



T. C
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı

**RATLARDA, KARADUT MEYVE (MORUS NİGRA)
EXTRESİNİN, METOTREKSAT İLİŞKİLİ İNTESTİNAL HASAR
ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Anna Carina ERGANİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ayşen TÜREDİ YILDIRIM

Manisa, 2018

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimini benimle paylaşan ve bana yol gösteren başta Ana Bilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Muzaffer POLAT'a ve tüm değerli hocalarıma,

Bilimsel bir çalışmanın içinde yer almamı sağlayan ve tezimin planlanması, araştırılması ve yürütülmesinde bana yol gösteren, benden anlayışı ve sabrını esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Ayşen TÜREDİ YILDIRIM' a,

Çalışmanın yürütülmesinde emeği geçen değerli hocalarım Prof.Dr. Seda VATANSEVER ve Prof.Dr. Fatma TANELİ'ye ,

Değerli histoloji yüksek lisans öğrencisi Fatma FIRAT' a ve biyokimya asistanı Dr.İsmail TAŞTAN' a, hemşire Esin ERCAN DEMİREL'e.,

Morus Nigra ekstraktı'nın hazırlanmasında bana yardımcı olan Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Hüsniye Kayalar'a ,

Morus nigra (kara dut)'yı elde etmemizi sağlayan Ege Döhler Gıda San.A.Ş firmasından Gülayfer SÖĞÜT Hanıma ,

Tüm meslek arkadaşlarıma, sevgilerini ve desteklerini daima yanımda hissettiğim sevgili babam ve kardeşlerime,

Uzmanlık eğitimim boyunca bana güvenen sevgisiyle destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan eşim Dr.Batuhan ERGANİ'ye ve güldüğünde bana tüm yorgunluğumu unutturan sevgili kızım Aslıhan Laura ERGANİ ye

Teşekkür ederim...

Dr.Anna Carina ERGANİ

2018, MANİSA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL DİZİNİ

RESİM DİZİNİ

TABLolar DİZİNİ

KISALTMA VE SEMBOLLER DİZİNİ

I.GİRİŞ VE AMAÇ	1
II.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Metotreksat	3
2.1.1. Metotreksatın metabolizması	4
2.1.2. İlaç Direnci	6
2.1.3. Metotreksatın dağılımı	7
2.1.4.Endikasyonları	7
2.1.5. İlaç Etkileşimleri	8
2.1.6. Toksikitesi ve Oksidatif stres	8
2.1.6.1. Kemik iliği baskılanması	8
2.1.6.2. Sindirim sistemi hasarı	8
2.1.6.3. Hepatotoksisite	9
2.1.6.4. Akciğer hasarı	9
2.1.6.5. Üriner sistem hasarı	9
2.1.6.6. Oküler hasar	9
2.1.6.7. Nörolojik hasar	10
2.1.6.8. İskelet ve kas sistemi hasarı	10
2.1.6.9. Üreme sistemi hasarı	10
2.1.6.10. Cilt hasarı	10
2.1.6.11.Metotreksata bağlı oksidatif stres	10
2.2.Mukozit	10
2.2.1.Mukozit patofizyolojisi	11
2.2.2.Mukozitin görülme sıklığı	12
2.2.3.Mukozit gelişiminde risk faktörleri	12
2.2.3.1.Hastaya ait risk faktörleri	12
2.2.3.2.Tedaviye ait risk faktörleri	13
2.2.4. Mukozitin klinik özellikleri	14
2.2.5.Mukozitin evreleri	16
2.2.5.1.Başlangıç (enflamatuar/epitelyal) fazı:	16
2.2.5.2.Sinyal çoğalma evresi	17

2.2.5.3.Amplifikasyon	17
2.2.5.4.Ülseratif faz:	18
2.2.5.5.İyileşme fazı:	18
2.2.6.Mukozitin derecelendirilmesi ve sonuçları	19
2.2.7.Mukozitin komplikasyonları	20
2.2.8.İdeal mukozit yönetimi	20
2.2.8.1. Tedavi Öncesi Ağız ve Diş Bakımı, Profilaktik ağız bakımı:	21
2.2.8.2.Önleyici Yaklaşım:	21
2.2.8.3.Oral Mukozitte Önlem ve Tedavi	22
2.3.Morus Nigra (Kara dut)	23
2.3.1. Dutlar ve Özellikleri:	23
2.3.2.Fenolik Bileşikler ve Sınıflandırılmaları	24
2.3.3.Dutların Biyoaktif Bileşenleri	25
2.3.3.1.Vitaminler	25
2.3.3.2.Mineraler	26
2.3.3.3.Antosiyaninler	26
2.3.4.Dutların Sağlık Yararları	26
2.3.5.Antioksidan Özellikleri	27
2.3.6.Antikanser Özellikleri	27
2.3.7.Antimutajenik Özellikleri	27
2.3.8.Morus nigranın diğer sistemler üzerine etkisi	28
2.4.Serbest Radikaller	28
2.4.1.Serbest Radikallerin Hücreler Üzerine Etkileri	29
2.4.2.Serbest radikallerin organizmaya etkileri:	30
2.4.2.1.Membran Lipitleri Üzerine Etkileri	30
2.4.2.2.Karbonhidratlara etkileri	31
2.4.2.3.Proteinlere etkileri	31
2.4.2.4.Nükleik asitlere etkileri	31
2.4.3.Antioksidan Savunma Sistemleri	32
2.4.4.Total Oksidatif Durum (Stres)	33
2.4.5.Total antioksidan Durum (Stres)	33
2.4.6.Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	34
III.GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1.Parafin doku takibi	36
3.2.Histokimyasal boyama	37
3.2.1.Doku immunohistokimya boyaması	38
3.3.Biyokimyasal analizler	40
3.4.Morus Nigra'nın elde edilişi	40

3.5.İstatistiksel yöntemler	40
IV.BULGULAR	42
4.1.Makroskobik bulgular	42
4.2.Histokimyasal bulgular(H-E)	44
4.2.1.Işık mikroskobik bulgular	44
4.3.İmmunohistokimyasal Bulgular	45
4.3.1.IL-1 immunoreaktivitesi	49
4.3.2.Kİ-67 immunorekativitesi	52
4.3.3.TNF-alfa immunoreaktivitesi	54
4.3.4.MDA immunoreaktivitesi	57
4.3.5.MPO immunoreaktivitesi	60
4.4.Biyokimyasal Bulgular	64
4.4.1.Biyokimyasal İstatistik	64
V. TARTIŞMA	66
VI.SONUÇLAR	73
VII.ÖZET	75
VIII.ABSTRACT	76
IX.KAYNAKLAR	77

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Metotreksatın yapısal formülü

Şekil 2: Folik asit yapısal formülü

Şekil 3: Total antioksidan durumunun 6.günde gruplar arası dağılımı

RESİM DİZİNİ

Resim 1: DHFR'nin bağlanma bölgesi (Yeşil renk ile gösterilen MTX mavi renk ile gösterilen DHFR'nin aktif bölgelerine bağlanır)

Resim 2: Mukozit başlangıcı ve hasara yanıt mesajı oluşturma evreleri

Resim 3: Haberci sinyallerin çoğalması

Resim 4: Ülserleşme

Resim 5: Karadut meyvesi

Resim 6: Rad'ların dekapitasyon sonrası intestinal dokuların çıkarılması ve kan örneği alınması

Resim 7: Radların bağırsak uzunluklarının makroskopik görünümü

Resim 8: IL-1'in 4.gün immünohistokimyasal görüntüleri

Resim 9: IL-1'in 6.gün immünohistokimyasal görüntüleri

Resim 10: Ki-67 nin 4.gün immünohistokimyasal görüntüleri

Resim 11: Ki-67 nin 6.gün immünohistokimyasal görüntüleri

Resim 12: TNF-alfa nın 4.gün immünohistokimyasal görüntüleri

Resim 13: TNF-alfa nın 6.gün immünohistokimyasal görüntüleri

Resim 14: MDA nın 4.gün immünohistokimyasal görüntüleri

Resim 15: MDA nın 6.gün immünohistokimyasal görüntüleri

Resim 16: MPO nun 4.gün immünohistokimyasal görüntüleri

Resim 17: MPO nun 6.gün immünohistokimyasal görüntüleri

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Türkiye’de 1-14 yaş grubu çocuklarda ölüm nedenleri

Tablo 2: Mukozite neden olan kemoterapotik ajanlar

Tablo 3: NCI -CTCAE v4. 03 Toksikite Kriterleri Oral Mukozitlerin Sınıflandırılması

Tablo 4: Deney gruplarının oluşturulma biçimi

Tablo 5:Doku takibi protokolü.

Tablo 6: Hematoksilen- eozin boyama protokolü

Tablo 7: Doku İmmunohistokimyası boyama protokolü

Tablo 8: 1.2.3.ve 4. Gruplarında bulunan 3’er adet rad’ın dördüncü ve altıncı gün bağırsak uzunlukları

Tablo 9: Duodenumun her bir grupta bulunan deneklerden yapılan boyanmaların ortalamaları

Tablo 10: Jejenumun her bir grupta bulunan deneklerden yapılan boyanmaların ortalamaları

Tablo 11: İleumun her bir grupta bulunan deneklerden yapılan boyanmaların ortalamaları

Tablo 12: Total antioksidan durum, TAS ve OSİ değerlerinin istatistiksel verileri

KISALTMA VE SEMBOLLER DİZİNİ

ALT	alanin aminotransferaz
AST	aspartat aminotransferaz
ALL	akut lenfoblastik lösemi
AML	akut miyeloid lösemi
ATP	adenozin trifosfat
AVI	antosiyanik vakuoler inklüzyonlar
CAT	katalaz
CSFs	hematopoetik koloni uyarıcı faktörlerin
DHF	dihidrofolat
DHFR	dihidrofolat redüktaz
DNA	deoksiribonükleik asit
EGF- β	epidermal Growth Faktör Beta
GSH	glutasyon
GPx	glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	hidrojen peroksit
JRA	jüvenil romatoid artrit için
IL	interlökin
IFN- α	interferon alfa
INF- γ	interferon gama
KT	kemoterapi
LDL	lipopolisakkarit
LPO	lipitlerinin peroksidasyonu
MAPKA	mitojen etkinleştirilmiş protein kinaz
MDA	malondialdehit
MTHF	metilen tetrahidrofolat
MTHFR	metilen tetra hidro folat redüktaz
MPO	myeloperoksidaz
MTX	metotreksat
NF- κ B	nuclear Factor kappa B
NHL	nonhodgin lenfoma
NO	nitrik oksit

NRF-2	nuclear Respiratory Factor 2
O ₂	süperoksit anyonları
OH	hidroksil serbest radikali
OSİ	oksidatif stres indeksi
PUFA	poliansature yağ asitlerinde
RNA	ribonükleik asit
ROS	reaktif oksijen türleri
RT	radyoterapi
SOD	süperoksid dismutaz
SOR	serbest oksijen radikalleri
SF	serum fizyolojik
TAS	total antioksidan durum
TOS	total oksidan durum
THF	tetrahidrofolat
TOS	total antioksidan stres
TGF- α	transforming growth faktör-alfa
5-FU	5-flourasil
WHO	World Health Organisation
XO	xsantin oksidaz

I.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, çocuklarda Amerika Birleşik Devletleri ve birçok gelişmiş ülkede ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alır fakat bizim ülkemizde ölüm nedenleri arasında 3.sırada yer almaktadır (Tablo1). Çocuklarda çok daha nadir olup, tüm kanserlerin %0.5'i 15 yaşından küçük çocuklarda görülmektedir. Onbeş yaş altında çocuklarda sıklığı milyonda 110-150 arasındadır (1-4). Dünyada şu an yaklaşık olarak 25 milyon kanserli olgu olduğu bilinmekte ve her yıl 12.7 milyon kişi kansere yakalanmaktadır. Olguların %56'sı gelişmekte olan ülkelerdedir (6).

Tablo1: Türkiye'de 1-14 yaş grubu çocuklarda ölüm nedenleri (2008)(5)

Ölüm nedeni	Toplam (%)
Kalp Hastalıkları	30.1
Enfeksiyon Hastalıkları	13.5
Kanser	6.7
Kazalar	6.0
Serebrovasküler Hastalıklar	3.9
Diğerleri	39.7

Akut lenfoblastik lösemi,beyin tümörleri, lenfomalar, yumuşak doku ve kemik sarkomları en sık çocuklarda ve ergenlerde görülen kanser türlerindedir. Çocuklarda kanser sıklığı erken çocukluk ve ergenlik yaş grubunda artış göstermektedir. İlk yıllarda en sık embriyonel tümörlerden olan nöroblastom, wilms tümörü, retinoblastom, rabdomiyosarkom, medulloblastom gibi tümörler görülmektedir. İki ile beş yaşlar arasında bu embriyonel tümörlere ek olarak akut lösemiler, hodgkin dışı lenfomalar ve gliomlar sık görülmeye başlamaktadır. Ergenlik dönemi ve sonrasında ise kemik maligniteleri, hodgkin lenfoma, gonadal germ hücreli tümörler, tiroid kanserleri ve malign melanom gibi karsinom türleri daha sık görülmektedir.

Çocukluk çağında kanserlerin büyük bir çoğunluğu uzun yaşam beklentileri nedeniyle yüksek doz ve yoğun kemoterapi (KT) protokolleri uygulanarak tedavi edilebilmektedir. Gözlemlenen yan etkilerin çoğu, antineoplastik ajanların hücre döngüsünün çeşitli basamaklarına etki ettikleri için hızlı hücre döngüsü olan kemik iliği, oral ve intestinal mukoza, epidermis, karaciğer gibi doku ve organlar üzerine olduğu görülmektedir. Kemoterapi ve radyoterapi (RT) hastaların hayat kalitelerini

arttırmak amacıyla kullanılmakta fakat bir çok yan etkiye sahiptirler. Tedaviye bağlı gelişen yan etkiler hastalarda morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır. Tedavi sırasında gelişen önemli yan etkilerden olan nötropeni ve bulantı nispeten kontrol altına alınabiliyor iken mukozit halen tedavide doz kısıtlayıcı neden olmaya devam etmektedir. Kemoterapive RT sonucu her yıl ortalama olarak 400.000 yeni oral kavite hasarı saptanılmaktadır (7). Mukozit tedavisinde birçok ajan kullanılmakta fakat günümüzde hala sınırlı etkilere sahiptirler. Bu nedenle gerek hayvan çalışmalarını gerekse klinik çalışmalarla mukozitin önlenmesi ve tedavisi amacıyla birçok ajan araştırılmaktadır.

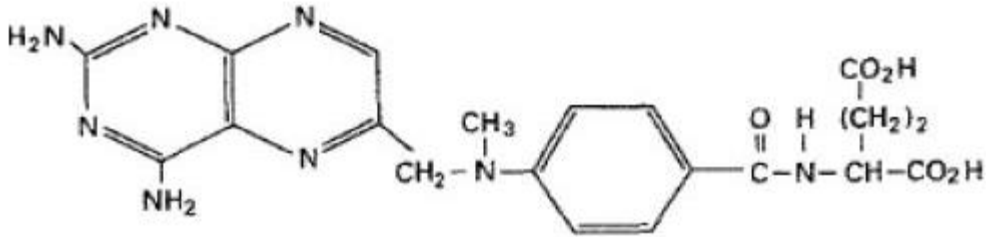


II.GENEL BİLGİLER

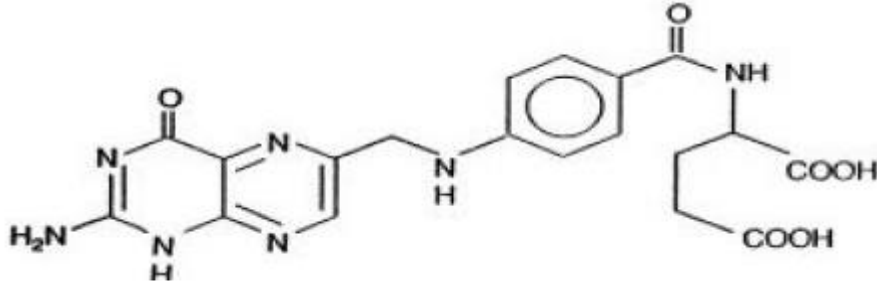
2.1. Metotreksat

Metotreksat folik asite benzeyen folik asit antimetaboliti bir antineoplastik ilaçtır. Kliniklerde sık olarak kullanılmaktadır. Bir folik asit analogudur,metotreksat dihidrofolat redüktaza bağlanarak timidilat, pürin sentezini ve hücre proliferasyonu azaltır (8). 5-aminoimidazole, 4-carboxamide ribonükleotide transformilaz gibi folat bağımlı diğer enzimleri de inhibe ederek, adenozin birikimi ile lenfosit proliferasyonu, interlökin (IL-1), interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekrozu faktörü- α (TNF- α) gibi enflamatuvar sitokinlerin salınımını ve polimorfonükleer hücrelerden serbest radikal oluşumu salınımını artırır ve bu hücrelerin adezyonunu ve nötrofil kemotaksisini baskılayarak anti-enflamatuvar etki oluşturur (9). Metotreksat gibi antimetabolitler,sıklıkla çoğalma hızı yüksek tümörlere etki etmektedir. En önemli yan etkileri kemik iliği ve bağırsak mukozası epiteli üzerindedir. Tüm prenatal dönemlerde fetüse zarar verebilirler(10). 5-Flourasil (5-FU), metotreksat (MTX), sitarabin, merkaptopürin antimetabolit ilaçlardandır.

İlk defa Farber ve arkadaşları tarafından folik asit antagonistlerinin 1948'de tanımlanmasıyla kanser KT'sinde yeni bir dönem açıldı. Klinikte birçok folat analogu kullanılmasına rağmen içlerinden en yaygın MTX kullanılmaktadır (11).



Şekil 1: Metotreksatın yapısal formülü (12)

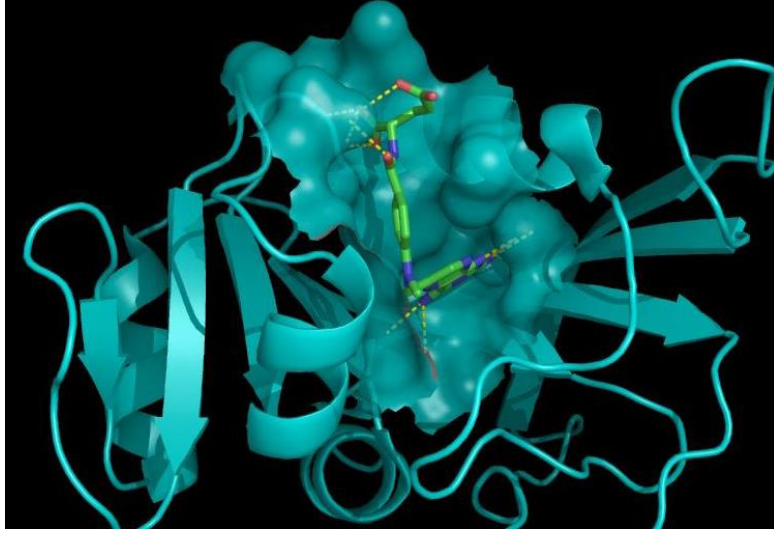


Şekil 2: Folik asit yapısal formülü (13)

Metotreksat, kimyasal olarak folik asitin 4-amino, N¹⁰-metil analogudur. Kimyasal MTX N-[4-[[2,4-diamino-6-pteridinil)metilamino] benzoil]-L-glutamik asittir.

2.1.1. Metotreksatın metabolizması

Folik aside bağlı enzimler tek karbon fragmanların transferini içeren reaksiyonlarda gereklidir. Bunlar arasında en önemlisi DNA (deoksiribonükleik asit) sentezi için deoksiüridilatın metilasyonu ile timidilat elde edilmesidir. Bu işlem sırasında metilen tetrahidrofolat (MTHF) dihidrofolata (DHF) dönüşür. Dihidrofolatın ise tekrar kullanılması için tetrahidrofolata (THF) dönüşmesi gereklidir. Bu dönüşüm için dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine ve NADPH'a gereksinim vardır. Tetrahidrofolat DNA ve ribonükleik asit (RNA) sentezi için gerekli olan pürin ve pirimidin nükleotidlerinin sentezinin önemli bir komponenti olan timidilatın üretiminde rol oynar (14). Bu nedenle MTX THF eksikliğine yol açarak pürin, pirimidin metabolizması ve DNA sentezini içeren pek çok metabolik yolu etkiler (11). Metotreksatın moleküler yapısı DHF'ye benzer (Şekil 1 ve 2), metotreksatın yapısında birden fazla metil grubu vardır ve DHF'deki hidroksil (OH) grubu yerine NH₂ bulunur. Metotreksat, DHF'yi THF'ye çeviren DHFR'ı inhibe eder (Resim 1)(15).



Resim 1: DHFR'nin bağlanma bölgesi (Yeşil renk ile gösterilen MTX mavi renk ile gösterilen DHFR'nin aktif bölgelerine bağlanır)

Metotreksatın sitotoksik etkisini gösterebilmesi için folilpoliglutamata sentaz enzimi tarafından poliglutamasyona uğratılması gerekmektedir. Poliglutamasyon işlemi karaciğer, kemik iliği, fibroblast ve eritrosit gibi normal dokularda hemde malign dokularda yapılmaktadır. Metotreksat poliglutamalarının hücre dışına atılımları zor olmaktadır bu nedenle hücre içinde daha uzun süre kalır, poliglutamata bir tür depo formudur. Böylece metotreksat, folat metabolizmasını etkileyen enzimler üzerinde artmış baskılayıcı etki gösterir (15).

Metotreksat poliglutamaları 5,10 metilen tetrahidrofolat(16) redüktaz, glisinamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz ve aminoimidazolkarboksamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz enzimlerini doğrudan baskılar. Bu enzimlerdeki baskılanma pürin ve pirimidin metabolizmasının baskılanmasınaneden olur (15). Bu yapı taşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA sentezini baskılayarak aynı zamanda enerji üretimi için gerekli adenosin trifosfat (ATP) üretimini baskılar. Ayrıca THF'ye dönüşmeden kalan DHF poliglutamata ve MTX'in poliglutamata türevleri toksik baskılayıcı metabolitler şeklinde birikir. Timidilat sentazın ve pürinin sentezinde rol oynayan transformilaz enzimlerinin baskılanması, MTX'in iki poliglutamata metaboliti tarafından yapılır. Metotreksatın hücrelerdeki toksik etkileri dışarıdan ilaç olarak verilen folinik asit (N5-formiltetrahidrofolat) tarafından tersine döndürülür ancak folikasidin kendisi ise bu durumda THF'ye dönüşemediğinden antidot olarak kullanılamaz (15,16).

Metotreksat aynı zamanda antiinflamatuvar etkiye de sahiptir. Proinflamatuvar sitokinlerden IL-1, 2, 6 ve INF- γ 'nın gen belirlenmesini azaltır, siklooksijenaz-2 sentezini ve nötrofil kemotaksisini inhibe eder.

2.1.2. İlaç Direnci

Metotreksatın kullanımını kısıtlayan en önemli faktör direnç gelişmesidir. MTX'e karşı tümör hücrelerinde oluşan direnç gelişimi dört nedene bağlıdır;

1. İlacın hücre içi alımının azalması
2. Değişime uğrayan DHF'nin MTX'e karşı olan ilgisinin azalması
3. Poliglutamat oluşumunda azalma
4. Gen ifadenmesindeki artışa bağlı olarak DHFR sentezinde artıştır.

Metotreksatın hücre içine alınması; folik asit ve L-lökovorin ile paylaşılmış bir taşıyıcı sistem gerektirmektedir (17,18). Metotreksat atılımı özgül baskılayıcılara duyarlı en az üç bileşik ile farklı bir mekanizma tarafından gerçekleştirilir (19). Metotreksata karşı direnç gelişimi MTX'in hücre içine alınmasının azalması veya atılımının artması sonucu gerçekleşir. İkinci olarak hücre içi MTX direkt etki edebilir ya da MTX'in dışarıya atılmayan uzun zincirli poliglutamat türevlerine dönüşebilir (20).

Metotreksatın her iki formunda sitotoksik fakat poliglutamat formu hücre içinde daha uzun süre kalabilir ve daha fazla sitotoksikiteye yol açabilir. Böylece MTX'in poliglutamat formuna dönüşmesinin azaltılması bir direnç mekanizması olabilir. Metotreksatın bazı tümör hücreleri tarafından poliglutamata dönüşümünün artması normal hücrelerle kıyaslanınca tümörlü hücrelerin ölümünde artışa neden olur. Direncin üçüncü mekanizması hedef molekül DHFR ile ilişkilidir. Mutasyonun tümör hücrelerinde gelişmesi sonucu DHFR'nin MTX'e ilgisi azalabilir ve bu durumda direnç gelişebilir (21). Direnç gelişiminde rol oynayan diğer önemli bir faktör DHFR'nin aşırı ifadenmesi sonucu hücrede bol miktarda THF oluşmasıdır. Metotreksat, hücrelere folatı ve THF'i de taşıyan bir aktif transport olayı ile girer; mutasyon sonucu bu mekanizmanın bozulmasının da dirençte rol oynadığı deneysel tümör modellerinde gösterilmiştir. Diğer bir direnç mekanizması dirençli hücrelerde timidin sentaz aktivitesinin azalmasıdır (22).

2.1.3. Metotreksatın dağılımı

Metotreksatın poliglutamam formuna dönüşmesi sonucunda sitotoksik etki görülebilmektedir. Poliglutamam şekli MTX in hücre içinde bulunan şeklidir ve hücredeki hasar etkisi yarılanma süresi daha uzun olmasından dolayı daha fazladır. Hücrede biriken poliglutamam miktarı arttıkça folik asit düzeyi azalır ve hücresel hasar miktarı ise artar (23).

Metotreksat, % 90 oranında böbreklerden atılır. % 3-4 oranında karaciğerde metotreksatın ekstrasellüler sıvıdaki majör formu olan 7-hidroksi metotreksata dönüştürülür fakat bu formu da üriner yolla atılır. Bir kısmı ise safra ile atılır ve enterohepatik dolaşım ile yeniden emilir. İnsanlarda metotreksatın major atılım yeri böbrekler iken, deney hayvanlarında (rad vs.) ise safra yoluyla atılımın daha fazla olduğu gösterilmiştir (24). Ratlarda yapılan bir çalışmada intravenöz olarak uygulanan metotreksatın %27'sinin üriner yolla, %62'sinin safra yoluyla atıldığı gösterilmiştir (25).

Metotreksat poliglutamam formunda hücrede uzun süre kalabilir ve hücre bölünmeye başladığı zaman metotreksatın etkisi belirgin hale gelmektedir (26). Oral yoldan alındığında emilim tama yakındır. İntravenöz yoldan verildiğinde sinir sistemi haricinde tüm vücuda yayılır ve %50 oranında proteinlere (özellikle albümine) bağlanarak taşınır. Standart doz aralığında beyin omurilik sıvısına geçişi yok denecek kadar azdır. Bu nedenle meningeal tümörlerde intratekal verilmesi gerekmektedir. Vücutta en yüksek doku seviyesine karaciğer de rastlanılır. Yarılanma ömrü ise 7-8 saattir (27,28).

2.1.4. Endikasyonları

Çocuklara uygulanan akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde yüksek dozda intravenöz MTX hem remisyon indüksiyonunda, hem de konsolidasyon sırasında kullanımında kür şansı oldukça yüksektir. Meningeal karsinomatosis tedavisinde, meningeal lösemi ve lenfomanın profilaksi ve tedavisinde MTX intratekal olarak kullanılmaktadır (29). Burkitt ve diğer non-Hodging lenfomalardaki kombinasyon tedavisinde faydalı etkileri vardır. Lökoverin kurtarma tedavisi ile birlikte uygulanan yüksek doz MTX, osteosarkomun adjuvan tedavisinde kullanılan standart protokolün bir parçasıdır (30). Koryokarsinomada düşük doz MTX tedavisi, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma yaparak, kaspaz 9 enzimini aktive ederek, Bax/ Bcl-

2 gen ekspresyonunda up- regülasyon yaparak hücrelerde apoptozisi indüklemiştir (31).

