

T.C.
FATİH ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA METOTREKSATIN BÖBREKTEKİ HASARI ÜZERİNE
KUERSETİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. YASEMİN YÜKSEL

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. MURAT YAĞMURCA

Bu uzmanlık tezi Fatih Üniversitesi tarafından P53011108_Y proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA-2013

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Osman ÖZCAN'a, değerli fikir ve önerileriyle desteğini her zaman hissettiğim tez danışmanı hocam sayın Doç. Dr. Murat YAĞMURCA'ya, çalışmalarımda büyük emekleri ve yardımları olan değerli hocalarım Doç. Dr. Hüsametdin ERDAMAR'a, Yard. Doç. Dr. Hacer HALTAŞ'a ve Yard. Doç. Dr. Mehmet KAYA'ya, aynı ortamı paylaştığımız değerli hocalarım Prof. Dr. Şenol DANE'ye, Prof. Dr. Ferah ARMUTCU'ya, Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ'e, Doç. Dr. Sevsen CEBECİ'ye, Uzm. Dr. Ayşe GÜREL'e, Doç. Dr. Kadir DEMİRCAN'a, Doç. Dr. Süleyman Murat TAĞIL'a, Yard. Doç. Dr. Muhsin TOKTAŞ'a, Yard. Doç. Dr. Muradiye ACAR'a ve diğer akademik personele içtenlikle teşekkürlerimi sunarım. Bugünlere ulaşma vesilem olan ve hayatımın her aşamasında maddi manevi desteğini esirgemeyen biricik annem Kezban GÜNEY ve babam Muammer GÜNEY'e, sevgili kardeşlerim Sümeyye ve Yasin'e sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım. Bu zor dönemde her daim desteğini hissettiğim desteğiyle moral bulduğum sevgili eşim Dr. Ramazan YÜKSEL'e ve kızım Nilüfer'e sevgilerimi sunarım.

Dr. Yasemin YÜKSEL

Ankara- 2013

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER ve GRAFİKLER.....	vi
TABLolar.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1-2
2. GENEL BİLGİLER.....	3-45
2. 1. Böbrek Anatomisi.....	3
2. 1. 1. Böbreğin yerleşimi, şekil ve büyüklüğü.....	3
2. 1. 2. Böbreği dıştan saran yapılar.....	4
2. 1. 3. Böbreklerin yapısı.....	4
2. 1. 4. Böbreklerin damarları ve sinirleri.....	5
2. 2. Böbrek Histolojisi.....	8
2. 2. 1. Böbreklerin yapısı.....	8
2. 2. 2. Nefron.....	8
2. 2. 3. Glomerül ve kanın süzülmesi.....	11
2. 2. 4. Proksimal tübül.....	14
2. 2. 5. Henle kulpu.....	15
2. 2. 6. Distal tübül.....	16
2. 2. 7. Toplayıcı tübül.....	17
2. 3. Böbrek Fizyolojisi.....	18
2. 4. Metotreksat.....	21
2. 4. 1. Metotreksatın metabolizması ve dağılımı.....	23
2. 4. 2. Metotreksatın antiinflamatuvar, immünomodülatör ve antiproliferatif etkisi...:	24
2. 4. 3. Metotreksatın yan etkileri.....	25
2. 4. 4. Metotreksatın nefrotoksik etkisi.....	26
2. 5. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	27
2. 5. 1. Endojen kaynaklı serbest radikaller.....	27
2. 5. 2. Eksojen kaynaklı serbest radikaller.....	28
2. 5. 3. Serbest oksijen radikallerine karşı savunma mekanizmaları.....	29
2. 5. 3. 1. Antioksidan sistemler.....	29
2. 5. 3. 2. Enzimatik antioksidanlar.....	29

1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	29
2. Malondialdehit (MDA).....	30
3. Nitrik oksit (NO).....	30
4. Miyeloperoksidaz (MPO).....	31
5. Ksantin oksidaz (XO).....	32
2. 6. Flavonoidler.....	32
2. 6. 1. Flavonoidlerin yapısı.....	33
2. 6. 2. Kuersetin.....	34
2. 6. 3. Flavonoidlerin metabolizması.....	36
2. 6. 4. Kuersetinin antioksidan etkisi ve oksidatif stres.....	37
2. 7. Apoptoz.....	38
2. 7. 1. Apoptozun mekanizması.....	39
2. 7. 2. Hücre dışı uyarılarla apoptozun tetiklenmesi.....	40
2. 7. 3. Apoptozda hücre içi yol.....	41
2. 7. 4. Apoptoz mekanizmasında rol alan moleküller.....	43
2. 7. 5. Reaktif oksijen radikalleri ve apoptoz.....	44
2. 7. 6. Apoptotik hücre ölümünün saptanması.....	44
1. TUNEL yöntemi.....	44
2. Kaspaz-3 yöntemi.....	45
3. MATERYAL VE METOD.....	46-58
3. 1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı.....	46
3. 2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	46
3. 3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Diğer Malzemeler.....	47
3. 4. Deneysel Çalışma Grupları.....	47
3. 5. Histolojik Yöntemler.....	49
3. 6. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling) Yöntemi.....	51
3. 7. Apoptotik İndeks (APOİ).....	53
3. 8. Kaspaz-3 Yöntemi.....	53
3. 9. Biyokimyasal Çalışmalar.....	54
3. 9. 1. Serum ve doku örneklerinin saklanması.....	54
3. 9. 2. Dokuların homojenizasyonu ve deney için hazırlanması.....	54
3. 9. 3. Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	55
3. 9. 4. Serum ve dokuda SOD aktivitesi ölçümü.....	55
3. 9. 5. Serum ve dokuda XO aktivitesi ölçümü.....	56
3. 9. 6. Serum ve dokuda MDA düzeyi ölçümü.....	56
3. 9. 7. Serum ve dokuda NO düzeyi ölçümü.....	57
3. 9. 8. Serumda MPO düzeylerinin belirlenmesi.....	57
3. 10. İstatistiksel Analiz.....	57

4. BULGULAR.....	59
4. 1. Vücut Ağırlıkları ve Ağırlık Kazançları.....	59-83
4. 2. Histolojik Bulgular.....	59
4. 2. 1. Işık mikroskopik bulgular.....	62
4. 2. 1. 1. Rutin histolojik boyamalar.....	62
1. Kontrol grubuna ait ışık mikroskopik bulgular.....	62
2. Metotreksat grubuna ait ışık mikroskopik bulgular.....	63
3. Metotreksat + Kuersetin grubuna ait ışık mikroskopik bulgular.....	65
4. Kuersetin grubuna ait ışık mikroskopik bulgular.....	66
4. 2. 1. 2. TUNEL boyama bulguları.....	68
1. Kontrol grubuna ait apopitotik bulgular.....	68
2. Metotreksat grubuna ait apopitotik bulgular.....	69
3. Metotreksat + Kuersetin grubuna ait apopitotik bulgular.....	70
4. Kuersetin grubuna ait apopitotik bulgular.....	71
4. 2. 1. 3. Kaspaz-3'ün değerlendirilmesi.....	72
1. Kontrol grubuna ait kaspaz-3 bulguları.....	73
2. Metotreksat grubuna ait kaspaz-3 bulguları.....	73
3. Metotreksat + Kuersetin grubuna ait kaspaz-3 bulguları.....	74
4. Kuersetin grubuna ait kaspaz-3 bulguları.....	75
4. 3. Biyokimyasal Bulgular.....	76
4. 3. 1. Serum SOD aktiviteleri.....	78
4. 3. 2. Serum MDA düzeyleri.....	78
4. 3. 3. Serum MPO düzeyleri.....	79
4. 3. 4. Serum XO düzeyleri.....	80
4. 3. 5. Serum NO düzeyleri.....	81
4. 3. 6. Doku SOD düzeyleri.....	81
4. 3. 7. Doku MDA düzeyleri.....	82
4. 3. 8. Doku XO düzeyleri.....	82
4. 3. 9. Doku NO Düzeyleri.....	83
5. TARTIŞMA.....	84-88
6. ÖZET.....	89
7. SUMMARY.....	90-91
8. KAYNAKLAR.....	92-98

ŞEKİLLER ve GRAFİKLER

Şekil 1: Böbreğin Yapısı

Şekil 2: Böbrekteki damarların seyri

Şekil 3: Böbrek kan akımı

Şekil 4: Nefronun Bölümleri

Şekil 5: Glomerüler kapiller membran

Şekil 6: Jukstaglomerüler aparatın kesitsel ve mikroskopik görünümü

Şekil 7: İdrar oluşumu

Şekil 8: Metotreksatın yapısal formülü

Şekil 9: Folik asit metabolizması

Şekil 10: Nitrik oksitin sentezi

Şekil 11: Hipoksantinden ürik asit oluşumu

Şekil 12: Flavonoidlerin genel yapısı

Şekil 13: Kuersetinin kimyasal yapısı

Şekil 14: Hücre dışı uyaranlarla (ekstresek yol ile) hücrenin apoptoza gidişi

Şekil 15: Apoptotik süreç (intrinsik ve ekstrinsik yol ile) ve bu süreçte yer alan proteinler

Grafik 1: Grupların histolojik parametreler açısından değerlendirilmesi

Grafik 2: TUNEL boyama yapılan doku kesitlerinde APOİ ortalamaları grafiği

Grafik 3: Gruplara ait kaspaz-3 (+) boyanma sonuçları

Grafik 4: Grupların serum SOD aktivite düzeyleri

Grafik 5: Grupların serum MDA düzeyleri.

Grafik 6: Grupların serum MPO düzeyleri

Grafik 7: Grupların serum XO düzeyleri

Grafik 8: Grupların serum NO düzeyleri

Grafik 9: Grupların doku SOD düzeyleri

Grafik 10: Grupların doku MDA düzeyleri

Grafik 11: Grupların doku XO düzeyleri

Grafik 12: Grupların doku NO düzeyleri

TABLolar

Tablo 1: Deneysel alışma grupları.

Tablo 2: Histolojik takip basamakları.

Tablo 3: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.

Tablo 4: Grupların başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ile ağırlık kazançları.

Tablo 5: Vücut ağırlık kazançlarının gruplar arası ikili istatistiksel karşılaştırılması.

Tablo 6: Gruplara ait histolojik değişiklikler ve histolojik değişikliklerin gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Tablo 7: TUNEL boyama yapılan doku kesitlerinde APOİ sonuçlarının gruplara göre dağılımı.

Tablo 8: Gruplara ait kaspaz-3 (+) boyanma sonuçları.

Tablo 9: Grupların serum SOD, MDA ve MPO değerleri.

Tablo 10: Grupların serum XO ve NO değerleri.

Tablo 11: Grupların doku SOD, MDA, XO ve NO değerleri.

Tablo 12: Biyokimyasal parametrelerin gruplar arası ikili istatistiksel karşılaştırılmasında p değerleri.

SİMGE ve KISALTMALAR

ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim

ADA: Adenozin deaminaz

ATP: Adenozin trifosfat

Ca⁺²:Kalsiyum

C: Karbon

Cl: Klor

°C: Santigrad derece

CAT: Katalaz

cm: Santimetre

Cu: Bakır

dk: Dakika

DHF: Dihidrofolat

DNA: Deoksiribonükleik asit

Fe⁺²: Demir

FH₂: Dihidrofolat

FH₄:Tetrahidrafolat

GFR: Glomerül kapillerlerindeki
filtrasyon hızı

gr: Gram

GSH: Redükte glutatyon

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

GSSG: Okside glutatyon

HCl: Hidroklorik asit

HCO₃: Bikarbonat

HE: Hematoksilen eozin

H₂O₂: Hidrojen peroksit

K⁺: Potasyum

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

Mg⁺²: Magnezyum iyonu

MDA: Malondialdehit

mg: Miligram

ml: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolar

µm: Mikrometre

µmol: Mikromol

MPO: Miyeloperoksidaz

MTX: Metotreksat

Na: Sodyum

NaCl: Sodyum klorür

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NAD⁺: Nikotinamid adenin dinükleotid
(yükseltgenmiş)

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid
(indirgenmiş)

NADP⁺: Nikotinamid adenin dinükleotid
fosfat (yükseltgenmiş)

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid
fosfat (indirgenmiş)

NBT: Nitroblue tetrazolium

nm: Nanometre

nmol: Nanomol

NO: Nitrik oksit

NO₂⁻: Nitrit

NO₃⁻: Nitrat

NSAİ: Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaç

O[•]: Süperoksit

OH[•]: Hidroksil radikali

ONOO⁻: Peroksinitrit

PAS: Periodic Acid Schiff

RNA: Ribonükleik asit

RO[•]: Lipid alkoksil

ROO[•]: Peroksil radikali

SOR: Serbest oksijen radikalleri

SOD: Süperoksit dismutaz

SAH: S- adenzil homosistein

SAM: S- adenzil metyonin

TBA: Tiyobarbitürük asit

TBS: Tris buffer saline

TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz

THF: Tetrahidrofolat

TNF: Tumor nekrosis factor (tümör nekroze edici faktör)

IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling

U: Ünite

XO: Ksantin oksidaz

Zn: Çinko

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Böbrekler vücudumuzda hayati öneme sahip birçok görevi yerine getirirler. Su ve elektrolit dengesini sağlayarak osmoregülasyonda, asit-baz dengesinin düzenlenmesinde, salgıladıkları renin ile kan basıncının ayarlanmasında, vücudun eritropoetin ile eritrosit yapımının düzenlenmesinde, D₃ vitamininin aktif hale dönüştürülmesinde, metabolizma atık ürünlerinin, ilaç ve toksinlerin vücuttan atılmasını sağlamada böbreklerin önemli rolleri vardır (1, 2).

Günümüzde kanser vakalarının artışından dolayı kemoterapötik ajanlar daha fazla oranda kullanılmaktadır. Metotreksat (MTX) da bir antimetabolik ajan olarak hücre siklusunun çoğalma fazında hücrelere etki ederek mitozu engellemektedir. Bu özelliğinden dolayı çoğalma fraksiyonu yüksek olan santral sinir sistemi tümörlerinde, osteosarkomda, çocukluk çağı lösemisinde, birçok lenfomada tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Bunun yanında antiinflamatuvar etkilerinden dolayı düşük dozda birçok inflamatuvar hastalıkta da (psöriyazis, sarkoidoz, dermatomyozit, romatoid artrit) kullanılmaktadır (3, 4).

Metotreksatın sitotoksik etkisi yalnızca malign hücreler üzerine değildir; aynı zamanda hızlı yenilenen gastrointestinal sistem mukozası ve hematopoetik sistem üzerinde de yan etkileri vardır. Bu tarz ilaçların terapötik amaçlı kullanılmaları hayati organlara olan toksik etkilerini de beraberinde getirmektedir. Metotreksat karaciğerde metabolize olduğundan ve metabolitleri de böbrek yoluyla atıldığından dolayı karaciğer ve böbrek gibi organlarda ciddi hasarlara neden olabilmektedir. Böbrekte metotreksat metabolitleri böbrek tübüllerine çökerek tübüler atrofi - nekroza ve böbrek fonksiyon testlerinde bozukluklara neden olabilmektedir (5, 6).

Metotreksat bir folat antagonisti gibi davranarak pürin ve pirimidin sentezini engeller. Dolayısıyla hücrede hayati önemi olan DNA ve ATP sentezini ve birçok reaksiyonu inhibe etmesi sebebiyle hücrelerde serbest oksijen radikallerinin (SOR) artışına neden olmaktadır. Metotreksat vücutta oksidan-antioksidan hasarın, oksidan maddeler lehine bozularak

hücrelerin zarar görmesine neden olur (7, 8). Bu yan etkilerinden korunmak amacıyla lökoverin kurtarma tedavisi ve folik asit desteğinden yararlanılmaktadır (9).

Flavonoidler bitkisel kaynaklı polifenolik bileşiklerdir. İn vitro çalışmalarda antioksidan ve serbest radikal yakalama özellikleri dikkatlerin flavonoidler üzerinde toplanmasına neden olmuştur (10). Birçok meyve ve sebze de bulunan flavonoidlerin flavonol grubundan olan kuersetinin çeşitli mekanizmalarla oksidan hasarı engellediği, hücre ölümünü azalttığı ve hücreyi lipid peroksidasyonundan koruduğu gösterilmiştir (11, 12). Aynı zamanda antialerjik, antiinflamatuar, antihipertansif ve antiproliferatif etkileri de bulunmaktadır (13).

Bu çalışmada metotreksatin terapötik amaçlı kullanımından kaynaklanan nefrotoksik etkilere karşı antioksidan ajan olarak bilinen kuersetinin etkinliği histopatolojik ve biyokimyasal olarak incelendi. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlarla, böbrek hasarı üzerine kuersetinin olası yararlı etkilerinin böbrekle ilgili klinik çalışmalara ışık tutabileceği düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Böbrek Anatomisi

2. 1. 1. Böbreğin yerleşimi, şekil ve büyüklüğü

Böbrekler karın arka duvarında, columna vertebralisin her iki yanında 12. torakal ile 3. lumbar vertebralar arasındaki seviyede, retroperitoneal olarak sağda ve solda yerleşen fasulye şeklindeki organlardır. Karın boşluğunun sağ üst kısmında karaciğer bulunması nedeniyle sağ böbrek genellikle sol böbrekten biraz aşağıda bulunur. Bir insanda böbrekler kırmızı-kahverengi renkte ve yaklaşık 10 cm uzunluğunda, 5 cm genişliğinde, 2.5 cm kalınlığındadır. Böbreğin ağırlığı erişkin erkeklerde 125-170 gr iken kadınlarda 115-155 gr kadardır. İki böbreğin ağırlığı vücut ağırlığının yaklaşık 1/240'ı kadardır.

Böbrekler yukarıdan diyafragma ile komşudurlar. Diyafragma, böbrekleri pleural boşluktan ve 12. kostadan ayırır. Sağ böbreğin ön yüzü; surrenal bez, karaciğerin sağ lobu, colon ascendens, fleksura coli dekstra, duodenumun ikinci parçası (pars descendens) ve jejunum kıvrımları ile komşudur. Sol böbreğin ön yüzü; surrenal bez, dalak, mide, pankreasın gövdesi, splenik damarlar, fleksura coli sinistra, kolon descendensin başlangıcı ve jejunum kıvrımları ile komşuluk yapar. Böbreklerin üst-iç yüzleri surrenal bez ile komşudur. Her böbreğin anterior ve posterior yüzü, superior ve inferior ucu, medial ve lateral kenarı bulunmaktadır. Lateral kenarı dışbükey, medial kenarı ise içbükeydir. Her böbreğin konkav olan medial kenarındaki vertikal yarığa hilum renale adı verilir. Burada pelvis renalis ve sinüs renalis yer alır. Hilum renale böbreğin içinde sinüs renalis denilen boşluğa açılır. Arteria renalis, hilum renaleden sinüs renalise girer ve vena renalis ile pelvis renalis çıkar. Hilumdaki yapılar önden arkaya doğru ven-arter-pelvis renalis olarak sıralanırlar. Sinüs renalis ise pelvis renalis, kaliksler, damarlar, sinirler ve bir miktar da yağ dokusundan oluşmaktadır (14).

2. 1. 2. Böbreği dıştan saran yapılar

Her böbrek üç bağ dokusu örtüsüne sahiptir. Bu örtüler içten dışa doğru capsula fibrosa, capsula adiposa ve fascia renalistir.

Capsula Fibrosa (Renal kapsül): Böbreği saran, ince fakat sağlam fibröz bir kılıftır. Kollajen liflerden oluştuğundan oldukça sağlamdır. Bu sebeple genişleme kabiliyeti azdır. Fakat böbreğe tamamen yapışmadığından böbrekten kolayca ayrılabilir. Böbrek hilusuna geldiğinde iki yaprağa ayrılarak, bu yapraklardan birisi böbrek hilusunda bulunan yapıların üzerine geçerek, onların adventisyası olarak devam eder. Diğer yaprak ise hilum renaleden içeri girer ve papillalar hariç sinüs renalisin iç yüzünü döşer.

Capsula Adiposa (Perirenal yağ tabakası): Fibröz kapsülü dıştan saran bir yağ tabakasıdır. Böbreği darbelere karşı korur. Bu yağ tabakası böbrek hilusundan geçerek sinüs renalise girer ve buradaki yapıların arasını doldurur.

Fascia Renalis (Gerota fasyası, perirenal fasya): Adipoz kapsülün dışındadır. Karın duvarındaki ekstrapéritoneal yağ dokusunun yoğunlaşması ile oluştuğu kabul edilir. Renal fasya ve adipoz kapsül böbreği adrenal bezle beraber sarmıştır (15, 16).

2. 1. 3. Böbreklerin yapısı

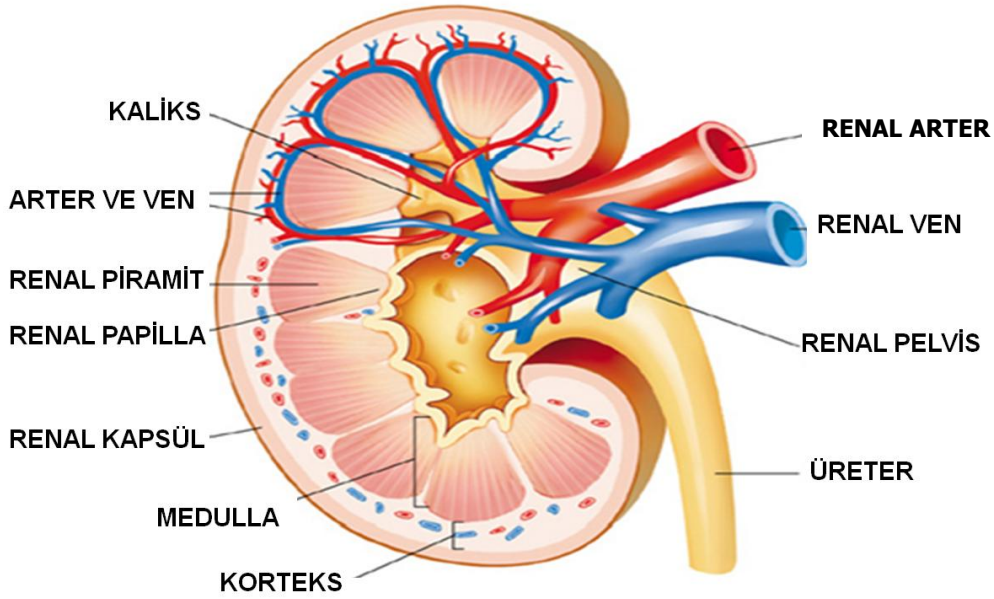
Böbreğe frontal bir kesi yapıldığında içten dışa doğru 3 farklı bölgeye ayrılır: pelvis renalis, medulla renalis, korteks renalis (Şekil 1).

Pelvis Renalis: Tepesi hilum renaleden çıkmış üretere uzanan ve gövdesi sinüs renalise oturmuş kas ve zardan yapılmış huni şeklindeki bölümdür. Üstten sinüs renalise oradan da majör ve minör kaliksler şeklinde böbrek dokusu içine doğru uzanmaktadır.

Medulla Renalis: Medulla en içteki sinüs renalisten kortekse kadar uzanan bölümdür. Malpighi piramitleri denilen 8-10 adet koni şeklindeki yapılardan oluşur. Bunların basis pyramidis denilen taban kısımları böbreğin dış yüzüne otururken, papilla renalis denilen tepe kısımları ise sinüs renalise doğru uzanır. Renal piramitler birbirine değmeyecek şekilde sinüs

renalisin etrafında sıralanırlar. Bunların aralarında columna renalis (Bertini sütunları) denilen korteks uzantıları bulunur. İçte renal piramitler ve dıştan onu saran korteks bölümüne bir böbrek lobu veya lobus renalis adı verilir. Renal piramitlerin taban kısımlarından kortekse doğru gönderdiği parmakı uzantılara pars radiata (Stria medullaris = Ferrein uzantıları) denir.

Korteks Renalis: Böbrek kitlesinin 1/3'ünü kapsayan kısımdır. Böbrek kapsülü ile renal piramitlerin arasındaki bölümdür. İki kısımdan oluşmaktadır. İlk kısmı böbreği kabuk gibi saran capsula fibrosa ile renal piramitlerin taban kısımları arasında bulunur. İkinci kısmı ise böbrek piramitleri arasında bulunur ve sinüs renalise kadar uzanır (Bertini sütunları). Medullanın kortekse gönderdiği medullar uzantılar olan pars radiataların arasında kalan korteks kısmına ise pars convulata denir. Corpusculum renale (Malpighi cisimcikleri) denilen ve kandan idrarı süzen yapılar burada bulunur (15, 16).



Şekil 1: Böbreğin yapısı (17).

2. 1. 4. Böbreklerin damarları ve sinirleri

Böbreğin temel görevi; inen aortadan dallanarak böbrek arterlerinden gelen kanı süzmektir. Vücutta dolaşan kanın 1/5'i böbreklere gitmektedir. Gelen kanın % 90'ı böbrek korteksine % 10'u da medullaya gider.

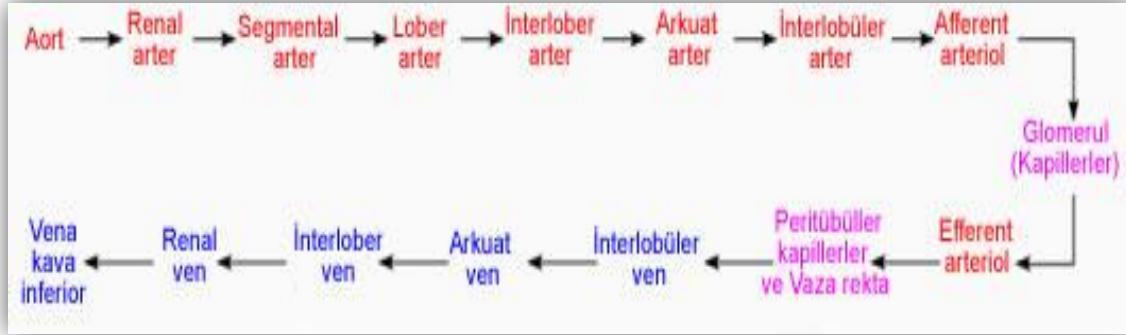
Böbrekler her dakikada (dk) 1.2 litre kanı süzerek atık maddelerden arındırırlar. Bu da vücuttaki tüm kanın her 5 dakikada bir böbreklerden süzülmesi demektir. Böbreklerden süzülen kanın % 99'u geri emilirken % 1'i ise idrar olarak dışarı atılır. Böbrekler 1. ve 2. lumbar vertebralar seviyesinde aorta abdominalisten sağlı ve sollu ayrılan renal arterler tarafından beslenirler. Renal arterler böbreğe oksijenlenmiş kanı getirirler. Böbreğin pozisyonundan dolayı soldaki renal arter sağdakinden daha yukarıda bulunur. Renal arterler, renal sütunlar içinden piramitlerin kenarları boyunca ilerleyerek medullayı geçen birçok loblararası arterlere (interlobar arter) dallanır (18) (Şekil 3).

Korteks-medulla kavşağında interlobar arterler arkuat arterleri oluşturmak için birçok dal verirler ve dikey olan yollarını yatay yönde değiştirerek korteks-medulla sınırında seyrederek. Arkuat arterlerden çıkan dikey dallar olan interlobüler arterler kortekse girer. İnterlobüler arterler dış kortekse doğru yükselirken afferent arteriollerini oluşturmak üzere birçok kez dallanırlar. Afferent arteriol iki tabakalı Bowman kapsülü ile çevrelenen glomerüler kapiller ağını oluşturur. Kan buradaki kapillerlerden geçerek efferent arteriollere aktarılır. Bu iki arteriol tarafından oluşturulan kapiller yumağa glomerül adı verilir. Renal korpüskülün yerleşimine göre efferent arteriyoller iki farklı kapiller ağ oluşturur.

