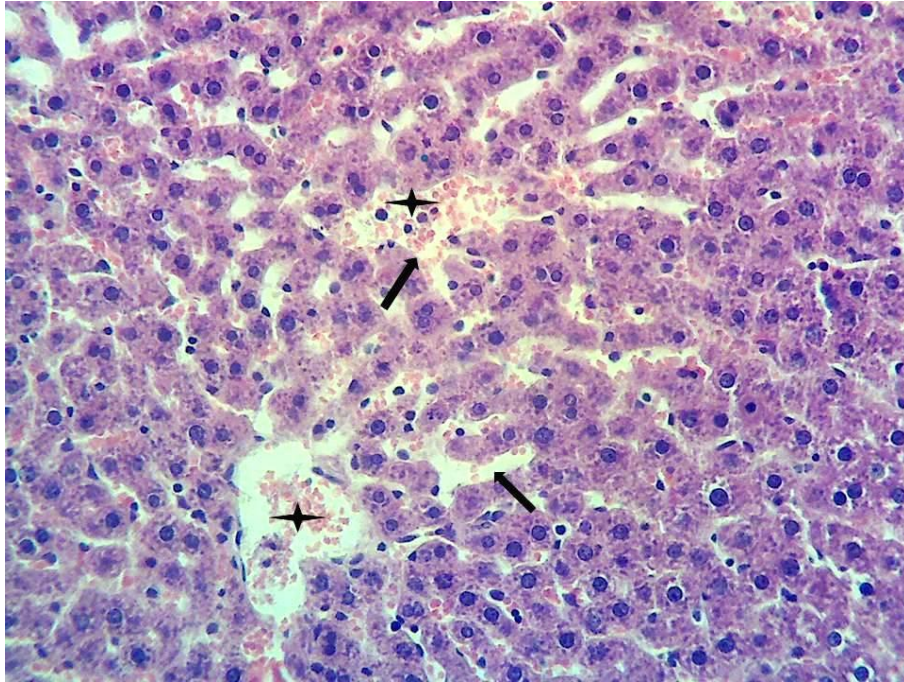
Şekil 27. Silmarin uygulanan grupta portal alan, hepatositler (→), sinüzoidler ve sinüzoidal hücreler normal yapıda gözlenmekte. Masson Trikrom X 200

Tek doz MTX uygulanan grubun karaciğer dokuları incelendiğinde vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon, periportal alanda mononükleer hücre infiltrasyonu,

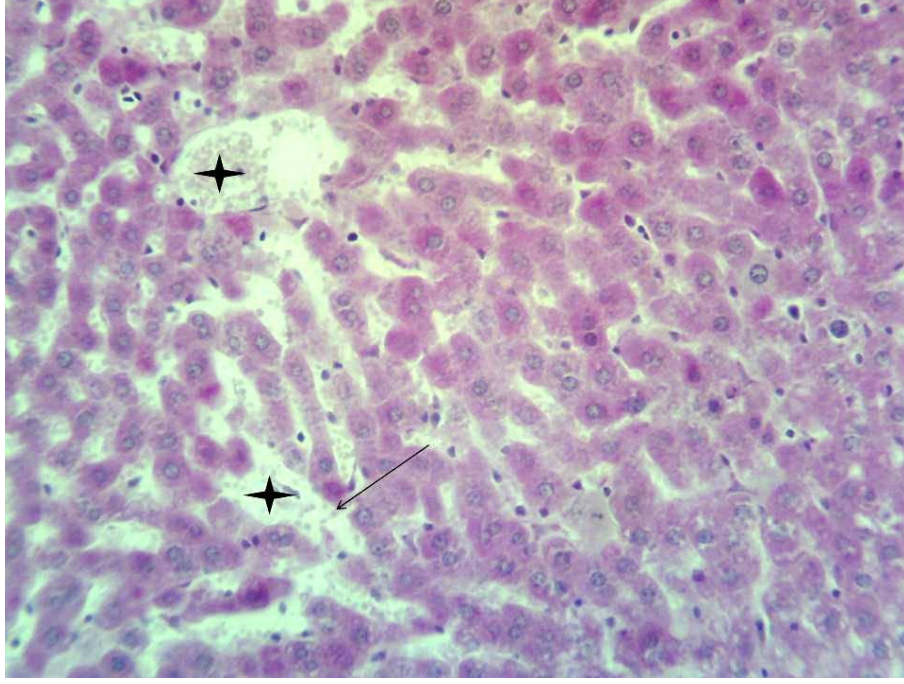
yer yer nekroze alanlar, piknotik ve heterokromatik çekirdekli hepatositler ve hepatositlerde glikojen depolarının belirgin şekilde azalmış olduğu gözlemlendi (şekil: 28-38).



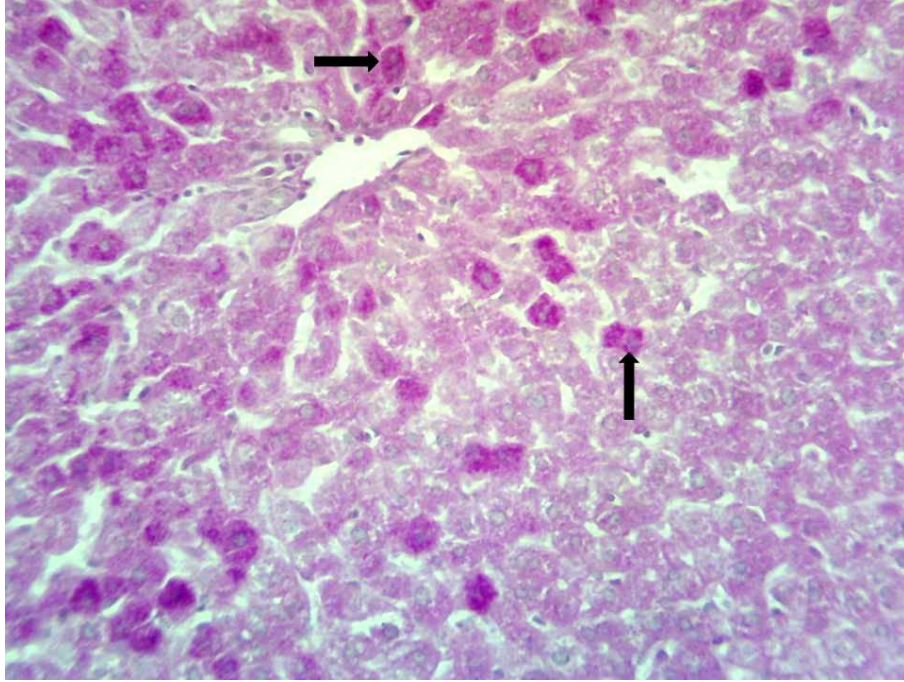
Şekil 28. Metotreksat uygulanan grupta periportal alanda mononükleer hücre infiltrasyonu (→) gözlenmektedir. H &E X 200



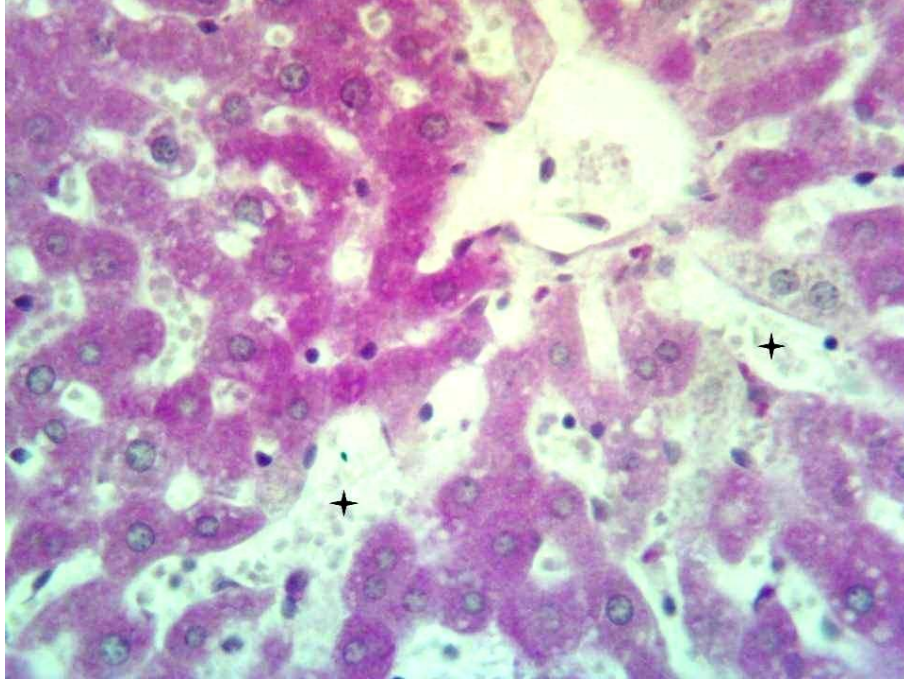
Şekil 29. Metotreksat uygulanan grupta vasküler konjesyon (+) ve sinuzoidal dilatasyon (→) gözlenmektedir. H &E X 200



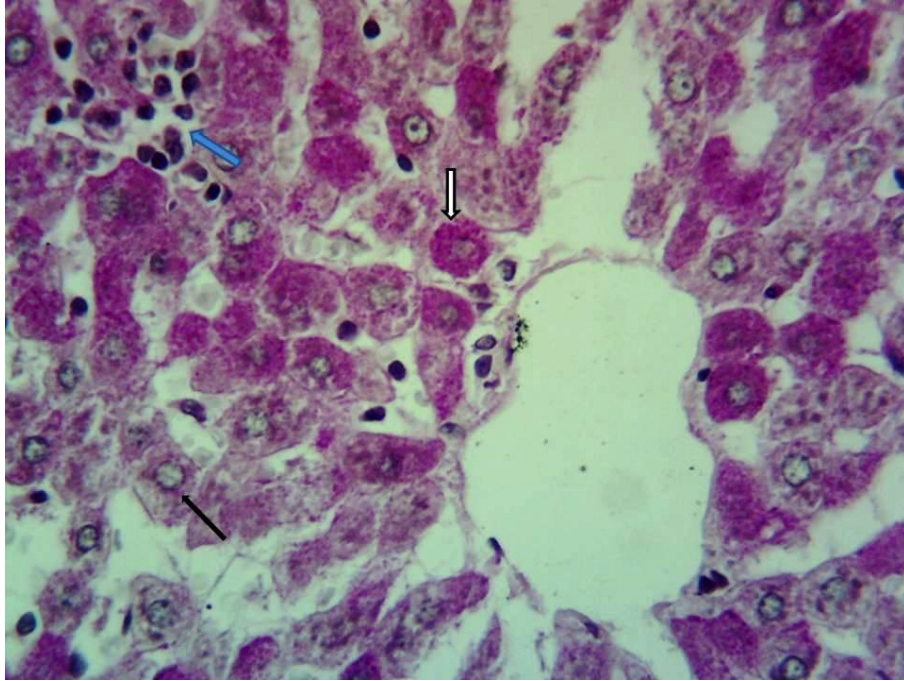
Şekil 30. Metotreksat uygulanan grupta vasküler konjesyon (+) ve sinuzoidal dilatasyon (→) izlenmekte. PAS X 200



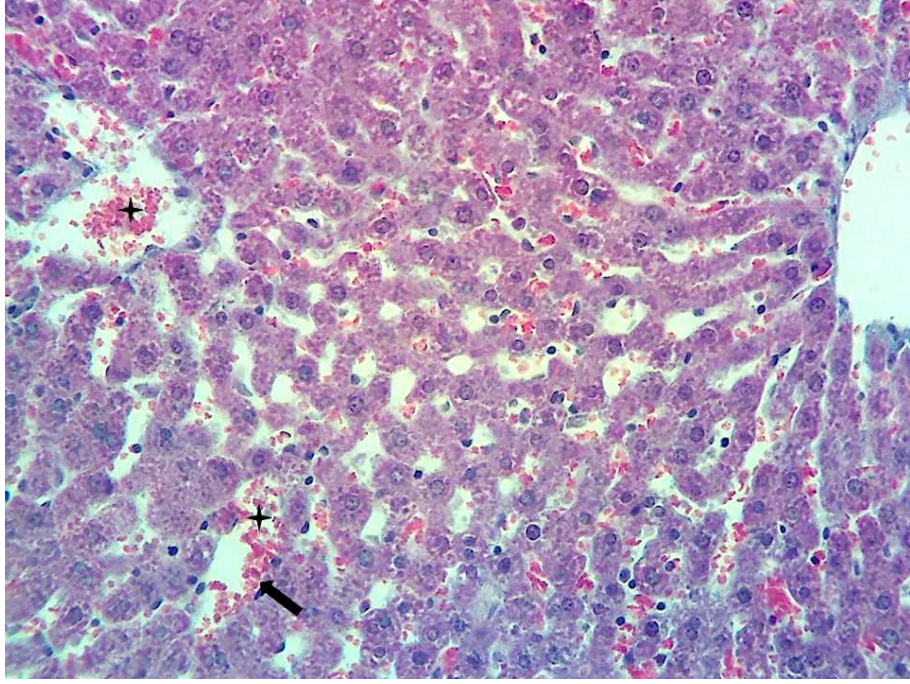
Şekil 31. MTX uygulanan grupta periportal bölgedeki hepatositlerin bazılarında glikojenin varlığı (→) ayırt edilmekte. PAS X 200



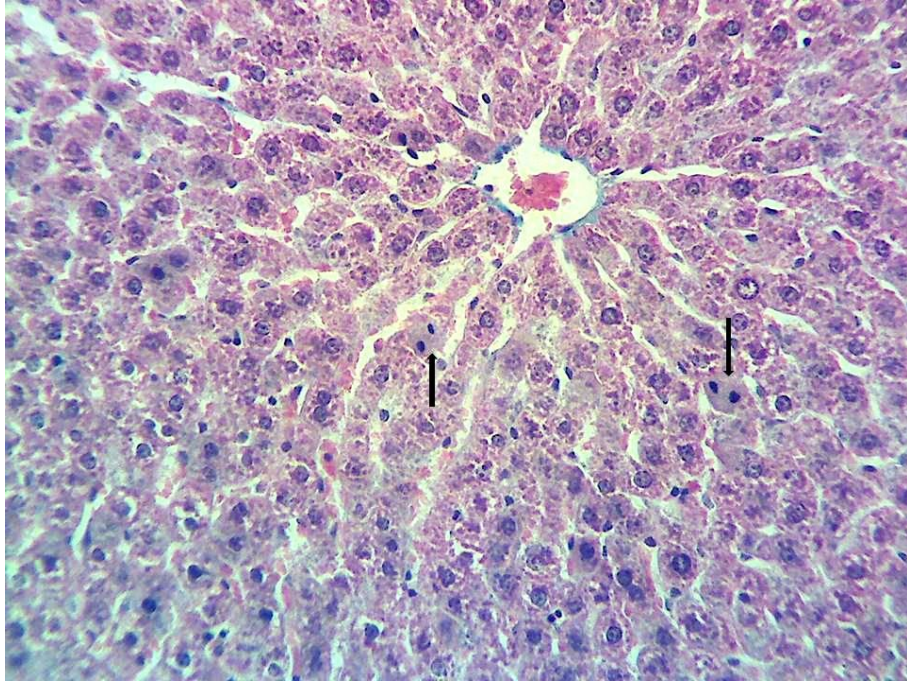
Şekil 32. MTX uygulanan grup karaciğerinde vasküler konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon (+) izlenmekte. PAS X 400



