

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

**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI KARACİĞER
HASARINA KARŞI E VİTAMİNİNİN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ahmet Uğur AKMAN

TRABZON 2017

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

**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI KARACİĞER
HASARINA KARŞI E VİTAMİNİNİN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ahmet Uğur AKMAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

TRABZON – 2017

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen ve hiçbir desteğini esirgemeyen KTÜ Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU' na, uzmanlık eğitimim boyunca bilgilerini ve deneyimlerini bizimle paylaşan her zaman yanımızda olan Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Engin YENİLMEZ'e, eğitimimize katkıları ve bizimle paylaştıkları bilgiler için değerli hocalarım Prof. Dr. Ersan ODACI, Prof. Dr. Esin YULUĐ ve Yrd. Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU' na, deney aşamasında tezime büyük katkıları olan doktora öğrencisi Sibel Türedi' ye, Halk Sağlığı Anabilim Dalı asistanı Dr. Volkan Karabacak'a ve anabilim dalında birlikte çalışma imkanı bulduğum tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamımın her anında karşılık beklemeden verdikleri sevgi ve gösterdikleri özveri için anneme ve babama, biricik oğlum Kaan'a ve dünyalar tatlısı kızım Zeynep Ela'ya her zaman yanımda olan sevgili eşim Dr. Burcu Akman'a sevgi ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Bu çalışmada sıçanlarda Metotreksat (MTX) kaynaklı karaciğer hasarına karşı E vitamininin etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada 32 adet erişkin erkek Spraque dawley tipi sıçan kullanıldı. Her grupta 8 adet sıçan bulunacak şekilde dört gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresi (5 gün) boyunca intraperitoneal (i.p.) serum fizyolojik verildi. MTX grubuna sadece çalışmanın ilk günü 20 mg/kg i.p. olarak tek doz MTX uygulandı. E vitamini grubuna 5 gün boyunca 100 mg/kg E vitamini i.p. olarak uygulandı. Tedavi (MTX+E vitamini) grubundaki sıçanlara ise çalışmanın ilk günü 20 mg/kg i.p. MTX uygulandı ve daha sonra ilk günde dahil olmak üzere 5 gün boyunca 100 mg/kg i.p. olarak E vitamini uygulandı. Deney süresinin bitiminde tüm hayvanlar sakrifiye edilerek karaciğerleri alındı. Karaciğer doku örnekleri ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi. Karaciğerdeki apoptozu değerlendirmek için Flowsitometri tekniği kullanıldı. Karaciğer doku örneklerinin bir kısmı ise enzimatik parçalama yöntemi ile süspansiyon haline getirildikten sonra akım sitometrik incelenmesi yapıldı. Histopatolojik değerlendirmeler sonucunda, kontrol grubu sıçanlarının karaciğer yapısı normal olarak izlendi. MTX grubuna ait sıçanlarda hepatosit dejenerasyonu, sinüzoidal dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon, hepatosit hipertrofisi, hepatositlerde vakuolizasyon ve piknotik çekirdek bulguları gözlemlendi. MTX grubunda flowsitometride apoptoz indeksi diğer gruplara yüksek çıktı. MTX+E Vitamini grubunda MTX' in oluşturduğu bozuklukların önemli ölçüde düzeldiği belirlendi. MTX+E Vitamini grubundaki apoptoz indeksinin ise MTX grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. E vitamini grubundaki karaciğer histolojisi normal yapıda izlendi. Akım sitometrik bulgularımızın da bu histolojik sonuçları desteklediğini belirledik. Özetle metotreksat karaciğerde hasar oluşturmaktadır. E vitamini koruyucu etkisiyle, MTX' in karaciğerde indüklediği hasarı düzeltmektedir.

Anahtar Sözcükler: Akım sitometri, E vitamini, Metotreksat, Sıçan, Karaciğer.



SUMMARY

The aim of this study was to investigate protective effects of vitamin E against Methotrexate (MTX) induced liver damage in rats. In this experiment, thirty two male Spraque dawley type rats were used. They were divided into four groups of eight rats. Control group were injected intraperitoneally (i.p.) with physiological saline for five days. Only the first day of the experiment, 20 mg/kg of MTX was injected i.p. to the MTX group. Vitamin E group were dosed by i.p. with 100 mg/kg of vitamin E for five days. The rats of treatment group (MTX+vitamin E) were injected with 20 mg/kg of MTX on the first day of the study and for five days (including the first day) they were dosed by i.p. with 100 mg/kg of vitamin E. All animals were sacrificed and their livers extracted at the end of the experimental period. Liver tissue samples were evaluated histopathologically under light microscope. The Flowcytometer technique was used to determine apoptosis. A portion of the liver tissue were suspended by means of enzymatic digestion and this solution was used for flow cytometric analysis. Histopathologically, the structures of the liver tissue in control group was observed normally. We observed hepatocyte degeneration, sinusoidal dilatation, mononuclear cell infiltration, vascular congestion, hepatocyte hypertrophy, vacuolization in hepatocytes and picnotic nukleus in the liver tissue of MTX group. In the MTX+Vitamin E group, methotrexate-induced liver damage was significantly reduced. The apoptotic index in the MTX+Vitamin E group was significantly decreased when compared to the MTX group. The structures in liver observed normally in the vitamin E group. Our histological findings were supported by our flow cytometric data. In summary, methotrexate causes damage in liver and vitamin E reduces the MTX-induced liver damage.

Key Words: Flow cytometry, Methotrexate, Rats, Liver, Vitamin E

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER.....	i
ÖZET.....	ii
SUMMARY.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karaciğer.....	3
2.1.1. Karaciğer Embriyolojisi.....	3
2.1.2. Karaciğer Gelişiminin Moleküler Düzeni.....	4
2.1.3. Karaciğer Histolojisi.....	4
2.1.4. Stroma.....	5
2.1.5 Karaciğer Lobülü.....	5
2.1.6. Portal Lobul.....	6
2.1.7. Karaciğer Asinusu.....	7
2.1.8. Kan Dolaşımı.....	8
2.1.9. Karaciğer Hücresi (Hepatosit).....	9
2.1.10. Karaciğer Yenilenmesi.....	10
2.1.11. Safra Yolları.....	10
2.1.12. Safra Kesesi.....	10
2.2. Metotreksat.....	11
2.2.1. Metotreksat Yapısı.....	11
2.2.2. Metotreksatın Etki Mekanizması.....	11
2.2.3. Metotreksatın Kullanım Alanları.....	13

2.2.4. Metotreksatın Elimine edilmesi.....	14
2.2.5. Metotreksatın Dozu.....	14
2.2.6. Metotreksata Resistans Oluşması.....	15
2.2.7. Metotreksat Yan Etkileri.....	15
2.2.8. Metotreksatın Hepatotoksik Etkisi.....	16
2.3. E Vitamini.....	16
2.3.1 E Vitamini Yapısı.....	16
2.3.2. Farmakokinetik Özellikleri.....	18
2.3.3. Antioksidan Etki.....	18
2.4. Apoptoz.....	19
2.4.1. Apoptozun Tanımı.....	19
2.4.2. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	20
2.4.3. Apoptozda Flowsitometri.....	20
2.4.4. Apoptozda Anneksin V Yöntemi.....	21
2.5. Flowsitometri.....	21
2.5.1. Flowsitometri (Akımsitometri).....	21
2.5.2. Flowsitometri'nin Çalışma Prensipleri.....	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	25
3.1. Deneysel Çalışma Planı.....	25
3.1.1. Etik Kurul Onayı ve Deney Hayvanlarının Temini.....	25
3.1.2. Sıçanların Bakımı ve Laboratuvar Şartları.....	25
3.1.3. Çalışma Grupları.....	26
3.2. Histolojik İşlemler.....	28
3.2.1. Karaciğer Dokularının Elde Edilmesi.....	28
3.2.2 Doku Takibi Aşaması	28
3.2.3. Kesitlerin Alınması.....	29
3.2.3.Kesitlerin Hematoksilen ve Eozin ile (H.E.) Boyanması.....	29
3.2.4. Peryodik Asit Schiff Boyası	30
3.2.4.1. PAS Boyası Boyama Protokolü.....	30

3.3. Flowsitometrik işlemler.....	31
3.3.1. Flowsitometrik Analiz İçin Dokuların Deparafinizasyonu ...	31
3.3.2. Flowsitometri Analizi.....	32
3.4. İstatiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Sıçan Ağırlıklarına Ait Bulgular.....	33
4.2. Histolojik Bulgular.....	35
4.3. Flowsitometrik Bulgular.....	37
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
6. KAYNAKLAR.....	50

KISALTMALAR ve SEMBOLLER LİSTESİ

- A.İ.: Apoptotik İndeks
BOS: Beyin Omurilik Sıvısı
DHFR: Dihidrofolat Reduktaz
FA: Folik Asit
FCM: Flowsitometri
FITC: Fluorescein İsothiocyanate
GSH: Glutasyon Sülfo Hidroksit
H.E.: Hematoksilin Eozin
i.p.: İntraperitoneal
Kc: Karaciğer
KTÜ: Karadeniz Teknik Üniversitesi
MDA: Malondialdehit
MTX: Metotreksat
NAD: Nikotin Adenin Dinükleotid
NADP: Nikotin adenin dinükleotid fosfat
NADPH: Nikotin Adenin Dinükleotid Fosfat Hidrat
PAS: Peryodik Asit Schiff
PMTs: Photomultiply Tubes
ROO*: Peroksil Radikali
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

Semboller:

- °C: Santigrat Derece
gr: Gram
µm: Mikrometre
ml: mililitre
%: Yüzde
mg: miligram

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Yapılan Uygulamalar.....	27
Tablo 2. Sıçan Ağırlıklarına Ait Bulgular.....	33
Tablo 3. Deney Gruplarının Karaciğer Ağırlığına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar.....	33
Tablo 4. Deney Gruplarının Flowsitometri Sonuçlarına Ait Ortalama ve Min-Max Değerleri.....	34
Tablo 5. Flowsitometrik Analizde Apoptoz İndeksi Yüzdeleri İstatistiği...	34
Tablo 6. Histolojik Bulguların Skoruması.....	35
Tablo 7. Histolojik bulguların farklarının karşılaştırması.....	36
Tablo 8. Flowsitometrik Analizde Apoptoz İndeksi Yüzdeleri Tablosu.....	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Klasik Karaciğer Lobül Görünümü.....	6
Şekil 2. Klasik Lobül, Portal Lobül ve Karaciğer Asinüsü Şematik Görünüm.....	7
Şekil 3. Karaciğer Zon Sınıflaması.....	8
Şekil 4. Karaciğerde Kan ve Safra Akış Yönlerini Gösteren Şema.....	9
Şekil 5. Metotreksat'ın Moleküler Yapısı.....	11
Şekil 6. Dihidrofolat'ın Moleküler Yapısı.....	12
Şekil 7. Folik Asit'in Moleküler yapısı.....	12
Şekil 8. E Vitamininin Moleküler Yapısı.....	17
Şekil 9. Flowsitometri Sisteminin Şeması.....	23
Şekil 10. Flowsitometride Hücrelerin Tek Sıra Halinde Geçişini Gösteren Şema.....	24

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. A ve B, Deneysel Hayvanlarının Barınmasında Kullanılan Tip III Kafesler.....	26
Resim 2. Karaciğer Dokusunun Elde Edilmesi.....	28
Resim 3. Kontrol, Metotreksat, Metotreksat + E Vitamini, E Vitamini Gruplarına Ait Flowsitometrik Apoptotik İndeks Yüzdelerine Ait Histogram.....	37
Resim 4. Kontrol Grubu H.E. X 400.....	38
Resim 5. Kontrol Grubu PAS X 400.....	38
Resim 6. Metotreksat Grubu H.E. X 400.....	39
Resim 7. Metotreksat Grubu H.E X 400.....	39
Resim 8. Metotreksat Grubu PAS X 400.....	40
Resim 9. Metotreksat Grubu PAS X 400.....	40
Resim 10. Metotreksat + E Vitamini Grubu H.E. X400.....	41
Resim 11. Metotreksat + E Vitamini Grubu PAS X 400.....	41
Resim 12. Metotreksat + E Vitamini Grubu H.E. X 200.....	42
Resim 13. Metotreksat + E Vitamini Grubu H.E. X 400.....	42
Resim 14. E Vitamini Grubu H.E X 400.....	43
Resim 15. E Vitamini Grubu PAS X 400.....	43

1. GİRİŞ

Metotreksat kanser kemoterapisinde kullanılan, antimetabolit grubu bir ajandır. Metotreksat etkisini dihidrofolat redüktaz enzimi üzerinden gösterir. Metotreksat dihidrofolat redüktaz enziminin aktif noktasına sıkı bir şekilde bağlanarak enzimi inhibe eder. Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu timidilat ve purin nükleotidlerinin (adenin ve guanin) biyosentezinin durmasına yol açar (1). Metotreksat lösemi, lenfoma gibi hematolojik maligniteler, osteosarkom, meme kanseri, baş ve boyun tümörleri gibi pek çok kanser türü ve psöriasis, dermatomiyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit gibi inflamatuvar ve romatizmal hastalıklarda sıklıkla kullanılmaktadır (2). Metotreksat tedavisinde çeşitli yan etkiler görülebilmektedir. MTX tedavisinde en sık rastlanan yan etkiler bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme ve stomatitdir (3). Yine ağız yaraları, kemik iliği depresyonu, anemi nötropeni trombositopeni, ağız ve bağırsak mukozasında ülserasyon, akciğerlerde infiltrasyon da görülebilir (1,4). MTX'in oluşturduğu karaciğer hasarının mekanizması tam olarak bilinmemektedir ama çeşitli görüşler vardır. MTX, NAD⁺ bağımlı mitokondrial enzimleri inhibe eder (5). Bu enzimler NADPH oluşturan ana enzimlerdir. MTX verince NADPH seviyesi azalır. Reaktif oksijen türlerine karşı önemli bir savaşçı olan redükte glutatyonun seviyesini koruyan glutatyon redüktaz enzimi tarafından da NADPH kullanılır böylece, MTX kullanımına bağlı olarak düşen NADP seviyeleri, hepatositleri reaktif oksijen radikallerine karşı duyarlılaştıran glutatyon seviyelerinin düşmesine ve bu da hepatosit hasarına sebep olur (2).

E vitamininin en önemli özelliği antioksidan etkinliğinin olmasıdır. Hücrelerde membran fosfolipidleri'nin doymamış yağ asitleri kendiliğinden ya da oksidan moleküllerin challenge reaksiyonu sonucunda kolayca oksitlenebilir ve peroksid türevlerine dönüşebilirler. Bu olaya lipid peroksidasyonu adı verilir (6,7). Serbest oksijen radikalleri oluşmasının eşlik ettiği bu olay zincirini membranda önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan faktör E vitamindir

(6). Bu özelliğinden dolayı zincir kırıcı (chain breaking) antioksidan olarak bilinir (8,9). E vitamini peroksidleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize ederek görev yapar (6,7). Bizde çalışmamızda metotreksat'la meydana getirdiğimiz karaciğer hasarına karşı E vitamininin etkilerini araştırmayı amaçladık. Sonuçlarımızı hem flowsitometri kullanarak hemde histopatolojik yöntemlerle inceledik.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

2.1.1. Karaciğer Embriyolojisi

Karaciğer primordiumu önbağırsağın distal ucunda bir endodermal epitel çıkıntısı şeklinde 3. haftanın ortasında belirir. Hepatik divertikül ya da karaciğer tomurcuğu olarak bilinen bu çıkıntı perikard boşluğu ve yolk sapı arasındaki mezodermal plağı yani septum transversumunu penetre eden hızlı proliferasyon gösteren hücrelerden meydana gelir. Karaciğer (kc) hücreleri septumun içine girmeye devam ederken hepatik divertikül ile ön bağırsak (duodenum) arasındaki bağlantı daralarak safra kanallarını oluşturur. Safra kanalından kaynaklanan küçük bir ventral çıkıntı safra kesesi ve sistik kanal haline gelir. Gelişimin sonraki dönemlerinde epitelyal kc kordonları vitellin ve umbilikal venlere karışarak hepatik sinuzoidleri meydana getirir karaciğer kordonları parenkime farklanır ve safra kanallarının iç yüzünü döşerler. Hematopoietik hücreler Kupffer hücreleri ve bağ dokusu hücreleri septum transversum mezoderminden köken alırlar (10,11).

Karaciğer hücreleri septum transversumun tümünü işgal ettiğinde organ karın boşluğunda kaudale doğru büyür. Aynı anda karaciğerle ön bağırsak ve karaciğerle karın ön duvarı arasındaki septum transversum mezodermi membranöz hale hale gelerek sırasıyla omentum minus ve ligamentum falsiformeyi oluşturur. Karaciğer yüzeyindeki mezoderm üst yüzeydeki küçük bir alan dışında farklanarak visseral periton haline gelir. İntrauterin hayatın 10 haftasında kc ağırlığı, vücut ağırlığının %10' u kadardır. Hematopoietik fonksiyonlarda fazlalık ve sinuzoid sayısının yüksekliği buna neden olarak gösterilmiştir. Doğuma yakın karaciğer ağırlığı % 5' e düşer.

Kc de 12. haftadan itibaren safra üretilmeye başlanır. Bu sırada safra kesesi ve sistik kanalda gelişir. Sistik kanal hepatik kanalla birleşip koledok kanalını

oluşturur. Duedonum pozisyonunda meydana gelen değişiklikler nedeniyle koledoğun duedonuma giriş yeri önden arkaya doğru yer değiştirir (10).

2.1.2. Karaciğer Gelişiminin Moleküler Düzeni

Önbağırsak endoderminin tümü karaciğere özgü genleri eksprese edebilme ve kc dokusunda dönüşebilme özelliğine sahiptir. Ancak bu olay çevredeki ektoderm, non-kardiyak mezoderm ve özellikle notokord gibi dokulardan açığa çıkan bazı faktörlerle bloke edilir. Bu inhibitörlerin etkisinde gelecekteki kc bölgesinde kardiyak mezoderm tarafından salgılanan fibroblast büyüme faktörleri (FGF-2) tarafından bloke edilir (10,11). Anlaşılabacağı gibi barsak endoderminden karaciğere özgü genlerin eksprese olması kardiyak mezoderm tarafından salgılanan inhibe edici faktörleri inhibe eden maddeler sayesinde mümkün olur. Kardiyak mezodermden gelen talimatla karaciğer bölgesindeki barsak endodermi hepatositlere ve safra kanalı hücrelerine farklılık bu süreçte kısmen hepatosit nükleer transkripsiyon faktörleriyle de kontrol edilir (HNF 3 ve HNF 4) (10,12,13).