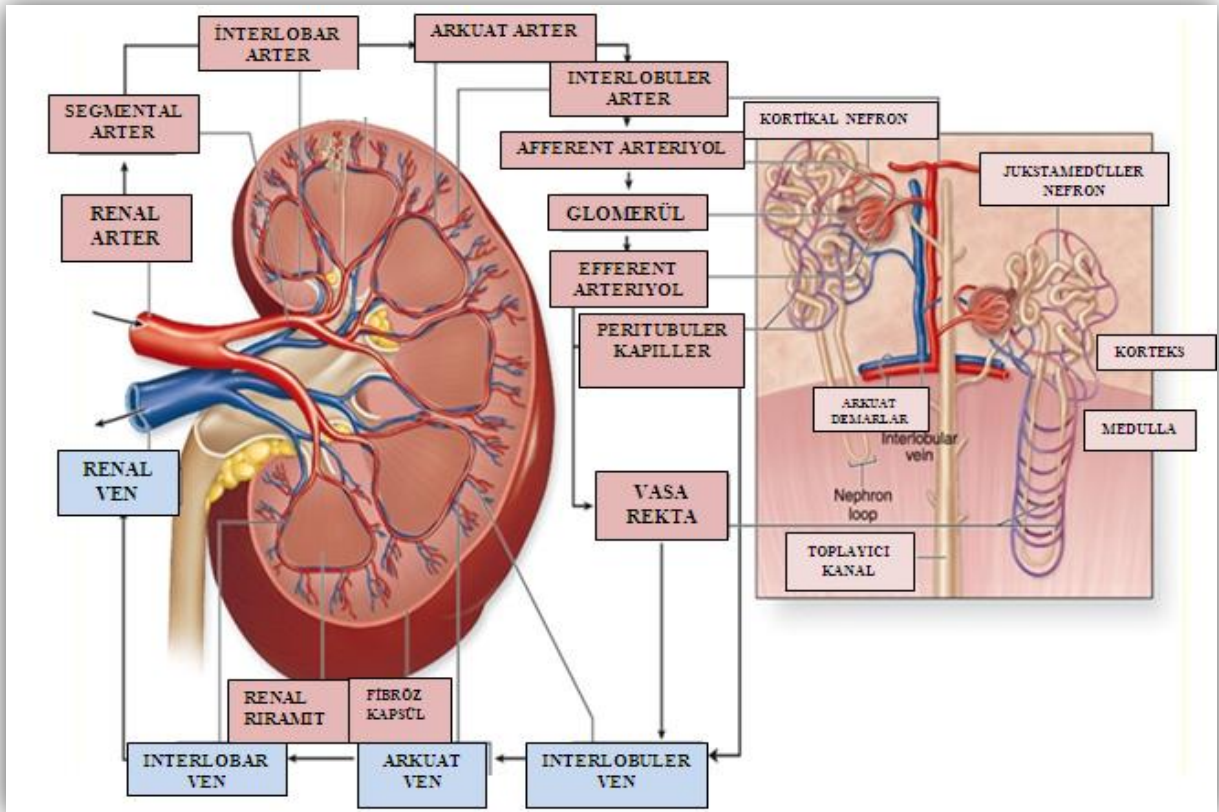
1. Yüzeyel tübüllerin korteksteeki parçalarını çevreleyen peritübüler kapiller ağ. Peritübüler kapiller ağ proksimal ve distal tübülleri besler ve düşük molekül ağırlıklı maddeleri ve iyonları dolaşım sistemine taşır. Stelat vene, sonra da interlobüler vene boşalırlar.

2. Korteks - medulla kavşağına yakın olan efferent arteriyollerin çok sayıda dallanması ile şekillenen vasa rekta. Jukstamedüller nefronlarla ilişkili olan efferent arteriollerin oluşturduğu ince, uzun kapiller damarlardır. Medullada düz bir yol izler ve sonra yeniden kortikomedüller sınıra doğru geriye kıvrılırlar. Glomerülden süzülen kanı taşıyan bu damarlar medullanın beslenmesini sağlar. Kangal biçimindeki yapıları sebebiyle bu damarlar Henle kulpunun ince kısımlarının interstisyumda oluşturduğu yüksek osmotik gradiyentin uzağa taşınmasını

engellerler. Vasa rektalar, önce interlobüler venlere ordanda arkuat venlere dökülürler. Arkuat venlerde interlobar venlere dönüşür. İnterlobar venler de renal veni oluşturmak üzere birleşirler ve kan buradan böbreği terk eder (18). Damarların seyri Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2: Böbrekteki damarların seyri (19).



Şekil 3: Böbrek kan akımı (20).

Böbreğin lenfatikleri: Lenf damarları 3 pleksustan oluşur. Bunlardan birincisi renal tübüllerin çevresinde, ikincisi renal fasyanın altında üçüncüsü de corpus adiposum

pararenalede bulunur. Bu pleksuslar hilum renaleden çıkarken birleşirler ve renal veni takip ederek aortanın yan tarafındaki nodi lymphatici lumbalese (aortici laterales) drene olurlar (18).

Böbreğin sinirleri: Sempatik lifler nervus splanchnicus minor, nervus splanchnicus imus ve truncus sympathicusun lumbal bölümünden, parasempatik lifleri ise nervus vagustan gelir. Bu lifler önce pleksus coeliacus, daha sonra renal arter etrafındaki pleksus renalis aracılığıyla böbreğe gelir. Pleksus renalisten çıkan sinir lifleri böbreğin parankimi içerisine girer ve nefronlara kadar giderler (18).

2. 2. Böbrek Histolojisi

2. 2. 1. Böbreklerin yapısı

Boşaltım sistemi; iki böbrek, iki üreter, bir idrar kesesi ve bir üretradan oluşur. Her böbrek dışta korteks (kabuk) ve içte medullaya sahiptir. Korteks iç ve dış bölgelere ayrılır. Medulla ise 10-18 adet piramidal şekilli yapılar olan medüller piramitlerden oluşur.

Metanefrik blastemdeki primitif lobların kaynaşma bölgelerinden arta kalan yapılar olan böbrek sütunları (Bertini), bir böbrek lobunun sınırlarını oluşturur. Her böbrek lobunun tepesi, bir minör kaliksle çevrelenen bir papillada sonlanır. Her minör kaliks bir papilladan gelen idrarı toplar. Minör kaliksler majör kaliksleri, ardından da pelvisi oluşturmak üzere birleşirler (1, 2, 21).

2. 2. 2. Nefron

Nefron, böbreğin yapısal ve fonksiyonel birimidir. Her böbrek 1-4 milyon arasında nefron içerir. Nefronlar; renal cisimcik olarak adlandırılan genişleyen bir bölümden, proksimal kıvrımlı ve proksimal düz tübül, Henle kulpu ince ve kalın kısmı, distal düz ve distal kıvrımlı tübül olarak 5 kısımdan oluşmaktadır.

Renal cisimcik (korpüskül) (Malpighi cisimciği): Yaklaşık 200 mikron çapındaki yuvarlak yapılardır. Nefronun başlangıç kısmı olan renal korpüsküller plazmanın filtrasyonundan asıl

sorumlu olan yapılardır. Renal korpüsküller, kapiller damarların kıvrılıp bükülerek oluşturduğu yumak şeklindeki yapı olan glomerül ve glomerülü saran çift tabakalı bir membran olan Bowman kapsülünden oluşur. Kapsülün iç tabakası (visseral tabaka) glomerülün kapillerlerini örter. Dış tabaka böbrek cisimciğinin en dış sınırını oluşturarak paryetal tabaka adını alır. Paryetal tabaka ince bir retiküler lif tabakası ve bazal lamina ile desteklenen tek katlı yassı epitelden oluşur. Paryetal tabaka ile visseral tabaka arasında kalan mesafeye Bowman mesafesi (idrar boşluğu) denir. Glomerül kapillerine kan afferent arteriol ile gelir ve efferent arteriol ile drene olur. Afferent arteriol, böbrek cisimciğine girdikten sonra genellikle herbiri kapillerlere dönüşen ve glomerülü saran 2-5 dala ayrılır. Her renal korpüskülde afferent arteriollerin glomerüle girdiği ve efferent arteriollerin glomerülü terkettiği bir damar kutbu ve proksimal tübüllere açılan bir idrar kutbu bulunur. Bowman mesafesi idrar kutbunda proksimal tübülün lümeni ile devamlılık gösterir. Paryetal tabakanın epiteli idrar kutbunda proksimal tübül için tipik olan tek katlı kübik veya prizmatik epitele dönüşür.

Glomerül üç bileşenden oluşur:

1. Pencereci endotel hücreleriyle döşenen glomerüler kapillerler,
2. Mezengiyal matrikse gömülü mezengiyal hücrelerce oluşturulan mezengiyum,
3. Bowman kapsülünün visseral tabakasını oluşturan podositler.

Glomerülü saran visseral yapraktaki hücreler yıldız şeklinde uzanırlar. Bu hücrelere podosit denir. Podositlerin hücre gövdeleri ile bazal membran arasında dar bir aralık vardır. Podositlerin hücre gövdesinden çıkan primer uzantılar dallanarak pedisel adı verilen sekonder uzantıları oluştururlar. Pediseller komşu hücrelerin pedisellerinin aralarına sokulur. Ayakçıklar arasında kalan mesafe filtrasyon yarığı olarak adlandırılır. Bu alan kan kaynaklı ultrafiltratın Bowman mesafesine geçmesine izin verir. Filtrasyon yarığının geçirgenliğini

kontrol eden bir faktör de burada bulunan ince bir membrandır. Podositlerin sitoplazmalarında bunların kasılabilmesini sağlayan aktin mikrofilamanlarından oluşan demetler bulunur.

Renal korpüsküllerin korteks içindeki yerleşim yerlerine göre çeşitli nefron tipleri tanımlanmıştır. Renal korpüskülleri korteksin dış bölümünde yer alan nefronlara kortikal nefronlar denir. Medullar piramitler arasında yer alanlara ise jukstaglomerüler nefron denir. Korteksin ortalarında yer alanlara ise intermediyer veya midkortikal nefron adı verilir. Nefronun tübül bölümleri farklı isimlerle nitelendirilir:

Proksimal kıvrımlı tübül: İdrar kutbundan başlar ve kıvrımlı olarak seyreder. Medullaya girdiğinde düz bir seyir kazanıp proksimal düz tübüle dönüşür.

Proksimal düz parça: Medullaya doğru inen bu parça aynı zamanda Henle kulpunun inen kalın parçasını oluşturur.

İnce inen parça: Proksimal düz tübülün medulladaki devamıdır. Burada kıvrılarak kortekse doğru döner.

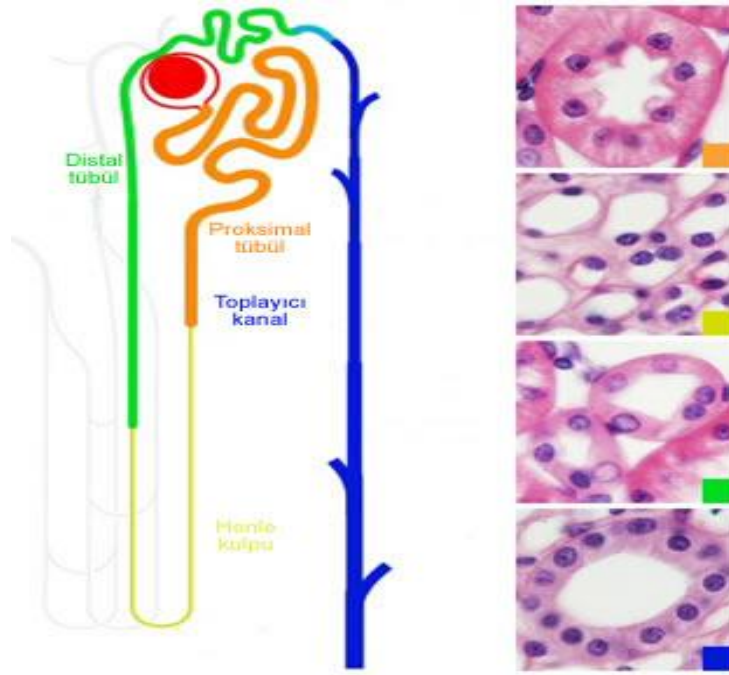
İnce çıkan parça: İnce parçanın kortekse doğru çıkan bölümüdür.

Distal düz tübül: Bu bölüm Henle kulpunun çıkan kalın parçasını oluşturur. Medullada biraz yol aldıktan sonra medulla ışınlarının olduğu bölgede kortekse girer. Medulla ışınlarını terk ettikten sonra renal korpüskülün vasküler kutbu ile temas kurar. Burada glomerülün afferent arteriolüne yakın konumda bulunan tübülün epitel hücreleri yoğunlaşır ve boyları uzar. Böylece özel bir yapı olan makula densa oluşur.

Distal kıvrımlı tübül: Korpüskül bölgesini terk eden tübül kıvrımlı bir hal alarak bu parçayı oluşturur. Bu parça ya bir bağlayıcı tübül aracılığıyla veya toplayıcı tübülü takiben toplayıcı kanala açılır.

Toplayıcı kanal medulla ışınlarında yer alır. Renal tübül (üriner tübül) kavramı nefrona ilaveten toplayıcı sistemi de (toplama tübülleri ve toplama kanalları) kapsar. Tek katlı bir epitel ile dōşeli olan renal tübülün başlıca fonksiyonu glomerüler filtrattan suyun, inorganik

iyonların ve diğer maddelerin reabsorbsiyonudur. Buna ilaveten bazı inorganik iyonların kandan tübül lümenine salgılanmasıdır (1, 2, 21).



Şekil 4: Nefronun Bölümleri (22).

2. 2. 3. Glomerül ve kanın süzülmesi

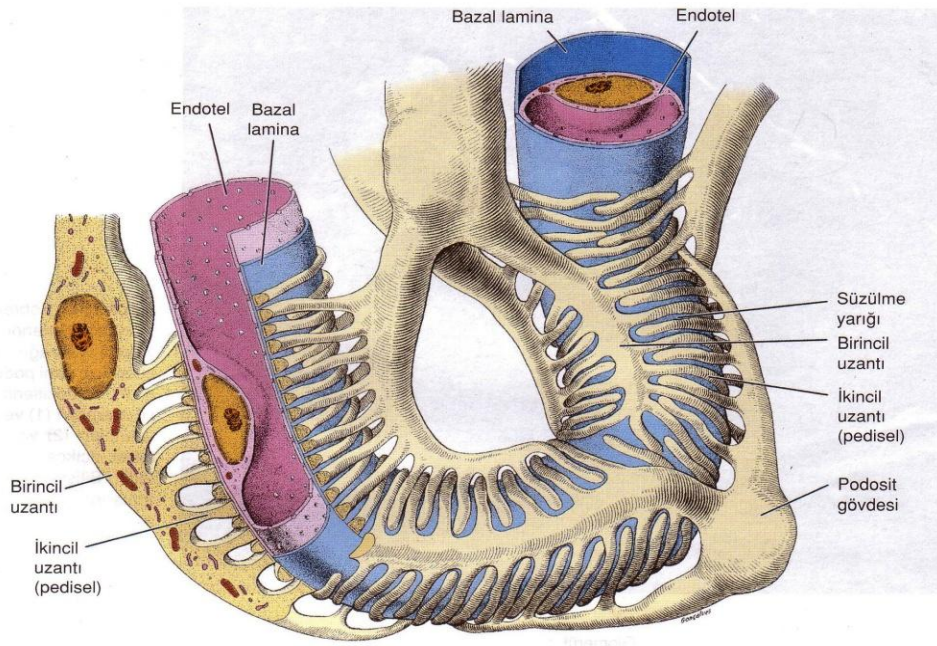
Filtrasyonun oluşmasında görevli yapılar:

Glomerüler kapiller endoteli: Glomerüler kapillerler, diyaframsız pencereci endotel tipindedir. Endotel hücrelerinde çok sayıda geniş aralıklar bulunur.

Glomerüler bazal membran: Glomerüler kapiller endotel hücreleriyle bunların dış yüzeyini örten podositler arasındaki 100 nm = 0.1 mikron kalınlığında kalın bir bazal laminadır. Bu bazal lamina kapiller ve podositlere ait bazal laminanın kaynaşmasından meydana gelmiştir. Yapısal olarak tip 4 kollajen, siyaloglikoprotein, laminin, fibronektin gibi glikoproteinlerden, heparan sülfat gibi glikozaminoglikanlardan zengindir. Kan ile idrar boşluğu arasında bir filtrasyon engeli oluşturur. Elektron mikroskopunda ortada elektron yoğun tabaka (lamina densa), her iki yanda daha az yoğun elektron geçirgen tabaka (lamina rara - lusida) bulunur. Lamina densa ise tip 4 kollajenden zengindir. Bu özelliğinden dolayı fiziksel bariyer özelliği gösterirken, kapiller endoteline bitişik lamina rara interna tabakası ile Bowman kapsülünün

visseral hücrelerine komşu lamina rara eksterna tabakası, polianyonik bir molekül olan heparan sülfat içererek negatif yüklü moleküllerin geçişini engelleyen bir elektriksel bariyer oluşturur. Fiziksel bariyer nedeniyle 10 nm'den daha büyük partiküller, elektriksel engel nedeniyle de 6 nm'den daha büyük partiküller bazal laminadan geçemez. Bu sebeple albüminden (6nm) büyük proteinler genel olarak bu bariyeri geçemezler. Glomerüler bazal membranın morfolojik veya fonksiyonel olarak değişikliğe uğramasına neden olan patolojilerde bu bariyerin hasarlanmasıyla proteinüri görülebilir.

Bowman kapsülünün visseral yaprağı: Bowman kapsülünün paryetal yaprağı tek katlı yassı hücrelerden oluşurken, visseral yaprağın hücreleri oldukça özel hücrelerdir. Podosit olarak isimlendirilen bu hücreler glomerüler kapillerleri saran uzantılar gönderirler. Filtrasyon yarığı kan kaynaklı ultrafiltratın Bowman mesafesine geçmesine izin verir.



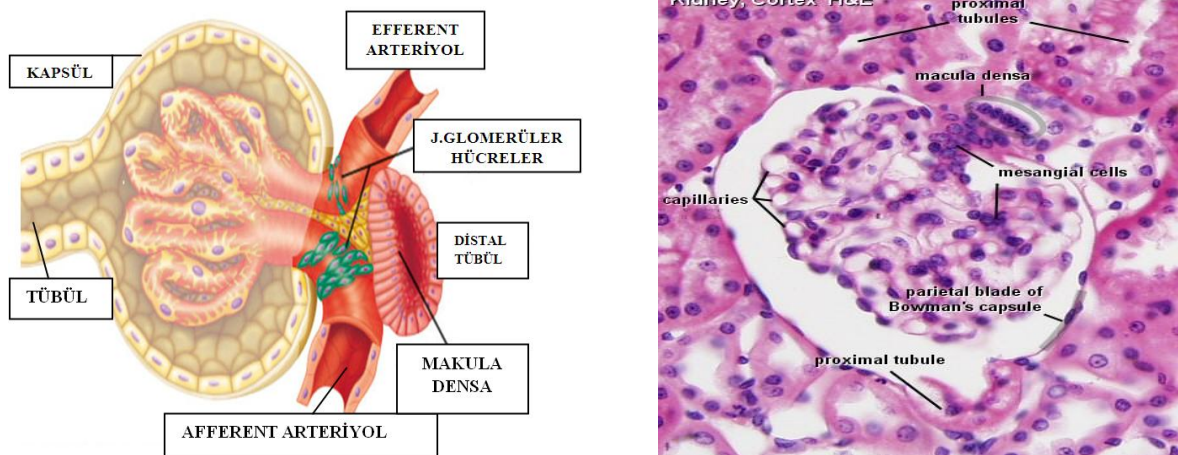
Şekil 5: Glomerüler kapiller membran (21).

Glomerüler süzme bariyerinin bileşenlerine ek olarak, plazma ultrafiltratındaki moleküllerin geçişini kontrol eden diğer sınırlayıcı faktörler ise ebat ve elektrik yüküdür. Örneğin, 3.5 nm'den daha küçük ve pozitif yüklü veya nötr moleküller daha kolay süzülürler.

Mezengiyum: Glomerüler kapillerler arasında bulunan intraglomerüler mezengiyal hücreler ve mezengiyal matriksten oluşan bir yapıdır. Mezengiyal hücreler düz kas ve makrofaj özelliklerine sahip, özelleşmiş perisit benzeri hücrelerdir. Glomerülün vasküler kutbunda glomerül dışında ise ekstraglomerüler mezengiyal hücreler (Lacis ve Polkissen hücreleri) bulunur. Fonksiyonları hakkında yeterli bilgi mevcut değildir ve tam olarak bilinmemektedir.

İntraglomerüler mezengiyal hücrelerin diğer fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber sahip oldukları fagositoz yeteneği sayesinde glomerül bazal membranındaki artıkları ve orada biriken proteinleri temizledikleri bilinmektedir. Epitelyal bazal membranın kesintiye uğradığı durumlarda da podositlere destek olurlar. Bu hücreler içerdikleri anjiyotensin II ve natriüretik faktör reseptörleri ve kontraktıl özellikleri sayesinde glomerüler kan akımını düzenleyebilirler. Mezengiyal hücrelerin glomerülü desteklemek, ekstrasellüler matriks bileşenlerini, sitokin ve prostaglandin gibi kimyasal maddeleri salgılamak gibi pek çok fonksiyonu olduğu da düşünülmektedir.

Jukstaglomerüler aparat: Makula densa, jukstaglomerüler hücreler ve ekstraglomerüler mezengiyal hücrelerden oluşur (Şekil 6).



Şekil 6: Jukstaglomerüler aparatın kesitsel ve mikroskopik görünümü (23, 24).

Distal düz tübülün afferent arteriole komşu epitel hücreleri değişikliğe uğrayarak, makula densayı oluştururlar. Histolojik kesitlerde bu bölgede hücrelerin boylarının uzadığı

nükleusların üst üste konumlandığı görülür. Makula densa tübül lümenindeki sodyum (Na^+) miktarına duyarlıdır. Bu hücreler hem glomerüler filtrasyon oranını hem de jukstaglomerüler hücrelerden renin salınımını düzenlerler. Aynı bölgede afferent arteriolün duvarında tunika mediada yer alan düz kas hücreleri de değişime uğrayarak jukstaglomerüler hücreleri oluşturur.

Jukstaglomerüler hücreler renin salgılayarak kan basıncını düzenlerler. Renin, anjiyotensinojen denilen plazma proteinini anjiyotensin I'e dönüştürür. Akciğer endotel hücrelerinde bulunan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından anjiyotensin I, anjiyotensin II'ye dönüştürülür. Vücutta kan basıncı düştüğü zaman renin salgısı da artarak anjiyotensin II miktarı artırılarak arteriollerde vazokonstrüksiyon gerçekleştirilir ve adrenal korteksten aldosteron salınımı indüklenir. Aldosteron da böbreklerde distal tübülleri etkileyerek Na^+ ve Cl^- geri emilimini artırır. Sonuçta damarlardaki sıvı hacmi artar. Vazokonstrüksiyon ve su tutulumu sonucu kan basıncının yükselmesi sağlanır.

Afferent ve efferent arteriolün arasında yer alan ekstraglomerüler mezengiyal hücreler soluk boyanan, eritropoetin salgıladıkları düşünülen hücrelerdir. Bu hücreler fagositoz yapabilen, kasılabilen ve bunun dışındaki fonksiyonları henüz tam olarak da anlayamamış hücrelerdir (1, 2, 21).

2. 2. 4. Proksimal tübül

Nefronun en uzun ve en geniş parçası olan proksimal tübülün kıvrımlı parçası kortekste seyrederken, düz parçası medullaya doğru inerek Henle kulpunun kalın inen parçasını oluşturur. Bowman kapsülü paryetal yaprağının epiteli tek katlı yassı iken proksimal tübüle gelince tek katlı kübik veya prizmatik epitele dönüşür. Tübülün enine kesitinde ortalama 6-12 adet epitel hücresi görülür. Hücrenin çekirdeği ortada ve yuvarlaktır. Histolojik kesitlerde kortekste bol miktarda proksimal tübüle rastlanır. Proksimal tübülün lümeni histolojik kesitlerde net olarak görülmeyebilir. Distal tübülden bu özelliğiyle ayrılabilir. Apikal yüzünde

ise çok sayıda mikrovillus bulunur ve buna fırçamsı kenar denir. Mikrovillusların yoğun olması emilim yüzeyinin artırılmasını sağlar. Fırçamsı kenar mikrovillus üzerinde yer alan kalın glikokaliks tabakasından dolayı PAS (Periodic Acid Schiff) (+) boyanır. Hücreler içerdikleri bol mitokondri nedeniyle asidofilik sitoplazmalıdır. Bazal plazma membranının sitoplazmaya doğru katlanmasından dolayı bazal yüzde çizgilenmeler görülür. Bu bölgede bol miktarda mitokondri ve aktin filamentleri bulunur. Aktin filamentleri sıvının tübül bazal membranından geçerek peritübüler kapillerlere ilerlemesini kontrol eder. Proksimal tübülün düz kısmı ise daha kısadır. Daha az oranda fırçamsı kenar içerir. Bu nedenle reabsorbsiyon yeteneği daha azdır. Hücrelerinde bazal ve lateral katlantılar daha az belirgindir.

Proksimal kıvrımlı tübül aktif ve pasif mekanizmalarla süzölmüş olan su, glikoz, Na^+ , K^+ gibi maddelerin %70 kadarının geri emildiği bölgedir. Tübül hücrelerinin bazolateral kısmında Na-K-ATPaz (Na pompası) bulunur. Bu pompayla Na^+ ve suyun interstisyel alana geçmesi sağlanır. Sodyumun aktif transportunu takiben Cl^- pasif difüzyonla hücreye alınır ve interstisyel alana gönderilir. İntersellüler alanda Na^+ ve Cl^- artışı osmotik gradiyent oluşturarak suyun lümeninden intersellüler alana geçmesine yol açar. Hücre membranlarının, akuaporin adı verilen ve moleküler bir su kanalı olarak görev yapan transmembran proteininden zengin olması da, fazla enerji harcanmadan suyun taşınmasına olanak sağlar.

Proksimal tübülün kalın glikokaliks tabakası disakkaridaz, peptidaz ve ATPaz gibi çeşitli enzimler içerir. Disakkaridaz enzimiyle disakkaritler monosakkaritlere, peptidaz enzimiyle de peptidler aminoasitlere parçalanarak mikrovilluslu yüzeyden geri emilir. Aminoasit ve glikozun geri emilimi Na^+ emilimine bağımlı olarak gerçekleşir (1, 2, 21).

2. 2. 5. Henle kulpu

Henle kulpu, renal korteksten başlayarak inen parçası ile medullanın derinlerine doğru devam eden, proksimal tübülden sonra gelen tübül kısmıdır. Henle kulpu; proksimal tübüle benzeyen kalın bir inen kol, ince bir inen kısım, ince bir çıkan kısım ve yapıca distal tübüle benzeyen

kalın bir çıkan koldan oluşan U şeklinde bir yapıdır. İnen kalın kol, proksimal tübülün düz parçasından oluşurken; çıkan kalın kol, distal tübülün düz parçasından oluşur. Distal kıvrımlı tübüle dönüşmeden Henle kulpunun çıkan parçası olarak medulladan kortekse geri döner. Bu nedenle Henle kulpu en iyi medullada görülür. Medullanın dış kısmında proksimal tübülün düz parçası aniden ince segmente dönüşür. Kolların kalın parçaları, proksimal tübüllerin epitel örtüsü ile değişen alçak kübik epitelle döşelidir. İnce parçalar ise basit yassı epitelle döşelidir. İnen ve çıkan ince kısımlarda, duvar epitelinin yassı olması nedeniyle lümen geniştir.

