



**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN
HEPATOTOKSİSİTE ÜZERİNE SİLİBİNNİNETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. EMİNE KÜRT

MART-2018



**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI**

**RATLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN
HEPATOTOKSİSİTE ÜZERİNDE BİR NİTELİKSEL
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. EMİNE KÜRT

DANIŞMAN

Prof. Dr. MUSTAFA BÜYÜKAVCI

MART-2018

Bu araştırma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü tarafından 2017-40-02-007 proje numarası ile desteklenmiştir.

Ç İNDEK İLER

ONAY	<u>I</u>
BEYAN.....	<u>II</u>
TE EKKÜR.....	<u>III</u>
KISALTMA VE S İMGELER.....	<u>IV</u>
EK İLLER.....	<u>VI</u>
TABLolar	<u>VII</u>
RES İMLER.....	<u>VIII</u>
TÜRKÇE ÖZET	<u>IX</u>
İNG İL İZCE ÖZET.....	<u>X</u>
1.G İR İ VE AMAÇ.....	<u>1</u>
2. GENEL B İLG İLER	<u>3</u>
2.1 METOTREKSAT	<u>3</u>
2.1.1 Metotreksat Metabolizması.....	<u>3</u>
2.1.2. Metotreksatın Klinikte Kullanımı	<u>4</u>
2.1.3. Metotreksatın Yan Etkileri.....	<u>5</u>
2.1.4. Metotreksat Hepatotoksisitesi	<u>6</u>
2.1.5. Metotreksat Toksisitesinden Korunma Yolları	<u>8</u>
2.1.6. Metotreksat ve Oksidatif Stres	<u>9</u>
2.2. OKS İDAT İF STRES	<u>9</u>
2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri.....	<u>10</u>
2.2.2. Antioksidanlar.....	<u>11</u>
2.2.3. Total Antioksidan Kapasite.....	<u>12</u>
2.2.4. Total Oksidan Seviye	<u>13</u>
2.2.5. Asimetrik Dimetil Arginin	<u>13</u>
2.2.6. Dinamik Thiol/Disülfid Denge Durumu	<u>15</u>
2.3. S İL B İN İ	<u>16</u>
2.3.1. Silibinin Etki Mekanizması	<u>18</u>
2.3.2. Silibinin Yan Etkileri, Toksisitesi ve Güvenilirli ğ i.....	<u>19</u>
2.3.3. Sillibininin Hepatoprotektif Etkileri	<u>20</u>
2.4. HEPATOTOKS İS İTEDE S İTOK İLER İN ROLÜ	<u>21</u>

2.4.1. İnterlökin-10	22
2.4.2. Tümör Nekroz Faktör-alfa	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. DENEY PLANI	25
3.2. LAÇLAR	27
3.3. TOTAL ANT OKS DAN KAPASİTE VE TOTAL OKS DAN SEVİYE	27
3.4. TOTAL TH OL SEVİYESİ, NAT VE TH OL SEVİYESİ, DİSÜLFİD	28
3.5. ASİMETRİK DİMETİLARJİNİN	28
3.6. TNF- α VE İL-10	28
3.7. BİYOKİMYASAL BELİRTİLER	29
3.8. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	29
3.9. STATİSTİK	30
4. BULGULAR	31
4.1. DENEKLERİN AĞIRLIK DEĞERLERİ	31
4.2. OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ	32
4.3. TNF- α VE İL-10 DÜZEYLERİ	34
4.4. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİ	34
4.5. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	35
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR	47
7. KISITLILIKLARIMIZ	48
8. KAYNAKLAR	49
9. VERİLER	61

EK-1: Özgeçmi

BEYAN

Bu çalı ma T.C. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Ara tırmaları Yerel Etik Kurulundan 10.05.2017 tarih ve 2017/24 karar ile onay alınarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalı mam oldu unu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir a amasında etik dı ı davranı ımın olmadı ını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde etti imi, tez çalı masıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdi imi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldı ımı, tez çalı ması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranı ımın olmadı ını beyan ederim.

15.03.2018

Emine Kürt

TE EKKÜR

Sakarya Üniversitesi Çocuk Sa lı ı ve Hastalıklarında uzmanlık e itim sürem içinde bilgi, fikir ve tecrübelerinden faydalandı ım ba ta tez hocalarım Prof. Dr. Mustafa Büyükavcı, Prof. Dr. Öner Özdemir olmak üzere Prof. Dr. Pınar güven, Doç. Dr. brahim Caner ve Yrd. Doç. Dr. Bahri Elmas'a, her daim tecrübelerinden faydalandı ım bütün uzman abilerime ve ablalarım, asistan arkadaşlarım, klini imiz hem ire ve personeline te ekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her anımda yanımda oldu unu hissettiren anneme, babama, ablama, abime, arkadaşlarım, dostlarıma ve her daim yüzümüzü güldüren Ne e ve Kerim'e te ekkür ederim.

Saygılarımla

Dr. Emine KÜRT

KISALTMA VE S İMGELER

- ADMA:** Asimetrik dimetil arginin
ALP: Alkalen fosfataz
ALT: Alanin aminotransferaz
AST: Aspartat aminotransferaz
ATP: Adenozin Trifosfat
AU: Arbitrary Units
VK : Vücut kitle indeksi
D/N: Disülfid/native thiol oranı
D/T: Disülfid/total thiol oranı
D.Bil: Direkt bilirubin
DDAH: Dimetilarjinin dimetil amino hidrolaz
DMSO: Dimethyl sulfoxide
DNA: Deoksiribonükleik asit
HMG-CoA: 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A
HV: Hepatoselüler vakuolizasyon
IL: nterlökin
H : nflamatuar hücre infiltrasyonu
p: ntraperitoneal
Max: Maksimum
Min: Minumum
MTX: Metotreksat
MTX-PGs: Metotreksat poliglutamatları
NADP: Nikotinamid adenozin difosfat
NADPH: ndirgenmi nikotinamid adenozin difosfat
N/T: Native/total thiol oranı
NF-kB: Nükleer faktör kappa B
NK: Naturel killer
NO: Nitrik Oksit
NOS: Nitrik Oksit Sentaz Enzimi
NTS: Native thiol seviyesi

LD₅₀: Ortalama öldürücü doz
LDH: Laktat dehidrojenaz
LDL: Düşük dansiteli lipoprotein
OS : Oksidatif stres indeksi
RNA: Ribonükleik asit
rRNA: Ribozomal ribonükleik asit
SD: Sinuzoidal dilatasyon
SDMA: Simetrik dimetilarjinin
SLB: Silibinin
SOR: Serbest oksijen radikalleri
SS: Standart Sapma
SÜEAH: Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi
TAK: Total antioksidan kapasite
THF: Tetrahidrofolat
TNF- α : Tümör nekroz faktörü- alfa
TOS: Total oksidan seviye
TTS: Total thiol seviyesi
T.Bil: Total bilirubin

EK LLER

ekil 1: Native thiol-disülfid dengesi.....16

ekil 2: Silibininin moleküler yapısı.....17



TABLolar

Tablo 1: Deney Planı.....	26
Tablo 2: Deneklerin alı ma öncesi ve sonrası a ırlıklarının kar ıla tırılması.....	31
Tablo 3: Deneklerin alı ma sonrası a ırlıklarının kar ıla tırılması.....	32
Tablo 4: Serum TAK, TOS, OS ve ADMA de erlerinin kar ıla tırılması.....	32
Tablo 5: Serum TTS, NTS, disülfid, D/N, D/T, N/T de erlerinin kar ıla tırılması..	33
Tablo 6: Serum TNF- α ve IL-10 düzeylerinin kar ıla tırılması.....	34
Tablo 7: Serum AST, ALT, AST/ALT, ALP, LDH, T.bil, D.bil, albumin de erlerinin kar ıla tırılması.....	35
Tablo 8: Sinuzoidal dilatasyon, inflamatuar hücre infiltrasyonu, hepatoselüler vakuolizasyon, nekroz ve toplam skorun kar ıla tırılması.....	36
Tablo 9: Deneklerin TOS, TAK ve ADMA de erleri	61
Tablo 10: Deneklerin Total Thiol Seviyesi (TTS), native thiol seviyesi (NTS) ve disülfid düzeyleri.....	62
Tablo 11: Deneklerin TNF- α ve IL-10 düzeyleri.....	63
Tablo 12: Deneklerin AST, ALT, LDH ve ALP de erleri.....	64
Tablo 13: Deneklerin total bilirubin (T.Bil), direkt bilirubin (D.Bil) ve albumin de erleri.....	65
Tablo 14: Deneklerin karaci ere ait histopatolojik inceleme sonuçları.....	66

RESİMLER

Resim 1: Santral ven ve portal alanlar arasında kordonlar ve trabeküller halinde organize olmuş hepatositlerden oluşan portal lobüler yapıda karaciğer dokusu.....37

Resim 2: Karaciğer dokusunda portal alanda mononükleer inflamatuvar infiltrasyon ve belirgin sinüzoidal dilatasyon.....38

Resim 3: Karaciğer dokusunun parankiminde nekroz alanı ve belirgin sinüzoidal dilatasyon.....38



ÖZET

G R VE AMAÇ: Bu çalı mada yüksek doz metotreksat (MTX) ile hepatotoksisite olu turulan sıçanlarda, silibininin hepatoprotektif etkisi ve oksidatif stres parametreleri ile sitokinlerin bu etkideki rolü ara tırılmı tır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Sıçanlar randomize olarak be gruba (n:7) ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara hiçbir uygulama yapılmazken, di er grupların hepsine ilk gün 20 mg/kg intraperitoneal (ip) metotreksat injeksiyonu yapıldı. MTX-SLB25, MTX-SLB50 ve MTX-SLB100 gruplarına sırasıyla 25, 50 ve 100 mg/kg dozlarında 5 gün boyunca silibinin ip olarak enjekte edildi. 6.gün sakrifiye edilen sıçanların kan örnekleri ve karaci er dokuları alındı.

BULGULAR: MTX deneklerde total oksidan seviye ve oksidatif stres indeksi düzeylerini etkilemeksizin total antioksidan kapasiteyi azaltmaktadır. MTX oksidatif stresi indükleyerek total thiol seviyesi, native thiol seviyesi ve native/total thiol oranını azaltıp, disüfid/total thiol oranını artırmaktadır. Buna kar ılık silibinin, disüfid düzeylerini azaltmaktadır. MTX, AST ve bilirubin düzeylerini etkilemezken, ALT ve albumin düzeylerini dü ürmü tür. Çalı mada asimetrik dimetil arjinin, TNF- α ve IL-10 düzeylerinin MTX ve silibinin verilmesi ile de i medi i gözlendi. Histopatolojik incelemelerde MTX'ın hepatik hasarı artırdı ı, 50 mg/kg dozunda verilen silibininin özellikle inflamatuvar hücre infiltrasyonunu belirgin ekilde önledi i gözlendi.

SONUÇLAR: Silibininin 50 mg/kg dozunda, sıçanlarda MTX ile olu turulan hepatotoksisitede karaci er hasarını azaltmaktadır. Ancak bu etki biyokimyasal belirteçlere yansımamaktadır. Silibininin bu koruyucu etkiyi sitokinler üzerinden de il antioksidan özellikleri ile yaptı ı anla ılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Hepatotoksisite, Metotreksat, Silibinin, Oksidatif Stres, Thiol/Disüfid

SUMMARY

Evaluation of Silibinin Effect on Methotrexate Induced Hepatotoxicity in Rats

INTRODUCTION AND AIM: In this study, we investigated the hepatoprotective effect of silibinin and the role of oxidative stress markers and cytokines on high dose methotrexate (MTX) induced hepatotoxicity in rats.

MATERIAL AND METHODS: Rats were randomly divided into five groups (n:7). MTX (20 mg/kg, intraperitoneally) was administered on first day in all groups except control. Silibinin was injected for five days in MTX-SLB25, MTX-SLB50 and MTX-SLB100 groups at a dose of 25, 50 and 100 mg/kg/day, respectively. On sixth day, blood and liver samples were obtained and rats were sacrificed.

RESULTS: MTX reduced total antioxidant capacity, however, had no effect on total oxidant capacity and oxidative stress index. MTX reduced total thiol, native thiol levels, and native/total thiol ratios, and increased disulphide/total thiol ratios by inducing oxidative stress. On the other hand, silibinin reduced disulphide levels. MTX reduced ALT and albumin levels, however, did not affect AST and bilirubin levels. Asymmetric dimethyl arginine, TNF- α and IL-10 levels had not changed by administration of MTX and silibinin. Histopathologic examination revealed that MTX increased hepatic damage and 50 mg/kg/dose of silibinin prevented inflammatory cell infiltration in particular.

CONCLUSIONS: Silibinin (50 mg/kg/day) reduced the hepatic damage in MTX induced hepatotoxicity in rats. However, this effect did not reflect on biochemical markers. The protective effect of silibinin is made by antioxidant properties, not by cytokines.

Key Words: Methotrexate; Hepatotoxicity; Oxidative stress; Silibinin;
Thiol/Disulphid

G R VE AMAÇ

Metotreksat (MTX) anti-kanserojen ve anti-inflamatuar bir ajan olup birçok otoimmün ve onkolojik hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Karaciğerden metabolize olan bu ajanın sitotoksik etkileri tümör hücrelerine spesifik olmayıp karaciğer, gastrointestinal sistem ve kemik iliğinde de belirgindir (Mager 2015). MTX'in yüksek dozlarda verilmesi ile yapıldığı hepatotoksisite karaciğer enzimlerinde artışı ve karaciğer histopatolojik incelemelerindeki değişiklikler ile gösterilmiştir. Önceki çalışmalarda MTX'in, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α)'nın salınımını artırdığı, oksidan-antioksidan dengesini değiştirdiği ve antioksidan maddelerin verilmesi ile hepatotoksisitenin önlenileceği gösterilmiştir (Kurt ve ark. 2015, Akbulut ve ark. 2014). Bu amaçla infliximab, amifostine, askorbik asit ve resveratrol gibi ajanların MTX'e bağlı hepatotoksisite üzerine etkisini araştıran çalışmalar yapılmıştır (Tunali-Akbay ve ark. 2010, Akbulut ve ark. 2014, Cure ve ark. 2015).

Silibinin, *Silybum maritimum* bitkisinden elde edilen bir flavonoid olup antioksidan, anti-kanserojen, anti-inflamatuar ve anti-fibrotik etkilere sahip olan hepatoprotektif bir ajandır. Silibininin hepatoprotektif etkisini antioksidasyon, fosfatidilkolin sentezinin inhibisyonu, RNA ve proteinlerin hepatik sentezinin uyarılması şeklinde gösterir (Dixit et al. 2007, Loguercio ve Festi 2011). Silibinin aynı zamanda lökosit migrasyonunu, nükleer faktör kappa B (NF-kB) aktivasyonunu, TNF'nin indüklediği SOR ara ürünlerinin üretimini ve lipid peroksidasyonunu da inhibe etmektedir (Manna et al. 1999, Kang et al. 2002). Silibininin α -amanitin, itrakonazol, doxorubisin gibi ilaçların hepatotoksisitesini azaltabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Raškovič et al. 2011, Mengs et al. 2012, Sozen ve ark. 2015). Silibinin sıçan deneylerinde MTX'e bağlı pulmoner hasarı ve nefrotoksisiteyi azalttığı da gösterilmiştir (Kalemci ve ark. 2015, Dabak ve Kocaman 2015). Ancak literatürde, sıçanlarda silibininin MTX'e bağlı karaciğer toksisitesi üzerine etkisini ve bunun fizyopatolojisini araştıran çalışma bulunmamaktadır.

Silibininin antioksidan etkisini araştıran önceki çalışmalarda serum ve dokuda süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, miyeloperoksidaz ve nitrik oksid (NO)

düzeyleri bakılmı tır (Muthumani 2012, Kalemci 2015, Beydilli 2015). Total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan seviye (TOS) ve thiol-disülfid dengesi ise yakın zamanda daha çok kullanılan farklı oksidatif stres belirteçleridir. Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) ile inflamasyon, oksidatif stres ve karaci er hasarı arasında güçlü bir ili ki vardır (Nijveldt et al. 2003). Hem MTX hem de silibinin inflamasyonu etkilerken TNF- α ve ili kili olarak interlökin-10 (IL-10) düzeylerinde de i iklikler olabilmektedir (Cure ve ark. 2015, Esmacil et al. 2017).

Biz bu çalı mada; silibininin sıçanlarda olu turulan MTX'e ba lı karaci er hasarı üzerindeki etkisini ve bu etkinin mekanizmasını ara tırmayı amaçladık. Karaci er hasarını tespit etmek için karaci er fonksiyon testlerinin yanı sıra histopatolojik de erlendirme yaptık. Oksidatif stresin rolünü belirlemek amacıyla yeni oksidatif stres markerleri olan TAK, TOS, thiol-disülfid dengesi ve ADMA; inflamatuvar sitokinlerin rolünü ara tırmak için TNF- α ve IL-10 düzeyleri çalı tık.

2. GENEL B LG LER

2.1. METOTREKSAT

Metotreksat DNA sentezini, onarımını ve hücresel replikasyonu engelleyen bir folik asit antagonistidir. Folat antagonistleri ilk geli tirilen antineoplastik ajanlar arasındadır. Aminopterin (ilk antifolat ilaç) 1948'de çocuklukta akut lenfoblastik lösemide (ALL) remisyonu ba latmak için kullanılırken daha sonra romatolojik hastalıklarda kullanılmaya ba landı. Antifolatlar halen ALL ve di er hematolojik maligniteler için modern tedavinin önemli bir bile enidir (Farber and Diamond 1948, Cuellar and Espinoza 1997).

2.1.1. Metotreksat Metabolizması

Metotreksatın sitotoksik etkisini gösterebilmesi için folil poliglutamata sentaz enzimi tarafından poliglutamasyona u ratılması gerekmektedir. Poliglutamasyon vücutta hem normal dokular hemde malign dokularda yapılır. te bu MTX poliglutamatların hücre içinde birikmesi folat metabolizmasını etkileyen enzimler üzerinde inhibitör etki gösterir (Chabner et al, 1985). MTX poliglutamatları, özellikle hücre içinde birikip dihidrofolat redüktaz enzimine ba lanır, dihidrofolat ile yer de i tirerek etki eder ve tetrahidrofolat (THF)'ın üretilmesini engeller (Rubino 2001). MTX, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) sentezi için gerekli olan THF sentezini inhibe eder. MTX dihidrofolik asit redüktaz enzimine ba lanan bir dihidrofolik asit analo u gibi davranır. THF sentezinin inhibisyonu pirimidin, timidilat ve pürin nükleotidlerinin biyosentezinin durmasına yol açar. Bu yapıta larının üretilmemesi hücre ço alması için gerekli olan DNA veRNA'nın sentezini ve enerji için gerekli olan Adenozin Trifosfat (ATP) yapımını inhibe eder (Kayaalp 2009, Gillman 2009). Bu nedenle metotreksat gibi antimetabolitler DNA sentezini negatif etkiledi inden dolayı bölünme katsayısı hızlı olan tümörlerin tedavisinde daha etkilidirler (Kayaalp 2009). MTX, pürin ve pirimidin inhibitörü oldu undan hastalarda immünsupresif ve antineoplastik olarak kullanılmaktadır (Quemeneur et al, 2003).

Metotreksat, %90 oranında böbrekler tarafından aktif tübüler sekresyona uğrayarak atılır. Yüzde 3-4 oranında karaciğerde MTX'in ekstrasellüler sıvıdaki major formu olan 7-hidroksi metotreksata dönüştürülür ve bu formu da üriner yolla atılır. Yüzde 5-10'u ise safra ile atılır ve enterohepatik dolaşım ile yeniden emilir. İnsanlarda MTX'in major atılım yerinin böbrekler olduğu, sıçan gibi deney hayvanlarında ise safra yoluyla atılımının daha fazla olduğu gösterilmiştir (Nuernberg et al, 1990).

Oral yoldan alındığında neredeyse tamamı emilir. İntravenöz yoldan verildiğinde %50 oranında proteinlere (özellikle albümine) bağlanarak taşınır ve sinir sistemi haricinde tüm vücuda yayılır. Standart dozlarda beyin omurilik sıvısına geçimi yok denecek kadar azdır. Bu sebeple meningeal tümörlerde intratekal verilmesi gerekir. En yüksek dokü seviyesine karaciğer ve böbrekte rastlanır. Vücutta yarılanma ömrü ise 7-8 saattir (Kayaalp 2009).

2.1.2. Metotreksatın Klinikte Kullanımı

Kliniklerde çok yaygın olarak kullanılan antimetabolit etki mekanizmasına sahip bir antineoplastik ilaçtır. MTX lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri ve meme kanseri gibi birçok onkolojik hastalıkta yüksek dozlarda kullanılabilir. Ayrıca psöriasis, dermatomyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde ve transplantasyon sonrası graft versus host hastalığının önlenmesinde de kullanılmaktadır (Cetinkaya ve ark, 2006). MTX'in bu yaygın kullanımı sebebiyle Dünya Sağlık Örgütü'nün temel ilaç listesinde yer almaktadır (<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>, Erişim adresi: 5 Ocak 2018). Santral sinir sistemi hariç oral ve intravenöz uygulamalarında dokulara dağılımı iyidir. MTX meningeal karsinomatosis, meningeal lösemi ve lenfomanın profilaksisi ve tedavisinde intratekal olarak kullanılır (Hardman and Limbird 2001). Lököverin kurtarma tedavisi ile birlikte uygulanan yüksek doz MTX, osteosarkomun adjuvan tedavisinde kullanılan standart bir protokoldür (Jolivet et al, 1983). MTX'in hem tedavideki etkinliği hemde toksik etkileri hastadan hastaya değişkenlik gösterebilir (Widemann and Adamson 2006). 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 (Hardman and Limbird 2001).