2.1.3. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer diyafragmanın altında abdominal boşlukta yerleşmiştir, vücudun ikinci büyük organı ve en büyük bezidir. Ağırlığı yaklaşık 1,5 kg'dır (14,15). Karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer kısımları tarafından kullanılmak üzere depolandığı bir organdır. Bu yüzden sindirim sistemi ile kan arasında bir geçiş bölgesi oluşturur. Organa kanın %70-80' i portal venden gelir; geri kalan az bir bölümü hepatik arterle sağlanır. İnce bağırsaklardan emilen maddelerin çoğu portal ven yoluyla karaciğere ulaşır, sadece kompleks lipitler (şilomikronlar) lenf damarlarıyla taşınır. Karaciğerin dolaşım sistemindeki konumu; metabolitlerin bir araya getirilmesi, dönüştürülmesi, biriktirilmesi, toksik maddelerin etkisizleştirilmesi ve elenmesi için çok uygundur. Bu elenme karaciğerin lipit sindirimi için önemli bir dış salgılaması olan safrada gerçekleşir. Karaciğerin ayrıca albümin ve diğer taşıyıcı

proteinler gibi plazma proteinlerinin üretilmesi gibi çok önemli bir işlevi de vardır (14).

2.1.4. Stroma

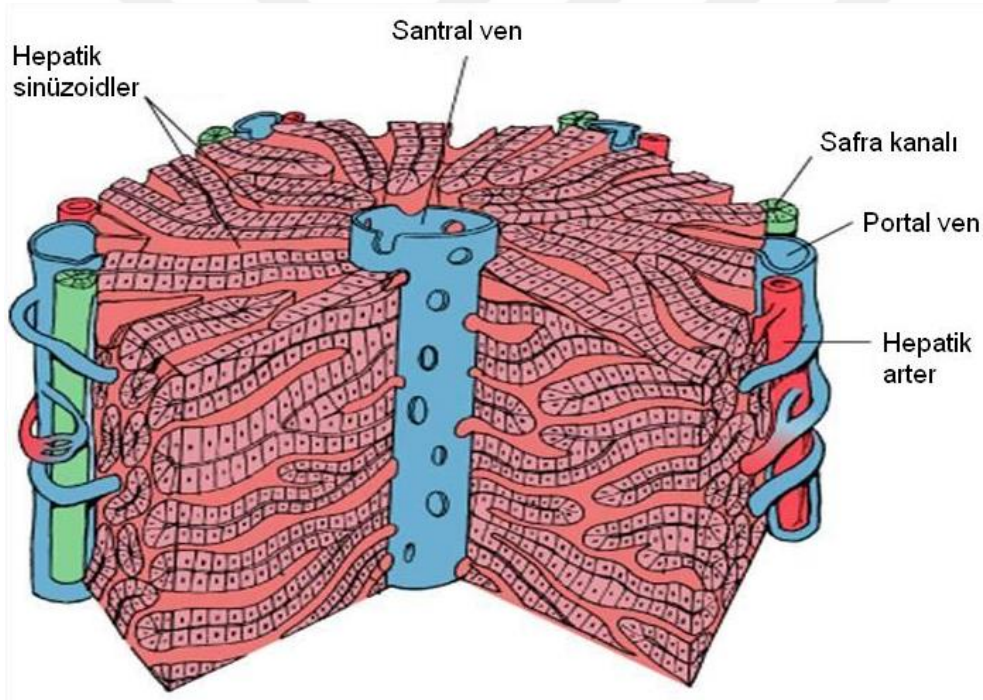
Karaciğer anatomik olarak iki büyük (sağ ve sol) lob ile iki küçük (kuadrat ve kaudat) loba ayrılır. Karaciğeri dışardan Glisson kapsülü sarar (15). Hilumda, organa portal ven ve hepatik arter girer, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar. Bu damarlar ve kanallar, klasik karaciğer lopçukları arasında sonlandıkları (ya da köken aldıkları) portal alanlara dek bağ dokusu ile çevrilmiştir. Bu noktadan itibaren karaciğer lopçuklarındaki hepatositlere ve sinüzoidal endotel hücrelerine destek sağlayan ince bir retiküler lif ağı oluşur (14).

2.1.5. Karaciğer Lobülü

Karaciğer lobülü poligonal şekillidir. Yaklaşık 0,7 x 2 mm boyutlarındadır. Lobüllerin orta kısmında vena centralis bulunur. Kenar kısımlarında ise portal alanlar bulunur. Portal alanı oluşturan yapılar arteria hepatica' nın bir dalı, vena porta' nın bir dalı, safra kanalları, lenfatikler ve sinirlerdir. İnsan karaciğer lobülünde 3-6 portal alan bulunabilir.

Karaciğer lobülü içindeki hepatositler ışınal olarak dizilmiştir ve plak benzeri bir dizilim gösterirler. Bu plaklar arasındaki boşlukta karaciğer sinüzoidleri bulunur. Sinüzoidler kesintili bir pencereci endotel tabakasından oluşan düzensiz olarak genişlemiş damarlardır. Endotel hücreleri altlarında bulunan hepatositlerden kesintili bir bazal lamina ve Disse aralığı adı verilen endotel altı bir boşlukla ayrılmıştır. Bu aralıkta hepatositlerin mikrovilusları bulunur. Sonuç olarak kan endotel duvarından kolayca geçer ve hepatosit yüzeyi ile temas eder. Böylece sinüzoid lümeniyle karaciğer hücreleri arasında alışveriş kolaylıkla sağlanır. Endotel hücrelerine ek olarak, sinüzoidler Kupffer hücreleri adı verilen makrofajları da içerir. Bu hücreler endotel hücrelerinin içine bakan yüzeyinde bulur. Başlıca fonksiyonları yaşlı eritrositleri metabolize etmek,

hemoglobini sindirmek, immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamak ve kalın bağırsaktan portal kana geçen bakterileri ortadan kaldırmaktır. Disse aralığında İto hücreleri bulunur. İto hücreleri yağ depolar. Bu hücreler A vitamini yönünden zengindir. Ayrıca retinoidlerin alınması, depolanması, salınması, bazı ekstraselüler matris proteinlerinin ve proteoglikanların sentezi, salgılanması gibi görevleri vardır. İto hücreleri büyüme faktörlerinin, sitokinlerin salgılanması ve çeşitli düzenleyici maddelere (prostoglandinler, tromboksan A2) yanıt olarak sinüzoid lümen çapının düzenlenmesi gibi işlevlerde görür (14).

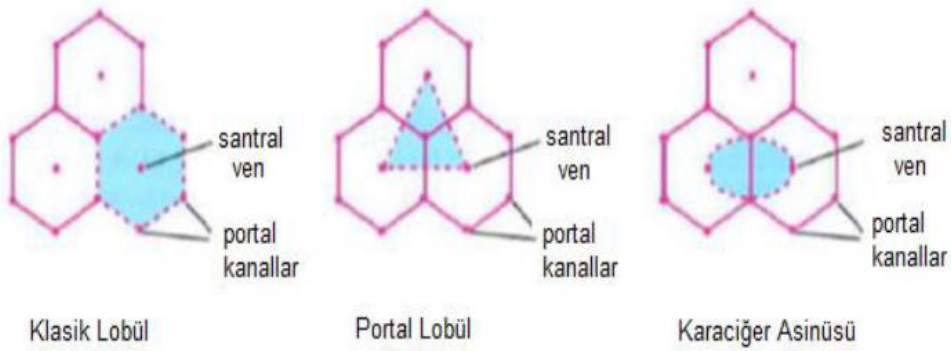


Şekil 1. Klasik Karaciğer Lobül Görünümü (15)

2.1.6. Portal Lobul

Birbirine komşu üç karaciğer lobülünün ortalarında yer alan vena sentralisler arasındaki hayali üçgen alanlar olarak tarif edilir. Üçgenin ortasında portal alan yer alır. Portal lobul karaciğerin ekzokrin fonksiyonları açısından önemlidir (15).

2.1.7. Karaciğer Asinüsü; Kan perfüzyonu, metabolik aktivite ve karaciğer patolojisi arasında en iyi korelasyonu sağlayan yapısal ünitidir (15). Karaciğer asinusu, parankimin en küçük fonksiyonel birimini gösterir. Asinusun kısa eksenini, iki adet portal triad arasında, uzun eksenini iki santral ven arasında çizilen çizgidir. Kısa eksene en yakın bölüm zon 1, kısa eksenden en uzak bölüm ve vena centralise en yakın kısım zon 3 olarak bilinir. 2. zon 1 ve 3 arasındaki bölgedir.



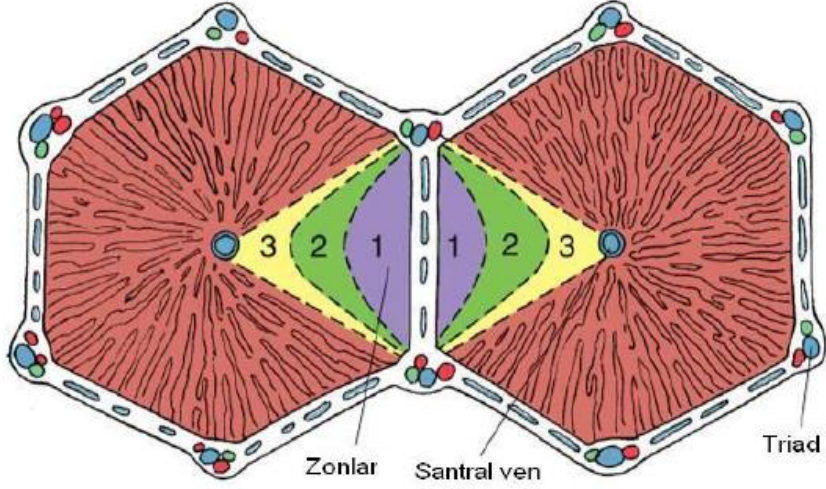
Şekil 2. Klasik Lobül, Portal Lobül Ve Karaciğer Asinüsü Şematik Görünüm (15).

Zon sınıflaması, karaciğer parankiminde hepatik hücrelerin vasküler perfüzyonunun derece ve kalitesiyle ilgili dejenerasyon, rejenerasyon ve spesifik toksik etkilerin tanımlanması ve yorumlanması sürecinde önemlidir. Sinüzoidal kan akışının bir sonucu olarak, hepatositlerin oksijen düzeyi, metabolik aktivitesi ve hepatik enzimlerin dağılımı her üç zonda değişiklik gösterir. İskemi ve toksik maddelere maruz kalmaya bağlı oluşan karaciğer hasarının değişken dağılımı, bu zon sınıflaması ile açıklanabilir (15).

Zon 1 (periferik zon): oksijen ve besin oranının en yüksek olduğu alandır. Rejenerasyon kabiliyeti yüksektir. Zararlı maddelerden ilk etkilenen bölge yine burasıdır. Glikojen en çok zon 1 de birikir

Zon 2 (ara zon): zon1 ve zon3 arasında kalan bölgedir.

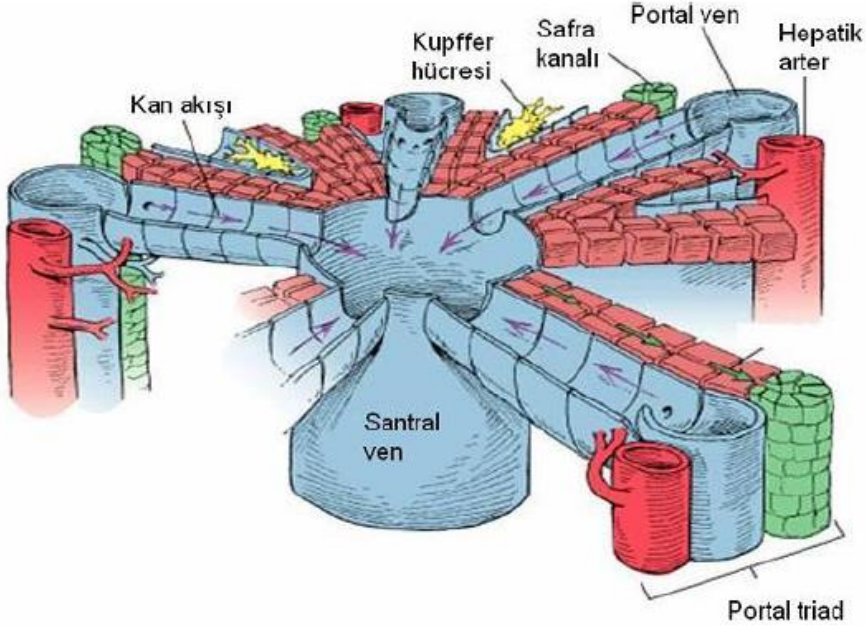
Zon 3 (santral zon): yetersiz kanlanma durumunda en çok etkilenecek zondur (sentrilobüler nekroz) (12). Aynı zamanda viral toksik ve oksijen azlığına bağlı oluşacak hasarda en çok etkilenen bölgedir.



Şekil 3. Karaciğer Zon Sınıflaması (15)

2.1.8. Kan Dolaşımı

Karaciğere kan alışılmışın dışında bir şekilde iki kaynaktan gelir; kanın %80'i abdominal organlardan gelen oksijenden fakir, besinden zengin kanı taşıyan portal venden, %20'si ise oksijenden zengin kanı sağlayan hepatik arterden gelir. Kan, karaciğer lobülünde periferden merkeze doğru akar. Sonuç olarak oksijen ve metabolitler ile bağırsaklardan emilen diğer bütün toksik olan ve olmayan maddeler önce lobülün çevresindeki hücrelere, daha sonra merkezindeki hücrelere ulaşır. Safra ise kanın ters yönünde, yani lobülün merkezinden çevresine doğru ilerler. Çevrede safra, kübik hücrelerden oluşmuş safra kanalcıkları ya da Hering kanallarına girer. Kanalcıklar portal alanlardaki safra kanallarında kübik ya da prizmatik bir epitelle örtülüdür ve belirgin bir bağ dokusu kılıfına sahiptir. Bu kanallar giderek genişleyip birleşerek sağ ve sol hepatik kanalları oluştururlar ve sonunda karaciğeri terk ederler (14).



Şekil 4. Karaciğerde Kan ve Safra Akış Yönlerini Gösteren Şema (15)

2.1.9. Karaciğer Hücresi (Hepatosit)

Karaciğer hücreleri polihedral, 6 ya da daha fazla yüzeylidir ve Hematoksilen eozinle boyanmış kesitlerde, çok sayıda mitokondri ve bir miktar düz endoplazmik retikulumunun bulunması nedeniyle hepatositin sitoplazması eozinofiliktir. Her bir hepatositin yüzeyi, diğer hepatositlerin yüzeyi ve Disse aralığı boyunca sinüzoidlerin duvarıyla temas halindedir. Hepatositin Disse aralığına bakan yüzeyinde bu aralığa doğru uzanan çok sayıda mikrovilüs bulunur. Hepatosit, bir ya da iki tipik çekirdekçik içeren bir ya da iki yuvarlak çekirdeğe sahiptir. Hepatosit sıklıkla glikojen içerir. Karaciğerde bulunan glikojenin miktarı günlük ritme uyar; aynı zamanda kişinin beslenme durumuna da bağlıdır. Karaciğer glikojeni glukoz için bir depodur ve kandaki glikoz düzeyi normalin altına düşerse mobilize olur. Bu şekilde hepatositler, kan glikozunu sabit bir düzeyde tutar. Karaciğer, vitaminler için de en büyük depolanma yeridir. A vitamini kaynağı alınan besinlerdir ve besinlerle alınan diğer lipitlerle birlikte

şilomikronlar halinde karaciğere ulaşır. Karaciğerde A vitamini İto hücrelerinde depolanır (14).

2.1.10. Karaciğer Yenilenmesi

Hücreleri yavaş yenilenmesine karşın, karaciğerin olağanüstü bir yenilenme yeteneği vardır. Karaciğer dokusunun cerrahi yolla çıkarılması ya da toksik maddelerin etkisiyle kaybı, karaciğer hücrelerinin bölünmesini başlatan ve dokunun esas kitlesi oluşuncaya kadar devam eden bir düzeneği tetikler (14).

2.1.11. Safra Yolları

Hepatosit tarafından üretilen safra, safra kanalikülleri, safra kanalcıkları ve safra kanalları yoluyla akar. Bu yapılar giderek birleşmek suretiyle bir ağ oluşturur ve bir araya gelerek hepatik kanalı meydana getirir. Hepatik kanal safra kesesinden çıkan sistik kanalla birleştikten sonra ana safra kanalı (koledok kanalı) olarak duodenuma devam eder (14).

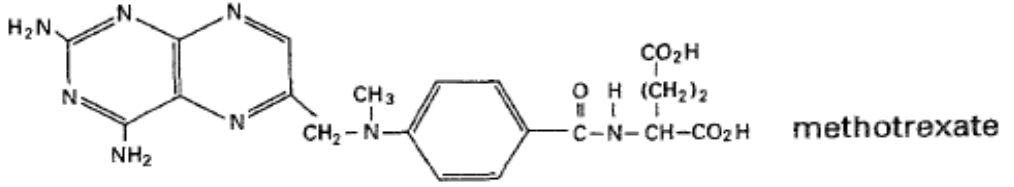
2.1.12. Safra Kesesi

Safra kesesi karaciğerin alt yüzüne bağlanmış, armut biçiminde içi boş bir organdır. 30-50 mL safra depolayabilir. Safra kesesinin başlıca işlevi safra depolamak, suyun emilimi ile safrayı yoğunlaştırmak ve gerekli olduğunda sindirim kanalı içine akıtmaktır. Safra kesesinin düz kaslarının kasılması kolesistokinin ile uyarılır. Bu hormon ince bağırsak epitelinde bulunan enteroendokrin hücreler (I hücreleri) tarafından üretilir. Kolesistokinin salgılanması ise ince bağırsakta besinsel yağların bulunması ile uyarılır (14).