Metotreksat ayrıca aktif romatoid artrit ve juvenil romatoid artrit için (JRA), ilk seçenek olarak hastalığı modifiye edici ilaçlar arasında yer almaktadır. Metotreksatı zamanda 5- aminoimidazol- 4- karboksamid ribonükleotit transformilaz enzimini inhibe ederek, intrasellüler ve ekstrasellüler adenozin düzeyini artırmaktadır. Adenozinin, anti-inflamatuar sitokinler olan IL-1 reseptör antagonist (IL-1 ra) ve IL- 10 seviyelerini yükselttiği bilinmektedir (32).

Düşük doz MTX'in antiinflamatuar ve immünsüpresif etkilerinden dolayı, reflakter romatoid artrit, JRA ve dirençli psöriazis hastalarının tedavisinde de kullanılmaktadır (29, 33, 34)

2.1.5. İlaç Etkileşimleri

Aspirin, penisilinler, probenesid, non-steroidal antiinflamatuarlar, sefalosporinler ve fenitoin gibi ilaçlar MTX'in renal atılımını baskılamasının yanı sıra toksik etkilerinde ortaya çıkmasına neden olurlar. Metotreksat, warfarinin antikoagulan etkisini plazma proteinlerine bağlanmasını kompetitif olarak engelleyerek artırır; ilacın 5-FU'dan 24 saat önce verilmesi durumunda antitümör aktivitesini artırır. Metotreksatın toksik etkilerini leukovorin engeller, ayrıca leukovorin antitümör etkinliğini azaltabilir. Metotreksatın antitümör etkinliğini folik asit içeren maddeler ve L-asparaginazazaltır (35).

2.1.6. Toksisitesi ve Oksidatif stres

2.1.6.1. Kemik iliği baskılanması

Kemik iliği supresyonu MTX'in en sık görülen yüksek doz toksisitesidir. Hastalarda miyelosüpresyon oluşması özellikle kötü huylu olmayan tümörlerde, tedavinin ertelenmesine neden olur. Nötropeni ilaç dozuyla ilintilidir. Metotreksat alımından 4-7 gün sonra nötrofil sayısı en düşük düzeyine ulaşır ve ortalama 14. günde normal düzeyine tekrar döner (11).

2.1.6.2. Sindirim sistemi hasarı

Metotreksat kullanımı sonrası gastrointestinal sistemde gelişen mukozit doz kısıtlayıcı yan etkilerinden biridir. Mukozit MTX tedavisinden sonraki 3-7. günde oluşur, nötropeni ve trombositopeniden önce gerçekleşir. Bulantı ve kusma doza

bağlı oluşur. İntestinal kriptlerde apopitoz ve villöz atrofi oluşur. Goblet hücrelerindeki hasara bağlı müsin sekresyonunda ve bağırsak koruma özelliği olan proteinlerde azalma gerçekleşir (36). Gastrointestinal sistemde gelişen mukozit hastalarda özellikle beslenme bozukluğu, büyüme gelişme de gerilik ve yaşam standartlarında bozulmalara sebep olur. Tedavi sırasında gelişebilen diyare bazen tedaviyi kesmeye sebep olacak kadar şiddetli olabilir (11).

2.1.6.3. Hepatotoksisite

Metotreksat karaciğerde major ekstrasellüler metaboliti olan 7-hidroksimetotreksata dönüşür (37). Hücre içinde MTX poliglutamat formunda tutulur. Metotreksat verilmesinden sonra hücre içindeki MTX'in poliglutamat formunun miktarı artar ve aynı zamanda folik asit seviyesi düşer. Bu durum karaciğerde hepatosit nekrozuna sebep olur (38). İntrasellüler alanda ilacın varlığının artması poliglutamat formunun seviyesinin artması ile gerçekleşir. Bu mekanizmanın MTX'in hepatotoksik etkisinin sebebi olduğu düşünülmektedir (39). Yüksek doz MTX tedavidesinde serum transaminazları ve bilirubin düzeylerinde geçici yükseklik ilk 12-24 saat içinde başlar ve çocuşunlukla ilk 10 gün içinde normal sınırlara geriler. Uzun süreli kullanımlarda karaciğer fibrozu ile birlikte kronik hepatotoksisite ve siroz oluşabilir, ölümlle sonuçlanabilir.

2.1.6.4. Akciğer hasarı

Kuru öksürükten, dispne, hipoksi, pnömoni ve göğüs radyografisinde değişikliklere kadar doza bağımlı olmaksızın değişik etkileri görülebilir (40).

2.1.6.5. Üriner sistem hasarı

Akut böbrek yetmezliği, azotemi ve idrar retansiyonuna yol açar. Metotreksatın kendisi tübüller üzerine toksik etki gösterir ve renal toksisite metabolitlerinin intratubuler çökmesine bağılı olarak gelişir. Yüksek dozlarda hematüri ile birlikte renal toksisite, nadiren renal tübüller nekroz ve proteinüri gözlenebilir (40).

2.1.6.6. Oküler hasar

Metotreksatın tedavide kullanımında gözde en sık görülen yan etki konjonktivit, aşırı göz yaşarması, katarakt, fotofobi ve görmede bulanıklıktır (40).

2.1.6.7. Nörolojik hasar

Yüksek doz MTX verilen hastalarda parezi, afazi, davranış bozukluğu ve nöbetlerin eşlik ettiği akut serebral disfonksiyon genellikle tedaviden sonraki ilk altı günde %5-15' oranında ortaya çıkar ve 48-72 saat içinde düzelir (40).

2.1.6.8. İskelet ve kas sistemi hasarı

Eklem, kas ağrıları ve osteoporotik kırılmalar görülebilir (40).

2.1.6.9. Üreme sistemi hasarı

Oligospermi ve menstruel bozukluklar görülebilir (11).

2.1.6.10. Cilt hasarı

Eritematöz deri döküntüleri, kaşıntı, ürtiker, fotosensitivite ve hiperpigmentasyona yol açar. Radyasyona benzer cilt reaksiyonuna yol açabilir (21).

2.1.6.11. Metotreksata bağlı oksidatif stres

Antikanser ilaçlarla son zamanlarda yapılan toksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerine dikkat çekilmektedir. Karaciğer, böbrek, ince bağırsak ve merkezi sinir sistemindeki MTX'in yan etki mekanizması olarak oksidatif stres ayrıca sorumlu tutulmaktadır (41-44).

Jahovic ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada radlara 20 mg/kg tek doz MTX intraperitoneal olarak uygulanmış sonuç olarak kan, karaciğer, böbrek ve ince bağırsak dokularında glutatyon seviyelerinde azalma, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinde artma ve malondialdehit (MDA) seviyelerinde belirgin artma olduğunu bulmuşlardır (42).

Miyazono ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada. MTX' verilen radlarda yan etki olarak ince bağırsağında süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitelerinde artma, indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX'in yol açtığı ince bağırsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdir (45).

2.2. Mukozit

Mukozit kompleks bir patolojidir. İnflamatuvar sitokinler, oral mikroflora, lokal travma, bozuk ağız hijyeni, immün sistemde bozukluk, kemoterapi ve radyoterapi

sonrasında hızlı çoğalan ağız epitel mukozit oluşum ve şiddetin de etkilidir. Metotreksat, 5-florourasil, doksorubisin ve daunorubisin kullanımı sonrasında mukozit sıklıkla gelişir. Kemoterapetikler ağız mukoza geçirgenliğinde değişiklikler yapar iken aynı zamanda epitel olgunlaşması tükürük içerik ve miktarını da etkilerler.

Mukozit sadece epitel değişikliği değildir, reaktif oksijen radikalleri, transkripsiyon faktör aktivasyonları, apoptozun tetiklendiği ve aynı zamanda TNF alfa, IL-1 ve 6 gibi sitokinlerin arttığı bir süreçtir. Oksijen radikalleri, KT, veya RT mukozal harabiyete neden olan transkripsiyon faktörünü aktifleştirir. Mukozit, yanak içi (2/3 olguda), dil önü ve yanında, dudaklar, ağız tabanı, yumuşak damak, orafarenks gibi keratinize olmayan mukozalarda en sık görülür. Mukozite tedavi sırasında en sık ve en ağır olarak Nonhodgin lenfoma (NHL), yüksek riskli ALL ve akut miyeloid lösemi (AML) olgularında rastlanmaktadır (46).

Mukozit, tedaviye bağlı ortaya çıkan akut toksisite içerisinde önemli bir yer tutar. Hafif hassasiyetten yaygın birleşik ülserlere ve kanamalı lezyonlara kadar geniş bir klinige sahip olabilir. Ağrı, kanama, ülserasyon, ağız kuruluğu, tat değişikliği ve beslenme bozukluğu gibi semptomlar birbirini izler. İmmün sistemi baskılanmış, yüksek doz kemoterapi alan olgularda mukozit gibi epitelyal bütünlüğün bozulduğu bu bölgeler enfeksiyon ajanlarının vücuda giriş noktasını oluşturur. Sıvı ve besin alımının azlığı, yetersiz olması sonucunda dehidratasyon ve malnutrisyon gözlenir. Mukozit hastanın beslenmesini, konuşmasını, gülümsemesini, etkileyen yaşam kalitesini bozan onkolojik tedavinin devamını engelleyen ve enfeksiyonlara zemin hazırlamasıdan dolayı sağ kalımı etkileyen önemli bir klinik sorundur (47).

2.2.1. Mukozit patofizyolojisi

Kemoterapi ve radyoterapi alan hastalarda KT veya RT'nin doğrudan etkisi ile bazal epitel hücrelerinde DNA sarmalı kırılır ve DNA sarmalının kırılması ile doku hasarı ve hücre ölümü gerçekleşir. Serbest oksijen radikalleri (SOR) ve aracı molekül oluşumu gibi dolaylı mekanizmalarda, DNA zedelenmesi dışında doku hasarı ve hücre ölümünde rol alır (48-50). Serbest oksijen radikalleri endotelde, fibroblastlarda, makrofajlarda ve epitel hücrelerinde Nükleer Faktor kappa B (NF-κB) ve Nükleer Respiratuar Faktor 2 (NRF-2) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Sitokinler, antineoplastik ilaçlar radyasyon gibi hücre dışı uyarılara maruz kalan hücrelerin yok edilmesini belirleyen genlerin aktivasyonunda NF-κB rol oynar. Nükleer Faktor kappa B'nin aktive olması hem pro-apoptotik hemde anti-apoptotik yollara etki eder.

Nükleer Faktor kappa B'yı uyaran birçok faktör vardır. Nükleer Faktor kappa B aktivitesini bakteri ve bakteri duvarı ürünleri, virüsler, büyüme faktörleri, inflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, TNF- α), radyasyon, sitotoksik ilaçlar, hiperglisemi ve şok artırır. Nükleer Faktor kappa B aktivasyonu pro-apoptotik mekanizmaları tetiklediğinde hem tümör hücre ölümü hem mukozaya toksik yan etkiler artmaktadır (50-52). Makrofajlar TNF- α , IL-6 gibi sitokinleri oluşturarak doku hasarının ilerlemesine sebep olurlar. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), sifingomyelinazı ve NF- κ B aktive ederek mukozada daha fazla hücre ölümüne sebep olur. Aynı zamanda yenilenme kapasitesi epitel kök hücre harabiyeti oluşturup kaybedilir. Sonuç olarak epitel incelmeye başlar ve atrofi gelişir. Atrofiyi mukozal incelme ve ülserasyon izler.

2.2.2. Mukozitin görülme sıklığı

Oral ve gastrointestinal mukozitin görülme sıklığı tam olarak bilinmemektedir. İdame tedavi sırasında, primer tedavi sırasında ve kök hücre transplantasyonu sonrasında gelişen mukozit oranına göre daha az mukozit gelişmektedir (53). Aynı tedavi uygulanan benzer hastalarda çok farklı mukozit düzeyleri saptanmıştır buda bize genetik ve mukozit arasında ilişki olabileceğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalarda metotreksat sonrasında ağır mukozit saptanan olgularda metilen tetra hidro folat redüktaz (MTHFR) enziminin farklı genetik özellikleri gösterilmiştir (46).

2.2.3. Mukozit gelişiminde risk faktörleri

2.2.3.1. Hastaya ait risk faktörleri

Cinsiyet yaş, ağız sağlığı ve hijyeni, tükrük salgı fonksiyonu, bireye ait genetik faktörler, tümör tipi ve yerleşim yeri, eşlik eden diğer hastalıklar mukozit oluşumunda hastaya ait risk faktörlerindedir. Çocuk hastalarda yüksek hücre döngüsü nedeniyle daha ağır ve daha sık mukozit olduğu gözlenmiştir. Mukozit riski 20 yaştan önce ve 50 yaştan sonra artar (54,49,55).

Tükrük, epiteli kaplayan bir örtü bakterilere ve çevresel faktörlere karşı koruyucu bir katman oluşturur. Yapısında lizozim, laktoferrin, salgısal immunglobulinler gibi biyolojik aktif moleküller bulundurulur. Tükrük yapımı azalan hastalarda koruyucu faktörlerin azalması nedeniyle mukozit gelişimine daha sık rastlanılır (56).

Bir çok çalışmada olgularda kemoterapötik ajanlara verilen farmakodinamik cevaplarda genetik farklılıklar olabileceği veya olguların mukozit gelişimi için genetik

olarak yatkınlık taşıyabileceği gösterilmiştir (57). Yani genetik farklılık nedeniyle aynı kemoterapötik ajanlarla tedavi edilen hastaların bir kısmında mukozit gelişirken diğerlerinde gelişmemekte ya da farklı şiddetlerde olabilmektedir. Metotreksat tedavisi alan hastalarda 5,10-MTHFR genindeki (C677T) polimorfizm genetik yatkınlığın en çok araştırıldığı örneklerden biridir. Metotreksat kullanımı sonrasında MTHFR genindeki polimorfizme bağlı olarak değişik derecelerde mukozit gelişir (57). Metilen tetrahidroolat redüktaz TT genotipinde MTHFR aktivitesi daha düşüktür ve mukozit daha ağır seyreder (57,58). Kanserin tipi ve tümörün yerleşimi mukozit gelişim riskini etkileyen faktörler arasındadır. Baş-boyun yerleşimli yumuşak doku sarkomları, nazofarenks karsinomu, Hodgkin dışı lenfoma mukozit riskinin daha yüksek olduğu gruplardır (36, 51,58). Ağızdan soluk alan çocuklarda ve maske ile oksijen alan olgularda mukozit daha kolay gelişir.

2.2.3.2.Tedaviye ait risk faktörleri

Olgunun aldığı kemoterapötik ilaçlar, ilaç sıklığı, ilaç dozu, eş zamanlı KT ve RT alması, RT bölgesi, hematopoetik kök hücre nakli ile nakil tipi mukozit oluşumunda risk faktörlerindedir. Çocukluk çağı kanserlerinde KT protokolündeki ilaçlar ve ilaç dozları mukozit riskini belirleyen en önemli faktörlerdendir. Akut myeloid lösemide uygulanan FLAG protokolündeki ilaçlardan fludarabin,yüksek doz sitarabin ve granülosit koloni uyarıcı faktör kullanıldıktan sonra mukozit gelişim riski %70 dolaylarındadır (48,49,59).

Timidin sentetaz inhibitörleri, topoizomera II inhibitörleri, primidin analogları, pürin analogları, yüksek dozlarda alkilleyici ajanlar ve antrasiklin grubu kemoterapötikler mukozit yapıcı etkileri en fazla olan ilaçlardır. Bu grup ilaçlardan olan sitozin arabinozid, sisplatin, daunomisin, etoposid, taksol, doksorubisin, vinkristin, vinblastin, bleomisin ve melfalan NF-κB uyarımı yaparak mukozit gelişimine neden olur (59)(Tablo 2).

Tablo 2:Mukozite neden olan kemoterapotik ajanlar

Alemtuzumab	Bleomisin	L-asparaginaz	Siklofosamid	Sitarabin	Busülfan
Dositaksel	Dokсорubisin	Kapesitabin	Florourasil	Gemsitabin	Karboplatin
Gemtuzumab	Hidroksiüre	Daunorubisin	İdarubisin	İnterlökin 2	Epirubisin
Lomustin	Melfelan	Etoposid	Mitomisin	Mitoksantron	İrinotekan
Oksaliplatin	Paklitaksel	Methotreksat	Pentostatin	Prokarbazin	Mekloreタミン
Topotekan	Trastuzumab	Pemetreksed	Vinblatin	Vinkristin	Tiotepa
Tretinoin					

Metotreksathem oral mukozada, hemde ince bağırsak mukozasında hasar yapmaktadır. Metotreksat intestinal hücrelerde apoptozise neden olurken, goblet hücrelerinde de yıkıma neden olur. Metotreksatın ayrıca TNF yapımını arttırmasının yanında T lenfosit ve makrofajların sayısını arttırdığıda gösterilmiştir (60).

Yüksek doz KT uygulanan olgularda mukozit daha sık görülmektedir. Kemoterapi ye ikincil gelişen mukozitlerde kür sayısı arttıkça mukozit olasılığının arttığı görülmüştür. Bolus infüzyon tarzında kullanılan ilaçlarda mukozit riski, uzun süreli infüzyonlara ya da düşük dozda tekrarlanan ilaçlara göre daha yüksektir (49).

Radyoterapi uygulanan olgularda mukozit riski artar. Radyoterapinin uygulandığı alana, toplam doza ve günlük fraksiyona göre risk değişim göstermektedir (49,52). Günlük RT dozları ya da fraksiyonu artarsa mukozitin şiddeti alınan doza ve fraksiyon sayısına paralel olarak artış gösterir. 40 gray (Gy) dozda oral mukozit belirginleşir fakat uygulanan RT 50 Gy dozu aşarsa tükrük bezlerinde kalıcı hasar gelişir. Kök hücre transplantasyonu yapılan hematolojik onkolojik vakalarda mukoza komplikasyonları ağır seyreder. Oral mukozitin özellikle kök hücre transplantasyonu yapılan olgularda sağkalımı kısaltan bir faktör olduğu bilinmektedir.

2.2.4. Mukozitin klinik özellikleri

Kemoterapi ve RT etkisi ile mukozal bariyerin yıkılması sonucu gelişen mukozit başlıca ağız ve gastrointestinal kanalda görülür (48, 51).Klinik bulgular mukoza hasarının derecesine ve yerleşimine göre farklılık gösterir. Oral mukozit oluşumunda en erken klinik belirtiler KT uygulamasını izleyen 4-8. günlerde eritemle başlar, 7-14 günde sona erer. Gingiva ve sert damak KT mukozitlerine dirençli iken RT sonrası gelişen mukozitler, dil kökü, gingiva, ve sert damakta keratinize epitel alanları dahil bütün oral mukozada belirti verebilir. Radyoterapinin 30 Gy dozundan sonra ülserler

gelişmeye başlar. Şiddetli mukozit olgularında kanama, beslenememe, tükürük salgısında azalma ve konuşamama görülür. Ağır mukozit olgularında sepsis sık gelişir. Kemoterapi mukozitlerinde infüzyon bitiminden üç hafta sonra, RT mukozitlerinde tedaviden iki hafta sonra klinik ve semptomatik düzelme başlar(48, 50, 51).

Akut radyasyon özefajiti toraks, baş boyun RT'si alan olgularda görülebilir. Metotreksat, 5-FU, taksan grubu ilaçlar özofajite neden olabilirler. Bu tabloda disfaji ve retrosternal ağrı başlıca bulgulardır (61). Bu belirtiler KT başlangıcından itibaren ilk birkaç gün içerisinde ortaya çıkabilirse de genelde KT bittikten sonra gözlenir. Epitelde incelme ve ülserasyon oluşur. Lamina propriyadaki bağ doku hücrelerinin çoğalmasında meydana gelen değişiklik sonucunda vasküler geçirgenlik ve inflamatuvar hücre birikiminde artış meydana gelir. Fibröz dokuda iskemi oluşur. İntestinal epitelde hasar daha hızlı gelişir. Aralıklı olarak bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı gelişebilir. Kemoterapiverildikten sonra yaklaşık üçüncü günde diyare başlar. Kemoterapiye ikincil intestinal mukozitlerde geri emilim yüzeyi hasarlandığından aşırı sıvı ve elektrolit kaybı olabilir (61,62). İntestinal mukozit oral mukozitten daha önce başlar ancak daha erken geriler. Bu semptomlara ek olarak gastrointestinal sistemde obstrüksiyon, perforasyon ve enfeksiyon gibi komplikasyonlar gelişebilir (7,62).

Tüm sitotoksik ilaçlar kript hücrelerinde apopitoza ardından hipoplaziye ve sonrasında da kript hiperplazisine neden olurlar.İnce bağırsaktaki epitelyal kök hücreler KT sonrası hasara uğrarlar ve özgül hücre gruplarına bölünemez ya da farklılaşma gösteremezler. Böylece villöz mukoza yenilenemez dolayısıyla hızla yapı ve fonksiyon kaybına uğrar (63). Oluşan mukozit ince bağırsakta kolona göre daha belirgindir. Bunun sebepleri arasında ince ve kalın bağırsakta belirlenen pro ve antiapoptotik proteinlerin farklı olmaları ile ince bağırsak ve kolondaki kök hücrelerin yerleşim yerlerinin farklı olmaları sayılabilir. Tüm bu değişiklikler sonucunda ishal görülür.

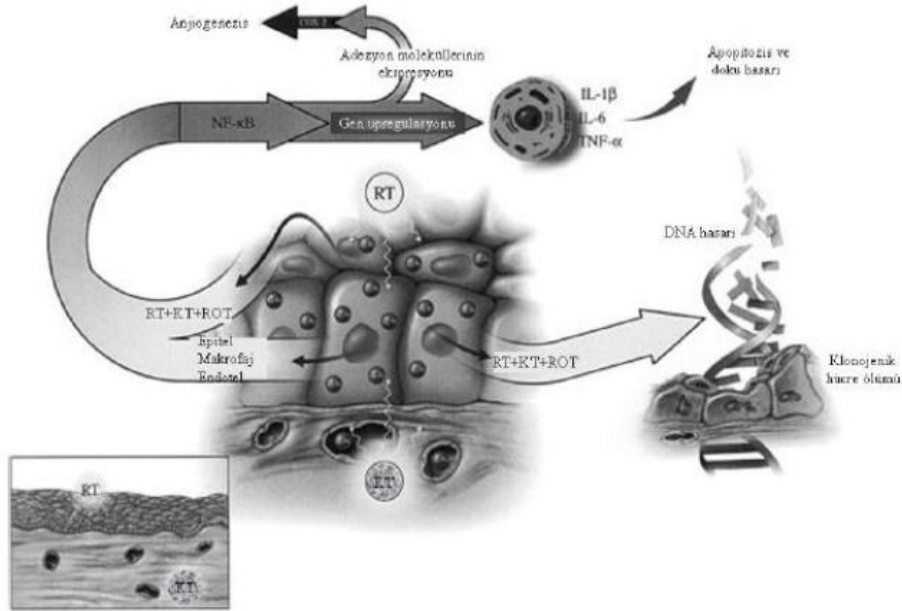
Mukozit KT'den iki hafta sonra ve RT'nin kesilmesinden 2-3 hafta sonra iyileşmeye başlar. Abdominal RT'den sonra altı aydan üç yıla kadar bağırsak semptomları sürebilmektedir. Sonuç olarak kanser tedavisinin tipi, seçilen ilaçlar, doz ve zamanlama mukozitin oluşumunda yakından ilişkilidir (48,61,62,65).

2.2.5.Mukozitin evreleri

Mukozitin patogenez evrelendirmesi şu şekildedir (66);

2.2.5.1.Başlangıç (enflamatuar/epitelyal) fazı:

Kemoterapötik ajanların ya da radyasyonun uygulamasından sonra oksidatif stres sonucunda hızlı doku zedelenmesi mukozite neden olan birincil olaydır. Bunun sonucunda SOR oluşur. Serbest oksijen radikalleri direkt olarak ya da NF-κB gibi hasara yol açan ikincil aracı molekülleri uyararak hücre ve dokulara hasar verir. İlk aşamada mukoza normal görünümündedir. Endotel ve epitel hücrelerinin etkilenmesi ile döngü devam eder (66)(Resim 2).



Resim 2: Mukozit başlangıcı ve hasara yanıt mesajı oluşturma evreleri

İzlemde klinik olarak mukozada parlaklık kaybolur ve soluk alanlar seçilir. Serbest oksijen radikalleri DNA hasarına yol açarak tüm hücre klonunun ölümüne sebep olur. Aynı zamanda p53 ve NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerini doğrudan uyarabilir. Mukozit oluşumunda NF-κB anahtar özelliğe sahiptir. Radyoterapi, KT, enfeksiyöz ajanlar, fizyolojik stres ve inflammatuar sitokinler NF-κB 'yi aktive eder. Nükleer Faktör kappa B'nin aktive olması sonucunda 200'den fazla genin regülasyonu gerçekleşir. Bu gen ürünlerinin bir çoğu mukoza üzerine toksiktir. Nükleer Faktör kappa B proapoptotik ve antiapoptotik yollara da etki eder. Nükleer Faktör kappa B artışı proinflammatuar sitokinlerin yapımına yol açarak bağ doku ve

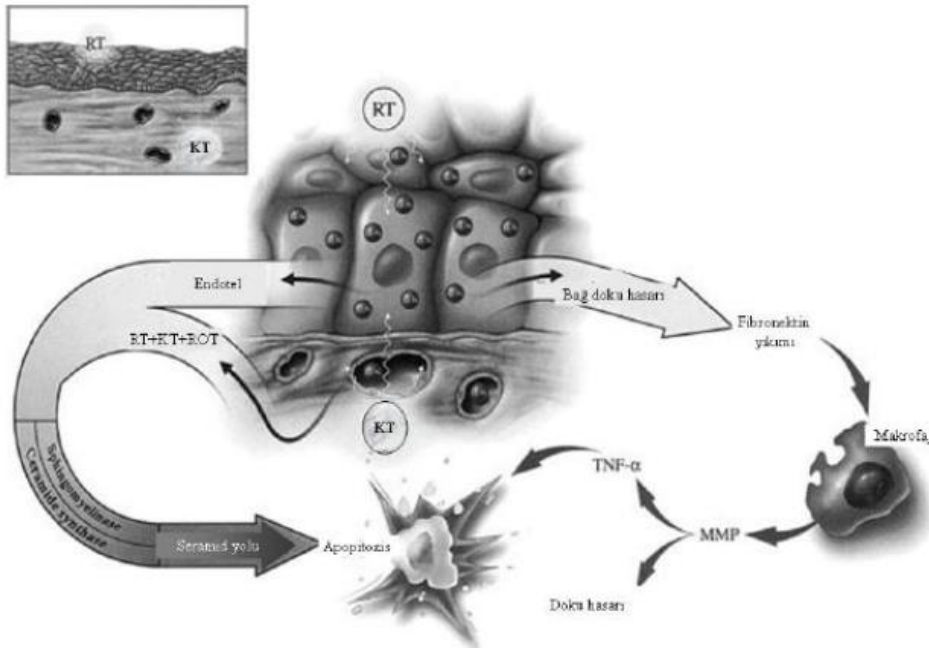
endotelde erken hasar oluşumunu tetikler. Fibroblast yıkımı gerçekleşir. Kollajen yıkımı ve epitel bazal membranında parçalanma fibronektin ve metalloproteinazların salgılanmasının artması ile gelişir. Sonuçta mukozada doku zedelenmesi ve apoptozis gerçekleşir (Resim 2)(66). Klinik olarak eritem, atrofi gelişir ve nadiren ülseratif alanlar fark edilir.

2.2.5.2.Sinyal çoğalma evresi

Kemoterapi ve RT'nin başlangıçta oluşturduğu saldırıya bağlı salınan haberci moleküller pozitif geri bildirimde bulunarak doku hasarını artırır. Bu dönemde birincil doku hasarı sonunda pek çok gen ve biyolojik olarak aktif proteinler tetiklenmiştir. Bu proteinler submukozada birikerek doku zedelenmesini sürdürür. Nükleer Faktör kappa B bağlantılı transkripsiyon faktörleri kaspaz, mitojen etkinleştirilmiş protein kinaz (MAPKA) ve siklooksijenaz 2, tirozin kinaz yolağı ile aktive edilir. Mukozit şiddet ve süresi proinflamatuvar sitokinlerin, NF- κ B ve proapoptotik yolak ile etkileşime geçmesiyle artar.