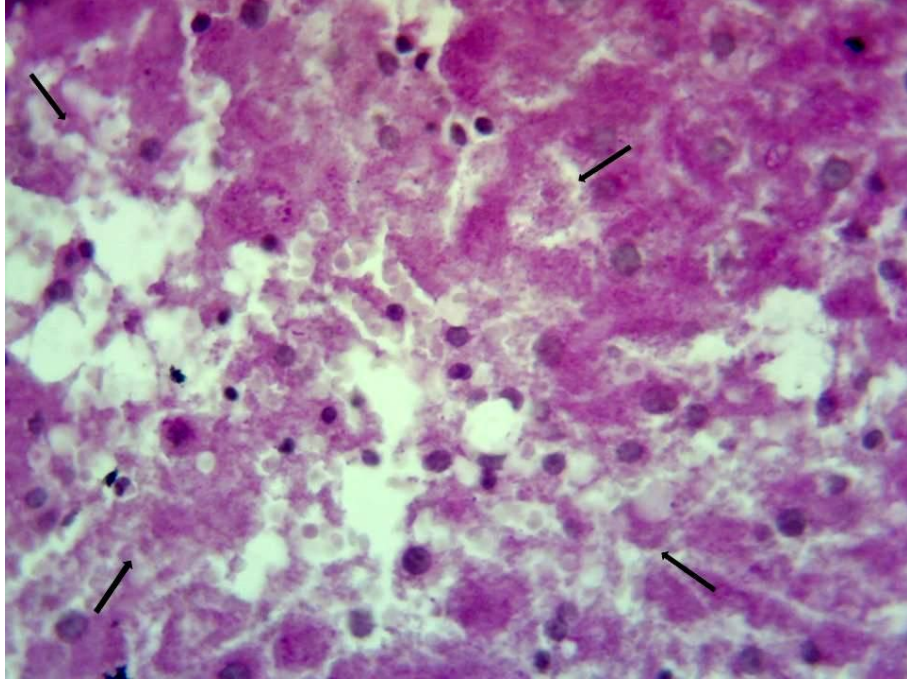
Şekil 33. MTX uygulanan grupta mononükleer hücre infiltrasyonu (→), Zon III'de glikojen depoları boşalmış hepatositler (→) yanında glikojen içeren hepatositler (⇔) ayrırtedilmekte. PAS X 400



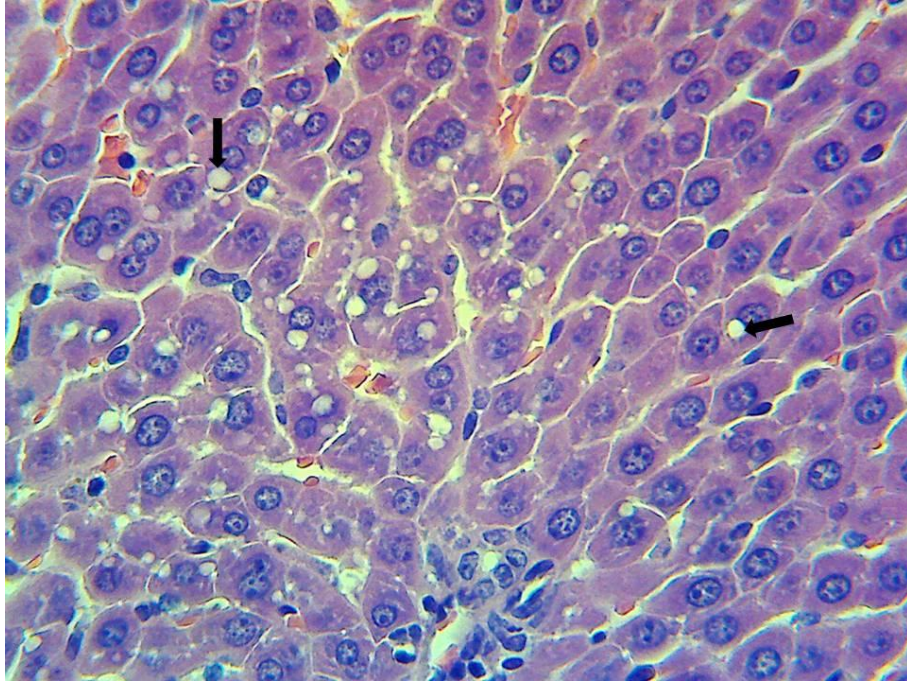
Şekil 34. MTX uygulanan grupta vasküler konjesyon (+) ve sinüzoidal dilatasyon (→) izlenmekte. Masson Trikrom X 200



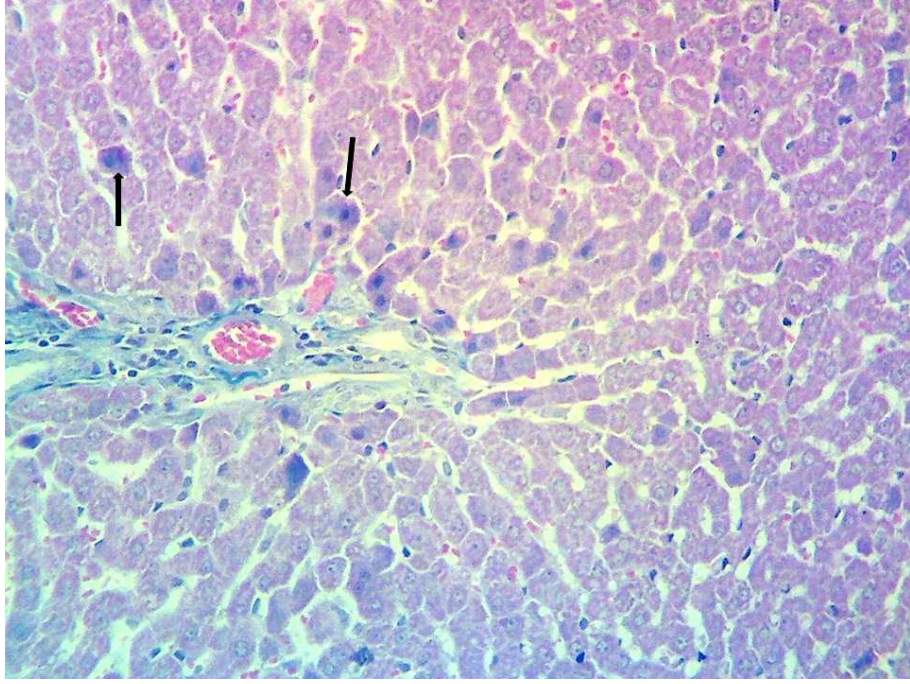
Şekil 35. MTX uygulanan grupta Zon III'de piknotik çekirdekli hepatositler (→) ayırtedilmekte. Masson Trikrom X 200



Şekil 36. Metotreksat uygulanan grupta nekroze bir alan (→) izlenmekte. PAS X 400

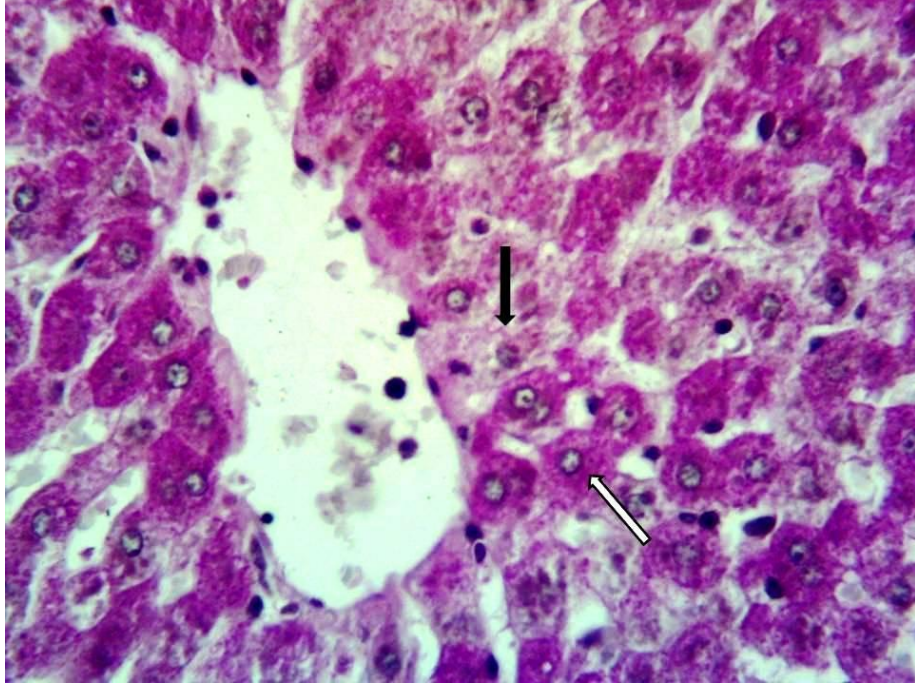


Şekil 37. MTX uygulanan grupta hepatositlerde makroveziküler yağlanma (→) gözlenmekte. H &E X 400

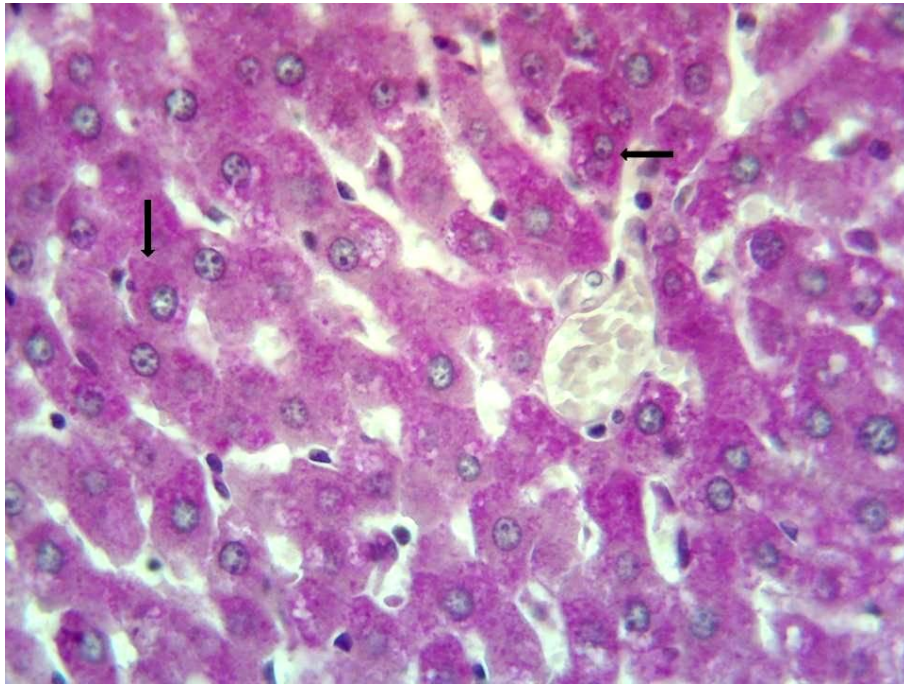


Şekil 38. MTX uygulanan grupta periportal bölgede az sayıda heterokromatik çekirdekli hepatositler(→) izlenmekte. Masson Trikrom X 200

Metotreksat ile birlikte silmarin uygulanan gruba ait deneklerin karaciğer dokuları yapısal olarak, sadece metotreksat uygulanan deneklerin karaciğer dokularına göre belirgin bir iyileşme gösterdi. Glikojen depolarında yer yer azalmalar olmakla birlikte grup IV'e göre daha az olmakla birlikte vasküler konjesyon ve dilatasyon ayırtdildi (şekil: 39-43).



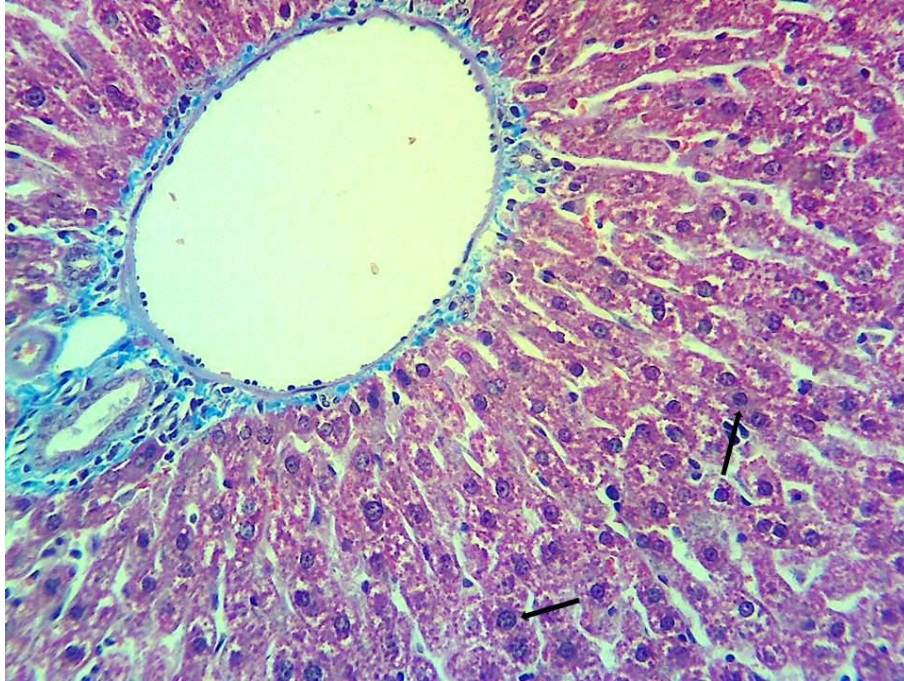
Şekil 39. Tek doz metotreksat ile birlikte silmarin uygulanan grupta glikojen depoları boşalmış (→) ve glikojen içeren hepatositler (⇐) izlenmekte. PAS X400



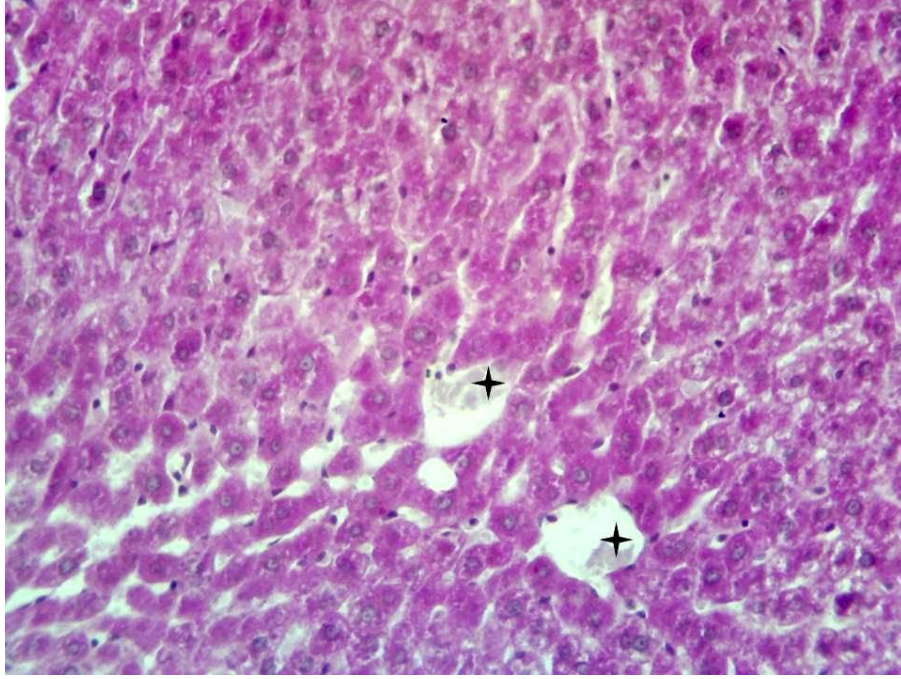
Şekil 40. Tek doz metotreksat ile birlikte silmarin uygulanan grupta glikojen depoları dolu hepatositler (→) gözlenmekte. PAS X400



Şekil 41. MTX ile birlikte silmarin uygulanan grupta zonl'de glikojen depoları dolu hepatositler (→) izlenmekte. PAS X400

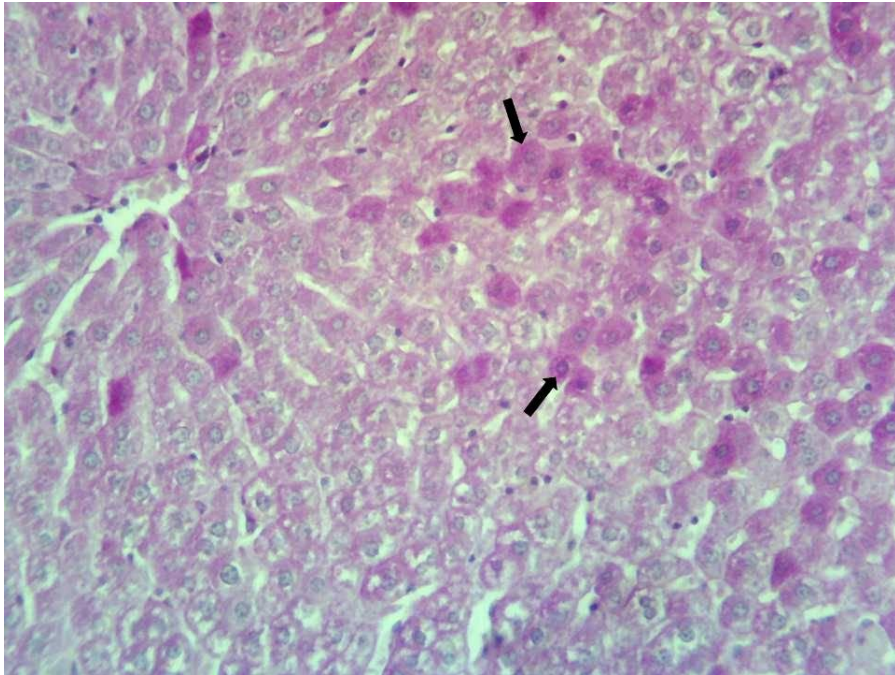


Şekil 42. MTX ile birlikte silmarin uygulanan grupta hepatositler (→) normal görünümde izlenmekte. Masson Trikrom X200



Şekil 43. MTX ile birlikte silmarin uygulanan grupta vasküler konjesyon (+) izlenmekte PAS X 200.