2.2. Metotreksat

2.2.1. Metotreksat Yapısı

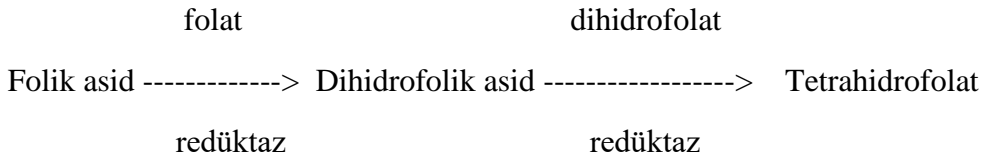
MTX kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Folik asit antagonistidir. İlk kez 1948' de çocukların lösemilerini tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır (16). Metotreksat kimyasal olarak folik asidin (4-amino, N10 - metil) analogudur.

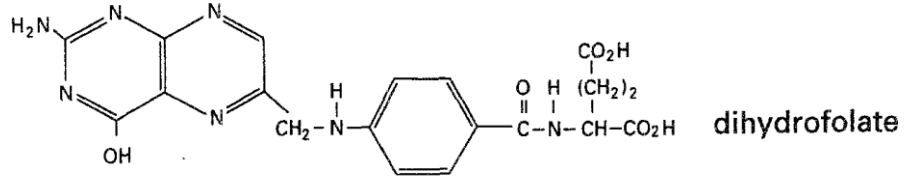


Şekil 5. Metotreksat'ın Moleküler Yapısı (17).

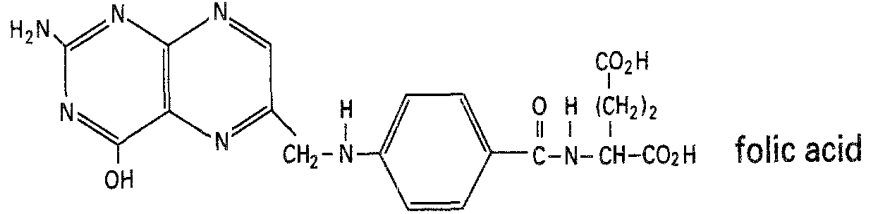
2.2.2. Metotreksatın Etki Mekanizması

Diyetle vitamin şeklinde besinler içinde alınan folik asidin (folat'ın) vücuttaki yararlı şekli folinik asid ve tetrahidrofolat türevi koenzimlerdir. Bu koenzimler, timidilatın, purinlerin, metionin ve glisin'in sentezinde rol oynayan tek koenzim transfer reaksiyonları için gereklidir. Folik asidin, dihidrofolat (FH2) üzerinden tetrahidrofolat'a (FH4'e) dönüşümü şu şekilde olur:





Şekil 6. Dihidrofolat'ın Moleküler Yapısı (17).



Şekil 7. Folik Asit'in Moleküler Yapısı (17).

Metotreksat dihidrofolat reduktaz (DHFR) üzerinden etki gösterir (18,19). Metotreksat Dihidrofolat reduktaz enziminin aktif noktasına sıkı bir şekilde bağlanarak enzimi inhibe eder. Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu timidilat ve pürin nükleotidlerinin (adenin ve guanin) biyosentezinin durmasına yol açar. Bu yapı taşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA'nın sentezini ve enerji üretimi için gerekli ATP üretimini inhibe eder. Ayrıca Tetrahidrofolat'a dönüşmeden kalan dihidrofolat, dihidrofolat poliglutamatlar ve metotreksatın poliglutamat türevleri adlı toksik inhibitor metabolitler şeklinde birikir, timidilat sentazın ve pürin bazı sentezinde rol oynayan transformilaz enzimlerinin inhibisyonu, metotreksatın poliglutamat metabolitleri tarafından yapılır (1). Kandaki folat molekülünde tek bir glutamat

vardır. Hücre içine girdiğinde ise poliglutamata haline geçer. Poliglutamata yapısı monoglutamatlara göre daha aktiftir (1). Metotreksat hücre dışındaki ilaç konsantrasyonu azalmaya başlar başlamaz hücreden çıkmaya başlamaktadır. Bu nedenle idrar pH'nın yüksek tutulması ve hastanın iyi hidrate edilmesi, böbrek fonksiyonlarının korunması açısından çok önemlidir (20).

Metotreksatın hücrelerdeki toksik etkileri dışardan ilaç olarak verilen folik asit (N5- formiltetrahydrofolat) tarafından antagonize edilir; folik asidin kendisi ise bu durumda tetrahydrofolat'a dönüşemez ve antidotal etkinlik göstermez (1).

2.2.3. Metotreksatın Kullanım Alanları

Metotreksat lösemi, lenfoma, gibi hematolojik maligniteler, osteosarkom, meme kanseri, baş ve boyun tümörleri gibi pek çok kanser türü ve psöriasis, dermatomyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit gibi inflamatuvar ve romatizmal hastalıklarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca intratekal olarak akut lenfoblastik lösemiler gibi malignitelerde leptomeningeal yayılımını önlemek ve idame tedavisi için de kullanılmaktadır (2,21-24). Metotreksat ağız yoluyla (10mg/m²) verildiğinde tama yakın bir oranda absorbe edilir.

Plazma proteinlerine nisbeten düşük bir oranda (%50) ve zayıf bir şekilde bağlanır. Sulfonamidler ve salisilatlar, bu ilaçla birlikte verilirlerse bağlanma oranını azaltırlar ve metotreksatın toksisitesini artırabilirler. Metotreksat tümör hücrelerinde ve karaciğer ile böbrek hücrelerinde uzun süre bağlı kalır. Tümör hücrelerindeki bu durumun tedavi yönünden değeri vardır. Şöyle ki yukarıda belirtildiği üzere, antimetabolitler istirahat halindeki hücrelerde sitotoksik etki yapmazlar. Fakat bu durumdaki hücrede uzun süre kalan metotreksatın, latent sitotoksik etkisi vardır; hücre bölünmeye başladığı zaman bu etki belirgin hale geçer ve hücreyi öldürür. Standart doz uygulamalarında sinir sistemine ve BOS'a giremez ve terapötik konsantrasyonlara ulaşamaz; ancak yüksek doz

uygulamalarında BOS'ta terapötik konsantrasyonlara ulaşıldığı bildirilmektedir. Meningeal tutulum yapan tümörlerde tedavi için intratekal verilmesi gerekir (1).

2.2.4. Metotreksatın Elimine Edilmesi

Böbreklerden hem glomerüler filtrasyon hem de tübüler sekresyon aracılığıyla atılır. Oral dozun %90'ı 12 saat içinde idrar ile atılır. Metotreksatın böbrekten eliminasyon yarılanma ömrü 8 saat kadardır. Az bir kısmı karaciğerde metabolize edilir (25).

2.2.5. Metotreksatın Dozu

Metotreksat, kullanıldığı duruma göre değişen dozlarda verilir. Akut lenfositik lösemnin idame tedavisinde düşük dozda (5-25 mg/m²) oral verilir. Haftada 2 kez 25 mg/m² i.m. veya i.v. injeksiyon suretiyle de verilebilir; aynı amaçla ayda bir veya iki gün 175-525 mg/m² dozunda i.m. verilebilir. Ağır psöriyaziste immun supresif olarak haftada 5 gün ağızdan günde toplam 2.5 mg gibi düşük dozda veya haftada bir 10-25 mg i.v. verilir. Koryokarsinomaya karşı gün aşırı 1 mg/kg i.m. dört doz injekte edilir ve bu uygulama 3 haftada bir tekrarlanır. Osteosarkom, çocukluk çağı lösemileri ve Hodgkin dışı lenfomaya karşı kalsiyum folinat ile birlikte yüksek dozda (100-12.000 mg/m² dozunda) 10-60 dakika süren i.v. infüzyonla 3 haftada bir verilir. İnfüzyonun sona ermesinden sonra. 15 mg/m² kalsiyum folinat ağızdan 6 saatte bir 8 veya 10 kez verilir. Bu yaklaşıma kanser kemoterapisinde, lökovorin ile (folinik asitle) kurtarma denilir.

Metotreksat menenjiyal lösemi veya lenfomaların profilaksisi ve tedavisi ve menenjiyal karsinomatozisin tedavisi için 12 mg/m² (maksimum 15 mg) intratekal enjekte edilir, uygulama BOS'ta tümör hücresi kaybolana kadar 2-5 günde bir tekrarlanır ve BOS tümörden temizlendiğinde de iki doz pekiştirme uygulaması yapılır. Yukarıda sayılan tümörlerden başka, metotreksat meme, testis ve akciğer kanserleri, baş ve boyun kanseri ve mikozis fungoides'in tedavisinde de kullanılabilir (1).

2.2.6. Metotreksata Resistans Oluşması

Tümör hücrelerinde mutasyon sonucu dihidrofolat reduktazın (DHFR) metotreksata afinitesinin azalması, rezistans gelişmesinde rol oynar (1,26,27). Ayrıca DHFR geninin aşırı ekspresyona uğraması (gen amplifikasyonu) sonucu hücrede bol miktarda tetrahidrofolat oluşması da rezistansta rol oynar. Rezistan hücrelerde metotreksata afinitesi düşük DHFR mutantlarının olduğu da gösterilmiştir. Metotreksat, hücelere folatı ve tetrahidrofolatı da taşıyan bir aktif transport olayı ile girer; mutasyon sonucu bu mekanizmanın bozulmasının da rezistansta rol oynadığı deneysel tümörlerde gösterilmiştir. Diğer bir rezistans mekanizması, timidin sentaz aktivitesinin azalmasıdır (1,28-30).

2.2.7. Metotreksat Yan Etkileri

Metotreksat tedavisinde çeşitli yan etkiler görülebilmektedir. MTX tedavisinde en sık rastlanan yan etkiler bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme ve stomatitdir (3). Yine ağız yaraları, kemik iliği depresyonu, anemi, nötropeni, trombositopeni, ağız ve bağırsak mukozasında ülserasyon, akciğerlerde infiltrasyon da görülebilir (1, 4). MTX teratojeniktir bu yüzden gebelik şüphesi olan kadınların ve gebelerin kullanması kontrendikedir (31). MTX, testisler üzerine toksik etki oluşturur ve infertilite yapabilir (32). MTX tedavisi sonrasında erkeklerde, oligozoospermi görülebilir hücresel ve kromozomal değişiklikler gözlemlenmiştir (33). Hepatotoksik ve nefrotoksik etkileri vardır; akciğerlerde infiltrasyon yapabilir (4). Metotreksatın en belirgin toksik etki gösterdiği organlardan biriside karaciğerdir (34-36). MTX karaciğer dışında; Kemik iliği akciğer böbrek, ince barsak gibi organlar üzerinde de önemli hasarlara sebep olmaktadır (37). MTX kullanımı sonrasında dokularda apoptoz artışı meydana gelmektedir. MTX uygulamasından 6 saat sonra yapılan incelemelerde sıçan ince barsağında apoptoz oranı en yüksek seviyeye çıkmıştır (38).

2.2.8. Metotreksatın Hepatotoksik Etkisi

Metotreksatın oluşturduğu karaciğer hasarının mekanizması tam olarak bilinmemektedir ama çeşitli görüşler vardır. MTX, NAD⁺ bağımlı mitokondrial enzimleri inhibe eder (5). Bu enzimler NADPH oluşturan ana enzimlerdir. MTX verilince NADPH seviyesi azalır. Reaktif oksijen türlerine karşı önemli bir savaşçı olan redükte glutatyonun seviyesini koruyan glutatyon redüktaz enzimi tarafından da NADPH kullanılır (2). Böylece, MTX kullanımına bağlı olarak düşen NADP seviyeleri, hepatositleri reaktif oksijen radikallerine karşı duyarlılaştıran glutatyon seviyelerinin düşmesine ve bu da hepatosit hasarına sebep olur (39). Hücre içinde MTX poliglutamata formunda tutulur. MTX kullanımı ile hücre içindeki poliglutamata formunun miktarı artar ve folik asit (FA) seviyeleri düşer (40). Bu da hepatosit nekrozuna sebep olur. Özetle hepatotoksitenin sebebi olarak; NADPH azalmasının oksidatif strese karşı hepatositlerde hassasiyet geliştirmesi ya da MTX' in hepatositlerde uzun vadede birikimi sonucu oluşan MTX-poliglutamata formlarının oluşması düşünülebilir (40,41).

2.3 E Vitamini

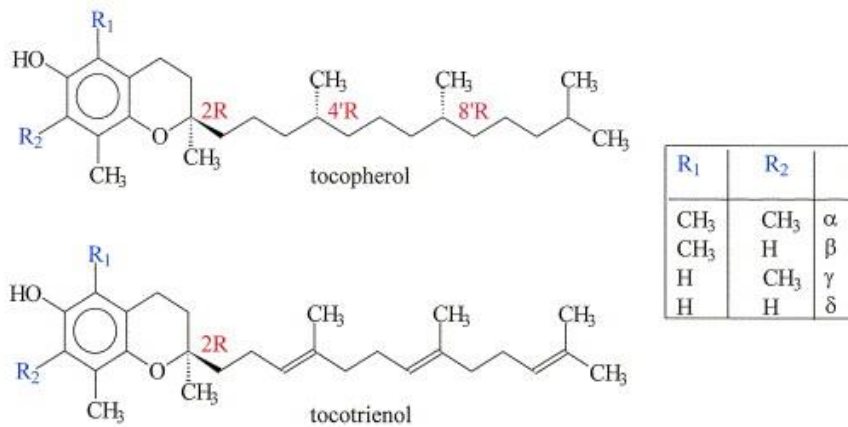
2.3.1 E Vitamini Yapısı

E vitamini ilk defa 1922 yılında Evans ve Bishop tarafından bulunmuştur (42). İlk olarak bu maddeye x maddesi adı verilmiştir (43). 1936 yılında ise Evans tarafından buğday tohumu yağından üretilmiştir (44). E vitamininin 4 tokoferol ve 4 tokotrienol olmak üzere 8 türevi vardır (45, 46).

Besinler içinde en fazla bulunan ve en güçlü E vitamini etkinliği gösteren türev α -tokoferoldür (47). Bu madde doğal olarak D izomeri halinde bulunur; sentetik olarak rasemik şekli yapılı ve ilaç olarak bu şekli kullanılır. Fiziksel özellikleri bakımından bir sıvı yağdır. Tokoferol'un besinler içinde bulunun beta,

gama, delta, eta ve zeta türevlerinin E vitamini etkinliği, α -tokoferol'üne göre oldukça düşüktür. Tokoferollar kimyaca izoprenoid zinciri ile substitüe edilmiş 6-hidroksikroman (tokol) türevleridir. Düşük derecede olmak üzere, besinler içindeki tokotrienollar da E vitamini etkinliği gösterirler. Kural olarak besinler içindeki E vitamini etkinliğinin yaklaşık %80' inin α -tokoferola bağlı olduğu, geri kalan %20'sinin diğer tokoferol türevlerinden ve tokotrienollardan ileri geldiği kabul edilmektedir (6). Alfa-tokoferol'un kimyasal olarak ölçümüne ait yerleşmiş yöntemler bulunduğu ve diğerlerinin kimyasal olarak ölçümü zor olduğu için, besinlerin E vitamini etkinliği değerlendirilirken sadece α -tokoferol miktarı ölçülür; ayrıca, besin içinde diğer türevlerin varlığından ileri gelen ve α -tokoferolunkinin %25'ine (toplamın %20'sine) eşit değerde ilave bir E vitamini etkinliğinin daha bulunduğu kabul edilerek bu değer ölçüme ilave edilir (6).

E vitamini hububat tanelerinde (bunların yağ fraksiyonunda), mısır yağı, pamuk yağı, soya yağı ve diğer bitkisel sıvı yağlarda ve bunlardan yapılan margarinlerde, et, hayvansal yağ, karaciğer, balık eti, tavuk eti ve yumurtada bulunur (6,48). Kızartma, kaynatma ve saklama sırasında önemli ölçüde parçalanır. Anne sütünde oldukça fazladır (6).



Şekil 8. E Vitamininin Moleküler Yapısı (49)

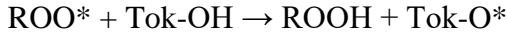
2.3.2. Farmakokinetik Özellikleri

Emilim ve karaciğere taşınması yağda çözünen vitaminlere benzer. Vücutta daha çok yağ dokusunda toplanır (6,50); depolanan miktarı fazla değildir. Plasentayı zor geçer. Emziren kadınlarda meme bezleri tarafından süt içine nisbeten fazla miktarda salınır. Normal plazmadaki konsantrasyonu bireyler arasında değişkenlik gösterir ve ortalama 0.4-0.5 mg/dl kadardır. Plazmadaki total lipit düzeyinde meydana gelen değişimler E vitamini düzeyine de yansır. Bu nedenle plazma E vitamini düzeyine bakarak yeterliliğinin değerlendirilmesinde mutlak E vitamini konsantrasyonundan daha çok, plazma E vitamini/total lipit oranına bakılır. Oranın 0,8mg/dl'in altına düşmesi eksiklik anlamına gelir (6).

2.3.3. Antioksidan Etki

E vitamininin en önemli özelliği antioksidan etkinliğinin olmasıdır, Hücrelerde membran fosfolipidlerinin doymamış yağ asitleri kendiliğinden ya da oksidan moleküllerin challenge reaksiyonu sonucunda kolayca oksitlenebilir ve peroksid türevlerine dönüşebilirler. Bu olaya lipid peroksidasyonu adı verilir (6,7). Serbest oksijen radikalleri oluşmasının eşlik ettiği bu olay zincirini membranda önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan faktör E vitamindir (6). Bu özelliğinden dolayı zincir kırıcı (chain breaking) antioksidan olarak bilinir (8,9).