Bütün nefronların 1/7'si kortikomedüller sınırda bulunur. Bu nefron tipine jukstamedüller nefron denir. Diğer nefron tipi ise kortikal nefronudur. Jukstamedüller nefronların Henle kangalı çok uzundur ve bunlar medullanın derinliklerine kadar inerler. Bu uzun Henle kulpunun inen kalın kolları kısa, inen ve çıkan ince kısımlarla çıkan kalın kolları uzundur. Bütün nefronlar, süzme, emilim, salgılama işlemlerinde rol alırlar. Jukstamedüller nefronlar ayrıca medüller interstisyumda hipertonic bir ortam oluşturarak böbreğin hipertonic idrar üretme yeteneğinin temelini oluştururlar. Henle kulpunun inen ince parçası ile çıkan ince parçası fonksiyonel olarak farklılık gösterir. İnen ince parçaya gelen ultrafiltrat izoosmotikken, çıkan ince parçayı terk eden ultrafiltrat plazmaya göre hipoosmotiktir. İnen ince parça suya karşı son derece geçirgen; NaCl ve üreye daha az geçirgendir. Çıkan ince parça ise NaCl'e yüksek oranda geçirgenken, suya geçirgen değildir (1, 2, 21).

2. 2. 6. Distal tübül

Düz ve kıvrımlı distal tübülün yapısı birbirine benzerdir. Proksimal tübülden daha kısa ve incedir. Epiteli fırçamsı kenar içermeyen tek katlı kübik epiteldir. Epitel hücreleri geniştir ve lateral sınırları belirgin değildir. Nükleusları apikal sitoplazmaya yakındır. Distal tübül epitel hücreleri, proksimal tübülün epitel hücrelerinden daha az oranda mitokondri içerdiğinden dolayı daha soluk boyanır. Lümenleri proksimal tübülden daha geniştir. Distal tübülün Henle kulpunun yapısına katılan düz bölümü dışında makula densa ve kıvrımlı segment olmak üzere

iki segmenti daha vardır. Distal düz tübül, çıkan ince parça gibi, iyonları tübül lümeninden interstisyuma taşır. Apikal plazma membranı Na^+ , Cl^- ve K^+ gibi iyonların hücreye taşınmasını sağlayan taşıyıcılar bulundurur. Distal kıvrımlı tübül aldosteronun düzenleyici etkisi altında Na^+ geri emiliminden ve K^+ 'un sekresyonundan sorumludur. Bu bölümden bikarbonat geri emilirken, amonyum salgılanır (1, 2, 21).

2. 2. 7. Toplayıcı tübül

Distal kıvrımlı tübüller, toplayıcı tübüllere onlar da daha büyük toplayıcı kanallara açılırlar. Toplayıcı kanallar, kortekste medüller ışınları oluştururlar. Toplayıcı tübüller esas hücreler ve interkalat hücreler olmak üzere iki tip hücreden oluşan tek katlı kübik epitelle döşelidir. Kortikal bölümdeki toplayıcı tübüller yassı veya kübik epitelle döşelidir. Korteksten medullaya doğru toplayıcı tübüllerin çapı artar, kanal epiteli kübik veya prizmatik epitele dönüşür. Hücreler arasındaki sınır çok belirgin olduğundan proksimal ve distal tübülden kolayca ayırt edilebilir. Hücreleri soluk boyanmakla birlikte fırçamsı kenar ve bazal çizgilenme göstermezler. Esas hücreler, az sayıda katlantı ve mitokondriye sahiptir. Na ve suyu geri emerler ve Na-K-ATPaz pompasına bağımlı durumdaki K^+ 'u salgırlar. İnterkalat hücreler, çok miktarda mitokondri içerirler ve daha koyu boyanırlar. H^+ iyonu ya da HCO_3^- 'ı salgırlar. Bu nedenle asit-baz dengesinin önemli oranda düzenleyicisidirler. Medullada gerçekleştirilen idrar yoğunlaştırma işleminde en önemli rolü toplayıcı kanallar oynar.

Renal interstisyum: Hem kortekste hem de medullada idrar tübülleri ile kan ve lenf damarları arasındaki boşluklarda özelleşmiş hücreler vardır. Bu hücrelere interstisyel hücreler denir. İnterstisyel bağ dokusu renal medullanın papilla bölgesinde daha fazladır. Medullada interstisyumun primer hücreleri myofibroblastlardır. Prostaglandin ve temel ara maddenin buralarda üretildikleri düşünülmektedir (1, 2, 21).

2. 3. Böbrek Fizyolojisi

Böbrekler, metabolizma sonucu oluşan artık maddelerin uzaklaştırılması, vücut sıvılarının osmolalitesinin ve elektrolit konsantrasyonlarının düzenlenmesi, asit-baz dengesinin düzenlenmesi, arteryel kan basıncının düzenlenmesi, hormon salgılanması ve glikoneojenez gibi birtakım görevleri de yerine getirerek homeostazda çok önemli rol oynarlar (25).

Böbrekler en temel görevini plazmayı süzerek gerçekleştirir. Bu yolla oluşan filtrattan, vücut için gerekli maddeleri kana geri döndürür veya yabancı kimyasal maddeler ve metabolik artıklar gibi istenmeyen maddeleri idrarla atarak vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar. Bu metabolitlere üre, kreatinin, ürik asit, hemoglobin yıkımı son ürünleri ve bazı hormon metabolitleri örnek olarak verilebilir. Bununla birlikte böbrekler, bazı toksinler, ilaçlar, pestisitler ve besinlerde kullanılan katkı maddeleri gibi dışardan alınan yabancı maddeleri de organizmadan uzaklaştırırlar. Ayrıca böbrekler, protein metabolizması esnasında oluşan sülfürik ve fosforik asit gibi asitleri uzaklaştıran tek organ konumundadır (25).

Vücut sıvılarının hacim ve içeriğini kontrol ederek homeostazın sağlanması böbreklerin önemli bir görevidir. Dolayısıyla alınan su ve elektrolit miktarıyla atılması gereken miktarın belli bir dengede tutulması sağlanır. Böbrekler plazma ozmolaritesinin normal sınırlarda tutulmasına katkı sağlar. Eğer atılan madde miktarı fazla olursa, o madde vücutta azalırken; atılan alınıandan az olursa, bu kez o madde vücutta birikmeye başlayacaktır. Örneğin böbreklerin Na^+ ıtrahını, Na^+ alımındaki değişikliğe göre değiştirme yetenekleri çok yüksektir. Normal insanlarda yapılan çalışmalarda vücut sıvı ve Na^+ hacminde yapılan küçük değişikliklerde bile, Na^+ alımının normalden 10 kat fazla artırılabilceği veya 10 kat daha azaltılabileceği gösterilmiştir. Böbreklerin bu fonksiyonu su, Cl^- , K^+ , Ca^+ , H^+ , Mg^+ ve fosfat gibi elektrolitler için de geçerlidir (25).

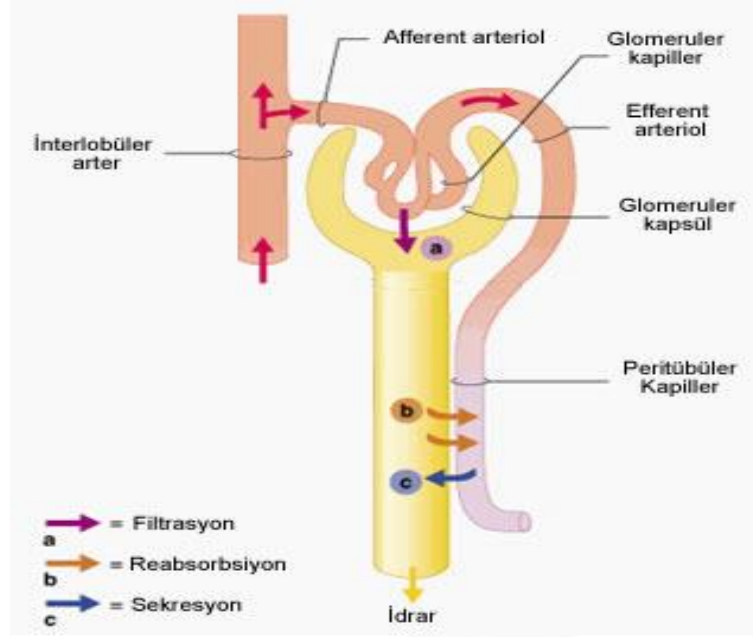
Böbrekler, vücut sıvılarının asit-baz dengesinin sağlanmasında akciğerlere destek sağlar. H^+ iyon konsantrasyonunun yükselmesiyle pH'nın azalıp asidozun arttığı durumlarda,

böbrekler idrarla H^+ iyonunun atılmasını hızlandırırken; bikarbonat (HCO_3^-) iyonunun derişimini yükseltmek amacıyla HCO_3 emilimini artırır. Böylece vücut sıvılarının asit-baz dengesi çok dar sınırlarda tutulmaya çalışılırken idrar pH'sı 4.5-8.0 arasında değişir (25).

Böbrekler, uzun süreli arteryel kan basıncı kontrolünde de önemli rol oynarlar. Bunu su ve Na^+ ıtrahıyla sağlarlar. Kan basıncının düşmesiyle makula densa hücreleri uyarılır ve jukstaglomerüler hücreler renin salgılayarak kan basıncının akut kontrolüne katkıda bulunurlar. Renin aslında proteolitik bir enzim görevi yaparak anjiyotensinojenin anjiyotensin I'e dönüşmesini sağlar. Anjiyotensin I, böbrek ve akciğerlerde bulunan ACE ile çok güçlü bir vazokonstrüktör olan anjiyotensin II'ye dönüştürülür. Böylece kan basıncı yükseltilir. Buna ilaveten anjiyotensin II, aldosteron ve antidiüretik hormon (ADH) salgılarını uyarır. Böylece kan basıncı yükseltilerek normal sınırlarda tutulmaya çalışılır (25).

Normal insanlarda eritrosit yapımını uyarıcı eritropoetin salgılanmasından primer sorumlu organ böbreklerdir. Ekstraglomerüler mezengiyal Lacis (Polkissen) hücrelerinin eritropoetin salgıladıkları düşünülmektedir (1). Hipoksi eritropoetin salgısının önemli bir uyarıcıdır. Vitamin D böbreklerde 1'inci pozisyonuna hidroksil ilavesiyle aktif formu olan kalsitriyole (1,25 dihidroksi-vit.D₃) dönüştürülür. Uzun süreli açlıkta aminoasitler ve diğer bazı maddelerden glikoneojenezle glikoz sentezi böbreklerde gerçekleştirilir. Vazodilatatör etkiye sahip olan bazı prostaglandinler de (PGA_2 ve PGE_2) böbrek medullasında sentezlenir (25, 26).

İdrar oluşumunda böbreklerde meydana gelen temel basamaklar süzülme (filtrasyon), geri emilme (reabsorbsiyon) ve salgılama (ekskresyon = sekresyon) fonksiyonlarıdır. İlk basamak olan filtrasyon kan sıvısının glomerüler kapillerlerden Bowman kapsülüne süzülmesidir. Glomerüler kapillerler ise kapiller endotel, bazal membran ve podosit tabakadan oluşur.



Şekil 7: İdrar oluşumu (27).

Glomerüler filtrat, kanın hidrostatik basıncına yanıt olarak oluşur ve kimyasal bileşimi kan plazmasına benzer. Erişkin bir bireyde, böbreklere gelen kan dakikada 1.2 ile 1.3 litre civarındadır. Bunun sonucunda böbreklere 125 ml/dk (180 litre/gün) filtrat üretilir ve bunun 124 ml'si emilerek yalnız 1ml'si idrar olarak kalikslere salınır. Dolayısıyla 24 saatte ortalama 1500 ml idrar oluşur. Birim zamanda süzülen plazma miktarına glomerüler filtrasyon hızı (GFR) denir. GFR, böbreğe gelen plazma akımının yaklaşık % 20'si kadardır. Maddelerin filtrasyon bariyerinden filtre olabilirliliğini onların elektrik yükleri ve büyüklükleri belirler. Makromoleküller glomerül duvarını geçemediği için glomerüler filtratta hemen hiç protein ve eritrosit bulunmaz.

Oluşan filtrattan organizmanın ihtiyacı doğrultusunda tübüllerde geri emilim meydana gelir. Bu aşamanın %90'ı proksimal tübüllerde gerçekleşir. Bu nedenle proksimal tübüllerde geri emilen madde miktarının azalması diürece yol açarak suyun reabsorbsiyonunu azaltır. Proksimal tübüller, filtrattaki glikoz, aminoasit, fosfat ve Ca^{+} un tümünü, suyun ve NaCl'nin %85'ini geri emer. Bunlara ek olarak kreatinin, paraaminohippurik asit, kontrast maddeler ve

penisilin gibi vücuda yabancı maddeleri idrara sekrete eder. Bu maddelerin sekresyon hızının belirlenmesi böbrek işlevlerinin klinik açıdan değerlendirilmesine katkı sağlar.

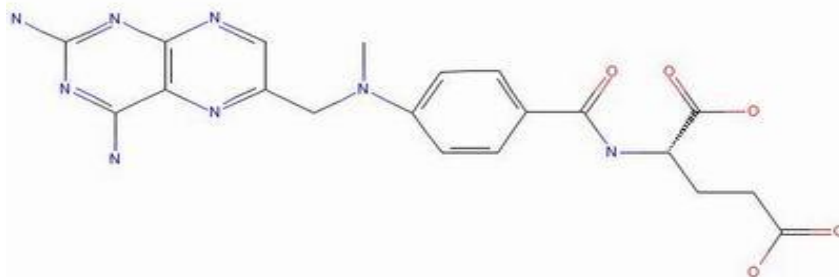
Henle kanalı su tutmada önemli rol oynayarak medüller interstisyumdaki hipertonic gradiyenti oluşturur. Böylece toplayıcı kanallardan geçen idrarın konsantrasyonunu etkiler.

Distal kıvrımlı tübüller vücuttaki total su ve tuz oranını kontrol eden düzeneğin bulunduğu bölgedir. Distal kıvrımlı tübüllerde sodyumun emildiği, potasyum iyonlarının dışarı verildiği bir iyon değişim bölgesi bulunur. Aldosteron özellikle distal tübüllerde Na^+ emilimini ve K^+ atılımını artırır. Distal tübül aynı zamanda tübüldeki idrara hidrojen ve amonyum iyonlarını sekrete ederek, kandaki asit-baz dengesinin korunmasında çok önemli bir işlevi yerine getirir.

Toplayıcı kanalların epiteli arka hipofizden salgılanan ADH'ye duyarlıdır. Su alımı azaldığında ADH salgılanır ve toplayıcı kanalların epiteli suya geçirgen hale geçer. ADH toplayıcı kanallarda su geri emilimi artırarak idrarı konsantre hale getirir. Bazı maddeler de tübül epitelinden idrara salınarak vücuttan uzaklaştırılır (1, 25, 26).

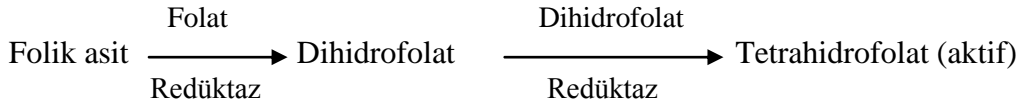
2. 4. Metotreksat

Metotreksat, bir folik asit antagonistidir. Folik asitin 4-amino- N^{10} -metil analogudur (28). İlk olarak 1948 yılında çocuklarda akut lösemi tedavisinde kullanılmıştır (29). ALL, lenf, baş ve boyun tümörleri gibi çeşitli neoplastik hastalıkların, transplantasyon sonrası graft versus host hastalığının tedavisinde kullanılan bir antimetabolittir. Bununla birlikte düşük dozlarda, psöriyazis ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarda da kullanılmaktadır (30). Kimyasal yapısı Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8: Metotreksatın yapısal formülü.

Besinlerle folik asitin vücuttaki yararlı şekli olan folinik asit ve diğer tetrahidrofolat türevi koenzimler alınmaktadır (31, 32). Bu koenzimler timidilat, pürin, metionin ve glisin sentezi gibi hücrenin hayati fonksiyonlarını yerine getirmesi için gerekli olan tek karbon transfer reaksiyonları için gereklidir. Tek karbon transferi yalnızca dihidrofolat redüktaz (DHFR) ile mümkün olmaktadır. Bu enzim blokaja uğradığında hücrenin hayatiyeti için gerekli olan birçok mekanizma aksar (33). Folik asitin dihidrofolat (DHF) üzerinden tetrahidrofolata (THF) dönüşümü şu şekildedir:



Şekil 9: Folik asit metabolizması (34).

Metotreksat folik asit metabolizmasında DHFR'yi inhibe eder ve tetrahidrofolatın üretilmesini engeller. Metotreksatın sitotoksik etkisini gösterebilmesi için poliglutamata forma dönüşmesi gerekir. Metotreksat, folilpoliglutamata sentaz (FPGS) tarafından 1-4 glutamat gruplarının eklenmesiyle poliglutamata forma dönüştürülür. Poliglutamata forma dönüşen metotreksat, hücre içinde tutulur ve DHFR enzimine bağlanarak DHF ile yer değiştirir.

Folat eksikliği nedeniyle pürin, pirimidin metabolizması ve biyolojik aminlerin sentezini içeren birçok metabolik yol olumsuz etkilenir ve neticede DNA ve RNA sentezi inhibe olur (33, 35). Bu nedenle metotreksat gibi antimetabolitler DNA sentezini negatif etkilediğinden dolayı bölünme katsayısı hızlı olan tümörlerin tedavisinde daha etkilidirler (36). Metotreksat, metionin ve homosistein mekanizmasını da olumsuz etkilemektedir. 5-metil THF'in azalması homosisteinin remilasyonunda azalmaya ve homosistein ile adenozin düzeylerinde artmaya neden olur. Metotreksat, S-adenozil metionin (SAM) miktarındaki azalmaya ek olarak doğrudan metionin sentetazı ve metionin transportunu inhibe edebilir (37-40).

Adenozin deaminaz (ADA), pürin metabolizmasında defosforilasyonla adenozinden inozin, deoksiadenozinden deoksiinozini katalizler. Metotreksatın ADA enzimini inhibe etmesi sonucu adeozin metabolitlerinde artış görülür. Adenozin metabolitleri (deoksiadenozin, deoksiadenozin difosfat) yüksek konsantrasyonda direk toksik etkiye neden olur. Deoksiadenozin kromozom kırıklarına ve metilasyon reaksiyonları için gerekli olan S-adenozil homosistein (SAH) hidrolaz enziminde inaktivasyona yol açar. Metotreksat bir antioksidan olan S-adenozil metionin (SAM) oranında da azalmaya neden olmaktadır. Vücutta SAM/SAH oranı, metilasyon reaksiyonları için önemli bir belirleyicidir ve bu orandaki azalma özellikle santral sinir sisteminde hipometilasyona ve demiyelinizasyona neden olabilir (41-43).

Pürin metabolizmasında önemli rolü olan diğer enzim ise hipoksantinden sırasıyla ksantin ve ürik asit oluşturan ksantin oksidaz (XO) enzimidir. Bu reaksiyon hücreler için toksik etkisi olan süperoksit radikallerinin üretildiği pürin yıkım metabolizmasının son reaksiyonudur. Metotreksat uygulamasını takiben pürinler hipoksantine indirgenir. XO da bunu bir taraftan süperoksit radikali üreterek ve indirek olarak hidroksil radikali oluşturarak ürik asite indirger (43). Bu şekilde serbest radikal artışı metotreksatın dokulara olan toksik etkisinin bir nedeni olabilir. Metabolik yollardaki bu değişikliklere etkisi ve sadece malign hücreleri değil aynı zamanda sağlıklı hücreleri de etkilemesi sonucu metotreksatın; gastrointestinal sistem, böbrek, sinir, karaciğer ve kemik iliğine olan yan etkilerinden dolayı kullanımı kısıtlanmıştır.

2. 4. 1. Metotreksatın metabolizması ve dağılımı

Metotreksatın sitotoksik etkisini gösterebilmesi için poliglutamata formuna dönüşmesi gerekir. Bu form metotreksatın hücre içinde bulunan şeklidir ve yarılanma süresi metotreksattan daha uzun olmasından dolayı hücredeki hasar etkisi daha fazladır. Hücrede oluşan poliglutamata oranı arttıkça folik asit düzeyi azalır ve hücresel hasar miktarı da orantılı olarak artar (44).

Metotreksat, % 90 oranında böbrekler tarafından aktif tübüler sekresyona uğrayarak atılır. % 3-4 oranında karaciğerde metotreksatın ekstrasellüler sıvıdaki majör formu olan 7-hidroksi metotreksata dönüştürülür ve bu formu da üriner yolla atılır. %5-10'u ise safra ile atılır ve enterohepatik dolaşım ile yeniden emilir. İnsanlarda metotreksatın major atılım yeri böbreklerken, rat gibi deney hayvanlarında ise safra yoluyla atılımın daha fazla olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (45). Ratlarda yapılan bir çalışmada intravenöz olarak uygulanan metotreksatın %27'sinin üriner yolla, %62'sinin safra yoluyla atıldığı gösterilmiştir (46).

Metotreksatın bir antimetabolit olmasından dolayı istirahat halindeki hücreler üzerine etkisi yoktur. Fakat glutamat formunda hücrede uzun süre kalabilen metotreksatın etkisi hücre bölünmeye başladığı zaman belirgin hale gelmektedir (47). Oral yoldan alındığında tama yakın emilir. İntravenöz yoldan verildiğinde %50 oranında proteinlere (özellikle albümine) bağlanarak taşınır ve sinir sistemi haricinde tüm vücuda yayılır. Standart dozlarda beyin omurilik sıvısına geçişi yok denecek kadar azdır. Bu sebeple meningeal tümörlerde intratekal verilmesi gerekir. En yüksek doku seviyesine karaciğer ve böbrekte rastlanır. Vücutta yarılanma ömrü ise 7-8 saattir (28, 48).

2. 4. 2. Metotreksatın antiinflamatuvar, immünomodülatör ve antiproliferatif etkisi

Metotreksatın iki mekanizma ile antiinflamatuvar etkide rolünün olduğu öne sürülmüştür (49).

- 1) Homosisteinin yeniden metilasyonunun inhibisyonu,
- 2) Adenozin salınması.

İn vitro çalışmalarda fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde düşük doz metotreksatın adenozin salınımına yol açtığı gösterilmiştir. Değişik yollarla adenozin deaminazın (ADA) metotreksat tarafından inhibisyonu adenozin metabolitlerinin birikimine yol açar. Adenozin antiinflamatuvar etkide merkezi bir rol oynar (49).

Metotreksat, romatoid artrit ve psöriatik artrit tedavisinde antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. TNF-alfa, interlökin-1 gibi sitokinler ve metalloproteinazlar gibi

inflamasyon mediatörlerinin romatoid artritte metotreksat tedavisi sonrası azaldığı gösterilmiştir (50). Metotreksat, pürin ve pirimidin sentezinin inhibisyonuna neden olduğundan immünsüpresif etki yaparak B ve T hücrelerinin aktivitesinde baskılanmaya neden olmuştur (51). Antiproliferatif etkisi dolayısıyla metotreksat, yüksek dozlarda kanser tedavisinde kullanılmaktadır (52).

2. 4. 3. Metotreksatın yan etkileri

Metotreksat toksisitesinin mekanizmaları hâlâ tam olarak anlaşılammakla birlikte yan etkileri oldukça yaygındır. Yapılan çalışmalar sonucunda bu etkiler birçok faktöre bağlanmıştır. Pürin, pirimidin, poliamin ve folat gibi metabolik yollar üzerindeki inhibitör etkisiyle doğrudan ilişkilendirilmiştir. Metotreksatın karaciğer toksisitesi, metotreksat poliglutamatlarının birikmesiyle birlikte folat eksikliğinin de bulunmasına bağlanmıştır (53). Yan etkilerin büyük oranda bu birikimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (7, 54). Metotreksat değişik yollarla ADA'yı inhibe etmesi sonucu biriken adenzin metabolitleri de toksik etkilidir (33, 43).

Metotreksat protein, lipid ve myelinin şekillenmesi için önemli olan transmetilasyon reaksiyonlarını da etkiler. Beyin omurilik sıvısında metionin ve SAM oranında azalmaya, SAH ve homosistein oranında artmaya neden olur. Artmış homosistein miktarı endotel hücre hasarı ve infarktlara neden olurken, SAM oranındaki azalma miyelinizasyon bozukluğuna yol açabilir. Azalmış SAM/SAH oranı santral sinir sisteminde hipometilasyon ve demiyelinizasyon anlamına gelir. Bu yüzden metilasyon reaksiyonlarının inhibisyonu toksisiteye neden olabilir (55).

Antikanser ilaçlarla yapılan son zamanlardaki toksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerinde durulmaktadır. Mitokondrial enzimlerden pirüvat dehidrogenaz, 2-okzogluterat dehidrogenaz ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağımlı enzimler ile sitozolik nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) bağımlı dehidrogenazın metotreksat tarafından

inhibe edildiği gösterilmiştir. NADPH, glutatyon redüktaz tarafından hücredeki GSH oranını belirli bir seviyede tutmak için kullanılır. GSH ise hücreleri serbest radikallerin etkilerinden korur. Metotreksat NADPH'da azalmaya neden olarak hücrede GSH miktarını azaltır ve hücrelerin radikallere daha duyarlı hale gelmesine neden olur (8).

Yapılan birçok çalışmada metotreksat verilmesi sonucu SOR'un oluştuğu ve bunun da hücre membranındaki lipid komponentlerini etkileyerek lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve hücreye zarar verdiği anlaşılmıştır. Metotreksat verilmesini takiben hücrede lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) ve inflamatuvar yanıtın göstergesi olan miyeloperoksidaz (MPO) seviyelerinde artış, hücredeki GSH seviyesinde azalmaya neden olarak, hücrenin SOR'a daha duyarlı hale gelmesine neden olur (56). Bu nedenle metotreksatın karaciğer (57-59), böbrek (60-63), testis (64), kalp (65, 66), ince barsak (67-69) ve santral sinir sisteminde (70) yan etki mekanizmasından oksidatif strese bağlı oluşan serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır.

Bulanti ve kusma metotreksatın en sık görülen gastrointestinal yan etkilerindedir. Metotreksat kemik iliği süpresyonu ve gastrointestinal mukozada hasarlara neden olabilmektedir. Metotreksata bağlı hematolojik yan etkilerin oluşumunda DHFR'nin inhibisyonu sonucu DNA sentezindeki bozulma ve hızlı hücre değişimine sahip kemik iliğinin baskılanması sorumlu tutulmaktadır. Karaciğerde fibrozis, kronik hepatotoksisite ve siroza neden olabilir (50). Metotreksatın özellikle yüksek doz veya uzun süre kullanımı ise böbrek hasarı, pulmoner infiltrasyon ve pulmoner fibrozise yol açmaktadır (39).

2. 4. 4. Metotreksatın nefrotoksik etkisi

Metotreksat ve metabolitleri büyük oranda böbrek yoluyla elimine olur ve hücrelere aktif taşıma yoluyla girerler. Genellikle yüksek dozda ve uzun süreli kullanımı sonucunda ortaya çıkan nefrotoksisite, metotreksat tedavisinde karşılaşılan ve tedavi sürecini olumsuz etkileyen nedenlerden birisidir (71).