2.1.3. Metotreksatın Yan Etkileri

Metotreksat için geni leyen klinik kullanım spektrumuyla toksisitesi çok daha fazla önem kazanıyor. MTX, THF eksikliğine yol açarak pürin, pirimidin metabolizması ve DNA sentezini içeren pek çok metabolik yolu etkiler (Jolivet et al, 1983).

Metotreksatın aynı zamanda sağlıklı hücreleri de etkilemesi sonucu tedavi edici etkileri yanında gastrointestinal sistem, böbrek, sinir, karaciğer ve kemik iliği üzerinde toksik etkileri de ortaya çıkmaktadır (Jolivet et al. 1983, Ener ve ark. 2006). Tedavi süresi, kullanım dozu, hastaların risk faktörleri, hastalığın tipi ve moleküler apoptotik faktörler toksisiteyi etkilemektedir (Neuman et al, 1999).

Metotreksatın yaygın yan etkileri bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme, kemik iliği supresyonu ve cilt ile gastrointestinal mukozada (mukozit) meydana gelen hasardır (Laan et al, 1998). Fakat en ciddi hasarı böbreklere ve karaciğere vermektedir. MTX'in uzun süre kullanımları hepatotoksisite, nefrotoksisite, pulmoner infiltrasyon ve fibrozise yol açar. Fibrozis için MTX'in kümülatif dozu özellikle önemlidir (Bertram and Katzung 2004).

Romatoid artrit tedavisinde kullanılan düşük doz MTX'e bağlı beklenmeyen en ciddi yan etki pansitopenidir (Ohasone et al, 1997). Lösemi, psöriazis ve romatoid artrit için MTX ile tedavisi sırasında gelişen hepatotoksisite beklenen bir durumdur. Karaciğer histolojisinde nonspesifik yağlı degranülasyonlar, nükleer polimorfizm, hepatosit nekrozu, kronik portal inflamasyon, fibrozis ve siroz gibi patolojik lezyon ve durumlar gözlemlenebilir (Kevat et al, 1988). MTX'e bağlı hematolojik yan etkilerin oluşumunda dihidrofolat redüktaz enziminin inhibisyonu sonucu DNA sentezindeki bozulma ve hızlı hücre degranülasyonuna sahip kemik iliğinin baskılanması sorumlu tutulmaktadır. Mukozit için risk faktörleri ise düşük vücut ağırlığı, azalmış böbrek fonksiyonları, nötropeni ve genetik polimorfizmlerdir (Schmiegelow et al, 2017).

Kanser tedavisinde kullanılan yüksek doz MTX, akut böbrek yetmezli ine neden olabilir. Yüksek dozda kullanılan MTX asidik idrarda presipite olup obstrüktif üropati nedeniyle oligo-anürik böbrek hasarı yapabilir. MTX'in nefrotoksik etkisi ise; MTX ve metaboliti olan 7-hidroksimetotreksatın (7-OH MTX) böbrek tübüllerinde çökmesi ile açıklanmıştır ki bu da MTX atılımının gecikmesi ile sonuçlanır (Van den Bongard et al, 2001). Bu olay myelosüpresyon, gastrointestinal toksisite, hepatit ve mukozit gibi toksisite olumuna öncülük eder (Schornagel and Mcvie 1983).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada romatoid artrit sebebiyle uzun dönem düşük doz MTX kullanan 204 hasta incelenmiş ve %6,37 oranında hepatotoksisite (ALT seviyeleri normalin 3 katından fazla olan olgular) tespit edilmiştir ; bunlardan 2'sinde biyopsi ile hepatik fibroz kesinleşmiştir. Aynı çalışmada %5,4 oranında ciddi anemive lökopeni tespit edilmiştir (Dubey et al, 2016).

2.1.4. Metotreksat Hepatotoksitesisi

Hepatotoksisite, MTX tedavisi esnasında oluşan major komplikasyondur (West 1997). MTX'in hepatotoksik etkisinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, intrasellüler MTX poliglutamaları birikimi ve folat azalmasının sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Kevat et al, 1988). MTX, NAD⁺ bağımlı mitokondrial enzimler olan piruvat dehidrogenaz, 2-oksoogluterat dehidrogenaz, izositrat dehidrogenaz, malat dehidrogenazı ve sitozolik nikotinamid adenzin difosfat (NADP) bağımlı dehidrogenazı inhibe eder. Bütün bu sayılan enzimler proliferasyon hücrelerinde, NADPH'nin ana kaynağını oluştururlar. Bundan dolayı MTX kullanımı hücre içi NADPH seviyelerinin azalmasına sebep olabilir (Caetano et al, 1997). SOR'a karşı önemli bir koruyucu ajan olarak bilinen redükte glutatyonun seviyesini koruyan glutatyon redüktaz enzimi tarafından da NADPH kullanılır. NADPglutatyon redüktaz enzimi tarafından, SOR'a karşı koruyucu bir antioksidan olan, redükte glutatyonun üretilmesi için kullanılır. MTX kullanımına bağlı olarak glukoz-6-fosfat, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz, γ -glutamil sisteinaz aktivitelerini inhibe eder ve glutatyonun hücresel düzeylerini düşürerek hepatosit hasarına sebep olur (Babiak et al, 1998).

Metotreksat, hücre içinde poliglutamata formunda tutulur (Uraz ve ark, 2008). MTX'in uzun süreli kullanımı poliglutamata formlarının hepatositlerde birikmesine yol açar. Poliglutamata formunun seviyesinin artması intrasellüler alanda ilacın varlığını artırır. Bu da hepatositler folik asit seviyelerini düşürür ve sonunda hepatosit nekrozuna yol açar (Kamen et al. 1981 ve Kremer et al. 1986). MTX ile tedavi sırasında gelişen hepatotoksisite de mikroskopik düzeyde, hepatositlerde dejenerasyon, piknotik çekirdek ve perinükleer vakuolizasyon, aktive Kupffer hücrelerinde artmış, sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon, periportal mononükleer hücre infiltrasyonu, portal alanda belirgin fibroblast aktivasyonu ve hepatositlerde belirgin makroveziküller ya da yağlanma görülebilir (Kocaman ve Çolako lu 2013, Dalaklioglu ve ark. 2013)

MTX'in neden olduğu toksisitenin, tedavinin süresi ve dozu, hastalığın tipi ve hastanın risk faktörleri ile birlikte genetik ve moleküler apoptotik faktörler gibi birçok faktörün etkileşimiyle oluştuğu düşünülmektedir (Neuman et al, 1999). Kent et al. (2004)'nın MTX toksisitesinin risk faktörlerini bulmak için yaptığı laboratuvar araştırmalarında folat eksikliği, tedavi edilmemiş hiperlipidemi, yüksek vücut kitle indeksi (VK) transaminazlarda yükselme için risk faktörü olarak bulunmuş ancak yüksek VK ve tedavi edilmemiş hiperlipidemisinin altında yatan yağlı karaciğer hastalığının bulgusu olabileceğine de dikkat çekilmiştir.

Metotreksat tedavisi sırasındaki aminotransferaz yükseklikleri genellikle ilacın kesilmesi ile düzeldiğinden önemli karaciğer toksisitesi teşkil etmez. Uzun süreli düşük doz kullanan hastalarda yapılan karaciğer biyopsilerinin çoğunda ya normal veya hafif yağlı değişiklikler gösterilmiştir. Fibrozis ve siroz gibi ilerlemiş patolojik değişiklikler hastaların %4-5'inde görülmüştür. MTX kullanımının yanı sıra alkol kullanımı, diyabet, obezite, kronik viral hepatitin olmasının hepatotoksisite riskini artırdığı gözlemlenmiştir (Berends et al. 2006, Whiting-O'Keefe et al. 1991).

Akut lösemilerin tedavisindeki gibi MTX'in aralıklı yüksek doz kullanımı veya psöriazisteki gibi uzun dönem MTX kullanımında progresif hepatik fibrozis ve siroza ilerleyebilen karaciğer hasarı oluşabilir. Düşük doz uzun dönem MTX tedavisi

alan psöriazisli hastalardaki siroz gelişme riski %7'dir. Takip edilen hastaların yaklaşık %8'inde transaminazların normalin üç katı kadar yükseldiği gösterilmiştir (Uraz ve ark, 2008).

Kronik MTX kullanımıyla ilgili karaciğer histolojisindeki temel yan etkiler, yağ infiltrasyonu, inflamasyon, hücresel nekroz ve sonuç olarak fibrozistir. Klinik ve biyokimyasal bulgular uzun süre sessiz kalabileceğinden karaciğer toksisitesinin gösterilmesinin tek yolu karaciğer biyopsisidir ve genellikle MTX 10 yıl kullanıldıktan sonra ya da MTX toplam dozu 1,5-2,5 gramı geçtikten sonra önerilmektedir (Uraz ve ark, 2008).

2.1.5. Metotreksat Toksisitesinden Korunma Yolları

Yüksek doz MTX toksisitesini önlemek ve hafifletmek için eş zamanlı hidrasyon, üriner alkalinizasyon ve sonrasında lökovorin kurtarması yer yapılmaktadır. Önleyici stratejilere rağmen gecikmiş MTX atılımı ve akut böbrek hasarı olduğu durumda hidrasyonu artırmak, lökovorin kurtarma tedavisi ve glukarpidaz genellikle yeterlidir. Toksikiteden korunmak için öncelikle MTX ile etkileşen ilaçlar (örneğin naproksen sodyum) kesilmelidir. MTX infüzyonundan sonra lökovorin verilmelidir. Lökovorin myelosupresyon, nörotoksisite ve gastrointestinal toksisiteyi önlemede özellikle önemlidir. Ancak lökovorin MTX'in etkinliğini azalttığından çok erken verilmemelidir (Howard et al, 2016).

Glukarpidaz, MTX'i hızla amino asit glutamat ve 2,4-diamino-N(10)-metilpteroik asit oluşturmak üzere parçalayan bir bakteriyel enzim olan karboksipeptidaz G2'nin rekombinant bir eklidir (Green 2012). Glukarpidaz, gecikmiş MTX eliminasyonu olan hastalarda nonrenal temizliği hızlandıran, MTX'i inaktif metabolitlere hızlıca hidroliz eden ve metotreksat konsantrasyonunu hızlıca azaltan önemli ve etkili bir ilaçtır (Widemann et al, 2014).

Hemodiyaliz MTX'e bağlı renal toksisitede etkili olmakla birlikte elektrolit bozuklukları, kateter bölgelerinde kanama ve kardiyak arrest açısından dikkatli olunmalıdır (Howard et al, 2016).

2.1.6. Metotreksat ve Oksidatif Stres

Metotreksatın hepatotoksisite ve nefrotoksisite ile ilgili mekanizması konusunda en çok de inilen konu oksidatif stres olmu tur (Jahovic et al, 2003).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalı mada 20 mg/kg tek doz MTX'in, sistemik toksisite olu turmaksızın, oksidatif stres yoluyla karaci er ve böbrekte toksik etki olu turdu u gösterilmi tir (Jahovic et al, 2003). Akbulut ve ark. (2014) yaptı ı çalı mada amifostin, askorbik asit ve N-asetilsisteinin oksidatif stres üzerinden MTX'e ba lı hepatotoksisiteyi önleyebildi i gösterilmi tir. Aslaner ve ark. (2015) yaptı ı çalı mada medikal ozonun antioksidan etkisi ile karaci er dokularında MTX'in indükledi i hepatotoksisiteyi tersine çevirdi i görülmü tür. Aynı çalı mada medikal ozonun lipid peroksidasyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu önledi i; glutasyon, malondialdehit ve myeloperoksidaz aktivitelerinde artı yaptı ı ve TNF- α düzeyini azalttı ı gösterilmi tir (Aslaner ve ark, 2015). Safaei ve ark. (2017), MTX ile indüklenen hepatotoksisiteye kar ı gallik asidin etkili oldu unu, MTX ile artan katalaz, süperoksid dismutaz ve glutasyon peroksidaz aktivitelerinin gallik asit ile dü tü ünü göstermi lerdir. Mehrzadi et al. (2018) ise antioksidan, anti-apoptotik ve anti-inflamatuar olan berberinin ile ön muamelenin biyokimyasal ve oksidatif stres belirteçleri üzerine iyile tirici etkiler yoluyla MTX hepatotoksisitesine kar ı etkili olabilece ini gösterdi.

2.2. OKS DAT F STRES

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Serbest oksijen radikalleri ise enerji üretim süreçlerinin do al bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir. Oksidatif stres, bir organizmadaki oksidanların üretimi ile organizmanın reaktif ara maddeleri nötralize etme veya reaktif oksidanlardan kaynaklanan hücre hasarının onarımı arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Organizmada serbest radikallerin olu um hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı arasında bir denge mevcuttur ve bu

durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sa landı ı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin olu um hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir dü me bu dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle, serbest radikal olu umu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizli i göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (Çavdar ve ark. 1997, Burçak ve Andıcan 2004).

2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri (SOR) hücrede ekzojen ve endojen kaynaklara ba lı olarak olu an, bir veya daha fazla e le memi elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız ve dü ük molekül a ırlıklı moleküller olarak tanımlanırlar. Organizmalarda SOR'lar ve antioksidan savunma sistemleri arasında do al bir denge söz konusudur (Mercan 2004).

Serbest radikaller oldukça reaktiftirler ve bu yüzden çevrelerindeki atom ve moleküllere saldırırlar. Kısa ömürlüdürler. Radikal olmayan maddelerle kolay etkile ime girmeleri, onları da radikal yapmaları ve bir dizi zincir reaksiyonu ba latmalarından ötürü oldukça tehlikelidirler. Aerobik hücrelerde metabolizma esnasında veya patolojik durumlarda yan ürün olarak olu abilirler ve hücrelerde geri dönü ümlü veya dönü ümsüz de i iklilere sebep olabilirler (Kılinc ve Kılinc 2003). Bugün radikallerin hücre molekül de i imlerine, gen mutasyonlarına yol açtı ı ileri sürülmekte, ya lanma, hücrel destrüksiyon ve doku yıkımında rol aldı ı kabul edilmektedir (Breimer 1991, Thomas 1995). E le memi elektronları olan serbest radikaller, di er bir molekülden elektron alarak ya da kendi elektronlarını vererek daha dengeli bir duruma geçerken, reaksiyona girdikleri molekülün kimyasal yapısında de i tirirler (Davies 1994, Ternay and Sorokin 1997).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere ba lı olarak olu urlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirlili i yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve

adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyu turucular gibi alı kanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir (Çavdar ve ark. 1997, Burçak ve Andican 2004). Hücre içi savunma sistemlerinin yeterli olamadı ı durumlarda, oksidatif stresin tanımında belirtildi i üzere, SOR ile antioksidanlar arasındaki denge bozularak oksidatif stres ortaya çıkar ve hücrede oksidan hasara duyarlı DNA, protein, karbonhidratlar ve lipitler gibi hücrel makromoleküller zarar görür (Halliwell and Gutteridge 1989, Gutteridge 1994, Berger 2005, Wildburger et al. 2009). Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir (Çavdar ve ark, 1997).

2.2.2. Antioksidanlar

Canlılarda olu an serbest radikalleri metabolize eden, olu umunu önleyen ve temizleyen savunma mekanizmalarına antioksidan denir (Ghiselli et al. 2000, Erel 2004).

Antioksidan maddelerin hepatik dokularda oksidatif stres, inflamasyon ve apopitozu azaltarak karaci eri korudu u çe itli çalı malarda gösterilmi tir. Bundan dolayı son yıllarda MTX toksisitesinden korunmak, hafifletmek ve en erken sürede tedavi etmek için antioksidan maddeler dikkati çekmi tir (Khalifa et al, 2017).

Antioksidanlar dört ayrı ekilde etki ederler:

1. Toplayıcı etki (Scavenging etki): Serbest oksijen radikallerini tutma ya da çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme i lemine “toplayıcı etki” denilmektedir. Bilirubin, antioksidan enzimler, trakeobron ial mukus ve küçük antioksidan moleküller bu tip bir etki göstermektedir (Akku 1996, Minetti et al. 1998).
2. Bastırıcı etki (Quencher etki): Serbest oksijen radikalleriyle etkile ip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif biçime dönü türen etki “bastırıcı etki” olarak adlandırılmaktadır. Vitaminler, bu tarz bir etkiye sahiptir(Hegyı et al. 1994, Akku 1996).
3. Zincir kırıcı (Chain-breaking etki): Serbest oksijen radikallerine ba lanarak

zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye “zincir kırıcı etki” denir. Bilirubin, hemoglobin, serüloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler (Stocker et al. 1987, Otani et al.2001).

4. Onarıcı etki (Repair etki): Onarıcı etki üzerinde çalı malar devam etmektedir. Oksidatif hasar görmü DNA molekülünü tamir eden enzimler bu guruba örnek olarak verilebilir (Gopinathan et al. 1994, Stocker 2004).

Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak ikiye ayrılmaktadır.

Endojen antioksidanlar, enzim olarak görev yapanlar ve enzim olmayan antioksidanlar olarak iki grupta incelenmektedir. Enzim olan antioksidanlar süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon redüktaz ve mitokondrial oksidaz sistemidir. Enzim olmayanlar ise, bilirubin, albümin, ürik asit, -tokoferol, askorbik asit, serüloplazmin, transferrin, ferritin ve glutatyon gibi maddelerdir (Cros et al. 1987, Kremer et al. 2004).

Eksojen antioksidan olarak allopurinol, folik asit, C vitamini, E vitamini, asetilsistein, mannitol, adenozin, kalsiyum kanal blokerleri, non steroid antienflamatuar ilaçlar ve demir elatörleri sayılabilir (Akku 1996, Scandalios 2002).

2.2.3. Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Normal fizyolojik ko ullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle olu an serbest radikaller ve bunlara ba lı olu an oksidatif stres ile mücadele eden kar ık bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Vücutun olu an oksidan durumlara kar ı indirgenme ayarını sürdürebilmesinde plazma çok önemlidir. Çünkü plazma, antioksidanların vücutun tüm bölümlerine ta ınmasını ve da ıtımını gerçekleştirir (Yao et al. 1998, Prior and Cao 1999).

Total antioksidan duruma en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi proteinler yanında serbest radikalleri kapan zincir kırıcı antioksidanlar da bulunmaktadır. Albumin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total

antioksidan durumun %85'inden fazlasını oluşturmaktadır. Bu fark kanda bilirubin, flavanoidler, -tokoferol ve -karoten gibi antioksidan durumun bileşenlerine nazaran albumin, ürik asit ve askorbik asitin seviyelerinin fazla olmasına bağlıdır. Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki olmaktadır (Prior and Cao 1999). Bu sinerjizme örnek glutatyonun askorbatı, askorbatında tokoferolün yeniden aktifleşmesini sağlaması gösterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalmadaki artışın ile kompanse edilebilmektedir (Romay et al.1996). Bundan dolayı kanın antioksidatif durumunu saptamada bireysel antioksidanlardan çok bunların toplam antioksidan değerini veren TAK ölçümü yaygınlaştırmaktadır (Yao et al. 1998, Prior and Cao 1999, Erel 2004).

2.2.4. Total Oksidan Seviye (TOS)

Oksidatif stres; vücudumuzda mevcut oksidatif-antioksidatif dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu meydana gelen patolojik durumdur. Oksidatif stresin toplam değeri TOS olarak ifade edilir (Erel 2005).

Pro-oksidanların artırılması, lipid peroksidasyonu, oksidatif DNA hasarı ve protein hasarı gibi zararlı olaylara neden olur. Oksidatif stres, artırılması reaktif oksijen ve/veya nitrojen türlerinin üretimi veya antioksidan tampon mekanizmasının eksikliği sonucu oluşur. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri toksiktir; hücrenin lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerine zarar verir (Yashikawa and Naito 2002).

2.2.5. Asimetrik Dimetil Arginin (ADMA)

Vallance et al. (1992) ilk defa 1992 yılında, L-arjinine yapısal olarak benzerlik gösteren maddeleri tanımladılar. Monometilargininler (bir metil grubu içerenler) veya dimetilargininler (iki metil grubu içerenler) olarak isimlendirilen bu maddeler insan plazma ve idrarında endojen olarak mevcuttu (Vallance et al, 1992).

ADMA protein yapısında bulunan L-arjininin aminoasidinin hücre içi metiltransferaz enzimleri ile metillenmesiyle üretilmektedir (Sibal et al, 2010).

ADMA, Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enziminin üç formunu da kompetitif olarak inhibe eder. ADMA'nın kan düzeyi arttıkça NO sentezi azalmaktadır. Yapısal izomeri olan simetrik dimetilarjininin (SDMA), ADMA'nın tersine, NO üretimi üzerine etkisi yoktur (Nijveldt et al. 2003, Vallance et al. 1992).