E vitamini, hücre ve membran lipidleri üzerindeki bu etkisi nedeniyle bu membranları oksidatif zedelenmeye karşı korur. Böylece eritrosit membranının stabilitesini artırır; aynı etkiyi diğer hücrelerde de gösterir. Eritrosit membranı ve bronkoalveoler sistemin epitel membranı gibi vücutta yüksek oksijen alan yerlerde E vitamini daha çok bulunur. E vitamini (Tok-OH), peroksidler üzerindeki nötralize edici etkisini, kendisinin bir fenolik hidrojen atomunu peroksil radikaline (ROO*) transfer etmek suretiyle iki basamakta yapar:



Sonuçta, oluşan tokoferoksil metaboliti nispeten sabittir ve lipid peroksidasyonunu başlatmak için yeterince reaktif değildir. Bu oksidasyon ürünü, glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yolu ile atılır (6).

2.4. Apoptoz

2.4.1. Apoptozun Tanımı

Apoptoz programlanmış hücre ölümü anlamına gelir. İnsan vücudunda hücreler ömrünü tamamladığında, ya da hasar gördüklerinde diğer hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmalıdırlar. Apoptoz genetik olarak kontrol edilir. Apoptoz yunanca yaprak dökümü anlamına gelir (51-52). Hücre ölümleri fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (physiological cell death) olarak da adlandırılır (53,54).

Apoptoz insan vücudunda embriyolojik gelişim sırasında birçok yerde fizyolojik olarak gözlenmektedir. Dokularda hücre popülasyonunun korunması ve yaşlanma gibi olaylarda fizyolojik olarak meydana gelir. Bunun yanında hücreler, hastalıklar veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde veya immün reaksiyonlarda koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkar (55,56).

Apoptoz için sinyal geldikten sonra hücrede birçok değişim gözlenir. Hücre boyutları küçülmeye başlar. Çekirdek kondanse olmaya başlar, hücre iskeleti yıkılır ve çekirdek zarı erir. Çekirdek DNA'sında parçalanma olur (54,57).

Apoptoz sırasında apoptotik hücrelerin membranlarında değişimler olur. En belirgin değişim normalde hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde yer alan negatif yüklü fosfolipidlerin birimlerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıdır. Bunun sonucunda kollektin (C1q) adı verilen çeşitli proteinler apoptotik hücre zarına bağlanmaktadır. Ayrıca normalde hücre zarında gizlenmiş

olan N-asetil glikozamin apoptozda açığa çıkar ve makrofajlar tarafından tanınırlar (54,58). Apoptotik hücrelerde görülen diğer bir olay ise hücre içeriklerini içeren ve veziküller biçiminde apoptotik hücrelerden kopan tomurcuklardır. Bu yapılara apoptotik cisim ismi de verilir. Bu değişimler apoptotik sürecin sonlarına doğru görülür (54,59).

2.4.2. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Hematoksilen-eozin boyama, giemza boyama, floresan mikroskopi , elektron mikroskopi, faz kontrast mikroskopi, TUNEL yöntemi, kaspas-3 yöntemi, agaroz jel elektroforezi, ELİSA western blotting, flowsitometri ve annexin V yöntemleri kullanılabilir (54)

2.4.3. Apoptozda Flow Sitometri

Flow sitometri lazer kaynaklı florometre ile parçacık ışık yayılımı analizi bileşiminden oluşur. Flow sitometride farklı moleküller, hücreler ve parçacıklar, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak büyüklük ve şekil olarak ayrılabilir. Bu hücreler, moleküller veya parçacıklar 13-phycoerithrin, FITC ve rhodamine-GG gibi özel floresan işaretleyicilerle veya boya işaretli antikorlarla işaretlenebilir (51). Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, çok zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanışlıdır. Apoptoz flow sitometri uygulamasında iki şekilde belirlenir.

- a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,
- b. Anneksin V kullanılarak (54,60, 61).

2.4.4. Apoptozda Anneksin V Yöntemi

Anneksin V yöntemi; hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne hareket ederler. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde örneğinin FITC ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. (54,60,62-64).

2.5 Flowsitometri

2.5.1. Flowsitometri (Akımsitometri)

1956 yılında Coulter, bir partikülün küçük bir delik boyunca geçişi süresince elektriksel iletkenlikteki değişiklikler olduğunu bulmuştur. Bu değişiklikler ile partikül sayısının saptanabildiği bir yöntem geliştirmiştir Büyük partiküllerin daha fazla iletkenlik değişikliği yaptığı ortaya çıkmıştır. Bu yöntemle partikülün büyüklüğü ve hacmi de değerlendirilmektedir (65).

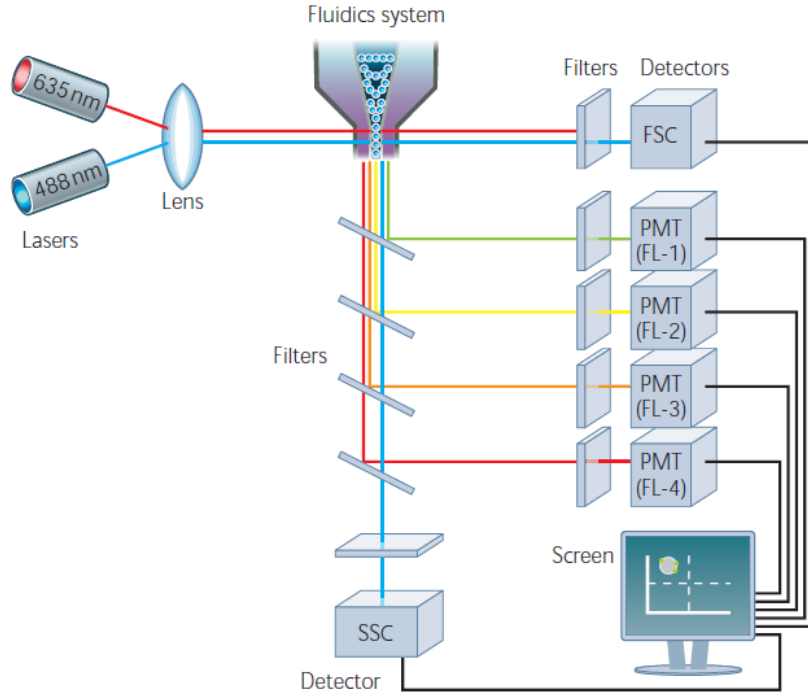
Bilgisayar ve optik teknolojisinde ilerlemeyle birlikte florokrom boyalardada gelişmeler olmuştur, 1965 yılında flow sistemiyle spektrofotometre birleştirilmiştir. Fuelgen tekniği ile boyanan hücrelerde DNA miktarının ölçülebilmesi sağlanmıştır. Bu yeni hali ile flowsitometri (FCM), simultane olarak 4 parametre ölçebilen ve 2 parametrelili histogram şeklinde veriler elde edilebilen modern şekline daha da yaklaşmıştır. Argon lazerin 1969 ve "slit scanning" tekniğinin 1971 yılında sisteme eklenmesi ile her bir hücre ve nükleusu, sahip oldukları büyüklük ve hacimlerine ve diğer bazı başka özelliklerine göre, dar bir

kanaldan gezerken ürettikleri floresana bağlı olarak farklı floresan dalga boyu sinyali şeklinde tespit edilebilir hale gelmişlerdir. Aslında FCM sistemi, kanaldan gezerken hücrelerin yaydığı ışık saçımı ile oluşan sinyali yakalayan ve bunu amplifiye eden bir seri dedektör sistemidir. Bu şekilde dijital olarak elde edilen elektriksel sonuçların bilgisayar analizi ile, hücre hakkında bilgiler edinmek mümkün olabilmektedir (66).

2.5.2. Flowsitometri'nin Çalışma Prensipleri

FCM; hücrelerin veya diğer partiküllerin cihaz içine bir sıvı içerisinde ve tek sıra halinde alınarak fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ölçüldüğü ileri bir tanı yöntemidir (65-67). Bu kompleks sistem, birçok farklı sistemin birleşimi ile ortaya çıkan oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. FCM sistemini oluşturan alt sistemlerin başlıcaları şunlardır;

- 1) Hücre veya diğer biyolojik partikülleri toplayan ve taşıyan sistem
- 2) Akım sistemi (sheat ve akım kabini (flow chamber))
- 3) Lazer sistemi
- 4) Sferik şekilli ve çapraz yerleşimli silindir filtreler
- 5) Odaklama aynaları
- 6) Optik ve elektriksel sinyal detektörleri
- 7) Verilerin toplandığı, saklandığı ve analiz edildiği Bilgisayar Sistemi
- 8) Hücreleri ayırabilen "cell sorting" sistemi

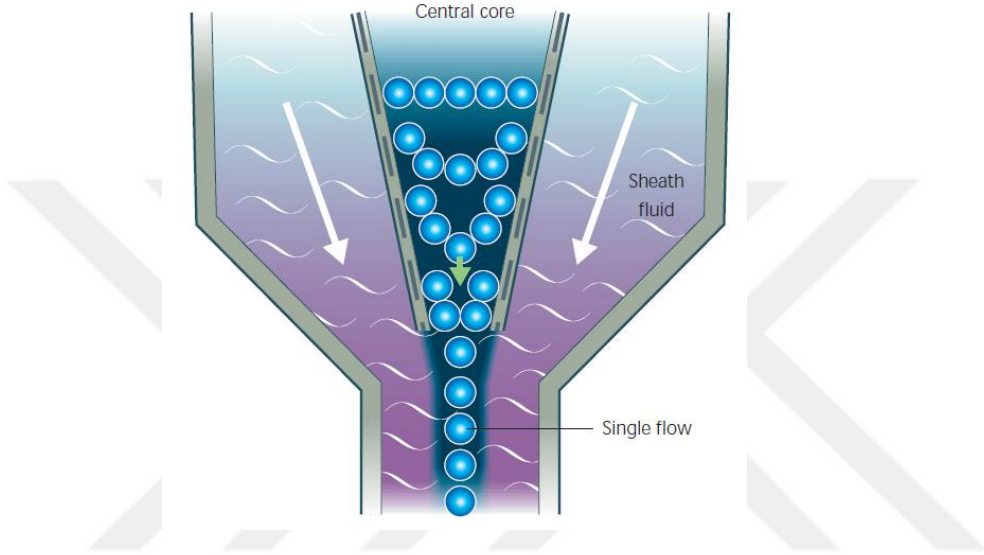


Şekil 9. Flowsitometri Sisteminin Şeması (70).

FCM çalışmasının ilk aşamasında; özel yöntemlerle taze veya parafine gömülü dokulardan hazırlanan ve nükleik asitlere bağlanan ve bağlandıkları yerde floresan veren florokrom boyalarla işaretlenen örneklerin, "Sheat Fluid" içinden geçirilerek "Flow Chamber"a ulaşmaları sağlanır. Bu geçiş sırasında hücreler tek sıra halinde olup, geçiş sırasında lazer ışığı altında uyarılarak görünür hale gelirler (67,68,69). Lazer kaynağı olarak genellikle Argon iyonu kullanılır. Bu şekilde hücreye bağlı florokromun lazer ışınları ile aktifleşmesi, ışığın yoğunluğuna bağlı olarak hücrenin boyutu, iç yapısı, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgi edinme olanağı sağlar (67-69).

Boyanın floresan emisyonu hassas fotodiodlarda toplanır ve "Photomultiply Tubes" (PMTs) ismi verilen özel sistemle elektrik sinyaline çevrilerek amplifiye edilir ve bilgisayar sistemine aktarılır. Böylece birkaç dakikalık süre içinde 10.000-

1.000.000 hücrenin geçişi sağlanır ve herbirinin özellikleri teker teker belirlenebilir (67-69).



Şekil 10. Flowsitometride Hücrelerin Tek Sıra Halinde Geçişini Gösteren Şema (70).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deneysel Çalışma Planı

3.1.1. Etik Kurul Onayı ve Deney Hayvanlarının Temini

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Hayvan Deneyle Yere Etik Kurul onayı alınarak başlandı. Çalışmamızda kullanılan sıçanlar KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlandı. Çalışmada, 200-250 gr ağırlığında Spraque dawley cinsi 32 adet erişkin erkek sıçan kullanıldı. Çalışma süresince sıçanların bakımı, beslenmesi, barınması ve deney süresince takibi için KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde bulunan odalar kullanıldı. Çalışmada kullanılan sıçanların tamamı Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlandığı için, deney sırasında sıçanlarda çevresel değişikliklerden kaynaklanan stres veya uyum problemi yaşanmadı.

3.1.2. Sıçanların Çalışma Süresince Bakımı ve Laboratuvar Şartları

Sıçanlar çalışma süresince, her zamanki beslenme ve barınma koşullarında bulundular. Deney süresi boyunca laboratuvardaki sıcaklık ortalama 22 ± 2 °C, nispi nem ortalama $\%50 \pm 5$ olarak tutuldu. Sıçanların bulunduğu ortama 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma koşulları sağlandı. Sıçanlara içme suyu olarak, cerrahi araştırma merkezinde normal şartlarda kullanılan çeşme suyu verildi ve standart sıçan yemi ile beslendi, herhangi ilave bir besin kullanılmadı. Çalışma süresince sıçanların barınmasında standart Tip III kafesler kullanıldı (Resim 1).



Resim 1. A ve B, Deney Hayvanlarının Barınmasında Kullanılan Tip III Kafesler.

3.1.3. Çalışma Grupları

Çalışma dört gruptan oluşturuldu ve her bir grupta eşit sayıda olacak şekilde sıçanlar rastgele olarak gruplara ayrıldı. Grupların özellikleri ve çalışma sırasında gruptaki sıçanlara uygulanan işlemler Tablo 1’ de verilmiştir.

1. Grup: Kontrol Grubu Sıçanlar (n=8): Bu gruptaki sıçanlara deney süresi (5 gün) boyunca intraperitoneal (i.p.) olarak serum fizyolojik verilip çalışma süresince kendi kafeslerinde serbestçe beslenmeleri sağlandı.

2. Grup: MTX Grubu Sıçanlar (n=8): Bu gruptaki sıçanlara sadece deneyin ilk günü 20 mg/kg MTX i.p. olarak uygulandı.

3. Grup: MTX+E Vitamini Grubu Sıçanlar (n=8): Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın ilk günü 20 mg/kg MTX i.p. olarak uygulandı ve deney süresince ilk günde dahil olmak üzere 100 mg/kg E vitamini i.p. olarak uygulandı.

4. Grup: E Vitamini Grubu Sıçanlar (n=8): Bu gruptaki sıçanlara 5 gün boyunca 100 mg/kg E vitamini i.p. olarak verildi.

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Gruplara Yapılan Uygulamalar

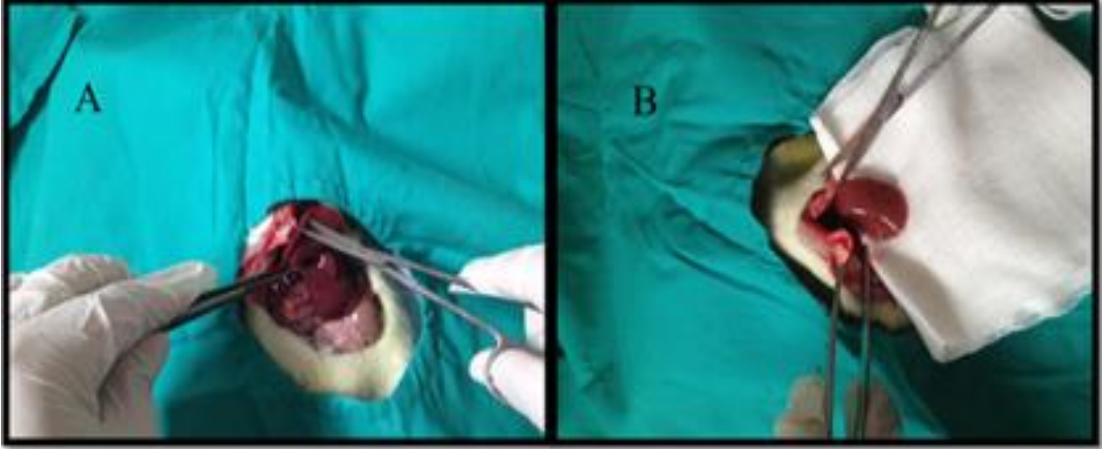
GRUPLAR	UYGULAMA	DENEK SAYISI
1. Grup (Kontrol Grubu)	5 gün boyunca sadece serum fizyolojik verildi.	8
2. Grup (MTX Grubu)	Sadece çalışmanın ilk günü 20 mg/kg MTX i.p. uygulandı.	8
3. Grup (MTX+E Vitamini Grubu)	Sadece çalışmanın ilk günü 20 mg/kg MTX i.p. ve 5 gün boyunca 100 mg/kg E vitamini i.p. uygulandı.	8
4. Grup (E Vitamini Grubu)	5 gün boyunca 100 mg/kg E vitamini i.p. verildi.	8

Çalışmanın deney aşaması ve dokuların elde edilmesi işlemlerinin tümü KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde özel olarak hazırlanmış hayvan takip ve cerrahi müdahale odalarında gerçekleştirildi. Uygulamalar her gün aynı saatler arasında (saat 11.00-12.00 arasında) yapıldı.

3.2. Histolojik İşlemler

3.2.1. Karaciğer Dokularının Elde Edilmesi

Tüm sıçanlar deney süresinin bitiminde (5. gün sonunda) anestezi altındayken kansızlaştırma yöntemi ile sakrifiye edilerek steril şartlar altında karaciğerler çıkarıldı ve hassas terazide tartıldı. Tüm sıçanlarda doku takibi aşamasında karaciğerin sağ tarafı kullanılmıştır.



Resim 2. Karaciğer dokusunun elde edilmesi.

3.2.2 Doku Takibi Aşaması

Doku takibi aşamasında aşağıdaki işlemler uygulandı:

- | | |
|-------------------|----------|
| 1. %70' lik alkol | 24 saat |
| 2. %90'lık alkol | 24 saat |
| 3. %96'lık alkol | 24 saat |
| 4. %100'lük alkol | 24 saat |
| 5. %100'lük alkol | 1 saat |
| 6. Ksilen+parafin | 5 dakika |
| 7. Ksilen | 5 dakika |
| 8. Ksilen | 5 dakika |

9. Dokular eritilmiş parafin içerisinde önce 58 °C' lik etüvde üç kez 15 dakika, sonrasında ise 2 saat bekletildi.

10. Dokular oda sıcaklığında bloklandı.

3.2.3. Kesitlerin Alınması

Kesitler KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarındaki Leica RM 2255 marka mikrotom ile alındı. Dokuya kadar 20µm' lik kesitler alınarak dokunun parafini atıldı. Dokuya ulaşıldığında 5 µm' lik kesitler alındı. Kesitler benmari içindeki 45 °C' lik sıcak su üzerine koyularak kırışıklıkların açılması sağlandı ve lam üzerine yerleştirildi.