Metotreksatın oluşturduğu böbrek hasarının nedenleri arasında filtrasyon yetmezliği, metotreksat ve 7-hidroksi metotreksatın doğrudan tübüller üzerine toksik etkisi, metotreksatın neden olduğu oksidatif hasar ve metotreksatın asidik idrarda presipite olup obstrüktif üropati yaparak oligo-anürik böbrek hasarına neden olması sayılabilir. Metotreksat ve metabolitleri intratübüler olarak çökerek renal tübüler nekroza neden olabilir. Böylece akut böbrek yetmezliği, azotemi, idrar retansiyonuna yol açabilir. Ayrıca serum kreatin değerlerinde artış, üremi, hematüri ve proteinüriye de neden olabilmektedir (40, 72, 73).

Metotreksatın renal toksisitesini azaltmak amacıyla idrarı alkalileştirme ve güçlü hidrasyon denenmiştir. Buna rağmen çoğu zaman yine de böbrek hasarı meydana gelir. Bazı vakalarda folinik asit desteği veya metotreksatın kimyasal antidotu olan lökoverinle kurtarma tedavisi yapılarak oluşan hasarda azalma gözlenmiştir. Renal hasar sonucu metotreksatın böbrek eliminasyonu geciktikçe vücutta kalma süresi uzayacağından, diğer organlara olan toksik etkisi de artar (74, 75).

2. 5. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller hücre metabolizması sırasında meydana gelen biyokimyasal redoks reaksiyonlarında ortaya çıkan, paylaşılmamış elektron içeren, reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Bu moleküller hem vücuttaki reaksiyonlarda yan ürün olarak, hem de ilaçların ve zararlı kimyasal ajanların etkisiyle ortaya çıkabilmektedir. Organizmaların ekzojen ve endojen faktörlere maruziyetleri sonucunda birçok reaktif oksijen türlerinin oluştuğu ve bu reaktif oksijen türlerinin homeostatik dengeyi bozduğu açıkça ortaya konulmuştur (76).

2. 5. 1. Endojen kaynaklı serbest radikaller

Normal metabolizma sırasında reaksiyonların ara basamaklarında serbest radikal yapısında ara ürünler meydana gelmektedir. Mitokondriyal elektron transport zinciri (ETS), sitokrom p450, NADPH oksidaz endojen serbest radikal kaynaklarıdır. Ksantin oksidaz da vücutta inflamasyonla ilişkili diğer bir radikal kaynağıdır (77, 78)

2. 5. 2. Ekzojen kaynaklı serbest radikaller

Organizmanın kendisinden kaynaklanmayan, dış etkenlerin varlığında oluşan reaksiyonlar sonucunda serbest radikaller açığa çıkar. Bu sebepler şu şekilde sıralanabilir:

- Antineoplastik ajanlar,
- Radyasyon,
- Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular,
- Çevresel ajanlar: Ksenobiyotikler (hava kirliliği yapan kimyasal maddeler, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar),
- Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ile serbest radikaller oluşur (79, 80).

Serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücreleri olan nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da yüksek düzeydeki serbest radikaller veya aktif oksijen türleri oksidatif strese neden olurlar. Oksidatif stres birtakım kimyasal ve fizyolojik lezyonlara yol açmakta ve bazen metabolik bozukluk ve hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır (81).

Serbest radikaller hücrenin lipit, DNA, karbonhidrat, protein gibi tüm önemli yapılarıyla etkileşime girerek hücre yapılarını bozarlar. Hücre membranında hasarla sonuçlanan lipit peroksidasyonuna neden olurlar. Bu hücre hasarı hücrenin dengesinde bozulmaya, osmotik basınç değişikliğine, hücrenin şişmesine ve sonuçta hücrenin ölmesine neden olur. Ayrıca serbest radikaller genel inflamatuvar cevap ve doku hasarına neden olan inflamatuvar mediatörleri de arttırırlar.

Biyolojik sistemlerdeki SOR'un başlıca en önemli kaynağı oksijen (O_2)'dir. O_2 'nin dört elektronunun basamaklar halinde redükte olmasıyla süperoksit anyonu (O_2^-), radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\bullet OH$) gibi hücreye toksik ürünler oluşur ve peroksil radikalinin miktarı oldukça artar (82, 83).

2. 5. 3. Serbest oksijen radikallerine karşı savunma mekanizmaları

2. 5. 3. 1. Antioksidan sistemler

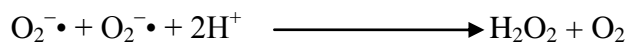
Serbest radikalleri metabolize eden, oluşumunu önleyen veya temizlenmesini arttıran maddelere antioksidan maddeler denilmektedir. SOR düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları bulunmaktadır (84). Antioksidanlar radikal süpürücüler olarak görev alırlar ve lipid peroksidasyonu ve diğer serbest radikal aracılı reaksiyonları inhibe ederler. Serbest radikallerin oluşum hızı bunları etkisiz hale getiren savunma sistemlerinin (antioksidanlar) hızı ile dengede olduğu sürece organizma olumsuz etkilenmez. Fakat bu denge oksidan ajanlar yönünde bozulduğu takdirde hücrel hasar düzeyinde artış gözlenir.

Canlı hücrelerde pek çok antioksidan sistem bulunmaktadır. Bu antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olarak ikiye ayrılır (79, 85). Enzimatik antioksidanlar içinde en önemlileri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz ve hidroperoksidazlardır. Enzimatik olmayan antioksidanlar glutatyon (GSH), askorbik asit, melatonin, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, haptoglobulin, ferritin, bilirubin, sistein, metionin, ürik asit ve albümindir (86, 87).

2. 5. 3. 2. Enzimatik antioksidanlar

1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit serbest radikalinin (O_2^-), H_2O_2 ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen bir antioksidan enzimdir.



SOD enziminin bakır-çinko, mangan ve demir içeren üç tip izoenzimi bulunur. Bakır ve çinko içeren Cu/Zn-SOD sitoplazmada, mangan içeren Mn-SOD mitokondride bulunur ve aktivite gösterir. SOD'un fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit

serbest radikalinin (O_2^-) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler olarak öldürülmesinde de rol oynar. Bu reaksiyon SOD enzimi tarafından katalizlendiğinde kendiliğinden oluşmasına kıyasla yaklaşık 4000 kat hızlı olur. Dolayısıyla antioksidan savunmada oldukça önemli bir enzimdir. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazladır ancak ekstrasellüler sıvılarda aktivitesi oldukça düşüktür (88).

2. Malondialdehit (MDA)

Biyolojik sistemlerde, oksidanlarca lipid hidroperoksidasyonu hücre zarı yüzeyindeki okside yağ asitleri ve poliansatüre lipitlerin yıkılması sonucunda aldehidler oluşur. MDA da [tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS)] üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda meydana gelen bir çeşit aldehittir. Bu nedenle MDA miktarı ölçümü dokulardaki lipid peroksidasyonunun derecesini yansıtmaktadır (89).

Lipid peroksidasyonu yıkım ürünü olan MDA, moleküler oksijen azalması yaparak süperoksit anyonu ve H_2O_2 oluşumuna neden olur. Bu ürünler de hücre ve dokularda hasar etkisi yaparlar. Biyolojik ortamlarda MDA hem serbest hem de protein ve nükleik asit gibi makromoleküllerin SH ve NH_2 gruplarına bağlı olarak bulunur. Bundan dolayı, genellikle total (serbest ve bağlı) MDA değerlendirilir. DNA ve proteinlerle etkileşiminin potansiyel olarak mutajenik ve karsinojenik olduğu gösterilmiştir (89).

3. Nitrik oksit (NO)

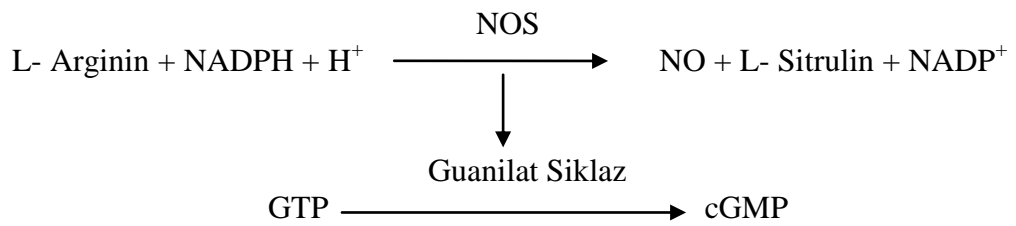
Nitrik oksit, insan vücudunda doğal olarak üretilen bir hormon, aynı zamanda kimyasal bir habercidir; sinir, dolaşım, savunma, solunum ve üreme sistemlerinin hayati fonksiyonlarının düzenlenmesinde stratejik bir rol oynamaktadır. NO molekülünün insan hayatı için son derece önemli görevleri bulunmaktadır. Fizyolojik konsantrasyonlarda, hemen hemen tüm organ ve sistemlerde değişik fizyolojik etkilere sahiptir. Organizmada çift yönlü etki göstermektedir. NO, hem birçok fizyolojik fonksiyonun gerçekleşmesi için gerekli ve antioksidan savunmaya

katkıda bulunurken, hem de aşırı üretimi durumunda güçlü radikal etkisi olan bileşiklerin oluşmasına yol açar. Son yıllardaki araştırmalarda hücreler arası haberleşmede temel bir görev üstlendiği ortaya çıkmıştır (90, 91).

NO, zayıf bir oksidan veya redüktan bir bileşik olarak birçok reaksiyona katılabilecek eşlenmemiş elektron içeren bir radikaldir. Fizyolojik şartlar altında, SOR ile reaksiyona girerek, güçlü bir oksidan ve dokulara toksik olan peroksinitriti (ONOO^-) oluşturur (90). Peroksinitrit, hücresel proteinlerin, lipidlerin ve LDL partiküllerinin oksidasyonu veya direk hücre toksisitesi ile vasküler yapılar üzerinde zararlı etkilere sahiptir (92).

Nitrik oksitin sentezi ve etki mekanizması

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-argininin guanidin grubundan üretilir (Şekil 8). Nitrik oksitin antioksidanları tüketmesi, enzim inhibisyonları, DNA hasarları, lipid peroksidasyonu, diğer toksik etkenlere duyarlılığı artırması gibi zararlı etkileri yanı sıra; antioksidan özelliği, antiinflamatuvar etkileri, TNF toksisitesine karşı yararlı etkileri bulunmaktadır. Nörotransmitter etkileri, platelet agregasyonunun inhibisyonu, düz kasları gevşetici etkisi, hücre adhezyonunun kontrolü, damar geçirgenliğine etkileri, immün sistemdeki fonksiyonları nedeniyle vücutta koruyucu görevlere sahiptir (93).



Şekil 10: Nitrik oksitin sentezi.

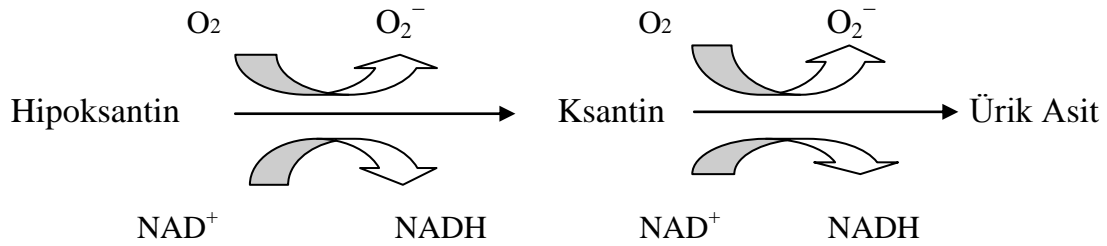
4. Miyeloperoksidaz (MPO)

MPO sadece nötrofillerde ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde bulunan, glikozile proteinden oluşmuş bir enzimdir. Kompleman fragmanları, hidroksil radikaller, reaktif oksijen radikalleri ve sitokinler gibi uyarılar, nötrofil aktivasyonuna neden olarak MPO'nun açığa çıkmasına yol açarlar. İnflamatuvar süreçte ekstrasellüler alana salınır. Bu

nedenle nötrofil sekestrasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilir. Nötrofillerin primer granüllerinden degranülasyon ile fagozom içine bırakılan MPO, H₂O₂ ve Cl⁻ iyonlarını bakteriyi öldüren hipoklorik asite (HOCl) çevirerek etki gösterir. HOCl gibi maddeler de organizmaya toksiktirler ve hücre ölümüne yol açarlar (78, 94).

5. Ksantin oksidaz (XO)

Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri de XO'dur. Pürin bazlarının son oksidasyonunda, molibden, demir, sülfür ve flavinin hidroksilasyonunda görev yapan enzim grubunun üyesi olarak bilinir.



Şekil 11: Hipoksantinden ürik asit oluşumu.

Ksantin oksidaz sağlıklı hücrelerde dehidrojenaz formunda bulunur. Enzimin bu formu pürinlerin oksidasyonu sırasında elektron alıcısı olarak moleküler oksijen yerine nikotinamid dinükleotidi (NAD⁺) kullanır ve reaktif SOR üretmez. Oksijensizliğe bağlı olarak adenozin difosfatın (ADP) adenozin trifosfata (ATP) fosforilasyonunun azaldığı durumlarda (iskemi vb.) ADP yıkılır ve pürin bazı, XO'nun bir oksidaz olarak etkili olmasıyla hipoksantin ve ürik aside dönüştürülmesi sırasında süperoksit radikali ve H₂O₂ oluşturur. Oluşan SOR ve süperoksit radikali hücre için zararlıdır (95-97).

2. 6. Flavonoidler

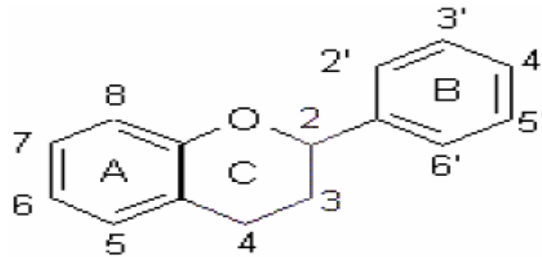
Flavonoidler bitkisel kaynaklı antioksidan maddelerdir. Bu maddeler sarı renkli olmaları nedeniyle 'sarı' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilen 'flavonoid' adını almışlardır. Bitkilerin gövdelerinde, yapraklarında, kabuklarında, çiçeklerinde ve köklerinde bulunurlar.

Flavonoidler hemen hemen yeşil bitkilerin tamamında bulunduğundan, bitki ekstraktlarıyla yapılan çalışmaların çoğunda sık sık karşılaşılır. Sayıları 4000'den fazladır. Elma, soğan, baklagiller, domates, çay, üzüm, brokoli gibi birçok sebze ve meyvede bulunur. Bir insanın günlük diyetle 50- 500 mg civarında flavonoid aldığı tahmin edilmektedir (98, 99).

Flavonoidler aynı zamanda doğal boyarmaddelerdir. Bu özellikleri sebebiyle kullanımları çok eski zamanlara dayanmaktadır. Uzun süredir tekstil alanında özellikle de antibakteriyel ürünlerin üretiminde sıkça kullanılmaktadır. Antioksidan (100), antimutajenik (101), iltihap önleyici (102), antikanser (103), kolesterol düşürücü (104), antibakteriyel (105), antialerjik (106) ve antiapoptotik (107-109) özelliklere sahiptirler.

2. 6. 1. Flavonoidlerin yapısı

Flavonoidler, birçok yapı formlarında bulunan polifenolik bileşiklerdir. Bu bileşiklerin tamamının temel yapısında C6-C3-C6 konfigürasyonunda dizilmiş 15 C atomu vardır. Bu konfigürasyonda iki aromatik halka, üçüncü bir halka oluşacak ya da oluşmayacak tarzda birbirine üçlü karbon birimiyle bağlanmıştır. Kolaylık olması açısından halkalar A, B ve C olarak adlandırılır. Flavonoidler iskelet yapılarının farklı olmasına göre flavonol, flavanon, flavon, antisiyanidin ve izoflavon olarak kategorize edilmiştir. Flavonoidlerin temelini oluşturan “flavan çekirdeği” Şekil 12’de gösterilmiştir (110).



Şekil 12: Flavonoidlerin genel yapısı.

Numaralarla gösterilen yerlerde bulunan karbon atomlarına hidroksil (OH⁻) gruplarının bağlanmasıyla farklı flavonoid çeşitleri meydana gelir. Flavonoidler antioksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler.

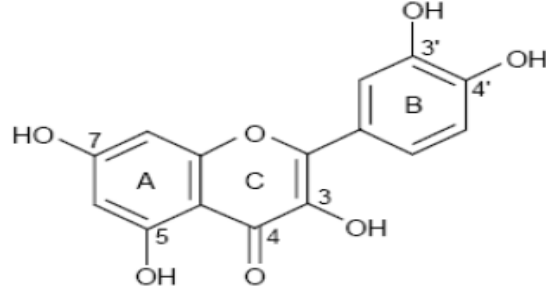
Flavonoidlerin serbest radikal yakalama ve antioksidan özelliklerinin, yapılarında bulunan üç gruptan ileri geldiği öne sürülmektedir (4). Bu yapısal gruplar şunlardır:

- B halkasındaki O-dihidroksil grubu (katekol yapısı); (güçlü radikal toplama aktivitesi gösterir).
- C halkasındaki 4-okso grubu ile 2-3 çift bağı (elektron delokalizasyonu için gereklidir).
- 3 ve 5 hidroksil grupları (maksimum radikal yakalama ve metal şelatlama için gereklidir).

Üç grubun hepsine sahip olan flavonoidler maksimum antioksidan aktivite gösterirken, eksik gruba sahip olanların aktiviteleri daha düşüktür (4). Bu üç fonksiyonel grubu flavonoidlerin bir üyesi olan kuersetinin üzerinde görebiliriz (111).

2. 6. 2. Kuersetin

Kuersetin, antioksidan kapasitesi yüksek olan ve flavonoidlerin flavonol grubuna ait bir üyesidir. Yenilebilir meyve ve sebzeler dahil bir çok bitkide bulunmaktadır. Greyfurt, soğan, ahududu, elma, yeşil çay, yaban mersini, kiraz, brokoli ve lifleri olan yeşillikler iyi birer kuersetin kaynağıdır. Kuersetin ($C_{15}H_{10}O_7$) 3, 3', 4', 5, 7-pentahidroksiflavon olarak adlandırılır. Yapısında 3, 3', 4' ve 5, 7 pozisyonlarında OH grubu bağlıdır. Flavonoidlerin fenolik hidroksil grupları elektron donörleri olarak hareket ettiklerinden dolayı serbest radikal toplayıcı aktivite için gereklidir. Özellikle katekol yapısı (o-dihidroksil yapısı) komşu pozisyonunda 2 hidroksil gruplarına sahiptir. Elektron verme kabiliyeti olan diğer pozisyonlardan daha üstündür ve böylece kuersetin ve diğer flavonoidlerin içerdiği katekol yapısı güçlü bir radikal toplama aktivitesi gösterir (112).



Şekil 13: Kuersetinin kimyasal yapısı (110).

Kuersetin gibi flavonoidler vitamin C ve E'den daha etkili antioksidanlardır. Vücuda alındığında metabolizmayı hızlandırarak vücudumuzdaki yağların yakılmasına ve toksinlerden arınmamıza yardımcı olduğu bilinmektedir. LDL kolesterolün okside olmasını engelleyerek kalp-damar hastalıklarını ve kalp krizi riskini azaltıcı yönde tesir ederler (113).

Kuersetin, bağışıklık sistemi hücrelerinde histamin açığa çıkmasını engelleyerek antialerjik etki yapar. Bu nedenle alerji ve astım tedavisindeki etkisi araştırılmaktadır. Bununla birlikte kuersetin; XO, fosfolipaz-A₂, siklooksijenaz, lipooksijenaz gibi enzimleri inhibe etmesi, mast hücresi degranülasyonunu önlemesi, komplemanı aktive etmesi ve endoteldeki inflamatuvar hücrelerin adhezyonunu azaltması gibi etkilerinden dolayı antiinflamatuvar cevaba neden olur (114, 115).

Kuersetin aktivitesinin moleküler mekanizmaları arasında mutant p53 proteininde düşük regülasyon, tirozin kinaz inhibisyonu ve ras proteinleri ekspresyonunun inhibisyonu vardır (116). Kuersetin, kalsiyum modülasyonu ile hücresel regülasyonda önemli rol alan kalmodülini inhibe eder. Ayrıca protein kinazı inhibe eder, laktat transportunu engeller. Kuersetin Na⁺-K⁺-ATPaz'ı ve sarkoplazmik retikulumda Ca⁺-ATPaz'ı inhibe eder. Kuersetin ayrıca fosfotidil-3 kinaz ve 1-fosfotidilinositol-4 kinaz inhibitörüdür. Belirlenen ilk tirozin kinaz inhibitörlerindedir. Kuersetinin gastrik kanser hücreleri ve insan lösemik T hücrelerinde hücre siklusunun dızurmasına neden olduğu bildirilmiştir. İn vitro kolon, mide, prostat, over, göğüs ve mide kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (117).

Kuersetin, antioksidan özelliğini vücuttaki hücreleri serbest radikallerin zararlarından koruyarak yapmaktadır. Kuersetin hidroksil radikali, peroksil ve süperoksit anyonuna karşı diğer flavonoidlere kıyasla en yüksek seviyede antiradikal özellik sergiler. Kuersetin lipofilik bir antioksidandır ve lipid tabakalarının arasına yerleşerek membran hasarını önleyici bir etkiye sahiptir (118). Kuersetin;

- XO aracılığıyla süperoksit anyon üretimini inhibe eder (119).
- Singlet oksijen ve hidroksil radikallerini temizler (120).
- Peroksil radikalini ve alkoksil radikalini yakalar ve lipid peroksil zincirini kırar (121).
- Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzim aktivitelerini inhibe eder (119).
- Demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlar (122).
- Laktat transportunu engeller (123).
- Vitamin C absorpsiyonunu artırır (83).

2. 6. 3. Flavonoidlerin metabolizması

Flavonoidler bitkilerde ve besinlerde genellikle glikozid formda bulunurlar. Merkez halkaya bağlanmış bir şeker (glukoz, galaktoz gibi) bulunur (124, 125). Kuersetin de sıklıkla R-4 hidroksil grubu hidrojeninin bir disakkarid ile yer değiştirdiği glikozidler şeklinde bulunur. Bundan dolayı aglikon olarak tanımlanır. Flavonoidlerin formu emilim derecesini etkiler. Flavonoidlerin glikozid formunda barsaklardan emilmeleri zordur (116). Bağırsaklarda bulunan mikroorganizmalar, flavonoid glikozidlerinin çözülmesini gerçekleştirirler (83, 112). Emiliminin glukoz konjugasyonu ile arttığı bildirilmiştir (126).

Kuersetin, % 98 oranında proteinlere bağlı (özellikle albümine) olarak taşınır. Proteinlere bağlandıktan sonra konjugasyon için karaciğere taşınırlar. Karaciğerde flavonoidlerin konjugasyonu sülfat grubu, metil grubu veya her ikisinin eklenmesi ile güçlenir. Bu grupların eklenmesi dolaşımdaki eliminasyon zamanını azaltır. Son yıllarda yapılan çalışmalar

kuersetin ve diğer flavonoidlerin karaciğer ve dolaşıma geçmeden bağırsak epitel hücrelerinde emilimi boyunca metabolik dönüşüme neden olabileceğini göstermişlerdir (127).

Yarı ömrü α fazı için 8.8 dk, β fazı için 2.4 saattir. Plazma seviyesi 20-40 dk içinde çok azalır, 54. dakikada tespit edilemeyecek seviyeye düşer (128). Kuersetinin üriner atılımı alınan miktar ve süre ile artış göstermektedir ve atılan fraksiyon % 0.29-0.47 olarak bildirilmektedir (129).

2. 6. 4. Kuersetinin antioksidan etkisi ve oksidatif stres

Flavonoidler serbest radikallerin neden olduğu hasarı çeşitli yollarla önlerler. Direkt serbest radikal çöpcüsü olarak flavonoidler SOR bileşikleri ile reaksiyona girerek onları stabilize ederler.

Kuersetin hücrede serbest radikalleri şu şekilde temizler:

1. O_2^- radikalinin temizlenmesi.
2. OH^- radikalinin temizlenmesi: Bu etkilerini metal iyonlarının şelasyonu aracılığıyla gerçekleştirirler.
3. NO 'nun, O_2^- radikali ile etkileşmesi sonucu peroksinitrit radikali ($ONOO^-$) meydana gelir. Kuersetin, O_2^- radikalini temizleyerek $ONOO^\bullet$ radikalinin oluşumunu engeller.
4. Lipid peroksil radikali (ROO^-) ile reaksiyona girerek zincir kırıcı bir etki ile lipid peroksidasyonunun inhibisyonunu yaparlar.

Kuersetin ($Q - OH$), lipid peroksil radikali (ROO^\bullet) ile reaksiyona girerek onu indirgerken kendisi daha kararlı bir radikal yapı ($Q - O^\bullet$) oluşturmaktadır (130).

5. Kuersetin lipofilik bir antioksidandır ve lipid tabakalarının arasına yerleşerek lipid hasarını önleyici etkiye sahiptir (131).

Ksantin oksidaz SOR'un kaynağıdır. İskemi sonrası reperfüzyon fazında XO moleküler oksijenle reaksiyona girerek süperoksit radikali oluşturur. Kuersetin, XO aktivitesini inhibe ederek oksidatif hasarı azaltır (127). Kuersetin aynı zamanda GST aktivitesini de arttırarak

oksidatif stresi azaltır ve mutajenik ksenobiyotikleri detoksifiye eder (132). Kuersetinin antioksidan etkisinden sorumlu diğer mekanizma ise Fe^{+2} ve Cu^{+2} iyonları aracılığı ile $\cdot OH$ radikali oluşumunu önleyerek oksidatif hasara karşı çok güçlü koruma yapmasıdır (133, 134).

2. 7. Apoptoz

Çok hücreli bir organizmada hücre döllemesinden başlayarak mitoz, farklılaşma ve hücre ölümünün düzenlenmesi büyük önem taşır. Hücrenin hayat yolculuğundaki olayları etkileyen temel faktörlerden bazıları şunlardır (135):

- Besin maddelerinin (oksijen-glikoz gibi enerji gereksinimini karşılayanlar, aminoasitler gibi yapıtaşları) varlığı ya da yokluğu,
- Büyüme faktörlerinin varlığı ya da yokluğu,
- Hücre dışından gelen ve hücredeki reseptörler aracılığıyla hücreye iletilen ölüm sinyallerinin varlığı ya da yokluğu, hücrenin hasar görmesi, DNA yapısının bozulması.

Apoptoz, belirli koşullar altında çalışan sinyal kaskadlar serisi tarafından düzenlenen hücrenin gelişmesi ve doku homeostazında gerekli bir süreçtir (136-138). Programlanmış hücre ölümü anlamına gelen apoptozun, daha önceleri hücre ölümünün sadece fizyolojik formu olduğu düşünülmesine rağmen; bugün patolojik hücre ölümüne de aracılık eden bir mekanizma olduğu bilinmektedir (139). Bu ölüm şekli ilk kez 1972’de, Kerr ve arkadaşları tarafından sonbaharda kuruyan ağaç yapraklarının dökülmesini anlatan ‘apoptosis’ sözcüğü ile anılmıştır (140). Hücrenin fizyolojik ölümüne embriyonik dönemde ekstremitelerin ve içi boş organların oluşumu, fetüste Wolf ya da Müller kanallarının körelmesi, merkezi sinir sistemi gelişiminde nöron sayısının düzenlenmesi, doğumdan sonra T ve B lenfositlerin seçimi örnek olarak verilebilir. Ayrıca patolojik olarak da apoptoz DNA’sı ağır hasar gören ya da virüsle infekte hücrelerin ölümünü sağlamada temel rol oynar (141).

Apoptozun engellenmesi ile gelişimsel anomaliler, otoimmün hastalıklar ve kanserler ortaya çıkarken, bu sürecin aşırı çalışmasıyla da dejeneratif kas ve nörolojik hastalıklar

meydana gelebilmektedir. Apoptoz hücre düzeyinde inhibitör ve promotor moleküller tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu moleküllerin dengede tutulması hücre ölümünün ya da yaşamının devamında en önemli belirleyicilerdir (142, 143).