Tek doz MTX ile birlikte CMC uygulanan grubun karaciğer dokuları incelendiğinde yalnızca MTX verilen gruba özgü bulguların varlığı gözlemlendi (Şekil: 44).

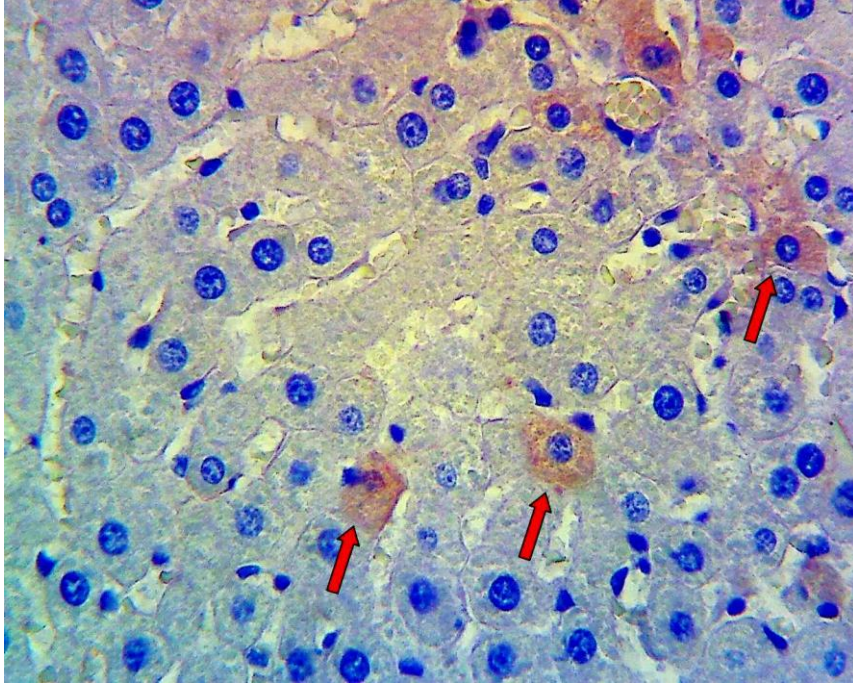


Şekil 44. Metotreksat ile birlikte karboksi metil selüloz uygulanan grupta genel anlamda glikojen depolarının boşaldığı fakat yer yer glikojen içeren hepatositlerin (→) de varlığı ayırtedilmekte. PAS X 200

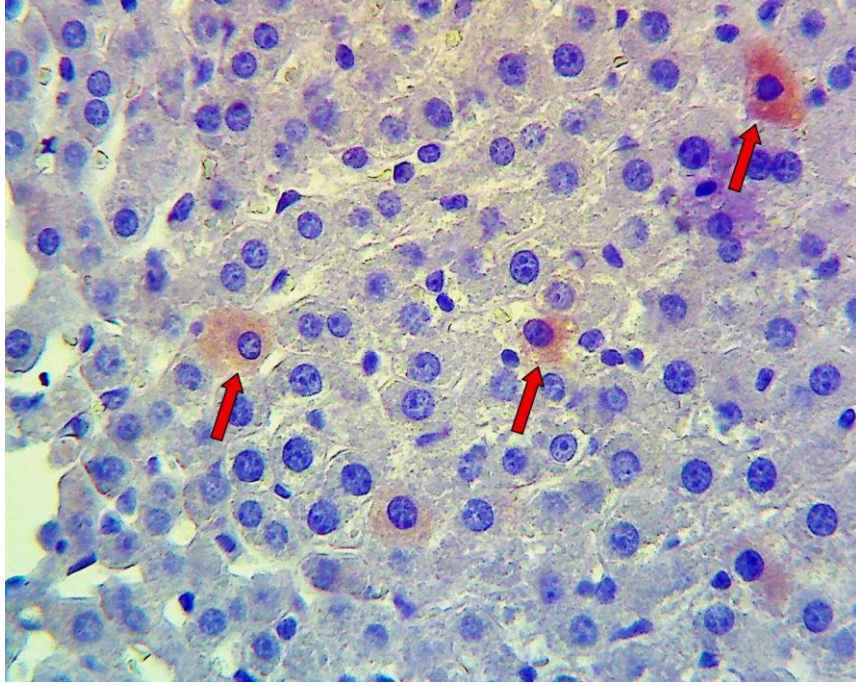
3.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

3.2.1. Bax İmmünreaktivitesi

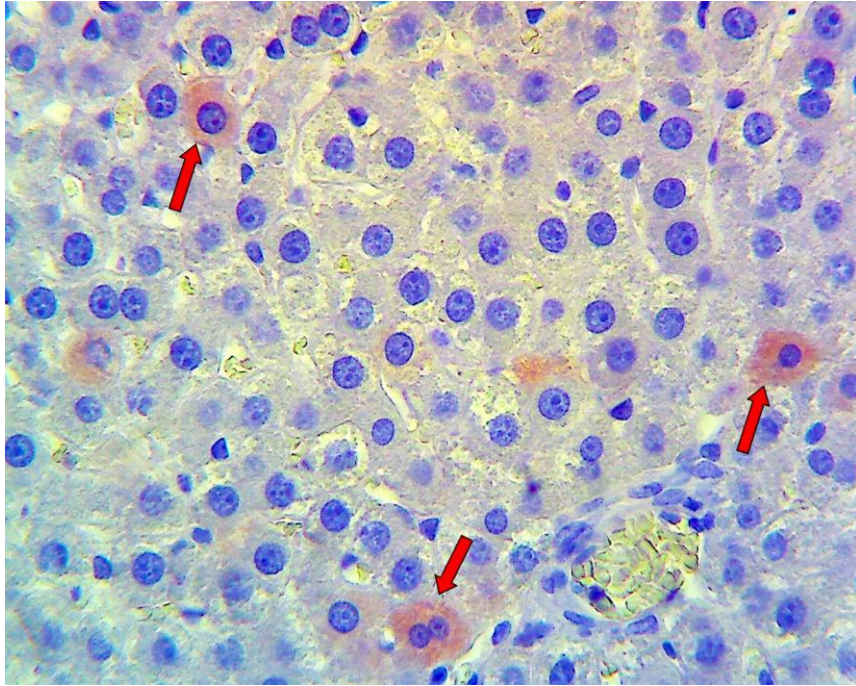
Bax immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; bax immünreaktivitesi kontrol, CMC ve Silmarin grubunda +1 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil: 45-46-47). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTX ve MTX + CMC gruplarında bax immünreaktivitesinde belirgin bir artış vardı ve +3 yaygınlığında olduğu görüldü (Şekil: 48-49). Silmarin'in tedavi olarak verildiği MTX + SİL grubunda ise MTX ve MTX + CMC gruplarına göre bax immünreaktivitesinde belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +2 olarak değerlendirildi (Şekil: 50). Negatif kontrolde herhangi bir boyanma saptanmadı (şekil: 51).



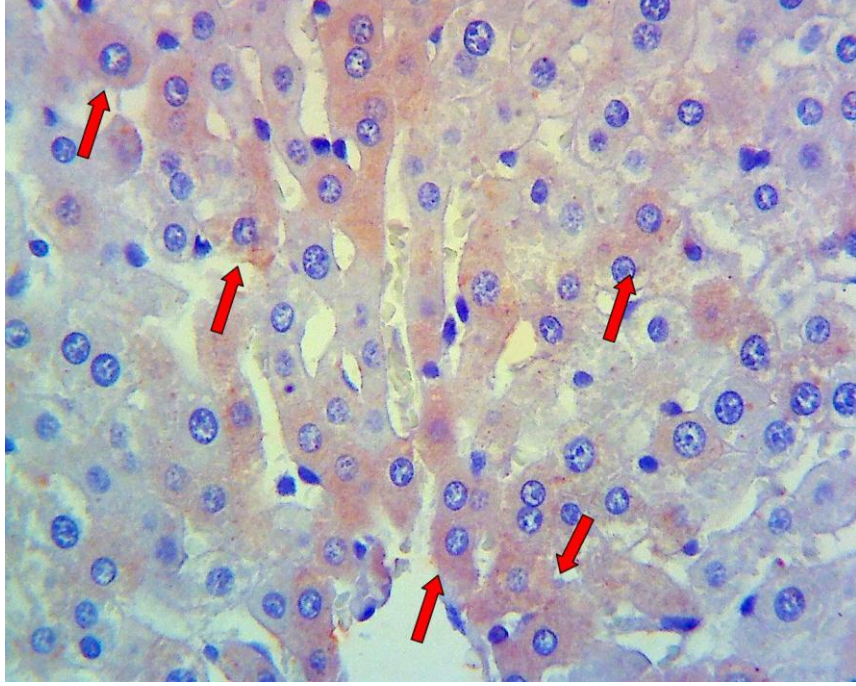
Şekil 45. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda +1 pozitifliğinde Bax immunreaktivitesi (→) X 400



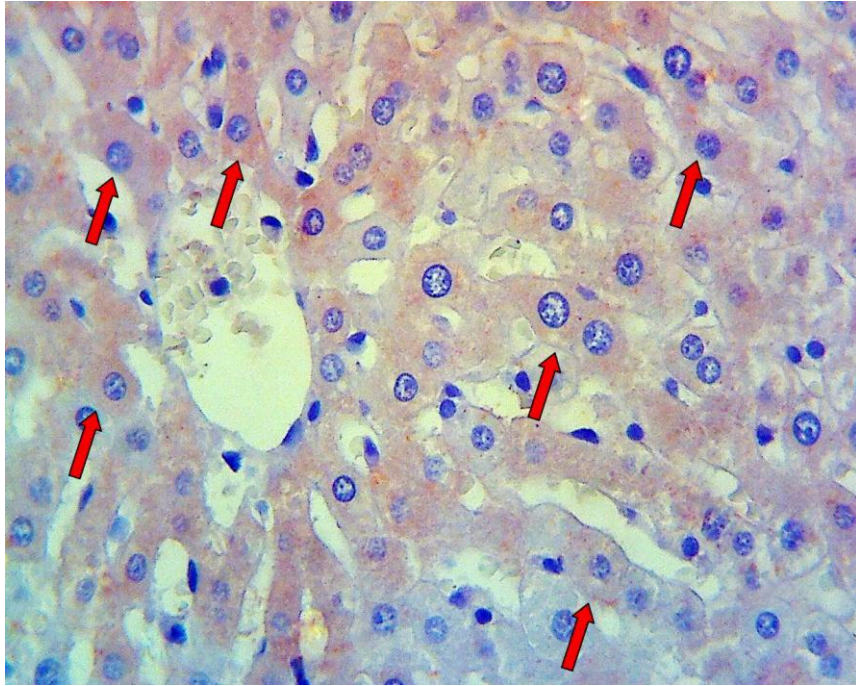
Şekil 46. CMC verilen gruba ait karaciğer dokusunda +1 bax pozitifliğinde immunreaktivitesi (→) X 400



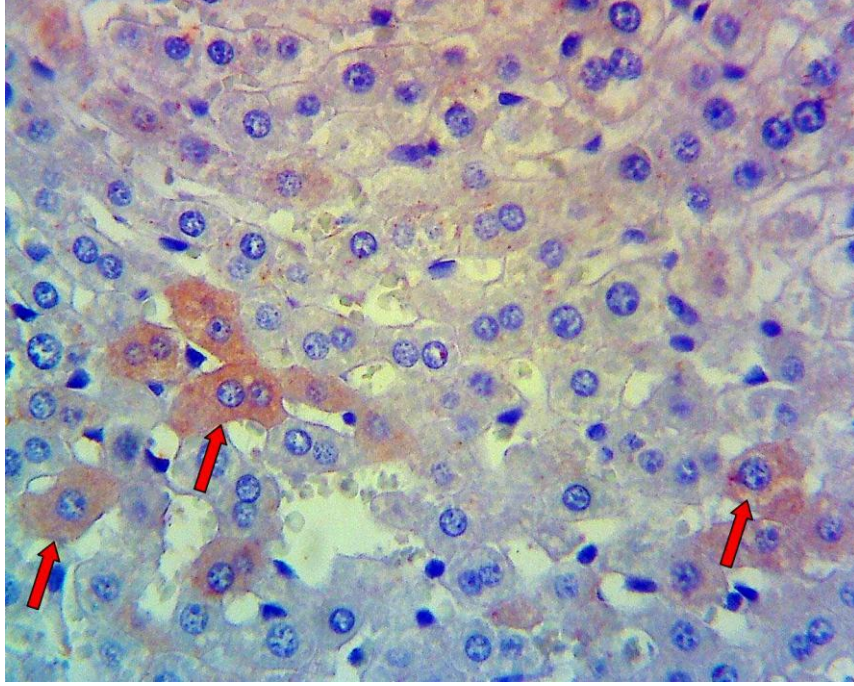
Şekil 47. Silmarin verilen gruba ait karaciğer dokusunda +1 pozitifliğinde bax immunreaktivitesi (→) X 400



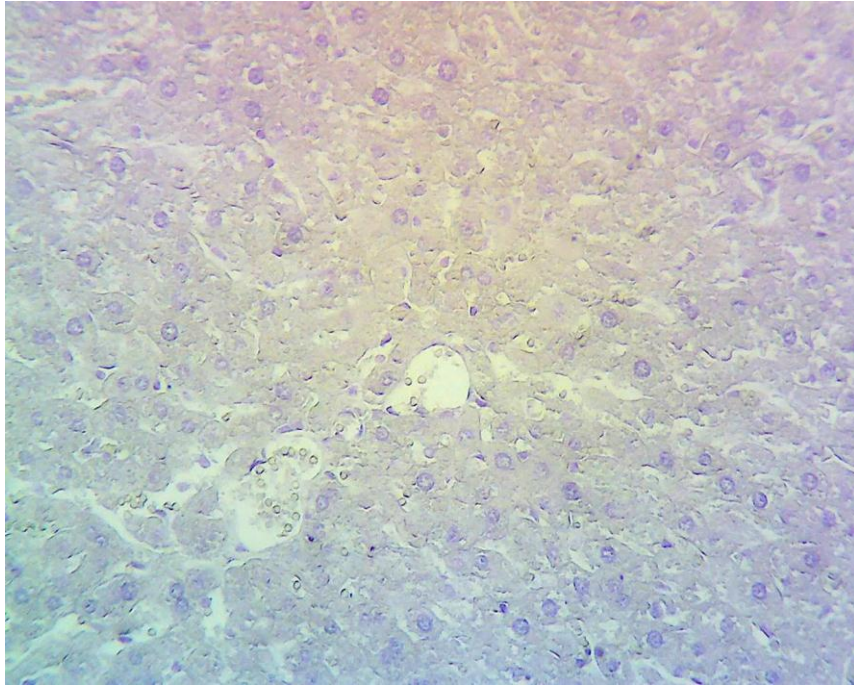
Şekil 48. MTX verilen gruba ait karaciğer dokusunda +3 pozitifliğinde Bax immunreaktivitesi (→) X 400