3.2.3.Kesitlerin Hematoksilen ve Eozin ile (H.E.) Boyanması

Tüm dokulardan kesitlerin alınması tamamlandıktan sonra boyama işlemine başlandı. Boyama sırasında H.E. boyaları kullanıldı. Tüm kesitlerin parafini 58°C'lik etüvde iyice eritildi ve sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

- | | |
|-------------------|----------------------------|
| 1) Ksilen | 5 dakika |
| 2) Ksilen | 5 dakika |
| 3) %100'lük alkol | 5 dakika |
| 4) %96'lık alkol | 5 dakika |
| 5) %70'lik alkol | 5 dakika |
| 6) Distile su | 2-3 dakika |
| 7) Hematoksilen | 35 saniye |
| 8) Musluk suyu | 5 dakika |
| 9) Asit alkol | 1 kez batırılıp çıkartıldı |
| 10) Distile su | 1 dakika |
| 11) Amonyaklı su | 10 saniye |
| 12) Distile su | 1 dakika |
| 13) Eozin | 30 saniye |
| 14) Distile su | 1 dakika |
| 15) %70'lik alkol | 5 dakika |

- 16) %96'lık alkol 5 dakika
17) %100'lük alkol 5 dakika
18) Ksilen 5 dakika
19) Ksilen 5 dakika
20) Entellan ile kapatma.

Fotoğraflar Olympus BX51 (Japan) fotomikroskoplu ışık mikroskobunda incelendi ve resimler dijital ortama aktarıldı.

3.2.4. Periyodik Asit Schiff Boyası

Periyodik Asit Schiff (PAS) boyası yapılarak hepatositlerde glikojen birikimleri değerlendirildi.

3.2.4.1. PAS Boyası Boyama Protokolü: Preparatlar 60°C'lik etüvde 1 saat bekletilerek deparafinize edildi. Daha sonra aşağıdaki işlemlerden geçirildi (71).

1-Periyodik Asit.....3-5 dk

2-Suda yıkandı

3-Prepartlar iyice kurutuldu

4-Schiff pipetle doku üzerini kaplayana kadar döküldü. 5-20 dk arası bekletildi (dokular kırmızı olana kadar).

5-Suda yıkandı

6-Hematoksilen boyasında bekletildi.....2 dk

7-Suda yıkandı

8-Asit alkole batırılıp çıkarıldı

9-Suda yıkandı

10-Amonyakta tutuldu.....5-10 sn

11-Suda yıkandı

12-Alkol serilerinden geçildi

13-Kurutulup üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.3. Flowsitometrik İşlemler

3.3.1. Flowsitometrik Analiz İçin Dokuların Deparafinizasyonu

Çalışma kapsamına alınan parafin bloklar Hedley metodundan modifiye edilen yöntemle aşağıdaki sıra izlenerek kimyasal ve mekanik yolla deparafinize edildi (72).

- 1) Parafin bloğa gömülü dokulardan Leica RM 2255 marka mikrotom kullanılarak 50 mikron kalınlığında her blok için 3 adet kesit hazırlandı ve lama alındı.
- 2) Kesitler 1 saat süre ile etüvde bekletildi ve parafinin erimesi sağlandı.
- 3) Her bir kesit 10 dakika süre ile iki kez ksilenden geçirildi.
- 4) Kesitler rehidratasyon işlemi için iki kez %100 etanol, daha sonra ise sırasıyla %75 ve %50 etanol serilerinden 10'ar dakika süreyle geçirildi.
- 5) Tüm kesitler 12 saat boyunca distile suda bekletildi.
- 6) Lamın üzerindeki materyal bistüri ucu ile her bir olgu için ayrı bir petri kutusuna kazındı
- 7) Petri kutusundaki dokular ince bir makas ile materyal çamur kıvamına gelene dek mekanik olarak parçalandı. Her bir yeni olgu için makas ucu özenle temizlendi.

8) Petri kutularındaki materyal üzerine 0.5-1 mL distile su eklendi ve Pastör pipeti kullanılarak dokular tüplere aktarıldı.

9) Süspansiyon naylon DNA mesh (Spectramesh-nylon, 50 micron Backman-Coulter)' den geçirildi ve süzülerek yabancı partiküllerin tamamen uzaklaşması sağlandı.

10) Her bir süspansiyondan 300 mikrolitre örnek alındı ve BD Pharmingen Pe ANNEXIN V Apoptosis Detection Kit (Cat: 559763 Lot: 5306537) ile boyandı.

11) Örnekler oda ısısında karanlıkta 20 dakika bekletildikten sonra flow sitometrik analize geçildi.

3.3.2. Flowsitometri Analizi

Flowsitometri Analizi BD Accuri C6 Cytometer cihazıyla yapıldı ve FCM bilgisayarına aktarıldı. FCM histogramlarında saptanan apoptoz piki yüzde oranları " BD Accuri C6 Cytometer software (Version 1.0.264.21) " analiz programı kullanılarak değerlendirildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences version 22) programı ve Microsoft®Excel programı kullanıldı. Değerlendirme sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, minimum, maksimum olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Kruskal-Wallis testi anlamlı çıkanlarda, ikili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı, anlamlılık seviyesi $p < 0.0083$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sıçan Ağırlıklarına Ait Bulgular

Tablo 2. Sıçan Ağırlıklarına Ait Bulgular

Tüm Gruplar	1.gün Ortalama	2.gün Ortalama	3.gün Ortalama	4.gün Ortalama	5.gün Ortalama
N=32	± ss	± ss	± ss	± ss	± ss
	235.63	238.34	235.84	232.44	232.19
	± 13.35	±13.54	±14.98	±19.49	±22.36

İstatistiksel olarak sıçan ağırlıkları değerlendirildiğinde birinci ve 2 gün ağırlıkları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. 3. 4. ve 5. Günlerde ise sıçanların ağırlıkları arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü $p<0.005$

Tablo 3. Deney Gruplarının Karaciğer Ağırlığına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar

Gruplar (N=32)	Karaciğer Ağırlıkları (gr)*
Kontrol Grubu (n:8)	12,575 ± 0.9347
MTX Grubu (n:8)	12,138 ± 1,3928
MTX+E Vitamini Grubu (n:8)	11,737 ±1,7129
E Vitamini Grubu (n:8)	14,150 ±1,9420

*: Tüm gruplar için karaciğer ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0,54$). $p>0,005$

Tablo 4. Deney Gruplarının Flowsitometri Sonuçlarına Ait Ortalama Ve Min-Max Değerleri

Gruplar	Flowsitometrik yüzdeler (%)*
Kontrol Grubu (n:8)	0,263 (0,1-0,4)
MTX Grubu (n:8)	34,038 (30,9-37,9)
MTX+E Vitamini Grubu (n:8)	11,125 (9,4-12,9)
E Vitamini Grubu (n:8)	0,950 (0,5-1,7)

*: Tüm gruplar için flowsitometrik sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,083$). Metotreksat grubundaki flowsitometrik yüzde değeri diğer gruplara göre anlamlı olarak arttı. Metotreksat+ E vitamini grubundaki flowsitometrik yüzde değeri ise Metotreksat grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p < 0,083$).

Tablo 5. Flowsitometrik analizde apoptoz indeksi yüzdelerinin istatistik değerlendirilmesi

Gruplar	1-2 (K-M)	1-3 (K-ME)	1-4 (K-E)	2-3 (M-ME)	2-4 (M-E)	3-4 (ME-E)
P değeri	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

Tüm gruplar arasında karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0,0083$).

4.2. Histolojik Bulgular

Kontrol grubu ve deney grubuna ait karaciğer doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının yapmış oldukları skorlamaya göre değerlendirildi (73). Gruplar arasında gözlenen değişikliklerin “p” değerleri aşağıda verilmiştir.

Deneysel parametrelerin histolojik (yapısal) değerlendirilmesi skorlandı.

(-) skor (negatif skor): Hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,

(+) skor (1 pozitif skor): Hafif derecede,

(++) skor (2 pozitif skor): Orta derecede,

(+++) skor (3 pozitif skor): Ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

Tablo 6. Histolojik Bulguların Skorlaması

Deney grupları	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Metotreksat	Grup 3 Metotreksat+E vitamini	Grup 4 E vitamini	Kruskal- Wallis p değeri
Histolojik skor	0 1+ 2+ 3+	0 1+ 2+ 3+	0 1+ 2+ 3+	0 1+ 2+ 3+	
Hepatositlerde dejenerasyon	8 0 0 0	0 0 1 7	0 4 4 0	8 0 0 0	p<0,0083
Piknotik çekirdekler	8 0 0 0	0 8 0 0	7 1 0 0	8 0 0 0	p<0,0083
Sinüzoidal dilatasyon	8 0 0 0	0 3 3 2	7 1 0 0	8 0 0 0	p<0,0083
Mononükleer hücre infiltrasyonları	8 0 0 0	0 0 1 7	0 1 6 1	8 0 0 0	p<0,0083
Vasküler konjesyon	8 0 0 0	0 0 7 3	1 7 0 0	8 0 0 0	p<0,0083
Hemoraji	8 0 0 0	0 0 0 8	6 2 0 0	8 0 0 0	p<0,0083

Histolojik bulguların analizinde tüm gruplar arasında karşılıklı yapılan karşılaştırmalarda anlamlı fark gözlemlendi (p<0,0083).

Tablo 7. Histolojik bulguların farklarının karşılaştırması

Gruplar	Hepatosit dejen.	Piknotik çekirdek	Sin. dilat.	Mono. infiltr.	Vas.kon.	Hem.
1-2 (K-M)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1-3 (K-ME)	0,000	0,317	0,317	0,000	0,001	0,000
1-4 (K-E)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2-3 (M-ME)	0,001	0,001	0,001	0,004	0,000	0,000
2-4 (M-E)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3-4 (ME-E)	0,000	0,317	0,317	0,000	0,001	0,000

Hepatosit dejen.: Hepatosit dejenerasyonu

Sin. Dilat.: Sinüzoidal dilatasyon

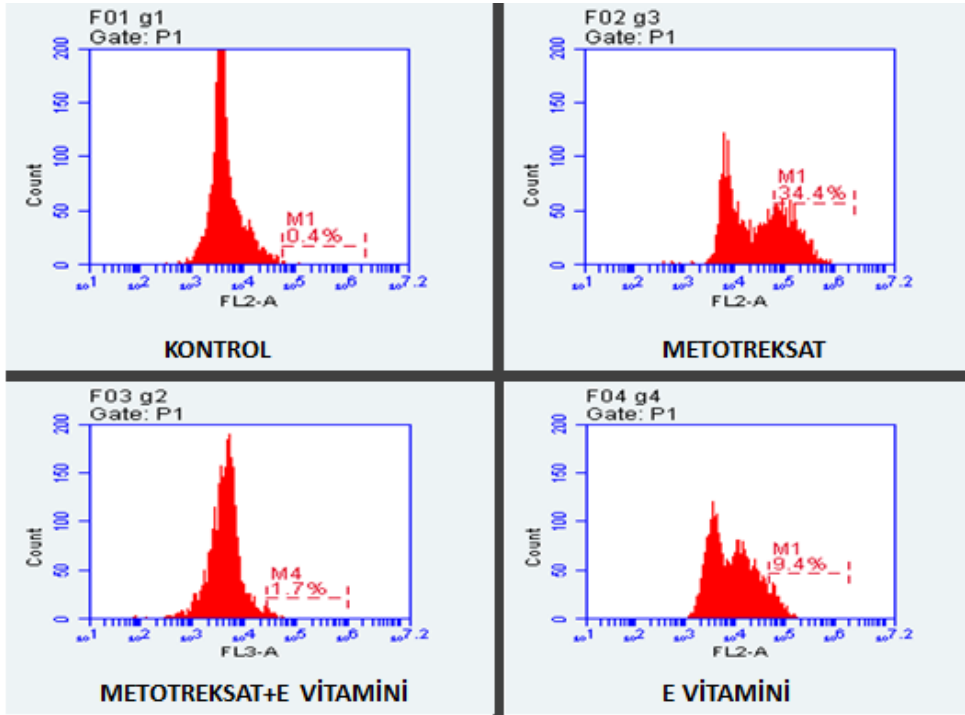
Mono. İnfiltr.: Mononükleer hücre infiltrasyonu

Vas.kon.: Vasküler konjesyon

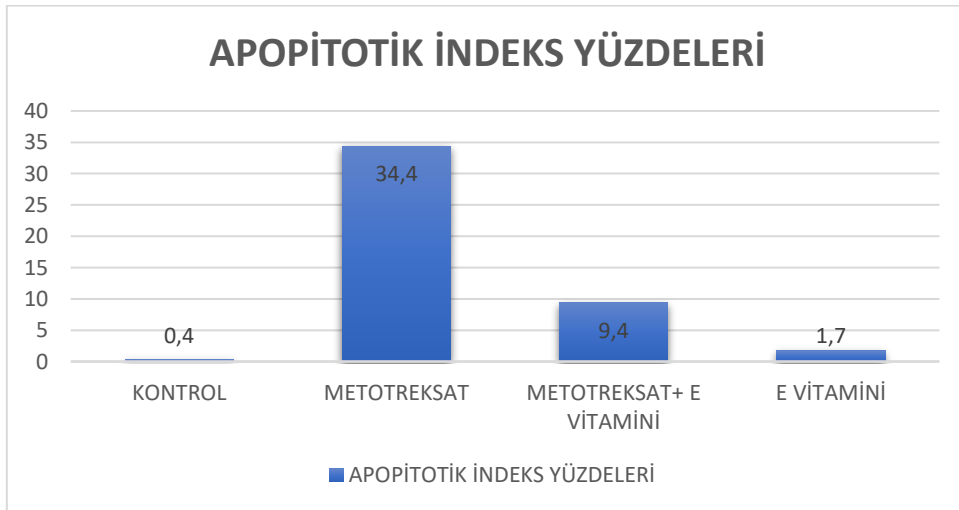
Hem.: Hemoraji

*Mann Whitney U testine göre $P < 0,0083$ anlamlı kabul edilmiştir. 1. ve 4. grup karşılaştırmasında anlamlı fark yoktur. 1. ve 3. grup karşılaştırmasındaki piknotik çekirdek ve sinüzoidal dilatasyon istatistiği ve 3. ile 4. grup karşılaştırmalarındaki piknotik çekirdek ve sinüzoidal dilatasyon anlamlı çıkmamıştır. Diğer grup karşılaştırmaları anlamlı olarak bulundu.

4.3. Flowsitometrik Bulgular

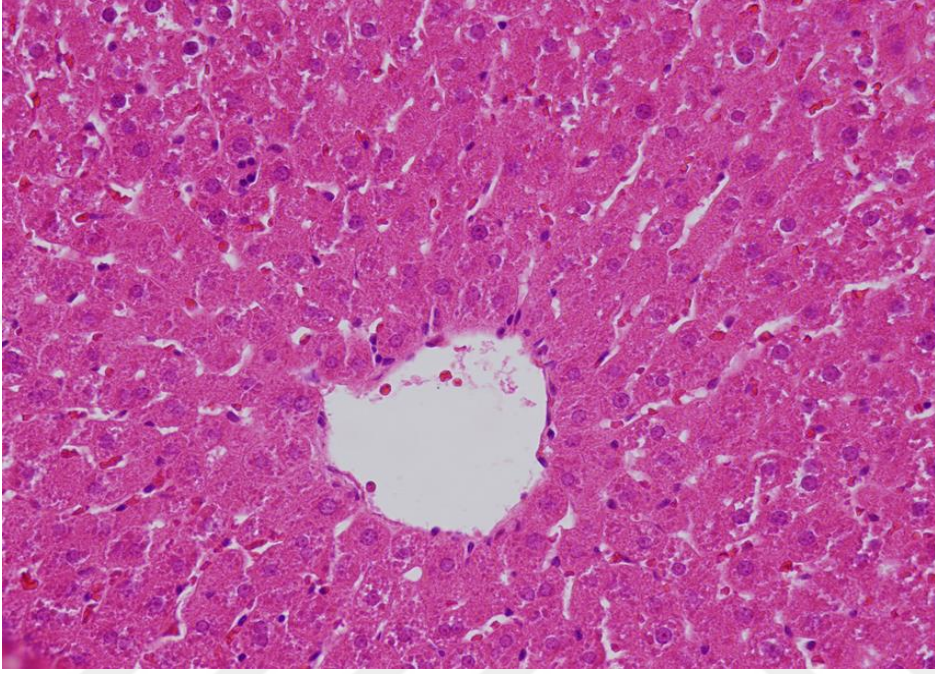


Resim 3. Kontrol, Metotreksat, Metotreksat + E Vitamini, E Vitamini Gruplarına Ait Flowsitometrik Apoptotik İndeks Yüzdelerine Ait Histogram.