Apoptoza giden hücredeki morfolojik değişimler karakteristiktir. Hücre boyutunda küçülme olur ve nükleer piknoz (küçülme) meydana gelir. Çekirdek zarının altındaki kromatin yapı kondanse olarak kompakt bir hal alır. Hücre DNA'sı parçalanarak nükleozomlar oluşturacak şekilde bölünür. Bunu sitoplazmik membranda "balonlaşma" ve apoptotik "bleb" oluşumu takip eder. Hücre tamamen parçalanarak, "apoptozom" adı verilen küçük parçacıklara ayrılır. Apoptozomların içinde organel parçaları ve parçalanmış çekirdek taneleri bulunur. Apoptoza uğrayan hücre makrofajları uyarmak suretiyle apoptozomların fagosite edilmesini sağlar ve bu süreç apoptotik parçacıkların makrofajlar tarafından fagosite edilerek dokudan hızla uzaklaştırılmasıyla tamamlanır. Bu tip hücre ölümünde inflamatuvar reaksiyon görülmez ve komşu hücreler zarar görmez (138, 142, 144).

Apoptozun en özgün yönü, hücre içi Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağımlı endonükleaz enziminin aktivasyonu ile kromozomal DNA'nın internükleozomal bölgelerinden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının (ladder pattern) ortaya çıkmasına neden olur (145).

Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri de normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne transloke olmasıdır (phosphatidylserine translocation). Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (146).

2. 7. 1. Apoptozun mekanizması

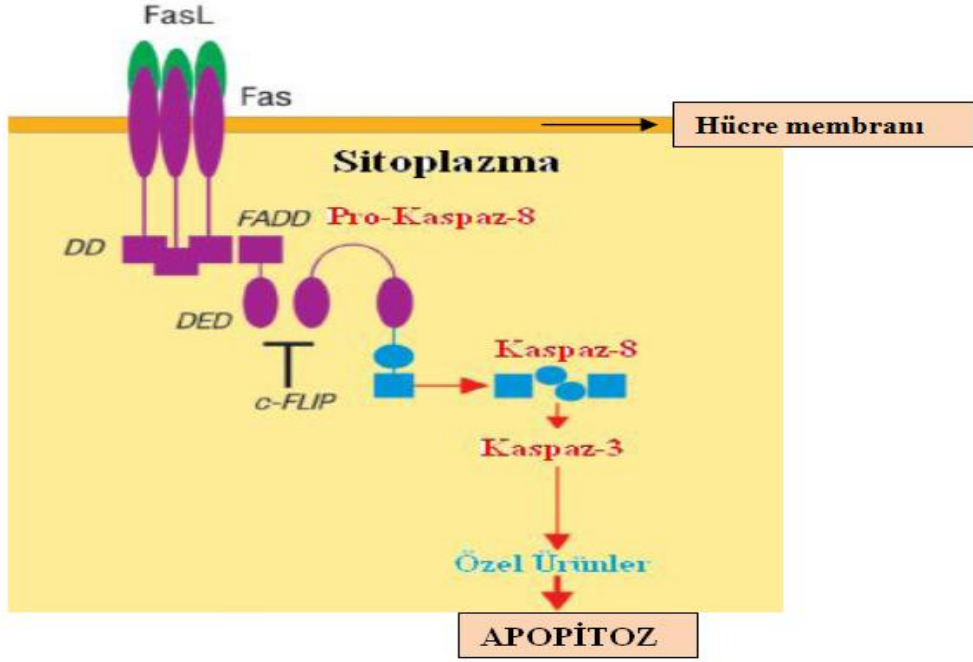
Apoptoz temel olarak iki yolla başlatılır:

- Hücre dışı kaynaklı yol (ekstresek); Ölüm sinyalleri, TNF α varlığı, büyüme faktörü yokluğu,
- Hücre içi kaynaklı (intrensek) veya mitokondri/sitokrom-c aracılı yol; DNA hasarı sonucu genotoksik stres, endoplazmik retikulum stresi ya da mitokondriden tetiklenen yol

Bununla birlikte apopitoz, bir proapopitotik bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ın fosforillenememesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden apopitozu başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi yoluyla da gerçekleşir. Apopitozu başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salınan granzim B'lerin hedef hücrede kaspaz sistemini aktifleştirmesidir. Apopitoz ayrıca SOR'un (oksidatif stres) mitokondri, plazma membranı ve DNA üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir (147).

2. 7. 2. Hücre dışı uyarılarla apopitozun tetiklenmesi (ekstresek yol)

Apopitoz, ölüm reseptörleri adı verilen, birbirleriyle yapısal olarak akraba olan birkaç reseptör tarafından uyarılır. En iyi bilinen örnekleri TNF- α ve Fas (CD95) reseptörleridir. Ölüm reseptörleri hücre zarı içine tutunmuş, bir ucu hücre dışına, bir ucu hücre içine bakan, hücre içi tarafında prokaspaz-8'in aktifleşmesini sağlayan bir ölüm bölgesine (death domain) sahip olan reseptörlerdir. Hücre zarında bulunan kendileri için özgün reseptörlere (FasL, TNFR-1) bağlanan ligandlar reseptörün trimerik (üç bileşenden oluşan) bir yapıya dönüşmesine yol açarlar ve hücre içinde adaptör moleküller adı verilen bir dizi molekülle etkileşerek prokaspaz-8'i iki farklı büyüklükte parçaya böler. Başlatıcı kaspaz denen aktifleşen kaspaz-8, inaktif durumdaki proenzimler olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin bir zincir biçiminde aktifleşmesine yol açar. Aktifleşen tüm kaspazlar hücredeki makromolekülleri parçalayarak tipik apopitoz morfolojisinin oluşumuna yol açarlar (148-150).



Şekil 14: Hücre dışı uyarılarla (ekstresek yol ile) hücrenin apoptoza gidişi.

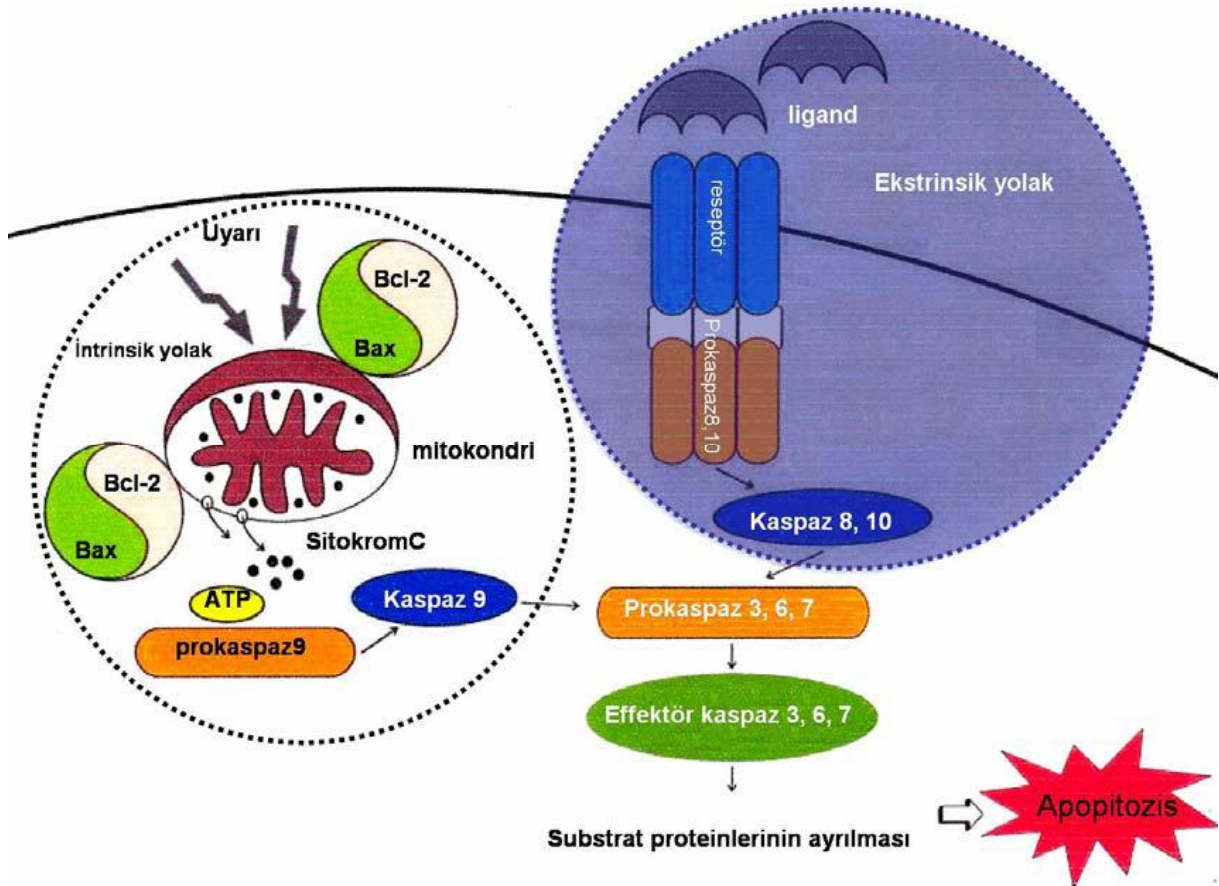
Apoptoz genotoksik ajanların etkisiyle oluşan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik gen olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozu başlatır. p53, bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerini de indükleyerek apoptozu başlatabilir. Apoptoz büyüme faktörlerinin eksilmesiyle de başlatılabilir. Hücre kültür ortamında büyütülen hücrelerin serum açlığına maruz bırakıldıklarında apoptoza uğradıkları görülmüştür (151, 152).

2. 7. 3. Apoptozda hücre içi yol (intrensek yol) (mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptoz)

Hücre içi apoptotik yolda mitokondri görev alır. Bu yol aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortaklaştığı bir mekanizmayla oluşturulur. İster hücre içi isterse hücre dışı mekanizmayla başlamış olsun, apoptotik süreç kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir.

DNA hasarı, radyasyon, kemoterapötik ilaçlar, oksidatif stres, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme ve metabolik bozukluklar sonucu hücre içinden

kaynaklanan sinyaller apoptotik süreci başlatabilirler. Mitokondri sitoplazmik kalsiyum artışı, oksidatif stres, fosfolipidlerin parçalanması, lipid yıkım ürünleri ile de hasarlanabilir ve bu nedenle ATP sentezlenemez. Oluşan mitokondriyal stres sonucu doğrudan ya da dolaylı olarak mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c çıkışı olur. Sitokrom c'nin sitoplazmaya sızması intrensek ölüm yolağında anahtar olaydır. Sitoplazmaya salınan sitokrom-c, mitokondriden salınan apoptotik proteaz aktive eden faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanır. Bu yapıya ATP ve prokaspaz-9'un eklenmesiyle apoptozom adlı kompleks oluşur. Daha sonra prokaspaz-9, aktif kaspaz-9'a dönüşerek efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktifleştirir, kaspaz-3 aktifleşir ve hücre apoptoza gider (153, 154).



Şekil 15: Apoptotik süreç (intrinsik ve ekstrinsik yol ile) ve bu süreçte yer alan proteinler (155).

Mitokondriden salınan sitokrom c ve proapoptotik moleküller (Bcl-2) kaspazlar için aktivatör rol oynarlar. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör Bcl-2 ailesidir. Hem proapoptotik (Bax, Bak, Bim) hem de antiapoptotik (Bcl-2 Bcl-xL) üyeleri olan bu

ailenin mitokondri üzerindeki etkileriyle, sitokrom-c'nin sitoplazmaya salıverilmesi başlatılır (apoptozun başlaması) veya baskılanır (apoptozun inhibisyonu). Sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması apoptotik süreçte irreversibl noktayı gösterir (156-158).

2. 7. 4. Apoptoz mekanizmasında yer alan moleküller

Apoptoz mekanizmasında Bcl-2 gen ailesi ve kaspazlar rol oynar.

Apoptotik proteinler: Bcl-2 gen ailesinin (B hücre lenfosit/lösemi-2), apoptozu indükleyen pro-apoptotik (Bax, Bid, Bim, Bcl-x5, Bad, Bak vs.) ve apoptozu baskılayan antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, E1B-19K, CED-9) alt grupları bulunmaktadır (159). Hücrenin yaşamını sürdürmesinde bu iki grubun arasındaki denge (Bax/Bcl-2 oranı) çok önemlidir. Şayet Bax/Bcl-2 oranı yeterince artarsa, sitokrom c mitokondriden salınmakta ve bir seri basamak yoluyla caspase-3 aktive olmaktadır (160). Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun, sitokrom c salınmasını ve kaspaz-3'ün aktive olmasını inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir (161).

Kaspazlar: Kaspazların bugüne kadar ondan fazla farklı türü tanımlanmıştır. Kaspazlar sitoplazmada inaktif proenzimler halde bulunan proteazlardır. Kaspazlar, aktif katalitik bölgelerinde sistein içerdiklerinden ve substratlarını aspartik asit bulunan özgül bir bölgeden kestiklerinden dolayı bu şekilde isimlendirilmişlerdir (caspase=cysteine-dependent aspartate specific proteases) (162, 163).

Kaspazlar apoptotik süreçte şelale tarzında birbirlerini aktifleştirerek hücreyi apoptoza götürürler. Bazıları başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, 8, 9 ve 10), bazıları da efektör kaspazlar (kaspaz-3, 6, 7) olarak görev alırlar. Başlatıcı kaspazlar, ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirken; efektör kaspazlar hücre iskelet proteini olan aktin, nükleer membran proteini olan laminin A, DNA tamirinde rol alan poli adozin difosfat (ADP) ve riboz polimeraz gibi

proteinleri parçalayarak apopitotik hücre morfolojisini meydana getirirler. İnflamatuar kaspazlar ise (kaspaz-1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) lenfokin üretiminden sorumludurlar (149, 164).

Ca^{+2} : Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan Ca^{+2} da apopitozda rol alır. Hücre içindeki Ca^{+2} miktarındaki artış da hücreyi apopitoza götüren nedenlerden birisidir. Sitoplazmadaki Ca^{+2} iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos ve ısı şok proteinlerini harekete geçirerek hücrenin apopitoza gitmesine neden olur.

Apoptoz inhibitör proteinler (IAP): Bu viral inhibitörler, direkt olarak kaspazları inhibe ederek apoptozun ilerlemesini engellerler. Apoptozu baskılayan protein grubu olan endojen IAP ailesinin üyeleri (cIAP-1 ve 2, XIAP, Livin, Survivin) özellikle kaspaz-3, 7 ve 9'u inhibe ederler (165).

2. 7. 5. Reaktif oksijen radikalleri ve apoptoz

Apoptoz, fazla miktarda oluşan SOR'un mitokondri, hücre membranı ve genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak meydana gelebilmektedir. Bir çalışmada, TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) uygulanması ile testiste SOR seviyelerinde artış gözlemlendiği, bunun da mitokondriyal membran potansiyelindeki kayba aracılık ettiği öne sürülmüştür (166). Serbest radikal olan peroksinitrit'in (nitrik oksit ve süperoksitin etkileşimi ile oluşur) hücre serilerini apoptozla götürdüğü görülmüştür (167, 168).

2. 7. 6. Apoptotik hücre ölümünün saptanması

Apoptozun neden olduğu morfolojik değişiklikler, çeşitli yöntemler kullanılarak ışık mikroskobu ile görülebilir.

1. TUNEL yöntemi

Apoptotik hücre fraksiyonları, ilk kez Gavrieli ve arkadaşları tarafından tanımlanan 'Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling' (TUNEL)

yöntemiyle belirlenebilir ve sayılabilir (169). Bu yöntemle yalnızca apoptotik çekirdekler boyanır. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturur. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) aracılığıyla biotinle işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinnükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine (DAB), işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Mayers hematoksilen ile zıt boyama yapılarak işlem sonlandırılır (170, 171).

Normal veya proliferatif nükleusta DNA 3'-OH uçlarının sayısı az olduğundan genellikle boyanma olmaz. TUNEL tekniği ile apoptoz erken dönemde, kromatin yoğunlaşması başladığında ve daha az dizi kırıkları olduğunda, hatta nükleusta büyük morfolojik değişimler başlamadan önce tespit edilir (172).

2. Kaspaz-3 yöntemi

Apoptoza uğramış hücreler kaspaz-3'ün immünohistokimyasal olarak gösterilmesiyle tespit edilebilirler. Kaspaz-3 apoptozda merkezi role sahiptir. Normal bir hücrede inaktif olan prokaspaz-3, hücrenin apoptoza gitmesiyle aktif kaspaz-3 molekülüne haline dönüşmeye başlar. Sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3'tür. Bunun için, dokunun kaspaz-3 ekspresyon ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir (173).

3. MATERYAL ve METOD

Fatih Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen (Proje No: P53011108_Y) ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanan bu çalışma, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) yapılmıştır.

3. 1. Deneysel Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Çalışmada GÜDAM'dan temin edilen 24 adet, 60 günlük, 250-300 gram ağırlığında, Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar kendi içlerinde grup içi rat ağırlıklarının ortalama aynı değerlerde olmasına dikkat edilerek rastgele 4 gruba ayrıldı ve her grup rastgele seçilen 6 hayvandan oluşturuldu (n=6). Deneyde kullanılan tüm ratların deney başında ve sonunda ağırlıkları tartıldı. Ratlar 10 gün boyunca oda ısısında, 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık ışık döngüsünde, polikarbon kafeslerde tutuldu. Ratların beslenmesi için standart hazır pellet yem ve çeşme suyu kullanıldı. Ratların yem ve su tüketiminde herhangi bir sınırlama yapılmadı.

3. 2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

CuCl ₂ (Merck)	Na-K tartarat (Sigma)
Na ₂ CO ₃ (Merck)	BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma)
NaOH (Merck)	Folin ciocalteu's fenol (Sigma)
CuSO ₄ . 5H ₂ O (Merck)	XO (Ksantin oksidaz) (Sigma)
H ₂ O ₂ (Merck)	O-dianisidin (Sigma)
EDTA (Sigma)	TBA (Tiyobarbitürik Asit) (Sigma)
HCl (Merck)	TCA (Trikloroasetik asit) (Sigma)
Fosfat Tamponu (Merck)	TEP (Tetraetoksipropan) (Sigma)
K-PO ₄ (Merck)	NBT (Nitrotetrazolium Blue) (Sigma)
Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O (Merck)	HETAB (Hexadecyltrimethylammonium Bromid) (Sigma)
KH ₂ PO ₄ (Merck)	MTX (Methotrexate 25mg/ml injectable, Hospira)
Amonyum sülfat (Merck)	Kuersetin (Quercetin) (L21600, Enzo Life Sciences)
Kloroform (Merck)	
Ksantin (Sigma)	

TUNEL Kiti (GenScript, L00290)
Kaspaz-3 antikoru (caspase-3 antibody, Millipore, AB3623)
Etanol (Merck)
Ketamin (Ketalar 50 mg/ml, Pfizer)
Ksilazin (Alfazyne 20 mg/ml, Alfasan)
Nötral formalin (Merck)
Hematoksilen- Eozin (Leica)
PAS (Periodic Acid Schiff) (Bio Optica)
Ksilan (Merck)

Streptavidin Peroxidase (Thermo Scientific)
AEC Substrate ve AEC Cromogen (Thermo Scientific)
Mayers Hematoksilen (Bio Optica)
Citrate Buffer (Thermo Scientific)
Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Thermo Scientific)
Phosphate buffered saline (PBS) (Thermo Scientific)
Ultra V Blok (Thermo Scientific)

3. 3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Diğer Malzemeler

Erişkin erkek Sprague Dawley rat (24 adet)
Teflon metal uçlu homojenizatör (IKA, T18 basic Ultra- Turrax)
Derin dondurucu (-80 °C) (Sanyo Ultra Low MDF U4086S)
Santrifüj (Nüve NF800R)
Spektrofotometre (Shimadzu)
Hassas Terazî (Mettler Toledo)
Vorteks (VWR International)
pH metre (Mettler Toledo)
Su banyosu (Mettler Toledo)

Etüv (red-LINE by BINDER)
Mikroskop (Olympus BX35)
Dijital fotoğraf makinesi (Olympus DP70)
Mikrotom (Leica 2265)
Doku takip cihazı kapalı sistem (Shandon Excelsior)
Buzdolabı (Beko)
Çeşitli hacimlerde ayarlanabilir hacimli otomatik pipetler ve cam pipetler.
Çeşitli boyutlarda cam ve polipropilen deney tüpleri ve eppendorf tüpleri.

3. 4. Deneysel Çalışma Grupları

Kontrol grubu (Grup I) (n=6): Herhangi bir uygulama yapılmadan ratlara 9 gün boyunca hergün serum fizyolojik (SF) (% 0.9'luk NaCl) 0.5 cc, intraperitoneal (i.p.) yoldan enjekte edildi.

Metotreksat grubu (Grup II) (n=6): İlk iki gün SF (0.5 cc/i.p.) enjekte edildikten sonra deneyin 3. gününde tek doz MTX (20mg/kg/i.p.) uygulandı (65, 174, 175). MTX uygulamasından sonra 6 gün daha SF (0.5 cc /i.p.) uygulanmaya devam edildi.

Metotreksat + Kuersetin grubu (Grup III) (n=6): İlk iki gün kuersetin (50 mg/kg/oral) verildikten sonra 3. gün tek doz MTX (20mg/kg/i.p.) uygulandı. Sonrasında kuersetin (50 mg/kg/oral) uygulanmasına 6 gün daha devam edildi.

Kuersetin grubu (Grup IV) (n=6): 9 gün boyunca hergün ratlara kuersetin oral yoldan 50 mg/kg olarak verildi (Tablo 1).

Deney sonunda 10. gün tüm ratlar ketamin (50mg/kg/i.p.) ve ksilazin (10mg/kg/i.p.) anestezisi altında sol ventriküllerinden kanları alınarak sakrifiye edildi. Hayvanlara ait böbrekler uygun şekilde çıkartıldı. Ratlara ait sağ böbrekler histopatolojik incelemelerde kullanılmak üzere % 10'luk nötral tamponlu formaldehid solüsyonuna alındı. Sol böbrekler ise biyokimyasal çalışmalarda kullanılmaları amacıyla, ilk aşamada sıvı azot tankına alındı; daha sonrasında -80 °C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

GRUP \ GÜN	GÜN										
	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	6.GÜN	7.GÜN	8.GÜN	9.GÜN	10.GÜN	
I. GRUP (KONTROL)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	HAYVANLAR SAKRİFYE EDİLDİ
II. GRUP (METOTREKSAT)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	Metotreksat (20mg/kg/i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	SF (i.p.)	
III. GRUP (METOTREKSAT + KUERSETİN)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Metotreksat (20mg/kg/i.p.)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	
IV. GRUP (KUERSETİN)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	Kuersetin (50mg/kg/oral)	

Tablo 1: Deneysel çalışma grupları.

3. 5. Histolojik Yöntemler

Histopatolojik incelemeler için çıkarılan böbrek dokuları %10'luk nötral tamponlu formaldehid solüsyonunda tespit edildikten sonra dehidratasyon aşamalarından geçirilerek parafin ile bloklandı (Tablo 2).

Sıra No	Kullanılan Madde	Süre
1	% 70 Alkol	1 saat
2	% 90 Alkol I	1 saat
3	% 90 Alkol II	1 saat
4	% 96 Alkol I	1 saat
5	% 96 Alkol II	1 saat
6	% 100 Alkol I	45 dk
7	% 100 Alkol II	45 dk
8	% 100 Alkol III	45 dk
9	Ksilol I	1 saat
10	Ksilol II	1 saat
11	Ksilol III	1 saat
12	Yumuşak Parafin	1 saat
13	Y. Parafin + Sert Parafin	1 saat
14	Sert Parafin	3 saat

Tablo 2: Histolojik takip basamakları.

Parafin bloklardan mikrotom ile 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon ve rehidrasyon aşamalarından sonra kesitlere rutin Hematoksilen-Eozin (HE) ve PAS boyamaları uygulandı (Tablo 3). Preparatlar ışık mikroskobu altında incelendikten sonra dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraf çekimleri yapıldı.

Kullanılan Madde	Süre
Ksilen (I)	10 dk

Ksilen (II)	10 dk
Ksilen (III)	10 dk
% 100 (Absolü) Alkol	2 dk
% 96 Alkol	2 dk
% 80 Alkol	2 dk
% 70 Alkol	2 dk
Çeşme Suyu	2 dk
Hematoksilen	4-8dk
Çeşme Suyu	4 dk
Eozin	1 -2 dk
% 80 Alkol	2 kez daldır çıkar
% 96 Alkol	2 kez daldır çıkar
% 100 (Absolü) Alkol	5 dk
Ksilen (I)	10 dk
Ksilen (II)	10 dk
Ksilen (III)	10 dk
Entellan ile kapatma	

Tablo 3: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü (Hücrelerin nükleusları hematoksilen ile mavi-mor boyanırken, sitoplazma eozin ile pembe renkte boyanır).

Her gruba ait böbrek kesitleri histolojik olarak tübüler atrofi, tübüler nekroz, tübüler vakuoler dejenerasyon, Bowman mesafesinde daralma, glomerüler fibrozis ve vasküler konjesyon bulguları dikkate alınarak ışık mikroskopunda incelendi. Herbir kesit 0-3 arasında (sırası ile hasar yok, az hasar, orta derecede hasar, şiddetli hasar) skorlandı (97, 176, 177).

Normal böbrek	0 (0)
Az hasar	+ (1)
Orta derecede hasar	++ (2)
Şiddetli hasar	+++ (3)

3. 6. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling) Yöntemi

Apoptozun saptanmasında rutin kullanılan yöntemlerden birisidir. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturur ve 3'-OH uçları açığa çıkar. Bu bölgenin TdT aracılığıyla işaretlenmesine dayanan bir yöntemdir (178).

1. Deparafinizasyon ve rehidrasyon

1. Lamlar oda ısısında 2x5 dk ksilene daldırıldı.
2. Lamlar oda ısısında 2x3 dk %100'lük etanole daldırıldı.
3. Lamlar oda ısısında 2x3 dk % 95'lik etanole daldırıldı.
4. Lamlar oda ısısında 2x5 dk PBS ile yıkanarak kesitlerin etrafı dikkatle kurulandı.

2. Spesmenin geçirgenliğinin arttırılması

1. Proteinaz K; PBS içerisinde 1:10 dilüe edilerek lam başına 20 ug/ml uygulandı (Proteinaz K'nın 1 µl'si, 10 mM PBS'nin 99 µl'sine eklenerek karıştırıldı).
2. Kesitlerin tamamı 20 µg/ml proteinaz K'nın 100 µl'si ile kaplandı. Oda ısısında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresinin aşılmasına dikkat edildi. Dokuların kurumasını engellemek için nemli kamara kullanıldı.
3. Lamlar enzimatik reaksiyonu durdurmak için 2x2 dk distile su ile durulandı.
4. Lamlar 2x5 dk PBS ile yıkandı.

3. Endojen peroksidaz inaktivasyonu

1. % 30'lük H₂O₂ PBS içinde 1:10 dilüe edildi (lam başına 10 µl % 30 H₂O₂ ile 90 µl PBS karıştırıldı).
2. 100 µl % 3 H₂O₂ ile kesitler kaplandı. 15 dk oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin aşılmasına dikkat edildi. Dokuların kurumasını engellemek için nemli kamara kullanıldı.
3. 2x5 dk PBS ile durulandı.