Şekil 49. MTX ve CMC verilen gruba ait karaciğer dokusunda +3 pozitifliğinde bax immunreaktivitesi (→) X 400



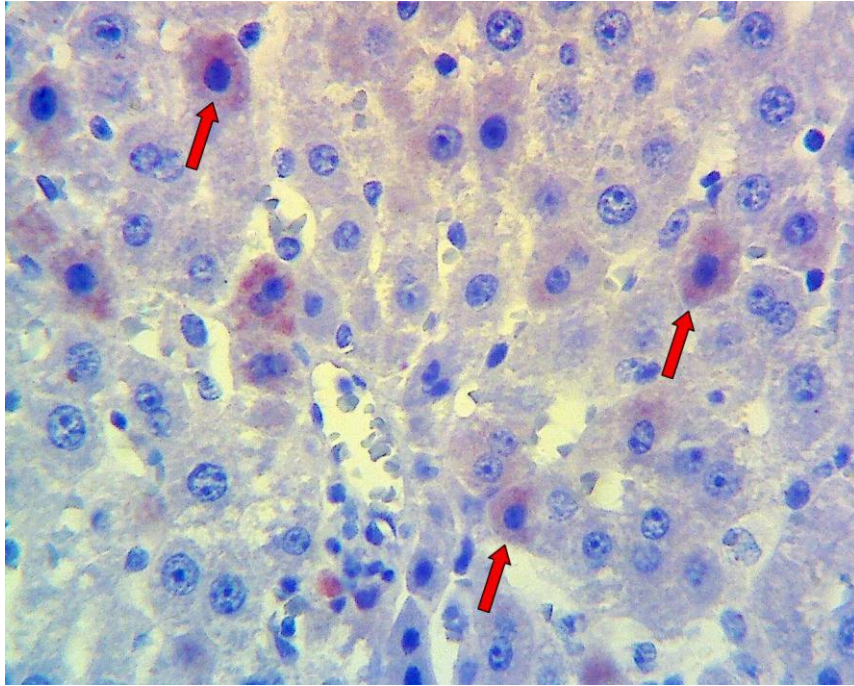
Şekil 50. MTX ve silmarin verilen gruba ait karaciğer dokusunda +2 pozitifliğinde bax immunreaktivitesi (→) X 400



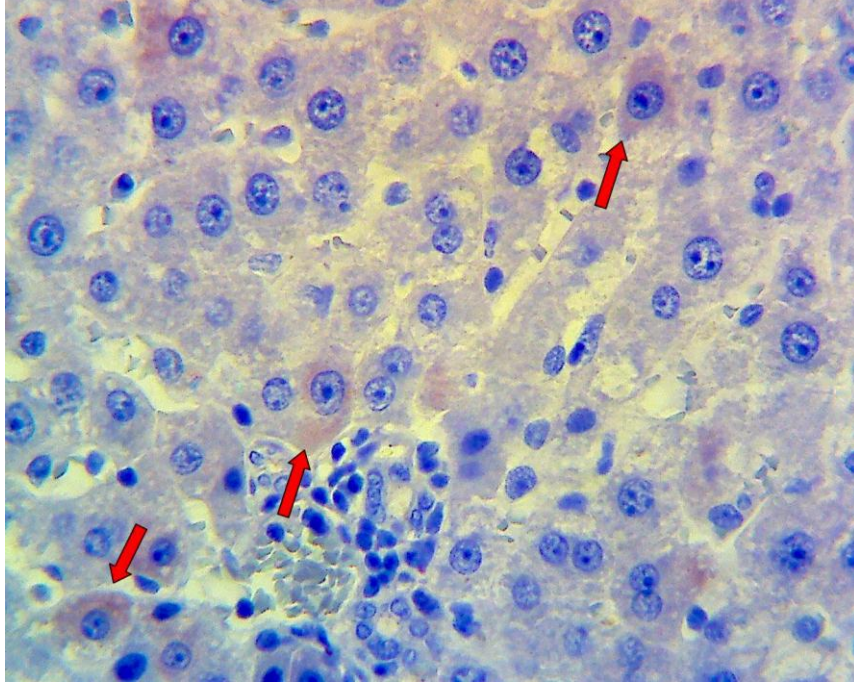
Şekil 51. Negatif kontrol X 200

3.2.2. Kaspaz 3 immünreaktivitesi

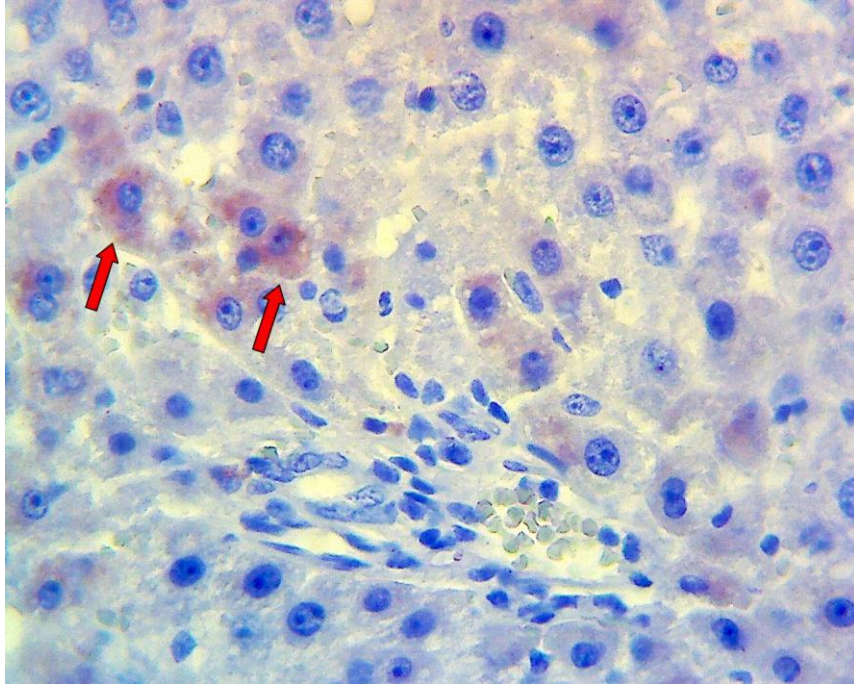
Kaspaz 3 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; kaspaz 3 immünreaktivitesi kontrol, CMC ve Silmarin grubunda +1 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil: 52-53-54). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTX ve MTX + CMC gruplarında kaspaz 3 immünreaktivitesinde belirgin bir artış vardı ve +3 yaygınlığında olduğu görüldü (Şekil: 55-56). Silmarin'in tedavi olarak verildiği MTX + SİL grubunda ise MTX ve MTX + CMC gruplarına göre kaspaz 3 immünreaktivitesinde belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +2 olarak değerlendirildi (Şekil: 57). Negatif kontrolde herhangi bir boyanma saptanmadı (şekil: 58).



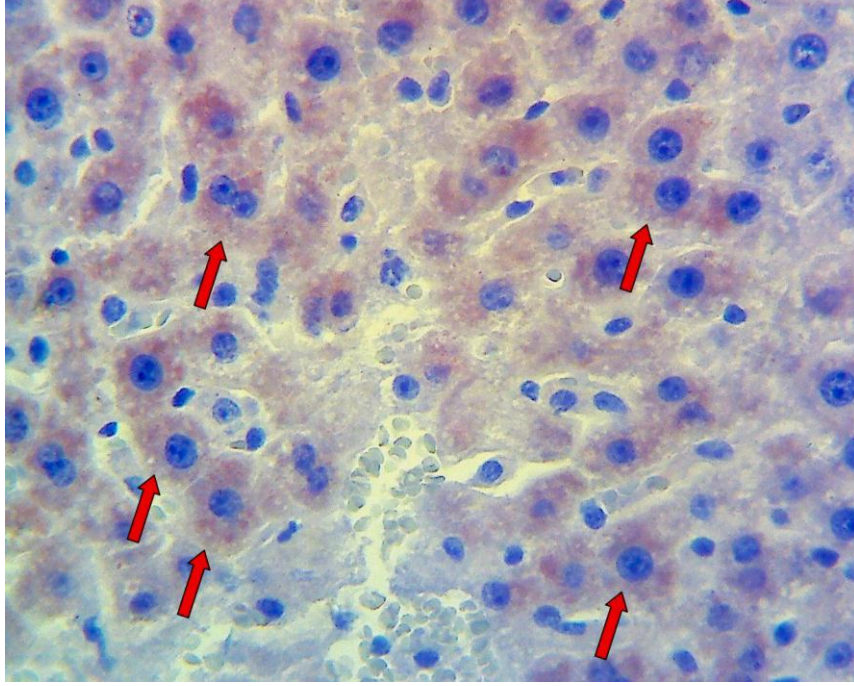
Şekil 52. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda +1 pozitifliğinde Kaspaz immünreaktivitesi (→) X 400



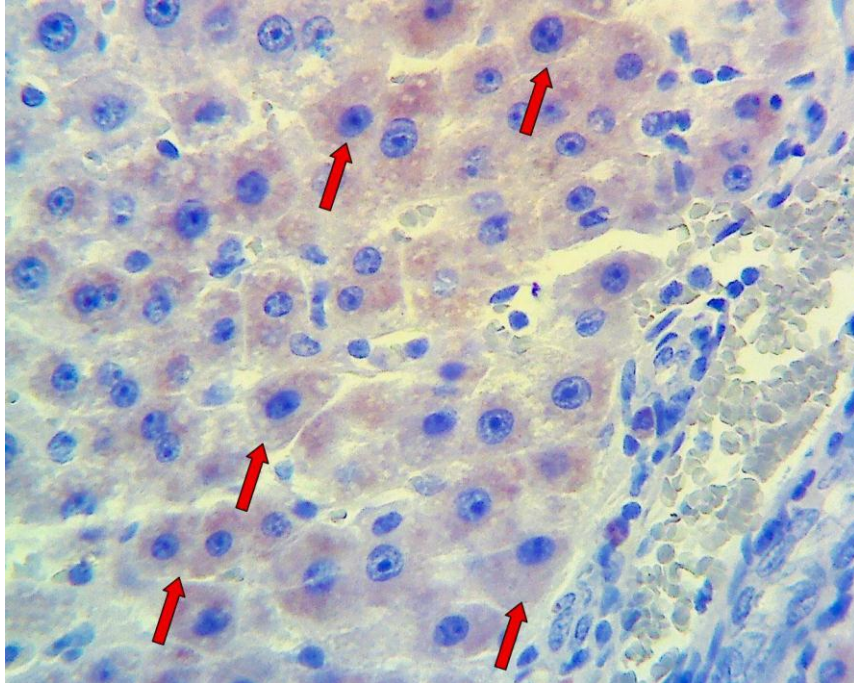
Şekil 53. CMC verilen gruba ait karaciğer dokusunda +1 pozitifliğinde kaspaz immunreaktivitesi (→) X 400



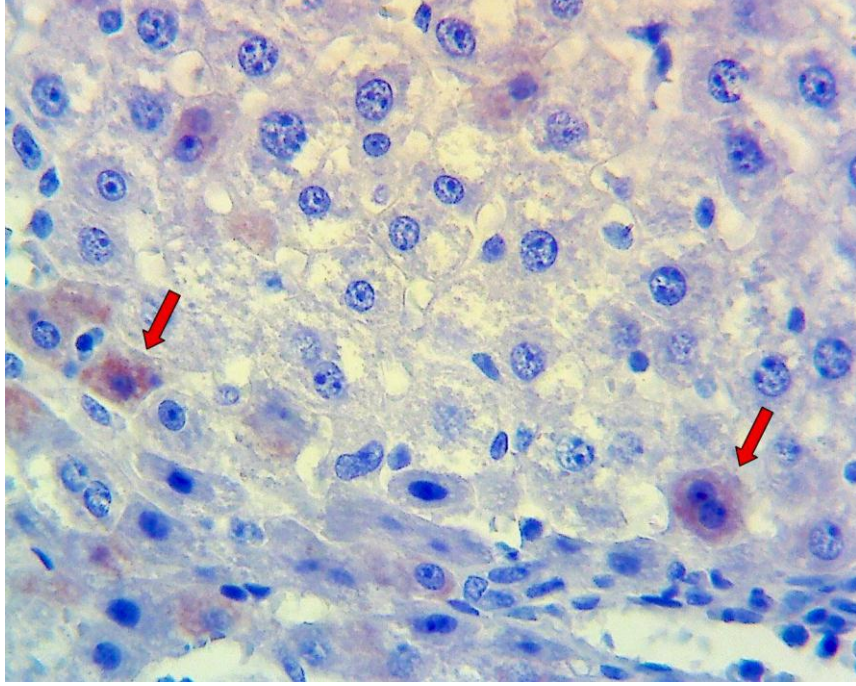
Şekil 54. Silmarin verilen gruba ait karaciğer dokusunda +1 pozitifliğinde kaspaz immunreaktivitesi (→) X 400



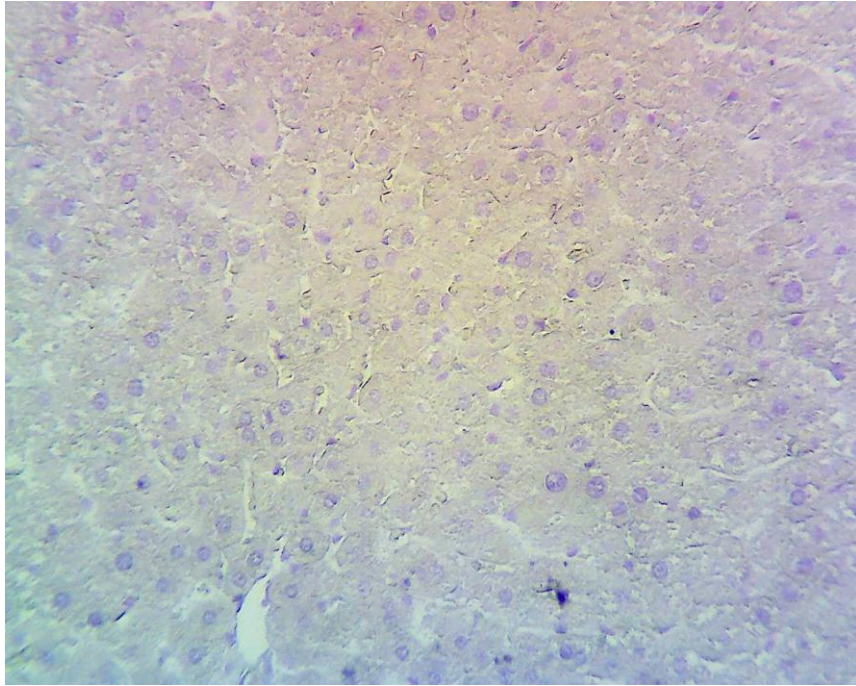
Şekil 55. MTX verilen gruba ait karaciğer dokusunda +3 pozitifliğinde kaspaz immunreaktivitesi (→) X 400



Şekil 56. MTX ve CMC verilen gruba ait karaciğer dokusunda +3 pozitifliğinde kaspaz immunreaktivitesi (→) X 400