2.2.5.3.Amplifikasyon

İnflamatuvar sitokinler ve sinyal iletimindeki artış devam eder, makroskopik düzeyde mukoza değişiklikleri minimaldir. Sonrasında dokudaki biyolojik karmaşa sonucunda mukoza bütünlüğü bozularak ülserleşme başlar (Resim 3)(66).



Resim 3: Haberci sinyallerin çoğalması

2.2.5.4. Ülseratif faz:

Mukoza bütünlüğü bozulur izlemde bakteri kolonizasyonu ve bakteri hücre duvarı ürünlerinin submukozaya nüfuz etmesi sonucunda mukozal lezyonlar gelişir. Mononükleer hücre birikimi ve proinflamatuvar sitokin salınımı bu dönemde devam etmektedir. Histolojik olarak ağızda fibrinöz eksuda içeren ülserler, ince bağırsakta kript, villus atrofi ve goblet hücre sayısında azalma görülür. Bu dönemde submukozaya geçen bakteriyel ürünlere bağlı olarak makrofajlardan proinflamatuvar sitokin salınımı devam eder (Resim 4)(66).



Resim 4: Ülserleşme

Ülserlerin üzerine fibrin oturması ve ikincil enfeksiyonların başladığı dönemdir. Sıklıkla klinik olarak nötropeninin en ağır olduğu dönemde görülür.

2.2.5.5. İyileşme fazı:

Epitel proliferasyonu ve diferansiasyonu yeniden başlar. Hücre dışı matris ve mezankim hücreleri uyarılmaya başlar. Epitel hücreleri hasarlı alanlara göç ederek yüzeyi kaplar, çoğalıp farklılaşarak mukoza yeniden yapılandırılır. Epidermal Growth Faktör Beta (EGF- β), Transforming Growth Faktör alfa (TGF- α), IL-1 β , interferon alfa (IFN- α) bu süreçte görev almaktadır. Bu yapılanma ile iyileşme evresi

tamamlanmasına karşın mukoza zedelenmeden önceki durumuna tamamen dönemediği için yeni bir hasara çok daha duyarlı hale gelir.

İyileşme evresinde hastanın nötropenisi düzelme eğilimindedir. Ağız içi ve gastrointestinal sistemde gelişen mukozit ve ülserler genel olarak kemoterapiden dört gün sonra başlar ve 7-14 gün sonra en yoğun hal alır. Nötropenin düzelmesi ile histolojik iyileşme başlar. Klinik olarak iyileşme özellikle baş boyun bölgesine uygulanan radyoterapi sonrasında, mukozit ve ağız komplikasyonları 6-8 haftaya dek uzayabilir (46).

2.2.6.Mukozitin derecelendirilmesi ve sonuçları

Mukozitin klinik değerlendirmesinde standart tanısal ve değerlendirme kriterleri bulunmamaktadır. Yan Etkiler için Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation/WHO), Ulusal Kansere Enstitüsü, Genel Terminoloji Kriterleri (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Event/NCICTC) veya Radyasyon Tedavisi Onkoloji Grubunun (Radiation Therapy Oncology Group/RTOG) derecelendirmesi kullanılmaktadır.

Dünya sağlık örgütü sınıflandırılması;

Evre 0: Normal

Evre 1: Hafif fokal değişiklikler(eritemli alanlar) ağrı ve duyarlılık henüz yok, ağızdan beslenebilir.

Evre 2: Ağrısız ülser ve eritem, hafif ağrı hissi, <2mm den ülserler,solid gıdalarla beslenebilir Evre 3: Ağrılı eritem, ödem veya ülser(derinlik>2mm ve mukozanın yarısından az) kanama yok, ağızdan sadece sıvı diyetle beslenir.

Evre 4: Eritem, ödem, ülser(mukozanın yarısından fazla), şiddetli ağrı, kanama, beslenemez. Parenteral veya enteral beslenme desteği gerekir (46).

Dünya sağlık örgütü oral mukoziti anatomik, semptomatik ve fonksiyonel olarak evre“sıfır” ile (oral mukozit yok) evre “dört”(oral beslenme mümkün değil ve hastanın total parenteral desteğe ihtiyacı olması) arasında derecelendirmektedir (67).

Tablo 3: NCI -CTCAE v4. 03 Toksikite Kriterleri Oral Mukozitlerin Sınıflandırılması (68)

	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4	Grad 5
NCI-CTCAE v4.03	Yok	Var, ancak mukozite ilişkin şikayet yok veya hafif şikayetleri var	Gıda alımını engellemeyen, ancak türünün değişmesini gerektiren orta derecede ağrılı mukozit var	Gıda alımını engelleyen ciddi derecede ağrılı mukozit	Tibbi girişimlere acilen gereksinim var	Ölüm

Ağır düzeyde mukoziti olan hastaların bir sonraki KT döngüsü çoğunlukla (% 35) gecikir. Hastaların yaklaşık % 60'ında doz azaltımına gidilir iken yaklaşık % 30'unda tedavi kesilir. Ağır mukozit gelişen hastaların yaklaşık %70'ine yeterli nutrisyon desteği sağlayabilmek için nazogastrik/nazoduodenal tüp takılmaktadır. Bu hastaların % 60'ında ateş ve sonrasında hastaneye yatış ihtiyacı gelişmektedir (67).

2.2.7. Mukozitin komplikasyonları

1-Ağrı: Bazen parenteral opioid analjezikler gerektirecek kadar şiddetli

2-Anoreksi ve disfaji: Beslenme bozukluğu

3- Enfeksiyöz komplikasyonlar: Oral mukozal bariyerin bozulmasına eşlik eden azalmış mutlak nötrofil sayısı, çeşitli bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır. Nötropenik hastalarda ve özellikle transplantasyon uygulanan hastalarda mukozit nedeni oral enfeksiyonlardan en sık rastlanılanı oral "kandidiazis"tir ve topikal nistatinle tedavi edilebilir (70,71).

4-Doz-azaltımına ve tedavinin gecikmesine yol açan toksisite: Mukozit ağırlığı hastadan hastaya değişiklikler gösterir. Ancak aynı hastada değişkenlik daha az olmakla birlikte ciddi mukozit gelişmiş olanlarda izleyen kemoterapi sikluslarında doz redüksiyonu gerekebilmekte, hatta tedavi ertelenebilmektedir.

5- Maliyeti artırır, hastanede kalma süresini uzatır.

6-Hastanın yaşam kalitesini (ağrı, beslenme, iletişim, uyku) bozar.

2.2.8. İdeal mukozit yönetimi

Oral mukozitin önlenmesi ve tedavisi bir ekip işidir, klinisyenler, diş hekimleri, onkoloji hemşireleri ve beslenme uzmanları tarafından bir arada yürütülür.

2.2.8.1. Tedavi Öncesi Ağız ve Diş Bakımı, Profilaktik ağız bakımı:

Onkolojik tedavi öncesi bir diş hekimi tarafından ayrıntılı bir ağız muayenesi yapılması mevcut veya kanser tedavisi sırasında sorun çıkaracağı düşünülen hastalıkların tedavi edilmesi (diş kökü değerlendirilmesi, çürük tedavileri ve gerekiyorsa endodontik tedavi) kanser tedavisine bağlı olarak gelişebilecek ağız içi komplikasyonları en aza indirecektir.

Düzenli ağız bakımı yapılması tedavi sırasından oluşabilecek mukozitin önlenmesinde en etkili yöntemdir. Temel bakım dışında mukozit profleksisi için hem topikal hem sistemik pek çok ilaç veya doğal madde uygulanmıştır.

2 2.8.2.Önleyici Yaklaşım:

Kemoterapi ile ilişkili mukoziti önlemek veya azaltmak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Ancak bunların çoğunun yararı sınırlıdır. Toplam 10,514 randomize olgunun katıldığı 131 çalışmanın değerlendirildiği bir metaanalizde, mukozitin önlenmesi veya şiddetinin azaltılması bakımından plaseboya göre 10 uygulama, istatistiksel olarak zayıf da olsa, yararlı bulunmuştur (72): Aloe vera, Amifosfin, Kriyoterapi, G-CSF, İntravenöz glutamin, Bal, Keratinosit büyüme faktörü, lazer, Polimiksin/tobramisin/amfoterisin antibiyotik pastil.

Sukralfat MASCC (Multinational Association of Supportive Care in Cancer) ve International Society for Oral Oncology kılavuzunda da oral kriyoterapi, palifermin ve düşük doz lazer tedavisinin yararlı olduğu bildirilmiştir (73). Özellikle bolus olarak uygulanan 5 fluorourasil hastalarında mukozit önemli bir sorundur ve bazı çalışmalarda oral buz uygulamasının vazokonstrüksiyonu uyararak ilacın oral yan etkilerinden koruma sağladığı gösterilmiştir. Yüksek doz melfalan uygulamasından sonra gelişen mukoziti önlemede veriler ne kadar sınırlıda olsa, kriyoterapinin etkili olduğu bildirilmiştir (72, 73). Palifermin bir rekombinan keratinosit büyüme faktörüdür ve epitelyal hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır. Değişik çalışmalarda, yüksek doz tedavi ve kök hücre nakli uygulanan hastalarda kemoterapi ile birlikte palifermin uygulamasının mukozitin ağırlığını ve süresini azalttığı gösterilmiştir (72-74). Glutamin, hızlı çoğalan hücrelerin nükleik asit sentezi için öncü bir aminoasittir. Parenteral glutamin tedavisinin mukoziti önlemede yararı kesin olarak gösterilememiş olmakla beraber oral glutaminin yararı tartışmalıdır. Kontrollü bir çalışmada biyoyararlanımının daha yüksek olduğu oral L-glutamin formülasyonlarının mukozit ağırlığını azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir.Yalnızca tek bir çalışmada

olumlu sonuç bildirilmiş bu nedenle uluslararası kılavuzlarda rutin olarak önerilememektedir fakat kemoterapisonrası ciddi mukozit gelişen hastaların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu uygulanan olgulara tedavi öncesi helyum-neon lazer uygulamasının mukoziti azalttığı bildirilmiştir (73). Diğer profilaktik yaklaşımlardan hematopoetik koloni uyarıcı faktörlerin (CSFs) kemoterapiye bağlı mukoziti engelleme ve mukozit şiddetini azaltma etkisi vardır. Fakat maliyeti yüksek olması nedeniyle tedavide kullanımı kısıtlıdır (74). Klorheksidin mukozit insidansını ve şiddetini azalttığı gösterilmiştir (75).

Doğal bal topikal olarak RT mukozitlerinde verilmiş ve koruyucu etkisi olduğu söylenmiştir (76). Metotreksat alan sıçanlarda koyun sütü ile yapılmış yoğurdun ince bağırsakta mukoza yıkımını azalttığı, mukoza koruyucu etkisi olduğu savunulmuştur (77).

Adaçayı, rezene, papatya suyu, meyan kökü, morus nigra (kara dut), ratanya gibi bitkiler oral ve gastrointestinal mukoziti önleyici olarak kullanılmıştır.

Mukozit tedavisinde amaç; mukozaların temiz ve ıslak tutulması, enfeksiyonun tedavisi ve yeterli sıvı ve gıda alımının sağlanmasıdır.

2 2.8.3.Oral Mukozitte Önlem ve Tedavi

Topikal mukoza koruyucular, topikal ve/veya sistemik analjezikler, E vitamini ve kapseisin ile oral bakım bazı olgularda semptomatik iyileşme sağlar.

- Hastalara günde 2-3 kez yumuşak fırçayla diş fırçalama önerilir.
- Gargara SF(serum fizyolojik) ve sodyum bikarbonat solüsyonu ile yapılır ve her 2-3 saatte bir yapılması önerilir.
- Antimikrobiyal gargaralardan olan klorheksidin ve povidon iyot ilegünde 3-4 kez gargara yapılır. Analjezi amaçlı %2'lik lidokain ve magnezyum hidroksit solüsyonu karışımı kullanılır. Topikal olarak kullanılan bir diğer ajan (içinde alkol ve gliserin olmayan) morfin solüsyonlarıdır. Bir bariyer oluşturucu olan sukralfatın (bariyer oluşturucu) anestezi ile birlikte kullanımı, ağrı gidericiye olan ilaç ihtiyacını azaltır. Difenhidramin 10 cc+jetokain amp 20 mg/1 cc + Mucaine 10 cc karışımı kullanılmaktadır. Jetokain yerine Aritmal ampül ve mukain yerine Talcid kullanılabilir. Sık olarakta novokain 0.3 gr ve gliserin 30 gr karışımı kullanılmaktadır.
- Kemoterapi sonrasında ağız florasında Gram (+) etkenlerden Gram (-)'lere geçiş olmaktadır. Gram (-) etkenli mukozitler daha kötü gidişlidir. Antibakteriyel gargaralar

pek önerilmez. Ancak mukozit sonrasında bozuk dokuda mantar yerleşmişse tedavide antifungallerden yarar sağlanır. Oral nistatin ve flukanazol tedavide sıklıkla kullanılmaktadır.

- Kemoterapi ve RT'ye bağlı oluşmuş mukoza hasarında palifermin epitel kalınlığını artırıp iyileşme süresini kısaltır.

2.3.Morus Nigra (Kara dut)

2.3.1. Dutlar ve Özellikleri:

Dut ılıman, tropik ve subtropik iklim türlerinde yetişen bir meyve türüdür. Dut (*Morus spp.*), Urticales takımının Moraceae familyasının *Morus* cinsine girmektedir. Dünyanın ılıman bölgelerinde *Morus* cinsinin 100 kadar türü olduğu gösterilmiştir. *Morus alba* (Beyaz dut), *Morus nigra* (Kara dut) ve *Morus rubra* (Mor dut) en sık rastlanan türleridir (78). *Morus alba*'nın anavatanı Çin, *Morus nigra*'nın anavatanı İran ve Kafkaslar, *Morus rubra*'nın anavatanı ise Kuzey Amerika'dır (79).

Karadut meyveleri 2-3 cm uzunlukta ve hafif ekşi lezzetiyle sulu özelliğindedir. Rengi ile ön plana çıkmakla beraber isimlendirilmesi rengine göre yapılmaktadır (80).



Resim 5: Karadut meyvesi

Dutun bitkisi ve meyvesi farklı alanlarda kullanılmaktadır. Yaprağı ipek böceği besini olarak kullanılmaktadır, bizim ülkemizde de ekonomiye önemli katkılar sağlamaktadır. Meyvesi, taze ve kuru olarak tüketilmekte ve aynı zamanda pekmez, reçel, pestil, sirke, ispirto da yapılmaktadır (81). Dutun pek çok hastalığın tedavisinde kök ve gövde kabuk kısımlarının kullanılabileceği, özellikle kara dut şurubunun ağız ve boğaz hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceği bildirilmektedir (82).

Meyve temel olarak şeker (fruktoz % 48, glikoz % 52), sitrik asit (% 92) ve malik asit (% 8) gibi organik asitler, fenolik asitler ve antosiyaninlerden oluşmaktadır (80). Karadutun bileşimi yapılan çalışmalar ile incelendiğinde şu şekilde özetlenebilir:

- Kuru madde miktarı (%): 12,5-29,5
- Kül miktarı (%): 0,12-1,04
- Protein miktarı (%) : 0,9-2,64
- Ham yağ miktarı (%): 2,5-6,79
- pH değeri: 3,30-5,65
- Suda çözünürlük (TSS) (%): 14,30- 30,80
- Mineral bileşimi:en baskın mineral potasyum'dur
Ca :0,21-6,6 mg/g,
P: 0,40-5,8 mg/g
K: 1,27-15 mg/g ,
Zn: 0,02-12 mg/g ,
Na: 0,92-3,29 mg/g ,
Mg: 0,37-2,40 mg/g
- Şeker içeriği: En baskın şekerin Glukoz ve Fruktoz olduğu belirtilmiştir.
Glukoz: 6,39- 7,75 mg/100g
Fruktoz: 3,40-5,77 mg/100g
- Yağ asitleri içeriği: Karadutlarda baskın üç yağ asit içeriği şu şekilde özetlenebilir:
Linoleik asit: % 13,6-64,41
Palmitik asit: % 11,36- 22,7
Oleik asit: % 2,33-16,0
- Organik asit içeriği: Karadutlarda baskın iki organik asit malik asit ve sitrik asit olarak verilmiştir.
Malik asit: 1,4 -218 mg/g
Sitrik asit: 8,80- 670 mg/g (80).

2.3.2.Fenolik Bileşikler ve Sınıflandırılmaları

Besin ve fitokimyasallar içermesi açısından zengin olan dut ve dut gibi meyvelerin alınımı insanları çeşitli hastalık ve rahatsızlıklardan önleyebilmektedir ve buda dünya çapında meyve sebze tüketimini arttırmıştır (83). Bu meyveler sadece taze ve donmuş olarak tüketilmemekte aynı zamanda işlenmiş olarakta tüketilmektedir. Dutta

bulunun yüksek seviyelerdeki polifenoller, antioksidanlar, vitaminler ve minerallerdutları insan sağlığı için faydalı hale getirmektedir (84).

Polifenoller; hidroksisinnamik asitler, hidroksibenzoik asitler, proantosiyanidinler, antosiyaninler, flavonlar, flavanoller, izoflavonlar gibi çeşitli sınıflara ayrılırlar. Dut genomundaki değişikliklerin bu biyoaktif bileşenlerin konsantrasyonu üzerinde etkili olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur (85). Dutun içeriğinin insan sağlığı üzerinde potansiyel yararları olması nedeniyle bitkisel diyet takviyesi olarak kullanılmaktadır. Bir çok çalışmada dutların; antikanser, antioksidan ve antiproliferatif özellikleri olduğu gösterilmiştir (86,87).

Dutların anti-kanser etkisi bileşenleri; metabolize edici enzimlerin indüksiyonu, gen ekspresyonunun modülasyonu ve hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre içi sinyal yollarının üzerindeki etkileri de dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gösterilmektedir (88). Çilek ve karadut gibi bazı dut türlerinin gallik ve elajik asit gibi fenolik bileşik kaynağı olduğu ve dolayısıyla kanser önleyici aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (89).

İnsan sağlığı ile ilişkili fenolik bileşikler flavonoid, fenolik asit ve diğer 7 aktif bileşen içerir ve günümüzde oldukça büyük ilgi çekmektedir (90). Dutların içeriğinde fitokimyasallar, esansiyel mineraller, vitaminler ve yağ asitleri yer almaktadır. Dutlar; provitamin A, mineraller, vitamin C ve B-kompleks vitaminleri açısından oldukça önemli bir kaynaktır.

Dutların koruyucu etkilerinin en önemli nedeni antioksidan özellik göstermeleri ve serbest radikalleri yakalama kapasitelerinin mevcut olmasıdır. Flavonoidlerin aynı zamanda antioksidan özelliklerinin yanı sıra antiinflamatuvar, antiviral, antimikrobiyal, antialerjik, antitrombotik gibi özellikleri de bulunmaktadır (91).

2.3.3.Dutların Biyoaktif Bileşenleri

2.3.3.1.Vitaminler

Dutlar vitamin A, C ve E ile kompleks B vitaminlerini ihtiva eder. Bu vitaminler bağışıklık sistemini güçlendirmeye ve inflamasyonu azaltmaya yardımcı olur. Ayrıca kalp hastalığı, diyabet ve yaygın kanserler gibi kronik hastalıklara yol açan oksidatif stresin etkilerini uzaklaştırmaya yardımcı antioksidanlar olarak kabul edilirler (92, 93). Dutlar canlı sistemlerde bir çok role sahip suda çözünebilen bir bileşik olan askorbik asidin çok önemli bir kaynağıdır. Taze meyve ve sebzelerde oldukça fazla bulunur.

Tür, çeşitlilik, iklim, hava koşulları, bölge, olgunluk ve depolama süresi gibi çok sayıda faktördut meyvelerinin C vitamini içeriğini etkilemektedir (94).

2.3.3.2. Mineraller

Dutlar makro ve mikro besin kaynakları açısından oldukça zengindir. Dutlarda en çok fosfor, potasyum, magnezyum, kalsiyum, mangan, demir, bakır, sodyum ve alüminyum mineralleri bulunur. Diğer meyveli bitkilere nazaran dutlar demir, kalsiyum, fosfor ve sodyum mineralleri içermeleri açısından lider konumdadır (95). Bu mineraller insanlarda; su ve elektrolit denge, metabolik kataliz, oksijen bağlanma, hormon fonksiyonları, kemik ve membran düzenlenmesi gibi fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde önemli rol oynar (96).

2.3.3.3. Antosiyaninler

Antosiyaninler flavonoidlerin alt grubudur ve doğada yaygın olarak bulunurlar. Antosiyaninler yaban mersini, karadut, böğürtlen, çilek, lahana ve ıspanak gibi meyve ve sebzelerde oldukça fazla bulunur. Antosiyaninler kırmızı, mavi ve mor pigmentli dutlarda bulunur ve güçlü antioksidan olarak davranan renkli pigmentlerdir (97). Antosiyaninler yüksek antioksidan özellik gösterir ve bu özelliği çok sayıda hastalıktan koruma sağlar (98).

2.3.4. Dutların Sağlık Yararları

Çalışmalar dutların sağlıklı bir diyetin önemli bir parçası olduğunu göstermektedir. Dutlardaki çeşitli fitokimyasalların antioksidan özellik gösterdiği ve serbest radikallerin yol açtığı kronik hastalıklar ve yaşlanmaya karşı vücudu çeşitli hastalıklara karşı korumaya yardımcı olduğu düşünülmektedir.

Dutlar pek çok doğal antioksidanın; flavonoidler, fenolik asitler, vitamin C ve E'nin kaynağıdır. Dutların yüksek tanin içeriği ve antiseptik özelliği minor kanamaların tedavisinde etkili olmalarını sağlar. Dut fenolikleri içerisinde en çok çalışılan madde antosiyaninlerdir (87, 89). Dut fenolikleri en çok antioksidan olarak davranışlarıyla tanınır. Fakat in vivo yapılan çalışmalar dut fitokimyasallarının antioksidan dışında pek çok özellikleri olduğunu göstermiştir. Ayrıca dut fitokimyasallarının; nükleer reseptörlerin ve metabolizma enzimlerin aktivitelerinin, gen ekspresyonunun, hücre içi sinyal yollarının düzenlenmesinde ve DNA oksidatif hasarının tamiri gibi çok sayıda hücre fonksiyonunda etkili olduklarına dair kanıtlar artmaktadır(99,100).

Modern tıpta dutun tek kullanımı karaduttan elde edilen şuruptur. Karadut şurubu gargara olarak ağız ve boğaz hastalıklarına, özellikle de bebeklerde pamukçuklara karşı uygulanır. Karadut kök ve gövde kabukları idrar söktürücü ve tenya düşürücü olarak bilinir. Meyveleri iştah açar. Karadut yapraklarından, hafif kan şekerini düşürücü etkisi nedeniyle faydalanılır (89).

2.3.5.Antioksidan Özellikleri

Flavonoidler ve diğer fenoliklerden olan fitokimyasallar serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasara karşı hücreleri korumaya yardım eden antioksidan aktiviteleri olduğu düşünülmektedir. Son zamanlarda antioksidan özelliğinden dolayı dutların tüketiminde artış olmuştur. Serbest radikallerin hasar verici etkisine ve yaşlanma süreci ile ilişkili kronik hastalıklara karşı, antioksidanların vücudu korudukları düşünülmektedir.

Dutlarında yer aldığı taze meyveler ve sebzeler antosiyanin, vitamin C ve E gibi doğal antioksidanları içererek, düşük yoğunluklu lipopolisakkarit (LDL) oksidasyonunu inhibe eder ve antioksidan aktiviteyi artırırlar (101)

2.3.6.Antikanser Özellikleri

Bir çok in vivo yapılan araştırmada tümörojenik sürecinin farklı evrelerinde çeşitli dut özütlerinin antikarsinojenik etki gösterdiği kanıtlanmıştır (102). Dutlar antosiyaninlere ek olarak aynı zamanda, flavonol, fenolik asitler, ellajik asit, vitamin C ve E, folik asit ve B-sitosterol gibi diğer koruyucu etkili fitokimyasallarca da zengin doğal bir kaynaktır (103).

2.3.7.Antimutajenik Özellikleri

Dut özütlerinden çeşitli kimyasallar izole edilmiş ve bu özütlerde kanser hücre metabolizmasını bloke eden, kültürde kanser hücrelerini öldüren, serbest radikalleri inaktive eden, antiöstrojenik aktiviteyi artırıp mutajenezi inhibe eden antimutajenik aktivite olduğu bildirilmiştir (104,105). Hücre kültürü çalışmalarından çeşitli bitki özütlerinin kanser hücre hatlarının çoğalmasını engellediği ve pek çok bitki bileşiklerinden, özellikle kara duttan elde edilenlerin, saf formda oldukça yüksek antiproliferatif etki gösterdikleri bildirilmiştir (106,107).

2.3.8.Morus nigranın diğer sistemler üzerine etkisi

Morus nigra yaygın olarak asya , avrupa ve afrikada yetiştirilir. Çoğunlukla karadut olarak bilinir. Morus nigra bir antioksidan olarak raporlanmış, membran ve biyomoleküllere karşı olan oksidatif hasarı koruyucu etkisi raporlanmıştır. Önemli bitki-kimyasal içerikler yani flavonoidler , alkaloidler ve fenoller bu bitkinin içeriğinde olduğu raporlanmıştır. İçeriğindeki flavonoid bileşenin hepatoprotektif aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda parasetamol toksisitesinde, diabetik karaciğer hasarında , karbotetraklorürün oluşturduğu karaciğer hasarında koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (107).

2.4.Serbest Radikaller

Kimyasal bileşikler iki ve daha fazla elementin bir araya gelmesiyle aralarında kimyasal bağ kurulması sonucunda oluşur. Bileşiklerin kararlı ya da kararsız duruma geçmesi mevcut bağların çevresinde bulunan elektronların çiftlenmiş olup olmamasına bağlıdır. Eşlenmemiş elektron içeren, çok kararsız, diğer moleküllerle çok hızlı reaksiyona giren ve kimyasal olarak kararlı hale gelebilmek için elektron almaya gereksinim duyan moleküllere serbest radikaller denir.

Serbest radikaller organizmada oksijen kullanımı sırasında bir molekülün elektronunu alarak okside eder ve bu yeni molekülün kendisi bir serbest radikal haline dönüşür. Serbest radikaller normal metabolik faaliyetlerin bir yan ürünü olarak ve/veya kullanılan ilaçların, diğer zararlı kimyasalların ve radyasyonun etkisi ile oluşur. Hücrelere zarar verdiği bilinen serbest radikal türleri süperoksit anyonları (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil serbest radikali (OH) gibi mutajenlerdir. Bunlar farklı da olsa ortaya çıkan zincirleme reaksiyonlar sonucunda proteinler ve diğer makromoleküllerde tahribata hatta hücre ölümlerine neden olabilmektedir (108).

Serbest radikaller zararlarını hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipitlere saldırarak oluştururlar (109). Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için antioksidanlar üretilir böylece antioksidanlar hücrelerdeki serbest radikalleri nötralize etmeye çalışırlar (110). Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların detoksifikasyon hızı bir denge içerisinde ve bu duruma oksidatif denge denir. Oksidatif denge, hücreyi serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korur. Denge serbest radikaller lehine bozulursa hücrede serbest radikallerin miktarı artar. Serbest

radikallerin hücrede artışı ile hücre fonksiyonları olumsuz etkilenir ve bu duruma 'oksidatif stres' denir (110).

Oksijenden oluşan radikal grubu biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikallerdir (111). Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksitler, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüştürülür (112). Süperoksitlerden daha zayıf etkiye sahip olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (113).

Düşük ağırlıklı glutatyonun sentezi ve antioksidan aktivitesindeki döngüsü serbest radikaller, organizmada normal hücre metabolizması sırasında oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluşabildiği gibi çeşitli dış kaynaklı nedenlerle de oluşabilir. Oksidatif stres, serbest radikaller ve diğer reaktif türlerin antioksidanların varlığına zarar verdiğinde ortaya çıkar. Reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri ve antioksidan ajanlar fizyolojik sinyal, savunma, inflamasyon oluşumu ve varlığında temel rol oynar. Normal kararlı durum bozulduğunda, oksidan ve antioksidan arasındaki dengesizlik solunum ve solunum dışı bir dizi hastalığa sebep olarak patolojik reaksiyonları provoke edebilir.