4. Dengeleme ve işaretleme reaksiyonu

1. 75 µl TdT dengeleyici tampon (equilibration buffer) ile kesitler kaplandı. 10 dk oda ısısında inkübe edildi.
2. Lam başına 77 µl TdT işaretleme reaksiyon karışımı ve 33 µl TdT enzimi (3:1 oranında) mikrofuj túbüne transfer edildi ve hafifçe karıştırıldı.
3. Kesitlerdeki TdT dengeleyici tampon aspire edildi. Yıkama işlemi uygulanmadan bir sonraki aşamaya geçildi.
4. Hemen 55 µl TdT işaretleyici reaksiyon karışımı (daha önce hazırlanmış olan) herbir kesitin üzerine uygulandı.
5. Lamlar nemli kamarada kapağı kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.

5. İşaretleme reaksiyonunun sonlandırılması

1. 1 ml Stop/Wash Buffer 34 ml distile su ile karıştırılarak solüsyon hazırlandı.
2. Kesitler 100 µl Stop/Wash solüsyonu ile kaplandı. Oda ısısında 10 dk inkübe edildi.
3. 2x5 dk PBS ile durulandı.

6. Tespit

1. Spesimen 65 µl Anti-Digoxigenin-Peroxidase ile tamamen kaplandı. Oda ısısında 30 dk inkübe edildi.
6. 2x5 dk PBS ile durulandı.
7. 100 µl DAB solüsyonu ile kesitler kaplandı. Karanlıkta oda ısısında 6 dk inkübe edildi.
8. Lamlar dH₂O ile durulandı.

7. Zıt boyama

1. Hemen kesitler 100 µl Mayers Hematoksilen zıt boyası ile kaplandı.
2. Oda ısısında 1 dk inkübe edildi.
3. Lamlar çeşme suyu ile durulandı.
4. Lamlar % 95 etanole 1x3 dk daldırıldı.

5. Lamlar %100 etanole 3x3 dk daldırıldı.

6. Lamlar ksilene 2x5 dk daldırıldı.

6. Kesitlerin üstü entellan ve lamel ile kapatıldı.

Bu işlemlerden geçirilerek boyanan doku kesitleri ışık mikroskobunda değerlendirildi.

3. 7. Apoptotik İndeks (APOİ)

Tüm gruplara ait deney hayvanlarının böbrek doku kesitlerinde apoptoz tayini için TUNEL boyaması uygulandı. Doku kesitlerinde ayrıca APOİ'nin tespiti, ışık mikroskobunda 40'lık objektifte (x 400) rastgele seçilen 10 alanda glomerül, tübüllerde ve interstisyel alanlarda pozitif olarak işaretlenen apoptotik nükleuslar sayılarak aşağıdaki formüle göre yapıldı (179).

$$\text{APOİ} = \text{Apoptotik nükleus sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı} \times 100$$

3. 8. Kaspaz-3 Yöntemi

Formaldehidde tespit edilerek hazırlanan parafin bloklardan polilizinli lamlara 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 30 dk boyunca 60 °C'lik etüvde bekletildikten sonra etüvden çıkarıldı ve deparafinizasyon amacıyla 10 dk ksilende bekletildi. Daha sonra, 5 dk absolu alkolde, ardından 5 dk % 96'lık alkolde bekletildi. İşlem sonrası kesitler distile suya alındı ve 5 dk bekletildi. Distile sudan çıkarılarak antijen retrieval uygulaması için %10'luk sitrat buffer tamponu (pH: 6) içerisinde mikrodalgada aşamalı olarak kaynatıldı (350 Watt 5 dk, 500 Watt 5 dk, 700 Watt 10 dk) ve yine aynı tampon içinde 20 dk oda ısısında soğutuldu. Distile suya alındı. Distile sudan geçirilen kesitlere % 3'lük H₂O₂ bloking solüsyonu damlatılarak 10 dk bekletildi. Sonra PBS ile yıkandı ve zemin boyanmasını engellemek için Ultra V blok ile kesitler 5 dk inkübe edildi. Bu işlem sonrası, kesitler yıkanmadan, üstündeki bloking solüsyonu akıtılarak primer antikör kaspaz-3 antikoru (anti-caspase-3 antibody) (Millipore, cat no: AB3623, 1:100 dilüsyon) damlatıldı ve 1 saat inkübe edildi. Yapılan işlemler sonrası PBS'te 5 dk süreyle yıkanan kesitlere biotin (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent) damlatılarak 20 dk süreyle inkübasyon uygulandı ve PBS'de tekrar yıkandı.

Streptavidin peroksidaz damlatılarak tekrar 20 dk süreyle inkübasyon yapıldı ve bir kez daha PBS'de yıkandı. AEC Substrat ve AEC Kromojen (2:1) oranında karıştırıldı ve kesitler üzerine damlatıldı. 15 dk bekletildi. Ardından distile suda 3 dk süreyle yıkandıktan sonra zıt boyama için Mayers hematoksilenle kesitler 1 dk boyandı. Çeşme suyunda iyice yıkandıktan sonra lamalar kurutularak vision mount ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirildi. Her böbrek doku kesitine ait kaspaz-3 değerlendirilmesi, ışık mikroskobunda 40'lık objektif ile (x 400) rastgele seçilen 10 alanda immun boyamanın değerlendirilmesiyle yapıldı (0: boyanma yok, 1: hafif şiddette boyanma, 2: orta şiddette boyanma, 3: şiddetli boyanma) (180).

3. 9. Biyokimyasal Çalışmalar

3. 9. 1. Serum ve doku örneklerinin saklanması

Biyokimyasal çalışmalar için hayvanların sol ventriküllerinden kan örnekleri alındı ve biyokimya tüplerine konuldu. Örnekler tüplerde 5 -10 dk bekletildikten sonra 3000 - 5000 devirde (rpm) 10 dk santrifüj edilerek serum elde edildi. Serum kısımları ependorf tüplerine alınarak enzim çalışmaları için -80 °C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Hayvanlardan çıkarılan sol böbrekler ise doku çalışmaları için öncelikle iki ayrı SF ile dolu beher kabında yıkandıktan sonra spançla suyu alındı ve alüminyum folyoya sarılıp etiketlendikten sonra önce sıvı azota sonrada -80 °C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

Serumda ve dokuda MDA düzeyi, SOD ve XO enzim aktiviteleri ve NO miktarı ve MPO düzeyi çalışıldı.

3. 9. 2. Dokuların homojenizasyonu ve deney için hazırlanması

Dokular, çalışma gününde dondurucudan alınarak ağırlıklarının 5 katı hacimde (% 20 w/v) SF içinde homojenize edildi. Doku homojenatları 4000 x g'de 20 dk süreyle santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda protein konsantrasyonları Lowry yöntemiyle belirlendi ve uygun seyreltmelerle aynı doku türü için tüm süpernatantların protein konsantrasyonları

eşitlendi. Bu süpernatlarda oksidan ve antioksidan parametreler (MDA düzeyi, SOD ve XO enzim aktiviteleri, NO miktarı) spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

3. 9. 3. Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi

Doku homojenatlarından elde edilen süpernatların protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde Lowry protein ölçüm yöntemi kullanıldı (181). Bu yöntem fosfotungstik asit ve fosfomolibdik asitin (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi), protein- Cu^{+2} kompleksi ile proteinlerin triptofan ve tirozin içeren rezidüleri tarafından, molibden mavisi ve tungsten mavisi oluşturması prensibine dayanır. Oluşan kompleksin absorbansı 700 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kullanılan reaktifler:

0.1 N NaOH içinde 32 kısım %2 Na_2CO_3 , 1 kısım %2 Na-K Tartarat, 1 kısım CuSO_4 karışımı
Folin ciocalteu's Phenol: Distile su ile 1/1 oranında dilüe edildi.

Standart: 1mg/ml bovin serum albumin (BSA)

3. 9. 4. Serum ve dokuda SOD aktivitesi ölçümü

Sun ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı (182). Yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen süperoksit radikalinin SOD enzimi tarafından ortadan kaldırılamadığında reaksiyon ortamında bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğinin indirgenmesi temeline dayanır. İndirgenmiş NBT, 560 nm dalga boyunda en uygun absorbansı veren menekşe rengi oluşumuna yol açar. Ortamda SOD aktivitesi mevcutsa bu rengin oluşumu önlenecektir. Buna göre SOD aktivitesi (1 U-Ünite), NBT'nin indirgenmesini % 50 inhibe eden enzim miktarıdır. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Kullanılan reaktifler:

Reaktif karışımı: 3 mM stok ksantin, 0.6 mM EDTA, 150 μM NBT, 400 mM Na_2CO_3 , 1 gr/l
BSA

Ksantin oksidaz: 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile dilüe edilerek taze hazırlandı.

0.8 mM CuCl₂

3. 9. 5. Serum ve dokuda XO aktivitesi ölçümü

Bu yöntemin esası ksantinden ksantin oksidaz enzimi yardımıyla ürik asit oluşumu ve oluşan ürik asitin 293 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Oluşan ürik asitin absorbanısı XO aktivitesiyle doğru orantılıdır.

Kullanılan reaktifler:

Fosfat tamponu (pH 7.5; 50 mM fosfat; 0.5 mM EDTA); 0.5 gr KH₂PO₄, 3 gr Na₂HPO₄ ve 93 mg EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) tartılıp distile suda çözüldükten sonra toplam hacim 500 ml'ye tamamlanır.

Ksantin çözeltisi (2 mM) 7.6 mg katı ksantin 25 ml fosfat tamponunda çözülerek hazırlanır (183).

3. 9. 6. Serum ve dokuda MDA düzeyi ölçümü

Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA bir oksidasyon göstergesi olarak kullanılmaktadır. Dahle'nin spektrofotometrik yönteminin temeli MDA ile tiyobarbitürik asitin (TBA) oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbanısın ölçülmesine dayanır. Bu yöntemle elde edilen sonuç MDA dışındaki bazı maddelerle de bu reaksiyonu verebildiği için TBA ile reaksiyona giren maddeler (substances) anlamında TBARS olarak da adlandırılmaktadır.

Elde edilen sonuç, protein konsantrasyonuna (mg/ml) bölünerek nmol/mg cinsinden MDA değerleri bulundu (184).

Kullanılan reaktifler:

Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM): 2.13 gr Na₂HPO₄ ile 11.56 gr KH₂PO₄ tartılıp distile suda çözümlü hacim 1 litreye tamamlanarak hazırlanır.

TBA çözeltisi (% 2 w/v) hazırlanması: 200 mg katı TBA 10 ml distile suda çözülür.

Trikloroasetik asit (TCA % 20 w/v): 100 gr katı TCA'nın 500 ml 0.6 N HCl'de çözülmesiyle hazırlanır.

Etil alkol: % 95'lik v/v.

3. 9. 7. Serum ve dokuda NO düzeyi ölçümü

Bu yöntemin esası nitrik oksitin asidik ortamda sırasıyla sülfanilik asit ve naftilendiamin çözeltisi ile reaksiyona girmesiyle oluşan rengin 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesidir.

Kullanılan reaktifler:

Sülfanilik asit çözeltisi: 180 mg sülfanilik asit 10 ml distile suda çözülür.

Naftiletilendiamin çözeltisi: 162 mg naftiletilendiamin 10 ml distile suda çözülür.

HCl: 50 µl HCl 10 ml distile suda çözülür (185).

3. 9. 8. Serumda MPO düzeylerinin belirlenmesi

H₂O₂'nin homojenat tarafından oksitlenerek O-dianisidinin redüklenmesi ve redükte O-dianisidinin 410 nm'de spektrofotometrik yöntemle ölçülmesi esasına dayanır. Sonuçlar U/ml protein olarak ifade edildi (186).

Kullanılan reaktifler:

Na-K fosfat tamponu: 500mM/L, pH=7, Potasyum fosfat tamponu 20mM, pH=7.4

Potasyum fosfat tamponu: 50mM, pH=6 (% 0.5 HETAB (hexadecyltrimethylammonium bromid) ve % 0.146 EDTA içerecek)

H₂O₂ (%30'luk): 1/10 dilüe edilir.

O-dianisidin : %1'lik , HCl: 3 M

3. 10. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde "SPSS 16.0 for Windows" istatistik paket programı kullanıldı. Toplam denek sayısının otuzdan az olması sebebiyle istatistiksel hesaplamalarda nonparametrik testler kullanıldı. Grupların karşılaştırılmasında Kruskal

Wallis testi kullanıldı. Grupların ikili karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U Testi kullanıldı. Elde edilen p değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlılık ifadesi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4. 1. Vücut Ağırlıkları ve Ağırlık Kazançları

Kontrol ve deney gruplarına ait hayvanların başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ile ağırlık kazançları Tablo 4’de, vücut ağırlık kazançlarının istatistiksel karşılaştırılması Tablo 5’de gösterilmiştir.

Gruplar vücut ağırlık kazançları bakımından karşılaştırıldığında MTX, MTX + Kuersetin ve Kuersetin grubunda başlangıçtaki vücut ağırlığına göre azalma görüldü. MTX ile Kuersetin grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamsızken, MTX + Kuersetin grubundaki ağırlık kazancı kontrol grubu, MTX grubu ve Kuersetin grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma olduğu bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 5).

Grup	N	Başlangıç Ağırlığı (g) (Ort ± SS)	Bitiş Ağırlığı (g) (Ort ± SS)	Ağırlık Kazancı (g) (Ort ± SS)
I	6	303.17 ± 43.49	309.33 ± 50.57	6.166 ± 9.80
II	6	305.50 ± 37.20	305.17 ± 37.57	-0.33 ± 8.95
III	6	303.17 ± 29.55	267.50 ± 37.06	-35.66 ± 16.48
IV	6	302.17 ± 52.34	300.17 ± 62.85	-2.00 ± 18.42

Tablo 4: Grupların başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ile ağırlık kazançları (Ort ± SS).

Gruplar	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
p değerleri	0.470	0.004	0.470	0.004	1.000	0.025

Tablo 5: Vücut ağırlık kazançlarının gruplar arası ikili istatistiksel karşılaştırılması.

4. 2. Histolojik Bulgular

Metotreksata bağlı oluşan nefrotoksik doku hasarı parametreleri Tablo 6’da gösterilmiştir. Böbrekte meydana gelen tübüler atrofi ve nekroz, tübüler vakuoler dejenerasyon, Bowman mesafesinde daralma, glomerüler fibrozis ve vasküler konjesyon açısından gruplar değerlendirilmiştir.

Grup*	Tübüler atrofi ve nekroz	Tübüler vakuoler Dejenerasyon	Bowman mesafesinde daralma
I (n=6)	0.17 ± 0.408	0.17 ± 0.408	0.00 ± 0.00
II (n=6)	1.67 ± 0.816	1.83 ± 0.753	1.33 ± 0.516
III (n=6)	0.33 ± 0.516	0.67 ± 0.516	0.00 ± 0.00
IV (n=6)	0.17 ± 0.408	0.67 ± 0.516	0.17 ± 0.408

Grup *	Glomerüler fibrozis	Vasküler konjesyon
I (n=6)	0.00 ± 0.00	1.33 ± 0.516
II (n=6)	1.50 ± 0.548	2.67 ± 0.516
III (n=6)	0.33 ± 0.516	0.67 ± 0.516
IV(n=6)	0.00 ± 0.00	0.67 ± 0.516

Gruplar**	T. atrofi ve nekroz	T. vakuoler dejenerasyon	Bowman mes. daralma	Glomerüler fibrozis	Vasküler konjesyon
I-II	0.004	0.004	0.002	0.002	0.009
I-III	0.699	0.180	1.000	0.394	0.132
I-IV	1.000	0.180	0.690	1.000	0.132
II-III	0.015	0.026	0.002	0.015	0.002
II-IV	0.004	0.026	0.009	0.002	0.002
III-IV	0.699	1.000	0.699	0.394	1.000
p değeri	0.004	0.005	0.000	0.000	0.001

* Kruskal Wallis testi kullanıldı.

** İkili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi yapıldı. Bonferroni düzeltmesi yapılarak ikili karşılaştırmalarda p değeri 0.008'den küçük değerler anlamlı kabul edildi.

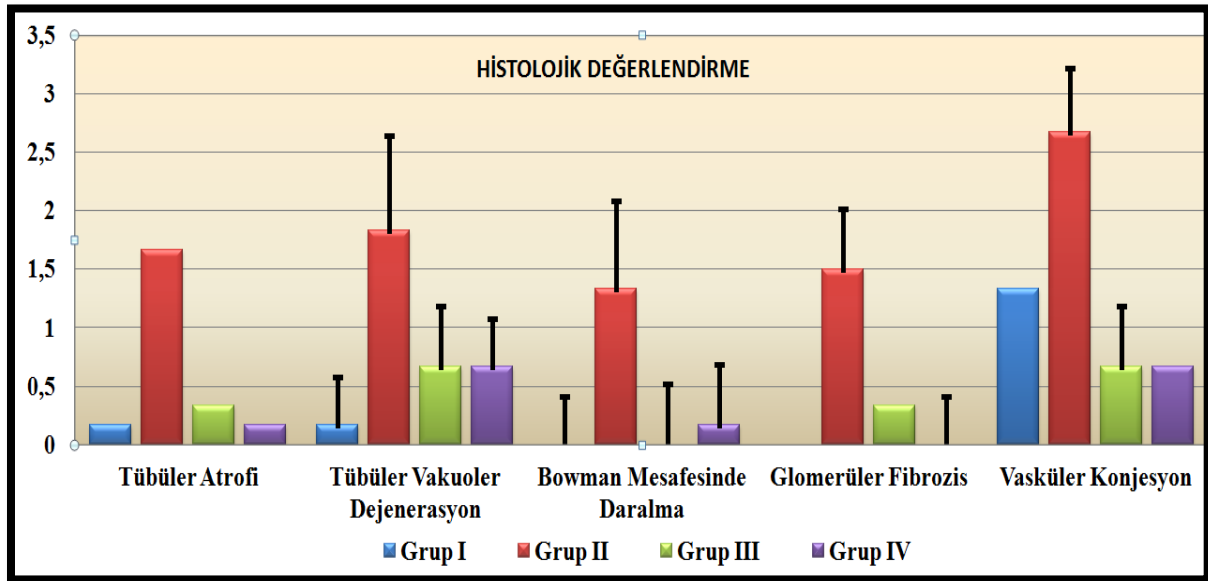
Tablo 6: Gruplara ait histolojik değişiklikler ve histolojik değişikliklerin gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması (Ort ± SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: Metotreksat, Grup III: Metotreksat + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin)

Kontrol ve MTX gruplarındaki değişiklikler değerlendirildiğinde MTX verilen grupta nefrotoksik hasar bulguları daha yoğun olarak tespit edildi. Tübüler atrofi-nekroz, vakuoler

dejenerasyon, Bowman mesafesinde daralma ve glomerüler fibrozis açısından gruplar değerlendirildiğinde; MTX grubunda oluşan bu değişiklikler kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.008$) (Tablo 6).

Kontrol grubu ve MTX + Kuersetin verilen grupta histopatolojik değişiklikler yönüyle gruplar arasında anlamlı bir farklılık izlenmedi ($p > 0.008$) (Tablo 6).

MTX grubu ile MTX + Kuersetin grubu tübüler atrofi-nekroz, tübüler vakuoler dejenerasyon, Bowman mesafesinde daralma, glomerüler fibrozis ve vasküler konjesyon açısından değerlendirildiğinde MTX grubunda hasar bulgularının anlamlı oranda arttığı gözlemlendi ($p < 0.008$) (Tablo 6). Kuersetin grubu ve kontrol grubunda meydana gelen doku hasarları karşılaştırıldığında bu iki grup arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p > 0.008$) (Tablo 6).



Grafik 1: Grupların histolojik parametreler açısından değerlendirilmesi

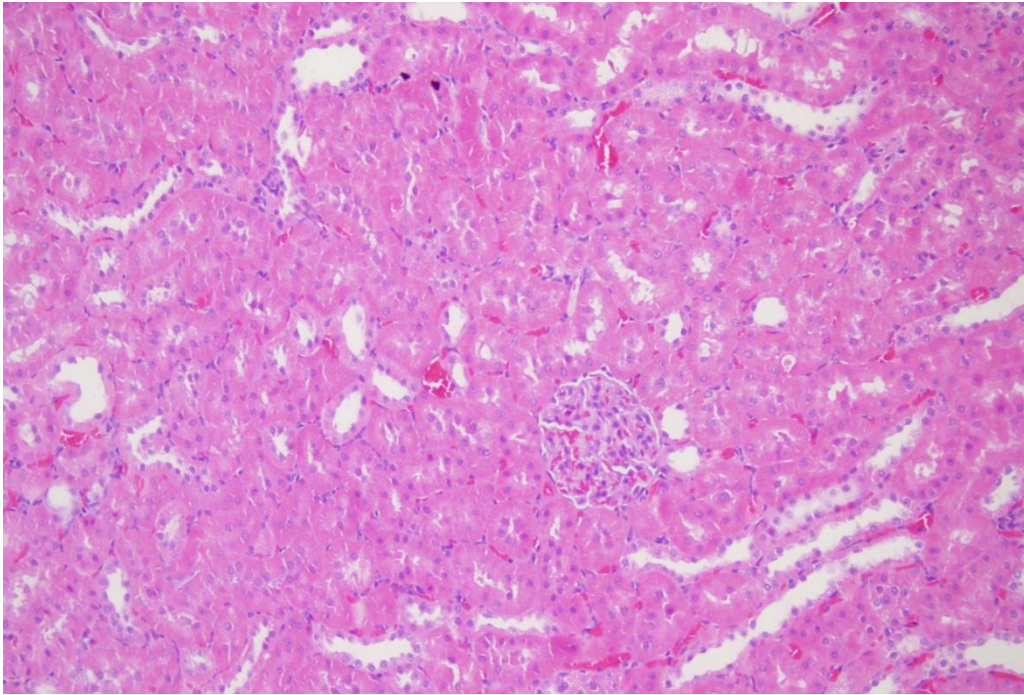
(Grup I: Kontrol, Grup II: Metotreksat, Grup III: Metotreksat + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin)

4. 2. 1. Işıık mikroskopik bulgular

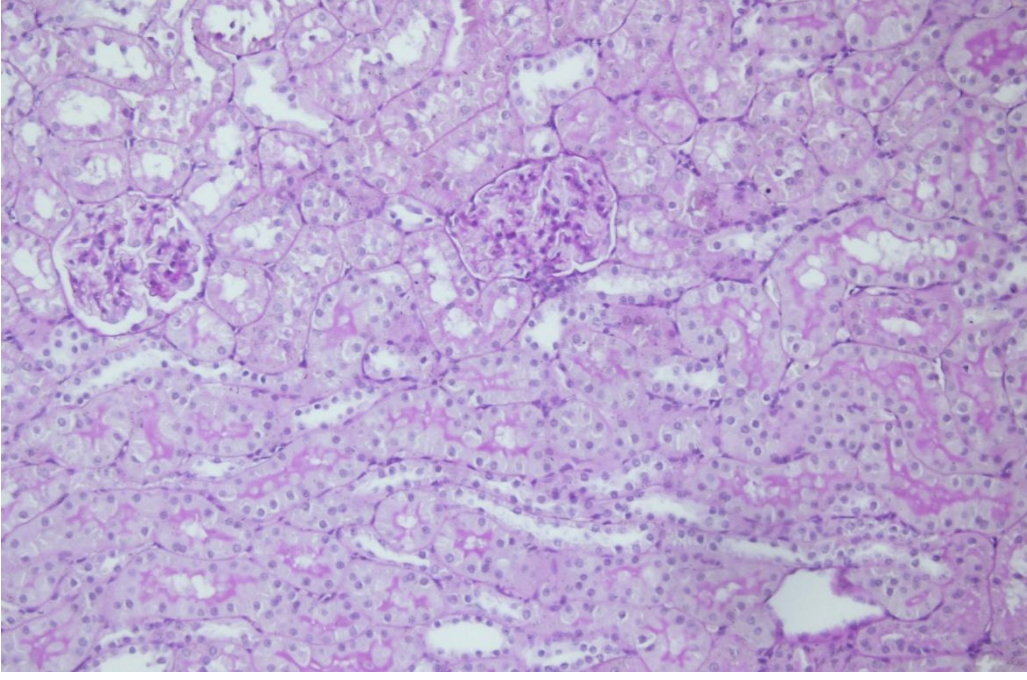
4. 2. 1. 1. Rutin histolojik boyamalar

1. Kontrol grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

Kontrol grubundaki rat böbreklerine ait HE ve PAS ile boyanmış kesitlerin incelenmesi sonucunda glomerül ve tübül yapıları değerlendirildi. Glomerül yapısı, Bowman mesafesi, Bowman kapsülü paryetal yaprağı, proksimal ve distal tübüllerin epitel yapılarının normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi. PAS ile boyanmış kesitlerde proksimal tübüllerde fırçasmsı kenar belirgin olarak izlendi. Glomerüller fibrozise rastlanmadı (Resim 1 ve 2).



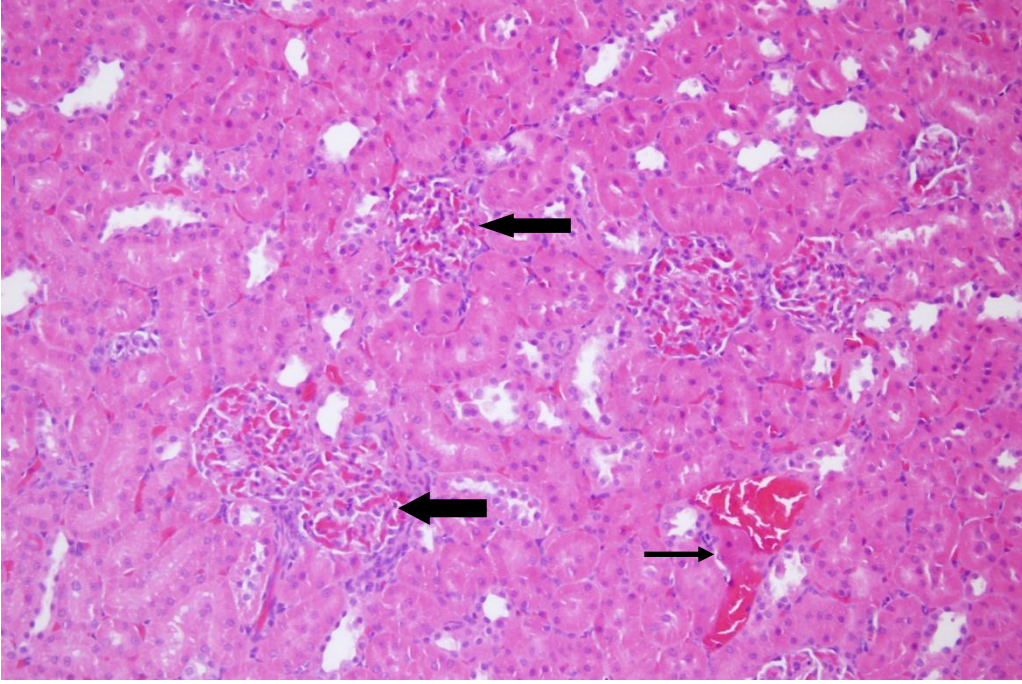
Resim 1: Kontrol grubuna ait rat böbreğinden histolojik bir görünüm. Glomerüller ve tübüller normal yapıda izlenmektedir (H-E x 200).