Nitrik oksit endotel tarafından sentezlenen, vazodilatasyondan inflamatuvar sitokinlerin salınımına kadar önemli fonksiyonları olan bir moleküldür (MacAllister et al, 1996). Endotel yapısı, fizyolojik vasküler tonüsün ve vasküler yapının devamını sağlamada merkezi bir rol oynamaktadır. Salkımlı endotel hücrelerden salgılanan NO bu yapının devamını sağlamada rol oynayan en önemli mediyatörlerdendir. Artmış ADMA konsantrasyonları, NO sentezini azaltarak etki eder ve endotel disfonksiyonunu gösterir (Böger et al, 1997).

Artmış protein metilasyonu, metille tirilen proteinlerin parçalanması ve serbest ADMA'nın eliminasyonunun azalması, ADMA'nın birikimine katkıda bulunabilir. Proteoliz, serbest metil arginin kalıntılarını serbest bırakmak için gerekli bir adımdır. Hasarlanmaya karşı en belirgin karakteristik yanıtlardan biri, sitokinlerin aracılık ettiği, özellikle de TNF- α ile hızlandırılmış protein parçalanmasıdır. Ayrıca, oksidatif stres, hücrel proteinleri modifiye edebilir ve hızlı bozunmayı sağlayan hidrofobik protein yamaları üretebilir. ADMA, artmış proteoliz ve eliminasyon yollarının azalması ile kritik hastalarda birikir (Zoccali et al. 2001, Davies 2001). inflamatuvar sitokinlerin, özellikle de TNF- α 'nın protein parçalanmasını hızlandırdığı, metil-arginin rezidülerini serbestle tirerek ADMA üretimini artırdığı düşünülmektedir. ADMA'nın birikimi NO üretimine etki ederek çoklu organ yetmezliğin nedenlerindedir. Bu sebeplerle artmış ADMA düzeyi organ yetmezliğin iddeti, inflamasyon ve mortalite ile ilişkilendirilmiştir (Lappalainen et al, 2017).

Dimetilarjinin dimetil amino hidrolaz (DDAH) enzimi ise ADMA'yı metabolize eden enzimdir. DDAH enzimiyle ADMA sitrülün ve dimetilamine yıkılır (Blackwell 2010). to et al. (1999) endotel hücrelerinde TNF- α 'ya uzun süre maruz kaldıktan sonra DDAH'nın aktivitesinin azaldığını bildirdiler ki bu da ortamda ADMA düzeyinin yükselmesine sebep olmaktadır. Buna göre, kritik hastalarda; TNF- α , ADMA'nın daha da birikmesine neden olacak şekilde DDAH aktivitesini bozabilir.

Septik durumda, nitrik oksit sitokin salınımı üzerine negatif bir geri bildirimle sahiptir ve nitrik oksit sentezinin inhibisyonu, TNF- gibi pro-inflamatuar sitokin düzeylerinde zararlı artışlara neden olabilir. Buna karşılık TNF- seviyelerinin artması DDAH aktivitesini daha da bozabilir. Buna ek olarak, DDAH aktivitesi enzimin aktif bölgesindeki kritik bir sistein kalıntısı ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerinden etkilenebilir (Murray-Rust et al, 2001). Özellikle fagositik hücreler, hasarlı dokulara çekildiğinde reaktif oksijen türlerinin başlıca üreticisidir. Oksidatif stres, iskemi-reperfüzyon hasarı ve sistemik inflammatuar durumlar dahil olmak üzere kritik hastalıkların çeşitli amaçları ile ilişkilendirilmiştir. İnflamasyon ve oksidatif stres DDAH aktivitesini azaltır. DDAH aktivitesi TNF- veya okside LDL ile indüklenen oksidatif stres ile de azalmaktadır. DDAH enziminin inaktivasyonu ADMA eliminasyonunun bozulmasına, ADMA seviyelerinin artmasına ve NO üretiminin azalmasına sebep olur (Nijveldt et al, 2003).

Hepatositler dolayısıyla çok miktarda arjinin aldığından dolayı karaciğer yetmezliği yüksek plazma L-arjinin düzeyleri ile karakterizedir. Karaciğerin dolağımdaki ADMA üzerindeki asıl etkisi yüksek arjinaz ve DDAH aktivitesine bağlıdır. Ayrıca ADMA çok az bir oranda hepatik hücrelerdeki aminotransferazlar ile de yıkılmakta ve yine böbrekle atılmaktadır. Kısacası karaciğer, ortamdaki stabil ADMA konsantrasyonunu sağlayan en önemli belirleyicidir ve karaciğer yetmezliğinde plazma ADMA konsantrasyonu yükselmektedir (Wang et al. 2006, Wilcken et al. 2007). Nijveldt et al. (2003) ADMA ile hepatik disfonksiyon arasında güçlü bir ilişki kurmuşlardır.

2.2.6. Dinamik Thiol/Disülfid Denge Durumu

Thioller bir hidrojen ve bir karbon atomuna bağlı bir sülfür atomundan oluşan bir sülfhidril grubu (-SH) içeren organik bileşiklerdir (Sen and Packer 2000).

Thioller yüksek redüktan kapasitesi olan, reversible ve irreversible modifikasyonlara yatkın moleküllerdir. Thioller, vücutta toplam antioksidanların önemli bir bölümüne katkıda bulunurlar ve reaktif oksijen türlerine karşı savunma için önemli rol oynarlar (Erel ve Neseliolu 2014). Ayrıca programlanmış hücre ölümü, detoksifikasyon, antioksidan korunma, transkripsiyon ve hücresel enzimatif aktivitenin korunmasında

kritik rol oynarlar (Circu and Aw 2010). Oksidan ile karıla an indirgenmi thiolün okside formu disülfittir. Thiol/disülfid dengesi antioksidan koruma, detoksifikasyon, sinyal transdüksiyon, enzimatik aktivitenin regülasyonu, apoptoz ve hücrese l sinyal iletiminde önemli bir role sahip oldu u için bu dengedeki de i ikler önemlidir (Erel ve Neselio lu 2014). Thiol/disülfid dönü üümü bir redoks reaksiyonudur ve dinamik bir süreçtir (ekil 1). Anormal thiol/disülfid homeostazı sırasında bu hayati hücrese l i levler bozulur (Nagy 2013).



ekil 1: Native thiol-disülfid dengesi

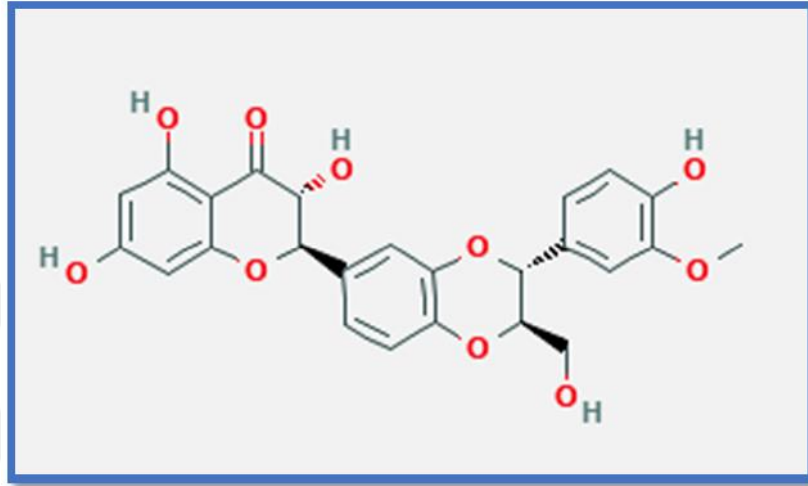
Son zamanlarda, çe itli akut ve kronik hastalıkların patogenezinde anormal thiol/disülfid denge durumunun bulundu u bildirilmektedir (Ozyazici ve ark, 2016). Yüksek oksidatif streste, thiol konsantrasyonları serbest oksijen radikallerini (SOR) nötralize etmek için azalır. Thioller, oksidanlar vasıtasıyla oksidasyon reaksiyonu geçirebilir ve thiol gruplarına geri indirilebilen disülfür ba ı olu tururlar (Jones and Liang 2009).

Thiollerin serumda ölçülmesi antioksidan savunmanın dolaylı yansımasını sa lar (Yuksel ve ark, 2016). Oksidatif stres göstergesi olarak kullanıma giren thiol/disülfid dengesi akut apendisitte, akut myokarda infarktüsünde ve akut febril konvülziyon gibi çe itli sistemleri etkileyen hastalıklarda çalı ılmı fakat karaci er ile ili kili hastalıklarda çalı ılmamı tır (Kundi et al. 2015, Ozyazici ve ark. 2016, Elmas ve ark. 2017)

2.3. S L B N N

Silibinin; Silybum Marianum bitkisinden elde edilen bir flavonoglignandır. Silibinin $C_{25}H_{22}O_{10}$ formülüne sahip, moleküler a ırlı ı 482,44 g/mol olan bir bile endir

(Deep and Agarwal 2010). Silybum marianum bitkisi deve dikenini, süt dikenini, meryem ana bitkisi olarak da bilinmektedir. Olgun bitki parlak-mor çiçekler ve bol dikenlere sahiptir. Bitki yeterli güneş maruz kalan yerlerde yetişir. Silibinin ile silibinin anlamlıdır (Wellington and Jarvis 2001).



ekil 2: Silibininin moleküler yapısı (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>’den alınmıştır)

Silymarin yedi flavonolignan dahil olmak üzere sekiz önemli bileşik kompleksidir. Bunlar silibinin A, silibinin B, izosilibinin A, izosilibinin B, silikristin, izosilikristin ve silidianin ve bir flavonoid olan taxifolin'dir (Kroll et al, 2007). Silibinin, silymarin kompleksinin (%70) biyolojik açıdan en aktif bileşendir ve silibinin A ve silibinin B'nin karışımından oluşur. Silymarin 7 flavonolignan ve polifenol kompleksinden oluşmasına rağmen en aktif bileşeni silibinin'dir (Federico et al, 2017). Silibinin, silymarindeki en etkin antioksidan ve hepatoprotektif etkili olan flavonolignandır. Safradaki konsantrasyonu diğerlerinden 60 kat fazladır (Kren and Walterova 2005).

Silibinin gastrointestinal sistemden kolaylıkla emilir ve enterohepatik dolaşıma girer. Esas olarak %80'isafıyla atılmakla birlikte geri kalan kısmı idrarla atılır. Oral alındıktan 2-4 saat sonra maksimum kan konsantrasyonuna ulaşır ve eliminasyon yarı ömrü 6 saattir (Post-White et al. 2007, Bijak 2017).

Silymarin yüzyıllar boyunca Avrupa'da hepatik ve safra bozuklukları için kullanılan bir bitki olup alternatif tıptan modern bir ilacın gelişiminin en başarılı

örneklerinden biridir. Halk tarafından safra taşı, kusma, kaşıntı, sedef, sıtma, hemoroid, kolik durumlarında ve sindirime yardımcı olarak çeşitli kullanım alanları vardır (Greenlee et al, 2007). Bunun yanında silibinin kanser hastaları tarafından gönüllülük esasına göre en sıklıkla kullanılan bitkisel preparatlardan biri olduğu bildirilmiştir ve pek çok insan kemoterapötiklerin yanında alternatif tıp ilacı olarak da silibinin kullanılmaktadır (Weneke et al, 2004).

Almanya’da bu bitki sindirim bozuklukları, intoksikasyon, kronik karaciğer hastalığında kullanılması için onay almıştır (<http://naturaldatabase.therapeuticresearch.com>, Erişim tarihi 1ubat 2018). Amerika Birleşik Devletleri tıbbi kullanım için henüz onay vermemiş olsada en sık satılan bitkisel ürünlerdendir (Post-White et al, 2007). Biyoyararlanımını artırmak için özel silibinin formülasyonları geliştirilmiştir. Klinik çalışmalarda kullanılan en yaygın silibinin ve silibinin ürünleri Legalon, Thisilyn, Siliphos ve Silipide’dir (Ramasay and Agarwal 2008).

2.3.1. Silibinin Etki Mekanizması

Silibinin hepatoprotektif etkisini çeşitli mekanizmalar ile gerçekleştirir. Bunlar;

- SOR inhibisyonu ve antioksidasyon (Comelli et al, 2007).
- Metal iyonlarının elasyonu (Darvishi Khezri et al, 2016).
- Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu (Hackett et al, 2012)
- Silibinin, DNA’ya bağımlı RNA polimeraz II’i uyarabilir, rRNA sentezini artırabilir ve bu yeni rRNA polimerazının oluşumunu hızlandırarak yeni hepatositlerin oluşmasını sağlayabilir (Ramasay and Agarwal 2008, Saller et al. 2001)
- Glukuronidasyon ve glutatyon konsantrasyonunu artırarak süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidazı stabilize eder (Saller et al, 2007)
- Anti-inflamatuar etki yolu ise lökotrien ve prostaglandin sentezinin inhibisyonu, NF- κ B inhibisyonu, Kupffer hücresi inhibisyonu, mast hücresi stabilizasyonu ve nötrofil migrasyonunun inhibisyonudur (Dehmlow et al, 1996)

- Karaci er stellat hücrelerinin miyofibroblastlara dönü ümünü azaltarak fibrozusun yava lamasını veya tersine çevrilmesini sa lar ve böylelikle anti-fibrotik etki gösterir (Loguercio and Festi 2011).
- Antikanserojen etkisi; siklin ba ımlı kinazların inhibisyonu ile kanser hücrelerinin büyümesinin durdurulması (Dixit et al, 2007).

Silymarin aynı zamanda östrojen sinyal modülatörü, insülin sensitizörü, antidiyabetikve koleretik etkilere de sahiptir (Li et al. 2015, Federico et al. 2006). Silibinin diyetle indüklenen hiperkolesterolemide 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktazı inhibe ederek kolesterol sentezini azaltabilece i ve hipokolesterolemik etkili olabilece i gösterilmi tir (Kreeman et al, 1998).

Deve dikeninden elde edilen silibininin enjektabl formu Amanita Phalloideszehirlenmelerinde kullanılan iyi bir antidottur ve suda çözünür. Bu mantar son derece toksiktir ve ölüme sebebiyet verir. Grabhorn et al. (2013) mantar zehirlenmesinde silibininin, N-asetil sistein ve aktif kömür ile erken detoksifikasyonunun prognozu iyile tirdi ini bildirmi lerdir. Vogel et al.(1984) Amanita Phalloides verilen köpeklerin bir kısmına 50 mg/kg olarak 5. ve 24. saatlerde silibinin uyguladı ve silibinin serum de i ikliklerini ve protrombin zamanındaki de i iklikleri ve karaci erdeki hemorajik nekroz derecesini belirgin derecede azalttı ını göstermi lerdir. Bitkinin etki mekanizması, silymarinin mantar toksinlerinin hepatositlere ba lanıp, oradan da enterohepatik sirkülasyona geçi ini inhibe etmesine ba lıdır. Mengs et al. (2012)'a göre amatoksin intoksikasyonunda silibininin etki mekanizması olarak enterohepatik sirkülasyonun inhibisyonu ve toksinlerin ba lanmasını engelleme yanında, TNF- α 'nın inhibisyonu ve protein sentezini uyarma da yer almaktadır.

2.3.2. Silibinin Yan Etkileri, Toksisitesi ve Güvenilirli i

Silymarin intravenöz infüzyonu ile ilgili toksisitesi üzerine çalı malar farelerde, sıçanlarda, tav anlarda ve köpeklerde yapılmı tır. LD₅₀ de eri farelerde 400 mg/kg, sıçanlarda 385 mg/kg, tav anlarda ve köpeklerde 140 mg/kg dır. nfüzyon hızına göre bu de erler de i ebilir. Yava infüzyonla LD₅₀, sıçanlarda 2 gr/kg, a ız yoluyla

uygulandı ında 10 gr/kg'dır (Lecomte 1975). Bu veriler akut toksisitenin dü ük oldu unu göstermektedir.

Silymarin yan etki bakımından güvenli bir bile ik olarak görülsede, çok sayıda hastanın katıldı ı bir çalı mada hafif gastrointestinal bulgular sergiledi i gözlemlenmi tir (Bahmani et al, 2015). Silibinin bilinen yan etkileri uzun süreli ve yüksek dozda kullanımda ba a rısı ve ka ıntıdır (Dunnick et al, 2011). Nadiren döküntü, ka ıntı ve anafilaksi bildirilmi , fakat hiç ölüm olmamı tır (Rainone 2005).

Rambaldi et al. (2007) tarafından deve dikenin alkole ba lı, Hepatit B ve C ye ba lı karaci er hastalı ında yararlı ve zararlı etkilerini de erlendirmek için yapılan toplam 1088 ki iyi içeren 18 klinik çalı manın sistematik derlemesinde, deve dikeninin artmı yan etki riski ta imadı ı bildirilmi tir. Her iki gruptada bildirilen semptomlar ka ıntı, bulantı, epigastrik a rı ve ba a rısıdır.

Silibinin gebelerde, çocuklarda ve 75 ya ından büyüklerde güvenle kullanılabilir. Mantar zehirlenmesi olan çocuklarda 20-50 mg/kg/gün'e kadar kullanımı ve toksisite bildirilmemi tir (Hruby et al, 1983). Silymarin, intrahepatik kolestazlı gebelerde 16 gün süreyle 560 mg/gün dozunda kullanımı ; hastaya veya fetusa hiçbir toksisite gözlemlenmemi tir (Hernandez and Nazar 1982). Bir ba ka çalı mada günlük 13 gr Siliphos (%30 silibinin)'un tolere edilebildi ini göstermi lerdir (Flaig et al, 2007).

2.3.3. Silibininin Hepatoprotektif Etkileri

Karaci er metabolik homeostazı korumak için çalı an ba lı ca organdır. Karaci er serbest radikal üreten bile ikleri metabolize eder. Oksidatif stres ise karaci erde fibroza ve siroza kadar ilerleyen hastalıklara neden olur. Bu nedenle dengeyi korumak önemlidir. Vücuttaki antioksidanları artırmanın bir yoluda antioksidan kapasiteli bile ikleri tüketmektir (Casas-Grajales and Muriel 2015). Silibinin'in hastalıklı karaci er üzerinde de immünmodülatör etkileri oldu u bulunmu tur (Dixit et al, 2007). Silibinin anti-fibrotik, antioksidan ve anti-inflamatuar özellikle sahip oldu u için son yıllarda siroz, toksik karaci er hasarı, kronik inflamatuar karaci er hastalıklarında kullanılmaya ba layan hepatoprotektör ajandır. Detoksifikasyon

veantioksidan özelli iyle asetaminofen, arsenik, karbon tetraklorür, fenotiyazinler, sisplatin, doxorubisin ve Amanita phalloides toksinleri nedeniyle zehirlenmelerde hepatoprotektif ajan olarak kullanılır (Federico et al. 2017, Surai 2015).

Silibinin/silymarin viral hepatitlerde, alkol a ırı alımlarında ve nonalkolik ya lı karaci er hastalı nda da progresyonu durdurdu u gösterilmi tir. Bu etkileri yaparken ki hedefleri oksidatif stres, insülin direnci, karaci erde ya birikimi ve mitokondriyal disfonksiyondur (Kayaalp 2009, Federico et al. 2017, Saller et al. 2008).

Polyak et al. (2010) silymarinden elde edilen bile iklerin etkilerini virüs kaynaklı oksidatif stres, TNF- α 'ya ba lı NF- κ B transkripsiyonu ve T hücre ço almasının inhibisyonu gibi testlerle de erlendirdiler. sosilibin A, taksifolin ve silibinin en güçlü hepatoprotektörlerdi ve tüm bile ikler virüse ba lı oksidatif stresi, antiviral etkiye sahip olup olmamasına bakılmaksızın inhibe etmi lerd. Bu veriler silymarinin insanlarda HCV enfeksiyonu seyrini etkileyebilece ini göstermektedir (Polyak et al, 2010).

Akut lenfoblastik lösemili (ALL) çocuklarda yapılan klinik çalı mada, silibininin ALL de kullanılan kemoterapi ajanlarının etkisini antagonize etmedi i ve uzun süre kullanımda karaci er enzimlerini dü ürebilece i gösterilmi tir (Ladas et al, 2010).

Hagag et al. (2016) ALL'li hastalarda silymarinin MTX'e ba lı hepatik ve böbrek toksisitesi üzerine koruyucu etkilerini ara tırmak için yaptıkları plasebo kontrollü klinik çalı mada, kemoterapi süresi boyunca gruplara her MTX dozundan sonra 1 hafta süreyle silymarin veya plasebo vermi ler; silymarin verilen grupta tedavi sonrası ALT, AST ve ALP düzeylerin plasebo grubuna göre anlamlı olarak daha dü ük oldu unu göstermi lerd.

2.4. HEPATOTOKS S TEDE S TOK NLER N ROLÜ

Uyarılmı lenfositler, monositler, makrofajlar ile di er bazı hücrelerde sentezlenen ve salındıkları zaman, salındıkları hücre çevresindeki hücrelere (parakrin) veya

salındıkları hücreler üzerine doğrudan (otokrin) etkili, çoğu 20-30 kD bir grup potent peptid veya glikoprotein yapısındaki solübl madde “sitokin” olarak adlandırılır. Monosit/makrofajlar tarafından salınan sitokinlere “monokin”, lenfositler tarafından salınan sitokinlere “lenfokin”, lökositlere etki eden monokin ve lenfokinlere ise “interlökin” denilmektedir (Bilgehan 2002).