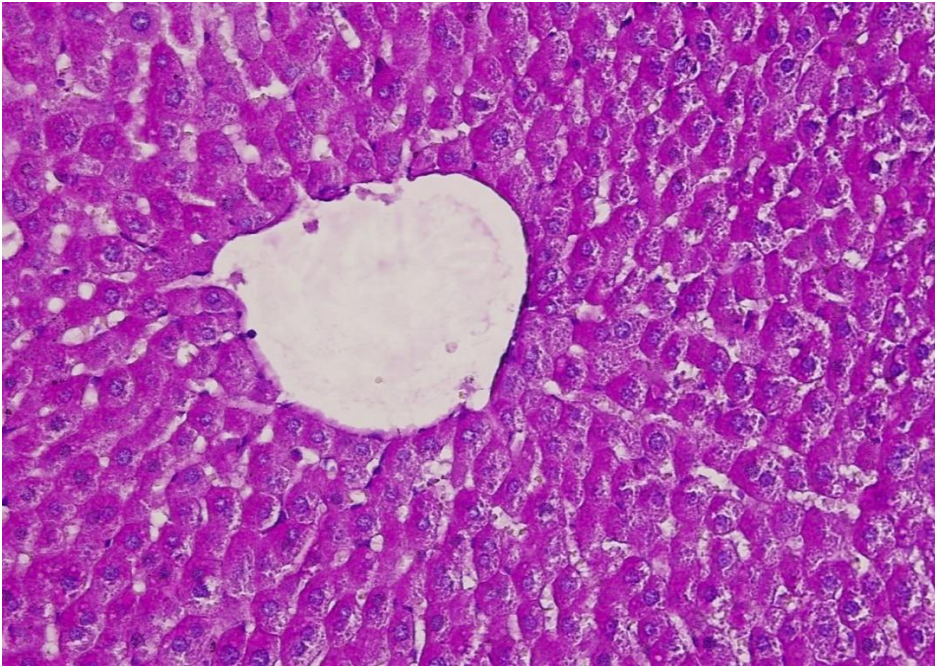


Tablo 8. Flowsitometrik Analizde Apoptoz İndeksi Yüzdeleri Tablosu

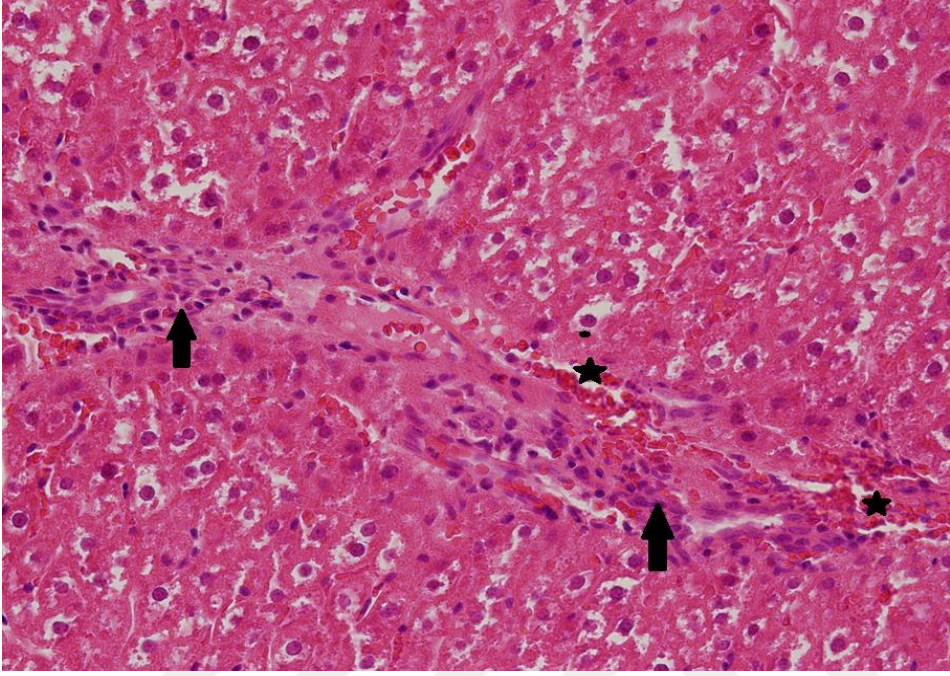
4.4. Histopatolojik Bulgular



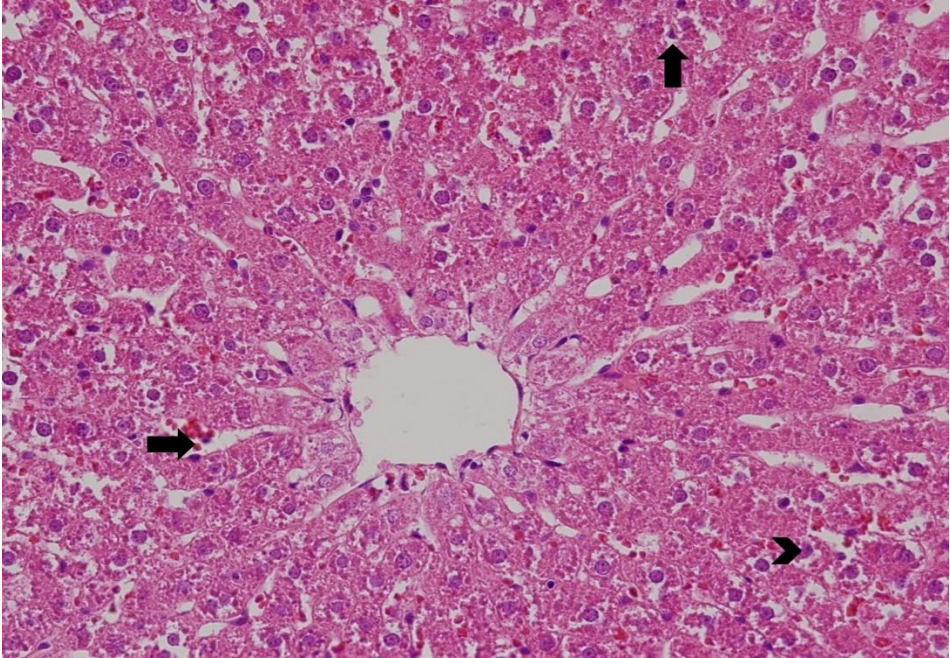
Resim 4. Kontrol Grubuna Ait Kesit (H.E. X 400). Normal histolojik bulgular gözlenmekte.



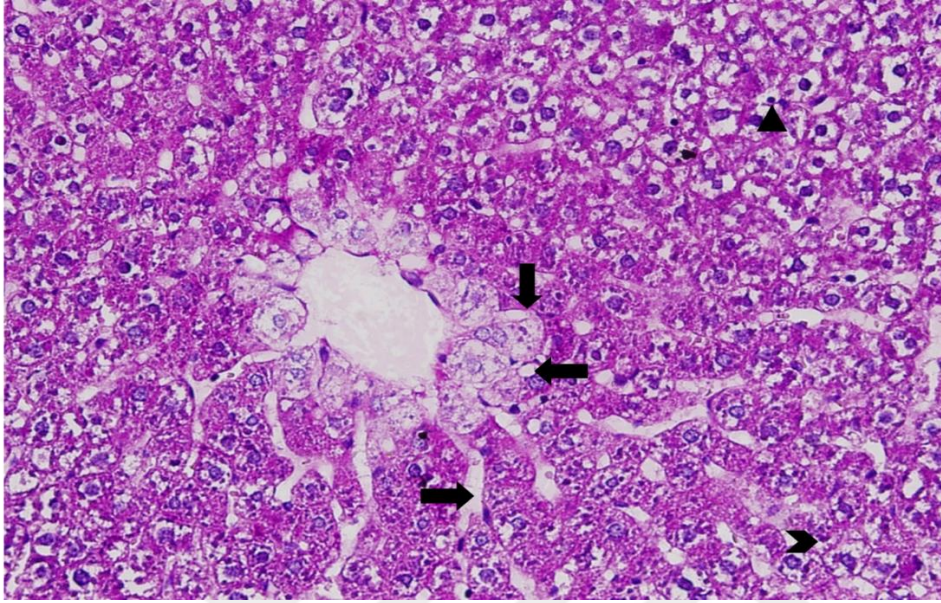
Resim 5. Kontrol Grubuna Ait Kesit (PAS X 400). Normal histolojik bulgular gözlenmekte. Hepatositlerin glikojen yoğunlukları normal bulunmuştur.



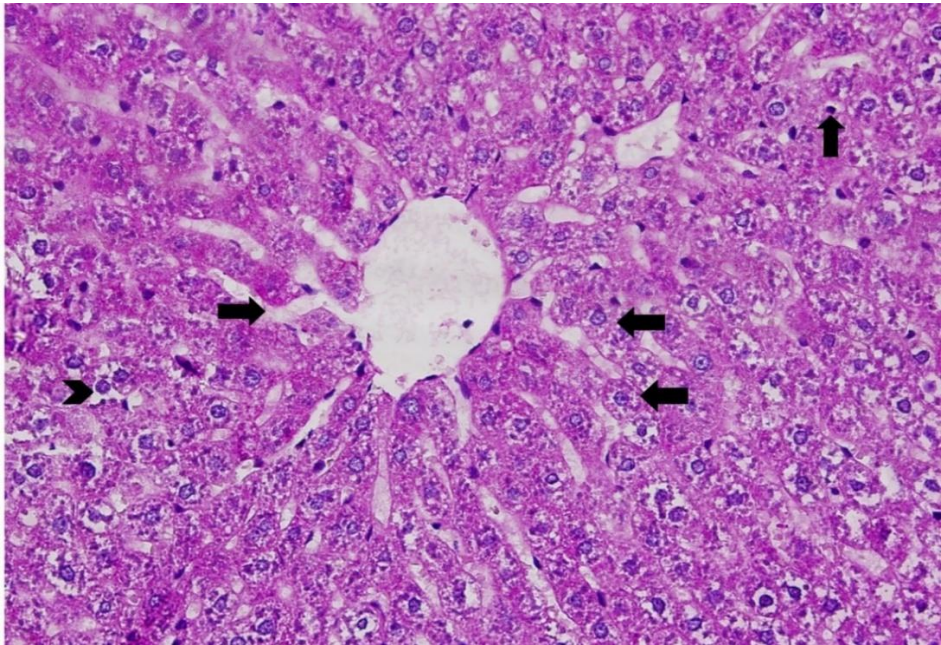
Resim 6. Metotreksat Grubuna Ait Kesit (H.E X 400). (↑) Mononükleer hücre infiltrasyonu, (★) Vasküler konjesyon bulguları gözlenmekte.



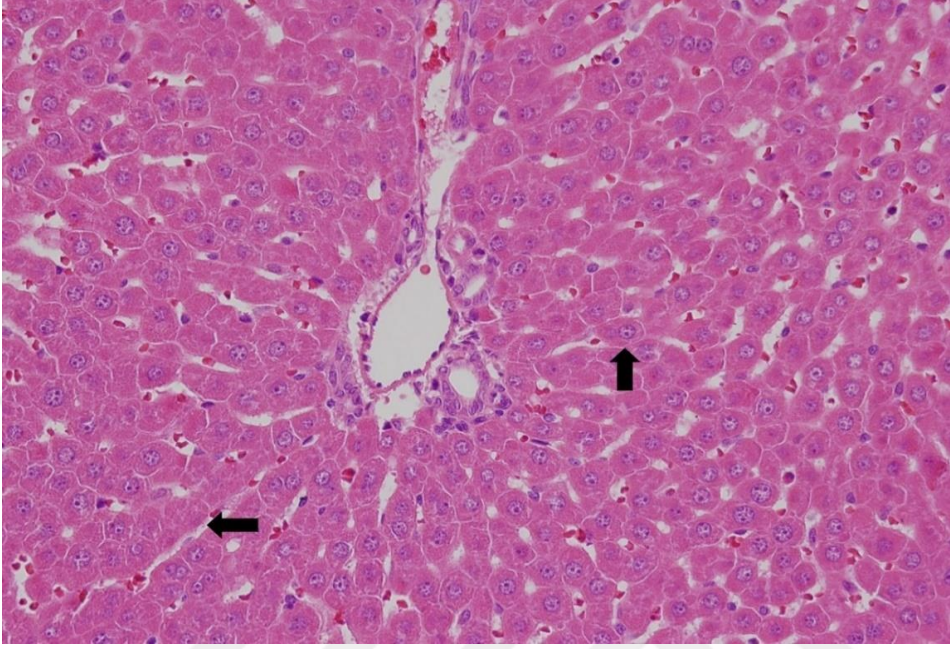
Resim 7. Metotreksat Grubuna Ait Kesit (H.E X 400). (➤) Hepatositlerde atrofi, (➡) Sinüzoidal dilatasyon, (↑) Piknotik çekirdek bulguları gözlenmekte.



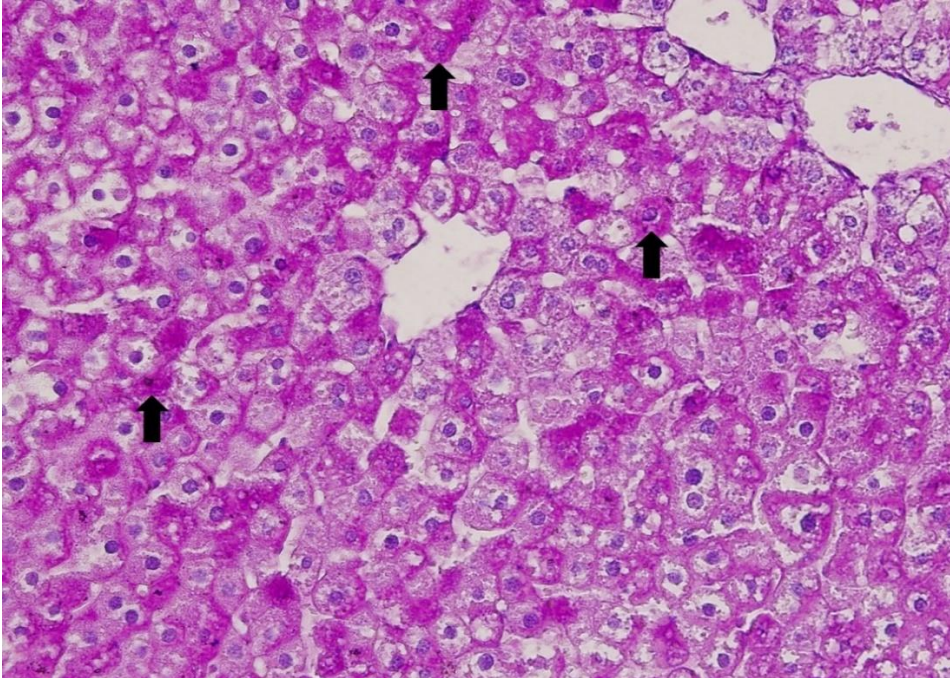
Resim 8. Metotreksat Grubuna Ait Kesit (PAS X 400). (▲) Piknotik çekirdekler, (←) Hepatosit sitoplazması içinde vakuol yapısı , (→) Sinüzoidal dilatasyon, (➤) Hepatosit dejenerasyonu, (↓) Vena sentralis etrafındaki hepatositlerde hipertrofi bulguları gözlenmekte.



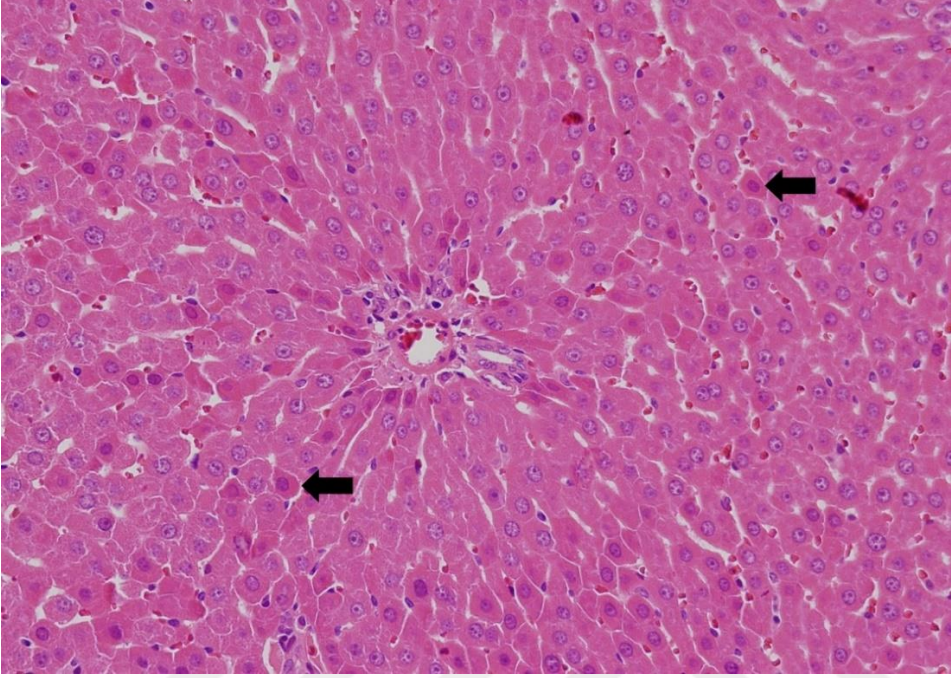
Resim 9. Metotreksat Grubuna Ait Kesit (PAS X 400). (←) Hepatositlerde glikojen depoları boşalmış. (➤) Hepatositlerde atrofi, (→) Sinüzoidal dilatasyon, (↑) Piknotik çekirdek bulguları gözlenmekte.



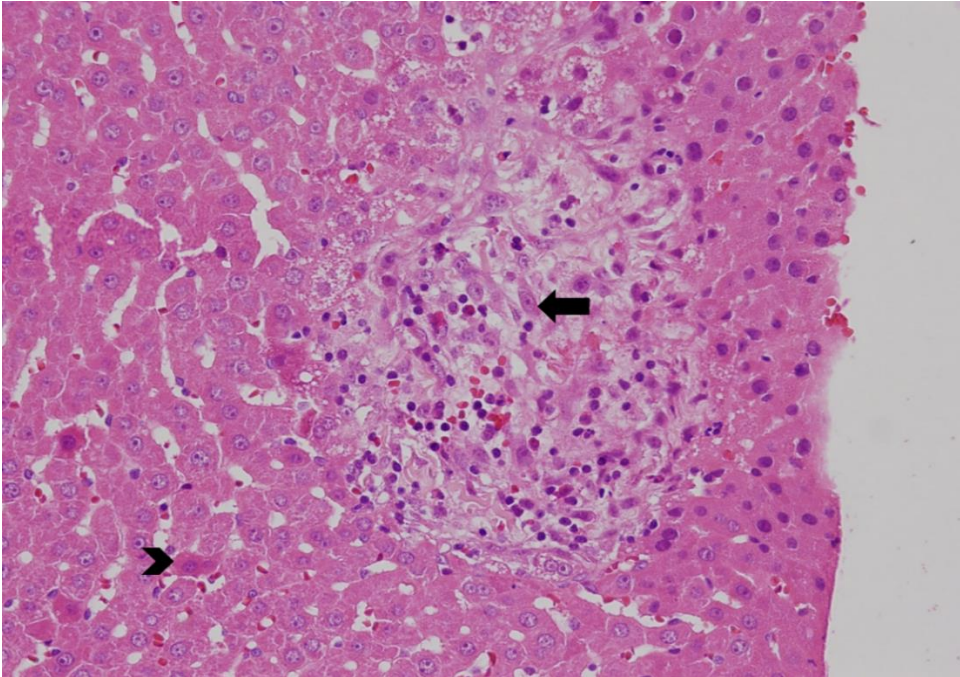
Resim 10. Metotreksat + E Vitamini Grubuna Ait Kesit (H.E. X400).
(←) Sinuzoidal dilatasyonda azalma, (↑) Hepatosit sitoplazmalarında belirgin düzelme gözlenmekte.