2.4.1.Serbest Radikallerin Hücreler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller, hücre membranının stabilitesini bozarak, hızlı bir şekilde hücre ve doku hasarlarına sebep olurlar (114). Oluşan hasar neticesinde membranın yapısı ve fonksiyonları büyük oranda bozulur. Poliansature yağ asitlerinde (PUFA) oluşan oksidatif hasar membran lipitlerinin peroksidasyonu (LPO) olarak bilinmektedir (115). Lipid molekülünde iki doymamış yağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks olaya LPO denir (116). Lipitlerinin peroksidasyonu bir defa oluştuğundan sonra hücrede kendi kendine devam eden zincir tepkimeler başlar. Lipitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksil radikalleri (LOO.) bir sonraki PUFA'yı okside eder ve yeni zincirleme tepkimeleri başlatırlar (117). Devam eden tepkimeler sonucunda hidroperoksitler (LOOH) ve bunların da devam eden parçalanması ile daha şiddetli radikal özelliği Malondialdehit (MDA)'e dönüşürler. Dokuda MDA seviyesinin artması o dokuda serbest oksijen

radikallerinin arttığını gösterir (118). MDA'nın ölçümü, doku hasarının boyutunu belirlemeye yarayan önemli belirleyicilerden biridir (119).

Serbest oksijen radikalleri DNA hasarı yaparak en önemli hasarı meydana getirir (120). DNA molekülü yeniden sentezlenemeyen fakat kopyalanabilen bir molekül olduğundan DNA modifikasyonları mutasyonlara ve genetik bozukluklara sebep olmaktadır. Proteinler, DNA tamir enzimleri ve DNA polimerazlar serbest oksijen radikallerinin önemli hedefleri arasındadır. DNA molekülü hasarı sonucu yaşlanma, kronik inflamasyon, karsinogenezis, enfeksiyon, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojiler görülmektedir (121). Protein yapısındaki enzimlerin aktivitelerini serbest radikaller değiştirir, aynı zamanda membran transport proteinlerini ve reseptör etkileşimlerini bozabilirler (122).

2.4.2.Serbest radikallerin organizmaya etkileri:

Serbest radikaller oldukça reaktif moleküller olduklarından dolayı, hücre mekanizmasına ve yapı taşlarına zarar vererek membran fosfolipitleri başta olmak üzere karbonhidrat, lipit, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin yapısını bozar. Bunun neticesinde membranlar depolarize olmakta, parçalayıcı enzimlerin aktivitesi artmakta, hücre zarının elektrik yük dengesi ve geçirgenliği değişmektedir (123).

2.4.2.1.Membran Lipitleri Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen radikali ile hücre membran fosfolipidlerinin yapısını oluşturan poliansatüre yağ asitleri reaksiyona girerek lipid hidroperoksitlerini oluşturarak lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) oluşurken, doku ve kandaki MDA seviyesi lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Malondialdehit, hücre için çok toksik bir moleküldür. Malondialdehit aynı zamanda mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşik olarak kabul edilmektedir (124,125). Malondialdehit yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir göstergesi olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon sergiler.

2.4.2.2.Karbonhidratlara etkileri

Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu peroksidler ve okzoaldehidler oluşur. DNA, RNA, proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı “ okzoaldehidler” antimitotik etki göstererek, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Serbest radikaller, bu tür etkilerinden dolayı çok çeşitli hastalıklarınpatogenezinde önemli role sahiptirler.Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, psöriyazis, romatoid artrit, behçet hastalığı, koroner arter hastalığı, hipertansiyon, çeşitli deri, kas ve göz hastalıkları, kanser ve yaşlılık gibi birçok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu anlaşılmıştır (126).

2.4.2.3.Proteinlere etkileri

Serbest radikallerin proteinler üzerinde ciddi zararları vardır. Reaktif oksijenler peptid bağları ile ya da aminoasit yan zincirleri ile reaksiyona girerek proteinleri okside ederler (127). Proteinin yapısındaki amino asitlerle serbest radikaller reaksiyona girerek sülfidril gruplarının kaybına ve karbonil gruplarının oluşmasına sebep olurlar. Özellikle yapısında çift bağ içeren fenilalanin, histidin, triptofan, trozin ve sülfidril grubu içeren metiyonin ve sistein serbest radikallerle reaksiyona geçerler. Reaksiyonlar sonucunda oksidatif stres ürünleri olan glutatyon (GSH) gibi tiyollerin (R-SH) 18 oksidasyonu, tiyol ve oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olurlar. Bunlar sülfür merkezli radikallerdir (R-SH) ve proteinlerdeki homolitik sülfürlerin karşılıklı fisyon reaksiyonları disülfid bağını oluşturur. Böylece proteinlerin yapısını bozarak vücuttaki metabolik aktivitelerini bloke eder (128, 129). Serbest radikallerin neden olduğu hasar sonucunda proteinlerde çapraz bağlanma, protein agregasyonu meydana gelir. Proteinlerin, ROS hasarından ne derecede etkileneceği aminoasit bileşimlerine bağlıdır. Proteinin hücresel lokalizasyonuna ve radikalın toksisite gücüne göre protein harabiyet boyutları değişebilir (130).

2.4.2.4.Nükleik asitlere etkileri

DNA molekülü üzerinde oluşan hasar serbest oksijen radikallerinin en önemli hasarlarından biridir (120). DNA molekülü kopyalanabilen fakat yeniden sentezlenemeyen bir molekül olduğundan DNA modifikasyonları, mutasyonlara ve

genetik bozukluklara sebep olur. Serbest oksijen radikallerinin major hedefleri arasında proteinler, DNA tamir enzimleri ve DNA polimerazlar bulunmaktadır (105, 131). Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla etkileşime girerek değişikliklere sebep olur. Sitotoksiste, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklarla ilişkilidir (132). Radikaller, protein yapısındaki enzimlerin aktivitelerini değiştirir (122). Serbest radikaller, DNA üzerinde etkiyle hücrede mutasyona ve ölüme sebebiyet verirler. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna neden olurlar. Hatta hücre ölümüne yol açabilir (133).

2.4.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek biyomoleküllerin oksidasyonunu önleyen ya da geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olay antioksidan savunma olarak tanımlanır (134). Organizmada oluşan bir oksidatif stres durumuna karşı antioksidanlar DNA'yı, lipidleri, karbohidratları, proteinleri ve diğer oksitlenebilir substratları oksidasyona karşı muhafaza ederler. Serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidasyon dokuların yaşlanmasına, kanser ve kalp-damar rahatsızlıkları gibi bazı hastalıklara sebep olurlar (135).

Canlı organizmalarda, oksidatif harabiyetin önlenmesi, sınırlanması ya da kısmen düzeltilmesini sağlayan koruyucu mekanizmalar mevcut olup, oksidan ürünlere karşı korunma, oluşan radikallerin detoksifikasyonu, radikal reaksiyonların sona erdirilmesi ve radikal oluşumunun sınırlandırılması şeklinde gelişir (134). Oksidanların organizmadaki düzeylerini arttıran etkenleri ve risk faktörlerini iyi belirlemek ve bunlardan uzak durmak ilk yapılması gereken girişim olmalıdır. İkinci girişim ise ROS'larla tetiklenen biyokimyasal reaksiyonları bir ya da birkaç basamağında bloke etmektir. Üçüncü girişim, oluşan mediyatörlerle aktive olan inflamatuvar hücrelerinin lezyon yerine hücumunu ve orada aşırı birikiminin önlenmesidir. Oksidan moleküllerle mücadelede esas girişim ise belirli düzeyi aşmış oksidanlara direkt olarak etki edip onları pasif hale getiren antioksidanlardır. Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır. İnsanda bellibaşlı hücre içi antioksidanlar

süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. Süperoksit dismutazın yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx'de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metalloenzim olarak da isimlendirilirler. Hücre dışı antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, haptogloblin, seruloplasmin, albumin, bilirubin, β -karoten ve α -1 antitripsin sorumludur (120).

2.4.4.Total Oksidatif Durum (Stres)

Dolaşımdaki reaktif oksidan radikallerinin düzeyleri ayrı ayrı ölçülüp hesaplanabilmektedir. Artan reaktif oksidan radikallerinin oksidasyon etkileri birbiri üzerine eklenebilir. Aynı zamanda ayrı ayrı ölçüm yapmak yerine total ölçümün pratik olarak daha yararlı olabileceği düşünülmüş ve total oksidatif stresi gösterebilecek bir ölçüm geliştirilmiştir. Bu ölçüm metodu ile in vitro Total Oksidatif Stres (TOS) hesaplanabilmektedir. Vücut sistemindeki oksidan-antioksidan durumunun oksidanlar yönünde bozulması sonucunda ortaya çıkan anormal durum oksidatif stres olarak adlandırılmıştır. Sistemdeki oksidatif stresin toplam seviyesi TOS şeklinde gösterilmektedir. Oksidatif ortam; aşırı miktarda serbest reaktif oksijen radikalının yada nitrojen radikallerinin bulunması veya antioksidan kapasitesinde azalma ile meydana gelir. Reaktif oksijen türlerindeki artma ile hücre yapısındaki lipit, protein ve DNA gibimoleküllerde hasar oluşmaktadır (136,137).

2.4.5.Total antioksidan Durum (Stres)

Endojen yada eksojen sebeplerle oluşan serbest oksijen türlerini ve bu oksijen radikallerine bağlı gelişen oksidatif stresi antogonize eden antioksidan molekülleri fizyolojik ortamda organizmada bulunmaktadır.Total antioksidan durumun az bir bölümü hariç başlıca dolaşımdaki antioksidan moleküllerinden meydana gelmektedir. Transferrin ve seruloplazmin benzeri antioksidanlarla birlikte serbest oksijen radikallerini temizleyen zincir kırıcı özelliği olan antioksidanlar mekanizmalarda dolaşımda mevcuttur. Ürik asit, albümin ve askorbik asit türünden antioksidanlar ise dolaşımdaki TAS'ın yaklaşık % 85'ini meydana getirir. Antioksidan moleküller dolaşımda kendi aralarında da etkileşim halindedirler. Böylece antioksidanlar tek başlarına meydana getirdikleri toplam etkiden daha fazla antioksidan etki gösterebilmektedirler.

Askorbatın glutasyon tarafından, alfa tokoferolünde askorbat tarafından tekrar aktive edilmesi bu sinerjistik özelliğe örnek olabilir. Vücutta meydana gelen oksidatif stresin antagonize edilmesinde plazma dolaşımı çok kritik bir rol üstlenmektedir. Kan; antioksidan molekülerinin vücuttaki tüm dokulara ulaşmasını sağlar Bunun içindir ki TAS'ın tespiti antioksidanların tek tek ölçümü ile hesaplanmasından daha fazla anlam taşır (136,138).

2.4.6.Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Oksidatif Stresin bir belirteci olarak tanımlanan Oksidatif Stres İndeksi (OSİ); TOS değerinin TAS değerine oranının yüzde olarak tanımlanmasıdır.Oksidatif Stres İndeksi hesaplamasında TAS seviyeleri μmol birimine dönüştürülür. Oksidatif Stres İndeksi'nin birimi Arbitrary Units (AU)'dir.

$$\text{OSI (arbitraryunit)} = [\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L})/\text{TAS } (\mu\text{molTroloxEq/L})] \times 100. (136).$$

III.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan hayvanlar Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiş ve T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 08.11.2016 tarih ve 77.637.435-64 sayılı karar ile etik onay belgesi alınmıştır.

Çalışmada 56 adet erişkin dişi 250-300gr ağırlığında Wistar sıçan kullanıldı. Farelerin bakımı ve gözlem süreci Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Fareler uygun kafeslerde oda sıcaklığı 24 ± 1 °C' de, 12 saat aydınlık/karanlık siklusu içinde ve günde bir kez temizlenen kafeslerde standart laboratuvar diyetiyle beslendi, su alımları serbest bırakıldı.

Deneysel grupları her grupta 14 hayvan olacak şekilde 4 grup halinde oluşturuldu. Gruplardaki denekler 4. ve 6. gün uygulamaları olmak üzere her bir grupta 7 denek olacak şekilde 2 alt gruba ayrıldı.

Tablo 4: Deneysel gruplarının oluşturulma biçimi

Gruplar	Uygulama	4. gün	6. gün
Grup 1	30mg/kg MTX	7	7
Grup 2	30mg/kg MTX + 500mg/kg Morus nigra ekstresi	7	7
Grup 3	0.001ml/kg-2.5ml/kg intragastrik salin solüsyonu	7	7
Grup 4	500mg/kg Morus nigra ekstresi	7	7

Birinci grup, birinci gün 30mg/kg metotreksatin intraperitoneal verilmesiyle oluşturuldu. İkinci gruba ise ilk gün 30mg/kg MTX intraperitoneal olarak verildi aynı zamanda birinci gün MTX verildikten sonra başlamak üzere birinci alt gruba dört gün ve ikinci alt gruba altı gün boyunca oral yoldan gavaj yardımıyla 500mg/kg Morus nigra ekstresi hayvanlara verildi. Üçüncü gruba ise yalnızca 0.001ml/kg-2.5ml/kg birinci alt gruba dört gün ve ikinci alt gruba altı gün boyunca intragastrik salin solüsyonu verildi. Dördüncü Gruba ise oral yoldan gavaj yardımıyla 500mg/kg olacak

şekilde birinci alt gruba 4 gün ve ikinci alt gruba 6 gün boyunca Morus nigra ekstresi verildi.

Denekler 4. veya 6. günde çalışma gruplarına göre sakrifikasyonu genel anestezi altında yapıldı ve steril şartlarda kardiyak kanları (yaklaşık olarak her hayvandan 3 ml) alınarak barsak dokuları çıkarıldı. Çıkarılan her bir barsak dokusunun total olarak uzunlukları ölçüldü. Daha sonra barsak örnekleri duodenum, jejunum ve ileum kısımları ayrılarak %10 luk formalin solüsyonu içerisinde fiksasyon için alındı. Solüsyon içerisindeki 1 saatlik bekleme süresinin ardından barsak içerisindeki feçes artıkları %10 luk formalin solüsyonu ile yıkanarak temizlendi ve tüm örnekler 24-48 saat tespit solüsyonunda tutuldu.

3.1.Parafin doku takibi

Fiksasyon işleminden sonra tüm örnekler bir gece boyunca akar su altında bekletildi. Ardından %60, %70 ve % 80'lik alkol solüsyonunda 30 ar dk bekletildikten sonra %100 alkolde 1 saat ve değişim olacak şekilde dehidratasyon işlemi yapıldı. Ksilen:alkol solüsyonu içerisinde 30 ar dk bekletilmenin ardından ksilene alındı ve 1 saat, 2 değişim olacak şekilde bekletilerek şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra tüm örnekler ksilen;parafin karışımında 30 dk bekletildi ve parafin içerisinde bloklandı. (Tablo 5).

Tablo 5:Doku takibi protokolü.

Akar suda yıkama	1 gece
%60 Alkol	30 dk
%70 Alkol	30 dk
%80 Alkol	30 dk
%100 Alkol	1 saat
%100 Alkol	1 saat
Abs.Alk.+ Ksilen	30 dk
Ksilen	1 saat
Ksilen	1 saat
Ksilen + Parafin	30 dk(60°C etüvde)
Parafin	1saat(60°C etüvde)
Parafin	1 saat(60°C etüvde)
Bloklama	

3.2.Histokimyasal boyama

Hayvanlardan alınan örnekler 5 mikron olacak şekilde kesitleri alındı ve parafinizasyon için 60°C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün ksilende 1 saat bekletildikten sonra 5 dk akarsuda yıkama işlemi yapıp % 96, % 80, % 70 ve % 60 alkol serilerinde 2'şer dk bekletildi. Tekrar 5 dk akarsuda yıkanan kesitler hematoksilende (Haematoxylinharris, RRSP67/E) 3 dk bekletildi. Ardından 5 dk akarsuda yıkama yapıldı ve %1 lik asit-alkol solusyonuna batırılıp çıkartıldı. Yeniden akarsuda 5 dk yıkama yapıldı ve 1 dk eosin (Surgipath, Unno1989, 01601E) ile boyandı. Akarsuda 5 dk yıkanan kesitler % 80 ve % 96 alkol serilerinde 1 dk bekletildi ve kesitler kurutulduktan sonra ksilende 1 saat bekletildi. Tüm boyalı preparatlar entellan (Spring bioscience, DMM-125) ile kapatılarak ışık mikroskobu (Olympus, BX43) altında incelendi (Tablo 6).

Tablo 6: Hematoksilin- eozin boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dk
Ksilen		30 dk
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dk
	% 80 alkol	2 dk
	% 70 alkol	2 dk
	% 60 alkol	2 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
Boyama	Hematoksilen	3 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	1 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
Dehidratasyon	% 80 alkol	1 dk
Dehidratasyon	% 95 alkol	1 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama		Entellan

3.2.1.Doku immunohistokimya boyaması

Örneklerden alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60° C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dk iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dk bekletildi. Immunohistokimya kalemi ile (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan örneklere % 0,5'lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dk tutuldu. Kesitlerin 3 defa 5'er dk fosfat tamponu (PBS) ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk % 3'lük H₂O₂ uygulandı. Kesitler 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandıktan sonra 10 dk bloklama solüsyonu (85-9043, Histostainplus kit, Invitrogen) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra kesitler 1/100 dilüsyon ile hazırlanmış anti- Myeloperoksidase (D3ZGE2), anti-Kİ 67 (ABM40064, Abbkine), anti-TNF- α (ABP52624, Abbkine), anti-IL-1 β (Abp51611, Abbkine) ve anti-Malondialdehyt (ab6463, Abcam) primer antikoları ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse –anti rabbit biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-9043, Histostainplus kit, Invitrogen) ile her bir boyama basamağı dk 30'ar dk olacak şekilde boyandı. Basamaklar arasında 3 defa 5'er dk PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB, 71897, 71898, Milipore) ile 5 dk boyandı. Mayer'shematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile 2 dk bekletilerek artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma vasatı (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı (Tablo 7).

Tablo 7: Doku İmmunohistokimyası boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 dk
	Ksilen	30 dk
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dk
	% 80 alkol	2 dk
	% 70 alkol	2 dk
	% 60 alkol	2 dk
Yıkama	PBS	10 dk
Bloklama	Tripsin	15 dk
		(370C)
Yıkama	PBS	3X5 dk
Endojen peroksidazların bloklaması	%3 Hidrojen Peroksit	5 dk
Yıkama	PBS	3x5 dk
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Birincil Uygulaması	Antikor Myeloperoksidase (Biorbyt CAT NO: D3ZGE2) Kİ 67 (Abbkine CAT NO: ABM40064) TNF- α (Abbkine CAT NO: ABP52624) IL-1 β (Abbkine CAT NO: Abp51611) Malondialdehyt(AbcamCAT NO:ab6463)	1 gece, 4°C de
Yıkama	PBS	3x5 dk
İkincil antikor Uygulaması	Biotinlenmiş antimouse veya anti-rabbit	30 dk
Yıkama	PBS	3x5 dk
Kromojen	DAB	5 dk.
Yıkama	Distile su	3x5 dk.
Zıt Boyama	Mayer hematoksilen	5 dk
Yıkama	Distile su	10 dk
Dehidratasyon	Alkol (%80, %90, %100)	2 şer dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	60 dk
Kapatma	Entellan	

3.3.Biyokimyasal analizler

Ratlardan kan örnekleri intrakardiyak olarak lityum heparinli tüplere alındı. Kan örnekleri 3500 rpm de 10 dk santrifüj edilerek plazma ayrılmış ve toplu olarak analiz edilinceye kadar -80°C de saklandı.

Plazma örneklerinde total oksidan status (TOS) ve total antioksidan status düzeyleri (TAS) ticari kitlerle (RelAssay Gaziantep, Türkiye) analizleri analizörde spektrofotometrik metod ile analiz edildi. TOS analizinde spektrofotometrik olarak örnekteki total antioksidan moleküller analiz edildi, kit hidrojen peroksid ile kalibre edildi. Sonuçlar mikromol hidrojen peroksid eşdeğeri /litre ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Eq/L}$) olarak verildi (139).

TAS analizi ABST (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radikal katyonunun antioksidan etkisi üzerinden analiz edilmiştir ve sonuçlar mikromol Trolox eşdeğeri /L olarak verildi.(140).

Oksidatifstress indeksi (OSI) oksidatifstress göstergesidir. TOS/TAS oranı olarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır. (141)

$$\text{OSI (arbitraryunit)} = [\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L})/\text{TAS } (\mu\text{molTroloxEq/L})] \times 100.$$

3.4.Morus Nigra'nın elde edilişi

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında meyveler oda sıcaklığına getirilip bir blender yardımıyla homojenize edildi. 1 k meyve homejenizatına karşı 10 k olacak şekilde %70'lik sulu etanol ile 24 saat çalkalayıcıda masere edildi ve daha sonra filtre kağıdından süzüldü. Süzüntü rotavaporda alçak basınçta kuruluğa kadar uçuruldu. Ele geçen ekstre analiz yapılana kadar buzdolabında saklandı.

3.5.İstatistiksel yöntemler

Değişkenlerin analizinde SPSS 25.0(IBM Corporation, Armonk, New York, United States) programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Lilliefors düzeltmeli Kolmogorov-Smirnov testi ve Shapiro-Wilk testi ile varyans homojenliği Levenetesti ile değerlendirildi. Bağımsız iki grubun nicel verilere göre birbiri ile karşılaştırılmasında Independent-Samples T testi Bootstrap sonuçlarıyla birlikte

kullanılırken Mann-Whitney U testi Monte Carlo simülasyon tekniği ile kullanıldı. Bağımsız çoklu grupların nicel verilere göre birbiriyle karşılaştırılmasında parametrik yöntemlerden One-WayAnov testi kullanılırken nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis H Testi Monte Carlo simülasyon tekniği sonuçları ile kullanılmış olup Post Hoc analizleri için Dunn's Test kullanıldı. Nicel değişkenler tablolarda ortalama±std.(standart sapma) ve medyan (Minimum/ Maximum), kategorik değişkenler ise n (%) olarak gösterildi. Değişkenler %95 güven düzeyinde incelenmiş olup p değeri 0,05 ten küçük anlamlı kabul edildi.



IV.BULGULAR

4.1.Makroskobik bulgular

Deneylere uygulama sonrasında çalışmamızda da nedeni bilinmeyen şekilde dördüncü gün üçüncü gruptan iki adet rad ve altıncı gün ikinci gruptan bir rad, üçüncü gruptan bir rad kaybı oldu. Diğer deneklerin MTX uygulamasından sonra ilacı tolere edebildi, güçsüzlük, kilo kaybı, ateş gözlenmedi. Çalışmada MTX ve ekstrak uygulaması sonrasında grup 1, 2 ve 4. grup deneklerde defekasyonun sulu olduğu tedavinin 3.gününde gözlemlendi. Fakat deneklerde bunun dışında bir klinik bulguya rastlanmadı. Her grup denekten sakrifikasyon sonrasında barsak dokuları çıkartılarak hem makroskobik gözlem yapıldı hemde barsak parçalarının uzunlukları ölçüldü. (resim 6), (resim 7). Makroskobik gözlem sonunda grup 1 ve 2 de bağırsak anslarının yer yer şiş ve ödemli olduğu, grup 1 de yer yer hiperemik kanama odakları gözlemlendi. Grup 3 ve 4 ise bağırsağın hiçbir segmentinde makroskobik değişiklik gözlenmedi. Ayrıca dört grupta patolojik boyutta mezenterik lenf noduna rastlanmadı.



Resim 6: Rad'ların dekapitasyon sonrası intestinal dokuların çıkarılması ve kan örneği alınması (A: Normal intestinal doku görünümü, B: Konjesyone, ödemli bağırsak duvarı)

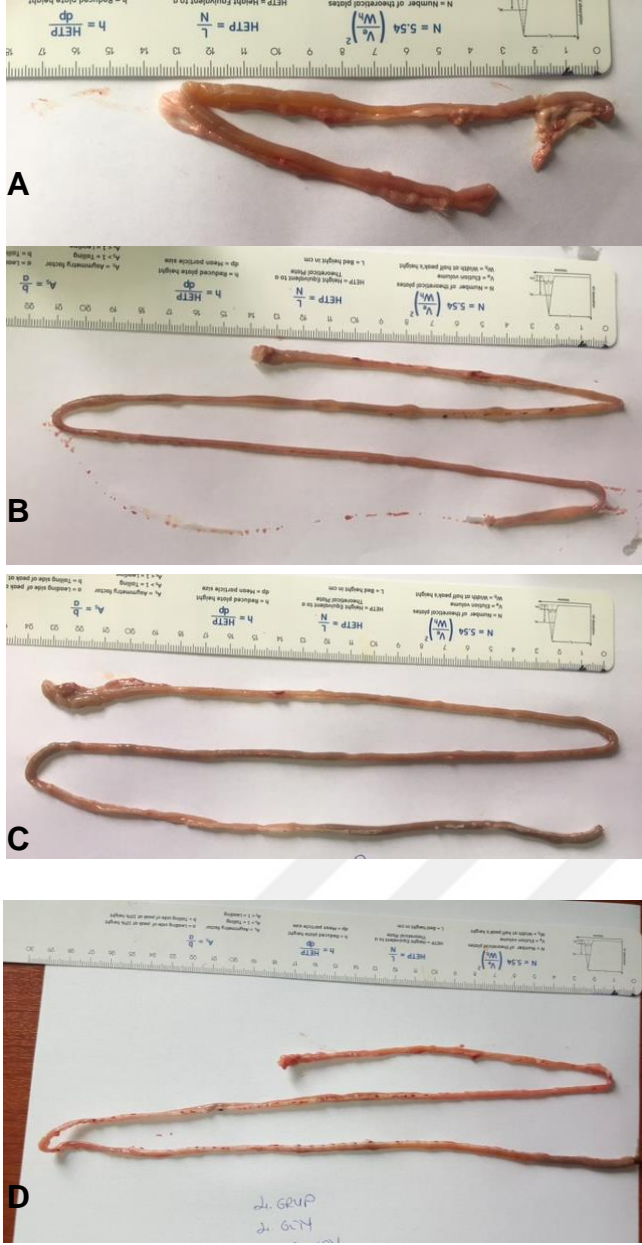
Bağırsak uzunlukları incelendiğinde, 4.ve 6.günlerde yalnızca MTX alan grup 1 ve MTX Morus nigra alan grup 2 bağırsak uzunluklarının 1. grupta sırasıyla dördüncü

gün 23, 44, 33 cm, altıncıgün 30, 25, 24 cm ve 2. grupta dördüncü günde sırasıyla 38, 58, 67 cm, altıncı gün 32, 38, 20 cm saptandı. Bu sonuçlar grup 3 ve grup 4 ile karşılaştırıldığında daha kısa olduğu gözlemlendi (Tablo: 8).

Tablo 8: 1.2.3.ve 4. Gruplarında bulunan 3'er adet rad'ın dördüncü ve altıncı gün bağırsak uzunlukları (1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)

BARSAK UZUNLUKLARI		1.HAYVAN	2.HAYVAN	3.HAYVAN
1.GRUP	4 . gün	23	44	33
	6. gün	30	25	24
2.GRUP	4. gün	38	58	67
	6. gün	32	38	20
3.GRUP	4. gün	69	64	65
	6. gün	48	28	41
4.GRUP	4. gün	56	61	65
	6. gün	28	32	31

Bağırsak uzunlukları açısından grup 1 ve 2 karşılaştırıldığında ise grup 2 bağırsak uzunluğunun grup 1 den daha fazla olduğu saptandı (Tablo 8). Grup 2 de 6. günde bağırsak uzunluğunun grup 1 e kıyasla daha uzun olduğu, fakat 6. gün barsak uzunluklarının 4. güne göre daha kısa olduğu gözlemlendi.