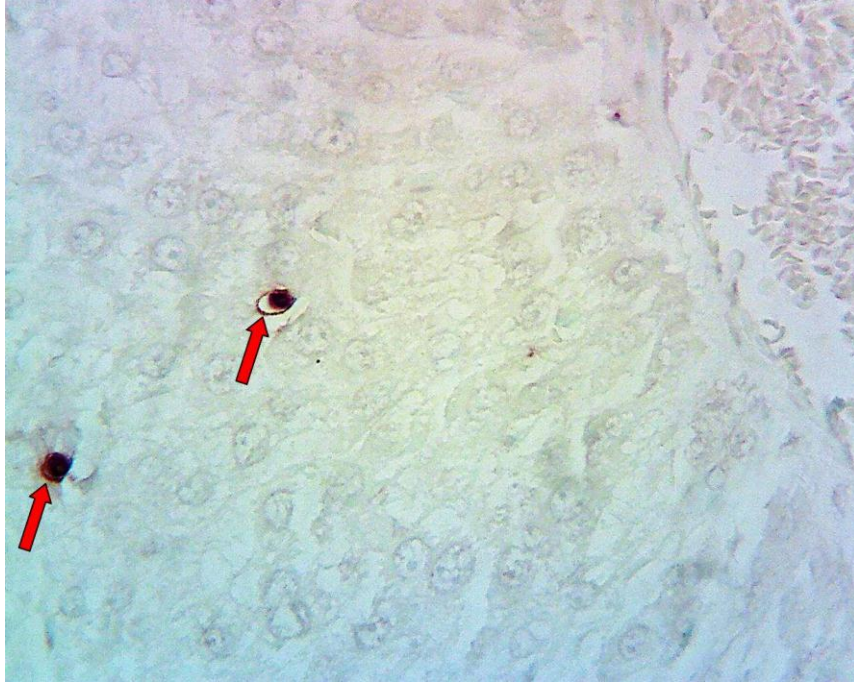
Şekil 57. MTX ve silmarin verilen gruba ait karaciğer dokusunda +2 pozitifliğinde kaspaz immunreaktivitesi (→) X 400



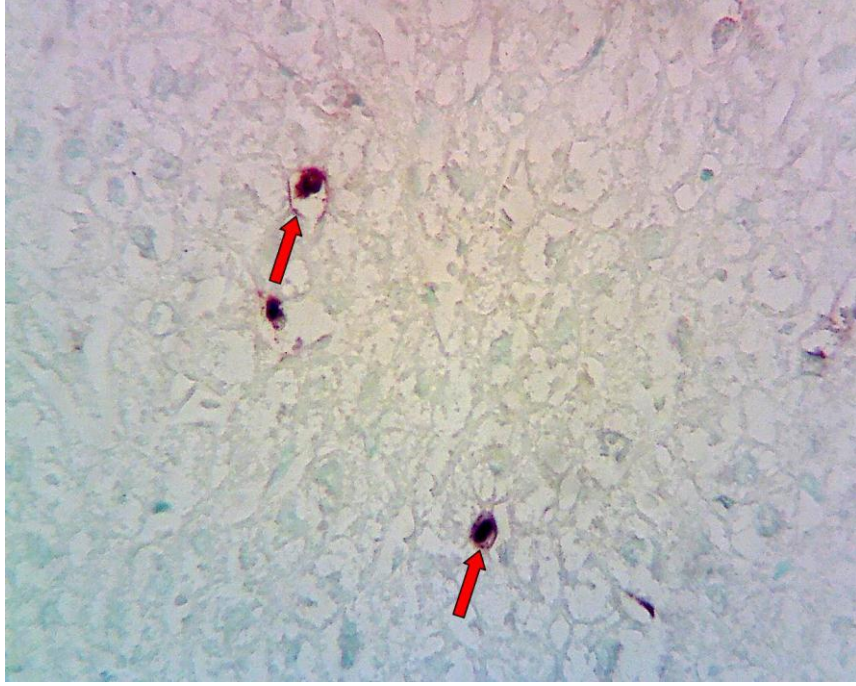
Şekil 58. Negatif kontrol X 200

3.3. TUNEL Bulguları

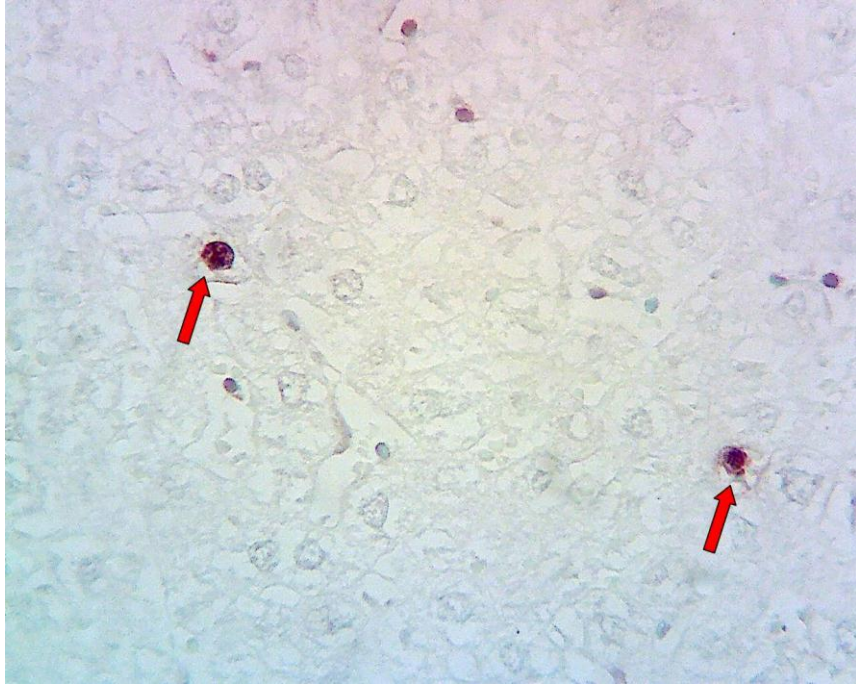
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği kontrol, SİL ve CMC grubunda +1 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil: 59-60-61). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTX ve MTX + CMC gruplarında belirgin bir artış vardı ve +3 yaygınlığında olduğu görüldü (Şekil: 62-63). Silmarin'in tedavi olarak verildiği MTX + SİL grubunda ise MTX ve MTX + CMC gruplarına göre belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +2 olarak değerlendirildi (Şekil: 64). Pozitif kontrol için meme dokusu (Şekil: 65) kullanıldı. Negatif kontrolde TUNEL pozitifliği saptanmadı (şekil: 66)



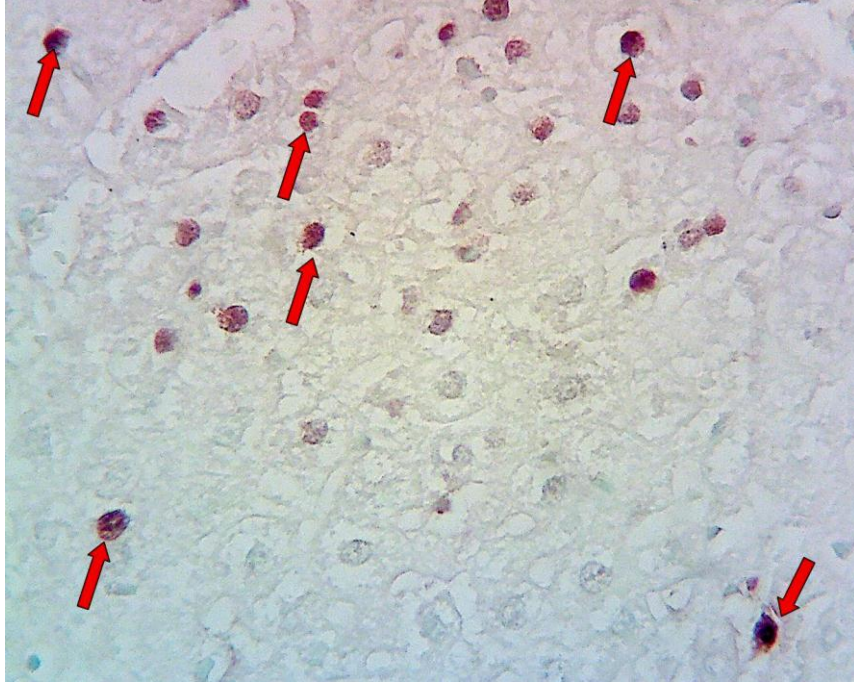
Şekil 59. Kontrol grubunda TUNEL pozitif hücreler (→) X 400



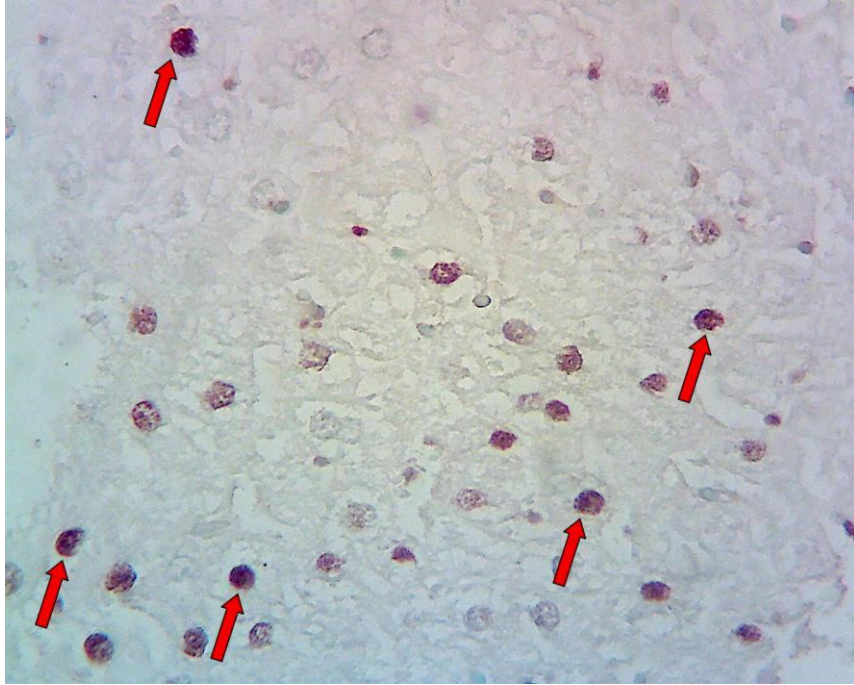
Şekil 60. Silmarin grubunda TUNEL pozitif hücreler (→) X 400



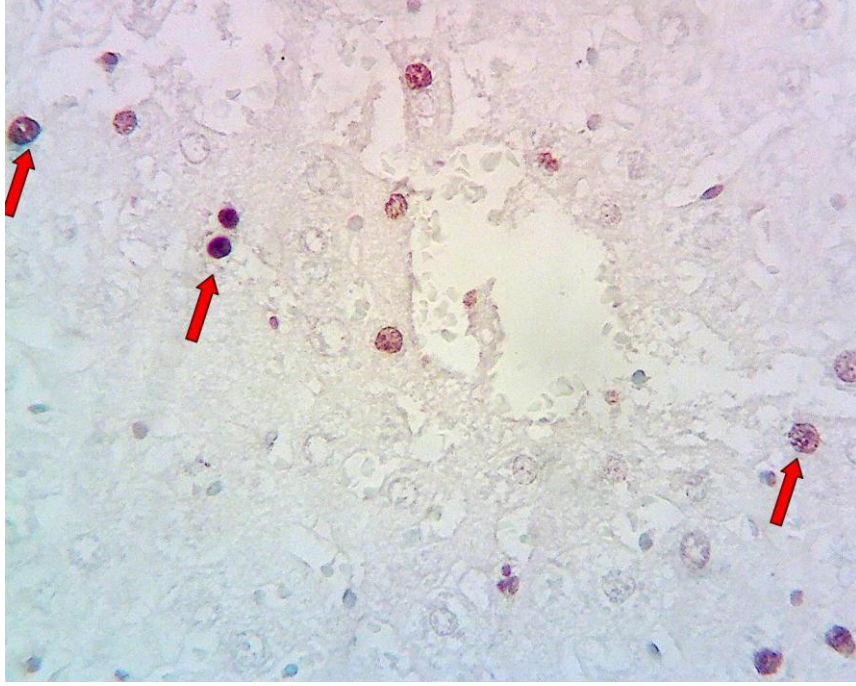
Şekil 61. CMC grubunda TUNEL pozitif hücreler (→) X 400



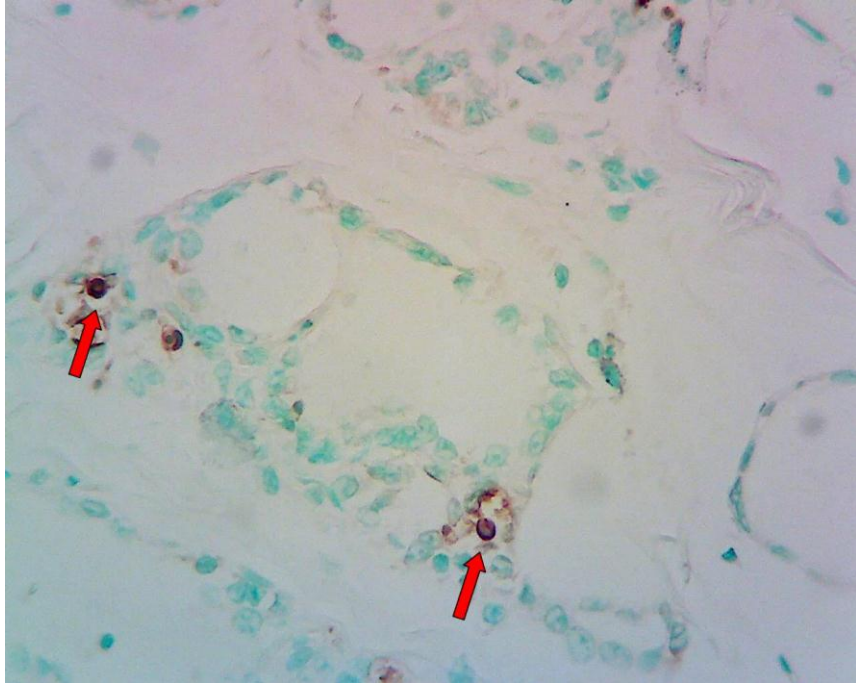
Şekil 62. MTX grubunda artmış TUNEL pozitif hücreler (→) X 400



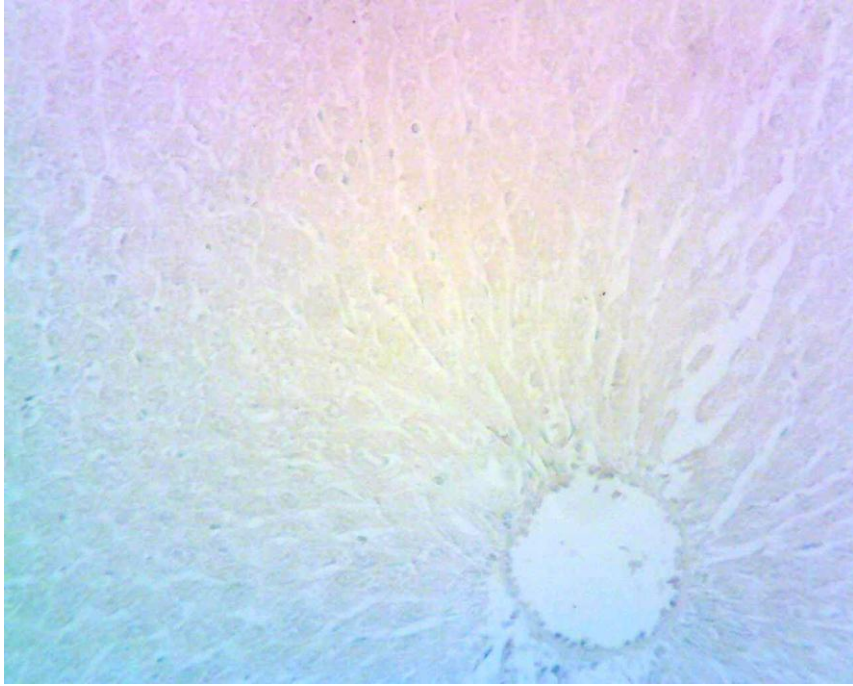
Şekil 63. MTX + CMC grubunda artmış TUNEL pozitif hücreler (→) X 400



Şekil 64. MTX + Silmarin grubunda TUNEL pozitif hücreler (→) X 400

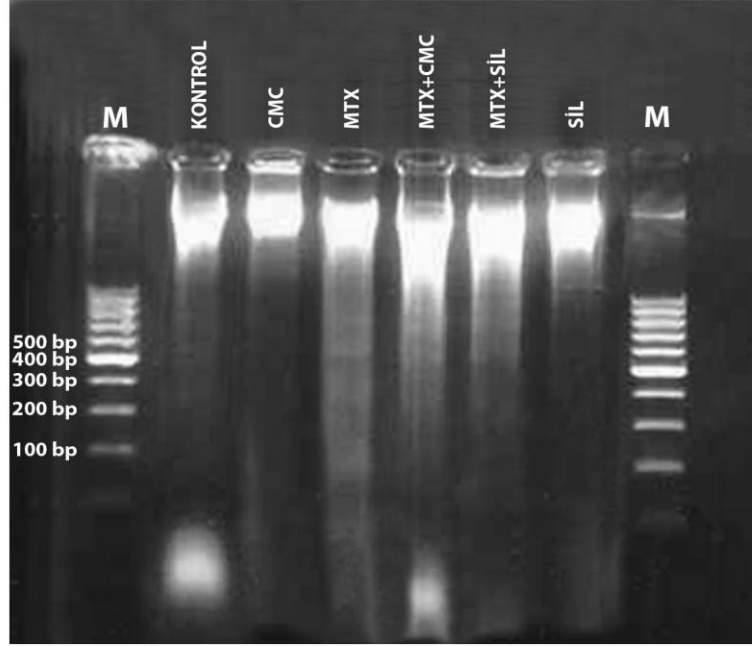


Şekil 65. TUNEL pozitif kontrol. Meme dokusu X 400.