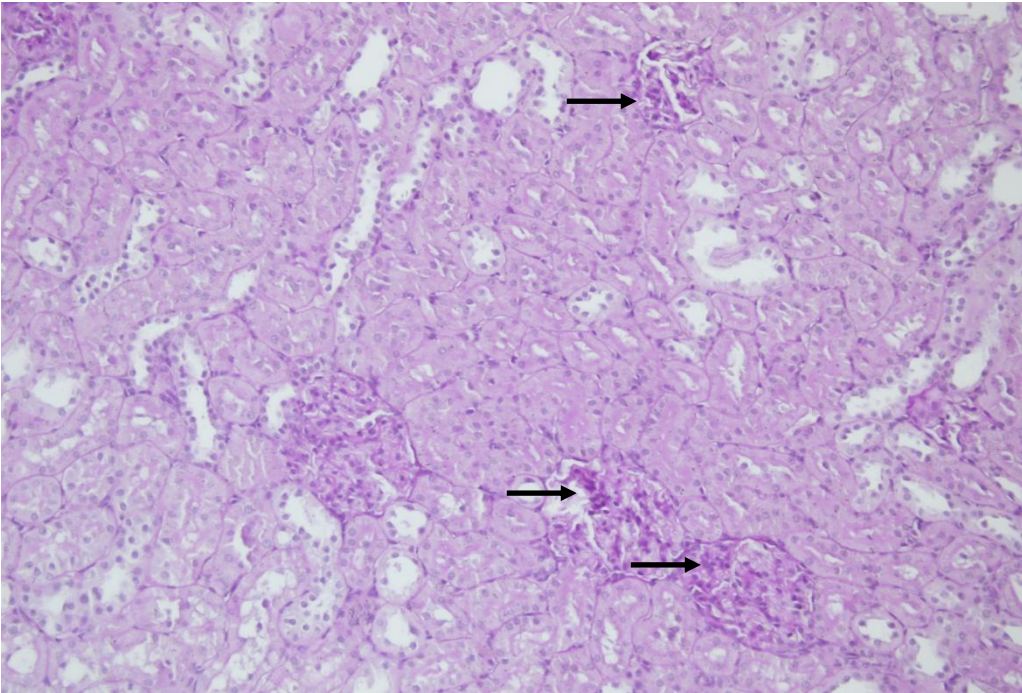
Resim 2: Kontrol grubuna ait rat böbreğinden histolojik bir görünüm. Glomerüller ve tübüller normal yapıda izlenmektedir (PAS x 200).

2. Metotreksat grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

MTX grubuna ait preparatlarda HE boyama ile yapılan incelemelerde, tübül epitelinde atrofik görünüm ve bazı yerlerde tübül epitelinde nekroz izlendi. Tübüllerde vakuoler dejenerasyonda belirgin artış görüldü. Glomerüler yapı incelendiğinde ise, glomerül yapısında yer yer bozulmalar ve Bowman mesafesinde daralma görüldü. Vasküler konjesyonda artış belirgindi. Nadir alanlarda Bowman kapsülü paryetal yaprağında kalınlaşma izlendi. Diğer gruplarla kıyaslandığında interstisyel infiltrasyonda belirgin bir değişiklik izlenmedi. PAS ile yapılan incelemelerde Bowman mesafeleri ve glomerüler fibrozis daha net izlenirken, proksimal tübül fırçamsı kenarında azalmalar gözlemlendi (Resim 3 ve 4).



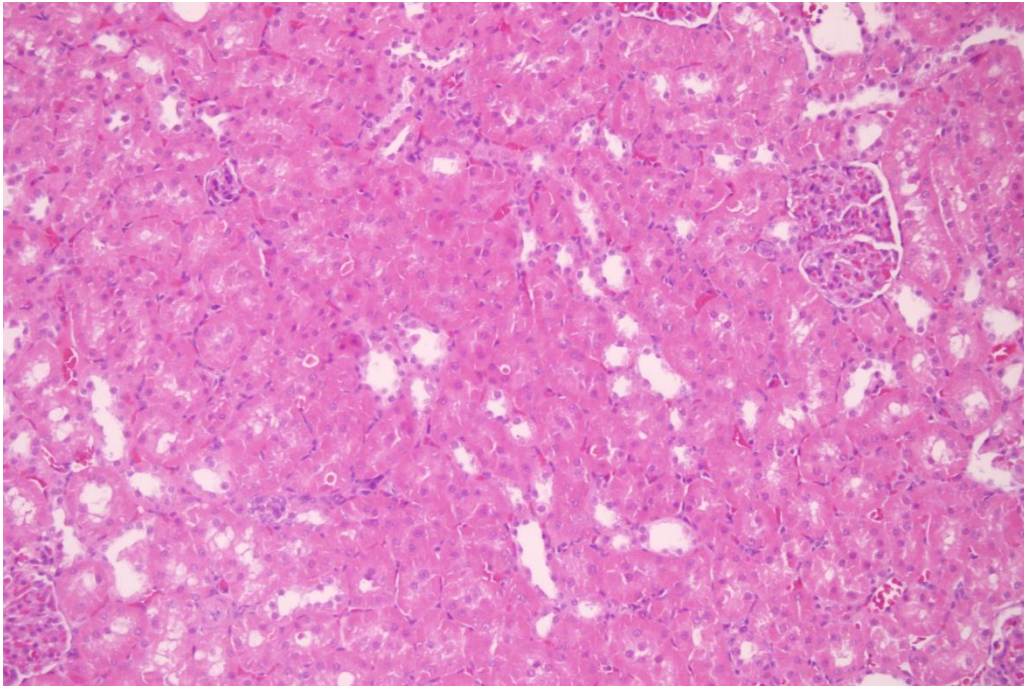
Resim 3: MTX grubuna ait rat böbreğinden histolojik bir görünüm. Böbrekte Bowman mesafesinde daralma (→) vasküler konjesyonda artış (→) ile belirtildi. (H-E x 200).



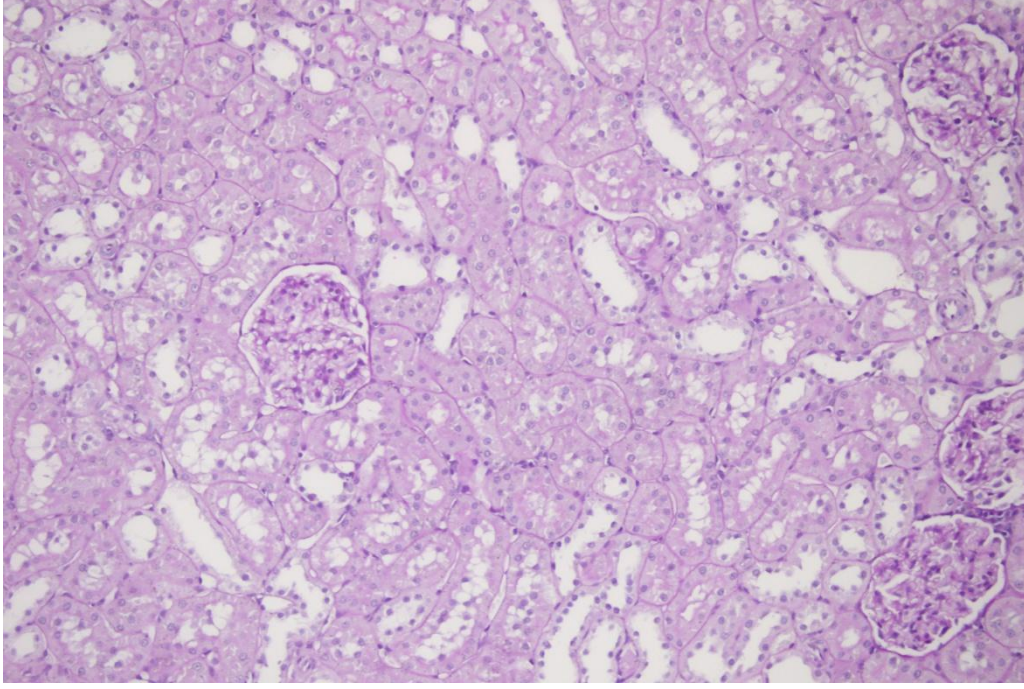
Resim 4: MTX grubuna ait rat böbreğinden histolojik bir görünüm. Böbrekte glomerüler fibrozis (→) ile gösterildi (PAS x 200).

3. Metotreksat + Kuersetin grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

Kuersetin tedavisinin, böbrekte MTX'in neden olduğu hasarı önlemedeki etkisi ışık mikroskopik yöntemle değerlendirildi. Tübüler atrofi ve tübüler vakuoler dejenerasyonda MTX grubuna oranla azalma görüldü. Glomerüller alan değerlendirildiğinde glomerüller fibrozis, Bowman boşluğunda azalma ve Bowman kapsülü paryetal yaprağında kalınlaşma miktarında azalma izlendi (Resim 5 ve 6).



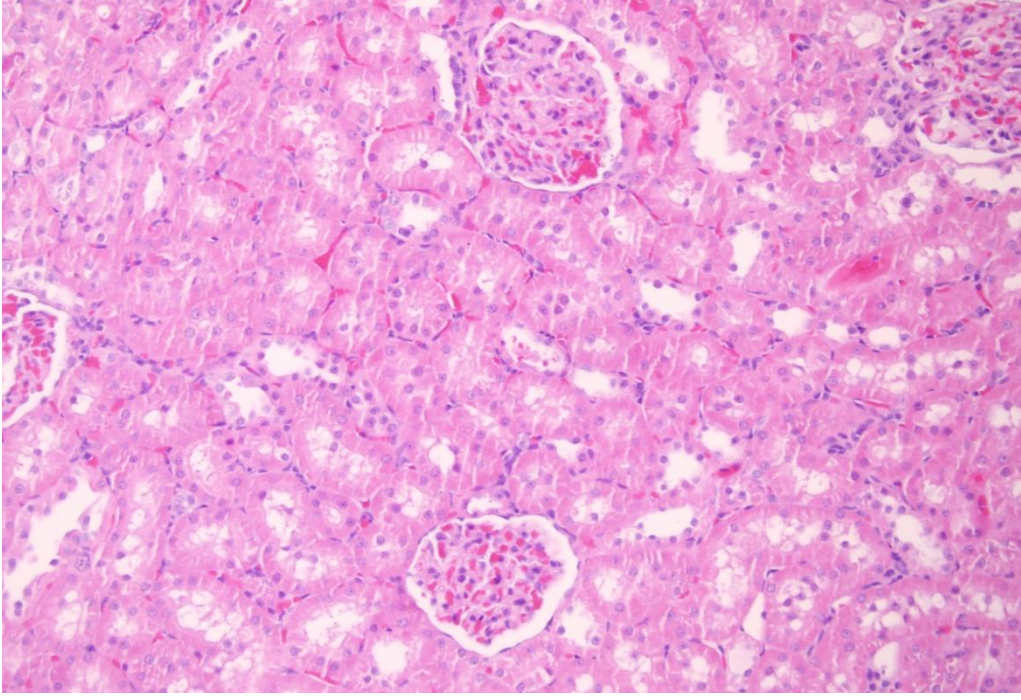
Resim 5: MTX + Kuersetin grubuna ait rat böbreğinden histolojik bir görünüm. Normal histolojik yapıya çok yakın şekilde glomerül ve tübül görünümü (HE x 200).



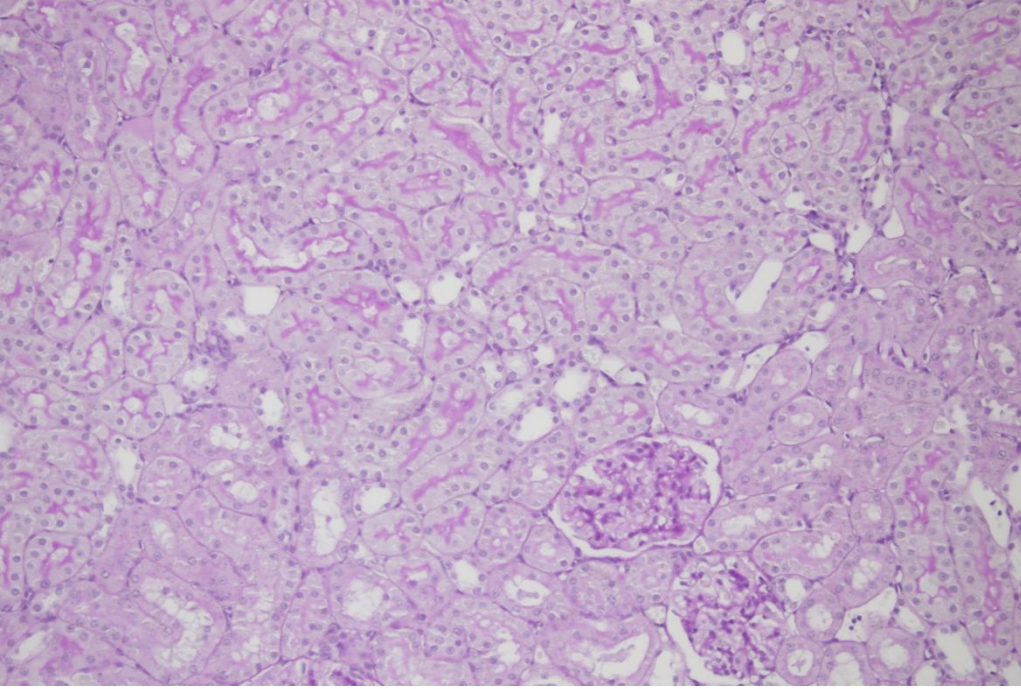
Resim 6: MTX + Kuersetin grubuna ait rat böbreğinden histolojik bir görünüm. Normal histolojik yapıya çok benzer şekilde glomerül ve tübül görünümü (PAS x 200).

4. Kuersetin grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

Kuersetin grubuna ait rat böbreklerinin histolojik incelemesi sonucunda tübüler atrofi, tübüler vakuoler dejenerasyon, glomerüler fibrozis, Bowman boşluğunda azalma ve Bowman kapsülü paryetal yaprağında kalınlaşma açısından kontrol grubu gibi morfolojik özellikler gösterdiği izlendi (Resim 7 ve 8).



Resim 7: Kuersetin grubuna ait rat böbreğinden histolojik bir görünüm. Normal histolojik görünümde glomerül ve tübül yapısı (HE x 200).



Resim 8: Kuersetin grubuna ait rat böbreğinden histolojik bir görünüm. Normal histolojik görünümde glomerül ve tübül yapısı (PAS x 200).

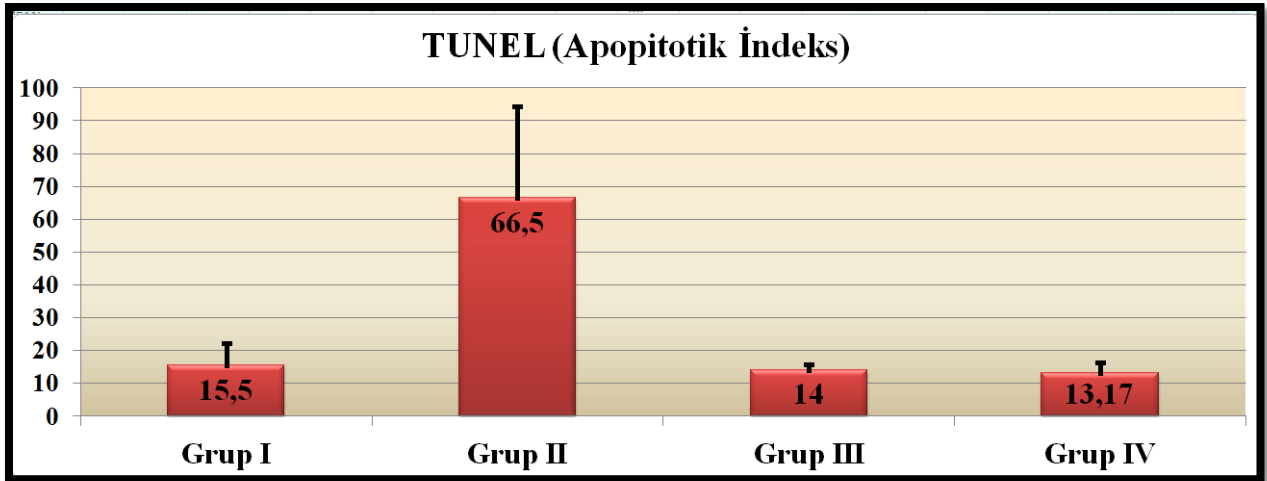
4. 2. 1. 2. TUNEL boyama bulguları

Çalışmamızda apoptozu belirlemek için histolojik kesitlere TUNEL metodu uygulandı. Işık mikroskobu ile her bir hayvana ait kesitler 40'lık objektifte (x 400) rastgele seçilen 10 alanda glomerül, tübüler ve interstisyel alanlarda pozitif olarak işaretlenen apoptotik nükleuslar sayılarak APOİ hesaplanarak yapıldı.

Gruplar	I	II	III	IV
TUNEL (APOİ)	15.50 ± 6.65	66.50 ± 27.97	14.00 ± 1.78	13.17 ± 2.99

p = 0.004

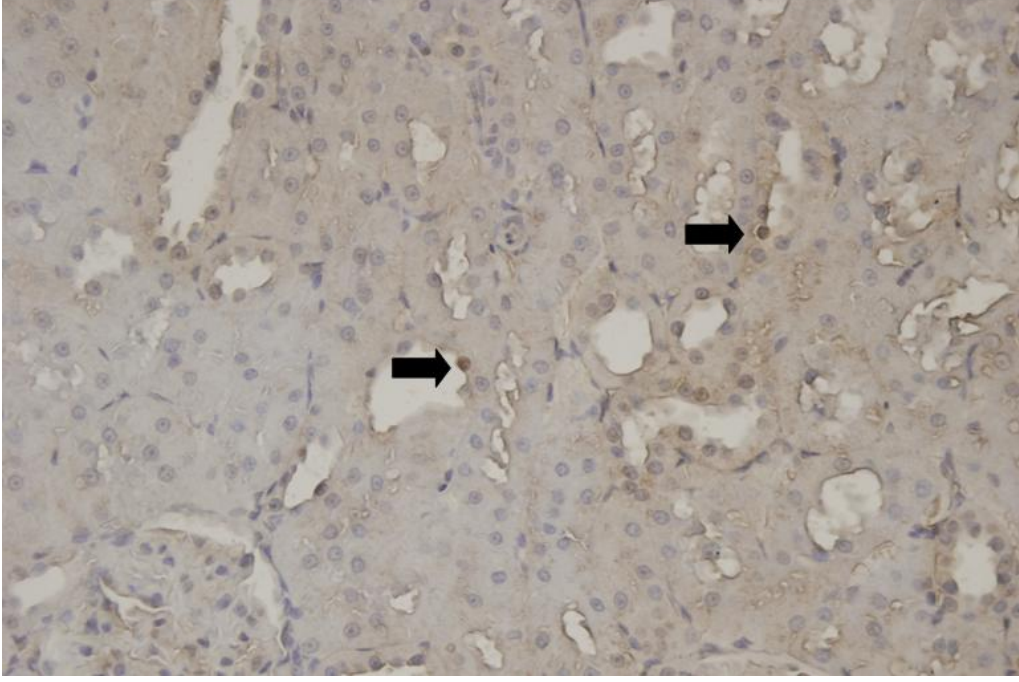
Tablo 7: TUNEL boyama yapılan doku kesitlerinde APOİ sonuçlarının gruplara göre dağılımı (Ort ± SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin)



Grafik 2: TUNEL boyama yapılan doku kesitlerinde APOİ ortalamaları grafiği (Ort ± SS) (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX+ kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

1. Kontrol Grubuna Ait Apoptotik Bulgular

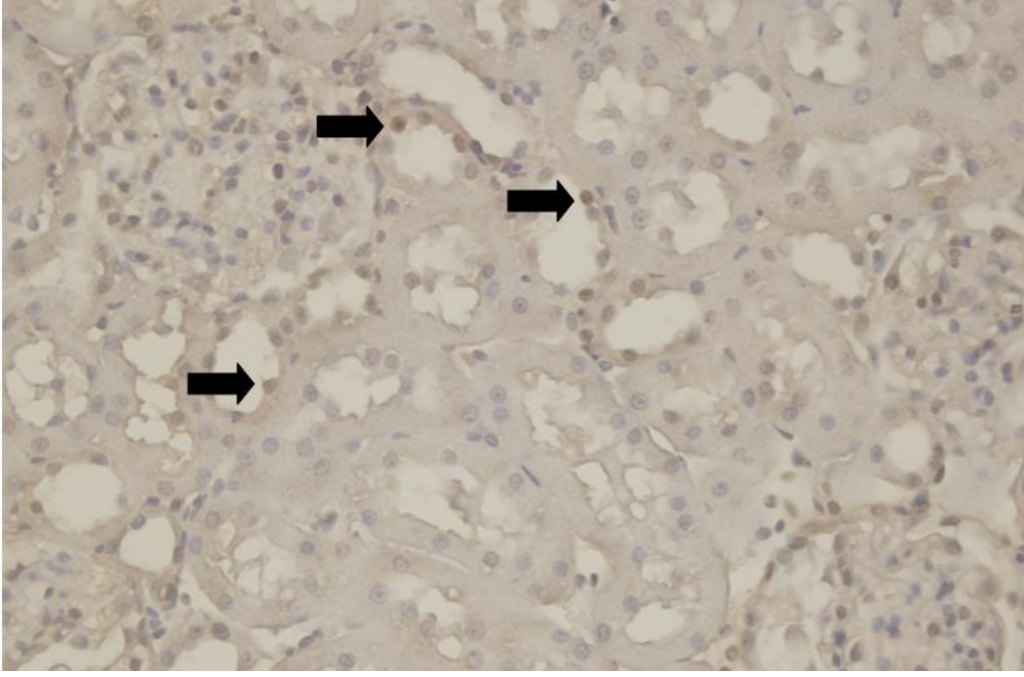
Kontrol grubuna ait renal korteks ve medullada, az sayıda TUNEL (+) hücreye rastlandı (Resim 9). MTX grubuyla karşılaştırıldığında kontrol grubunda APOİ'de anlamlı oranda azalma görüldü (p = 0.004). MTX + Kuersetin ve Kuersetin grubuyla arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p >0.05).



Resim 9: Kontrol grubuna ait kesitte az sayıda TUNEL (+) hücre (x 400) (Zıt Boya: Mayers hematoxilen).

2. MTX grubuna ait apopitotik bulgular

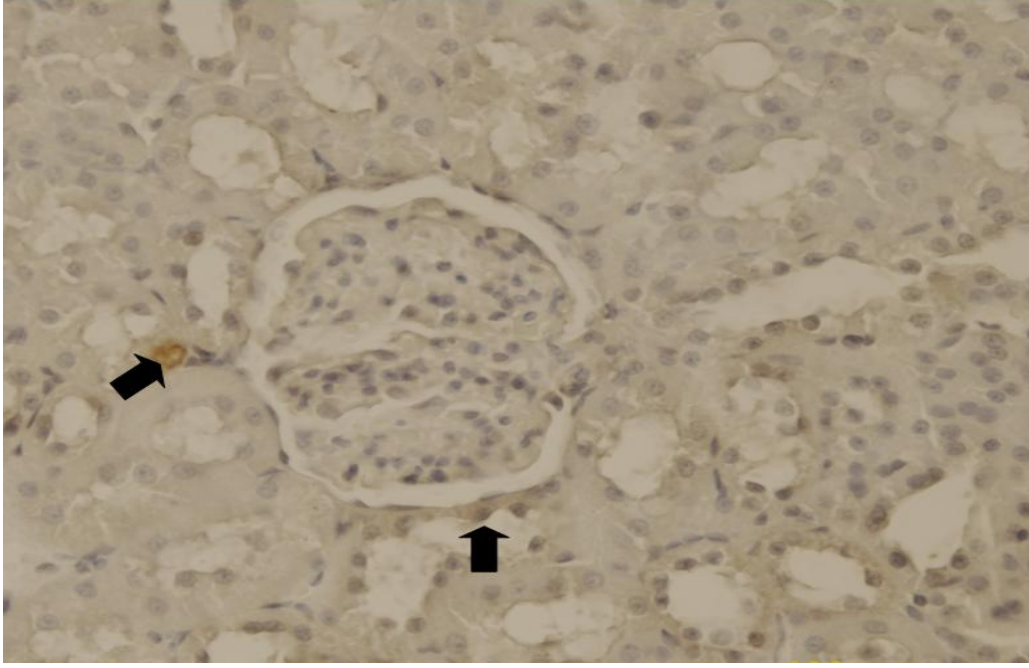
MTX grubu böbrek kesitlerinde, MTX'in diğer gruplara göre TUNEL (+) hücre sayısını arttırdığı görüldü. Glomerüllerde ve proksimal tübüllerde nadir alanda TUNEL (+) hücre tutulumuna rastlanırken, distal tübüllerde ve medulla bölgesinde daha yoğun TUNEL (+) hücre tutulumu izlendi (Resim 10). Kontrol, MTX + Kuersetin ve Kuersetin gruplarıyla karşılaştırıldığında MTX grubunda APOİ'de anlamlı oranda artış görüldü ($p = 0.004$).



Resim 10: MTX grubuna ait kesitte artmış sayıda TUNEL (+) hücre (x 400) (Zıt Boya: Mayers hematoksilin).

3. MTX + Kuersetin grubuna ait apoptotik bulgular

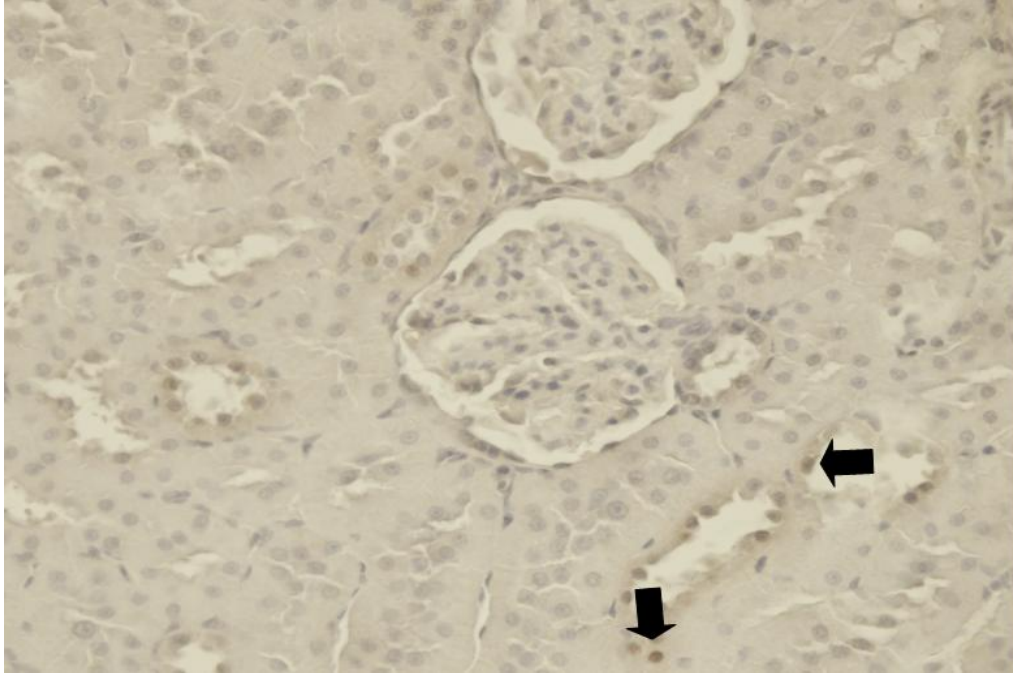
MTX + Kuersetin grubunda TUNEL (+) hücre tutulumu kontrol grubuna benzer olarak değerlendirildi. Yapılan çalışma sonucunda MTX ile beraber kuersetin ön uygulamasının TUNEL (+) hücre sayısını yalnızca MTX verilen gruba göre anlamlı oranda azalttığı görüldü ($p = 0.004$) (Resim 11). Kontrol grubu ve Kuersetin grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).



Resim 11: MTX + Kuersetin grubuna ait kesitte az sayıda TUNEL (+) hücre (x 400) (Zıt Boya: Mayers hematoksilen).