Resim 7: Radların bağırsak uzunluklarının makroskopik görünümü (A: 1.grup 4. Gün 23cm , B: 2.grup 4.gün 58 cm , C: 3.grup 4.gün 69 cm , D: 4.grup 4.gün 65)

4.2.Histokimyasal bulgular(H-E)

4.2.1.Işık mikroskopik bulgular

Işık mikroskopik analiz sonucunda grup 1 duodenum, jejunum ve ileum örneklerinde yer yer epitelial düzensizlikler olduğu, laminapropriada PNL ve kanama odakları olduğu gözlemlendi. Grup 2 de epitelial düzensizliklerin azaldığı, PNL infiltrasyonunu olduğu, fakat eritrositlerin laminapropriada olmadığı gözlemlendi. Grup 3

ve 4 deki tüm barsak örneklerinde tek katlı prizmatik epitelin varlığı, gevşek bağ dokusu karakterinde laminapropriasi normal olarak değerlendirildi. Tüm grup bağırsak örneklerinde muskular ve adventisya tabakalarında herhangi bir histolojik değişiklik gözlenmedi.

4.3.İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmün boyamalar kullanılan DAB kromojeni nedeni ile kahverengi olarak görülmektedir. Boyanma görülmeyen resimler 1 olarak skorlanır iken, boyanma yoğunluğuna göre her bir antikorun her bir dokudaki boyanma şiddeti 2, 3 veya 4 olarak değerlendirildi. Her bir grupta bulunan deneklerden yapılan boyanmalarının ortalamaları tablo 9, 10, 11 de verilmiştir.

Tablo 9: Duodenumun her bir grupta bulunan deneklerden yapılan boyanmaların ortalamaları (E: Epitel, LP:laminapropria, 1.grup:mtx grubu , 2.grkup:mtx+morus nigra grubu , 3.grup:salin solüsyonu grubu , 4.grup:morus nigra grubu).

DUODENUM	IL-1	Kİ-67	TNF-ALFA	MDA	MPO
1.GRUP	4. gün				
E	3	1	3	4	3
LP	3	1	3	3	3
	6. gün				
E	3	1	3	4	4
LP	3	1	2	3	4
2.GRUP	4. gün				
E	3	1	4	4	1
LP	3	2	4	4	2

	6. gün					
	E	2	1	2	2	1
	LP	2	1	3	2	2
3.GRUP	4. gün					
	E	3	2	1	2	1
	LP	2	1	1	1	1
	6. gün					
	E	1	1	1	1	1
	LP	1	1	1	1	1
4.GRUP	4. gün					
	E	3	1	3	2	1
	LP	2	1	2	2	2
	6. gün					
	E	2	2	2	1	1
	LP	2	1	1	1	1

Tablo 10: Jejenumun her bir grupta bulunan deneklerden yapılan boyanmaların ortalamaları (E: Epitel, LP:laminapropria, 1.grup:mtx grubu , 2.grup:mtx+morus nigra grubu , 3.grup:salin solüsyonu grubu , 4.grup:morus nigra grubu).

JEJENUM	IL-1	Kİ-67	TNF-ALFA	MDA	MPO	
1.GRUP	4. gün					
	E	4	1	4	3	4
	LP	4	1	4	3	4

6. gün

E 3 1 4 4 4

LP 4 1 4 4 4

2.GRUP

4. gün

E 2 2 3 3 2

LP 3 3 3 4 3

6. gün

E 2 1 4 2 4

LP 3 1 4 3 3

3.GRUP

4. gün

E 2 3 2 1 2

LP 1 1 2 1 1

6. gün

E 2 2 2 2 1

LP 2 2 1 1 2

4.GRUP

4. gün

E 2 2 3 2 2

LP 3 1 2 1 3

6. gün

E 2 1 3 2 2

LP 2 1 2 3 2

Tablo 11: İleumun her bir grupta bulunan deneklerden yapılan boyanmaların ortalamaları (E: Epitel, LP:laminapropria, 1.grup:mtx grubu , 2.grup:mtx+morus nigra grubu , 3.grup:salin solüsyonu grubu , 4.grup:morus nigra grubu).

İLEUM	IL-1	Kİ-67	TNF-ALFA	MDA	MPO	
1.GRUP	4. gün					
	E	4	1	3	4	4
	LP	3	2	4	4	4
	6. gün					
	E	4	1	2	4	4
	LP	4	1	4	4	4
2.GRUP	4. gün					
	E	3	1	4	4	3
	LP	3	2	4	3	3
	6. gün					
	E	2	1	2	2	4
	LP	2	2	2	1	3
3.GRUP	4. gün					
	E	2	3	2	2	2
	LP	2	3	3	2	1
	6. gün					
	E	2	2	2	2	2
	LP	1	2	2	2	1

4.GRUP**4. gün**

E	2	2	2	2	2
LP	1	1	1	2	1

6. gün

E	2	2	2	2	3
LP	1	2	2	1	2

4.3.1.IL-1 immunoreaktivitesi

Duodenum 4.gün IL-1 immunoreaktivitesi tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. IL-1 immunoreaktivitesi grup 1 ve grup 2 örneklerinde epiteldeve laminapropriada (3) olarak saptanır iken, kontrol grubu olan grup 3 de ise epitelde IL-1 immunoreaktivitesi (3), laminapropriada ise (2) olarak saptandı. Grup 4 de epiteldeki IL-1 immunoreaktivitesi (3) ve laminapropria da ise (2) olduğu izlendi. (Resim 8, Tablo 9)

Duodenum 6.gün IL-1 immunoreaktivitesi tüm gruplarda epitelde saptanır iken laminapropria da grup 3 haricinde tüm gruplarda saptandı. IL-1 immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropriada (3) olarak saptanır iken, grup 2 ve grup 4 de epiteldeki ve laminapropriadaki IL-1 immunoreaktivitesinin (2) olduğu izlendi. Kontrol grubu olan grup 3 de ise epiteldeve laminapropriada (1), boyanma gözlenmedi (Resim 9, Tablo 9).

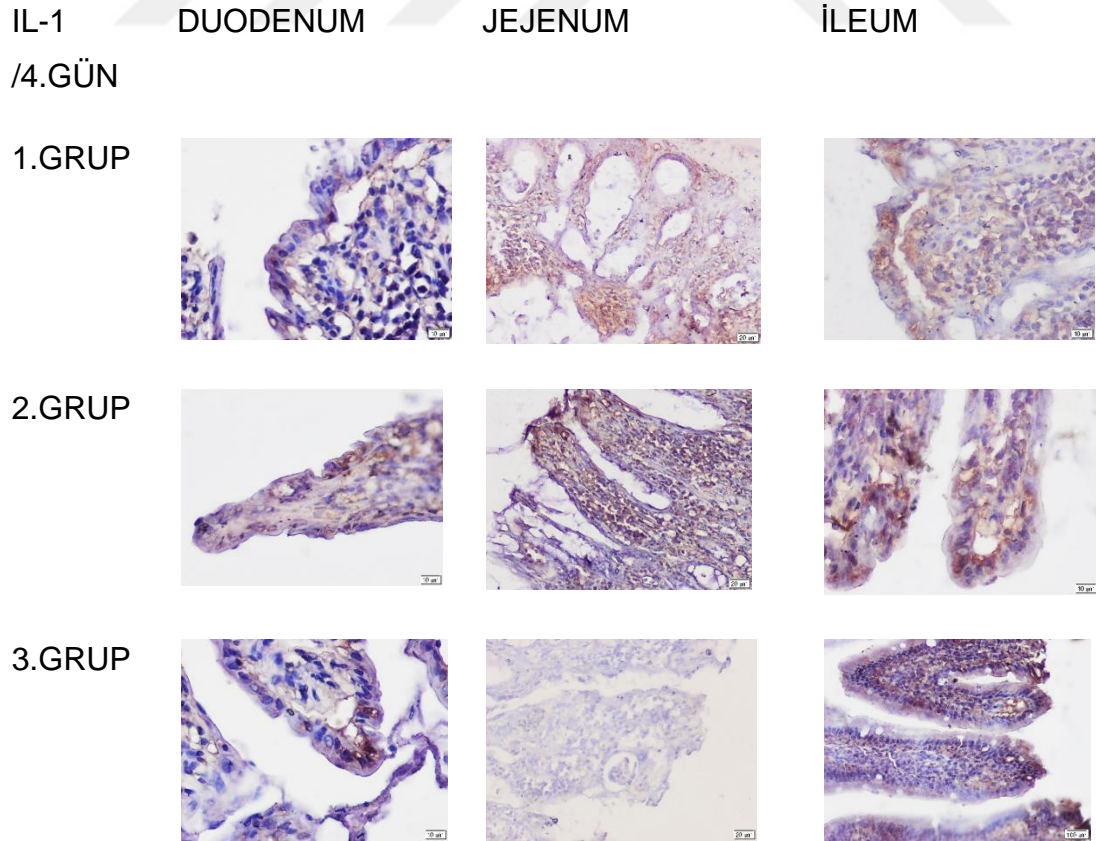
Jejenum 4.gün IL-1 immunoreaktivitesitüm gruplarda epitel de saptanır iken laminapropria da ise grup 3 haricinde tüm gruplarda saptandı. IL-1 immunoreaktivitesi grup 1 de epitel de ve laminapropria da (4) olarak saptanır iken, grup 2 ve grup 4 örneklerinde epitelde (2) ve laminapropriada (3) olarak saptanır iken grup 3 de epitelde (2) ve laminapropria(1) boyanma saptandı (resim 8, Tablo 10).

Jejenum 6.gün IL-1 immunoreaktivitesi tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. IL-1 immunoreaktivitesi grup 1 epitelde (3) ve laminapropria da (4) saptanır iken grup2 örneklerinde epitelde (2) ve

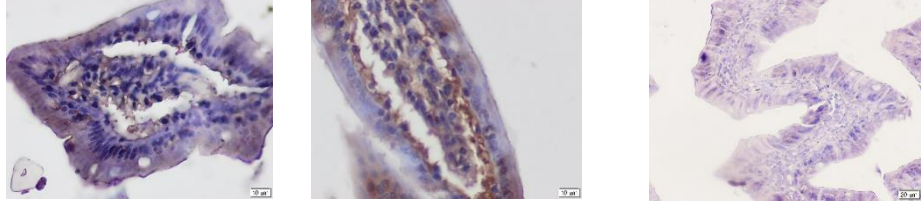
laminapropriada (3) boyanma saptandı. Grup 3 ve grup 4 de epitelde ve laminapropria da (2) boyanma saptandı (Resim 9, Tablo 10).

İleum 4.gün IL-1 immunoreaktivitesi grup 4 laminapropria haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. IL-1 immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde (4) ve laminapropria (3) saptanır iken, grup 2 de ise epitelde ve laminapropria da (3) boyanma gözlemlendi. Grup 3 de ise epitel de ve laminapropria da(2) boyanma gözlemlendi. Grup 4 de ise IL-1 immunoreaktivitesinin epitelde (2) boyanma gözlenirken , laminapropria da boyanma gözlenmedi (1) (Resim 8, Tablo 11).

İleum 6.gün IL-1 immunoreaktivitesi grup 3 ve 4 laminapropria haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria saptandı. IL-1 immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropria da saptanır iken, grup 2 de ise epitelde ve laminapropria da (2) boyanma gözlemlendi. Grup 3 de ve grup 4 de ise epitel de (2) ve laminapropria da ise boyanma gözlenmedi (1)(Resim 9, Tablo 11).



4.GRUP



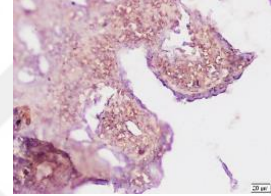
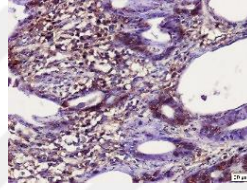
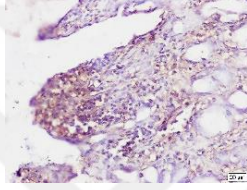
Resim 8: IL-1'in 4.gün immünohistokimyasal görüntüleri (1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)

IL-1 /6.GÜN DUODENUM

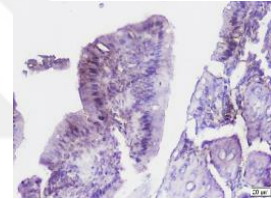
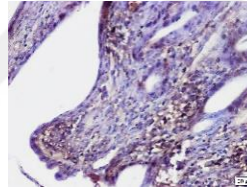
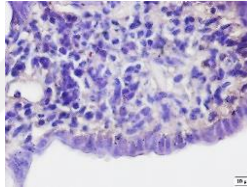
JEJENUM

İLEUM

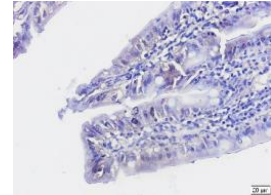
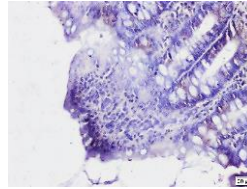
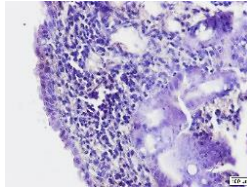
1.GRUP



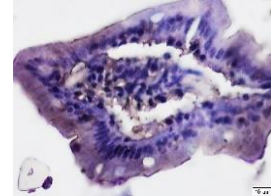
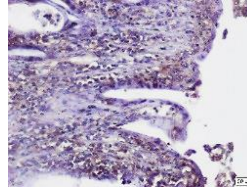
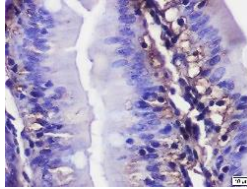
2.GRUP



3.GRUP



4.GRUP



Resim 9: IL-1'in 6.gün immünohistokimyasal görüntüleri (1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)

4.3.2.Kİ-67 immunoreaktivitesi

Duodenum 4.gün Ki-67 immünoreaktivitesi 1.ve 4 grupta epitel ve laminapropria da (1) boyanma gözlenmez iken grup 2 de epitelde boyanma gözlenmedi (1) fakat laminapropria da boyanma (2) ile uyumlu saptandı. Grup 3 de epitelde (2) boyanma gözlenirken laminapropria da (1) boyanma gözlenmedi (Resim 10, Tablo 9).

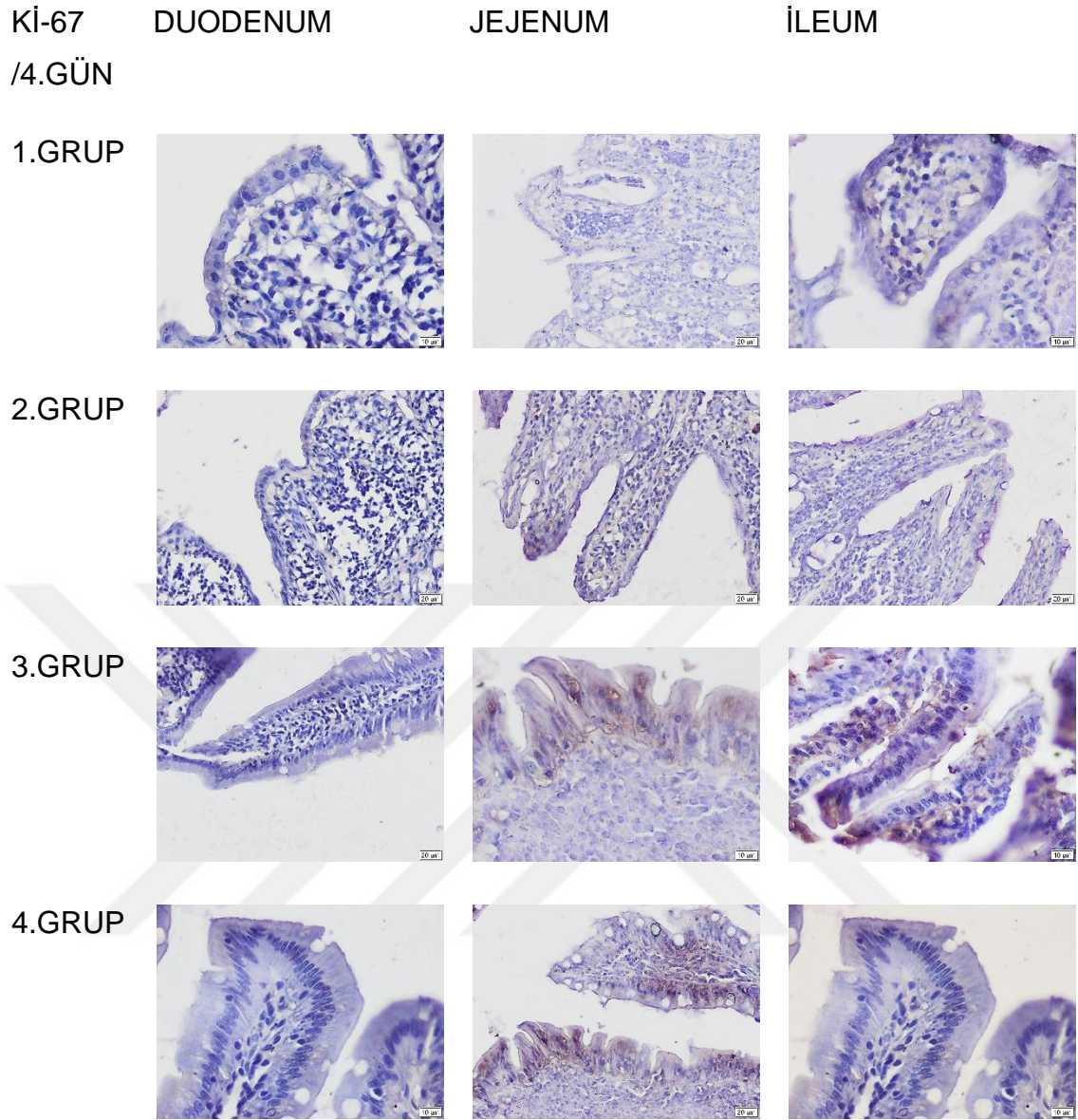
Duodenum 6.gün Ki-67 immünoreaktivitesi 1. 2. 3.grupta epitelve laminapropria da (1) boyanma gözlenmez iken grup 4 de epitelde (2) boyanma gözlendi ve laminapropria da boyanma gözlenmedi (1)(Resim 11, Tablo 9).

Jejenum 4.gün Ki-67 immünoreaktivitesi 1.grupta epitel ve laminapropria da boyanma gözlenmezken (1) grup 2 örneklerinde epitelde (2) ve laminapropria (3) saptandı. Grup 3 epitelinde boyanma (3) ile uyumlu iken laminapropria da(1) boyanma saptanmadı. Grup 4 epitelinde (2) boyanma gözlenir iken laminapropriasında (1) boyanma gözlenmedi (Resim 10, Tablo 10).

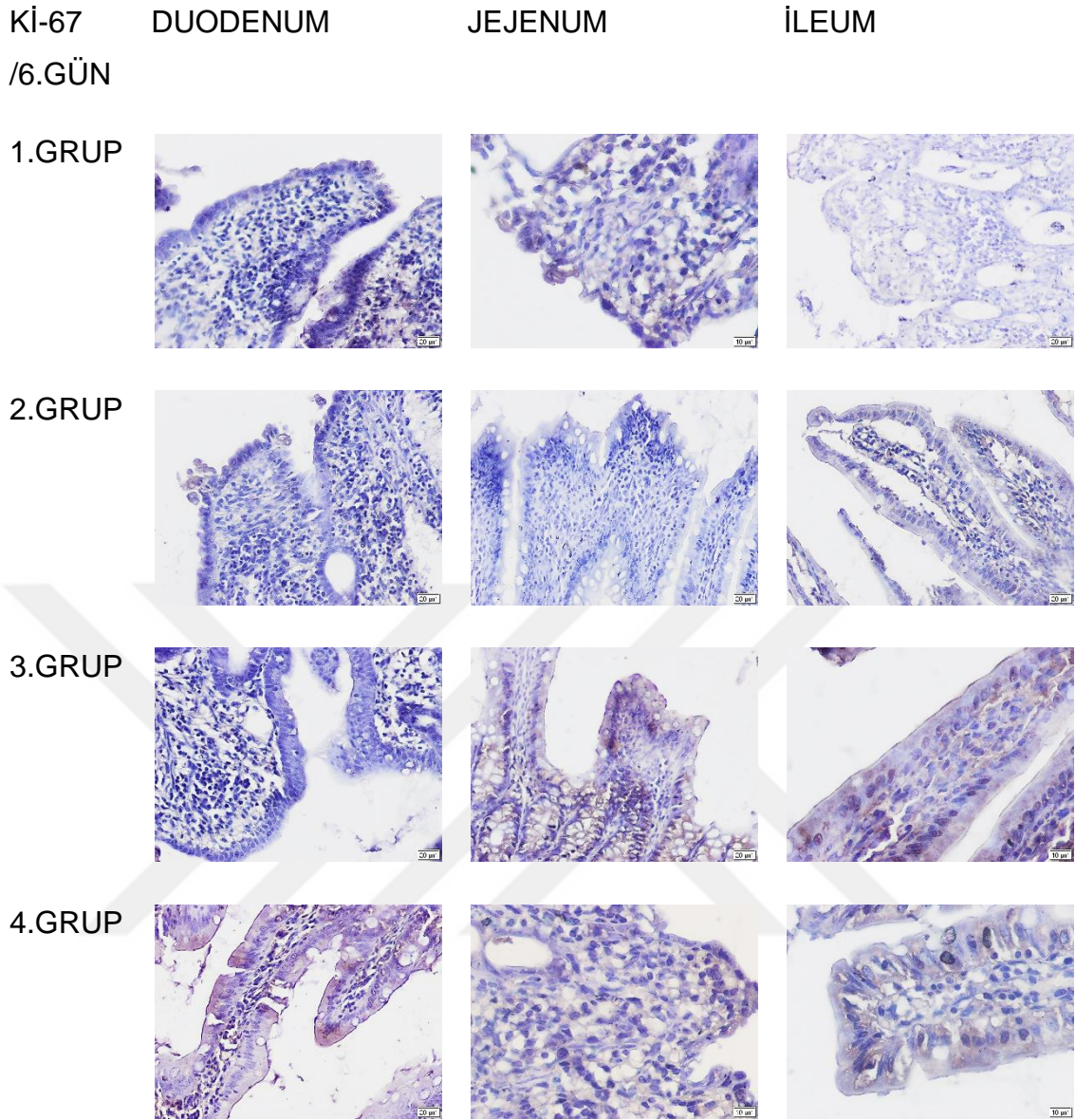
Jejenum 6.gün Ki-67 immünoreaktivitesi 1. 2. 4.grupta epitel ve laminapropria da (1) boyanma gözlenmez iken grup 3 de epitelde ve laminapropria da (2) boyanma gözlendi (resim 11, Tablo 10).

İleum da 4.gün Ki-67 immünoreaktivitesi 1. ve 2.grupta epitelde (1) boyanma gözlenmez iken laminapropria da boyanma (2) ile uyumlu saptandı. Grup 3 epitelinde ve laminapropriasında (3) ile uyumlu boyanma gözlendi. Grup 4 epitelde (2) boyanma saptanır iken laminapropria da boyanma (1) saptanmadı (Resim 10, Tablo 11).

İleum da 6.gün Ki-67 immünoreaktivitesi 1.grupta epitelde ve laminapropria da(1) saptanmadı. İkinci grupta epitelde (1) boyanma gözlenmez iken laminapropria da boyanma (2) ile uyumlu saptandı. Grup 3 de ve grup 4 de epitelde ve laminapropria da (2) ile uyumlu boyanma saptandı (Resim 11, Tablo 11).



Resim 10: Kİ-67 nin 4.gün immünohistokimyasal görüntüleri (1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)



Resim 11: Ki-67 nin 6.gün immünohistokimyasal görüntüleri (1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)

4.3.3.TNF-alfa immunoreaktivitesi

Duodenum 4.gün TNF-alfaimmunoreaktivitesi 3.grup haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. TNF-alfa immunoreaktivitesigrup 1 örneklerinde epitelde (3) ve laminapropriada (3) olarak saptanır iken, grup 2 de epitelde ve laminapropriada TNF-alfa immunoreaktivitesinin (4) olduğu izlendi. Kontrol grubu olan grup 3 de ise epitelde ve laminapropriada (1) boyanma

saptanmadı. Grup 4 epitelde (3) boyanma saptanır iken laminapropria da (2) boyanma saptandı (Resim 12, Tablo 9).

Duodenum 6.gün TNF-alfa immunoreaktivitesi 3.grup ve 4. Grup laminapropriasi haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. TNF-alfa immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde (3) ve laminapropriada (2) olarak saptanır iken, grup 2 de epitelde (2) ve laminapropriada (3) ile uyumlu TNF-alfa immunoreaktivitesi olduğu izlendi. Kontrol grubu olan grup 3 de ise epitelde ve laminapropriada (1) boyanma saptanmadı. Grup 4 epitelde (2) boyanma saptanır iken laminapropria da (1) boyanma saptanmadı (resim 13, Tablo 9).

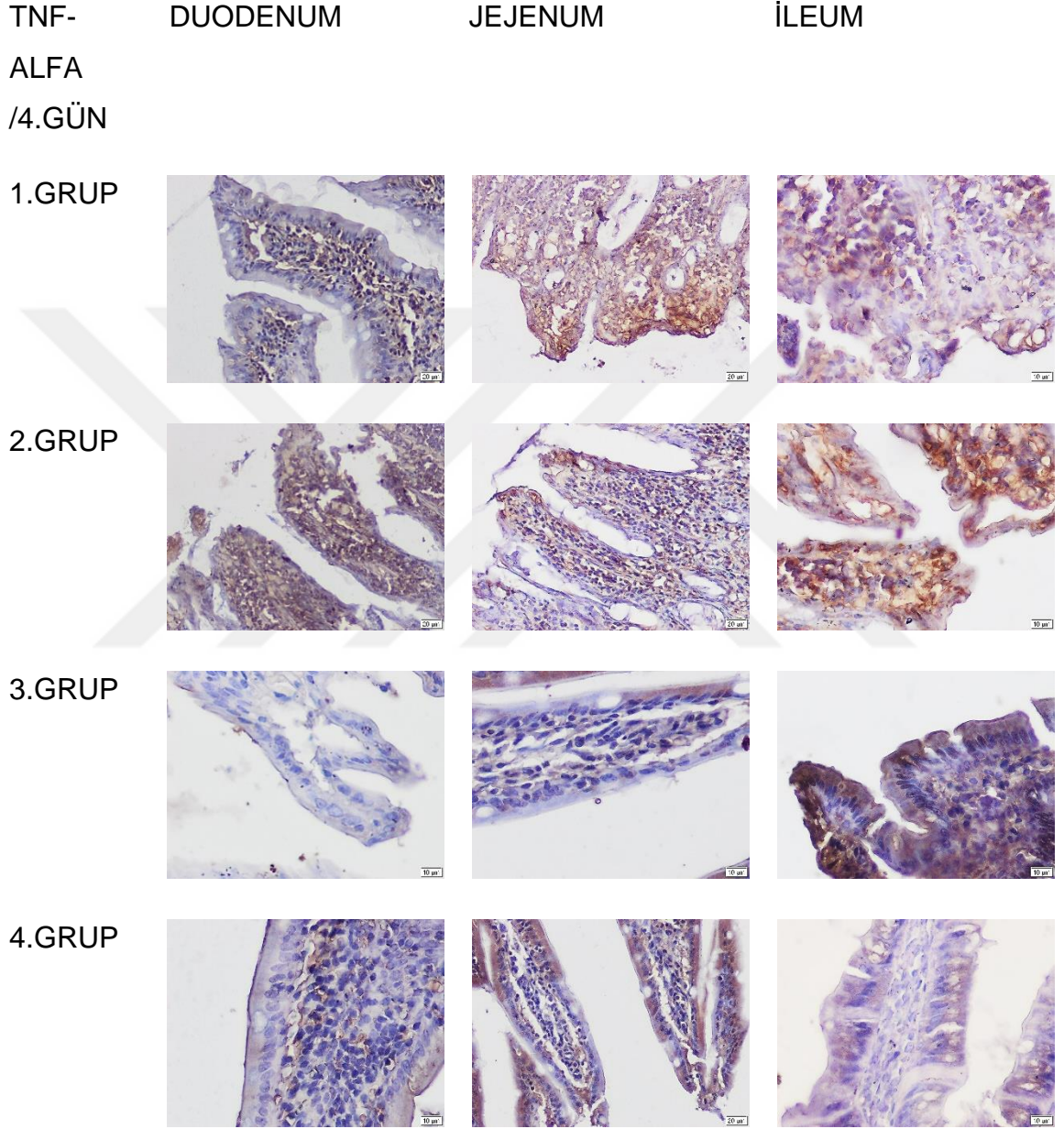
Jejenum 4.gün TNF-alfa immunoreaktivitesi tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. TNF-alfa immunoreaktivitesi grup 1 de epitelde ve laminapropria da (4) ile uyumlu saptandı. Grup 2 de epitelde ve laminapropria da boyanma (3) saptandı. Üçüncü grupta epitel ve laminapropria da (2) boyanma gözlenir iken 4.grup epitel de (3), laminapropria da (2) ile uyumlu boyanma gözlendi (Resim 12, Tablo 10).