Şekil 66. TUNEL negatif kontrol X 200.

3.4. DNA Fragmentasyon Bulguları



Şekil 67. DNA fragmentasyon jel görüntüsü.

M: 100 bç'lik Marker, Kontrol, CMC: Karboksimetil selüloz, MTX: Metatraksat, MTX+CMC: Metatraksat+Karboksimetil selüloz, MTX+SiL: Metatraksat+Silmarin, SiL: Silmarin

Kontrol, Silmarin ve Karboksimetil selüloz verilen hayvanlardan elde edilen karaciğer doku örneklerinde apoptozis tespit edilmemiştir. MTX, MTX+CMC ve MTX+SİL gruplarında apoptozisin varlığı tespit edilmiştir. Silmarinin MTX'in neden olduğu apoptozisi engellemediği ancak azalttığı belirlenmiştir.

4. TARTIŞMA

MTX, antikanserojen, antiinflamatuvar, antimetabolit etkili bir ilaç olup lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer, meme kanseri yanında psöriasis, dermatomiyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (58). MTX, S fazındaki hücreleri etkileyip hücre replikasyonunda anahtar enzim olan dihidrofolat redüktaz'a bağlanarak pürin ve primidin yapımı için gerekli tetrahidrofolat sentezini inhibe eder (41). Klinikte geniş kullanım alanları olmasıyla birlikte, karaciğer üzerine olan toksik etkisinden dolayı da dikkat çekmektedir (5). Kronik düşük doz MTX, fibrozis ve siroza neden olurken yüksek doz MTX, karaciğer fonksiyon testlerinde ani bozulmaya neden olur (218).

MTX'in böbrek, karaciğer, ince barsak ve kan hücrelerinde oksidan antioksidan sistem üzerine olan etkisi araştırılmış ve mitokondrilerde pirüvat dehidrogenaz, 2 okzogluterat dehidrogenaz ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)'e bağımlı enzimler ile sitozolik nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) bağımlı dehidrogenazları inhibe ettiği gösterilmiştir (219). Sitosolik nikotinamid adenin fosfat dehidrogenaz (NADPDH) ve NADP bağımlı malik enzimin inhibe olması, hücre içi NADPH'ın azalmasına neden olmaktadır. NADPH, önemli bir sitozolik antioksidan madde olan indirgenmiş glutatyonun (GSH) devamlılığını sağlayan glutatyon redüktaz (GSSG-R) enzimi için gerekmektedir. MTX tedavisi nedeniyle GSH seviyesinin azalması, süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroklorik radikaller gibi reaktif oksijen radikallerine karşı hücreleri koruyan antioksidan savunma sistemlerinin etkinliğinin azalmasına neden olduğu bilinmektedir (58).

MTX aracılı toksisite gelişiminin serbest oksijen radikalleri ve hidrojen peroksit ile ilişkili olduğu anlaşılmış ve buna yönelik olarakta, dokuları MTX'ın yaptığı harabiyetten korumak için melatonin, nikotinamid, metiyonin, E vitamini ve N-asetilsistein gibi antioksidan ajanlar denenmiştir (10, 220, 221). Aynı şekilde L-Carnitin, nikotinamid, metionin, melatonin, folik asit (10, 222, 224), üredoksikolik asit gibi antioksidan maddelerin koruyucu etkilerini gösteren birçok deneysel çalışmalar yapılmıştır (225).

Son zamanlarda reaktif oksijen metabolitlerinin, hepatotoksistelerde temel rol

oynadığı iddia edilmiştir (58). Serbest oksijen radikalleri olarak isimlendirilen süperoksit, serbest hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünleri, karaciğer gibi yoğun fizyolojik ve metabolik olayların geçtiği bir ortamda sürekli olarak üretilmekte ve detoksifiye edilmektedir. Oksidatif stres, ROS ve çeşitli sitokinler sebebiyle; hepatosit, Kupffer ve İto hücrelerinin etkileşimiyle gelişen proinflamatuvar olaylara, hepatositlerin apoptoza gitmesine ve sonuçta fibrogenezin oluşmasına katkıda bulunmaktadır (226, 228).

Silmarin deve dikenini bitkisinden (*Silybum marianum*) elde edilen bir flavonoid olup literatürde, pek çok kimyasal madde ve toksin ile oluşan karaciğer hasarını önlemede etkili olduğu bildirilmiştir (176).

Silmarinin hepatoprotektif etkilerinde ana mekanizmalar antioksidan rol alması olup lipid peroksidasyonunu engellemesi, glutatyon azalmasına engel olarak güçlü detoksifikasyon ve koruyucu etkiler yapmaktadır. Yine çalışmalarda liopoksinaz enzimini inhibe ederek karaciğerde lökotrien oluşumunu engellediği, hepatositlerde protein sentezini arttırdığı, tümör öncüllerinin aktivitesini azalttığı, mast hücre stabilizasyonunu sağladığı, immun fonksiyonları modüle ettiği ve antiinflamatuvar ve antifibrotik etkileri gösterilmiştir (176). Antioksidan özelliğine bağlı olarak silmarinin bazı nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmüştür (177, 178).

Silmarin içerdiği flavano-lignanlar ve diğer polifenolik bileşikler ile antioksidan özellik göstermekte ve buna bağlı olarak serbest radikal tutucu işlevi bulunmaktadır (229).

Silmarin glutatyon peroksidaz, süperoksid dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin pankreatik aktivitelerini uyarır ve makrofajlardaki ve T-lenfositlerdeki interlökin 1 β , interferon- γ , interferon- α gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ederek pankreastaki β hücrelerini de korumaktadır (169, 175, 177, 179).

Silmarin ultraviyolenin tetiklediği oksidatif stres, inflamasyon, immün cevap ve DNA hasarı gibi tehlikeli etkileri baskılar ve azaltır. Silmarinin apoptoz sinyal yollarında, kaspaz aktivasyonu üzerine koruyucu etkileri vardır. Silmarin sitotoksiteyi ve kaspaz aktivitesini ortadan kaldırır. Bcl ve Bax oranını artırır. (169, 185, 186).

Deneysel çalışmalarda MTX, ratlara farklı dozlarda ve farklı uygulama

yolları ile verilmiştir. Biz; MTX'ı, daha önceden doku toksisite çalışmalarında belirlendiği gibi tek doz olarak ve 20 mg/kg intraperitoneal olarak verdik (6, 10).

Yaptığımız bu çalışmada MTX ve MTX ile beraber CMC uygulanan gruba ait doku örneklerinde; Remark kordonlarının ışınal yapısının bozulduğu, hepatositlerin normal yapılarını korumadığı, hepatositlerdeki glikojen depolarının azaldığı, sinuzoidlerde genişleme, vasküler konjesyon ve özellikle portal alanlarda daha yaygın olmakla birlikte mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü. Yine bu grupta piknotik çekirdekli hepatositler, makroveziküler yağlanma ve hiperkromatik çekirdekli hepatositler ayırtıldı. MTX ile birlikte silmarin verilen tedavi grubundaki sıçan karaciğer dokularında bazı alanlarda sinuzoidal genişleme, vasküler konjesyon ve inflamasyonun belirtisi olan mononükleer hücre infiltrasyonunun azaldığı, yine hepatosit glikojen depolarının kontrol grubuna benzer şekilde dolduğu tesbit edildi.

MTX kullanımı ile ilgili karaciğer histolojisi üzerine yan etkileri yağ infiltrasyonu, inflamasyon, hücresel nekroz ve nihayet fibrozis olarak bulunmuştur (5). MTX makroveziküler yağlı değişikliğe neden olan ilaçlar arasındadır. MTX ile ilgili toksisitenin histolojik özellikleri minör yağlı değişiklik, hepatosit anizonükleozis, hafif portal inflamasyon ve fokal nekrozdaki, daha ciddi hepatosellüler nekroz, fibrozis ve siroza kadar değişir. Yine ilacın yüksek kümülatif dozda verildiği bazı hastalarda, diğer risk faktörleri olmadan da karaciğer yağlanması gibi patolojiye rastlanabilir (230).

Vardı ve ark. (231) çalışmamızdakine benzer şekilde deney hayvanlarına MTX uygulamış ve tedavi olarak bir antioksidan olan β Karoten vermişlerdir. Çalışmalarında MTX verilen deney hayvanlarının karaciğer dokularında çalışmamıza benzer şekilde sinuzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve apoptotik hücreler göstermişlerdir. Tedavi gruplarında ise kontrole yakın bulguların olduğunu tesbit etmişlerdir. Doku düzeyinde MTX verilen grupta MDA değerlerinde anlamlı artış olurken tedavi gruplarında kontrole yakın MDA seviyesi olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, MTX uygulanan deneklerin karaciğerlerinde meydana gelen histopatolojik değişikliklerin; oksidatif hasarın artmasına bağlı olduğunu, silmarin uygulanmasının bu değişiklikleri iyileştirdiği ve bu olumlu etkilerin antioksidan özellikten kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Jahovic ve ark. (10) MTX verilmesinin kan, karaciğer, böbrek ve ince

barsakta glutatyon (GSH) seviyelerinin azalmasına, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) seviyelerinin artmasına neden olduğunu göstermişlerdir.

Son zamanlarda reaktif oksijen metabolitlerinin hepatotoksisitede temel rol oynadığı iddia edilmiştir (58). Serbest oksijen radikalleri olarak isimlendirilen süperoksit, serbest hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünleri, karaciğer gibi yoğun fizyolojik ve metabolik olayların seyrettiği bir ortamda sürekli olarak üretilmekte ve detoksifiye edilmektedir. Oksidatif stres, ROS ve çeşitli sitokinler sebebiyle; hepatosit, Kupffer ve İto hücrelerinin etkileşimiyle gelişen proinflamatuvar olayların, hepatositlerin apoptoza gitmesine ve sonuçta fibrogenezin oluşmasına katkıda bulunmaktadır (226, 228).

Miyazono ve ark. (232) MTX'ın rat ince barsağında süperoksid dismutaz (SOD), katalaz aktivitelerini ve GSH seviyelerini azalttığını gösterip MTX'ın yol açtığı ince barsak hasarında, oksidatif stresin önemli rol oynadığını öne sürmüşlerdir.

Serbest radikaller, dokular üzerindeki doğrudan zararlı etkilerinin yanı sıra, ilgili dokularda lökositlerin birikimini tetikler ve böylece aktive nötrofiller aracılığıyla dolaylı olarak doku hasarını ağırlaştır. Daha önceki çalışmalarda MTX aracılı oksidatif karaciğer hasarına katkıda bulunan nötrofil birikiminin kantitatif bir belirteci olarak, myeloperoksidaz düzeyleri kullanılmıştır (10). Myeloperoksidaz nötrofil infiltrasyonunun bir belirtecidir. Aktive nötrofiller myeloperoksidaz, elastaz, proteaz gibi bazı enzimler salgılar ve oksijen radikallerini açığa çıkarırlar (233). Bunun yanında serbest oksijen radikallerinin, lipid peroksidasyonu yoluyla hücre membranındaki hasar oluşumunda temel bir rol oynadığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehidtir. MDA, lipid peroksitlerinin düzeylerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmakta olup lipid peroksidasyonunun derecesi ile yakın korelasyon göstermektedir (234, 235).

Silmarinin hepatoprotektif etkisi in vitro ve in vivo pek çok çalışma ile gösterilmiş olsa da, etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Silmarinin etki mekanizması; serbest radikallere karşı antioksidan gibi davranması ve sitokin üretimi üzerindeki immun regülatuar etkisi şeklinde olmaktadır (236).

Srivastava ve ark. (209) yaptıkları çalışmalarında silmarinin tümör nekroz faktör alfa'nın (TNF- α) neden olduğu apoptotik hücre ölümüne karşı da koruyucu

etkili olduğunu (15) Sonnenbichler ve ark. (209) da hepatosit RNA-polimeraz I aktivitesini artırdığını tesbit etmişlerdir.

Çalışmamızda apoptotik proteinler olduğu bilinen Bax ve kaspaz 3'ün immünohistokimyası ile birlikte DNA fragmantasyonunu gösteren TUNEL ve Agaroz jel elektroforezi yapılması sonucunda; MTX verilen deney grubunda apoptozun artışı tedavi olarak verilen silmarinin apoptozu azalttığı gösterilmiştir.

Kaspaz oranındaki artış bir dokuda apoptozise eğilimin arttığını göstermektedir (237). Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle, ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın ekspresyonunu arttırarak mitokondri aracılığıyla veya Fas ekspresyonunu arttırarak ekstrinsik yolla apoptozisi başlatabilir (238, 239).

Apoptozis gelişiminde superoksit, peroksinitrit ve hidroksil radikali gibi radikal oluşumundaki artışın yol açtığı oksidatif stresin etkin rol oynadığı saptanmıştır. Bu radikallerin hem mitokondri, hem plazma membranı, hem de genom üzerine etkilerle apoptotik süreci tetikleyebildiği bildirilmiştir (238, 242).

Kaspazlar olarak bilinen bazı sitoplazmik proteinler apoptozis sürecinde rol oynamaktadır. Bunlardan bazıları (Kaspaz 2, 8, 9) öncül kaspazlar olarak bilinirken, diğerleri (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Sitokrom C'nin sitoplazmaya çıkması sonucu inaktif olan prokaspaz-9 aktif kaspaz-9'a, aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazların, özellikle kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olur ki, bu durum apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna neden olur (238, 239, 241, 243).

Çalışmamızdaki ışık mikroskopik olarak gösterilen piknotik ve heterokromatik çekirdekli hepatositlerin varlığı da bu kaspazların aktive edildiğine dair immünohistokimyasal çalışmayı destekleyici bir bulgu olabilir.

Silmarin ve bileşiklerinin hayvan ve insan çalışmalarında hepatoprotektif özelliğinin olduğu saptanmış ve hepatoprotektif etkisinin ana mekanizmasının serbest radikal süpürücüsü olmasından kaynaklandığı görülmüştür. Silmarin ve türevlerinin bilinen en önemli özelliklerinden biri, antikanser aktivitesidir. Burada ise silmarin, kemoterapötikler tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı dokuları korumada bir antioksidan olarak etki etmektedir (169).