Sitokinler antijen için spesifik değildir. Sentezlenmeleri ve hedef hücreleri etkilemeleri için çoğunlukla bir uyarı gerektirirler. Kendi aralarında agonist ve antagonist etkileşimler gösterebilirler. Lenfositlerin büyüme ve farklılaşmasında, antijenlerin eliminasyonunda, hematopoetik hücrelerin gelişiminde rol alırlar. Sitokinlerin etkileri hedef hücrelerdeki spesifik membran reseptörlerine bağlanmaları ile başlar. Sitokinler, lenfoid hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlar, bağışıklık yanıtı düzenlerler. İnflamasyona katılan hücreleri aktive eder; bu hücreleri reaksiyon yerine toplayarak orada tutar, çeşitli biyolojik etkinlikler gösterirler. Bazı hipofiz hormonlarının sentez ve salınımına neden olur, ateş ve akut faz cevabını oluştururlar. Bazıları antiviral etkinlik gösterir. Baş ağrısı, miyalji, ateş gibi genel infeksiyon bulguları ve yüksek dozlarda ödem, toksik, hatta öldürücü etkiler oluştururlar (Kuby 1992).

2.4.1. Interlökin-10 (IL-10)

IL-10, sitokin sentez inhibitör faktör olarak da bilinen anti-inflamatuar bir sitokindir ve inflamasyonu sınırlamada düzenleyici role sahiptir. IL-10 diğer önemli görevi makrofajların T hücre aktivasyonundaki işlevini engellemek ve B lenfositlere uyarıcı etkide bulunmaktır. Bu etkiler sonucunda T hücre aracılığıyla gelişen bağışıklık yanıtını inhibe ederek immunsupresif etki gösterir (Abbas et al. 1994, Wang et al. 2003). IL-10, TNF- α ve IL-1 gibi proinflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe eder ve IL-1 reseptör antagonisti gibi anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini artırır. Bu sitokin aynı zamanda NF-kappa B aktivitesini bloke eder ve JAK-STAT sinyal yolunun regulasyonuna da katılır (Nororiha et al, 1995). IL-10 aynı zamanda virüslerin, alkolün ve otoimmunitenin neden olduğu karaciğer hasarına karşı da korur (Cintra et al, 2008).

Son yıllarda ilaca ba lı hepatotoksisitede ba ıklık sistemi dikkat çekmeye ba lamı tır. Sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen ürünleri, NO, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler ilaca ba lı hepatotoksisite patogenezinde rol oynayabilirler. Hepatotoksik maddeler anti-inflamatuar sitokinlerin pro-inflamatuar sitokinlere oranını de i tirebilirler. Goto et al. (2015)pro ve anti-inflamatuar yanıt dengesinin ilaca ba lı hepatotoksisitede önemli bir faktör oldu unu, hepatotoksik ilaçlarla muamele edilen kupffer hücrelerinde TNF- α düzeyi de i mezken IL-1 β düzeyinin arttı mını ve IL-6, IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin baskılandı mını göstermi lerdir.

Amirshahrokhi et al.(2010) tarafından yapılan çalı mada, sıçanlarda safra kanalı ligasyonu ile indüklenen hepatik fibrozis modelinde sitokin üretimine kaptoprilin etkileri ara tırıldı ; TNF- α artarken, IL-10'nun azaldı ı gösterildi ve kaptoprilin hepatik fibroz üzerine koruyucu etkisinin sitokinler üzerinden oldu u sonucuna varıldı tır.

2.4.2. Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α)

TNF- , gram (-) bakterilere ve di er infeksiyöz ajanlara kar ı geli en akut inflamatuvar yanıtın ana mediyatörüdür. Pro-inflamatuar sitokinler içinde en erken salgılanan ve konakçı cevabındaki en güçlü mediyatördür. Sentezleyen ana hücreler mononükleer fagositlerdir. Antijen ile uyarıldı T lenfosit, NK ve mast hücreleri tarafından da sentezlenir. TNF- , infeksiyon bölgesine nötrofil ve monositlerin çekilmesinde önemli rol oynar. Dü ük dozlarda lökositler ve endotelde akut inflamasyonu indükler. Normal dozlarda inflamasyonun sistemik etkilerini düzenler. Yüksek dozlarda septik okun patolojik anormalliklerine neden olur (Özbal 2000).

TNF- , aktive olmu makrofajlar tarafından salgılanan, pro-inflamatuar, pirojen, akut faz reaktanı olan bir sitokindir. TNF- 'nın ayrıca, apoptozisin ekstrensek ve intrensek yola nda da ba langıç kaspazlarını aktive tirmek suretiyle etkin oldu u gözlenmi tir. Pro-apoptotik bir sinyal olarak kabul edilen TNF- 'nın antagonistleri, anti-apoptotik etkinlik göstermektedirler (Fadeel and Orrelius 2005).

Farklı in vivo ve in vitro çalışmaları TNF- α düzeyinin yükselmesinin hepatositlerde apoptozu indüklediği ve farklı deney hayvanlarında hepatik hasarın patogenezinde rol aldığını ortaya koymuştur (García-Ruiz et al.2003, Darwish et al. 2013).

Metotreksat toksisitesinin artmasıyla birlikte pro-inflamatuar sitokin olan TNF- α 'nın arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Aslaner ve ark, 2015). TNF- α 'nın yüksek doz metotreksat enjeksiyonu yapılan ratlarda arttığı; melatonin, balanites ekstraktı ve medikal ozonun MTX toksisitesini önlediği ve karaciğer hasarı azalırken TNF- α düzeyinin de azaldığı gösterilmiştir (Aslaner ve ark. 2015, Montasser et al. 2017). Arı venomuda TNF- α salınımını azaltarak MTX'a bağlı hepatotoksisiteyi azaltmaktadır (Darwish et al, 2013).

Hussain et al. (2016), 15 mg/hafta MTX ile tedavi edilen romatoid artritli hastalarda yaptığı klinik çalışmada silibinin tedavisi ile TNF- α düzeyinin düştüğünü, IL-10 düzeyinin ise anlamlı ölçüde arttığını göstermiştir. Zhang et al. (2009)'da miyokarditli sıçanlarda yaptığı çalışmada düşük doz MTX (0,1 mg/kg/gün) uygulamasının TNF- α 'yı azalttığını ve IL-10'nu artırdığını göstermiştir. Bu iki çalışma gösteriyor ki düşük dozda MTX uygulaması, TNF- α düzeyini düşürmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalı ma projesine, Abant ızet Baysal Üniversitesi Hayvan Ara tırmaları Yerel Etik Kurulundan onay alınmı tır (etik kurul onay tarihi:10.05.2017 ve karar no:2017/24). Çalı ma 35 adet Wistar Albino cinsi 8-10 haftalık di i sıçan kullanılarak,19-21 °C derece oda sıcaklı ında, 50-55 nisbi nem ortamında, ad libitum su ve besleme ile Abant ızet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Ara tırma merkezinde yapıldı. Çalı manın tüm a amaları 1983 Helsinki deklarasyonunda bildirilen “hayvanlarda bilimsel çalı malar için etik kurallar”uygun bir eilde yapıldı.

Tüm hayvanlar rastgele (randomizasyon) olarak hepsinde 7 sıçan olacak eilde 5 gruba ayrıldı. Bu sayede, bireyler arası varyasyonun deney ve kontrol gruplarına e it olarak da ılması sa lanmı oldu. Kafeslerin üzerine, grupları belirtecek plakalar yerle tirildi. Çalı manın ba langıcında ve sonunda a ırlıklar hassas terazi ile darası alınmı plastik bir kapta gerçekte tirildi.

3.1. DENEY PLANI

Silibinin için çözücü madde olarak dimethyl sulfoxide (DMSO) kullanıldı. Metotreksat ve silibininin intraperitoneal (ip) enjeksiyonları arasında 1 saat süre bırakıldı. Metotreksat tek sefer, silibinin ise 24 saat arayla 5 kez ip olarak yapıldı.

Grup 1: Kontrol Grubu

Kontrol grubundaki sıçanlara hiçbir ilaç verilmedi, hiçbir uygulama yapılmadı.

Grup 2: Metotreksat grubu (MTX)

Bu gruptaki sıçanlara ilk gün 20 mg/kg'dan MTXip olarak verildi. MTX'ten 1 saat sonra 0,5 cc DMSO ip olarak verildi. Di er 4 gün boyunca sadece DMSO 0,5 cc ip olarak verildi.

Grup 3: Metotreksat ve Silibinin 25 mg/kg grubu (MTX-SLB25)

Bu gruptaki sıçanlara ilk gün 20 mg/kg'dan MTX ip olarak verildi. MTX' ten 1 saat sonra silibinin 25 mg/kg dozunda 0,5 cc DMSO içinde çözünmü ekilde ip olarak verildi. Silibinin di er 4 gün boyunca 25 mg/kg dozda 0,5 cc DMSO içinde çözünmü olarak hergün aynı saatte verildi.

Grup 4: Metotreksat ve Silibinin 50 mg/kg grubu (MTX-SLB50)

Bu gruptaki sıçanlara ilk gün 20 mg/kg'dan MTX ip olarak verildi. MTX'ten 1 saat sonra silibinin 50 mg/kg dozunda 0,5 cc DMSO içinde çözünmü ekilde ip olarak verildi. Silibinin di er 4 gün boyunca 50 mg/kg dozda 0,5 cc DMSO içinde çözünmü olarak hergün aynı saatte verildi

Grup 5: Metotreksat ve Silibinin 100 mg/kg grubu (MTX-SLB100)

Bu gruptaki sıçanlara ilk gün 20 mg/kg'dan MTX ip olarak verildi. MTX'ten 1 saat sonra silibinin 100 mg/kg dozunda 0,5 cc DMSO içinde çözünmü ekilde ip olarak verildi. Silibinin di er 4 gün boyunca 100 mg/kg dozda 0,5 cc DMSO içinde çözünmü olarak hergün aynı saatte verildi (Tablo 1).

Tablo 1: Deney Planı

	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün
Kontrol	-	-	-	-	-	Sakrifikasyon
MTX	MTX-DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	
MTX-SLB25	MTX-SLB25	SLB25	SLB25	SLB25	SLB25	
MTX-SLB50	MTX-SLB50	SLB50	SLB50	SLB50	SLB50	
MTX-SLB100	MTX-SLB100	SLB100	SLB100	SLB100	SLB100	

Çalı ma sonunda tüm ratlara 90 mg/kg ketamin + 10 mg/kg xylazine intramuskuler olarak verildikten sonra kardiyak ponksiyon ile 4 ml kanları alınarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyonun ardından midsagital insizyon yapılarak karaci er dokuları hızlıca çıkartıldı. Çıkarılan karaci er dokuları %10 formaldehit ile tespit edildi.

Ratlardan alınan kanlar sarı kapaklı jelli biyokimya tüpüne alınarak 5-6 kez yava ça altüst edilerek bekletildi. Bekleyen kanlar, 20 dakikalık pıhtıla ma sürecinden sonra santrifüj i lemine (so utmalı, 1500g, 10 dakika) tabi tutuldu. Elde edilen serumlar numaralandırılarak 2 adet eppendorf (ısolab centrifuge tubes 2.0 ml, flat cap-without skirt) tüplere aktarılarak so uk zincir kurallarına uyularak Sakarya Üniversitesi E itim Ara tırma Hastanesi Merkez Kampüs Biyokimya Laboratuvarına getirilerek çalı ma gününe kadar -80°C de saklandı.

Alınan karaci erler, dokunun yakla ık 10 katı kadar hacimdeki tamponlanmı %10'luk formalin solüsyonuna konularak a zı sıkıca kapatılmı kaplarda patoloji laboratuvarına gönderildi.

3.2. LAÇLAR

Metotreksat için METHOTREXAT "EBEWE" 50 MG/5 ml; Sandoz
Silibinin için Silibinin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),1 gr poli tüpte
Ketamin için Ketalar; Pfizer
Xylazine için Rompun; Bayer
DMSO için Merck kimyasaldan Dimethyl Sulfoxide EMPLURA kullanıldı.

3.3. TOTAL ANT OKS DAN KAPAS TE VE TOTAL OKS DAN SEV YE

Plazma analizleri, önceden aplikasyonu yapılan ve kontrol serumları çalı ılan tam otomatik Beckman Coulter marka AU 680 (Koutou-ku, Tokyo, Made In Japan) analizörde gerçekleştirildi. Çalı mada Rel Assay Diagnostics marka kit kullanıldı. Total oksidan seviye(TOS) ve total antioksidan kapasite(TAK) tespiti için, Erel tarafından geli tirilen otomatik ölçüm metodu kullanılmı tır (Erel 2004, Erel 2005). Serum TAK sonuçları mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi. TOS için H2O2 Equivalent/L birimleri kullanıldı.

Oksidatif stres indeksi (OS) a a ıdaki formüle göre hesaplandı.

OS : TOS / TAK

OS (Arbitrary Unit)=TOS (mmol H₂O₂ Equivalent/L)/TAK (mmol Trolox Equivalent/L).

Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi.

3.4. TOTAL THİOL SEVİYESİ, NATİVE THİOL SEVİYESİ VE DİSÜLFİD

Total thiol ve native thiol Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi (SÜEAH) biyokimya laboratuvarında, tam otomatik Beckman Coulter marka AU 680 (Mishima K.K, Made in Japan) otoanalizöründe çalışıldı. Rel Assay Diagnostics marka kitlerde araştırma test parametreleri çalışıldı. Total thiol seviyesi (TTS), native thiol seviyesi (NTS) ve disülfid $\mu\text{mol/L}$ olarak ifade edildi.

Disülfid aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Disülfid} = (\text{Total thiol seviyesi} - \text{Native thiol seviyesi})/2$$

Total thiol seviyesi, native thiol seviyesi ve disülfidin birbirine oranlanması ile disülfid/native thiol (D/N), disülfid/ total thiol (D/T) ve native thiol/ total thiol (N/T) sonuçları elde edildi. Bu sonuçlar yüzde olarak hesaplanarak birbiriyle karşılaştırıldı (Erel ve Neselioğlu 2014).

3.5. ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN (ADMA) METRİKLERİNİN

Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA), SÜEAH biyokimya laboratuvarında, BioTek's Gen5™ ELx800 Eliza cihazı ile, Rel Assay Diagnostics marka, Rat Asymmetrical Dimethylarginine (ADMA) ELISA Kiti ile çalışılmıştır. Sonuçları optik dansitometri ile ifade edilmiştir.

3.6. TNF- α ve IL-10

Serum analizleri, SÜEAH Mikrobiyoloji Laboratuvarında tam otomatik mikro-ELISA cihazında (Grifols, Triturus, İspanya) çalışılmıştır. TNF- α ve IL-10 parametreleri için ratlara özel ELISA kitleri kullanılmıştır (Thermo Fisher

Scientific Rat TNF alpha ve IL-10 Platinum ELISA Kiti, Austria). Mikroeliza test prosedürü (pipetaj, inkübasyon, yıkama ve okuma i lemleri) üreticinin talimatları do rultusunda uygulanmı olup, Cut-off ve kalibrasyon e risi çıkarılarak sonuçta TNF- α ve IL-10'in serum düzeyleri kantitatif olarak ölçüldü. Sonuçlar pg/ml ile ifade edilmi tir.

3.7. B YOK MYASAL BEL RTEÇLER

Sakarya Üniversitesi E itim ve Ara tırma Hastanesi Merkez Kampüs Biyokimya Laboratuvarında Beckman Coulter marka AU 5800 (Koutou-ku, Tokyo, Made In Japan) tam otomatik analizörde gerçekleştirilmi tir.

Sonuçlar ise AST, ALT, ALP, LDH'in birimi U/L ile total bilirubin ve direkt bilirubin mg/dL ile ve albumin ise g/dL ile ifade edilmi tir.

De Ritis oranı ise AST/ALT olarak hesaplanmı tir.

3.8. H STOPATOLOJ K NCELEME

Karaci erler %10'luk tamponlanmı formalinde fikse edildikten sonra her birinden kesitler alınarak farklı plastik kasetler içinde otomatik doku takip cihazında %10'luk tamponlanmı formalinde %70'lik, %80'lik, %90'luk alkol, saf alkol, ksilol ve parafini içeren basamaklarda bekletme esasına dayalı doku takibine alındı. Takip sonrası elde edilen dokular eriyik parafin ile bloklandı. Bloklanan dokular -4 °C de so utuldu ve mikrotom cihazı ile herbir bloktan 5'er mikron kalınlı nda kesitler alındı. Rutin histopatolojik inceleme için lam üzerine alınan kesitler, 30 dakika, 70°C sıcaklıkta, etüvde deparafinize edildikten sonra; 10 dakika ksilolde bekletildi, otomatik boyama ve kapama cihazında Hemotoksilen-Eozin boyaması otomatik prosedür ile yapıldı. Histopatolojik incelemede her olgu patoloji uzmanı tarafından 1 ık mikroskobunda, dahil oldu u çalı ma grubu bilinmeksizin incelendi. Hepatik hasarı de erlendirmek üzere her olgu sinüzoidal dilatasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatosellüler vakuolizasyon ve nekroz varlı ı açısından "yok" (-

),“hafif” (+), “orta” (++) ve “a ır” (+++) olmak üzere skorlandı. Toplam skor her olgu için ayrıca hesaplandı.

3.9. STATİSTİK

Bütün istatistiksel yöntemler, “SPSS versiyon 22.0” istatistiksel paket programı kullanılarak yapıldı. Sayısal de i kenlere ait verilerin normal dağılımı Shapiro-Wilk ile değerlendirildi. Normalite testinin sonuçlarına göre parametrik veya non parametrik testler uygulandı. Dağılımı normal olanlara one-way ANOVA, dağılımı normal olmayanlara Kruskal-Wallis uygulandı.Çoklu karşılaştırma testi olarak normal dağılım de i kenlerde varyanslar homojen ise Post Hoc testlerden Tukey HSD, varyanslar homojen değil ise Dunnett T3 kullanıldı. İki grubun karşılaştırılmasında normal dağılıma uymayan de i kenlerde ise Mann-Whitney U analizi yapıldı. Deney öncesi ve sonrası vücut a ırlı ı düzeyleri iki yönlü tekrarlı ölçümler (tek faktör tekrarlı) varyans analizi ile karşılaştırıldı. Tanımlayıcı olarak ortalama±standart sapma ve ortanca (minumum-maksimum) değerleri verildi. Tüm analizlerde $p<0,05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalı maya 5 grup ve toplam 35 denek ile ba landı. Çalı ma boyunca 4 adet denek öldü ü için çalı ma dı nda kaldı. MTX-SLB100 grubundan bir denek deneyin 4. günü, MTX grubundan bir denek deneyin 5.günü ve MTX-SLB100 grubundan bir denek daha ve MTX-SLB25 grubundan bir denek deneyin 6.gününde öldü. MTX grubunda 6 denek, MTX-SLB25 grubunda 6, MTX-SLB100 grubunda 5 adet denek kaldı.

4.1. DENEKLER N A İRLİK DE KL KLER

Deneklerin çalı ma ba langıcındaki ortalama a ırlıkları arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu. Deney sonunda a ırlıkları kar ıla tırıldı nda MTX-SLB25, MTX-SLB50, MTX-SLB100 grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark vardı (Tablo3). Kontrol grubunun ilk ve son tartıları kar ıla tırıldı nda anlamlı artı saptanırken MTX grubunda bu de i iklik izlenmedi (P:0,218). Yine silibinin verilen grupların ilk ve son tartıları kar ıla tırıldı nda tartılarında anlamlı dü ü oldu u görüldü (Tablo 2).

Tablo 2: Deneklerin çalı ma öncesi ve sonrası a ırlıklarının kar ıla tırılması (Ortalama±SS)

Gruplar	Çalı ma öncesi a ırlık(g)	Çalı ma sonrası a ırlık(g)	P
Kontrol	203,7±24,5	214±19,4	0,005 ^a
MTX	200±21,6	185±20,1	0,218
MTX-SLB25	202±18,8	168±19,6	0,000 ^a
MTX-SLB50	207±19,1	176±19,5	0,000 ^a
MTX-SLB100	200±17	175±14,2	0,002 ^a

(a): Çalı ma öncesi ile sonrası a ırlıkları kar ıla tırılmasında anlamlı farklılık, $p < 0,05$

Tablo 3: Deneklerin çalı ma sonrası a ırlıklarının kar ıla tırılması (Ortalama±SS)

	Kontrol	MTX	MTX-SLB25	MTX-SLB50	MTX-SLB100
Çalı ma sonrası a ırlık(g)	214±19,4	185±20,1	168±19,6 ^a	176±19,5 ^a	175±14,2 ^a

(a): Çalı ma sonrası a ırlıklarında kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, p<0,05

Çalı ma öncesinde sa lıklı olan deneklerin MTX verildikten sonra ishal oldukları gözlemlendi. Kontrol grubunda ishal gözlemlenmedi. Özellikle silibininin 100 mg/kg verilen gruptaki ishal iddeti fazlaydı. Bu gruptan 2 adet denek çalı manın son gününe gelmeden öldü. Deney gruplarındaki kilo kaybı deney hayvanlarında görülen ishalle ili kiliydi.