Jejenum 6.gün TNF-alfa immunoreaktivitesi tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. TNF-alfa immunoreaktivitesi grup 1 de epitelde ve laminapropria da (4) ile uyumlu saptandı. Grup 2 de epitelde ve laminapropria da boyanma (4) saptandı. Üçüncü grupta epitelTNF-alfa immünüreaktivitesi (2) saptanır iken laminapropria da (1) boyanma gözlenmedi. Dördüncü grup epitelde (3), laminapropria da (2) ile uyumlu boyanma gözlendi (Resim 13, Tablo 10).

İleum 4.gün TNF-alfa immunoreaktivitesi 4.grup laminapropria haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı.TNF-alfa immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde (3) ile uyumlu iken laminapropria (4) ile uyumlu saptandı. İkinci grupta epitel ve laminapropria (4) ile uyumlu gözlendi. 3.grupta boyanma epitel (2) ve laminapropria da (3) ile uyumlu saptandı. Dördüncü grup epitelinde (2) ile uyumlu boyanma saptanır iken laminapropria da boyanma gözlenmedi (1)(Resim 12, Tablo 11).

İleum 6.gün TNF-alfa immunoreaktivitesi tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. TNF-alfa immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde (2) ile uyumlu iken laminapropria (4) ile uyumlu saptandı. İkinci grupta epitel

ve laminapropria (2) ile uyumlu gözlemlendi. Üçüncü grupta boyanma epitel (2) ve laminapropria da (2) ile uyumlu saptandı. Dördüncü grup epiteli ve laminapropria (2) ile uyumlu boyanma saptandı (resim 13, Tablo 11).



Resim 12: TNF-alfa nın 4.gün immünohistokimyasal görüntüleri (1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)

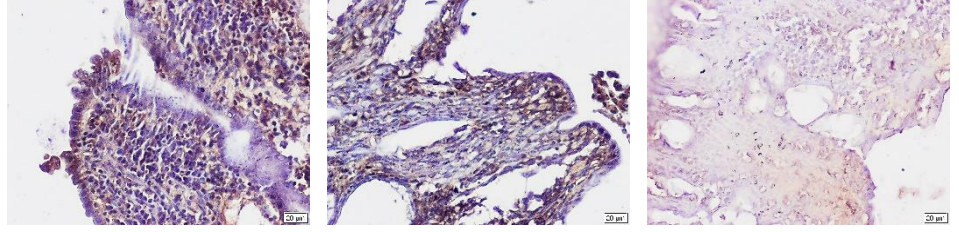
TNF-
ALFA/6.GÜN

DUODENUM

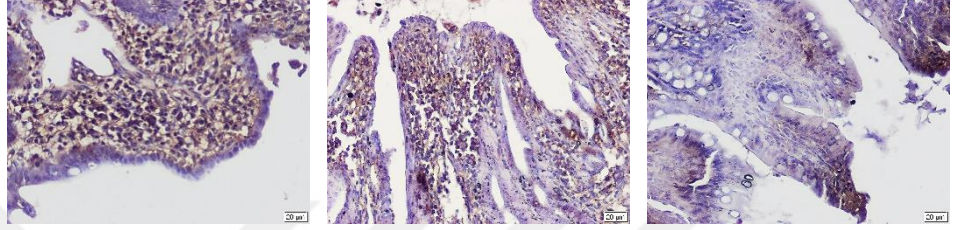
JEJENUM

İLEUM

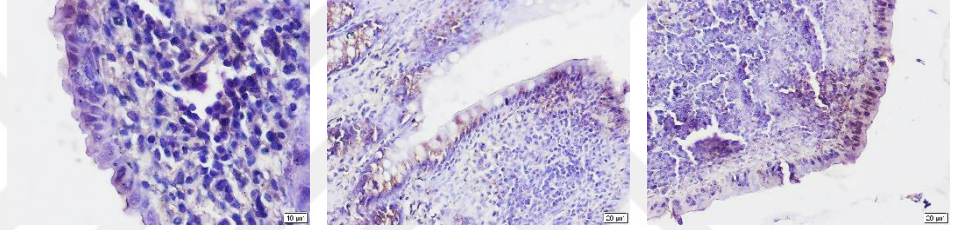
1.GRUP



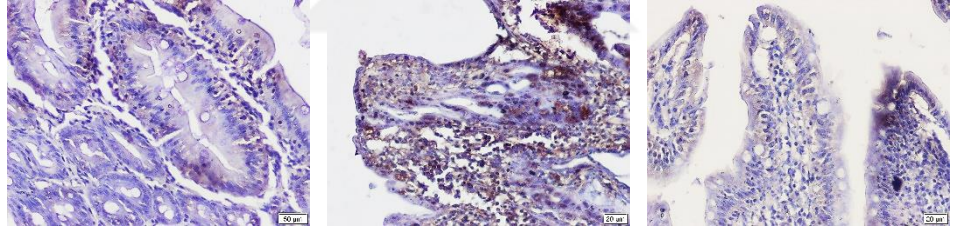
2.GRUP



3.GRUP



4.GRUP



Resim 13: TNF-alfa nın 6.gün immünohistokimyasal görüntüleri (1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)

4.3.4.MDA immunoreaktivitesi

Duodenum 4.gün MDA immunoreaktivitesi 3.grup laminapropriasi haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. MDA immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde boyanma (4) ve laminapropriada (3) olarak saptanır iken, 2.grup epitel ve laminapropriasında boyanma (4) ile uyumlu gözlemlendi. Kontrol grubu olan grup 3 de epitelde (2) saptanır iken laminapropria da (1)

boyanma saptanmadı. Grup 4 de epitelde ve laminapropria da (2) ile uyumlu boyanma saptandı (Resim 14, Tablo 9).

Duodenum 6.gün MDA immunoreaktivitesi 3. ve 4. grup haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. MDA immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde boyanma (4) ve laminapropriada (3) olarak saptanır iken, 2.grup epitel ve laminapropriasında boyanma (2) ile uyumlu gözlemlendi. Kontrol grubu olan grup 3 de epitelde ve laminapropria da (1) boyanma saptanmadı. Dördüncü grup epitelde ve laminapropria da (1) boyanma saptanmadı (Resim 15, Tablo 9).

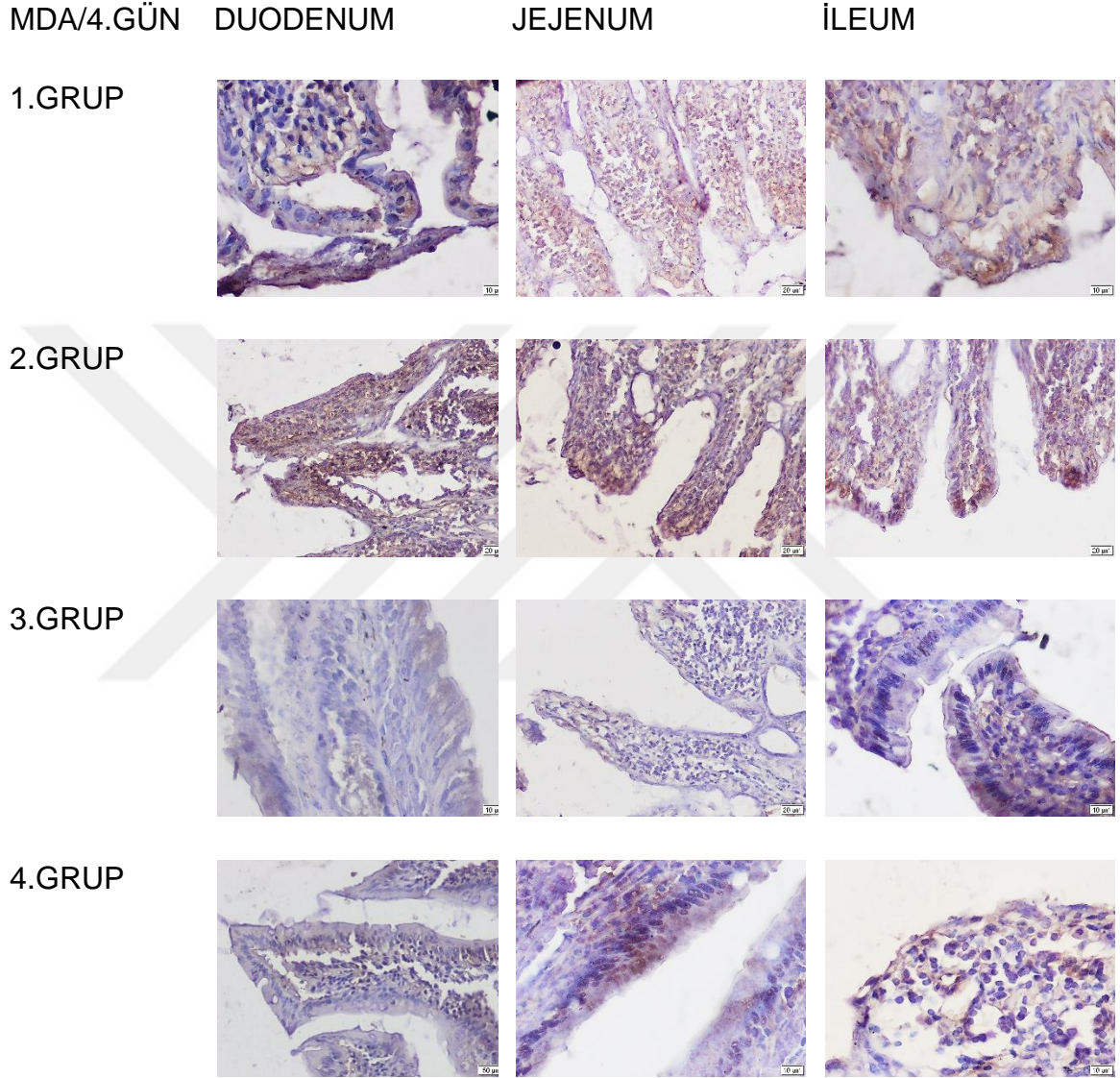
Jejunum 4.gün MDA immunoreaktivitesi 3.grup epitel ve laminapropriası ile 4.grup laminapropriası haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. MDA immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropriada (3) olarak saptanır iken, 2.grup epitel (3) ve laminapropriasında (4) ile uyumlu boyanma gözlemlendi. Kontrol grubu olan grup 3 de epitelde ve laminapropria da (1) boyanma saptanmadı. Dördüncü grup epitelde (2) ile uyumlu boyanma saptanır iken laminapropria da (1) boyanma saptanmadı (Resim 14, Tablo 10).

Jejunum 6.gün MDA immunoreaktivitesi 3.grup laminapropria haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. MDA immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropriada (4) olarak saptanır iken, 2.grup epitel (2) ve laminapropriasında (3) ile uyumlu boyanma gözlemlendi. Kontrol grubu olan grup 3 de epitelde (2) ile uyumlu boyanma gözlenir iken laminapropria da (1) boyanma saptanmadı. Dördüncü grup epitelde (2) ile uyumlu boyanma saptanır iken laminapropria da (3) ile uyumlu boyanma saptandı (Resim 15, Tablo 10).

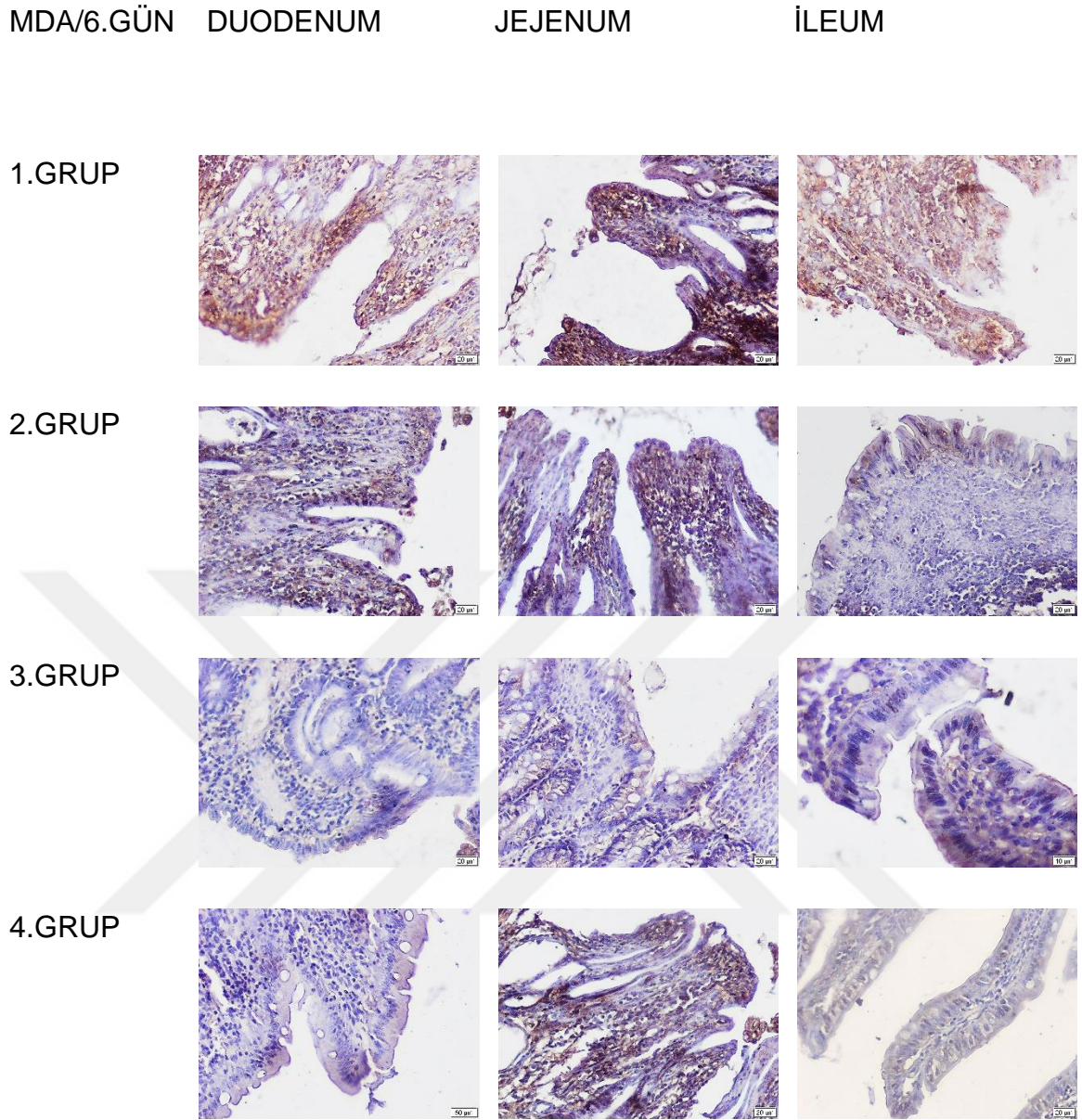
İleum 4.gün MDA immunoreaktivitesi tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. MDA immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropriada (4) olarak saptanır iken, 2.grup epitel (4) ve laminapropriasında (3) ile uyumlu boyanma gözlemlendi. 3.ve 4.grup epitel ve laminapropria da (2) ile uyumlu boyanma gözlemlendi (Resim 14, Tablo 11).

İleum 6.gün MDA immunoreaktivitesi tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. MDA immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropriada (4) olarak saptanır iken, 2.grup epitel (2) ile uyumlu

saptanır iken laminapropriasında (1) boyanma saptanmadı. 3.grup epitel ve laminapropria da (2) ile uyumlu boyanma gözlemlendi. Grup 4 de epitelde (2) boyanma gözlenir iken laminapropria da (1) boyanma saptanmadı (resim 15, Tablo 11).



Resim 14: MDA nın 4..gün immünohistokimyasal görüntüleri (1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)



Resim 15: MDA nın 6.gün immünohistokimyasal görüntüleri (1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)

4.3.5.MPO immunoreaktivitesi

Duodenum 4.gün MPO immunoreaktivitesi, grup 1 epitel ve laminapropriasında aynı zamanda grup 2 ve 4 laminapropriası içerisinde saptandı. MPO immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropriada (3) olarak saptanır iken, 2.ve 4.grup örneklerinde epitelde (1) boyanma gözlenmez iken

laminapropria da boyanma (2) olarak saptandı. Kontrol grubu olan grup 3 de epitel ve laminapropria da (1) boyanma saptanmadı (Resim 16, Tablo 9).

Duodenum 6.gün MPO immunoreaktivitesi, grup 1 epitel ve laminapropriasında aynı zamanda grup 2 laminapropriası içerisinde saptandı. MPO immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropriada (4) olarak saptanır iken, 2.grup örneklerinde epitelde (1) boyanma gözlenmez iken laminapropria da boyanma (2) olarak saptandı. Grup 3 ve 4 de epitelde ve laminapropria da (1) boyanma saptanmadı (Resim 17, Tablo 9).

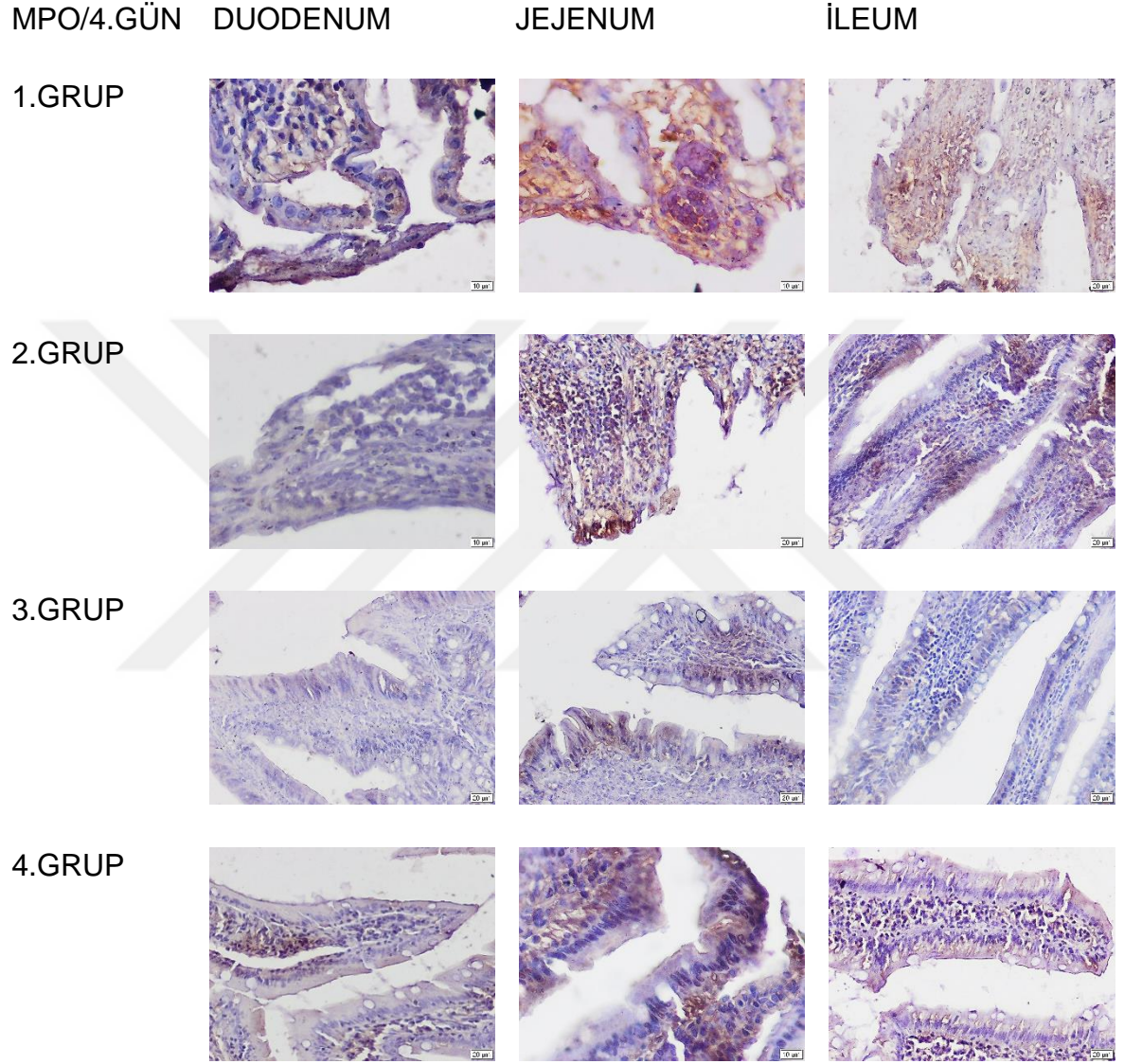
Jejenum 4.gün MPO immunoreaktivitesi 3.grup laminapropriası haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. MPO immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropriada (4) olarak saptanır iken, 2.ve 4.grup örneklerinde epitelde (2) boyanma gözlenir iken laminapropria (3) boyanma saptandı. Kontrol grubu olan grup 3 epitelde (2) ve laminapropria da (1) boyanma saptanmadı (Resim 16, Tablo 10).

Jejenum 6. gün MPO immunoreaktivitesi 3.grup epiteli haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. MPO immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropriada (4) olarak saptanır iken, grup 2 örneklerinde epitelde (4) boyanma gözlenir iken laminapropria (3) boyanma saptandı. Kontrol grubu olan grup 3 epitelde (1) boyanma saptanmaz iken ve laminapropria da (2) ile uyumlu boyanma saptandı Grup 4 örneklerinde epitel de ve laminapropriada (2) ile uyumlu boyanma saptandı (Resim 17, Tablo 10).

İleum 4.gün MPO immunoreaktivitesi 3.ve 4.grup laminapropriası haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. MPO immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropriada (4) olarak saptandı. 2.grup epitelde ve laminapropria da (3) boyanma ile saptandı. Üçüncü ve 4.grup örneklerinde epitelde (2) boyanma gözlenir iken laminapropria (1) boyanma saptanmadı (Resim 16, Tablo 11)

İleum 6.gün MPO immunoreaktivitesi 3.grup laminapropriası haricinde tüm gruplarda hem epitel hem de laminapropria içerisinde saptandı. MPO immunoreaktivitesi grup 1 örneklerinde epitelde ve laminapropriada (4) olarak saptandı. İkinci grup epitel boyanması (4) ile uyumlu saptanır iken laminapropria da

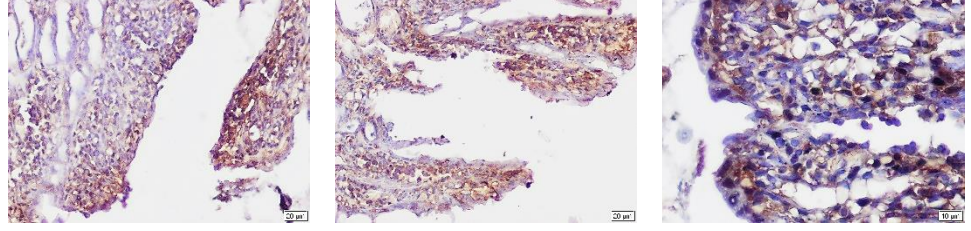
(3) boyanma saptandı. Üçüncü grup örneklerinde epitelde (2) boyanma gözlenir iken laminapropria (1) boyanma saptanmadı 4.grup epiteli (3) ve laminapropriası (2) ile uyumlu boyanma saptandı. (Resim 17, Tablo 11)



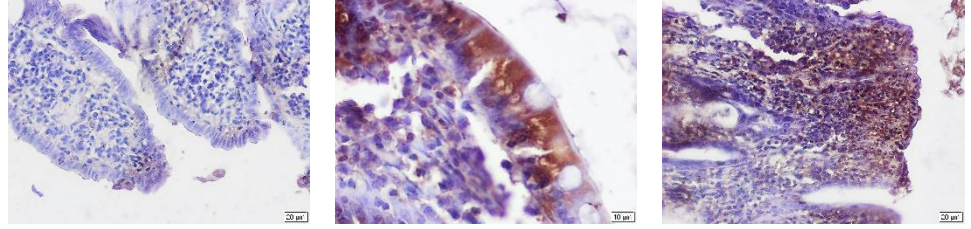
Resim 16: MPO nun 4.gün immünohistokimyasal görüntüleri (1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)

MPO/6.GÜN
DUODENUM JEJENUM İLEUM

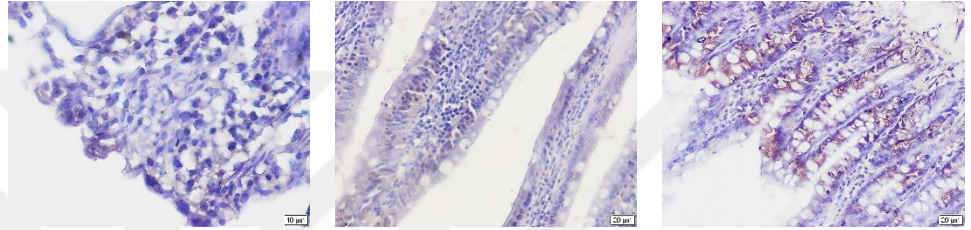
1.GRUP



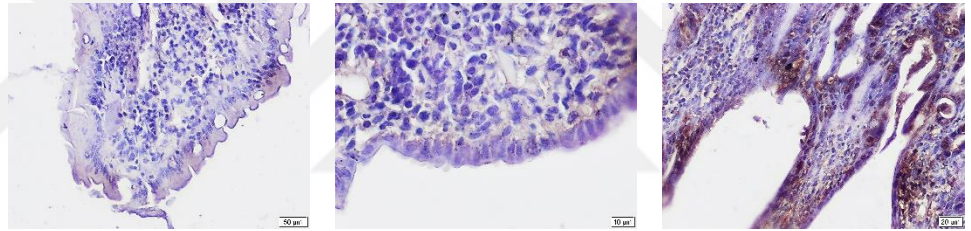
2.GRUP



3.GRUP



4.GRUP



Resim 17: MPO nun 6.gün immünohistokimyasal görüntüleri (1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)

4.4.Biyokimyasal Bulgular

4.4.1.Biyokimyasal İstatistik

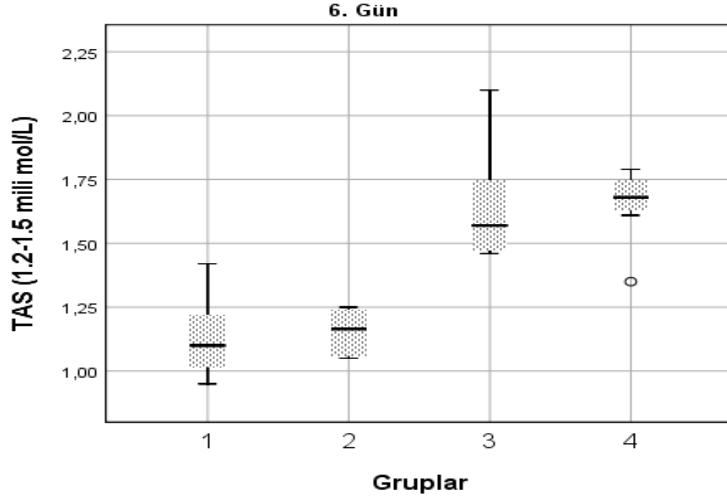
Tablo 12: Total antioksidan durum, TAS ve OSİ değerlerinin istatistiksel verileri

Grup lar	TAS (1.2-1.5 mili mol/L)		TOS (4-6 mikromol/L)		OSI (TOS /TAS)	
	4. Gün	6. Gün	4. Gün	6. Gün	4. Gün	6. Gün
	Ortalama ±Ss.	Medyan (Min/Max)	Medyan (Min/Max)	Ortalama ±Ss.	Medyan (Min/Max)	Ortalama ±Ss.
1	1,88±0,50	1,10 (0,95 / 1,42)	98,43 (39,13 / 221,69)	34,08±11, 42	5,91 (3,13 / 7,97)	3,12±1,36
2	1,52±0,22	1,17 (1,05 / 1,25)	46,87 (22,58 / 158,31)	31,48±12, 60	3,17 (1,87 / 8,51)	2,77±1,24
3	1,61±0,10	1,57 (1,46 / 2,10)	41,63 (16,92 / 104,79)	35,77±18, 87	2,59 (1,11 / 6,13)	2,08±0,79
4	1,46±0,24	1,68 (1,35 / 1,79)	30,77 (23,58 / 86,16)	42,17±24, 79	2,15 (1,66 / 8,53)	2,52±1,41
P Değeri	0,093	<0,001	0,110	0,697	0,230	0,493
1→2	ad.	1,000	ad.	ad.	ad.	ad.
1→3	ad.	0,020	ad.	ad.	ad.	ad.
1→4	ad.	0,003	ad.	ad.	ad.	ad.
2→3	ad.	0,053	ad.	ad.	ad.	ad.
2→4	ad.	0,010	ad.	ad.	ad.	ad.
3→4	ad.	1,000	ad.	ad.	ad.	ad.