Valenzuela ve ark. (168) Silmarinin hücre redükte glutatyon seviyesinde artışa neden olduğunu, Zhao ve ark. (244) SOD aktivitesini arttırdığını, Bosisio ve ark. (245) ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Mira ve ark. (246) ise silmarinin hücre membranını radikal hasarından koruduğunu ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek hepatosit membranında lipid içeriğini düzenlediğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak;

1) 20mg/kg verilen MTX ın sıçan karaciğer dokusunda histopatolojik ve apoptotik değişikliklere neden olduğu,

2) MTX ile beraber Silmarin kullanımının karaciğer dokusunda bulguları azaltmasına rağmen tamamen iyileştirmediği,

3) MTX ve Silmarinin uygulanan doz ve süresinde değişiklikler yapılarak yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu,

4) MTX'ın klinikte çok geniş kullanım alanı olmasından dolayı karaciğer dokusunda yaptığı değişikliklerin patofizyolojisinin farklı mekanizmalarının aydınlatılabilmesi gerekliliği,

5) Gelecekte daha ileri ve ayrıntılı çalışmalar yapılarak MTX kullanımıyla birlikte meydana gelebilecek istenmeyen etkileri önlemek amacıyla Silmarin ile ilişkili tedavi yaklaşımlarının klinik kullanımının güncel olabileceği, kanaatine varılmıştır.

5. KAYNAKLAR

1. Kremer JM, Maini RN, Romain PL. Major side effects of low-dose methotrexate. *Uptodate* 2009; 53:17-21.
2. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* 2006; 11: 694-703.
3. Fiehn C. Methotrexate in rheumatology. *Z Rheumatol* 2009; 68: 747-756.
4. Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Yeoh AS, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DM. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev* 2007; 33: 448-460.
5. Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M, Senturk O, Avsar E, Haklar G, Celikel C, Hulagu S, Tozun N. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1071-1077.
6. Sener G, Eksioglu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Yegen BC. Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol* 2006; 542: 170-178.
7. Hardman, J.G., Limbird, L.E. (Ed) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. ABD, The McGraw-Hill Companies. 2001: 1321-1338.
8. Widemann BC, Balis FM, Kempf-Bielack B, Bielack S, Pratt CB, Ferrari S, Bacci G, Craft AW, Adamson PC. High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer* 2004; 100: 2222-2232.
9. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 1983; 309: 1094-1104.
10. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 2003; 34: 282-287.
11. Göktürk E. Serbest radikaller ve antioksidanlar. *Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1999; 20: 32-37.
12. Alidoost F, Gharagozloo M, Bagherpour B, Jafarian A, Sajjadi SE, Hourfar H, Moayedi B. Effects of silymarin on the proliferation and glutathione levels of peripheral blood mononuclear cells from beta-thalassemia major patients. *Int*

- Immunopharmacol 2006; 6: 1305-1310.
13. Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clinical Drug Investigation* 2002; 22: 51-65.
 14. Dvorák Z, Kosina P, Walterová D, Simánek V, Bachleda P, Ulrichová J. Primary cultures of human hepatocytes as a tool in cytotoxicity studies: cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from *Silybum marianum*. *Toxicol Lett* 2003; 137: 201-212.
 15. Srivastava S, Srivastava AK, Srivastava S, Patnaik GK, Dhawan BN. Effect of picroliv and silymarin on liver regeneration in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 1994; 26: 19-22.
 16. Elkins TE, Bury RJ, Ritter JL, Ling FW, Ahokas RA, Homsey CA, Malinak LR. 1984. Adhesion prevention by solutions of sodium carboxymethylcellulose in the rat. *Fertil Steril* 41: 926-928
 17. Sadler TW, ed. Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyoloji*. Basaklar C (Çev. Ed.), Ankara, Palme Yayıncılık, 1993: 230-231.
 18. Moore KL, ed. Moore KL, Persaud T.V.N. klinik yönleriyle insan embriyolojisi Dalçık H., Yıldırım M. (Çev. Ed.) Nobel Tıp Kitabevi, 2009: 218-220.
 19. Şeftalioğlu A, ed. Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. 3. baskı. Tıp teknik yayıncılık Ltd. Şti. Ankara 1998: 301-302.
 20. Arıncı K , ed. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. 3. Baskı (2. Cilt), Ankara: Günes Kitabevi, 1997: 265-272.
 21. <http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/h fram19.html>.
 22. Bannister LH, ed. Bannister LH. *Alimentary System*. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Fergusson MWJ, (editors). *Gray's Anatomy*. 38th Edition, New York. Churchill Livingstone, 1995: 1795-1813.
 23. Moore KL, ed. Moore KL, Agur AMR. *Essential Clinical Anatomy*. Elhan A. (Çev. Ed.), Ankara, Günes Kitabevi, 2006: 173.
 24. Snell RS, ed. 2004. Snell RS. *Clinical Anatomy for Medical Students*. Yıldırım M. (Çev. Ed.), İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri, 2004: 229.
 25. Wanless IR, ed. Wanless IR. *Anatomy, Histology, Embryology, and Developmental*

- Anomalies of the Liver. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. 8th Edition, Saunder Elsevier, Philadelphia,USA 2006: 1543-1585.
26. Junqueira LC, ed. Junqueira L.C. Carneiro J. Karaciğer, In: Aytekin Y., Solakoğlu S. (eds) Temel Histoloji: Text & Atlas, Nobel Matbaacılık, 2009; 323-337.
 27. Eşrefoğlu M, ed. Eşrefoğlu M. Özel histoloji Medipres yayıncılık Ltd. Şti. 2009: 106-120.
 28. Kierszenbaum AL, ed. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Payolojiye Giriş. Demir R (Çev.Ed.), Ankara, Palme Yayıncılık, 2009; 459-469.
 29. William KO, ed. William K.O., Patrick C.N. Karaciğer, In: Müftüoğlu S., Kaymaz M., Atilla P. (eds) Netter's Essential Histology, Ankara, Güneş Kitabevi 2009; 312-325.
 30. Sodeman's ed. Sodeman's Pathologic Physiology, Mechanism's of disease. Cilt II. Bölüm 4.1986: 178-190.
 31. www.octc.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes8%20digestive.
 32. Paker Ş. Karaciğer, In: Paker Ş. (ed) Histoloji, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları. 1993: 32.
 33. Kierszenbaum AL, ed. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Payolojiye Giriş. Demir R (Çev.Ed.), Ankara, Palme Yayıncılık, 2006; s.459-469.
 34. Cowley AW, Jr., Mori T, Mattson D, Zou AP. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 284: 1355-1369.
 35. Ge ZD, Zhang DX, Chen YF, Yi FX, Zou AP, Campbell WB, Li PL. Cyclic ADP-ribose contributes to contraction and Ca²⁺ release by M1 muscarinic receptor activation in coronary arterial smooth muscle. J Vasc Res 2003; 40: 28-36.
 36. Guyton AC, Hall JE, eds. Tıbbi Fizyoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2006:802-804.
 37. Ganong WF, ed. Karaciğer ve safra sistemi, In: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği. (eds) Ganong Tıbbi Fizyoloji, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri 2002: 479-489.
 38. Abraham LK, ed. Karaciğer , In: Demir R. (ed) Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş, Ankara, Palme Yayıncılık. 2006: 459-472.

39. Junqueira LC, Carneiro J, eds. Karacığer, In: Aytekin Y., Solakoğlu S. (eds) Temel Histoloji : Text & Atlas, Nobel Matbaacılık; 323-337; 2009.
40. Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. Arch Pathol Lab Med 2007; 131: 1728-1734.
41. Chabner BA, Allegra A, Curt C. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? J Clin Invest 1985; 76:907-912.
42. Flores F, Kerdel FA. Other novel immunosuppressants. Dermatol Clin 2000; 18: 475-83.
43. Gillman Ga, ed. Tedavinin Farmakolojik Temeli. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2009; 1315-405.
44. Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; 764: 217-54.
45. Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. Biol Res Nurs 2005; 6:187-195.
46. 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. Semin Arthritis Rheum. 1998;27:277-92.
47. Kishi T, Tanaka Y, Ueda K. Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy. Cancer 2000; 89:925-931.
48. Hirata S, Matsubara T, Saura R, Tateisbi H, Hirohata K. Inhibition of in vitro vascular endothelial cell proliferation and in vivo neovascularization by lowdose methotrexate. Arthritis Rheum 1989; 32:1065-73.
49. 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 1998; 27:277-292.
50. Kimura E, Nishimura K, Sakata K, Oga S, Kashiwagi K, Igarashi K. Methotrexate differentially affects growth of suspension and adherent cells. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36:814-825.
51. Kane D, Gogarty M, O'Leary J, Silva I, Bermingham N, Bresnihan B, Fitzgerald O. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine

- expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3286-95.
52. Baggott JE, Morgan SL, Ha TS, Alarcon GS, Koopman WJ, Krumdieck CL. Antifolates in rheumatoid arthritis: a hypothetical mechanism of action. *Clin Exp Rheumatol* 11 1993; 8:101-105
 53. Cronstein BN. Molecular therapeutics. Methotrexate and its mechanism of action. *Arthritis Rheum* 1996; 39:1951-1960.
 54. Gibson LE, Perry HO. Papulosquamous eruption and exfoliative dermatitis: *Dermatology*. Third edition. Moschella SL, Hurley HJ(eds) WB Saunders, Philadelphia 1992: 607-622.
 55. Herman RA, Veng-Pedersen P, Hoffman J, Koehnke R, Furst DE. Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *J Pharm Sci* 1989; 78: 165-71.
 56. Hamilton RA, Kremer JM. Why intramuscular methotrexate may be more efficacious than oral dosing in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1997; 36: 86-90.
 57. Hardman JG, Limbird, LE (Ed) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. ABD, The McGraw-Hill Companies 2001: 1300-1398.
 58. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit* 2006 ;12: 274-278.
 59. Işık A, Işılçay L, Erdemli EA, Akbay C, Anafarta K. Sıçan Testisinde Metotreksat'ın Işık Ve Elektron Mikroskop Düzeyinde Etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 1997: 50.
 60. Brock S, Jennings HR. Fatal acute encephalomyelitis after a single dose of intrathecal methotrexate. *Pharmacotherapy* 2004; 24: 673-676.
 61. Hedman J, Seideman P, Albertioni F, Stenius-Aarniala B. Controlled trial of methotrexate in patients with severe chronic asthma. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 49: 347-349.
 62. Linnebank M, Pels H, Kleczar N, Farmand S, Fliessbach K, Urbach H, et al. MTX-induced white matter changes are associated with polymorphisms of methionine metabolism. *Neurology* 2005; 64: 912-913.

63. Krajinovic 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* 2005; 6: 293-302.
64. Vezmar S, Becker A, Bode U, Jaehde U. Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. *Chemotherapy* 2003; 49: 92-104.
65. Kayaalp SO, ed. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Ankara: Hacettepe-Taş Yayıncılık. 2005; 317-343.
66. Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 832-835.
67. Uz E, Oktem F, Yilmaz HR, Uzar E, Ozguner F. The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 2005; 277: 165-170.
68. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001; 2: 67-74.
69. Scandalios J, Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004;18:1791–1800.
70. Akkuş İ, ed. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları 1995; 3-95.
71. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-493.
72. Warner DS, Sheng H, Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 2004; 207: 3221-3231.
73. Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs* 2005; 21: 24-28.
74. Memişoğulları R. The Role of Free Radicals and the effect of Antioxidant in Diabetes. *Düzce Tıp Fakültesi Tıp Dergisi* 2005; 3: 30-39.
75. Burçak G, Gülnur A. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaslanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*

- 2004; 35: 159-169.
76. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri, Temel Tıptan Kliniği. Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33: 110-118.
 77. Hajieva P, Behl C. Antioxidants as a potential therapy against age-related neurodegenerative diseases: amyloid Beta toxicity and Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 699-704.
 78. Chen SX, Schopfer P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur J Biochem* 1999; 260: 726-735.
 79. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle-70 years later. *Redox Rep* 2001; 6: 229-234.
 80. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3-4: 92-5.
 81. Foote CS, Shook FC, Abakerli RB. Characterization of singlet oxygen. *Methods Enzymol* 1984; 105: 36-47.
 82. Moncada S. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 735-59.
 83. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
 84. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 2031-2036.
 85. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142 231-255.
 86. 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* 2004; 43: 439-448.
 87. Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterr Health J* 1998; 4: 350-360.
 88. <http://www.doctorslounge.com/primary/articles/freeradicals/freeradicals11.html>.
 89. Ramachandra M, Atencio I, Rahman A, Vaillancourt M, Zou A, Avanzini J, Wills K, Bookstein R, Shabram P. Restoration of transforming growth factor Beta signaling by

- functional expression of smad4 induces anoikis. *Cancer Res* 2002; 62: 6045-6051.
90. Akkus İ, ed. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler, Vols. 1. baskı. Konya: Mimoza Yayınları 1995; 91-102.
 91. Köse K, Doğan P. Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi Prof. Dr. Ahmet Bilge Ek Sayısı*: 1992; 340-350.
 92. Basu S. The enigma of in vivo oxidative stress assessment: isoprostanes as an emerging Target. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition* 2007; 51: 48-61.
 93. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994; 52: 253-265.
 94. <http://www.lookchem.com/cas-542/542-78-9.html>.
 95. Kayalı R, Çakata Y. Protein Oksidasyonu. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004; 35: 83-89.
 96. Mishra PC, Singh AK, Suihai S. Interaction of singlet oxygen and superoxide radical anion with guanine and formation of its mutagenic modification 8-oxoguanine. *Int J Quantum Chem* 2005; 102: 282-301.
 97. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004; 567: 51-61.
 98. Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev* 2005; 31: 603-617.
 99. Kurutas EB, Güler FD, Kılınç M. Serbest radikaller arşiv. 2004; 13: 120-132.
 100. Jenkins RR, Teng J. Catalase activity in skeletal muscle of varying fibre types. *Experientia* 1981; 37: 67-68.
 101. Tanırgan G, Koldas M, Uras F. Serbest radikaller: an introduction 10 free radical biochemistry. *Haseki Tıp Bülteni* 1994; 32: 304-308.
 102. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1332-1340.
 103. Tian WN, Braunstein LD, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, Stanton RC. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol* 1999; 276: 1121-1131.
 104. Leopold JA, Cap A, Scribner AW, Stanton RC, Loscalzo J. Glucose-6-phosphate

- dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *FASEB J* 2001; 15: 1771-1773.
105. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-1590.
 106. Caro AA, Cederbaum AI. Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine in Fe(2+)-initiated oxidations. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1303-1316.
 107. Delogu G, Antonucci A, Moretti S, Marandola M, Tellan G, Signore M, Famularo G. Oxidative stress and mitochondrial glutathione in human lymphocytes exposed to clinically relevant anesthetic drug concentrations. *J Clin Anesth* 2004; 16: 189-194.
 108. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.
 109. Harlan JM, Levine JD, Callahan KS, Schwartz BR, Harker LA. Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide. *J Clin Invest* 1984; 73: 706-713.
 110. Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV, Alperi JD. Menopause: a review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr* 2006; 42: 289-306.
 111. Drisko JA, Chapman J, Hunter VJ. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2003; 88: 434-439.
 112. Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr* 2001; 20: 591-598.
 113. Borekova M, Hojerova J, Koprda V, Bauerova K. Nourishing and Health Benefits of Coenzyme Q 10. . *Czech J Food Sci* 2008; 26: 229-241.
 114. So A, Thorens B. Uric acid transport and disease. *J Clin Invest* 2010; 120: 1791-1799.
 115. Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J* 2005; 26: 257-264.
 116. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr* 2005; 164: 775-778.