4.2. OKS DAT F STRES PARAMETRELER

Total oksidan seviye ölçümünde 31 numuneden 3'ü kit yanlı sonuç verdi i için çalı ma dı ı bırakılmı tır.

Tablo 4: Serum TAK, TOS, OS ve ADMA de erlerinin kar ıla tırılması (Ortalama±SS ve ortanca(min-max))

	Kontrol	MTX	MTX+SLB25	MTX+SLB50	MTX+SLB100
TAK	1,37±0,04 1,38(1,32-1,43)	0,88±0,14 0,86(0,68-1,09) ^a	0,9±0,3 0,78(0,69-1,48) ^a	1,02±0,27 0,93(0,78-1,59)	0,97±0,39 0,82(0,72-1,66)
TOS	6,7±6,04 4,6(1,7-18,7)	11,7±10,3 10,3(1,1-28,6)	37,2±44,60 5,01(3,06-181,2)	48,5±76,64 5,01(3,06-181,19)	39,9±63,6 13,9(1,8-151,74)
OS	4,9±4,3 3,34(1,29-13,4)	13,7±12,3 11,07(1,26-34,4)	34,1±34,7 15,1(8,3-85,11)	36,2±48 6,42(3,52-113,9)	30,9±37,3 17,16(2,21-91,4)
ADMA	0,097±0,017 0,089(0,083-0,13)	0,086±0,002 0,086(0,083-0,089)	0,096±0,008 0,098(0,081-0,106)	0,085±0,003 0,085(0,080-0,089)	0,093±0,004 0,094(0,86-0,96)

(a): Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (p<0,05)

TAK: Total antioksidan kapasite, TOS: Total oksidan seviye, OS : Oksidatif stres indeksi, ADMA: Asimetrik dimetil arginin

Gruplardaki TOS, OS , ADMA düzeyinin gruplar arası karılaştırılmasında istatistiksel anlamlı fark yoktu. MTX maruziyeti ve de silibinin tedavisinin TOS, OS ve ADMA üzerine etkisi gözlenmedi. Ancak TAK düzeyleri MTX verilen grup ve MTX-SLB25 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalma gözlemlendi. Aynı azalma MTX-SLB50 ve MTX-SLB100 gruplarında saptanmadı. Yani azalmı olan TAK düzeyi silibinin 50-100 mg/kg dozlarda verildiğinde artmakla birlikte, MTX grubu ve kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark olu turacak düzeyde de ildir (Tablo 4).

Total thiol seviyesi beklendiğ i ekilde MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktü. Diğer tüm grupların kontrol grubu ile ve kendi aralarında karılaştırılmasında fark yoktu. Silibinin verilen gruplarda total thiol düzeyinin arttığı gözlemlendi. Ancak bu artış MTX grubu ile karılaştırıldığında anlamlı de ildi. Native thiol düzeylerinde de total thiol düzeylerine benzer bir etki gözlemlendi (Tablo 5).

Tablo 5: Serum TTS, NTS, disülfid, D/N, D/T, N/T değerlerinin karılaştırılması (Ortalama±SS ve ortanca(min-max))

	Kontrol	MTX	MTX-SLB25	MTX-SLB50	MTX-SLB100
TTS	2189,3±193,3 2167,7(1926-2542)	1259±309,7 1350(669-1535) ^a	1549,8±1320 1008(651-4127)	1948,6±1355,1 1372(1096-4957)	1685,2±1600 1026(634-4521)
NTS	884±171 814(699-1195)	311±93 294(199-449) ^a	892±1233 311(43-3257)	1005±1622 341(143-4653)	955±1494 280(198-3626)
Disülfid	651±24,1 645(613-676,5)	473,5±127,4 492,7(235-589,5)	328,6±89,1 313(223,5-435) ^a	471,2±153,9 486,5(152-651) ^a	364,6±108,2 414(177-447) ^a
D/N(%)	75±12 81(56-88)	156±48 147(108-242)	190±264 86(13-706)	148±106 151(3-330)	105±75 100(12-209)
D/T(%)	29±2 30(26-31)	37±2 37(34-41) ^a	28±14 31(10-46)	31±13 37(3-43)	29±12 33(9-40)
N/T(%)	40±4 38(36-47)	25±5 25(17-32) ^a	41±28 36(6,6-79)	35±27 25(13-94)	40±23 33(19-80)

(a): Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (p<0,05)

TTS: Total thiol seviyesi, NTS: Native thiol seviyesi, D/N: Disülfid/Native thiol oranı, D/T: Disülfid/Total thiol oranı, N/T: Native/Total thiol oranı

Disülfid de erleri MTX-SLB25, MTX-SLB50 ve MTX-SLB100 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde dü üktü. MTX grubu ile kontrol grubu arasında fark yoktu. Disülfid/native thiol de erleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Disülfid/total thiol de erleri ise MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti. Bu anlamlı yüksekli in silibinin tedavisi verilen gruplarda olmadı ı görüldü.

Native thiol/total thiol de erlerinin kar ıla tırmasında, TTS ve NTS'de gözlendi i ekilde anlamlı fark saptandı (Tablo 5).

4.3. TNF- α VE IL-10

Tablo 6'da gösterildi i gibi ne MTX maruziyeti ne de silibinin tedavisi TNF- α ve IL-10 düzeylerini etkilemektedir.

Tablo 6: Serum TNF- α ve IL-10 düzeylerinin kar ıla tırılması(Ortalama \pm SS ve ortanca(min-max))

	Kontrol	MTX	MTX-SLB25	MTX-SLB50	MTX-SLB100
TNF-α (pg/ml)	23,16 \pm 3,80 23,02(16-27)	22,35 \pm 2,42 22(19-25)	25,35 \pm 6,62 24,5(16-35)	23,59 \pm 2,63 24(20-27)	29,62 \pm 6,07 31(22-37)
IL-10 (pg/ml)	128 \pm 63 114(62-250)	160 \pm 81 131(65-296)	289 \pm 174 255(114-584)	113 \pm 57 124(37-204)	235 \pm 170 195(47-497)

4.4. B YOK MYASAL PARAMETRELER

AST, total bilirubin ve direkt bilirubin testleri gruplar arası karşılaştırmalarında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Ancak ALT ve ALP düzeyleri MTX alan gruplarda belirgin şekilde düştü ($P<0,05$). Benzer bir sonuç LDH düzeylerinde de gözlemlendi. MTX, MTX-SLB25 ve MTX-SLB100 verilen gruplarda LDH seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü saptandı. Fakat MTX-SLB50 grubunda farklılık yoktu. De Ritis oranı(AST/ALT), MTX ve silibinin verilen tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı seviyede yüksekti. Albumin düzeyleri de MTX ve silibinin verilen grupların hepsinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düştü (Tablo 7).

Tablo 7: Serum AST, ALT, AST/ALT, ALP, LDH, T.bil, D.bil, albumin değerlerinin karşılaştırılması (Ortalama \pm SS ve ortanca(min-max))

	KONTROL	MTX	MTX-SLB25	MTX-SLB50	MTX-SLB100
AST	137,9 \pm 15,4	114,8 \pm 29,1	101 \pm 30,7	116 \pm 27,8	125,6 \pm 76,9
(U/L)	131(125-167)	103(100-174)	101,5(62-149)	123(76-146)	97(76-262)
ALT	67,5 \pm 10,2	28 \pm 3,9	26,3 \pm 8,8	33,9 \pm 9,8	30,6 \pm 19,4
(U/L)	67,5(51,8-80,8)	29,6(22,8-31,5) ^a	25,5(16,8-36,1) ^a	35,1(20,5-42,5) ^a	22,2(19-65,1) ^a
AST/ALT	2,0 \pm 0,52	4,0 \pm 0,88	3,9 \pm 0,91	3,4 \pm 0,39	4,1 \pm 0,78
(U/L)	1,9(1,6-3,2)	4,0(3,2-5,5) ^a	3,8(2,9-5,5) ^a	3,3(2,9-4,2) ^a	4,6(2,9-4,7) ^a
ALP	242,29 \pm 47,4	69,67 \pm 71,5	55 \pm 13,2	38 \pm 17,5	49,4 \pm 31,8
(U/L)	227(173-310)	37(32-214) ^a	58(36-72) ^a	37,5(19-69) ^a	34(32-106) ^a
LDH	843 \pm 198	416 \pm 152	280 \pm 167	569 \pm 284	331 \pm 352
(U/L)	903(543-1054)	434,5(243-666) ^a	231,5(114-553) ^a	648,5(228-893)	216(86-947) ^a
T.Bil	0,16 \pm 0,01	0,13 \pm 0,03	0,15 \pm 0,05	0,16 \pm 0,09	0,17 \pm 0,06
(mg/dL)	0,17(0,15-0,18)	0,13(0,09-0,17)	0,13(0,12-0,24)	0,15(0,03-0,28)	0,21(0,1-0,23)
D.Bil	0,027 \pm 0,01	0,026 \pm 0,01	0,036 \pm 0,02	0,022 \pm 0,01	0,046 \pm 0,02
(mg/dL)	0,02(0,02-0,04)	0,025(0,02-0,04)	0,035(0,01-0,08)	0,02(0,01-0,03)	0,05(0,03-0,07)
Albumin	3,15 \pm 0,1	2,17 \pm 0,3	2,09 \pm 0,4	2,46 \pm 0,2	2,32 \pm 0,3
(g/dL)	3,13(3,05-3,24)	2,26(1,72-2,53) ^a	2,01(1,67-2,7) ^a	2,38(2,2-2,72) ^a	2,21(1,98-2,65) ^a

(a): Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($P<0,05$)

4.5. H STOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Kontrol grubunda yer alan sıçanların karaciğerinde bu organa özgü histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmadı (Resim 1).

MTX grubundaki sıçanların karaciğerlerinde kontrol grubuna kıyasla inflamasyon iddetinde belirgin bir artış oldu u saptanmıştır.

Bu çalışmada MTX uygulamasına bağlı hepatositlerde sinüzoidal dilatasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatoselüler vakuolizasyon ve fokal nekroz alanları gözlemlendi (Resim 2, 3). Özellikle MTX-SLB50 grubunda bu inflamasyonun gerilediği gözlemlendi. Sinüzoidal dilatasyon MTX, MTX-SLB25, MTX-SLB50, MTX-SLB100 tedavisi verilen tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti (Tablo 8).

İnflamatuvar hücre infiltrasyonu MTX ve MTX-SLB25 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti. MTX-SLB50 grubunun inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hem MTX hem de MTX-SLB25 grubuna göre anlamlı seviyede düşüktü ve de kontrol grubuyla aralarında fark yoktu.

Tablo 8: Sinüzoidal dilatasyon (SD), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (H), hepatoselülvakuolizasyon (HV), nekroz ve toplam skorun karşılaştırılması (Ortanca(min-max))

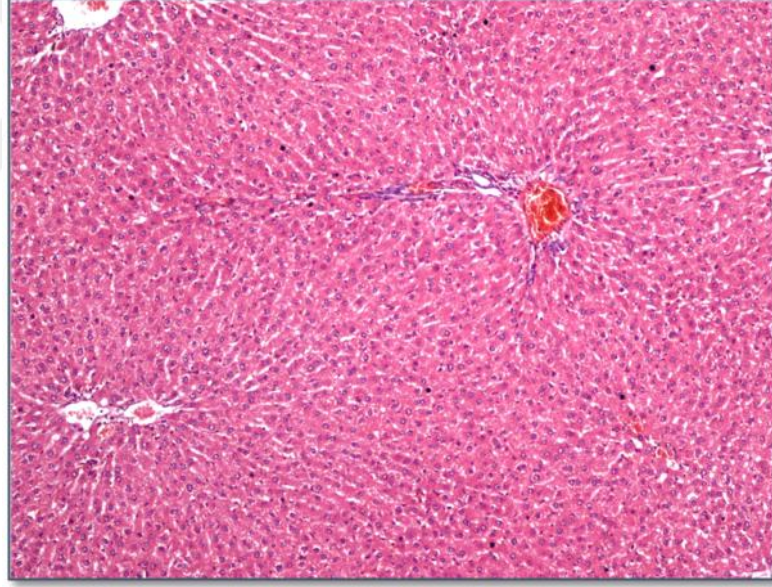
	Kontrol	MTX	MTX-SLB25	MTX-SLB50	MTX-SLB100
SD	0(0-0)	2(1-2) ^a	1,5(1-2) ^a	1(1-2) ^a	1(1-2) ^a
H	0(0-0)	1(0-1) ^a	1(0-2) ^a	0(0-0) ^{b,c}	0(0-1)
HV	0(0-0)	1(0-1) ^a	1(1-1) ^a	1(1-1) ^a	1(1-2) ^a
Nekroz	0(0-0)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-0)	0(0-1)
Toplam	0(0-0)	4(3-4) ^a	3(2-6) ^a	2(2-3) ^{a,b}	3(2-4) ^a

(a): Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, (b): MTX grubuna göre anlamlı farklılık, (c): MTX-SLB25 grubuna göre anlamlı farklılık (P<0,05)

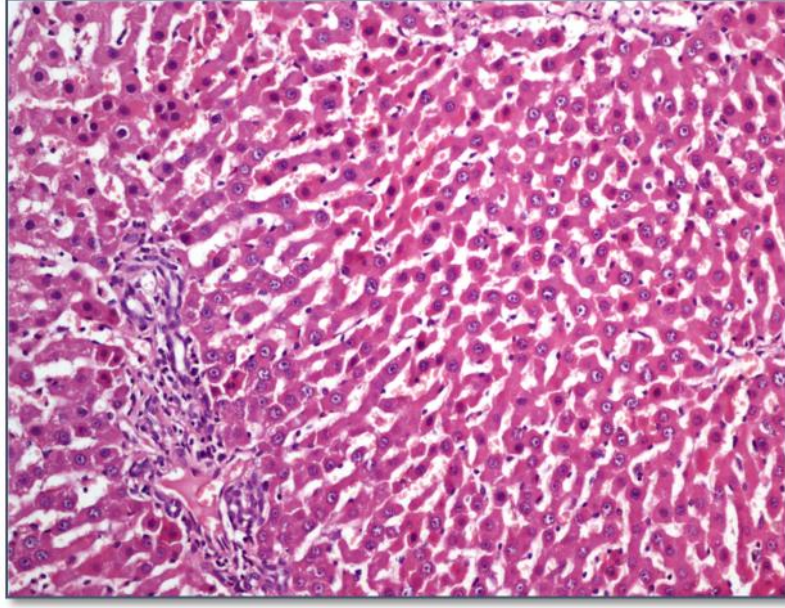
Hepatoselüler vakuolizasyon MTX, MTX-SLB25, MTX-SLB50, MTX-SLB100 gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek saptandı.

Kontrol grubu ve MTX-SLB50 grubu dışındaki tüm gruplarda nekroz alanları görülmekle birlikte anlamlı farklılık yoktu.

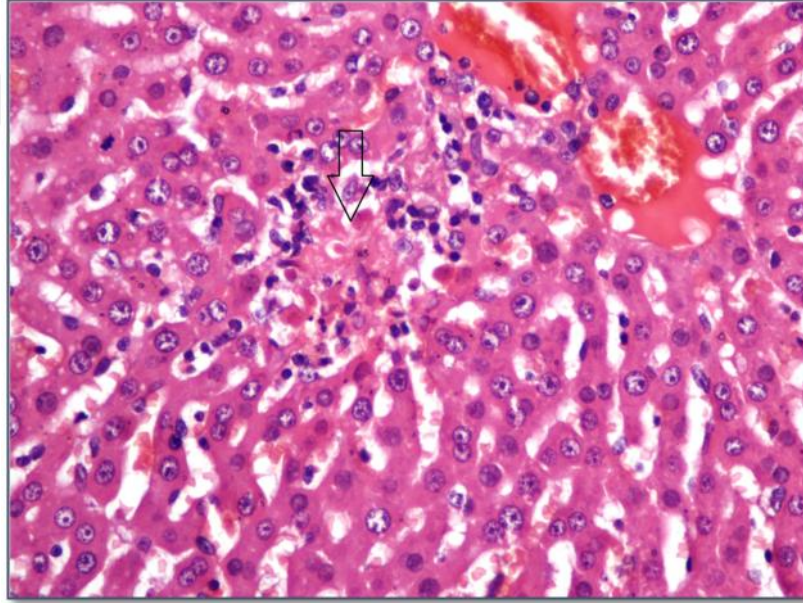
Denek grupların karaciğerlerinin histopatolojik incelemesinin toplam skoru MTX, MTX-SLB25, MTX-SLB50 ve MTX-SLB100 gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklıydı. MTX-SLB50, MTX grubuna göre toplam skoru daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo 8).



Resim 1: Santral ven ve portal alanlar arasında kordonlar ve trabeküller halinde organize olmuş hepatositlerden oluşan doal lobüler yapıda karaciğer dokusu (Hematoksilen-Eozin X 100)



Resim 2: Karaci er dokusunda portal alanda mononükleer inflamatuvar infiltrasyon ve belirgin sinüzoidal dilatasyon (Hematoksilen-Eozin X 200)



Resim 3: Karaci er dokusunun parankiminde nekroz alanı ve belirgin sinüzoidal dilatasyon (Hematoksilen-Eozin X400)

Deneklerin TAK, TOS, OS , ADMA, total thiol seviyesi (TTS), native thiol seviyesi (NTS), disülfid, TNF- , IL-10, AST, ALT, ALP, LDH, total bilirubin, direkt bilirubin, albümin sonuçları tablo 9, 10, 11, 12, 13’de verilmi tir. Deneklerin histopatolojik skorlama sonuçları ise tablo13’de gösterilmi tir.



5. TARTI MA

Bu çalı ma, MTX ile olu turulan hepatotoksisitedeki oksidatif stresin ve sitokinlerin rolünü ara tırmak; antioksidan ve hepatoprotektif bir ajan olan silibininin potansiyel koruyucu etkilerini doz ba ımlı olarak de erlendirmek üzere tasarlandı. Yüksek doz MTX ile hepatotoksisite olu turulan deneklerde, antioksidan savunma sistemi ve oksidatif stres parametreleri, sitokinler, ADMA, karaci er hasarını gösterecek biyokimyasal parametrelerin ölçülmesi ve histopatolojik olarak karaci erin incelenmesi ile karakterize edildi.

Metotreksatın karaci er toksisite potansiyeli bu ilacı kullanan hekimler için hala endi e kayna ıdır. Silibinin ise MTX tedavisinin önemli ve doz sınırlayıcı bir yan etkisi olan karaci er hasarının önlenmesinde potansiyel tedavi edici bir ajan olarak görülmektedir (Hagag et al, 2016).

Çalı mamızda; MTX ile birlikte silibinin verilen tüm grupların ortalama vücut a ırlıkları tedavi öncesine ve kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde dü ük bulundu. Bu durumun belirtilen gruplarda MTX infüzyonu sonrasında gözlenen ishalle ili kili olabilece i, bunun da MTX'e ba lı gastrointestinal sistem toksisitesi ile açıklanabilece i dü ünüldü. Zira MTX'in gastrointestinal sistem boyunca hızlı bölünen epitel hücrelerine hasar verdi i ve mukozite neden oldu u bilinmektedir (Howard et al, 2016). Ancak yalnız MTX alan grupta tartı azalması olmasına ra men MTX-SLB gruplarındaki gibi anlamlı düzeyde de ildi. Silibinin alan gruplarda tartı kaybının daha fazla olması, tartı kaybında silibinin de etkisi oldu unu dü ündürmektedir. Flaig et al. (2010) tarafından yapılan çalı mada yüksek doz oral silibinin verdikleri hastalarda yan etki olarak diyare geli ti i bildirilmektedir. Tartı azalmasında ishalin yanı sıra MTX verilen ve hepatotoksisite geli en ratlarda i tah azalmasında etkili olabilece i dü ünülmektedir.

Yaptı ımız çalı ma ile öngörümüz; MTX etkisi ile azalan TAK, artan TOS ve OS de erlerinin antioksidan özelli i oldu u bilinen silibinin tedavisi ile düzeltilmesiydi. MTX'in TAK ve TOS üzerine etkilerini inceleyen çalı malarda farklı sonuçlar

bildirilmi tir. Akbulut ve ark. (2014), 20 mg/kg MTX verilen sıçanlara amifostin, askorbik asit ve N-asetilsistein gibi antioksidan maddeler vererek biyokimyasal parametreleri ve karaci er histopatolojilerini de erlendirmi lerdir. TAK düzeylerinde di er gruplar ve kontrol grubu arasında farklılık saptanmazken, TOS düzeyinin MTX verilen tüm gruplarda kontrol grubuna göre arttı ı gözlenmi tir. en ve ark. (2014)'nın sıçanlarda MTX'in indükledi i oksidatif akci er hasarını inceledikleri çalı mada, 20 mg/kg tek doz MTX verilen deneklerde hem dokuda hem de serumda TAK düzeyinin azaldı ı TOS ve OS düzeylerinin arttı ı bildirilmi tir. Bu çalı mada antioksidan olarak verilen karvakrol ve nar ekstrasının TAK düzeylerini artırdı ı ve OS azalttı ı gözlenmi tir. Bizim çalı mamızda da sadece MTX verilen grupta ve MTX-SLB25 grubunda TAK düzeyinde kontrol grubuna göre azalma gözlenirken, MTX-SLB50 ve MTX-SLB100 gruplarında fark izlenmedi. Bu durum silibininin 50-100 mg/kg/gün dozunda antioksidan kapasiteyi kısmen artırdı ı ekinde yorumlanabilir. Ancak TOS ve OS de erleri açısından MTX ve MTX-SLB gruplarında kontrol grubuna göre fark izlenmedi.