OneWay ANOVA (Brown-Forsythe), Kruskal Wallis Test(Monte Carlo); Post Hoc Test : Dunn's Test, Ss.:standart Sapma, Min. :Minimum, Max.:Maximum, TAS:total antioksidan stres, TOS total oksidatif stres, OSİ: oksidatif stres indeksi, 1.grup:mtx grubu, 2.grup:mtx+morus nigra grubu, 3.grup:salin solüsyonu grubu, 4.grup:morus nigra grubu)

Total antioksidan stres (TAS) sonuçları değerlendirildiğinde 6.günde grup 1, grup 2 ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı değil iken grup 3 ve grup 4 de TAS

değerindeki yükseklik istatistiksel olarak anlamlı görüldü. Grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında, grup 4 deki TAS değerindeki yükseklik istatistiksel olarak anlamlı saptandı.



Şekil 3: Total antioksidan durumunun 6.günde gruplar arası dağılımı

V. TARTIŞMA

Son yıllarda kanser hastalarında etkin ve çok yönlü tedavi yaklaşımlarıyla yaşam sürelerinde önemli artış sağlanırken, tedaviye bağlı gelişen oral ve gastro intestinal mukozit nedeni ile nutrisyonel problemler morbidite ve mortalitenin önemli nedenleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Sık kullanılan bir kemoterapötik olan Metotreksat, lösemi ve çeşitli solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Metotreksat hastalarda ishal, iştahsızlık ve bunlara eşlik eden malabsorbsiyon, malnutrisyon ve dehidratasyona neden olabilir. Aynı zamanda epitelyal proliferasyonu ve enterosit fonksiyonunu da inhibe eder ve mukozal bariyerin bozulmasına bağlı olarak bağırsak kaynaklı sepsis riskini artırır. Metotreksat uygulamasında asıl doz sınırlayıcı faktör gastrointestinal toksisitedir (36). Metotreksat tedavisi uygulanan hastalarda, oral ve intestinal mukozite yol açtığı kesin bir şekilde gösterilmiştir (36). Sıçanlar, MTX'in yol açtığı gastrointestinal mukozit için oldukça uygun modeller oluştururlar.

Antioksidan özelliği olan folik asitin, MTX'in yan etkilerinden özellikle intestinal ve karaciğer toksisitesinin oluşumunun azaltılması amaçlı, MTX ile birlikte günlük kullanımı yaygın olarak önerilmektedir (143,144). Ancak, folik asit kullanımının MTX'in etkinliğini azaltıp azaltmadığı hala tartışmalıdır (145,146). Bu nedenle, yeni antioksidan ajanlar MTX'in sistemik oksidatif hasarına karşı deneysel olarak kullanılmıştır. Bu antioksidan maddelerden n-asetilsistein ve glutaminin MTX'in ince barsak ile karaciğerde yaptığı oksidatif hasara karşı faydalı etkileri gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar L-karnitin (147), taurin (148) ve melatoninin (149). MTX'in sistemik oksidatif hasarına karşı ince bağırsak, karaciğer ve böbrek üzerine olumlu etkilerini rapor etmişlerdir (150).

Bu çalışmada, antioksidan özelliği bilinen Morus nigra'nın MTX'in ince bağırsakta yaptığı histopatolojik değişikliklere ve plazma oksidatif stres parametreleri üzerine olumlu etkilerinin olup olmadığı araştırıldı. Aynı zamanda, yapılan deneysel çalışma MTX'in neden olduğu oksidatif hasar üzerine Morus nigra'nın etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Çalışmamızda MTX uygulaması sonrasında deneklerde sulu defekasyon dışında bir klinik bulguya rastlanmadı ve MTX'i deneklerin tolere edebildiği düşünüldü. Sulu defekasyonun ise 3. grup dışında yani salin verilen grup dışında görülmesi, MTX ve/veya ekstrak uygulamasına bağlı bağırsağın göstermiş olduğu reaksiyon olarak

düşünüldü. Ama klinik olarak bulgu olmamasından dolayı sulu defekasyonun sadece bu tür bir reaksiyon olabileceği sonucuna varıldı. Tüm sitotoksik ilaçlar kript hücrelerinde apoptoza ardından hipoplaziye ve sonrasında da kript hiperplazisine neden olurlar. İnce bağırsaktaki epitelyal kök hücreler KT sonrası hasara uğrarlar ve özgül hücre gruplarına bölünemez ya da farklılaşma gösteremezler. Böylece villöz mukoza yenilenemez dolayısıyla hızla yapı ve fonksiyon kaybına uğrar (63). Tüm bu değişiklikler sonucunda ishal görülür. İkinci grupta ishal görülmesinden dolayı *Morus nigra*'nın ishal oluşumunu önleyici etkisi tespit etmedik.

Çalışmamızda MTX dozunu 30 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde belirledik. Daha önce yapılmış çalışmalarda sıçan ince bağırsağındaki MTX'e bağlı erken cevabın letal dozun ortalama yüzde ellisinde bölünen hücrelere olan ilacın direkt etkisine bağlı olduğu kanıtlanmış (151). Bu nedenle MTX ile oluşturulan deneysel mukozit çalışmalarına benzer şekilde 30 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde MTX'i intraperitoneal verdik. Böylece çalışmamızda MTX'e bağlı gastrointestinal mukozit oluşturuldu.

Artmış tek yönlü sodyum akışı ve yüksek elektrik farkı, MTX'e olan erken cevap olup bu durum epitelyal permeabilitenin fazla artışı ile ilişkilidir. MTX verildikten 96 saat sonra jejunal epitelyumun yüksek proliferatif evreye geçtiği zamandır. Artmış mitotik figürler derinleşmiş kriptler ve artmış belirli kript hücrelerinin MTX verildikten sonraki 4 ile 6. günde olduğu görülmüştür. Bu zaman artmış enterosit proliferasyonun aktif olduğu zamandır. Doksan altı saatin sonunda enzim profili kript hücrelerinde normal olarak gözlenirken villöz hücrelerinde bu durum gözlenmemiş (152). Tooley ve ark. yaptığı bir çalışmada MTX ile oluşan hasarın en fazla 72. Saatte (4.gün) olduğu ve ince barsağın 96.saatte düzelmeye başladığı, 144.saatte (6. gün) onarımın devam ettiğini bildirmişlerdir (153).Bu sebeplerden ötürü bizde, çalışmamızda ince bağırsak hasarının histopatolojik değerlendirilmesi için, tek doz intraperitoneal MTX uygulandıktan 96 ve 144.saat sonra derin anestezi altında elde edilen duodenum, jejunum ve ileum dokuları kullanıldı. İmmünohistokimyasal olarak MTX'in uyardığı bağırsak hasarının 4. gün en fazla olduğu görüldü. İnce barsaktaki immüno histokimyasal parametrelerin ise 6. gün MTX tedavisi alan sıçanlarda azaldığı ve barsak mukozasının minimal düzelmeye başladığı görüldü. Deney sonunda ise İnce barsaktaki immüno histokimyasal parametre skor değerlerinin MTX+*Morus nigra*

grubunda daha düşük olduğu saptandı. Bu bulgu bize MTX e Morus nigra eklenmesinin bağırsak hasarını azalttığını düşündürmektedir.

Bağırsak uzunlukları açısından bakıldığında MTX uygulamasının enflamasyon etkisinin gözlendiği, bağırsak uzunluğunda da kısalma olduğu gözlendi. Ekstrak uygulanması sonrasında bağırsak uzunluğunun sadece MTX uygulanan gruba oranla daha fazla olması ekstraktın uygulanması sonrasında barsaktaki inflamatuvar sürecin azaltılmasının sonucu olabileceği sonucuna varıldı. Bağırsak uzunluğunun 6. gündeki ölçümleri sonucunda ekstrakt uygulanan grupta (Grup 2) sadece MTX uygulanan gruba oranla (Grup 1) bağırsak uzunluğunun daha uzun olduğu gözlenmesi ekstraktın koruyuculuğunun 6. günde de devam ettiğini desteklemektedir. Bununla beraber grup 2 deki bağırsak uzunluklarının 4. ve 6 günleri karşılaştırıldığında 6. gündeki bağırsağın 4. güne oranla daha kısa olması ise, ekstraktın bu açıdan erken dönemde daha etkili olabileceğini düşündürdü.

Oluşan mukozit ince bağırsakta kolona göre daha belirgindir. Bunun sebepleri arasında ince ve kalın bağırsakta belirlenen pro ve antiapoptotik proteinlerin farklı olmaları ile ince bağırsak ve kolondaki kök hücrelerin yerleşim yerlerinin farklı olmaları sayılabilir. Bu sebepten ötürü bizde ince bağırsağın tüm bölümlerini çıkardık. Çalışmamızın 96. ve 144. saatlerinde sakrifiye edilen birinci ve ikinci grup ratlarda makroskopik olarak barsak anslarının şiş, ödemli olduğu gözlendi ve yer yer mukozit saptandı (Resim 6). Aynı zamanda yer yer hiperemik kanama alanları gözlendi fakat patolojik boyutta mezenterik lenf bezine rastlanmadı. Makroskopik olarak incelendiğinde sagrifiye edilen ratlarda ince bağırsakta oluşan mukozitin kalın bağırsağa göre daha belirgin olduğu gözlendi. İnce bağırsak epitel hücrelerinin çoğalması ve kendini yenilemesi kriptlerde meydana gelmektedir. Normal fizyolojik koşullarda çok hızlı yenilenebilen kript hücreleri, villus uçlarına göç ederek yaklaşık 2-3 gün içinde gastrointestinal epitelin kendini tamamen yenilemesini sağlamaktadır. Metotreksatın neden olduğu histopatolojik değişiklikler içinde en ciddi etki kript ve villöz ablasyonu ile proksimal ince bağırsakta belirgindir (154).

Metotreksat epitelde incelme ve ülserasyona sebep olur. Laminapropriyada ki bağ doku hücrelerinin çoğalmasında meydana gelen değişiklik sonucunda vasküler geçirgenlik ve inflamatuvar hücre birikiminde artış meydana gelir. Bundan dolayı bizde histolojik olarak hem epitel hem de laminapropriayı inceledik. Çalışmamızda histolojik

olarak duodenum, jejunum ve ileumdaki epitel ve lamina propria'yı ayrı ayrı makroskopik görünümüne göre skorladık.

Mukozit sadece epitel değişikliği değildir, reaktif oksijen radikalleri, transkripsiyon faktör aktivasyonları, apoptozun tetiklendiği ve aynı zamanda TNF alfa, IL-1beta ve 6 gibi sitokinlerin arttığı bir süreçtir. Metotreksatın ayrıca TNF yapımını arttırmasının yanında T lenfosit ve makrofajların sayısını arttırdığıda gösterilmiştir (60). Interlökin-1 ailesi, enfeksiyonlar veya otoimmün hasarlara karşı immün ve inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde merkezi rol oynayan 11 sitokinden oluşan bir gruptur. IL-1 ailesi proinflamatuvar sitokin grubundandır. IL-1 beta proinflamatuvar bir sitokin olup enfeksiyona karşı vücutta inflamatuvar yanıtta önemli bir rol almaktadırlar. Bu sitokinler fagositler, lenfositler ve diğerleri gibi immünkompetent hücrelerin transmigrasyonunu sağlamak için enfeksiyon alanlarında endotelial hücrelerden adhezyon faktörlerinin ekspresyonunu artırırlar.

IL-1 immunoreaktivitesinin MTX uygulanan gruplarda 4. ve 6. günlerde kontrol grubu olan 3. gruba oranla arttığı gözlenmesi MTX'in IL-1 ekspresyonunda artışa nedene olduğunu göstermektedir. Ekstrak uygulamasından sonra ise duodenumda 6. günde sadece MTX uygulanan gruba oranla azaldığı gözlendi. Fakat ekstrak uygulanan 4. Grupta IL-1 ekspresyonunun da gözlenmesi 6. günde hala IL-1 immunoreaktivitesinin artışının ekstraktın etkisinden dolayı olabileceğini düşündürdü. Jejunum ve ileumda ise ekstrakt uygulamasının IL-1 immunoreaktivitesi üzerine etkisinin daha fazla olduğu, grup 1 de görülen IL-1 ekspresyonuna oranla daha az olmasının, MTX a bağlı inflamatuvar etkiyi azalttığı, fakat ekstraktın IL-1 salgısını birazda olsa tetikleyebileceğinden hala IL-1 boyanmasının azda olsa devam ettiği sonucuna varıldı.

TNF-alfa immunoreaktivitesi duodenum, jejunum ve ileum örneklerinde grup 1 de en fazla olduğu ve IL-1 e nazaran MTX in etkisi ile özellikle TNF-alfa'nın ekspresyonunda artış olduğunu göstermektedir. Ekstrak uygulaması sonrasında TNF-alfa uygulamasının erken dönemde (4. Günde) azaldığı görülmesi üzerine ekstrakt uygulamasının erken dönemde daha etkili olabileceğini düşündürdü.

Ki-67 çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteindir. Esas olarak G1, S, M ve G2 evresinde görülür. G0 evresinde yoktur. Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi şekilde gösteren bir protein olup, mitotik indeks ve tümör

evrelemesinde sıklıkla kullanılır. İmmunohistokimya ile Ki-67 için pozitif nükleer boyanma gösteren hücre yüzdesi, proliferasyon indeksini gösterir (155,156,157). Ki-67, prognoz belirlemede kesin sonuçlar vermese de, proliferasyon markeri olarak kullanılmaktadır (158).

Holt ve ark kanserli ve normal kolon dokusunda çoğalan hücreleri saptamada, Ki-67 proliferasyon indeksinin üstün bir markır olduğunu bulmuşlardır (159). Sugiyama ve ark. MTX grubunda Ki-67 antijeni pozitif hücre oranının belirgin olarak azaldığını bildirmişlerdir (160). Leitão ve ark. yaptığı benzer bir çalışmada da MTX verilen sıçanların jejunum epitelinde 5. gün proliferasyonun belirteci olan Ki-67 pozitif hücre sayısının önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır (161). Ki-67 immunoreaktivitesinin duodenumda grup 1 de olmaması MTX'in epitelial proliferasyonu inhibe ettiğini desteklemektedir. Ekstrak uygulaması sonucunda grup 2 de epitelial proliferasyon hala gözlenmez iken, MTX uygulanmadan ekstrak uygulanan grupta bir miktar Ki-67 immunoreaktivitesinin gözlenmesi ekstraktın hücre proliferasyonu üzerine normal dokularda etkisi olabileceğini düşündürdü. Jejunum da ise grup 2 de erken dönemde Ki-67 varlığının gözlenmesi ekstraktın epitelial hasarı önlemek adına jejunumda proliferasyonu bir miktar tetiklediğini düşündürdü. Çalışmamızda Leitão ve ark. yaptığı çalışma ile aynı şekilde MTX tedavisinin 4.ve 6. günü MTX grubunda Ki-67 proliferasyon indeksinin kontrol grubuna göre düşük olduğu bulundu. Aynı zamanda Jejunum da MTX+Morus nigra'nın eş zamanlı verilmesi erken dönemde Ki-67 proliferasyon indeksinde kontrol ve MTX grubuna göre anlamlı derecede bir fark olduğu görüldü.

Jahovic ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada radlara 20 mg/ kg tek doz MTX intraperitoneal olarak uygulanmış sonuç olarak kan, karaciğer, böbrek ve ince bağırsak dokularında glutatyon seviyelerinde azalma, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinde artma ve malondialdehit (MDA) seviyelerinde belirgin artma olduğunu bulmuşlardır (42). Miyazono ve ark'nın yaptığı bir çalışmada ise MTX verilen radlarda yan etki olarak ince bağırsağında süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitelerinde artma, indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX'in yol açtığı ince bağırsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdir (45). Çalışmamızda Soares ve ark.yaptığı çalışmaya benzer olarak nötrofilin infiltrasyonunun bir belirteci olan MPO seviyeleri MTX alan grupta diğer gruplara göre

yüksek saptandı(162). MDA ve MPO immunoreaktivitelerinin MTX uygulaması sonrasında artar iken, ekstrak uygulaması sonrasında immunoreaktivitelerin her üç barsak segmentinde de azalması ekstrak uygulamasının erken ve geç dönemde MDA ve MPO azalması üzerine olduğunda göstermektedir. Yapılan çalışmalar Morus nigra extresinin olumlu mekanizmasının onun antioksidan etkisine bağlı olduğunu ve MTX'in reaktif formunun aktivasyonunu bozarak bu etkisini gösterdiğini göstermiştir. Bu durum Morus nigra'nın antioksidan etkisi içerisinde bulunan alkoloide bağlıdır, flavonoidler gibi. Flavonoidlerin varlığı bilinen güçlü antioksidan etkisi sayesinde normal hücreleri çeşitli oksidatif stres indüklü hücre ölümünü engelleyici etkisi ile sonuçlanır. Yine aynı şekilde Morus nigra extresinin radikal kovucu aktivitesine bağlıdır. Lipit ve peroksil radikallerinin yakalanması sonucu poliansatüre yağ asitleri arasındaki ilişkiyi önler ve lipit peroksidatif sürecin engellenmesine neden olur (163). Bu da bize Morus nigra'nın SOR'a bağlı gelişen lipit peroksidasyonunu engellediğini ve antioksidan özellik gösterdiğini düşündürür. Bununla birlikte biz bu çalışmada, MTX tedavisine Morusnigra'nın eklenmesinin MDA ve MPO düzeylerini, dolayısıyla lipid peroksdasyonunu azalttığını göstermiş olduk. Literatürde morus nigra'nın metotereksatin gastrointestinal toksisitesinden koruyucu etkisini doku düzeyinde gösteren çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle çalışmamız alanında ilk olması açısından özgündür.

Total antioksidan durum açısından değerlendirildiğinde ise; MTX'in karaciğerdeki metabolizması sırasında meydana gelen oksidatif reaksiyonlar toksik yan etkileri ortaya çıkararak hepatotoksisiteye ve kemik iliği, bağırsak gibi hızlı proliferen olan normal dokularda hasara yol açar. Dolaşımdaki reaktif oksidan radikallerinin düzeyleri ayrı ayrı ölçülüp hesaplanabilmektedir. Artan reaktif oksidan radikallerinin oksidasyon etkileri birbiri üzerine eklenebilir. Oksidatif stres düzeyini, antioksidan savunmayı, oksidan-antioksidan dengeyi ve bu dengeyi etkileyen bilinen faktörler (total oxidantstatus (TOS), total antioxidantstatus (TAS) ve oxidativestressindex (OSI)) mevcuttur (164), Morus nigra'nın antioksidan özelliğini ortaya koyabilmek amacıyla bizde çalışmamızın dördüncü ve altıncı gününde radlar sakrifiye edildikten sonra kan aldık. Ve bu alınan kanlardan TOS ve TAS seviyeleri çalışıldı. Radlardan alınan serum plazma örneklerinde TAS, TOS değerleri ve OSİ oranlarına bakarak Antioksidan/Oksidan dengesini belirlemeyi amaçladık. Total oksidatif durum ve TAS sonuçlarıyla OSİ değerleri ayrı ayrı hesaplandı. Dördüncü ve altıncı gün TAS, TOS

ve OSİ sonuçları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, birinci ve ikinci grup karşılaştırıldığında TAS, TOS ve OSİ değerlerinin istatistiksel analizinde anlamlı bir sonuç saptanmadığı görüldü. Yalnızca altıncı gün TAS değerlerinin istatistiksel analizinde birinciyle üçüncü grup, birinciyle dördüncü grup, ikinci ile dördüncü grup karşılaştırıldığında sırasıyla p değerleri 0,020, 0,003 ve 0,010 saptandı, fakat anlamlı bir değer farkı olmadığı gözlemlendi. Grup 1 ve 2 arasında TAS da anlamlı fark olmadığı için Morus nigra'nın TAS artırıcı etkisi bulunamadı.

Metotreksat, uygulamayı takiben sıçanlarda duodenum, jejunum ve ileum da histopatolojik hasar meydana getirmekte ve bunun sonucunda, diyare gibi klinik durumlarla karşımıza çıkmaktadır. Metotreksatın neden olduğu intestinal mukozite karşı Morus nigra'nın koruyucu etkisini gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamız da Morus nigra'nın sıçanlar tarafından iyi tolere edildiği, biyokimyasal ve immünohistokimyasal parametrelerde anormal değişikliklere neden olmadığı görüldü. Çalışmamızdaki morfometrik ve histopatolojik bulgular, MTX'in neden olduğu mukoza harabiyeti üzerine Morus nigra'nın koruyucu etkisinin olduğu ve bağırsak epitelinde rejenerasyonu desteklediği görülmüştür. Morus nigra MTX'in oluşturduğu hasarları çalışmamızda gözlemlendiği gibi azaltmaktadır. Bizim çalışmamız, MTX'in istenmeyen etkilerinden korunmada Morus nigra'nın kullanımı için bir ümit vermektedir. Ancak daha geniş kapsamlı klinik uygulamaları da içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

VI.SONUÇLAR

1. Çalışmamızda 56 adet erkek Wistar albino cinsi sıçanlar alındı. MTX verilen sıçanların MTX'i iyi tolere ettiği görüldü. Deneyi sonlandırmayı gerektirecek herhangi bir bulgu yoktu.
2. MTX uygulaması sonrasında deneklerde sulu defekasyon dışında bir klinik bulguya rastlanmadı Sulu defekasyonun ise 3. grup dışında yani salin verilen grup dışında görülmesi, MTX ve/veya ekstrak uygulamasına bağlı bağırsağın göstermiş olduğu reaksiyon olarak düşünüldü
3. Morus nigra'nın ishal oluşumunu önleyici etkisi tespit edilmedi.
4. Tek doz intraperitoneal MTX uygulandıktan sonra 96. saatinde sacrikiye edilen radların ince bağırsağında mukozit görüldü
5. İmmünohistokimyasal olarak MTX'in uyardığı bağırsak hasarınının 4. gün en fazla olduğu görüldü.
6. Total ince barsaktaki immünohistokimyasal parametrelerin 6. gün MTX tedavisi alan sıçanlarda azaldığı ve barsak mukozasının minimal düzelmeye başladığı görüldü. MTX+Morus nigra grubunda deney sonu total ince barsak hasarı skorunun MTX grubundan daha düşük olduğu saptandı. Bu bulgu bize MTX e Morus nigra eklenmesinin bağırsak hasarını azalttığını düşündürdü.
7. Bağırsak uzunlukları açısından bakıldığında MTX uygulamasının enflamasyon etkisine bağlı bağırsak uzunluğunda kısalma gözlemlendi. Ekstrak uygulanması sonrasında bağırsak uzunluğunun sadece MTX uygulanan gruba oranla daha fazla olması ekstraktın uygulanması sonrasında barsaktaki inflamatuvar sürecin azaltılmasının sonucu olabileceği sonucuna varıldı.
8. Bağırsak uzunluğunun 6. gündeki ölçümleri sonucunda ekstrakt uygulanan grupta sadece MTX uygulanan gruba oranla bağırsak uzunluğunun daha uzun olduğu gözlenmesi ekstraktın koruyuculuğunun 6. günde de devam ettiğini desteklemektedir.
9. Birinci ve ikinci grup radlarda makroskopik olarak bağırsak anslarınının şiş, ödemli olduğu gözlemlendi ve yer yer mukozit saptandı
- 10.Radlarda ince bağırsakta oluşan mukozitin kalın bağırsağa göre daha belirgin olduğu gözlemlendi

11. IL-1 immunoreaktivitesinin MTX uygulanan gruplarda 4. ve 6. günlerde kontrol grubu olan 3. gruba oranla arttığının gözlenmesi MTX ın IL-1 ekspresyonunda artışa nedene olduğunu göstermektedir. Ekstrak uygulamasından sonra ise duodenumda 6. günde sadece MTX uygulanan gruba oranla azaldığı gözlendi. Fakat ekstrak uygulanan 4. grupta IL-1 ekspresyonunun da gözlenmesi 6. günde hala IL-1 immunoreaktivitesinin artışının ekstraktın etkisinden dolayı olabileceğini düşündürdü. Jejenum ve ileumda ise ekstrakt uygulamasının IL-1 immunoreaktivitesi üzerine etkisinin daha fazla olduğu, grup 1 de görülen IL-1 ekspresyonuna oranla daha az olmasının, MTX a bağlı inflamatuvar etkiyi azalttığı, fakat ekstraktın IL-1 salgısını birazda olsa tetikleyebileceğinden hala IL-1 boyanmasının azda olsa devam ettiği sonucuna varıldı.
12. TNF-alfa uygulamasının erken dönemde (4. Günde) azaldığı görülmesi üzerine ekstrak uygulamasının erken dönemde daha etkili olabileceğini düşündürdü.
13. Ki-67 immunoreaktivitesinin Jejenum da grup 2 de erken dönemde Ki-67 varlığının gözlenmesi ekstraktın epitelial hasarı önlemek adına jejenumda proliferasyonu bir miktar tetiklediğini düşündürdü
14. MDA ve MPO immunoreaktivitelerinin MTX uygulaması sonrasında artar iken, ekstrak uygulaması sonrasında immunoreaktivitelerin her üç barsak segmentinde de azalması ekstrak uygulamasının erken ve geç dönemde MDA ve MPO azalması üzerine olduğunu göstermektedir.
15. Grup 1 ve 2 arasında TAS da anlamlı fark olmadığı için Morus nigranın TAS arttırıcı etkisi bulunamadı.