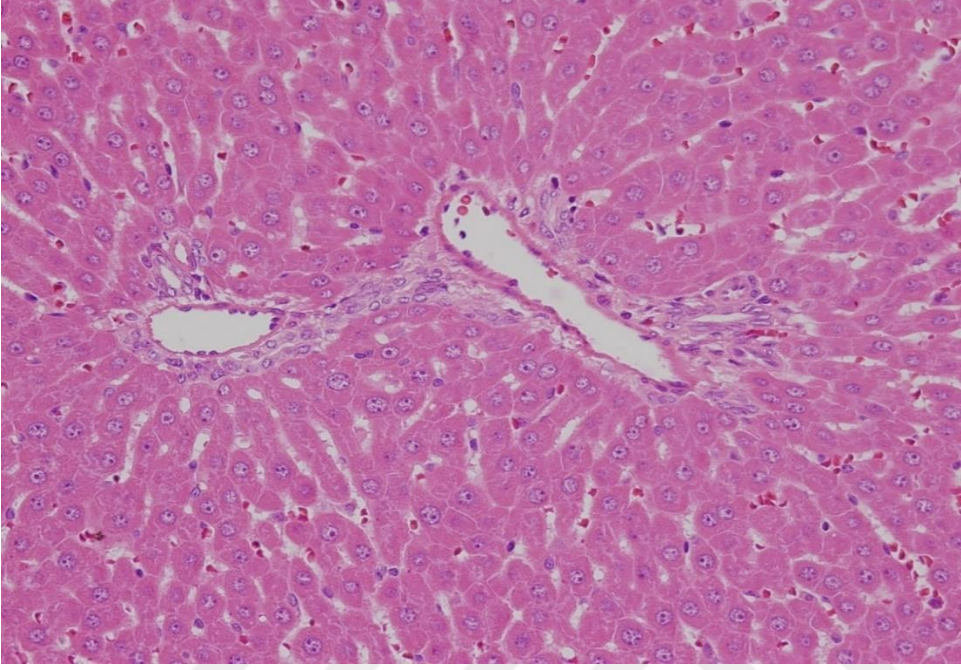
Resim 11. Metotreksat + E Vitamini Grubuna Ait Kesit (PAS X400).
(↑) Hepatosit sitoplazmalarında metotreksat grubuna göre belirgin düzelme ve hepatositlerdeki glikojen yoğunluğunda artma gözlenmekte.



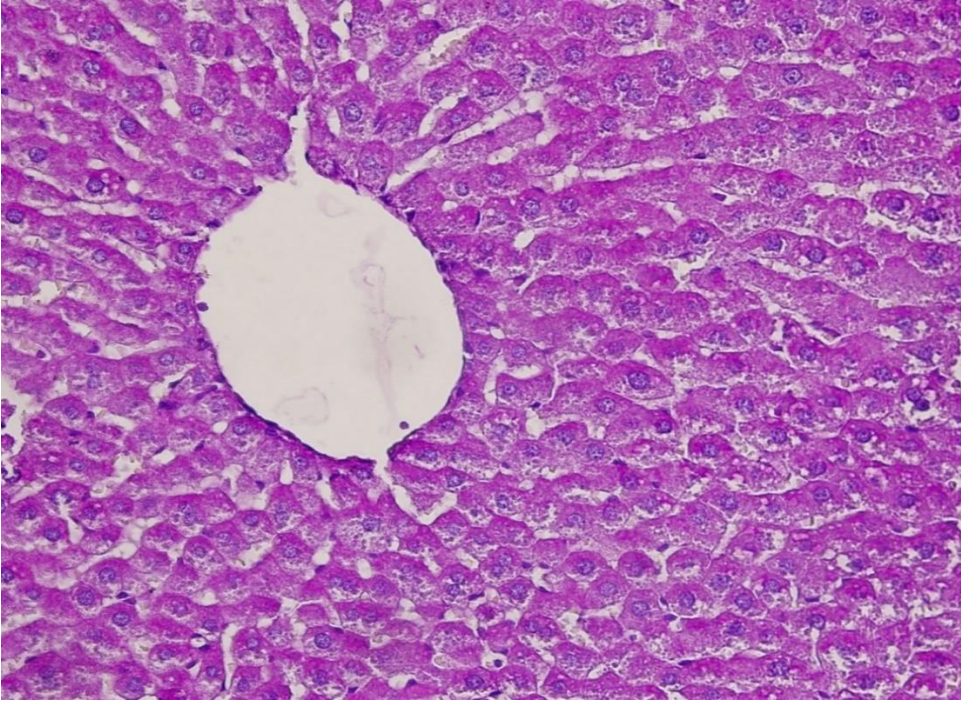
Resim 12. Metotreksat + E Vitamini Grubuna Ait Kesit (H.E. X 200). (←) Eozinofilik sitoplazmalı hepatositler gözlenmekte.



Resim 13. Metotreksat + E Vitamini Grubuna Ait Kesit (H.E X 400). (←) Fibroblast çekirdekleri, (→) Eozinofilik sitoplazmalı hepatosit gözlenmekte.



Resim 14. E Vitamini Grubuna Ait Kesit (H.E X400). Normal histolojik bulgular gözlenmekte.



Resim 15. E Vitamini Grubuna Ait Kesit (PAS X400). Normal histolojik bulgular gözlenmekte.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Metotreksat uzun yıllardır kanser kemoterapisinde, inflamatuvar, romatolojik ve otoimmün hastalıklarda kullanılmaktadır. MTX % 50' ye yakın bir oranda plazma proteinlerine ve albümine bağlanarak taşınır. (1) En yoğun olarak karaciğer ve böbrek dokularında bulunur (74).

MTX, hücre siklusunda S fazındaki hücreleri etkiler. Dihidrofolat redüktaz'a bağlanarak pürin ve primidin yapımı için gerekli tetrahidrofolat sentezini inhibe eder (28). Kronik düşük doz MTX, fibrozis ve siroz yaparken yüksek doz MTX, karaciğer fonksiyon testlerinde ani bozulmaya neden olur (75). MTX nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) seviyelerini azaltır. Özellikle NADP önemli bir antioksidan olan indirgenmiş glutatyonun (GSH) devamlılığını sağlayan glutatyon redüktaz (GSSG-R) enzimi için gerekmektedir. MTX GSH seviyesinin azalması, süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroklorik radikaller gibi reaktif oksijen radikallerine karşı hücreleri koruyan antioksidan savunma sistemlerinin etkinliğinin azalmasına neden olur. (2)

Süperoksit, serbest hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünleri, karaciğer de devamlı olarak sentezlenmekte ve yıkılmaktadır. Meydana gelen oksidatif stres, reaktif oksijen ürünleri ve çeşitli sitokinlerle birlikte; hepatositte bulunan, Kupffer ve İto hücrelerinin hasarlanmasına neden olmaktadır. Sürekli hale gelen bu etki hepatositlerin apoptoza gitmesine ve sonuçta fibrozis oluşmasına neden olabilir (76,77).

MTX daha çok karaciğerde metabolize olur ve böbrek yoluyla atılır. Alındıktan 24 saat içinde 7-OH metotreksat olarak renal filtrasyon, tübüler reabsorbsiyonla böbreklerden atılır. Az bir oranda safra yolu ile de elimine edilebilir (74,78).

MTX' in en sık görülen yan etkilerinden biriside hepatotoksisitedir. Tedavi gören hastalarda tedavi kesilmesine neden olan önemli bir yan etkidir. Hepatotoksisite alınan dozla bağlantılıdır ayrıca obezite, diabet alkol kullanımı, yaş ve geçirilmiş karaciğer hastalığına bağlı olarak değişik hasar derecelerinde ortaya çıkabilir (79). Yüksek doz MTX' in hepatotoksisiteye yol açması sık olarak gözlenir bu nedenle metotreksatla kanser tedavisi olumsuz olarak etkilenmektedir (80).

MTX' in neden hepatotoksik olduğunun mekanizması tam olarak ortaya konulmamıştır (2). Hepatotoksisite mekanizması olarak oksidatif stresin sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Literatürde daha önce yapılan çalışmalar da ; MTX'in hepatotoksisite, nefrotoksisite ve GİS toksisitesinden oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır (81,82). Biz de çalışmamızda daha önceki çalışmalarda antioksidan özelliği kanıtlanmış olan E vitamininin, MTX'in hepatotoksik etkisine karşı vereceği cevabı araştırdık.

Literatürde MTX ratlara değişik dozlarda ve uygulama yolları ile verilmiştir. Biz çalışmamızda MTX'ı intraperitoneal yolla tek seferde 20 mg/kg dozunda uyguladık (2,41,83). Şener ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MTX 20 mg/kg/i.p. tek doz olarak uygulanmış ve sonrasında beş gün süre ile L-Karnitin 500 mg/kg uygulanmış, karaciğer dokuları histolojik açıdan incelenmiştir. MTX grubunda hepatosit dejenerasyonu, sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyon, bulgularının olduğu gözlenmiştir (83). Bizde bu çalışmadaki sonuçlara benzer olarak yapmış olduğumuz çalışmada MTX grubundaki hepatositlerde dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve hepatositlerde piknotik çekirdek bulgularını bulduk.

Karaciğer, toksik maddelerin eliminasyonunda ve atılımı sırasında önemli görev alan bir organdır. MTX ve metabolitlerinin vücuttan atılımında hepatobiliyer sistem, böbrekler ile birlikte çalışır. MTX karaciğer ve böbreklerde çok birikmektedir bu sebepten dolayı, yüksek doz uygulanması hepatotoksisite ve nefrotoksisiteye neden olur (82,84)

Yapılan bir çalışmada MTX verilen sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında MDA seviyeleri artmış ve glutatyon sulfohidroksit seviyeleri azalmış olarak tespit edilmiş ve antioksidan olan melatoninin bu etkileri önlediği bulunmuştur (41). Bizde çalışmamızda metotreksatın hepatotoksitesine karşı bir antioksidan olan E vitamini kullandık. Bu çalışmadaki sonuçlara benzer şekilde E vitamini kullanımının karaciğer hasarını azalttığını gözlemledik.

Karaciğerdeki ve diğer dokulardaki meydana gelebilecek çeşitli hasarları önlemek ve etkin bir tedavi için E vitamini kullanımını içeren çok sayıda çalışma yapılmıştır (85-92). E vitamininin kuvvetli antioksidan etkisi çok uzun zamandır bilinmektedir ve bu etki çeşitli tedavi modaliteleri açısından değerlendirilmeye çalışılmaktadır (86,87,93)

E vitamini serbest radikalleri ve oksijen radikallerini nötralize ederek antioksidan etkinlik gösterir (94). E vitamini, lipit yıkım reaksiyon zincirini engeller ve serbest radikalleri durdurur. Hücre ve organellerin membran lipitleri üzerindeki bu etkisi nedeniyle membranları oksidatif hasara karşı korur. Böylece genel olarak membran stabilitesini sağlar. (94) E vitamini serbest oksijen radikallerini; hücre zarlarına, nukleik asitlere ve hücre organellerine zarar vermeden önce kendine çeker ve bağlar. Doymamış yağ asitleri ve diğer yağları içeren hücrel membranlara yerleşerek oksidatif hasarları engeller. E vitamininin eksikliğinde hücrel membranların serbest radikallerden zarar gördüğü ve hücre içine kalsiyum iyonlarının geçişinde artış olduğu belirtilmiştir (1,86,87,95).

Etanol bağımlı karaciğer hasarında serbest radikallerin reaktif oksijen türlerini artırarak ve antioksidanları azaltarak karaciğere toksik etki yaptığını ve E vitaminin de bu etkilerden karaciğeri koruduğu bulunmuştur (87).

Karaciğerdeki hasar eğer erken dönemlerinde belirlenip etkin bir tedavi geliştirilmezse, hepatosit dejenerasyonundan başlayıp fibrozis hatta siroza kadar uzanan irreversible hasarlar meydana gelmektedir (96)

Non-alkolik steatohepatit olgularında; yağlanma makroveziküler özellikte

olup, özellikle ZON 3 ve vena sentralis çevresinde olmaktadır. E vitamini tedavisinin, Non-alkolik steatohepatit olgularında fibrozis ve inflamasyonu da azalttığı bulunmuştur (97).

Alkolik karaciğer hastalığında ise MDA seviyeleri yükselirken E vitamini seviyeleri düşer. Alkolün yaptığı bu oksidan etkiye karşı tedavide antioksidan etkili E vitamini kullanımı klinik yarar sağlamıştır (98,99).

Karaciğer hasarının en ileri evrelerinden birisi olan sirozda E vitamini seviyeleri anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ve E vitamini eksikliğinin siroz etyopatogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (100-102).

Yaptığımız çalışmada sıçan ağırlıkları değerlendirildiğinde birinci ve 2. gün ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. 3. 4. ve 5. günlerde ise sıçanların ağırlıkları arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü. Karaciğer ağırlığına ait ortalama ve standart sapmalar incelendiğinde ise gruplar için karaciğer ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Çalışmamızda MTX uygulanan gruplara ait doku örneklerinde; hepatosit kordonlarının ışınsal diziliminin bozulduğu, hepatositlerin dejenere olduğu, hepatositlerdeki glikojen depolarının azaldığı, sinuzoidlerde genişleme, vasküler konjesyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu olduğu görüldü. Yine bu grupta piknotik çekirdekli hepatositler, özellikle vena sentralis çevresindeki hepatositlerde vakuol oluşumu ve hipertrofi gözlemlendi.

Yaptığımız annexin v ile flowsitometri çalışmasında kontrol grubuna ait apoptotik indeks yüzdesi %0,4 iken metotreksat verilen gruptaki apoptoz indeksi yüzdesi %34,4 olarak bulduk buda bize metotreksata bağlı olarak apoptozun önemli derecede arttığını göstermektedir. Bu bulgumuz istatistiksel olarak anlamlıdır.

MTX ile birlikte E vitamini verilen tedavi grubunda ise sinuzoidal genişleme, vasküler konjesyon ve inflamasyonu gösteren mononükleer hücre infiltrasyonunun azaldığı görülmüştür, hepatosit dejenerasyonunda belirgin

şekilde azalma ve hepatosit glikojen depolarının metotreksat grubuna göre daha fazla dolduğu tesbit edildi. Yapmış olduğumuz flowsitometrik analizde metotreksat + E vitamini grubundaki apoptotik yüzde %9,4' e düşmüştür. Apoptoz' a giden hücre yüzdesindeki bu büyük düşüşün E vitamininin antioksidan etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamıza benzer şekilde Vardı ve ark (103), deney hayvanlarına MTX uygulamış ve antioksidan olan β Karoten vermişlerdir. MTX verilen grupta karaciğerde sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve apoptotik hücreler göstermişlerdir. Tedavi gruplarında ise kontrole yakın bulguların olduğunu tesbit etmişlerdir. Doku düzeyinde MTX verilen grupta MDA değerlerinde anlamlı artış olurken tedavi gruplarında kontrole yakın MDA seviyesi olduğunu bildirmişlerdir.

Uraz ve ark. (39) yaptıkları bir çalışmada ALT, ALP ve gama glutamil transferaz (GGT) seviyelerini MTX alan grupta anlamlı şekilde yüksek saptamışlardır. Yine yapılan bir çalışmada ratlarda MTX kullanımıyla, karaciğer dokularında MDA ve MPO düzeyleri artarken, histopatolojik olarak da hasar bulgular görülmekte iken thiamin pirofosfatla bu bulgular iyileştirilmiştir (104).

Benzer şekilde yapılan bir çalışmada (105), ratlarda MTX (20 mg/ kg ip tek doz) kullanımı ile mikroskobik hasar skorlaması anlamlı derecede artarken montelukast ile gerilemiştir. Bizde yaptığımız çalışmada metotreksat verdiğimiz grupta meydana gelen hasarı E vitamini verdiğimiz grupta azaltmayı başardık. Yine yapılan bir çalışmada karaciğer dokusunda, mikroskobik düzeyde patolojik bulgular görülürken resveratrol verilerek karaciğer dokusunda biyokimyasal ve histopatolojik düzelmeye sağlanmıştır (106).

Sonuç olarak, MTX ile meydana gelen karaciğer hasarı, E vitamini ile azaltılabilir. Mevcut literatür bilgileri ve bizim çalışmamızın sonuçlarına göre, E vitamini antioksidan etkisiyle metotreksatın karaciğerde meydana getirmiş olduğu hasarı önemli derecede azaltmaktadır. Flowsitometrik olarak ölçtüğümüz apoptoz indeksi yüzdesini metotreksat grubunda %34,4 bulmuş iken E vitamini eklenmesiyle apoptoza giden hücre yüzdesi %9,4 e düşmüştür. Bu istatistiksel

olarakda anlamlı bir bulgudur. Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlardan yola çıkarak daha fazla sayıda sıçan ve parametre kullanılarak, E vitamini farklı dozlarda verilerek, yeni antioksidan çeşitleri denenerek farklı çalışmalar yapılabilir. Flowsitometri ile değişik histopatolojik yöntemleri birleştirerek yapılacak çalışmaların literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.



6. KAYNAKLAR

1- Kayaalp O (2002). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1. Cilt. 10. Baskı. Hacettepe-Taş Yayıncılık. Ankara; 397-398.

2-Çetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken BN-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. Med Sci Monit. 2006 Aug;12(8):BR274-8. Epub 2006 Jul 12.