Multipl organ yetmezli inde, inflamasyonda ve oksidatif stres durumlarında ADMA düzeyleri artar (Nijveldt et al, 2003). Artan TNF- α düzeylerinin de ADMA'yı artırdı ı gösterilmi tir (Ito et al, 1999). Karaci er ortamdaki ADMA düzeyinin en önemli belirleyicisidir ve karaci er yetmezli inde düzeyleri artar (Wilcken et al, 2007). Ancak çalı mamızda gruplar arasında TNF- α düzeylerinde oldu u gibi ADMA düzeyleri arasında da fark izlenmedi.

Silibininin antioksidan etkisini gösteren ba ka bir bulgu da thioller ile ilgili buldu umuz sonuçlardır. Sadece MTX verilen grupta total thiol, native thiol ve native/total thiol düzeyi azalırken, disüfid/total thiol düzeyi artmı tır. Bu de i ikli in silibinin alan gruplarda izlenmemesi, MTX'e ba lı olu an oksidan stresin (özellikle disüfid/total thiol oranının artı ı) silibinin ile azalması ekinde yorumlandı. Ayrıca MTX-SLB gruplarında disüfid düzeyinin kontrol grubuna göre azalmı olması da bu yorumu desteklemektedir. Thioller yeni geli tirilen bir oksidatif stres markeri oldu undan literatürde MTX'in thioller üzerine etkisini gösteren bir çalı maya rastlanmamı tır. Bizim çalı mamız MTX ve thioller ile ilgili ilk olma niteliindedir.

Önceki çalışmaları, yüksek doz MTX'in oksidatif stresi artırarak, SOR'da ve pro-inflamatuar sitokinlerde artışa neden olduğunu göstermektedirler (Dalaklıoğlu ve ark. 2013, Aslaner ve ark. 2015). MTX farmakolojik dozlarda pro-inflamatuar sitokinleri ve TNF- α 'yı baskımlarken, yüksek dozlarda pro-inflamatuar sitokin salınımına ve TNF- α düzeyinin artmasına sebep olur. MTX'in otoimmün myokardit oluştuğu sığıçanlarda düşük dozda (0,1 mg/kg/doz) ve uzun süre kullanıldığı bir çalışmada TNF- α ve IL-6 seviyelerinin düşük ve IL-10 seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir (Zhang et al, 2009). Sığıçanlara 20mg/kg dozunda verilen MTX'in SOR ve TNF- α düzeyini artırdığı bildirilmektedir (Kurt ve ark, 2015). Ancak çalışmamızda yüksek doz MTX verilmesi ile pro-inflamatuar sitokin olan TNF- α ve anti-inflamatuar sitokin olan IL-10'un serum seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik göstermemiştir.

Silibininin anti-inflamatuar etkisini gösteren çok sayıda çalışmada vardır. Osteoartrit modeli oluşturulan sığıçanlarda silimarin, selekoksib ve selekoksib+silymarin kombinasyonu tedavilerinin etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmada silimarinin de TNF- α ve SOR'u anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir (Ashkavand et al, 2014). Hussain et al. (2016) düşük doz MTX kullanan romatoid artritli hastalarda silibinin ve plaseboyu karşılaştırmışlar; silibinin kullanan grupta plaseboya göre anlamlı derecede daha düşük TNF- α ve daha yüksek IL-10 düzeyleri saptamışlardır. Schümann et al. (2003) ise T hücreye bağımlı hepatit oluşturulan fare modelinde silibininin, intrahepatik IL-10 sentezini artırdığını; TNF- α , IFN- γ , IL-4 ve IL-2'yi inhibe ederek karaciğer hasarını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Yukarıdaki çalışmaları modelleri, silibinin doz ve süreleri bizim çalışmamızdan farklı olsa da silibininin TNF- α ve IL-10 üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda ise MTX grubunda olduğu gibi farklı dozlarda silibinin alan gruplarda da TNF- α ve IL-10 düzeyleri açısından kontrol grubuna göre fark gözlemlenmedi.

Ladas et al.(2010)'ın ALL nedeniyle idame tedavisi sırasında MTX kullanan ve grade 2 karaciğer toksisitesi gelişen (AST, ALT veya total bilirubin düzeylerinde artış olan) çocuklarda yaptıkları çalışmada iki ayrı gruba 28 gün süreyle 5.1 mg/kg/gün'den oral silibinin (siliphos) ve plasebo verildiği belirtilmiştir; 28. günde gruplar arasında fark gözlemlenmezken, 56. günde silibinin grubunda plasebo grubuna

göre daha düşük AST de erlerinin olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmaya her ne kadar düşük doz ve uzun süreli MTX alan hastalar dahil edilmiş ve silibinin de uzun süreli kullanılması sağada bizim çalışmamızla benzer şekilde hastalara toksisite geliştikten sonra silibinin verilmiştir.

Yukarıdaki çalışmanın farklı versiyonu Hagag et al. (2016) tarafından gerçekleştirilmiştir. ALL'li çocuklara kemoterapi boyunca her MTX (indüksiyonda 5 gr/m², konsolidasyonda 1 gr/m² ve idamede 20 mg/m²) verilmesini takiben bir hafta süreyle oral silymarin veya plasebo verilmiş; silymarin alan grupta ALT, AST ve ALP düzeylerinin plasebo grubuna göre anlamlı olarak daha düşük seyrettiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın en önemli özelliği Ladas et al. (2010) yaptığı çalışmaya gibi silymarinin uzun süreli kullanımınıdır.

Ghaffari et al. (2011) MTX uygulanan sıçanlarda silymarinin etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada, tek doz MTX (100 mcg/kg, ip) ve silymarin (600 mg/kg, oral) vermişlerdir. Uygulamadan 15, 30 ve 45 gün sonra yapılan de erlendirmelerde serum AST, ALT, ALP, albumin, total ve direkt bilirubin düzeyleri silymarin verilen grupta, MTX grubuna göre belirgin derecede düşük saptanmıştır. Bu çalışmada bizimkinden farklı olarak MTX çok daha düşük dozlarda kullanılmış, silymarin ise oral olmakla birlikte çok yüksek dozda verilmiştir. Ayrıca en erken de erlendirmenin 15. günde yapılması ile de bizim çalışmamızdan farklılık arz etmektedir.

Ba langıçta çalışmayı planladığımız sıradaki öngörümüz MTX verilen deneklerde karaci er fonksiyon testlerinin (AST, ALT, ALP ve bilirubinler) artması eklindedir. Ancak çalışmaya sonrasında elde ettiğimiz de erlerde paradoksal olarak AST ve bilirubin de erlerinde de i iklik olmazken ALT ve ALP de erleri MTX verilen tüm gruplarda kontrol grubuna göre daha düşük düzeylerde saptandı. Bu konuda literatürde farklı sonuçlar bildirilmektedir. Dalaklıo lu ve ark. (2013) sıçanlara üç gün boyunca 7 mg/kg/gün dozda uyguladıkları MTX'in serum AST, ALT ve ALP düzeylerini anlamlı derecede artırdığını göstermişlerdir. Akbulut ve ark. (2014) ise 20 mg/kg MTX'in sıçanlarda AST ve ALP düzeylerini belirgin şekilde artırırken ALT düzeyini artırdığını rapor etmişlerdir. Her iki çalışmada da koruyucu olarak kullanılan antioksidan ajanların (resveratrol, amifostin, N-asetilsistein, askorbik asit)

bu parametrelerde kısmen düzelme sağlandı bildirilmiştir. Biz silibininin her üç dozuyla da ALT, AST ve bilirubin düzeylerinde de değişiklik gözlemlenemedik. Masif hepatik nekroz varlığında karaciğer enzim düzeylerinde düzelme gözlemlenmektedir (Özen ve ark, 2012). Biz de histopatolojik değerlendirme sırasında nekroz görmemize rağmen masif düzeyde deildi.

Kalemci ve ark. (2015) sıçanlarda MTX'e bağlı akciğer hasarı üzerine silibininin etkisini inceledikleri çalışmada, 10 mg/kg/dozda 3 gün süreyle verilen MTX'in ALT, AST düzeylerini artırdığını; MTX ile beraber 100 mg/kg silibinin verilen sıçanlarda ise bu artışın önlenildiğini göstermişlerdir. Ancak bu çalışmada silibinin yedisi MTX'ten önce olmak üzere 10 gün süreyle verilmiş ve silibininin bu etkisi antioksidan enzim düzeylerini artırmasına bağlıdır. Çalışmamızla aynı silibinin preparatının kullanıldığı bu çalışmanın en önemli farkı silibininin, MTX verilmeden önce ve daha uzun süre ile verilmesidir. Bu da silibininin hücreleri hasara uğramadan ve toksik etki oluşturan maddelere karşı daha dirençli hale getirdiğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamız bu şekilde planlamamızın en önemli nedeni yüksek doz MTX'in malignitelerde kullanılıyor olmasıdır. Bu tedavilerde MTX malign hücre içine girerek etki etmekte ve MTX toksisitesini önlemek için kullanılan lökoverin gibi ilaçların MTX etkisini gösterdikten sonra verilmesi önerilmektedir.

AST hem hepatosit sitoplazmasında hem de mitokondride bulunur. Ayrıca ALT karaciğere özgü iken AST diğer dokularda da bulunabilir (Guyton and Hall 2001). Farklı hastalıklarda ALT ve AST'nin etkilenmesi de farklı olabilmektedir. De Ritis oranının (AST/ALT) alkolik karaciğer hastalığı ve kronik karaciğer hastalığında yüksek iken, kronik viral hepatitlerde düşük olduğu belirtilmektedir (Botros and Sikaris 2013). Bununla birlikte AST ve ALT düzeylerinin her zaman histopatoloji ile korele olmadığını akılda tutmak gerekir (Khattab et al. 2015, Özen ve ark. 2012). Çalışmamızda her ne kadar serum AST düzeylerinde de değişiklik olmasa da ALT düzeylerinin MTX verilen tüm gruplarda kontrol grubuna göre düşük (dolayısıyla De Ritis oranının yüksek) saptanmasının ileri derecede karaciğer hasarı ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Ancak histopatolojik değerlendirmelerimizde ileri derecede hasar (nekroz ve inflamasyon) gözlemlememizin bu açıklama ile paradoks oluşturmaktadır.

Albumin, karaciğer tarafından sentezlenen en önemli proteindir ve hepatik fonksiyonun yararlı bir göstergesidir. Fakat asiti olan hastalarda da ılım hacminin geni olmasından dolayı veya nefrotik sendrom gibi böbrekten kayıp olduğu durumlarda da serum düzeyi düşebilmektedir (Thapa and Walia 2007). Bizim çalışmamızda albumin MTX, MTX-SLB25, MTX-SLB50 ve MTX-SLB100 gruplarında kontrol grubuna göre düşük seviyede idi. Albumin gibi yarılanma ömrü uzun olan bile enin 6 gün içerisinde anlamlı ölçüde azalmasını karaciğerin bozulan sentez fonksiyonuna bağlamak mümkün gözükmemektedir. Ancak MTX'in nefrotoksik etkileri de göz önünde bulundurulacak olursa albumin düşüklüğüne renal kayıpların yol açtığı düşünülebilir (Özen 2012, Wiczer et al. 2016). Biz çalışmamızda nefrotoksisteyi de erlendirmedik için kesin bir yorumda bulunmak doğru olmayacaktır. Bunların yanı sıra albuminin bir antioksidan olarak oksidatif stres sırasında koruyucu rol aldığı bilinmektedir. Hatta sepsisli hastalarda albumin desteğinin ekstraselüler tiol düzeyini artıracak bildirilmektedir (Sitar ME et al. 2013, Quinlan GJ et al. 2005). Biz albumin düzeyindeki en fazla düşüşü TAK'nın en çok azaldığı grup olan MTX ve MTX-SLB25 grubunda gözledik. Bütün bunlar birlikte değerlendirildiğinde albumin düzeyindeki azalmada en büyük rolün, oksidatif stres karşısında albuminin tamponlayıcı etkisine ait olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda MTX verilen sıçanların karaciğer histopatolojik incelemelerinde sinüzoidal dilatasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatoselüler vakuolizasyon ve yer yer nekroz alanları görülmesi MTX'in hepatotoksik etkisini göstermektedir. Özellikle inflamatuvar hücre infiltrasyonunun MTX grubunda artması ve MTX-SLB50 grubunda düzelme olduğu gözlenmiştir. MTX verilen gruplarda total histolojik skor anlamlı düzeyde artarken MTX-SLB50 grubunda MTX grubuna göre anlamlı düzelme olduğu fakat MTX-SLB25 ve MTX-SLB100 gruplarında bu farklılığın olmadığı izlenmiştir. MTX-SLB100 grubunda MTX-SLB50 grubuna benzer etkinin gözlenmemesi silibinin dozunun artırılmasıyla anti-inflamatuvar etkisinin artmadığı şeklinde yorumlanabilir. Bu sonuçlar MTX'e bağlı karaciğer hasarının antioksidan maddelerle önlenemediğini histopatolojik olarak gösteren diğer çalışmalarla uyumludur (Akbulut ve ark. 2014). Ghaffari ve ark. (2011) MTX'in indüklediği karaciğer fibrozisini silymarinin azaltabileceğini bildirmişlerdir.

6. SONUÇLAR

1. MTX-SLB gruplarındaki deneklerin a ırlıklarında çalı ma öncesine göre ve kontrol grubuna göre dü me izlendi. MTX deneklerde tartı kaybına neden olmakta, silibinin ise tartı kaybını anlamlı düzeye çıkaracak ekilde artırmaktadır.
2. MTX deneklerde TOS ve OS düzeylerini etkilemeksizin TAK'ı azaltmaktadır. MTX-SLB alan deneklerde TAK'ın azalmaması silibininin denekleri oksidatif stresten korudu unu göstermektedir.
3. MTX'in olu turdu u karaci er hasarında ve silibininin hepatoprotektif etkisinde ADMA'nın rolü saptanamamı tır.
4. MTX oksidatif stresi indükleyerek TTS, NTS ve native/total thiol oranını azaltıp, disüfid/total thiol oranını artırmaktadır. Buna kar ılıklı silibinin, disüfid düzeylerini azaltarak oksidatif stresi önlemektedir.
5. MTX ve silibinin etki mekanizmasında TNF- α ve IL-10'un rolü gösterilememi tir.
6. Hepatotoksisite olu turmak için verilen MTX (20 mg/kg, ip), uygulamadan5 gün sonra yapılan tetkiklerde AST ve bilirubin düzeylerini etkilemezken öngörümüzün aksine ALT düzeylerini dü ürmü tür. Bu de i iklik üzerine silibininin bir etkisi gözlenmemi tir.
7. Albumin düzeylerinin bu kadar kısa sürede dü mesi MTX'in nefrotoksisite etkisiyle birlikte özellikle albuminin koruyucu antioksidan özelli inden kaynaklandı ı dü ünülmü tür. Ancak çalı mamızda nefrotoksisite de erlendirilmedi i için bu konuda kesin bir yargıya varılamamı tır.
8. Histopatolojik incelemelerde MTX'in hepatik hasarı artırdı ı, 50 mg/kg/gün dozunda verilen silibininin bu hasarı belirgin ekilde önledi i gözlenmi tir. Silibininin bu etkiyi daha çok inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltarak göstermi tir.

7. KISITLILIKLARIMIZ

1. Çok fazla kan gerekmesinden dolayı kan MTX düzeyi bakılamadı ve silibininin kan MTX düzeyine etkisi incelenemedi.
2. MTX'e ba lı nefrotoksisite de erlendirilmedi i için özellikle albumin dü üklü ünde nefrotoksisitenin rolü belirlenemedi.



8. KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH, Poper JS. (1994). Cellular and Molecular Immunology Philadelphia. *Cytokines* (s. 240-261). Philadelphia: WB Saunders Company.
- Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. (2010). Milk Thistle in Liver Diseases: Past, Present, Future. *Phytotherapy Research*,24:1423-1432.
- Ackland SP, Scihilsky RL. (1987). High-dose methotrexate: a critical reappraisal. *J ClinOncol*,5(12):2017-2031.
- Akbulut S, Elbe H, Eris C, Dogan Z, Toprak G, Otan E, Erdemli E, Turkoz Y. (2014). Cytoprotective effects of amifostine, ascorbic acid and N-acetylcysteine against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *World J Gastroenterol.*,20(29):10158-10165.
- Akku , . (1996). *Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri*. Konya: Mimoza Basım.
- Amirshahrokhi K, Ghazi-Khansari M, Mohammadi-Farani A, Karimian G. (2010, dec). Effect of captopril on TNF- and IL-10 in the livers of bile duct ligated rats. *Iran J Immunol.*, 7(4): 247-251.
- Ashkavand Z, Malekinejad BS, Vishwanath. (2014). Combined action of Silymarin and Celecoxib in modulating inflammatory mediators in osteoarthritis. *Biomedicine&Preventive Nutrition*,4(4):485-490.
- Aslaner A, Çakır T, Çelik B, Do an U, Akyüz C, Ba türk A, Polat C, Gündüz U, Mayir B, ehirlı AÖ. (2015). The protective effect of intraperitoneal medical ozone preconditioning and treatment on hepatotoxicity induced by methotrexate. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(8):13303-13309.
- Böger RH. (2004). Asymmetric Dimethylarginine, an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase, Explains the “l-Arginine Paradox” and Acts as a Novel Cardiovascular Risk Factor. *J Nutr.*, 134:2842S-2847S
- Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC. (1997). Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*, 195:2068-2074.
- Babiak RM, Champello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. (1998). Methotrexate: Pentose cycle and oxidative stres. *Cell Biochem Funct.*, 16(4):283-293.
- Bahmani M, Shirzad H, Rafieian S, Rafieian-Kopaei M. (2015). Silybum marianum: Beyond Hepatoprotection. *J Evid Based Complementary Altern Med.*, 20(4): 292-301.
- Bath RK, Brar NK, Forouhar FA, Wu GY. (2014). A review of methotrexate-associated hepatotoxicity. *Journal of Digestive Diseases*, 15(10):517-524.
- Berends MAM, Snoek J. (2006). Liver injury in long-term methotrexate treatment in psoriasis is relatively infrequent. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 24(5):805-811.
- Berger MM. (2005). Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition*, 24(2):172-183.
- Bertram G, Katzung. (2004). Basic and Clinical Pharmacology. Singapore: The McGraw-Hill Companies.
- Beydilli H, Yilmaz N, Cetin ES, Topal Y, Celik OI, Sahin C, Topal H, Cigerci IH, Sozen H. (2015). Evaluation of the protective effect of silibinin against diazinon induced hepatotoxicity and free-radical damage in rat liver. Iran

- Red Crescent Med J., 17(4):e25310.
- Bijak M. (2017). Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*, 22(11):1942.
- Bilgehan, H. (2002). *Temel mikrobiyoloji ve ba ı rlık bilimi* (10.baskı b.). izmir: Barı yayınları.
- Blackwell S. (2010). The biochemistry, measurement and current clinical significance of asymmetric dimethylarginine. *Ann Clin Biochem.*, 47(1):17-28.
- Botros M, Sikaris KA. (2013). The De Ritis Ratio: The Test of Time. *The Clinical Biochemist Reviews*, 34(3):117-130.
- Breimer L. (1991). Repair Of DNA Damage. Induced By Reactive Oxygen Species. *Free Rad. Res. Commun*, 14(3):159-171.
- Burçak G, Andican G. (2004). Oksidatif DNA Hasarı ve Ya lanma. *Cerrahpa a Tip Dergisi* , 35(4):159-169.
- Caetano NN, Champello AP, Carnieri EG, Kluppel ML, Oliveira MB. (1997). Effect of methotrexate (MTX) on NAD(P)+ dehydrogenases of HeLa cells: malic enzyme, 2- oxoglutarate and isocitrate dehydrogenases. *Cell biochemistry and function*, 15(4):259-64.
- Cao G, Prior RL. (1999). Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol*, 299:50-62.
- Casas-Grajales S, Muriel P. (2015). Antioxidants in liver health. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 6(3):59-72.
- Cetinkaya A, Bulbulolu E, Kurutas EB, Kantarceken B. (2006). N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit*, 12(8):274-278.
- Chabner BA, Allegra A, Curt C. (1985). Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest.*, 76(3):907-912.
- Chládek J, Martínková J, Sispera L. (1997). An in vitro study on methotrexate hydroxylation in rat and human liver. *Physiol Res.*, 46(5):371-379.
- Cintra DE, Pauli JR, Araújo EP, Moraes JC, De Souza CT, Milanski M, Morari J, Gambero A, Saad MJ, Velloso LA. (2008). Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol.*, 48:628-637.
- Circu ML, Aw TY. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6):749-762.
- Comelli MC, Mengs U, Schneider C, Prosdocimi M. (2007). Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. *Integr. Cancer Ther.*, 6:120-129.
- Cooke JP. (2004). Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation*, 109(15):1813-1818.
- Cros CE, Halliwell B, Borish E, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. (1987). Oxygen Radicals And Human Disease. *Ann Intern Med.*, 107(4): 526-545.
- Cuellar ML, Espinoza LR. (1997). Methotrexate use in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 23(4):799-809.