VII.ÖZET

“Ratlarda, Karadut Meyve (Morus Nigra) Ekstresinin, Metotreksat İlişkili İntestinal Hasar Üzerine Koruyucu Etkisi”

Bu çalışmada bir çok çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde kullanılan yüksek doz metotreksatin oluşturduğu oral ve gastrointestinal sistem mukozitlerinin önlenmesinde, antioksidan özelliği olan karadutun (morus nigra) koruyucu etkisinin olup olmadığını, gerek histolojik gerekse biyokimyasal parametreleri kullanarak göstermeyi amaçladık. Çalışma prospektif, randomize olarak yapıldı ve her bir grupta 14 denek olacak şekilde ağırlıkları 200-250 gr arasında olan erkek Wistar albinosıçanlar dört gruba ayrıldı. İntestinal hasar modeli oluşturmak için çalışmamızın birinci gününde 1. Grup 30mg/kg metotreksatin intraperitoneal verilmesiyle oluşturuldu. İkinci gruba ise ilk gün 30mg/kg MTX intraperitoneal olarak verildi aynı zamanda birinci gün MTX verildikten sonra başlamak üzere oral yoldan gavaj yardımıyla 500mg/kg Morus nigra ekstresi hayvanlara verildi. Üçüncü gruba ise yalnızca 0.001ml/kg-2.5ml/kg intragastrik salin solüsyonu verildi. Dördüncü gruba ise oral yoldan gavaj yardımıyla 500mg/kg olacak şekilde Morus nigra ekstresi verildi. Çalışma gruplarında ratlar 4. ve 6. günlerde sakrifiye edildi. Deneklerde antienflamatuar ve antioksidan etkinliği ortaya koymak için biyokimyasal ve histolojik analizler gerçekleştirildi. Biyokimyasal olarak alınan kan örneğinde TOS ve TAS düzeyleri analiz edildi. Histolojik analizler için ince barsak segmentlerinden (duodenum, jejunum, ileum) alınan kesitlerde Ki-67, MPO, MDA, TNF-alfa, TOS ,TAS, IL-1beta dağılımları değerlendirildi. Literatürde morus nigranın metotereksatin gastrointestinal toksisitesinden koruyucu etkisini doku düzeyinde gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma alanında ilk olması açısından özgündür. Çalışmamızdaki morfometrik ve histopatolojik bulgular, MTX'in neden olduğu mukoza harabiyeti üzerine Morus nigra'nın koruyucu etkisinin olduğu ve bağırsak epitelinde rejenerasyonu desteklediği görülmüştür. Morus nigra MTX'in oluşturduğu hasarları çalışmamızda gözlemlendiği gibi azaltmaktadır. Bizim çalışmamız, MTX'in istenmeyen etkilerinden korunmada Morus nigra'nın kullanımı için bir ümit vermektedir. Ancak daha geniş kapsamlı klinik uygulamaları da içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Metotreksat, intestinal mukozit , morus nigra

VIII.ABSTRACT

“Protective Effect Of Black Mulberry (Morus Nigra) Fruit Extract On Methotrexate-Related Intestinal Damage In Rats “

In this study, using histological and/or biochemical parameters, we aimed to demonstrate possible protective effects of black mulberry (*Morus nigra*), already known to have antioxidant properties in the prevention of oral and gastrointestinal system mucositis caused by high dose methotrexate used in the treatment of many childhood cancers. In this prospective, randomized study, male Wistar albino rats weighing between 200-250 g will be divided into 4 groups, each including 14 subjects. In first group 30 mg/kg of methotrexate will be administered intraperitoneally on the first day of the study to establish the intestinal damage model. In second group 30 mg/kg of methotrexate will be administered intraperitoneally on the first day and then at the same time, 500 mg / kg *Morus nigra* extract was given to these animals by oral gavage to start after the first day of MTX administration. In the third group only 0.001ml / kg-2.5ml / kg intragastric saline solution was given. The fourth group was given *Morus nigra* extract with 500 mg / kg by oral gavage. The rats were sacrificed on the 4th and 6th days in the study groups. Biochemical and histological analyzes will be performed to demonstrate antiinflammatory and antioxidant activities in the subjects. Taken blood sample was analysed biochemically for TOS, TAS levels. For histological analysis, samples were taken from small intestinal segments (duodenum, jejunum, ileum) and than distributions of Ki-67, MPO, MDA, TNF-alpha, TOS, TAS, IL-1beta were assessed in the samples. In the literature, no study was determined showing the protective effect of *Morus nigra* on gastrointestinal toxicity of Methotrexate at the tissue level. This study is unique in regard to being the first on this topic. In our study, morphometric and histopathologic symptoms show that, *Morus nigra* has a protective effect on the mucosa damage caused by the MTX and supports regeneration on intestinal epithelium. *Morus nigra*, as seen in our study, reduces the damages of MTX. Our study gives hope for the use of *Morus nigra* in order to remain protected from the adverse effects of MTX but we need more wide range of studies which includes clinical studies also.

Keywords: Methotrexate, intestinal mucositis, *Morus nigra*

IX.KAYNAKLAR

- 1- Stiller CA, Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* 2004, 23: 6429-6444
- 2-Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, et al. International incidence of childhood cancer, IARC Scientific Publications No. 87, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1988
- 3-Parkin DM, Kramárová E, Draper GJ, et al. International Incidence of Childhood Cancer, IARC Scientific Publications No. 144, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1998.
- 4-Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, et al. The international incidence of childhood cancer. *Int. J. Cancer* 1998;42: 511- 520
- 5-Ölüm İstatistikleri, İl ve İlçe Merkezlerinde, 2008. T.C. Başbakanlık Türkiye
- 6-Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted lifeyears (DALYs) Worldwide in 2008 (Globocan, 2008)
- 7-Naidu M, Ramana G, Rani P, et al. Chemotherapy induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis - complicating the treatment of cancer. *Neoplasia* 2004;6: 423-431
- 8-Yamauchi PS, Rizk D, Kormeili T, et al. Current systemic therapies for psoriasis: where are we now? *J Am Acad Dermatol* 2003;49(Suppl 2):66-77
- 9-Strober BE, Menon K: Folate supplementation during methotrexate therapy for patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:652-9.
- 10-Peter CA, Frank MB, Stacey B, et al. General Principles of Chemotherapy In Philip A Pizzo, David G. Poplack (eds) *Principles and Practice of Pediatric Oncology* fifth edition Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2006: 318-322 102
- 11-Jollivet J, Cowan K, et al. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med.* 1983 ;309:1094-1104
- 12-Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, et al. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum.* 1998 ; 27: 277-292
- 13-Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 ;764:217-254

- 14-Flores F, Kerdel FA. Other novel immunosuppressants. *Dermatol Clin.* 2000;18:475-483
- 15-Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, et al. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest.* 1985;76:907-912
- 16-Bram J, Allegra CJ, Fine RL, et al. Effects of methotrexate on intracellular folate pools in purified myeloid precursor cells from normal bone marrow. *J Clin Invest* 1987; 79: 692-697
- 17-Henderson GB, Tsuji JM, Kumar HP. Transport of folate compounds by leukemic cells: evidence for a single influx carrier for methotrexate, 5-methyltetrahydrofolate, and folate in CCRF-CEM human lymphoblasts. *Biochem Pharmacol*; 1987;36: 3007-3014
- 18-Gifford AJ, Kavallaris M, Madalio J, et al. P-glycoprotein-mediated methotrexate resistance in CCRF-CEM sublines deficient in methotrexate accumulation due to a point mutation in the reduced folate carrier gene. *Int J Cancer*; 1998;78: 176-181
- 19-Henderson GB, Tsuji JM. Identification of the bromosulphophthalate insensitive efflux route for methotrexate as the site of action of vincristine in the vincristine dependent enhancement of methotrexate uptake in L1210 cells. *Cancer Res*; 1998; 48: 5995-6001
- 20-Pizzorno G, Mini E, Coronello M, et al. Impaired polyglutamylation of methotrexate as a cause of resistance in CCRF-CEM cells after short-term, high-dose treatment with this drug. *Cancer Res*; 1998; 48: 2149-2155
- 21-Dicker AP, Waltham MC, Volkenant M, et al. Methotrexate resistance in an in vivo mouse tumor due to a non-active-site dihydrofolate reductase mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1993; 90: 11797-11801
- 22-Curt GA, Jolivet J, Carney DN, et al. Determinants of the sensitivity of human small-cell lung cancer cell lines to methotrexate. *J Clin Invest*; 1985;76:1323-1329
- 23-Chladek J, Martinkova J, Sispara L. An in vitro study on methotrexate hydroxylation in rat and human liver. *Physiological research/ Academia Scientiarum Bohemoslovaca.* 1997;46(5):371-9. Epub 1997/01/01.
- 24-Nuernberg B, Koehnke R, Solsky M, et al. Biliary elimination of low-dose methotrexate in humans. *Arthritis and rheumatism.* 1990;33(6):898-902. Epub 1990/06/01.

- 25-Masuda M, Iizuka Y, Yamazaki M, et al. Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer research*. 1997;57(16):3506- 10. Epub 1997/08/15.
- 26-Cancer Chemotherapy. In: BG K, editor. *Basic&Clinical Pharmacology*. 6. Edition ed. East Norwalk: Appleton& Lange; 1995. p. 832-3. 48.
- 27-Gibson LE, Perry HO. Papulosquamous eruption and exfoliative dermatitis. In: SL M, HJ H, editors. *Dermatology*. 3. Baskı ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p. 607-22.
- 28-Kayaalp O. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 11. Baskı ed. Ankara:Hacettepe-Taş Yayıncılık; 2005
- 29-Goodman and Gillmann, *Tedavinin Farmakolojik Temeli*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009: 1315- 1405
- 30-Jolivet JJ, Cowan KH, Clendennin NJ, et al. The pharmacokinetics and clinical use of methotrexate. *N Engl J med* 1983; 309: 1094-104
- 31-Ginnani EH, Brewer EJ, Kuzima N, et al. Methotrexate in resistant juvenile rheumatoid arthritis. Results of the USAUSSR double blind placebo controlled trial. The Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group and The Cooperative Study Group. *N Engl J Med* 1992: 326:1043– 1049
- 32-Cornstein BN. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23: 739–755
- 33-Bertram G. Katzung. *Basic and Clinical Pharmacology*, 9. Edition, Singapore: The McGraw- Hill Companies, 2004 : 898- 931
- 34-Pınarbaşı A, Akman A, Yılmaz E, et al. Metotreksat verilen Psöriazis Vulgaris Hastalarına Folik Asit Desteği Gerekli mi? *Türk Dermatoloji Dergisi* 2008; 2: 39- 42
- 35-Kane D, Gogarty M, O'leary J, et al. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis Rheum*. 2004 ;50: 3286-3295
- 36-Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment –induced alimentary tract mucositis : *Pathobiology , animal models and cytotoxic drugs* .*Cancer Treat Rev* 2007 ;33 :448-460
- 37-Chládek J, Martínková J, Sispera L. An in vitro study on methotrexate hydroxylation in rat and human liver. *Physiol Res*. 1997;46:371-379

- 38-Kamen BA, Nylen PA, Camitta BM, et al. Methotrexate accumulation and folate depletion in cell as a possible mechanism of chronic toxicity to the drug. *Br J Haematol.* 1981;49:355-360
- 39-Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, et al.. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum.* 1986 ;29: 832-835
- 40-Kovacs, GT, Paal, C., Somlo, P, et al. Proteinuria due to suboptimal hydration with high-dose methotrexate therapy. *Cancer Chemother Pharmacol;* 1993; 33: 262-263
- 41-Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M, et al. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs.* 2005 ;6:187-195
- 42-Jahovic N, Sener G, Cevik H, et al. Amelioration of methotrexate induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct.* 2004 ;22:169-178
- 43-Devrim E, Çetin R, Kılıçoğlu B, et al. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail.* 2005;27:771-773
- 44-Uz E, Öktem F, Yılmaz HR, Uzar E, et al. The activities of purine catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem.* 2005 ; 277:165-170
- 45-Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2004; 39: 1119-1127
- 46-Celkan T. Kanserli çocuklarda mukozit. *Klinik gelişim.* 2007; 20:195-198
- 47-Peterson DE, Kefe DH, Hutchins RD, et al. Alimentary tract mucositis in cancer patients: Impact of terminology and assessment on research and clinical practice. *Support Care Cancer* 2006;14:499-504
- 48-Scully C, Sonis S, Diz PD. Mucosal diseases series. Oral Mucositis. *Oral Diseases* 2006;12: 229-241
- 49-Scully C, Epstein J, Sonis S. Oral mucositis : A challenging complication of radiotherapy: Part 1 pathogenesis and prophylaxis of mucositis . *Head Neck* 2003; 25:1057-1070
- 50-Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews* 2004; 4: 277-284
- 51-Nicola P, Romani C, Cupelli L, et al. Mucositis in patients with hematologic malignancies: an overview. *Haematologica* 2007;92:222-231

- 52-D'Hondt L, Lonchay C, Marc A, et al. Oral mucositis induced by anticancer treatments : Physiopathology and treatments. *Ther Clin Risk Manag* 2006;2:159-168
- 53-Barasch A, Coke JM. Cancer therapeutics: an update on its effects on oral health. *Periodontology* 2000;44:44-54
- 54-Brown CG, Wingard J. Clinical consequences of oral mucositis. *Semin Oncol Nurs* 2004;20:16-21
- 55-Pico JL, Avila-Garavito A , Naccache P. Mucositis : Its occurrence, consequence
- 56-Mansson – Rahemtulla B, Techanitiswad T, et al. Analyses of salivary components in leukemia patients receiving chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:35-46
- 57-Gemmati D, Ongaro A, Tognazzo S, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene variants in adult non Hodgkin's lymphoma patients : association with toxicity and survival .*Haematologica* 2007 :92;478-485
- 58-Woessmann W, Siedemann K, Mann G, et al. The impact of the methotrexate administration Schedule and dose in the treatment of children and adolescents 107 with B-cell
- 59-Sonis ST. The biologic role for nuclear factor kappa B in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti neoplastic therapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:380-389
- 60-Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, et al. Is the pathobiology of chemotherapy–induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 63: 239-251
- 61-Keefe DM. Intestinal mucositis: mechanisms and management. *Curr Opin Oncol* 2007; 19: 323-327
- 62-Gibson RJ, Keefe DM. Cancer chemotherapy – induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. *Support Care Cancer* 2006; 14: 890-900
- 63-Sevinir B. Mukozit .In : Özkan A (eds) *Pediatric Onkoloji* ,Nobel matbaacılık, İstanbul . Nobel Tıp Kitabevleri 2009: 1283-1300
- 64-Stringer A, Gibson R, Bowen J, et al. Chemotherapy-induced mucositis: the role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment. *J Support Oncol.* 2007;5: 259-267
- 65-Treister N, Sonis S, Mucositis: biology and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 15: 123-129

- 66-Barascha A, Peterson DE. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. *Oral Oncology*.2003 ;39:91–100
- 67- Wohlschlaeger A. Prevention And Treatment Of Mucositis: A Guide For Nurses. *J Pediatr Oncol Nurs*. 2004 ; 5: 281–7
- 68- Kocaman Yıldırım N, Kaçmaz N, Özkan M. Yetişkin kanser hastalarının destekleyici bakım gereksinimleri ve verilen hizmet arasındaki boşluk. *DEUHYO ED* 2013;6(4): 231-240.
- 69-Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, et al. Mucositis Study Section of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer; International Society for Oral Oncology. Perspectives on cancertherapyinduced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, andconsequences for patients. *Cancer* 2004; 100: 1995-2025
- 70-Lalla, V, Bowen J Barasch A, et al. MASCC=ISOO Clinical Practice Guidelines for the Management of Mucositis Secondary to Cancer Therapy. *Cancer* 2014;120:1453–61.
- 71-AU Worthington HV, Clarkson JE, Bryan G, et al. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Apr 13;(4):CD000978.
- 72-Hensley ML, Hagerty KL, Kewalramani T, et al. American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. *J Clin Oncol* 2009; 27:127. 71
- 73-Peterson DE, Jones JB, Petit RG 2nd. Randomized, placebo-controlled trial of Saforis for prevention and treatment of oral mucositis in breast cancer patients receivinganthra cycline based chemotherapy. *Cancer* 2007; 109:322.
- 74-Bjordal JM, Bensadoun RJ, Tunè J, et al. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer* 2011; 19:1069.
- 75-Van der Lelie H, Thomas BL, van Oers RH, et al. Effect of locally applied GM-CSF on oral mucositis after stem cell transplantation: a prospective placebo-controlled double-blind study. *Ann Hematol* 2001; 80:150.
- 76-Motallebnejad M, Arkam S, Moghadamnia A, et al. The effect of topical application of pure honey on radiation induced mucositis: a randomised clinical trial. *J Contemp Dent Pract* 2008; 9: 40-47

- 77-Southcott E, Tooley KL, Howarth GS, et al. Yoghurts containing probiotics reduce disruption of small intestinal barrier in methotrexate-treated rats. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1837-184181- Pari L, Tewas D, Eckel J. Role of
- 78-Guven S., Basaran, M, 1979. Canakkale Yoresinde Uretilen Kara Dut (Morus nigra L.) Meyvesinin Besin Teknolojisi Yönünden Degerlendirilmesi. *Tarimsal Araştırma Dergisi*, 1 (2): 108-117. 55
- 79-Baytop A., 1996. *Farmasotik Botanik. Ders Kitabı. Istanbul Univ. Yay. No:3637, Eczacılık Fak. Yay. No:58. Istanbul, 315 s.*
- 80-Şevik R, Uygur E.Y. Karadut (morus nigra) meyvesinin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi, yüksek lisans tezi
- 81-Wang, SY., Jiao, HJ. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals hydrogen peroxide hydroxyl radicals and singlet oxygen. *J Agric Food Chem*;48:5677–83.
- 82-Zhao Y., 2007. *Berry fruit value-added products for health promotion. Boca Raton, FL: CRC Press*
- 83-Seeram, NP., 2006. Berries. In: Heber D, Blackburn G, Go VLW, Milner J, editors. *Nutritional oncology. 2nd edition. London, UK: Academic Press*;p. 615–25.
- 84-Seeram, NP., 2008. Berry fruits Compositional elements biochemical activities and the impact of their intake on human health performance and disease. *J Agric Food Chem* ;56:627-9.
- 85-Xue H., Aziz RM., Sun, N., 2002. Inhibition of cellular transformation by berry extracts. *Carcinogenesis*;22:351–6
- 86-Nile, SH., Won Park, S., 2013. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* 30 134–144
- 87-Beer, C., Myers, RA., Sorenson, JH., et al. Comprehensive comparison of the antioxidant activity of fruits and vegetables based on typical serving sizes from common methods. *Curr Top Nutraceutical Res*;2:227–50. 56
- 88-Parry J., Su L., Luther M. 2005. Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *J Agric Food Chem* ;53:566–73.
- 89-Hakala M., Lapvetelainen A., Huopalahti R., 2003. Effects of varieties and cultivation conditions on the composition of strawberries. *J Food Comp Anal*;16:67–80.

- 90-Skupien K., Oszmianski, J., 2003. Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria ananassa* Duch) grown in Northwest Poland. *Eur Food Res Technol* ;219:66–70.
- 91 Şenol M., Karadut (morus nigra l.) meyvelerinde antosiyaninlerin karakterizasyonu ve antioksidant özellikleri. (TEZJ.Mersin, Mersin üniversitesi, 2017)
- 92-Hardisson A., Rubio C., Baez A., Martin M., 2001. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. *Food Chem*;73:153– 61
- 93-Lopes da-Silva F., Escribano-Bailon MT., 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT Food Sci Technol* 40:374–82.
- 94-Zierau O., Bodinet C., Kolba, S.,2002. Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol*;80:125–30.
- 95-Kraft BTF., Dey M., Rogers RB., 2008. Phytochemical composition and metabolic performance enhancing activity of dietary berries traditionally used by native North Americans. *J Agric Food Chem*;56:654–60.
- 96-Nurmi T., Mursu J., Heinonen M., 2009. Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *J Agric Food Chem*;57:2274–81
- 97-Satue-Gracia MT., Heinonen M., Frankel FN., 1997. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithinliposome systems. *J Agric Food Chem*;45:3362–7.
- 98-Vant-Veer P., Jansen MC., Klerk M., 2000. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Public Health Nutr*;3:103–7.
- 99-Marnett LJ., Dubois RN., 2002. COX-2: a target for colon cancer prevention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*;42:55–80.
- 100-Boivin D., Blanchette M., Barrette S., 2007. Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFκB by edible berry juice. *Anticancer Res*;27:93748.
- 101-Surh YJ., Na HK., Lee JY., 2001. Molecular mechanisms underlying antitumor promoting activities of heat-processed *Panax ginseng* CA Meyer. *J Korean Med Sci*;16:S38 41.
- 102-Katsube N., Iwashita K., Tsushida T., 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem*;51:68–75.
- 103-Wang L., Hecht, SS., Carmella, SG., 2009. Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats. *Cancer Prev Res*;2:84–93.

104-Arat S., Çetinkaya G., 2008. Hücre Kültürü Uygulamalı Kursu, TURKHAYGEN-1 PROJESİ

105-Ames BN., Shigenaga MK., Hagen TM., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7915-22.

106-Gutteridge, JMC., Halliwell B., 1993. Free radicals and antioxidants in aging and disease: fact or fantasy. In: Gutteridge JMC, Halliwell B, editors. *Antioxidants in nutrition, health, and disease*. Oxford, U.K.: Oxford Univ Press. p 111-35.

107-Ross J.A., Kasum C.M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr* 22, 19-33.

108-Gökpınar S., Koray T., Akçiçek E, et al. (2006). Algal Antioksidanlar. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23: 85-89.

109-Winczura A., Zdzalik D., Tudek, B. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free Radic Res*, 2012, 46(4), 442-459.

110-Jacob R. ve Burri, B. J., Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr*, 1996, 63(6), 985S-990S.

111-Paradies G., Petrosillo G., Paradies V., et al. Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(10), 1286-1295.

112- Qi, X., Guy, J., Nick, H., et al. Increase of manganese superoxide dismutase, but not of Cu/Zn-SOD, in experimental optic neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(6), 1203-1212.

113-Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1), 44-84.

114-Thomas M. J. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1995, 35(1-2), 21-39.

115-Iul G. ve Andrianova G. P. Status of the antioxidant system and free radical lipid peroxidation in patients with chronic renal failure. *Ter Arkh*, 1988, 60(6), 54-56.

116-Vladimirov Iu, A., Free radical lipid oxidation and physical properties of lipid layer of biological membranes. *Biofizika*, 1987, 32(5), 830-844.

117-Yılmaz H. R., Uz E. Özçelik N ve ark. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol*, 2004, 18(4), 234-238.

- 118-Nazifi S., Razavi S. M., Kianiamin, P et al. Evaluation of erythrocyte antioxidant mechanisms: antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and serum trace elements associated with progressive anemia in ovine malignant theileriosis. *Parasitol Res*, 2011, 109(2), 275-281.
- 119-Boutin A. C., Shirali P., Garcon G., et al. Peripheral markers (Clara cell protein and alpha-glutathione S-transferase) and lipid peroxidation (malondialdehyde) assessment in Sprague-Dawley rats instilled with haematite and benzo[a]pyrene. *J Appl Toxicol*, 1998, 18(1), 39-45.
- 120-Halliwel B., Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 1994, 52(8 Pt 1), 253-265.
- 121-Cwikel J. G., Gidron Y, Quastel M., et al. Low-dose environmental radiation, DNA damage, and cancer: the possible contribution of psychological factors. *Psychol Health Med*, 2010, 15(1), 1-16.
- 122-Ravanat J. L., Cadet J. Douki T et al. Oxidatively generated DNA lesions as potential biomarkers of in vivo oxidative stress. *Curr Mol Med*, 2012, 12(6), 655-671.
- 123-Sinclair A. J., Barnett A. H., Lunec J. et al. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med*, 1990, 43(5), 334-344.
- 124-Champe P. C. and Harvey R. A. Lippincot's illustrated reviews, J B Lippincot Company, 1994.
- 125-Rumley A. G., and Paterson J. R., Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem*, 1998, 35 (Pt 2), 181-200.
- 126-Freeman B. A., and Crapo J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 1982, 47(5), 412-426.
- 127-Calder P. C., Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52(8), 885-897.
- 128-Jurgens G., Lang, J., Esterbauer, H. Modification of human low-density lipoprotein by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 875(1), 103-114.
- 129-Yamazoe K., Inaba T., Bonkobara M., et al. Changes of hepatic tissue phospholipid peroxidation, malondialdehydes, and antioxidative enzyme activities in dogs with halothane inhalation. *J Vet Med Sci*, 1998, 60(1), 15-21.
- 130-Erenel G., Erbaş, D., Arıcıoğlu, A., Serbest radikaller ve antioksidan sistemler *Gazi Tıp Dergisi*, 1992, 3, 243-250.

- 131-Sonntag D. M., de Boer J., Medvedovic M et al. Mutational biases associated with potential iron-binding DNA motifs in rodent lacI and human p53 mutational databases. *Mutat Res*, 2004, 550(1-2), 73-88.
- 132-Akkuş, G. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza Yayınları, 1995, pp. 3-95.
- 133-Yu B. P., Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 1994, 74(1), 139-162.
- 134-Çıracı, M. Z. Lipopolisakkarit ile sepsis oluşturulan ratların karaciğer dokularında serbest radikal metabolizmasının incelenmesi vitamin D nin etkisi. Unpublished (TEZJ, Ankara, T.C. Gzi Üniversitesi, 2013.)
- 135-Jacob R. A., ve Burri B. J., Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr*, 1996, 63(6), 985S-990S.
- 136-Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*. 2004; 37: 112-119.
- 137-Işık A, Selek Ş. Total Antioxidant Response and Oxidative Stress in Patients with Behçet's Disease. *F. Ü. Sağ. Bil. Derg.* 2006;20(6):415-421.
- 138-Ghiselli A, Serafini M, Natella F. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29: 1106-1114. 64.
- 139-Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38:1103–11.
- 140-Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37:277–85.
- 141-Kosecik M, Erel O, Sevinc E, et al.. Increase oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol*. 2005;100:61–4.
- 142-Howarth GS, Geoffrey L, Cool JC et al. Milk Growth Factors Enriched from Cheese Whey Ameliorate Intestinal Damage by Methotrexate When Administered Orally to Rats. *Human and Clinical Nutrition* 1996; 126: 2519-2530.
- 143-Van Ede AE, Laan RF, Rood MJ, et al: Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: a forty-eight-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1515–24.

- 144-Ortiz Z, Shea B, Suarez-Almazor M, et al: The efficacy of folic acid and folinic acid in reducing methotrexate gastrointestinal toxicity in rheumatoid arthritis: a metaanalysis of randomized controlled trials. *J Rheumatol* 1998; 25: 36–43.
- 145-Morgan SL, Baggott JE, Vaughn WH, et al: Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: a doubleblind, placebocontrolled trial. *Ann Intern Med* 1994; 121: 833–41.
- 146-Khanna D, Park GS, Paulus HE, et al: Reduction of the efficacy of methotrexate by the use of folic acid: post hoc analysis from two randomized controlled studies. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3030–38.
- 147-Çetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, et al. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit* 2006; 12: 274-78.
- 148-Çetiner M, Sener G, Sehirli Ö. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 209: 39 – 50.
- 149-Jahovic N, Çevik H, Sehirli AÖ, et al. Melatonin prevents methotrexate induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J. Pineal Res* 2003; 34: 282–87.
- 150-Çetin A, Kaynar L, Koçyiğit I, et al. Role of Grape Seed Extract on Methotrexate Induced Oxidative Stress in Rat Liver. *The American Journal of Chinese Medicine* 2008; 36: 1–12.
- 151-Chabner BA, Young RC. Threshold methotrexate concentration for in vivo inhibition of DNA synthesis in normal and tumorous target tissues. *J Clin Investigation* 1973; 52: 1804-11.
- 152-Field M, Fromm D, McColl I. Ion transport in rabbit ileal mucosa. 1. Na and Cl fluxes and short-circuit current. *Am J Physiol* 1971, 220: 1388-96.
- 153-Tooley KL, Howarth GS, Lymn KA, et al. Optimization of the non-invasive ¹³C-sucrose breath test in a rat model of methotrexate-induced mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65(5):913-921..
- 154-Tiauamin JA, Gall DG, Hamilton JR. Response of the rat small-intestine epithelium to methotrexate. *Gut* 1980; 21: 486-492
- 155-Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M et al.. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138(4):867-873.

- 156-Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*2000; 182(3):311-322.
- 157-Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL et al. Evaluation of cell proliferation in ratt issues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situhybridization for histonem RNA. *J HistochemCytochem*2003; 51(12):1681-1688.
- 158-Abike F, Zengeroğlu S, Temizkan O et al.. Seröz ve müsinöz over kanserleri ile Ki-67 ilişkisi. *TurkHij Den BiyolDerg* 2010; 67 (2):79-84.
- 159-Holt PR, Moss SF, Kapetanakis AM et al. Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclearantigen? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*1997; 6(2):131-135.
- 160-Sugiyama A, Kimura H, Ogawa S et al. Effects of polyphenols from seed shells of Japane sehorsechestnut (*Aesculusturbinata* BLUME) on methotrexate-induced intestinalinjury in rats. *J VetMedSci*2011; 73(5):673-678.
- 161-Leitão RF, Brito GA, Oriá RB et al. Role of inducible nitricoxide synthasepathway on methotrexate-inducedintestinal mucositis in rodents. *BMC Gastroenterol* 2011; 11:90.
- 162- Soares PM, Lopes LO, Mota JM et al. Methotrexate-induced intestinal mucositis delaysgastricemptyingand gastrointestinal transit of liquids in awakerats. *ArqGastroenterol* 2011; 48(1):80-85
- 163- Kutlu T, Durmaz G, Ate B, et al.. Antioxidant properties of different extracts of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Turk J Biol.* 2011;5:103–10.
- 164-Wiswell TE, Tuggle JM, Turner BS. Mekonium aspiration syndrome: havemade a difference? *Pediatrics.* 1990; 85: 715-721