117. Cetiner M, Sener G, Sehirli AO, Eksioglu-Demiralp E, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N, Akpulat S, Tecimer T, Yegen BC. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 209: 39-50.
118. Mathes AM. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 6087-6097.
119. Lee WJ, Park JY, Lee KU, eds. α -Lipoic Acid Prevents Diabetes Mellitus and Endothelial Dysfunction in Diabetes-Prone Obese Rats. Newyork: CRC Press. 2008; 261-89.
120. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397-400.
121. Cotran RS, Robbins SL, Kumar V, eds. Robbins Basic Pathology, Vols. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2002; 4-31.
122. <http://t0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQoAa0hIBuW96ekLoNbmoCoBKx0Oa1M1Cf8P1npBR9BzrlvYjEb>.
123. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
124. Krishnaswamy K, Sushil K. Oxidative stres and apoptosis. *Pathophysiology* 2000; 7: 153-163.
125. Öztürk F. Apopitoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 9: 143- 148.
126. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; 192: 1-15.
127. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7162-7160.
128. Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY. Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 487-490.
129. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 2000; 74: 1-20.
130. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* 2001; 2: 91-95.
131. Bjelakovic G, Nagorni A, Bjelakovic M, Stamenkovic I, Arsic R, Katic V. Apoptosis: programmed cell death and its clinical implications. *Medicine and Biology* 2005; 12:

6-11.

132. Ergin M, Alkan S. Apoptosis. *Arsiv* 2002; 11: 495.
133. Cummings MC, Winterford MC, Walker NI, eds. *Apoptosis, Vols. Second Edition*: Lipincott-Raven Publishers. 1997; 3-21.
134. Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslet C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of tromboxane B2. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 269-73.
135. Wyllie AH, Kerr JF, Macaskill IA, Currie AR. Adrenocortical cell deletion: the role of ACTH. *J Pathol* 1973; 111: 85-94.
136. Kumar V, Abbas A, Fausto N, eds. *Cellular Adaptations, Cell injury and Cell Death, Vols. 7th ed.* Philadelphia: Elsevier 2005; 26-32.
137. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.
138. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis of autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 267: 1456-62.
139. Chen Q, Fisher AB, Strayer DS, Bates SR. Mechanism for secretagogue-induced surfactant protein A binding to lung epithelial cells. *Am J Physiol* 1998; 275: 38-46.
140. Oren M, Rotter V. Introduction: p53--the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 9-11.
141. Hao H, Yenari MA, Cheng D, Sapolsky RM, Steinberg GK. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. *J Neurochem* 2003; 85: 1026-1036.
142. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
143. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ, 2nd. Lung infections: role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Chest* 2000; 117: 1771-7.
144. Johnson DE. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia* 2000; 14: 1340-4.

145. Majid DS, Said KE, Omoro SA, Navar LG. Nitric oxide dependency of arterial pressure-induced changes in renal interstitial hydrostatic pressure in dogs. *Circ Res* 2001; 88: 347-51.
146. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6.
147. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.
148. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
149. Arama E, Agapite J, Steller H. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell* 2003; 4: 687-697.
150. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993; 75: 641-652.
151. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 2005; 18: 335-350.
152. Padosch SA, Vogel P, Bottiger BW. Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, physiopathology and treatment strategies. *Anaesthesist* 2001; 50: 905-920.
153. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003; 348: 1365-1375.
154. Assuncao GC, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1638-1650.
155. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 99-103.
156. Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF, et al. Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 1999; 457: 217-236.
157. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet* 2009; 46: 497-510.
158. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları. *Biyokimya Anabilim Dalı* 2008: 15-26
159. Dubska L, Matalova E, Mısek I. Detection of Apoptosis in Parafin Embedded Tissues:

- the Influence of Tissue Type and Fixation. *Acta Vet. BRNO* 2002; 71: 529-553.
160. Hekim N. Apoptosis. In *Kalıtısal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu*, 2003: 115-140.
 161. Katherine L, Jonathan M. Advances in Cytochemical Methods for Detection of Apoptosis. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 821-832
 162. Jin WP, Quan XQ, Meng FP, Cui XD, Pi HJ. Relationship among hepatocyteapoptosis, P450 2E1 and oxidative stress alcoholic liver disease of rats. *Zhongguo WeiZhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2007; 19: 419-421.
 163. Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: 1309-1318.
 164. Ding T, Tian S, Zhang Z, Gu D, Chen Y, Shi Y, Sun Z. Determination of active component in silmarin by RP-LC and LC/MS. *J Pharmacol Biomed Anal* 2001; 26: 155-161.
 165. Parveen R, Baboota S, Ali J, Ahuja A, Vasudev SS, Ahmad S. Effects of silmarin nanoemulsion against carbon tetrachloride-induced hepatic damage. *Arch Pharm Res* 2011; 34: 767-774.
 166. Demartini G, Esposti D. Pharmacology of Silmarin. *Clin Drug Invest* 2002; 22: 51-65.
 167. Aktoğlu S, Yorgancıoğlu A, Çırak K. Clinical spectrum pulmonary and pleural tuberculosis: A Report of 5480 case. *Eur. Respir. Dis* 1996; 9: 2031-2035.
 168. Valenzuela A, Garride A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silmarin and of its structural isomer silibinin. *Biol. Res* 1994; 27: 105-112.
 169. Kren V, Walterova D. Silybin and Silmarin-new effects and applications. *Biomed Papers* 2005; 149: 29-41.
 170. Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S. Comparative pharmacokinetics of silipide and silmarin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1993; 18: 289-297.
 171. Mennicke W, ed. What is known about the metabolism and pharmacokinetics of silmarin. Munich, Berlin, Vienna: Urban & Schwarzenberg. 1976; 98-102.
 172. Pepping J. Milk thistle: *Silybum marianum*. *Am J Health Syst Pharm* 1999; 56: 1195-1197.

173. Schandalik R, Gatti G, Perucca E. Pharmacokinetics of silybin in bile following administration of silipide and silmarin in cholecystectomy patients. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 964-968.
174. Zi X, Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7490-7495.
175. Kang JS, Jeon YJ, Park SK, Yang KH, Kim HM. Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1 and prostaglandin E2 synthesis by silmarin. *Biochem Pharmacol* 2004; .67: 175-181.
176. Miguez MP, Anundi I, Sainz-Pardo LA. Hepatoprotective mechanism of silmarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chem Biol Interact* 1994; 91: 51-63.
177. Nencini C, Giorgi G, Micheli L. Protective effect of silmarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine* 2007; 14: 129-135.
178. Soliman Kf, Mazzio Ea. In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 218: 390-397.
179. Soto C, Recoba R, Barron H, Alvarez C, Favari L. Silmarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 2003; 136: 205-212 .
180. Tager M, Dietzmann J, Thiel U, Neumann KH, Ansorge S. Restoration of the cellular thiol status of peritoneal macrophages from CAPD patients by the flavonoids silibinin and silmarin. *Free Rad Res* 2000; 34: 137-151.
181. Yang Sh, Lin JK, Chen WS, Chiu JH. Anti-angiogenic effect of silmarin on colon cancer LoVo cell line. *J Surg Res* 2003; 113: 133-138.
182. Singh RP, Tyagi AK, Zhao J, Agarwal R. Silmarin inhibits growth and causes regression of established skin tumors in Sencar mice via modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis. *Carcinogenesis* 2002; 23: 499-510.
183. Svobodova A, Walterova D, Psotova J. Influence of silmarin and its flavonolignans on

- H₂O₂- induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts. 2006; 32.
184. Huang Q, Wu LJ, Tashiro SI, Onodera S, Li LH, Ikejima T. Silmarin augments human cervical cancer HeLa cell apoptosis via P38/JNK MAPK pathways in serum-free medium. *Journal of Asian Natural Products Research* 2005; 7: 701-709.
185. Kang JS, Park SK, Yang KH, Kim HM. Silmarin inhibits TNF- α induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett* 2002; 550: 89-93.
186. Mohan S, Dhanalakshmi S, Mallikarjuna GU, Singh RP, Agarwal R. Silibinin modulates UVB-induced apoptosis via mitochondrial proteins, caspases activation, and mitogen-activated protein kinase signaling in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 183-189.
187. De Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effect of flavanoids, *Fundam. Clin. Pharmacol* 1998; 12: 249-255.
188. Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 139-143.
189. Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silmarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 2001; 61: 2035-2063.
190. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res* 2010; 24: 1423-1432.
191. HE Q, Riley RT, SHARMA RP. Pharmacological antagonism of fumonisin B1 cytotoxicity in porcine renal epithelial cells (LLC-PK1): A model for reducing fumonisin - induced nephrotoxicity in vivo. *Pharmacology & Toxicology* 2002; 90: 268-277.
192. Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJM, Palmeira CM. Protection against post-ischemic mitochondrial injury in rat liver by silmarin or TUDC. *Hepatology Research* 2003; 26: 217-224
193. Chang JW, Kim CS, Kim SB, Park SK, Park JS, Lee SK. Proinflammatory cytokine-induced NF- κ B activation in human mesengial cells is mediated through intracellular calcium but not ROS: Effects of silmarin. *Nephron Experimental Nephrology* 2006; 103: 156-165.

194. Kvasnicka F, Biba B, Sevcik M, Voldrich M, Kratka J. Analysis of the active components of silmarin. *Journal of Chromatography A* 2003; 990: 239-245
195. Barreto R, Kawakita S, Tsuchiya J, Minelli E, Pavasuthipaisit K, Helmy A, et al. Metal-induced oxidative damage in cultured hepatocytes and hepatic lysosomal fraction: beneficial effect of a curcumin/absinthium compound. *Chin J Dig Dis* 2005; 6.
196. Nisar A, et al. DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum* L.) *Toxicol Ind Health*. 2012; 23: 6-10.
197. Farghali H, Kamenikova L, Hynie S, Kmonickova E. Silmarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: A Study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury. *Pharmacological Research* 2000; 41: 231-237.
198. Matsuda T, Ferreri K, Todorov I, Kuroda Y, Smith CV, Kandeel F, Mullen Y. Silmarin protects pancreatic β -cells against cytokine mediated toxicity: Implication of c-Jun NH2-Terminal Kinase and Janus Kinase/Signal transducer and activator of transcription pathways. *Endocrinology* 2004; 146: 175-185.
199. Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1. *Alternative Medicine Review* 1998; 3: 410-421.
200. Burczynski FJ, Wang G, Nguyen D, Chen Y, Smith HJ, Gong Y. Silmarin and hepatoprotection. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2012; 37: 6-10.
201. Desplaces A, Choppin J, Vogel G. The effects of silmarin on experimental phalloidine poisoning. *Arzneimittelforschung* 1975; 25: 89-96.
202. Fuchs EC, Weyhenmeyer R, Weiner OH. Effects of silibinin and of a synthetic analogue on isolated rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Arzneimittelforschung* 1997; 47: 1383-1387.
203. Dehmlow C, Erhard J, de Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology* 1996; 23: 749-754.
204. Baer-Dubowska W, Szafer H, Krajczakuzniak V. Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica* 1998; 28: 735-743.
205. Muriel P, Mourelle M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄

- liver damage. *J Appl Toxicol* 1990; 10: 275-279.
206. Matveev AV, Konjaeva EI, Kurchenko VP, Shchekatikhina AS. Hepatoprotective properties of silmarin. *Eksp Klin Gastroenterol* 2011; 2: 130-135.
 207. Salmi HA, Sarna S. Effect of silmarin on chemical, functional, and morphological alterations of the liver; A double blind controlled study. *Scand J Gastroenterol* 1982; 17: 517-21.
 208. Ferenci P, Dragosics B, Dittrich H. Randomized controlled trial of silmarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J Hepatol* 1989; 9: 105-113.
 209. Sonnenbichler J, Zetl I. Biochemical effects of the flavolignane silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat liver. *Prog Clin Biol Res* 1986; 213: 319-331.
 210. Magliulo E, Carosi PG, Minoli L. Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silmarin. *Arzneimittelforschung* 1973; 23: 161-167.
 211. Davis-Searles PR, Nakanishi Y, Kim NC, Graf TN, Oberlies NH, Wani MC, et al. Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 15: 4448-4457.
 212. Desplaces A, Choppin J, Vogel G. The effects of silmarin on experimental phalloidine poisoning. *Arzneimittelforschung* 1975: 25.
 213. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008; 2: 73-78.
 214. Wang G, Mao JM, Wang X, Zhang FC. Effect of homocysteine on plaque formation and oxidative stress in patients with acute coronary syndromes. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1650-1654
 215. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, eds. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. silibinin hemisuccinate. *Biochem. Pharmacol.* 1989; 48, 753-759.
 216. Andrews AT, ed. *Electrophoresis*, 2nd ed. Clarendon press, Oxford, UK, 1986: 217-255.
 217. Bottema CD, Sommer SS. PCR amplification of specific alleles: rapid detection of

- known mutation and polymorphisms. *Mutat. Res* 1993; 288: 93-102
218. Şahan C, Öztürk M, eds. *Kanser Kemoterapisi ve Karaciğer*, Vols. 2003; 20: 47-60.
 219. Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct* 1998; 16: 283-293.
 220. Oktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzare E, et al. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester *Toxicol Ind Health* 2006; 22: 241-247.
 221. Muralikrishnan G, Amalan SV, Sadasivan PK. Dual role of vitamin C on lipid profile and combined application of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil treatment in fibrosarcoma-bearing rats. *Cancer Lett.* 2001; 28: 115-120.
 222. Sener G, Tosun O, Şehirli AÖ. Melatonin and N-Acetylcysteine Have Beneficial Effects During Hepatic Ischemia and Reperfusion. *Life Sciences* 2003; 72: 2707-2718
 223. Sultana F, Mehboobali N. Folinic acid protects against suppression of growth by methotrexate in mice. *Biopharm. Drug Dispos* 2001; 22: 169-178.
 224. Kröger H, Hauschild A, Ohde M. Nicotinamide and Methionine Reduce the Liver Toxic Effect of Methotrexate. *General Pharmacology* 1999; 33: 203-206.
 225. Uraz S, Tahan V, Aygun C. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver Toxicity. *Dig Dis Sci* DOI 2007; 10.1007/s10620-007-9949-3.
 226. Cassiman D, Deneef C, Desmet VJ, Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 2001; 33: 148-158.
 227. Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130: 1807-1821.
 228. De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology* 2006; 131: 272-275.
 229. De Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effect of flavanoids. *Fundam. Clin. Pharmacol* 1998; 12: 249-255.
 230. Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *J Clin Pathol* 2009; 62: 481-492.

231. Vardi N, Parlakpınar H, Cetin A, Erdogan A, Cetin Ozturk I. Protective effect of beta-carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol Pathol* 2010; 38: 592-597.
232. Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1119-1127.
233. Sullivan KE. The role of bone marrow transplantation in pediatric rheumatic diseases. *J Rheumatol Suppl* 2000; 58: 49-52.
234. Halliwell B. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurol Scand Suppl* 1989; 126: 23-33.
235. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389.
236. Girish C, Pradhan SC. Hepatoprotective activities of picroliv, curcumin, and ellagic acid compared to silymarin on carbon-tetrachloride-induced liver toxicity in mice. *J Pharmacol Pharmacother*. 2012; 3: 149–155.
237. Papaconstantinou HT, Xie C, Zhang WP, Ansari, NH, Hellmich, MR, Townsend, CM, et al. The role of caspases on Methotrexate-induced gastrointestinal toxicity. *Surgery* 2001; 130: 859-865.
238. Gregus Z, Klaassen CD. Mechanisms of toxicity. Casaret and Doull's Toxicology, Ed: CD Klassen, McGraw-Hill Med Publ, New York, Sixth Edition, 2001: 35-81.
239. Kim R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 336-343.
240. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006; 43: 31-44.
241. Kass GE. Mitochondrial involvement in drug-induced hepatic injury. *Chem Biol Interact* 2006; 163: 145-159.
242. Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabo C. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 302-310.
243. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005; 54: 1024-1033.

244. Zhao J, Lahiri-Chatterjee M, Sharma Y, Agarwal R. Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silmarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR Mouse skin. *Carcinogenesis* 2000; 21: 811-816.
245. Bosisio E, Benelli C, Pirola O. Effect of flavanoligands of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Pharmacol. Res* 1992; 25: 147-154.
246. Mira L, Silva M, Manso CF. Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 753-759.

6. ÖZGEÇMİŞ

1992 Yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesini bitirdim. 5 yıl Elazığ Kültür Sağlık Ocağında çalıştıktan sonra, 11 yıl Bingöl Verem Savaş Dispanserinde çalıştım.

Halen Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.