- Cure E, Kirbas A, Tumkaya L, Cure MC, Kalkan Y, Yilmaz A, Suleyman Y. (2015). Protective effect of infliximab on methotrexate-induced liver injury in rats: Unexpected drug interaction. *J Can Res Ther.*, 11(1):164-169.
- Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. (1997). Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Office Journal of the Turkish Nephrology*,3-4: 92-95.
- Dabak DO, Kocaman N. (2015). Effects of silymarin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Renal Failure*, 37(4):734-739.
- Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcıt F, Gumuslu S. (2013). Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Human&experimental toxicology*, 32(6):662-671.
- Darvishi Khezri H, Salehifar E, Kosaryan M, Aliasgharian A, Jalali H, Hadian AA. (2016). Potential effects of silymarin and its flavonolignan components in patients with beta-thalassemia major: a comprehensive review in 2015. *Ad. Pharmacol Sci.*:3046373.
- Darwish SF, El-Bakly WM, Arafa HM, El-Demerdash E. (2013). Targeting TNF- and NF- B Activation by Bee Venom: Role in Suppressing Adjuvant Induced Arthritis and Methotrexate Hepatotoxicity in Rats. 8(11).e79284
- Davies KJ. (1994). *Oxidative stress: The paradox aerobic life: Free Radicals and Oxidative stress: Environment, Drugs and Food Additives* (1. b.)(C. Rice-Evans B, Hallivvell GG, Lunt DÜ) Portland Press.
- Davies KJ. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, 83(3-4):301-310.
- Deep G, Agarwal R. (2010). Anti-metastatic Efficacy of Silibinin: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential against Cancer. *Cancer metastasis reviews*, 29(3):447-463.
- Dehmlow C, Erhard J, De Groot H. (1996). Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology*, 23(4):749-754.
- Dixit N, Baboota S, Kohli K, Ahmad S, Ali J. (2007). Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. *Indian Journal of Pharmacology*, 39(4):172-179.
- Dore S, Ferris CD, Takahashi M. (1999). Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci.*, 96:2445-2450.
- Dubey L, Chatterjee S, Ghosh A. (2016). Hepatic and hematological adverse effects of long-term low-dose methotrexate therapy in rheumatoid arthritis: An observational study. *Indian J Pharmacol.*, 48(5):591-594.
- Dunnick JK, Singh B, Nyska A, Peckham J, Kissling GE, Sanders, J. M. (2011). Investigating the potential for toxicity from long-term use of the herbal products, goldenseal and milk thistle. *Toxicol Pathol.*, 39(2):398-409.
- Elmas B, Erel Ö, Ersava D, Yürümez Y. (2017). Thiol/disulfide homeostasis as a novel indicator of oxidative stress in children with simple febrile seizures. *Neurological Sciences*:38(11):1969-1975.
- Erel O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.*, 37(2):112-119.
- Erel O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.*, 38(12):1103-1111.

- Erel O, Neselio lu S. (2014). A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clinical Biochemistry*, 47(18):326-332.
- Esmaeil N, Anaraki SB, Gharagozloo M, Moayedi B. 2017. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many lock. *In International Immunopharmacology*, 50:194-201
- Essid E, Dernawi Y, Petzinger E. (2012). Apoptosis induction by OTA and TNF- in cultured primary rat hepatocytes and prevention by silibinin. *Toxins(Basel)*, 4(11):1139-1156.
- Fadeel B, Orrelius S. (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med.*, 258(6):479-517.
- Farber S, Diamond LK. (1948). Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist,4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med.*, 238(23):787-793.
- Federico A, Dallio M, Loguercio C. (2017). Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules*, 22(2), E191.
- Federico A, Trappoliere M, Tuccillo C, De Sio I, Di Leva A, Del Vecchio Blanco C, Loguercio C. (2006). A new silybin-vitamin E-phospholipid complex improves insulin resistance and liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease: Preliminary observations. *Gut*, 55(6):901-902.
- Flaig TW, Glodé M, Gustafson D, Van Bokhoven A, Tao Y, Wilson S, Su LJ, Li Y, Harrison G, Agarwal R, Crawford ED, Lucia MS, Pollak M. (2010). A study of high-dose oral silybin-phytosome followed by prostatectomy in patients with localized prostate cancer. *Prostate*,70(8):848-855.
- Flaig T, Gustafson DL, Su LJ, Zirrolli JA, Crighton F, Harrison GS, Pierson AS, Agarwal R, Giod LM. (2007). A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patients. *Invest New Drugs. Invest New Drugs.*, 25(2):139-146.
- García-Ruiz C, Colell A, Marí M, Calvo M, Enrich C, Fernández-Checa JC.(2003). Defective TNF- mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *Journal of Clinical Investigation*, 111(2):197-208.
- Ge Y, Zhang Y, Chen Y, Li Q, Chen J, Dong Y, Shi W. (2011). Silibinin Causes Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Some Human Pancreatic Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8):4861-4871.
- Ghaffari AR, Noshad H, Ostadi A, Ghojazadeh M, Asadi P. (2011). The effects of milk thistle on hepatic fibrosis due to methotrexate in rat. *Hepat Mon.*, 11(6): 464-468.
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C.(2000). Total Antioksidan capacity as a tool to ases redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol.*,29(11):1106-1114.
- Gillman G. (2009). Tedavinin Farmakolojik Temeli. stanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2009: 1315-405. stanbul:Nobel Tıp Kitapevleri.
- Go J, Kim JE, Koh EK, Song SH, Sung JE, Lee HA, Lee YH, Lim Y, Hong JT, Hwang DY. (2016). Protective Effect of Gallotannin-Enriched Extract Isolated from Galla Rhois against CCl4-Induced Hepatotoxicity in ICR Mice. *Nutrients*, 8(3):107.
- Gopinathan V, Miller NJ, Milner AD, Rice-Evans CA. (1994). Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Lett*, 349(2):197-200.

- Goto S, Deguchi J, Nishio N, Nomura N, Funabashi H. (2015). Hepatotoxicants induce cytokine imbalance in response to innate immune system. *J Toxicol. Sci.*, 40(4):389-404.
- Grabhorn E, Nielsen D, Hillebrand G, Brinkert F, Herden U, Fischer L, Ganschow R. (2013) Successful outcome of severe *Amanita phalloides* poisoning in children. *Pediatr Transplant.*, 17(6):550-5
- Green JM. (2012). Glucarpidase to combat toxic levels of methotrexate in patients. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 8:403-413.
- Greenlee H, Abascal K, Yarnell E, Ladas E. (2007). Clinical applications of *Silybum marianum* in oncology. *Integr Cancer Ther.*, 6(2):158-165.
- Gutteridge J. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*, 91(2-3):133-140.
- Guyton AC, Hall JE. (2001). Textbook of Medical Physiology. Tıbbi Fizyoloji. 10th ed, Çeviren: Çavuşoğlu H, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. ti., İstanbul.
- Hackett ES, Twedt DC, Gustafson DL. (2012). Milk Thistle and Its Derivative Compounds: A Review of Opportunities for Treatment of Liver Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(1):10-16.
- Hagag AA, Elgamsy MA, El-Asy HM, Mabrouk MM. (2016). Protective role of silymarin on hepatic and renal toxicity induced by mtx based chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.*, 8(1):e2016043
- Halliwell B, Gutteridge J. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Hardman JG, Limbird LE. (2001). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (L. E. Limbird, Dü.) ABD: The McGraw-Hill Companies.
- Harma M, Erel O. (2005). Oxidative stress in women with preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 192(2):656-657.
- Hegyi T, Goldie E, Hiatt M. (1994). The protective role of bilirubin in oxygen-radical diseases of the preterm infant. *J Perinatol*, 14(4):296-300.
- Hernandez R, Nazar E. (1982). Effect of silymarin in intrahepatic cholestasis of pregnancy (preliminary communication). *Rev Chil Obstet Ginecol*, 47(1):22-29.
- Howard SC, McCormick J, Pui CH, Buddington RK, Harvey, R. D. (2016). Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *The Oncologist*, 21(12):1471-1482.
- Hruby K, Csomos G, Fuhrmann M, Thaler H. (1983). Chemotherapy of *Amanita phalloides* poisoning with intravenous silibinin. *Hum Toxicol.*, 2(2):183-195.
- Hussain SA, Mortada AH, Jasim NA, Gorial FI. (2016). Silibinin Improves the Effects of Methotrexate in Patients with Active Rheumatoid Arthritis: Pilot Clinical Study. *Oman Medical Journal*, 31(4):263-269.
- Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. (1999). Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, 99(24):3092-3095.
- Jahovic N, Çevik H, ehirli AO, Yen BC, Ener, G. (2003). Melatonin prevents methotrexate induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res.*, 34(4):282-287.

- Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. (1983). The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med.*, 309(18):1094-1104.
- Jones DP, Liang Y. (2009). Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(10):1329-1338.
- Kılınç K, Kılınç A. (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33:110-118.
- Kılınç A, Kılınç K. (2003). *Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri* (1. b.). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Kalemci S, Topal Y, Celik SY, Yılmaz N, Beydilli H, Ko ar MI, Dirican N, Altunta . (2015). Silibinin attenuates methotrexate-induced pulmonary injury by targeting oxidative stress. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(2):503-507.
- Kamen BA, Nylen PA, Camitta BM, Bertino JR. (1981). Methotrexate accumulation and folate depletion in cells as a possible mechanism of chronic toxicity to the drug. *British journal of haematology*, 49(3):355-360.
- Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang KH. (2002). Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Pharm Exp Ther.*, 302(1):138-144.
- Kayaalp O. (2009). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. (12.ed b.) Ankara: Pelikan Yayıncılık.
- Kent PD, Luthra HS, Michet CJ. (2004, sep). Risk factors for methotrexate-induced abnormal laboratory monitoring results in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*, 31(9):1727-1731.
- Kevat S, Ahern M, Hall P. (1988). Hepatotoxicity of methotrexate in rheumatic diseases. *Med Toxicol Adverse Drug Exp.*, 3(3):197-208.
- Khalifa M, Bakr AG, Osman AT. (2017). Protective effects of phloridzin against methotrexate-induced liver toxicity in rats. *Biomed Pharmacother.*, 95:529-535.
- Khattab H, Fouad A, Hamza M, Mohey MA, El-Akel W, Ghoneim H, Abul-Fotouh A, Esmat G. (2015). Relation of ALT and AST levels to the histopathological changes in liver biopsies of patients with chronic hepatitis C genotype 4. *Arab J Gastroenterol.*, 16(2):50-53.
- Kim DH, Jin YH, Park JB, Kobashi K. (1994). Silymarin and its components are inhibitors of beta-glucuronidase. *Biol Pharm Bull.*, 17(3): 443-445.
- Kocaman N, Çolako lu N. (2013). Tekrarlayan Dozlarda Metotreksat Uygulamasının Sıçan Karaci er Dokusu Üzerine Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi*, 18(3):141-145.
- Kreeman V, Skottova N, Walterova D. (1998). Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Planta Med.*, 64(2):138-142.
- Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. (1986). Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum.*, 29(7): 832-835.
- Kremer TM, Rinne ML, Xu Y, Chen XM, Kelley MR. (2004). Protection of pulmonary epithelial cells from oxidative stress by hMYH adenine glycosylase. *Respiratory Research*, 5:16.

- Kren V, Walterova D. (2005). Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 149(1): 29-41.
- Kroll DJ, Shaw HS, Oberlies NH. (2007). Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies. *Integr Cancer Ther.*, 6(2): 110-119.
- Kuby J.(1992) Immunology, W.H. Freeman and Company
- Kundi H, Ates I, Kiziltunc E, Cetin M, Cicekcio lu H, Neselioglu S, Erel O, Ornek E. (2015). A novel oxidative stress marker in acute myocardial infarction; thiol/disulphide homeostasis. *Am J Emerg Med.*, 33(11):1567-1571.
- Kurt A, Tumkaya L, Turut H, Cure MC, Cure E, Kalkan Y,Sehitoglu I, Acipayam, A. (2015). Protective Effects of Infliximab on Lung Injury Induced by Methotrexate. *Arch Bronconeumol.*, 51(11):551-557.
- Laan RF, Blom HJ, Abreu RA, Van Ede AE, Van de Putte LB. (1998). Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum.*, 27(5):277-292.
- Ladas E, Kroll D, Oberlies N,Cheng B, Ndao NH, Rheingold SR, Kelly KM. (2010). A randomized controlled, double-blind pilot study of milk thistle for the treatment of hepatotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer*, 116(2):506-513.
- Lappalainen M, Hamalainen S, Juutilainen A, Koivula I, Pulkki K, Jantunen, E. (2017). Asymmetric dimethylarginine in the assessment of febrile neutropenia in hematological patients. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 77(2):130-134.
- Lecomte J. (1975). Pharmacologic properties of silybin and silymarin. *Rev Med Liege*, 30(4), 110-114.
- Li HB, Yang YR, Mo ZJ, Ding Y, Jiang WJ. (2015). Silibinin improves palmitate-induced insulin resistance in C2C12 myotubes by attenuating IRS-1/PI3K/Akt pathway inhibition. *Braz J Med Biol Res.*, 48(5): 440-446.
- Loguercio C, Festi D. (2011). Silybin and the liver: From basic research to clinical practice. *World Journal of Gastroenterology*, 17(18): 2288-2301.
- MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley HS, Vallance P. (1996). Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *British Journal of Pharmacology*, 119(8):1533-1540.
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. (1999). Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kB, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol*, 163(12):6800-6809.
- McCord JM. (1993). Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*, 26(5):351-357.
- Mehrzadi S, Fatemi I, Esmaeilzadeh M, Ghaznavi H, Kalantar H, Goudarzi M. (2018).Hepatoprotective effect of berberine against methotrexate induced liver toxicity in rats. *Biomed Pharmacother*. 97: 233-239
- Mercan U. (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet Fak Derg.*, 15(1-2):91-96.
- Minetti M, Mallozzi C, Di Stasi AM, Pietraforte D. (1998). Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. *Arch Biochem Biophys.*, 352(2):165-174.

- Montasser AO, Saleh H, Ahmed-Farid OA, Saad A, Marie MA. (2017). Protective effects of *Balanites aegyptiaca* extract, Melatonin and Ursodeoxycholic acid against hepatotoxicity induced by Methotrexate in male rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 106(6):557-565.
- Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Phelan J, Tilley S, Santa Maria J, Vallance P, McDonal N. (2001). Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol.*, 8(8):679-683.
- Muthumani M, Prabu SM. (2012). Silibinin potentially protects arsenic-induced oxidative hepatic dysfunction in rats. *Toxicol Mech Methods.*, 22(4):277-288
- Nagy P. (2013). Kinetics and Mechanisms of Thiol–Disulfide Exchange Covering Direct Substitution and Thiol Oxidation-Mediated Pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(13): 1623-1641.
- Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkewcz IM, Shear NH. (1999). Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatotoxicity. *Clin Biochem.*, 32(7):519-536.
- Nijveldt J, Terlink T, Siroen MP, Van Lambalgen AA, Rauwerda JA, Van Leeuwen PA. (2003). The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). *In Clinical Nutrition*, 22(1):17-22.
- Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Leeuwen PA. (2003). The asymmetrical dimethylarginine (ADMA)-multiple organ failure hypothesis. *In Clinical Nutrition*, 22(1):99-104.
- Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, Van Leeuwen PA. (2003). Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr.*, 22(1):23-30.
- Nororiha IL, Niemir Z, Stein H, Waldher R. (1995). Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 10(6): 775-786.
- Nuernberg B, Koehnke R, Solsky M, Hoffman J, Furst DE. (1990). Biliary elimination of low-dose methotrexate in humans. *Arthritis and rheumatism*, 33(6): 898-902
- Ohasone Y, Okano Y, Kameda H, Hama N, Matsumura M, Nojima T, Nakamura K, Kuwana M, Ogasawara T, Hirakata M, Yoshida T, Mimori T, Akizuki M, Ikeda Y. (1997). Toxicity of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis – clinical characteristics in patients with MTX-induced pancytopenia and interstitia pneumonitis. *Ryumachi*, 37(1):16-23.
- Ohbayashi M, Yamamoto C, Shiozawa A, Kohyama N, Kobayashi Y, Yamamoto T. (2013). Differential mRNA expression and the uptake of methotrexate in primary MAEC and MLF cells: involvement of the Abc and Slco/Oatp transporters in alveolar epithelial cell toxicity. *J Toxicol Sci.*, 38(1): 103-114.
- Otani K, Shimizu S, Chijiwa K, Yamaguchi K, Kuroki S, Tanaka M. (2001). Increased Urinary Excretion of Bilirubin Oxidative Metabolites in Septic Patients: A New Marker for Oxidative Stress in Vivo. *Journal of Surgical Research*, 96(1): 44-49.
- Ozyazici S, Karateke F, Turan U, Kuvvetli A, Kilavuz H, Karakaya B, Ozaltun P, Alısık M, Erel O. (2016). A Novel Oxidative Stress Mediator in Acute Appendicitis: Thiol/Disulphide Homeostasis. *Mediators of Inflammation*. 2016:6761050

- Özbal Y. (2000). *Temel mmünoloji* (2. baskı b.). stanbul. Nobel Tıp Kitapevi.
- Özen H, Yüce A, Gürakan F, Saltık Temizel, N, Demir H. (2012). *Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme* (1. b.). stanbul. Akademi Yayınevi.
- Polyak SJ, Morishima C, Lohmann V, Pal S, Lee DY, Liu Y, Graf TN, Oberlies NH. (2010). Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13): 5995-5999.
- Post-White J, Ladas EJ, Kelly KM. (2007). Advances in the use of milk thistle (silybum marianum) . *Integr Cancer Ther.*, 6(2):104-109.
- Quemeneur L, Gerland LM, Flacher M, Ffrench M, Revillard JP, Genestier L.(2003). Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *Journal of mmunology*, 170 (10): 4986-4995.
- Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. (2005). Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*. 41(6): 1211-9.
- Rainone, F. (2005). Milk Thistle. *American Family Physician*, 72(7): 1285-1292.
- Ramasay K, Agarwal R. (2008). Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer letters*, 269(2): 352-362.
- Rambaldi A, Jacobs B, Gluud C. (2007). Milk thistle for alcoholic and/or hepatitis B or C virus liver diseases. *The Cochrane Database Of Systematic Reviews*, 17;(4):CD003620.
- Reiss S, Buie L, Adel N, Goldman DA, Devlin SM, Douer D. (2016). Hypoalbuminemia Is Significantly Associated with Increased Clearance Time of High Dose Methotrexate in Patients Being Treated for Lymphoma or Leukemia. *Annals of hematology*, 95(12): 2009-2015.
- Romay C, Pascual C, Lissi EA. (1996). The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz J Med Biol Res*, 29(2): 175-183.
- Rubino FM. (2001). Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 764(1-2):217-254.
- Safaei F, Mehrzadi S, Khadem Haghghian H, Hosseinzadeh A, Nesari A, Dolatshahi M, Esmailizadeh M, Goudarzi M. (2017) Protective effects of gallic acid against methotrexate-induced toxicity in rats. *Acta Chir Belg.*, 25: 1-9.
- Salamone F, Galvano F, Marino A, Paternostro C, Tibullo D, Bucchieri F, MangiameliA, Parola M, Bugianesi E, Li Volti G. (2012). Silibinin improves hepatic and myocardial injury in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Digestive and Liver Disease*, 44(4): 334-342.
- Saller R, Brignoli R, Melzer J, Meier R. (2008). An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Forsch. Komplementmed*, 15(1): 9-20.
- Saller R, Meier R, Brignoli R. (2001). The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol*, 61(14): 2035-2063.
- Saller R, Melzer J, Reichling J, Brignoli R, Meier R. (2007). An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. *Forsch Komplementmed*, 14(2): 70-80.