3-Wijnands MJ¹, van Riel PL. Management of adverse effects of disease-modifying antirheumatic drugs. Drug Saf. 1995 Oct;13(4):219-27.

4-Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. Seminars in Arthritis and Rheumatism 1998; 27(5):277-292.

5-Regina Maria V. Babiak APC, Eva G. S. Carnieri And Ma. Benigna M. Oliveira. Methotrexate: Pentose Cycle And Oxidative Stres. Cell Biochem Funct. 1998; 16:283-93.,

6-Kayaalp O (2002). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1. Cilt. 10. Baskı. Hacettepe-Taş Yayıncılık. Ankara; 1484-1488.

7-Meydani M Vitamin E, Lancet, 345, 170-175,1995.

8-Kanter, M, Topçu, Y, Uygun, M., 2007, Cisplatin nefrotoksisitesinde E vitamini'nin koruyucu etkileri: ışık ve elektron mikroskopik çalışma,Tıp araştırmaları Dergisi 5(3):83-90 s.

9-G. W. Burton and K. U. Ingold Vitamin E: Application of the Principles of Physical Organic Chemistry to the Exploration of Its Structure and Function1Acc. Chem. Res. 1986, 19, 194-201.

10-Langman medical embriyoloji (2005) 9. Baskı Palme yayıncılık Ankara.

11-Stephen A. Duncan Transcriptional regulation of liver development Developmental Dynamics 219:131–142(2000).

12-Costa RH, Grayson DR, Darnell JJ. 1989. Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and α 1-antitrypsin genes. Mol Cell Biol 9: 1415–1425.

13-Lai E, Prezioso VR, Smith E, Litvin O, Costa RH, Darnell JE Jr. 1990. HNF-3 α , a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev* 4: 1427–1436.

14-Luiz Carlos Junqueira, MD, PhD Jose Carneiro, MD, PhD Temel histoloji Nobel tıp kitabevi Çeviri Editörleri: Prof. Dr. Yener Aytekin, Doç. Dr. Seyhun Solakoğlu (2006) 332-347.

15-Ross Michael H, Pawlina W. Histoloji konu anlatımı ve atlas: Lippincott Williams & Wilkins; palme yayıncılık 6. Baskıdan çeviri Ankara 2014 628-647.

16-Dökmeci İ (2000). Farmakoloji Temel Kavramlar. Nobel Tıp Kitapevleri, 975-991.

17-Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum*. 1998 Apr;27(5):277-292.

18-Bertino JR. Karnofsky memorial lecture. Ode to methotrexate. *J Clin Oncol*. 1993 Jan;11(1):5-14

19-Osborne MJ, Freeman M, Huennekens FM: Inhibition of dihydrofolic reductase by aminopterin and amethopterin. *Proc Soc Exp Biol Med* 97:429-431, 1958.

20-Mycek MJ, Harvey R.A., Champe P.C. (1997) Anti Metabolitler, In: Berkman K., Oktay Ş., Onat F., Gören Z. (eds) Lippincott's Illustrated Review Serisinden: Farmakoloji, 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

21-Samireh Said, Edward MB, Jeffes Phd, Gerald D, Weinstein MD Methotrexate Clinics in Dermatology Volume 15, Issue 5, September–October 1997, Pages 781-797.

22-Goodman and Gillman. The Pharmacological Basis of Therapeutics Laurence L. Bruton (editör), John. S. Lazo, Keith L. Parker (editör Yardımcıları), McGraw-Hill. Tedavinin Farmakolojik Temeli. Çeviri editörü Süzer Ö. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2009; 1315-1405.

23-Quinn CT, Kamen BA. A biochemical perspective of methotrexate neurotoxicity with insight on nonfolate rescue modalities. *J Invest Med* 1996; 44:522-30.

24-Adamson PC, Bagatell R, Balis FM, Blaney SM. General principles of chemotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG, Eds. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 6th Ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011:279-352.

- 25-Salmon SE, Sartorelli AC. Cancer chemotherapy. In: Katzung BG, Ed. *Basic & Clinical Pharmacology*. 7th Ed., Stamford, Connecticut: A Simon & Schuster Company, 1998: 881-915.
- 26-P.D. Cole, A.K. Smith, B.A. Kamen, Osteosarcoma cells, resistant to methotrexate due to nucleoside and nucleobase salvage, are sensitive to nucleoside analogs, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 50 (2002) 111–116.
- 27-M. Serra, G. Reverter-Branchat, D. Maurici, S. Benini, J.N. Shen, T. Chano, et al., Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells, *Ann. Oncol.* 15 (2004) 151–160.
- 28-Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, Drake JC, Jolivet J. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* 1985; 76(3):907-12.
- 29-Takimoto CH. New Antifolates: Pharmacology and Clinical Applications. *Oncologist* 1996; 1(1 & 2):68-81.
- 30-Yoon SA, Choi JR, Kim JO, Shin JY, Zhang X, Kang JH. Influence of reduced folate carrier and dihydrofolate reductase genes on methotrexate-induced cytotoxicity. *Cancer Res Treat* 2010; 42(3):163-171.
- 31-Del Pozo J, Martinez W, Garcia-Silva J, Almagro M, Pena-Penabad C, Fonseca E (2001). Cutaneous ulceration as a sign of methotrexate toxicity. *Eur J Dermatol*, 11 (5): 450-452.
- 32-Armagan A, Uzar E, Uz E, et al (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum Exp Toxicol* 27: 547–552.
- 33-Sussman A, Leonard JM (1980). Psoriasis, methotrexate and oligospermia. *Arch Dermatol* 116: 215–217. 44 Morris LF, Harrod MJ, Menter MA, et al (1993).
- 34-Uraz S., Tahan V., Aygun C., ve ark. (2007) Role of ursedeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver Toxicity. *Dig Dis Sci* DOI 10.1007/s10620- 007-9949-3.
- 35-Şendur N., Karaman G., Şavk H., ve ark. (2002) Akut Metotreksat Toksisitesinin Erken Belirtisi; Deri Ülserleri. *T Klin Tıp Bilimleri* 22, 593-596.

- 36-Goto E., Tomojiri S., Okamoto I. (2001) Methotrexate poisoning with acute hepatorenal dysfunction. *Clinical Toxicology* 39, 101-104.
- 37-Olson J. (2000) *Klinik Farmakoloji*, 1.Baskı, Ankara, Hacettepe Taş Yayıncılık.
- 38-Gibson RJ, Keefe DMK, Thompson FM, Goland GJ, Cummins AG (2002). Effect of interleukin-11 on ameliorating intestinal damage after methotrexate treatment of breast cancer in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 47: 2751-2757.
- 39-Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M, Senturk O, Avsar E, Haklar G, Celikel C, Hulagu S, Tozun N. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate induced liver toxicity. *Dig Dis Sci* 2008; 53(4):1071-1077.
- 40-Kamen BA, Nysten PA, Camitta BM, Bertino JR. Methotrexate accumulation and folate depletion in cells as a possible mechanism of chronic toxicity to the drug. *British journal of haematology*. 1981 Nov.
- 41-Jahovic N, Çevik H, Şehirli AO, Yeğen BC, Şener G. Melatonin prevents methotrexate induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res*. 2003 May; 34(4): 282-287.
- 42-Evans, H.M., Bioshop, K.S., On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction, *Science*. 1922 Dec 8;56(1458):650-1.
- 43-Marcus R, Coulston AM. Vitamins in; Gilman AG (ed). *Goodman and Gilman's. The pharmacological Companies* 1996; 1585-1590.
- 44-Bjorneboe, A., Bjorneboe, G.E., Drevon, C.A., 1990, Absorption, transport and distribution of vitamin E, *J Nutr*, 120, 3, 233-42 p.
- 45-ZINGG, J.M., 2007, Vitamin E: an overview of major research directions, *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 400-422.
- 46-Constantinou, C., Papas, A., Constantinou, A.I., 2008, Vitamin E and cancer: an insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs, *International Journal of Cancer*, 123, 739-752.
- 47-Frank J. Beyond vitamin E supplementation: an alternative strategy to improve vitamin E status. *J Plant Physiol*. 2005;162(7):834-43.
- 48-Bertino JR (1992). *Text Book of Pharmacology*. Ed: Smith CM, Reynard AM, Saunders Company, 941-964.

- 49-Azzi. A., Stocker, A. "Vitamin E: non-antioxidant roles" *Prog. Lipid. Res.*, 39, 232-255 (2002).
- 50-Kalaycıoğlu L (2006). *Biyokimya. Üçüncü Baskı*. Nobel Yayınevi, Ankara, 684.
- 51-Cummings M C, Winterfold C M, Walker N I (1997): Apoptosis. *Am. J. Surg. Pathol.*, 21: 88-101.
- 52-Pınarbaşı E (2007): Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü) (in) *Moleküler Biyoloji*. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör), 423-468, Nobel Yayın, Ankara.
- 53-Bellamy C O, Malcomson, R D, Harrison, D J, Wyllie A H (1995): Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology*, 6: 3-16.
- 54-Özay Güleş Ülker Eren Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2008 (2) 73-78 ISSN 1017-8422; e-ISSN: 1308-3651.
- 55-Majno G, Joris I (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146: 3-15.
- 56-Elmore S (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 35(4): 495–516.
- 57-Cohen J J (1993): Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *American College of Physicians, CHEST*, 103: 99-101.
- 58-Öniz H (2004): Apoptoz: Ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi*, 14(1).
- 59-Trump B F, Berezesky I K, Chang S H, Phelps P C (1997): The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol. Pathol.*, 25: 82–8.
- 60-Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C. (1998): Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3: 115.
- 61-Kockx M M, Muhring J, Knaapen M W M, de Meyer G R Y (1998): RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 152: 885.

- 62-Bratton D L, Fadok V A, Richter D A, Kailey J M, Guthrie L A, Henson P M (1997): Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flipflop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.*, 272: 26159–26165.
- 63-Kopman G, Reutelingsperger C P, Kuijten G A, Keehnen R M, Pals S T, van Oers N H (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.*, 84: 1415–1420.
- 64-Zhang G, Gurtu V, Kain S R, Yan G (1997): Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechniques*, 23: 525–531.
- 65-Coulter WH: High speed automatic blood cell counter and cell analyser Proc. Nat Electron Conf 12: 1034, 1956.
- 66-Wheless LL, Patten SF: Definition of variable cellular parameters with a slit-scan optical system. *Acta Cytol* 15: 111, 1971.
- 67-Koss LG: Flow Cytometry. in *Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, Koss LG(ed), Vol. 2, 4th edition Philadelphia. JB Lippincott Company, 1992, pp. 1613-1657.49(3):355-60.
- 68-Riley SR, Mahin EJ: Flow cytometry. Clinical applications. ASCP National Meeting Fall. Washington DC, 3-15, 1989.
- 69-Coon JS, Landay AL, Weinstein RS: Biology of disease. Advanced in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest* 57: 453, 1987.
- 70-Rahman M. Introduction to flow cytometry. Serotec Ltd. Oxford (UK): Published by Serotec Ltd; 2006.
- 71- Bancroft JD, Cook HC. Manual of Histological Technics and Their Diagnostic Application, Churchill Livingstone, Edingburg, 1994.
- 72-Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW: Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 6: 327, 1985.
- 73-A. Abdel-wahhab, s. A. Nada and m. S. Arbid, Ochratoxicosis: Prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats m. *Journal of applied toxicology*, *J. Appl. Toxicol.* 19, 7–12 (1999).

- 74-Camisa C. Psoriasis. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1994; s. 285-300.
- 75-Şahan C, Öztürk M, eds. Kanser Kemoterapisi ve Karaciğer, Vols. 2003; 20: 47-60.
- 76-Cassiman D, Deneff C, Desmet VJ, Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 2001; 33: 148-158.
- 77-De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology* 2006; 131: 272-275.
- 78-Gibson LE, Perry HO. Papulosquamous eruptions and exfoliative dermatitis. In: Moschella SL, Hurley HJ, eds. *Dermatology* (3rd edition). Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992:607-622.
- 79-Tekin NS. Metotreksat ile tedavi edilen psöriasis vulgarisli hastaların tedavi öncesi ve sonrası nitrik oksit düzeylerinin karşılaştırılması. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. Ankara, 2000.
- 80-Al-Ali SY, Hassan IM, Sadek S. Ultrastructural changes in rat livers perfused in vitro and in vivo with a high dose of methotrexate. *Histol Histopathol*, 2005; 20: 1131-1145.
- 81-Devrim E, Çetin R, Kılıçoğlu B, Ergüder BI, Avcı A, Durak I. Methotrexate Causes Oxidative Stress in Rat Kidney Tissues. *Renal Failure*, 2005; 27: 771- 773
- 82-Uz E, Öktem F, Yılmaz HR, Uzar E, Özgüner F. The activities of purine catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem*. 2005 Sep;277(1- 2): 165-170.
- 83-Şener G, Ekşioğlu- Demiralp E, Çetiner M. ve ark. L-Carnitine Ameliorates Methotrexate-Induced Oxidative Organ Injury and Inhibits Leukocyte Death. *Cell Biology and Toxicology*, 2006; 22: 47-60.
- 84-Süzer Ö. Karaciğer Hastalıklarında İlaç Kullanımı ve Hepatotoksik Etkileri. Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi 2002, 28: 37-42.
- 85-Kozampassi, K., Paramythiotis, D., Tsiakitzis, D., et all: The Impact Of α -Tocopherol On Radiation-Induced Liver Injury. *Nutrition Research*.2003; 23: 103-109.

- 86-Harrison, SA., Torgerson, S., Hayashi, P., et al: Vitamin E And Vitamin C Treatment Improves Fibrosis In Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *The American Journal of Gastroenterology*. Vol. 98, No.11:2003.
- 87-Jordao Jr, AA., Chiarello, PG., Arantes, MR., et al: Effect Of An Acute Dose Of Ethanol On Lipid Peroxidation In Rats: Action Of Vitamin E. *Food and chemical toxicology*.2004; 42: 459-464.
- 88-Sigounas, G., Anagnostou, A., Steiner, M.: D α -Tocopherol Induces Apoptosis In Erythroleukemia, Prostate, And Breast Cancer Cells.*Nutr Cancer*. 1997; 28: 30-5.
- 89-Karlsson, J., Ranneberg, R., Semb, B.: Vitamins Q And E, Extracorporeal Circulation And Hemolysis. *Mol Cell Biochem*.1997; 173 (1,2): 33-41.
- 90-Fox, ES., Brower, JS., Belezso, JM., et al: N-Acetylcysteine And Alpha-Tocopherol Reverse The Inflammatory Response In Activated Rat Kupffer Cells. *J. Immunol*. 1997; 1: 5418-23.
- 91-Thiele, J., Traber, MG., Tsang, K.: In Vivo Exposure To Ozone Depletes Vitamins C And E And Induces Lipid Peroxidation In Epidermal Layers Of Skin.*Free Radic Biol Med*.1997; 23: 385-91.
- 92-Steiner, M.: Vitamin E: More Than Antioxidant.*Clin Cardiol*. 1993; 16: 16-8.
- 93-Bartels, M., Hans, K., Biesalski., et al: Pilot Study On The Effect Of Parenteral Vitamin E On Ischemia And Reperfusion Induced Liver Injury: A Double Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Clinical Nutrition*.2004; 23: 1360–1370.
- 94-C. Y. Chang, C. K. Argo, A. M. Al-Osaimi and S. H. Caldwell, “Therapy of NAFLD: Antioxidants and Cytoprotective Agents,” *Journal of Clinical Gastroenterology*, Vol. 40, Suppl. 1, 2006, pp. S51-S60.
- 95-Comporti, M: Biology Of Disease Lipit Peroxidation And Cellular Damage InToxic Liver Injury. *Lab. Invest*.1985; 53: 599-623.
- 96-C.P. Day Pathogenesis of Steatohepatitis,” *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 16, No.5,2002, pp. 663-678. <http://dx.doi.org/10.1053/bega.2002.0333>
- 97-T. Hasegawa, M. Yoneda, K. Nakamura, I. Makino and A. Terano, “Plasma Transforming Growth Factor-Beta1 Level and Efficacy of Alpha-Tocopherol in

Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Pilot Study,” *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, Vol. 15, No. 10, 2001, pp. 1667-1672.

98-Kathleen, H., McDonough.: *Antioxidant Nutrients And Alcohol. Toxicology.* 2003;189: 89-97.

99-Pintu, D., Masalkar, Subodhini, AA.: *Oxidative Stress And Antioxidant Status In Patients With Alcoholic Liver Disease. Clinica Chimica Acta.* 2005; 355:61–65.

100-Look, MP., Reichel, C., Falkenhausen, MV., et al: *Vitamin E Status In Patients With Liver Cirrhosis: Normal or Deficient. Metabolism*, Vol 48, No: 1 (January). 1999: 86-91.

101-Bell, H., Bjorneboe, A., Eidsvoll, B., et al: *Reduced Concentration Of α Tocopherol In Patients With Alcoholic Liver Cirrhosis. Alcohol & Alcoholism.*1992; 27: 39-46.

102-Munoz, SJ., Heubi, JE., Balistreri, WF., et al: *Vitamin E Deficiency In Primary Biliary Cirrhosis: Gastrointestinal Malabsorption, Frequency And Relationship To Other Lipit-Soluble Vitamins. Hepatology.*1989; 9: 525-531.

103-Vardi N, Parlakpinar H, Cetin A, Erdogan A, Cetin Ozturk I. *Protective effect of beta-carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. Toxicol Pathol* 2010; 38: 592-597.

104-Demiryilmaz I, Sener E, Cetin N, Altuner D, Suleyman B, Albayrak F, et al. *Biochemically and histopathologically comparative review of thiamine's and thiamine pyrophosphate's oxidative stress effects generated with methotrexate in rat liver. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research.* 2012 Dec;18(12):BR475-81.

105-Kose E, Sapmaz HI, Sarihan E, Vardi N, Turkoz Y, Ekinci N. *Beneficial effects of montelukast against methotrexate-induced liver toxicity: a biochemical and histological study. The Scientific World Journal.* 2012; 2012:987508.

106-Tunali-Akbay T, Sehirli O, Ercan F, Sener G. *Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques.* 2010;13(2):303-10.