- Sayyah M, Boostani H, Pakseresht S, Malayeri A. (2010). Comparison of Silybum marianum (L.) Gaertn. with fluoxetine in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychophar. Biol Psychiatry*, 34(2): 362-365.
- Scandalios, J. G. (2002). The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9): 483-486.
- Schümann J, Prockl J, Kiemer AK, Vollmar AM, Bang R, Tiegs G. (2003). Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury. *J Hepatol.*, 39(3): 333-340.
- Schmiegelow K, Müller K, Mogensen SS, Mogensen PR, Wolthers BO, Stoltze UK, Tuckuviene R, Frandsen, T. (2017). Non-infectious chemotherapy-associated acute toxicities during childhood acute lymphoblastic leukemia therapy. *F1000Research*, 7;6: 444.
- Schornagel JH, Mcvie JG. (1983). The clinical pharmacology of methotrexate. *Cancer Treat Rev*, 10(1): 53-75.
- Sen CK, Packer L. (2000). Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2), 653-669.
- Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. (2010). The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reviews*, 6(2): 82-90.
- Sitar ME, Aydin S, Cakatay U.(2013). Human serum albumin and its relation with oxidative stress. *Clin Lab*. 59(9-10):945-52.
- Stocker R. (2004). Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal.*, 6(5): 841-849.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235(4792):1043-6.
- Surai PF. (2015). Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. *Antioxidants*, 4(1): 204-247.
- en HS, en V, Bozkurt M, Türkçü G, Güzel A, Sezgi C, Abakay Ö, Kaplan, I. (2014). Carvacrol and Pomegranate Extract in Treating Methotrexate-Induced Lung Oxidative Injury in Rats. *Med Sci Monit*, 20: 1983-1990.
- ener G, Ekio lu-Demiralp E, Çetiner M, Ercan F, Yen BC. (2006). Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulator effects. *Eur J Pharmacol.*, 542(1-3): 170-178.
- Ternay LA, Sorokin V. (1997). *Redox, radical and antioxidants: oxidants, antioxidants, and free radical* (1. b.). (S. I. Baskin, & H. Salem, Dü) Washington: Taylor and Francis.
- Thapa BR, Walia A. (2007). Liver Function Tests and their Interpretation. *The Indian Journal of Pediatrics*, 74(7): 663-671.
- Thomas MJ. (1995). The Role Of Free Radicals And Antioxidants: How Do We Know That They Are Working? *Critical Rew Food Sci And Nutr*, 35(1-2): 21-39.
- Treon SP, ChabnerBA. (1996). Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *ClinChem*, 42(8 pt 2): 1322-1329.
- Turell L, Radi R, Alvarez B. (2013). The thiol pool in human plasma: central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med.*, 65: 244-253.

- Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M, Senturk O, Avsar E, Haklar G, Celikel C, Hulagu S, Tozun, N. (2008). Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate induced liver toxicity. *Dig Dis Sci*, 53(4): 1071-1077.
- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*, 339(8793): 572-575.
- Van den Bongard HJ, Manhjt RA, Boogerd W, Schornagel JH, Soesan M, Schellens JH, Beijnen JH. (2001). Successful rescue with leucovorin and thymidine in a patient with high-dose methotrexate induced acute renal failure. *Cancer Chemother Pharmacol*, 47(6): 537-540.
- Vogel G, Tuchweber B, Trost W, Mengs U. (1984). Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 73(3): 355-362.
- Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. (2003). Tumor necrosis factor. In *The Cytokine Handbook, 4th Edition* (Eds Thomson A.W. & Lotze M.T.). (s. 603-614). London: Elsevier Science Ltd.
- Wang J, Sim, AS, Wang XL, Salonikas J, Naidoo D, Wilcken D.E. (2006). Relations between plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) and risk factors for coronary disease. *Atherosclerosis*, 184(2): 383-388.
- Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Chang YH, Ou HC, Kuo JS. (2002). Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur. J. Neurosci*, 16(11): 2103-2112.
- Weiseger RA. (1986). Oxygen Radicals and ischemic tissue injury. *Gastroenterology*, 90(2): 494-496.
- Wellington K., Jarvis B. (2001). Silymarin: A Review of its Clinical Properties in the Management of Hepatic Disorders. *BioDrugs*; 15(7): 465-489
- Weneke U, Earl J, Seydel C, Horn O, Crichton P, Fannon D. (2004). Potential health risk of complementary alternative medicines in cancer patients. *Br J Cancer*, 90(2): 408-413.
- West SG. (1997). Methotrexate hepatotoxicity. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 23(4): 883-915.
- Whiting-O'Keefe QE, Fye KH, Sack KD. (1991). Methotrexate and histologic hepatic abnormalities: a meta-analysis. *The American Journal of Medicine*, 90(6): 711-716.
- WHO. (2017, Mart). *Model list of essential medicines 20th list*. http://www.who.int/entity/medicines/publications/essentialmedicines/20th_EML2017.pdf.
- Wiczler T, Dotson E, Tuten A, Phillips G, Maddocks K. (2016). Evaluation of incidence and risk factors for high-dose methotrexate-induced nephrotoxicity. *J Oncol Pharm Pract.*, 22(3):430-436.
- Widemann BC, Adamson PC. (2006). Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*, 11(6): 694-703.
- Widemann BC, Schwartz S, Jayaprakash N, Christensen R, Pui CH, Chauhan N, Daugherty C, King TR, Rush JE, Howard SC. (2014). Efficacy of Glucarpidase (Carboxypeptidase G2) in Patients with Acute Kidney Injury After High-Dose Methotrexate Therapy. *Pharmacotherapy*, 34(5): 427-439.

- Wilcken DE, Sim AS, Wang J, Wang XL. (2007). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. *Mol Genet Metab*, 91(4): 309-317.
- Wildburger R, Mrakovcic L, Stroser M, Andric L, Borovic Sunjic S, Zarkovic K, Zarkovic, N. (2009). Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence? Review Citation. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 29(1): 189-193.
- Xing Ding W, Ming Yin X. (2004). Dissection of the multiple mechanisms of TNF-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med.*, 8(4): 445-454.
- Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, Van Kammen DP. (1998). Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res*, 32(1):1-8.
- Yao J, Zhi M, Gao X, Hu P, Li C, Yang X. (2013). Effect and the probable mechanisms of silibinin in regulating insulin resistance in the liver of rats with non-alcoholic fatty liver. *Braz J Med Biol Res.*, 46(3): 270-277.
- Yashikawa T, Naito Y. (2002). What is oxidative stress? *JMAJ*, 45(7): 271-276.
- Yuksel M, Ates I, Kaplan M, Alı ık M, Erel Ö, Saygılı F, Kayaçetin E. (2016). The dynamic thiol/disulphide homeostasis in inflammatory bowel disease and its relation with disease activity and pathogenesis. *International Journal of Colorectal Disease*, 31(6): 1229-1231.
- Zhang B, Wang B, Cao S, Wang Y, Wu D. (2017). Silybin attenuates LPS-induced lung injury in mice by inhibiting NF- B signaling and NLRP3 activation. *Int J Mol Med*, 39(5): 1111-1118.
- Zhang Z, Zhao P, Li A, Lv X, Gao Y, Sun H, Ding Y, Liu, J. (2009). Effects of Methotrexate on Plasma Cytokines and Cardiac Remodeling and Function in Postmyocarditis Rats. *Mediators of Inflammation*. 2009:389720
- Zhong X, Zhu Y, Lu Q. (2006). Silymarin causes caspase activation and apoptosis in K562 leukemia cells through inactivation of Akt pathways. *Toxicology*, 227(3): 211-216.
- Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R. (2001). Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*, 22-29;358(9299): 2113-2117.

VER LER

Tablo 9: Deneklerin TOS, TAK ve ADMA de erleri

GRUP		TOS (mmol H ₂ O ₂ equiv./L)	TAK (mmol Trolox equiv./L)	ADMA
1	KONTROL	18,73	1,39	0,083
2	KONTROL	2,37	1,4	0,086
3	KONTROL	3,54	1,43	0,131
4	KONTROL	5,58	1,33	0,110
5	KONTROL	4,62	1,38	0,094
6	KONTROL	1,71	1,32	0,089
7	KONTROL	10,64	1,34	0,086
8	MTX	-	0,99	0,085
9	MTX	6,73	0,68	0,089
10	MTX	1,1	0,87	0,087
11	MTX	10,34	0,85	0,084
12	MTX	28,63	0,83	0,083
13	MTX	12,07	1,09	0,087
14	MTX-SLB 25	13,72	0,69	0,100
15	MTX-SLB 25	81,71	0,96	0,097
16	MTX-SLB 25	7,21	0,74	0,095
17	MTX-SLB 25	105,99	1,48	0,106
18	MTX-SLB 25	7,73	0,74	0,099
19	MTX-SLB 25	6,97	0,83	0,081
20	MTX-SLB 50	48,9	0,93	0,082
21	MTX-SLB 50	-	1,12	0,085
22	MTX-SLB 50	181,19	1,59	0,088
23	MTX-SLB 50	5,01	0,78	0,080
24	MTX-SLB 50	-	0,93	0,084
25	MTX-SLB 50	3,06	0,87	0,086
26	MTX-SLB 50	4,48	0,93	0,089
27	MTX-SLB100	13,9	0,81	0,096
28	MTX-SLB100	1,94	0,82	0,086
29	MTX-SLB100	151,74	1,66	0,094
30	MTX-SLB100	1,86	0,84	0,096
31	MTX-SLB100	30,1	0,72	0,092

Tablo 10: Deneklerin Total thiol seviyesi (TTS), native thiol seviyesi (NTS) ve disülfid düzeyleri

NO	GRUP	TTS($\frac{\text{iol}}{\mu\text{m}^2}$)/L	NTS($\frac{\text{TS}}{\mu\text{m}^2}$)/L	Disülfid($\frac{\text{sev}}{\mu\text{m}^2}$)/L
1	KONTROL	1926,3	699	613,65
2	KONTROL	2296,3	1005	645,65
3	KONTROL	2077,2	790	643,6
4	KONTROL	2167,7	814	676,85
5	KONTROL	2542,1	1195	673,55
6	KONTROL	2112,3	761	675,65
7	KONTROL	2203,3	930	636,65
8	MTX	1422,8	243	589,9
9	MTX	669	199	235
10	MTX	1277,7	280	498,85
11	MTX	1226,3	308	459,15
12	MTX	1423,2	449	487,1
13	MTX	1535,3	390	572,65
14	MTX-SLB 25	651,1	43	304,05
15	MTX-SLB 25	1750,8	1243	253,9
16	MTX-SLB 25	753,1	306	223,55
17	MTX-SLB 25	4127,9	3257	435,45
18	MTX-SLB 25	960,8	316	322,4
19	MTX-SLB 25	1055,3	187	434,15
20	MTX-SLB 50	1767	794	486,5
21	MTX-SLB 50	1865	563	651
22	MTX-SLB 50	4957,2	4653	152,1
23	MTX-SLB 50	1096,7	143	476,85
24	MTX-SLB 50	1338,2	244	547,1
25	MTX-SLB50	1372,4	341	515,7
26	MTX-SLB 50	1244,2	303	470,6
27	MTX-SLB100	1238,6	410	414,3
28	MTX-SLB100	1005,1	263	371,05
29	MTX-SLB100	4521,8	3626	447,9
30	MTX-SLB100	1026,1	198	414,05
31	MTX-SLB100	634,8	280	177,4

Tablo 11: Deneklerin TNF- α ve IL-10 düzeyleri

NO	GRUP	TNF- α (pg/ml)	IL-10(pg/ml)
1	KONTROL	26,026	77,93
2	KONTROL	23,023	62,17
3	KONTROL	26,026	95,65
4	KONTROL	16,016	145,9
5	KONTROL	23,023	250,33
6	KONTROL	21,021	114,386
7	KONTROL	27,027	151,82
8	MTX	25,025	127,192
9	MTX	23,023	210,92
10	MTX	25,025	124,23
11	MTX	21,021	136,05
12	MTX	19,019	296,63
13	MTX	21,021	65,13
14	MTX-SLB 25	23,023	222,74
15	MTX-SLB 25	35,035	386,27
16	MTX-SLB 25	26,026	584,28
17	MTX-SLB 25	30,03	142,95
18	MTX-SLB 25	22,022	287,76
19	MTX-SLB 25	16,016	114,386
20	MTX-SLB 50	26,026	142,95
21	MTX-SLB 50	22,022	204,03
22	MTX-SLB 50	21,021	99,6
23	MTX-SLB 50	27,027	133,1
24	MTX-SLB 50	24,024	124,23
25	MTX-SLB 50	20,02	50,35
26	MTX-SLB 50	25,025	37,54
27	MTX-SLB100	31,031	497,59
28	MTX-SLB100	33,033	195,165
29	MTX-SLB100	37,037	47,39
30	MTX-SLB100	22,022	148,86
31	MTX-SLB100	25,025	290,72

Tablo 12: Deneklerin AST, ALT, LDH ve ALP de erleri

No	GRUP	AST(U/L)	ALT(U/L)	LDH(U/L)	ALP(U/L)
1	KONTROL	167	51,8	1012	310
2	KONTROL	125	67,5	814	283
3	KONTROL	130	69,9	963	211
4	KONTROL	134	65,4	903	173
5	KONTROL	127	58,6	613	227
6	KONTROL	131	80,8	543	221
7	KONTROL	151	78,6	1054	271
8	MTX	100	30,6	269	62
9	MTX	101	23,4	422	36
10	MTX	174	31,3	666	37
11	MTX	108	28,6	447	32
12	MTX	104	22,8	243	37
13	MTX	102	31,5	450	214
14	MTX-SLB 25	62	16,8	114	63
15	MTX-SLB 25	97	30,1	182	59
16	MTX-SLB 25	116	21	158	43
17	MTX-SLB 25	106	36,1	397	57
18	MTX-SLB 25	149	36	281	36
19	MTX-SLB 25	76	18,2	553	72
20	MTX-SLB 50	76	20,5	228	19
21	MTX-SLB 50	78	23,9	233	28
22	MTX-SLB 50	146	42,3	893	69
23	MTX-SLB 50	128	38	-	31
24	MTX-SLB 50	123	42,5	751	47
25	MTX-SLB 50	123	29,5	546	48
26	MTX-SLB 50	138	40,7	764	24
27	MTX-SLB100	90	19	86	32
28	MTX-SLB100	103	22,2	284	34
29	MTX-SLB100	97	20,7	126	106
30	MTX-SLB100	76	26,4	216	34
31	MTX-SLB100	262	65,1	947	41

Tablo 13: Deneklerin total bilirubin (T.Bil), direkt bilirubin (D.Bil) ve albumin de erleri

No	GRUP	T.Bil(mg/dL)	D.Bil(mg/dL)	Alb.(g/dL)
1	KONTROL	0,15	0,02	3,09
2	KONTROL	0,17	0,02	3,24
3	KONTROL	0,18	0,04	3,22
4	KONTROL	0,16	0,02	3,05
5	KONTROL	0,17	0,04	3,19
6	KONTROL	0,18	0,02	3,12
7	KONTROL	0,15	0,03	3,13
8	MTX	0,17	0,04	2,4
9	MTX	0,13	0,02	1,72
10	MTX	0,13	0,03	2,21
11	MTX	0,12	0,03	2,32
12	MTX	0,09	0,02	1,82
13	MTX	0,16	0,02	2,53
14	MTX-SLB 25	0,14	0,03	1,78
15	MTX-SLB 25	0,2	0,04	2,16
16	MTX-SLB 25	0,24	0,08	1,67
17	MTX-SLB 25	0,13	0,01	2,7
18	MTX-SLB 25	0,12	0,02	1,86
19	MTX-SLB 25	0,12	0,04	2,35
20	MTX-SLB 50	0,15	0,03	2,2
21	MTX-SLB 50	0,13	0,03	2,72
22	MTX-SLB 50	0,28	0,02	2,31
23	MTX-SLB 50	0,03	0,01	2,38
24	MTX-SLB 50	0,21	0,02	2,58
25	MTX-SLB 50	0,09	0,02	2,36
26	MTX-SLB 50	0,27	0,03	2,69
27	MTX-SLB100	0,21	0,05	2,21
28	MTX-SLB100	0,11	0,03	2,19
29	MTX-SLB100	0,21	0,07	2,65
30	MTX-SLB100	0,1	0,03	2,55
31	MTX-SLB100	0,23	0,05	1,98

Tablo 14: Deneklerin karaci ere ait histopatolojik inceleme sonuçları

GRUP	Sinüzoidal dilatasyon	nflamatuar hücre infiltrasyonu	Hepatoselüler vakuolizasyon	Nekroz	SKOR
KONTROL	-	-	-	-	0
KONTROL	-	-	-	-	0
KONTROL	-	-	-	-	0
KONTROL	-	-	-	-	0
KONTROL	-	-	-	-	0
KONTROL	-	-	-	-	0
KONTROL	-	-	-	-	0
MTX	++	+	+	-	4
MTX	+	+	+	-	3
MTX	++	+	+	-	4
MTX	++	+	+	-	4
MTX	++	-	+	+	4
MTX	++	+	-	-	3
MTX-SLB25	++	-	+	-	3
MTX-SLB25	++	+	+	+	5
MTX-SLB25	++	++	+	+	6
MTX-SLB25	+	+	+	-	3
MTX-SLB25	+	-	+	-	2
MTX-SLB25	+	+	+	-	3
MTX-SLB50	+	-	+	-	2
MTX-SLB50	+	-	+	-	2
MTX-SLB50	+	-	+	-	2
MTX-SLB 50	++	-	+	-	3
MTX-SLB50	+	-	+	-	2
MTX-SLB50	++	-	+	-	3
MTX-SLB50	++	-	+	-	3
MTX-SLB100	++	-	++	-	4
MTX-SLB100	+	-	+	-	2
MTX-SLB100	++	-	+	-	3
MTX-SLB100	+	-	+	-	2
MTX-SLB100	+	+	+	+	4

ÖZGEÇM

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Emine KÜRT

Do um yeri ve tarihi: Karahallı/U AK, 14.08.1989

Uyru u: Türkiye

Medeni durumu: Bekar

leti im adresi:Erenler Mah. 1139. Sok. No: Bingül Evler 1 A Blok 30 A/1

Erenler

Telefonu: 05059624505

Yabancı dili: İngilizce

II- E itimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye do ru)

2013- Halen Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sa lı ı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Sakarya

2006-2013 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, zmir

2003-2006 Özel Ça lisesi, Sakarya

1998-2003 Ali Dilmen İkö retim Okulu, Sakarya

1995-1998 22 Haziran İkö retim Okulu, Sakarya

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye do ru)

2013- Tıp Doktoru

2013- Ara tırma Görevlisi

IV- Mesleki Deneyimi

2013- Halen Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sa lı ı ve Hastalıkları Ara tırma Görevlisi

V- Üye Oldu u Bilimsel Kurulu lar

VI- Bilimsel İgi Alanları

Yayınları

1. ELMAS B, KÜRT E, ÖZDEM R Ö. Geç Dönemde Bradikardi ve Hipotansiyon Geli en Deli Bal ntoksikasyonu: Olgu Sunumu. Sakarya Tıp Dergisi. 2016;6(3):166-169
2. ÖZDEM R Ö, KÜRT E. Metilprednizolon Alerjisi olan Hastanın Deksametazon ile Tedavisi. İstanbul Med. J. 2017;18:100-2

3. ÖZDEMİR R Ö, KÜRT E. Astımlı hastada influenza H1N1 virüsüne bağlı gelişen akciğer pnömoni ve konvülsiyon: Olgu sunumu. İstanbul Med. J. 2017;13(3):182-185

Poster Sunumları

1. Özdemir Ö, Menekşe E, Kılıç M, Kaya G, Kürt E, Bekis Bozkurt H. Hipokomplementemik Ürtikeryal Vaskulit Olgusu. Türk Pediatri Kurumu, 50. Kongresi, 26 – 30 Mayıs 2014, Antalya
2. Özdemir Ö, Menekşe E, Kılıç M, Kaya G, Kürt E, Bekis Bozkurt H. Hipogammaglobulinemi Nedeniyle Tekrarlayan Hıslıltılı Çocuk Vakaları. Türk Pediatri Kurumu, 50. Kongresi, 26 – 30 Mayıs 2014, Antalya.
3. Özdemir Ö, Menekşe E, Kılıç M, Kaya G, Kürt E, Güven P. Hipokomplementemi ile Giden Ürtikeryal Vaskulit Olgusu. Çocuk Alerji ve Astım Akademisi Derneği'nin 9. Kongresi, 23-26 Nisan 2014, KKTC.
4. Kılıç M, Menekşe E, Okuyan HE, Kürt E, Diyarolu Altınok N, Büyükcavcı M, Özdemir Ö. P275 Süt Çocuğunda Pnömoniyle Birlikte Seyreden Herpes Simplex Virüs: Olgu Sunumu. 58. Türkiye Milli Pediatri Kongresi, 22-26 Ekim 2014, Antalya.
5. Elmas B, Kürt E. Geç Dönemde Bradikardi ve Hipotansiyon Gelişen Deli Balntoksikasyonu: Olgu Sunumu. 12. Uludağ Pediatri Kılı Kongresi, 13-16 Mart, Uludağ
6. Özdemir Ö, Kürt E. Metilprednizolon Alerjisi Olan Hastanın Dekametazon ile Tedavisi. 11. Ulusal Çocuk Alerji ve Astım Kongresi, 24-27 Nisan 2016, Marmaris
7. Özdemir Ö, Kürt E. Astım Zemininde H1N1 Virüsüne Bağlı Gelişen Pnömoni: Olgu Sunumu. 11. Ulusal Çocuk Alerji ve Astım Kongresi, 24-27 Nisan 2016, Marmaris
8. Özdemir Ö, Kürt E. Yeni Kurulan Çocuk İmmünolojisi Kliniğimizde Takip Ettiğimiz Primer İmmün Yetmezlikli Hastalarımız. 2. Klinik İmmünoloji Kongresi, 31 Mart-03 Nisan 2016, Antalya

VII- Bilimsel Etkinlikleri

1. Çocuk Acil Tıp ve Yo un Bakım Derne i, Çocuk Acil ve Yo un Bakım Kursu, 22 ubat 2014

VIII- Di er Bilgiler

1. Mass General Hospital for Children, PICU, Harvard Medical School, Observer Programme: 2010