4. Kuersetin grubuna ait apopitotik bulgular

Kuersetin grubunda; kontrol, MTX ve MTX + Kuersetin grubuna göre daha az sayıda TUNEL (+) hücre görüldü (Resim 12). Kuersetin grubu MTX grubu ile karşılaştırıldığında, apopitozda istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma gözlenirken ($p = 0.004$); kontrol grubu ve MTX + Kuersetin grubu karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı değildi ($p > 0.05$).

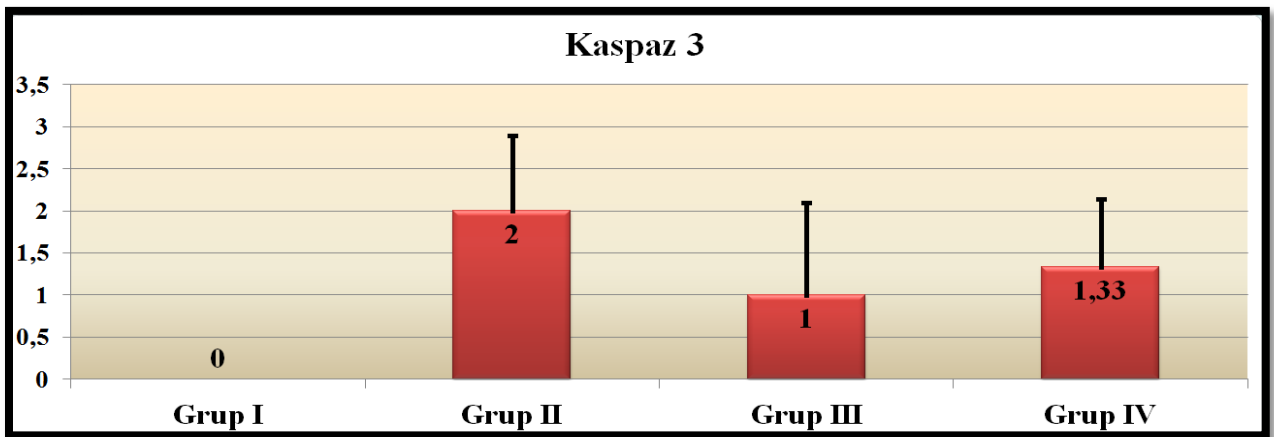


Resim 12: Kuersetin grubuna ait kesitte az sayıda TUNEL (+) hücre (x 400) (Zıt Boya: Mayers hematoksilen)

4. 2. 1. 3. Kaspaz-3'ün değerlendirilmesi

Gruplar	I	II	III	IV
Kaspaz-3	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.894	1.00 ± 1.095	1.33 ± 0.816
p = 0.006				

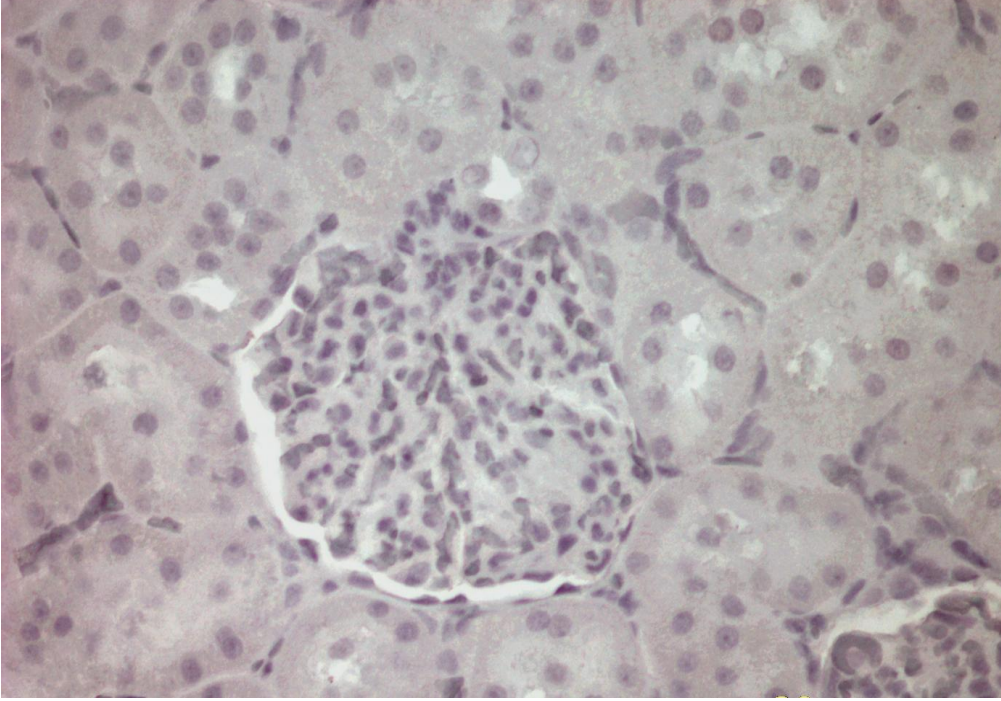
Tablo 8: Gruplara ait kaspaz-3 (+) boyanma sonuçları (Ort ± SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).



Grafik 3: Gruplara ait kaspaz-3 (+) boyanma sonuçları (Ort ± SS) (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

1. Kontrol grubuna ait kaspaz-3 bulguları

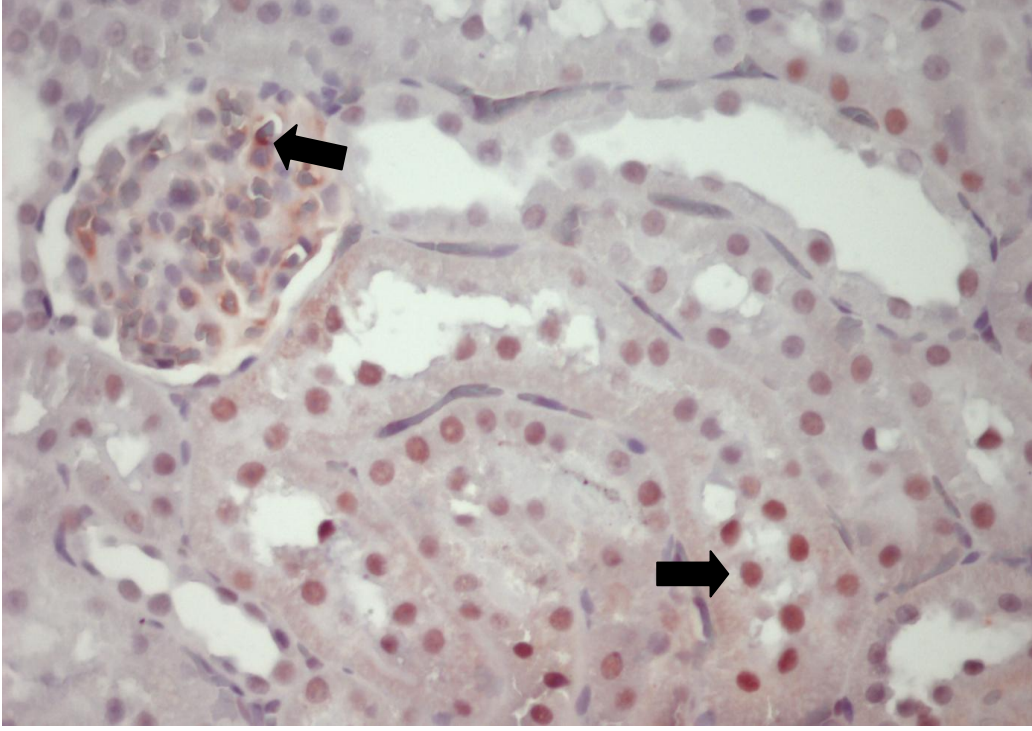
Kontrol grubuna ait böbrek kesitlerinde glomerüller ve tübüler alanlarda kaspaz-3 (+) tutulumuna rastlanmadı ve normal görünümde izlendi (Resim 13).



Resim 13: Kontrol grubuna ait rat böbreğinin immünohistokimyasal olarak kaspaz-3 ile boyanması (Kaspaz-3 ekspresyonuna dair boyanma izlenmedi) (x 400).

2. Metotreksat grubuna ait kaspaz-3 bulguları

MTX grubundaki kaspaz-3 ekspresyonu diğer gruplara göre yüksek bulundu. Glomerüllerde ve tübüler alanlarda pozitif tutulum izlendi. Özellikle medüller bölgede Henle kulpunda ve toplayıcı kanallarda kaspaz-3 ekspresyonu belirgindi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kaspaz-3 (+) hücre sayısındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p = 0.002$). MTX + Kuersetin grubu ve Kuersetin grubu ile karşılaştırıldığında MTX grubundaki kaspaz-3 (+) hücre sayısı artmış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p > 0.05$).

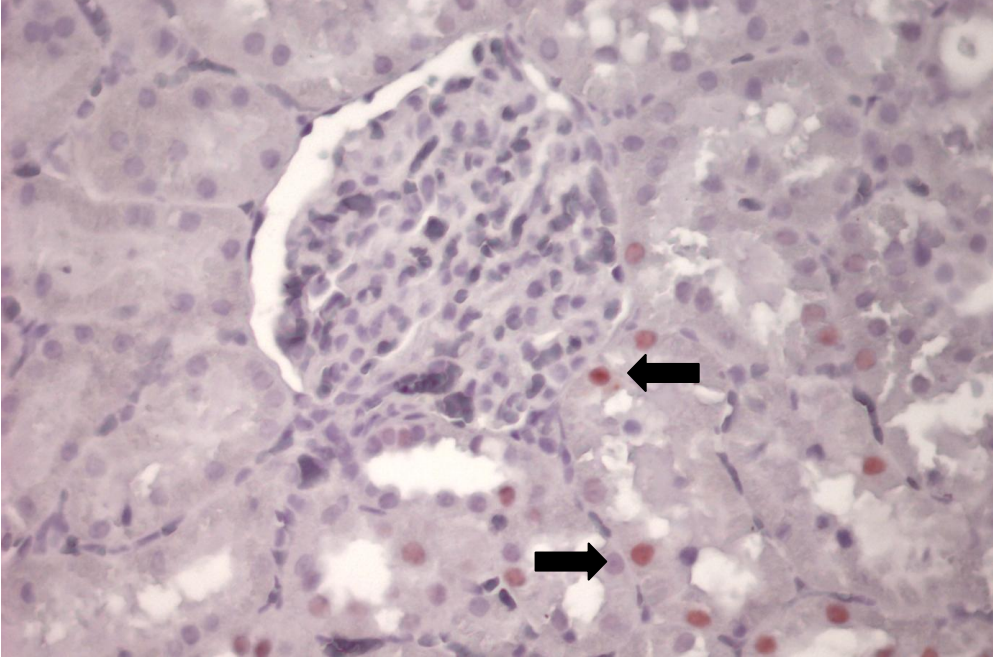


Resim 13: MTX grubuna ait rat böbreğinin immünohistokimyasal olarak kaspaz-3 boyaması (x 400). Hem tübüler hem de glomerüler alanda hücre çekirdeği ve sitoplazmada bol miktarda kaspaz-3 (+) boyanma görüldü.

3. MTX + Kuersetin grubuna ait kaspaz-3 bulguları

MTX + Kuersetin grubunda kaspaz-3 ekspresyonu medullada az sayıda; glomerüller, proksimal ve distal tübüllerde de oldukça az sayıda gözlemlendi (Resim 14).

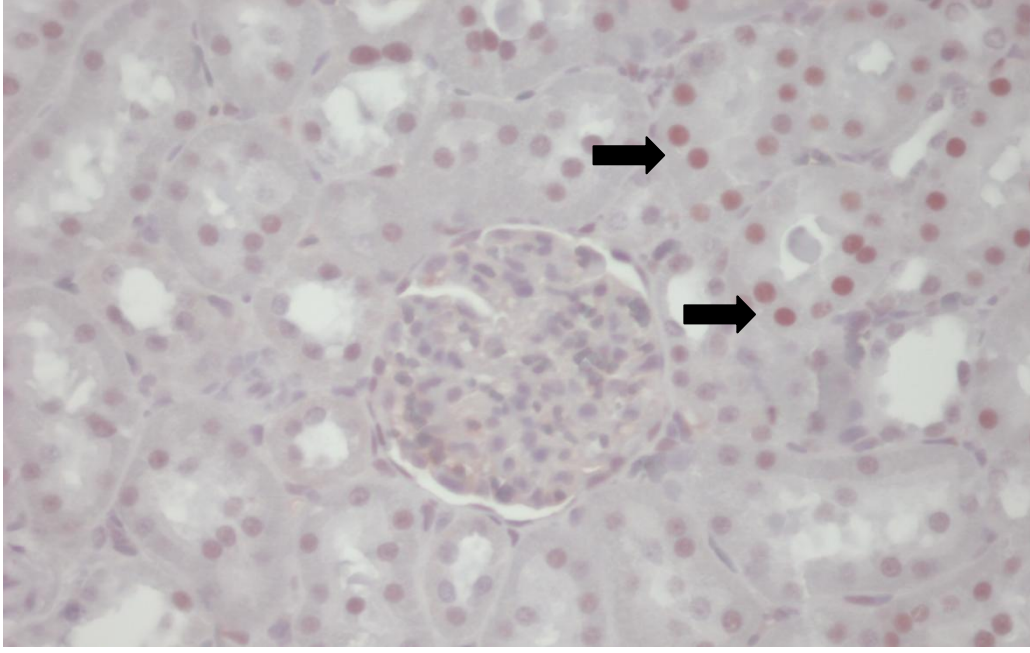
MTX + Kuersetin grubuna ait kesitlerdeki kaspaz-3 (+) hücre sayısı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kaspaz-3 (+) hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış görülürken ($p < 0.05$); MTX grubuyla karşılaştırıldığında kaspaz-3 (+) hücre sayısında azalma görülmesine rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Kuersetin grubuyla karşılaştırıldığında ise anlamlı bir değişiklik izlenmedi ($p > 0.05$).



Resim 14: MTX + Kuersetin grubuna ait rat böbreğinin immünohistokimyasal olarak kaspaz-3 boyaması (x 400). Tübüler alanda az miktarda kaspaz-3 (+) hücre sayısı gözlemlendi.

4. Kuersetin grubuna ait kaspaz-3 bulguları

Kuersetin grubunda tübüler alanda ve medullada az sayıda kaspaz-3 ekspresyonu gözlemlendi (Resim 15). Kuersetin grubuna ait örnekler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kaspaz-3 (+) hücre sayısındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). MTX grubuyla karşılaştırıldığında kaspaz-3 (+) hücre sayısında anlamlı oranda azalma görüldü ($p < 0.05$). MTX + Kuersetin grubuyla karşılaştırıldığında ise kaspaz-3 (+) hücre sayısında anlamsız oranda artış görüldü ($p > 0.05$).



Resim 15: Kuersetin grubuna ait rat böbreğinin immünohistokimyasal olarak kaspaz-3 boyaması (x 400). Tübüler ve glomerüler alanda kaspaz-3 (+) hücreler görüldü.

4. 3. Biyokimyasal Bulgular

Ratlar üzerinde yapılan çalışmada antioksidan savunma sistemi enzimlerinden serum ve dokuda SOD, XO aktiviteleri ve NO düzeyleri spektrofotometrik olarak değerlendirildi (Tablo 9, 10, 11). Ayrıca lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeylerine serum ve doku örneklerinde bakıldı (Tablo 9, 11). Nötrofil infiltrasyonunu gösteren MPO düzeyleri serum örneklerinde araştırıldı (Tablo 9).

Grup	Serum SOD (U/mL)	Serum MDA (nmol/ml)	Serum MPO (U/mL)
I	693.67 ± 23.84	12.36 ± 6.18	92.79 ± 62.04
II	701.34 ± 48.16	14.12 ± 2.78	73.25 ± 39.90
III	599.67 ± 94.99	11.28 ± 1.34	131.58 ± 67.30
IV	657.60 ± 40.85	10.43 ± 1.16	79.22 ± 76.09

Tablo 9: Grupların serum SOD, MDA ve MPO değerleri (Ort ± SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin)

Grup	Serum XO (U/mL)	Serum NO (μ mol/mL)
I	125010 \pm 16803	25.54 \pm 19.10
II	113335 \pm 4533	26.29 \pm 9.44
III	112775 \pm 5169	28.43 \pm 16.25
IV	113430 \pm 8261	25.72 \pm 8.68

Tablo 10: Grupların serum XO ve NO değerleri (Ort \pm SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX+ Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

Grup	Doku SOD (U/mg protein)	Doku MDA nmol/g protein)	Doku XO (mIU/mg protein)	Doku NO (μ mol/g protein)
I	9.725 \pm 0.980	0.650 \pm 0.105	0.043 \pm 0.010	31.220 \pm 23.619
II	10.036 \pm 1.043	0.626 \pm 0.128	0.034 \pm 0.009	41.025 \pm 28.081
III	9.886 \pm 0.310	0.859 \pm 0.194	0.043 \pm 0.004	37.843 \pm 29.650
IV	9.774 \pm 0.296	0.594 \pm 0.109	0.040 \pm 0.010	34.088 \pm 20.697

Tablo 11: Grupların doku SOD, MDA, XO ve NO değerleri (Ort \pm SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

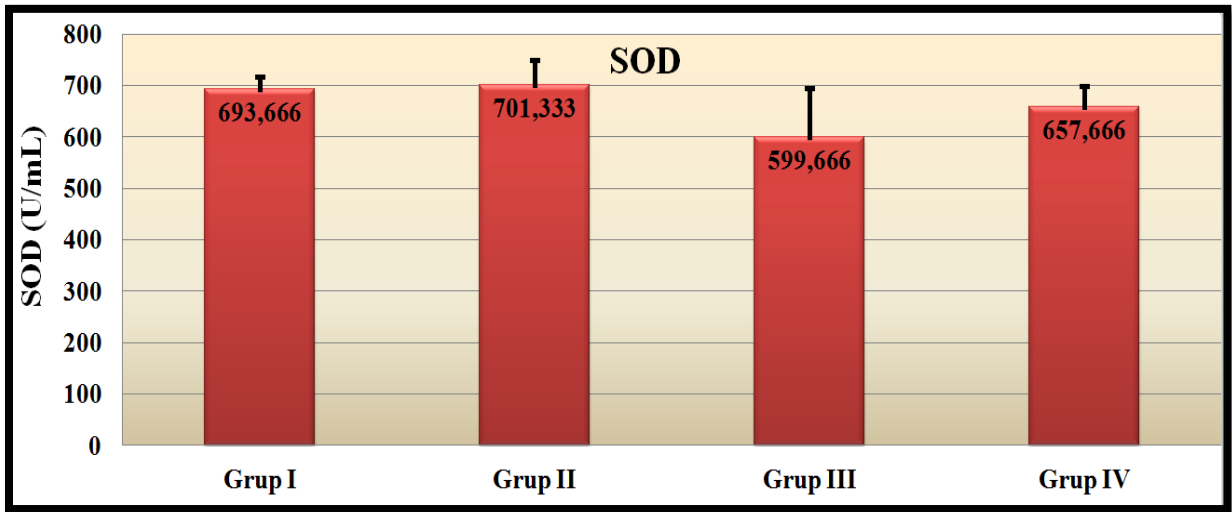
Gruplar	Serum Değerleri					Doku Değerleri			
	SOD	MDA	MPO	XO	NO	SOD	MDA	XO	NO
P	0.024	0.027	0.277	0.333	0.738	0.806	0.053	0.425	0.728
I-II	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
I-III	0.010	0.054	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
I-IV	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
II-III	0.025	0.045	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
II-IV	AD	0.020	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
III-IV	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD

Tablo 12: Biyokimyasal parametrelerin gruplar arası ikili istatistiksel karşılaştırılmasında p değerleri (AD: Anlamli değil) ($p > 0.05$). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

4. 3. 1. Serum SOD aktiviteleri

Grupların SOD değerleri Tablo 9’da ve istatistiksel anlamlılık düzeyleri Tablo 12’de, dağılımları Grafik 4’te gösterilmiştir.

Serum SOD aktivitesi açısından gruplar değerlendirildiğinde; MTX grubunda SOD aktivitesi en yüksek değerde iken, MTX + Kuersetin grubunda en düşük değerdedir. MTX grubu serumlarının SOD aktivite değerlerindeki artışın kontrol grubuna ait değerler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Kontrol grubu ile MTX + Kuersetin grupları karşılaştırıldığında; Kontrol grubunda serum SOD aktivitelerinin MTX + Kuersetin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu tespit edildi ($p = 0.010$). MTX grubu, MTX + Kuersetin grubu ile karşılaştırıldığında serum SOD aktivitesinde anlamlı oranda artış izlendi ($p = 0.025$) (Tablo 12).



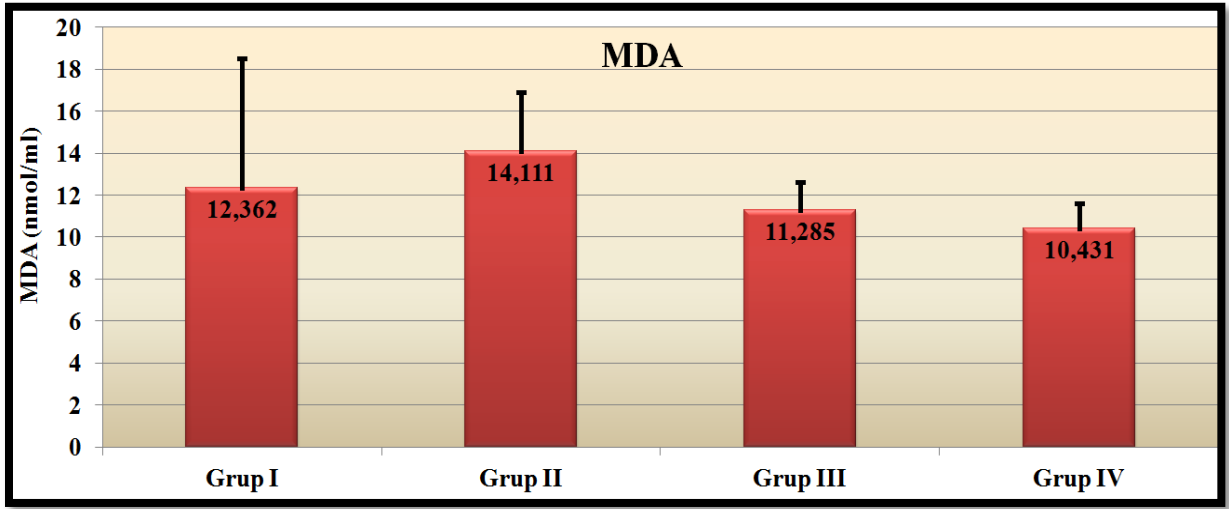
Grafik 4: Grupların serum SOD aktivite düzeyleri (Ort \pm SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

4. 3. 2. Serum MDA düzeyleri

Grupların serum MDA değerleri Tablo 9’da ve istatistiksel anlamlılık düzeyleri Tablo 12’de dağılımları Grafik 5’te gösterilmiştir.

Serum MDA düzeyleri en yüksek MTX grubunda iken, Kuersetin grubunda ise en düşük değerde saptandı. MTX grubu serum örneklerindeki MDA düzeylerindeki artışın Kontrol

grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). MTX grubu, MTX + Kuersetin grubu ile karşılaştırıldığında MTX grubunda MDA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi ($p = 0.045$). MTX grubu ile Kuersetin grubu karşılaştırıldığında MTX grubunda MDA düzeylerinde anlamlı artış saptandı ($p = 0.020$). Kontrol grubu ile MTX + Kuersetin grubu karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunmadı ($p = 0.05$) (Tablo12).

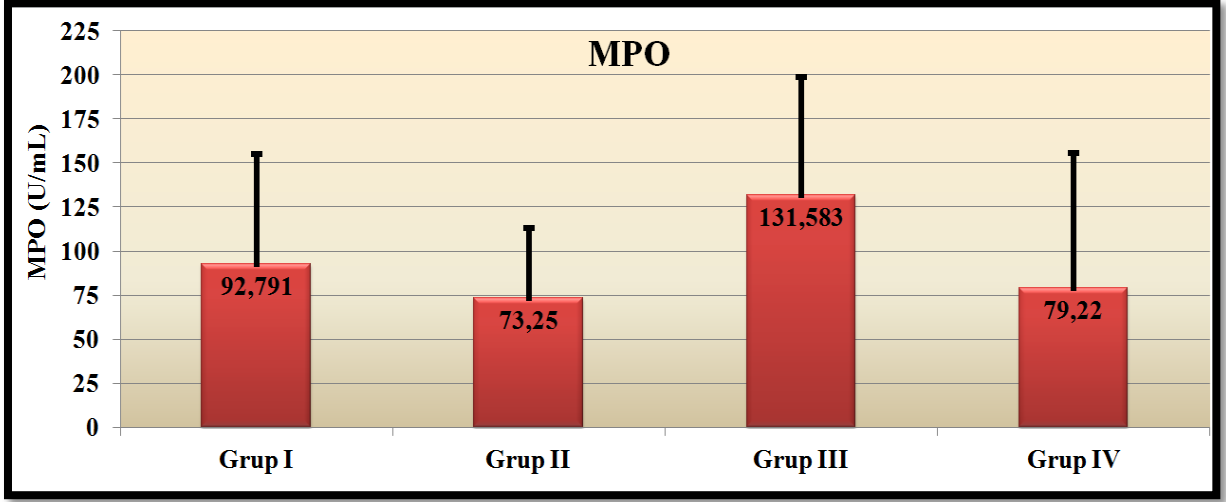


Grafik 5: Grupların serum MDA düzeyleri (Ort \pm SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin)

4. 3. 3. Serum MPO düzeyleri

Grupların serum MPO değerleri Tablo 9’da ve istatistiksel anlamlılık düzeyleri Tablo 12’de dağılımları Grafik 6’da gösterilmiştir.

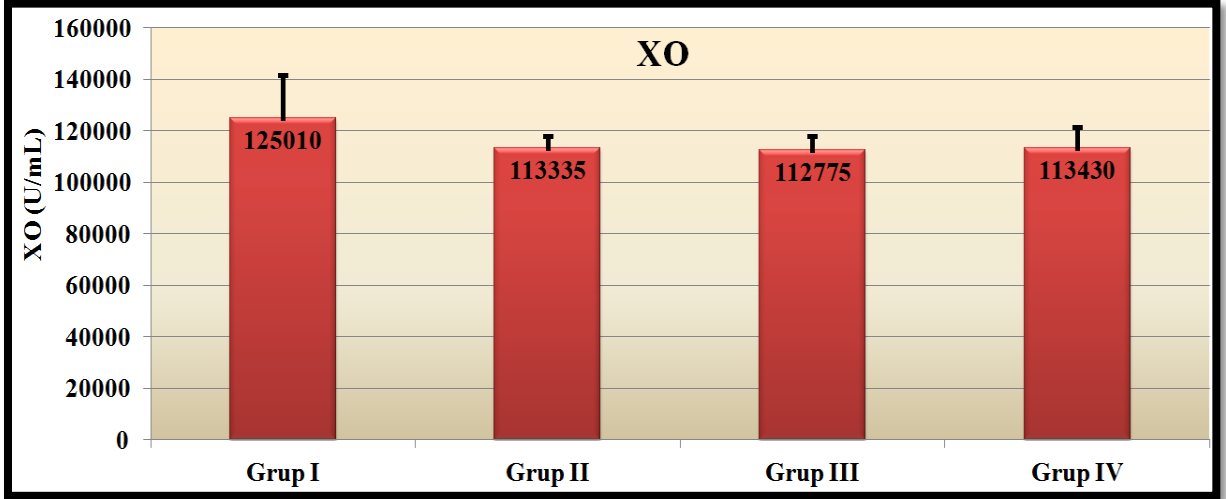
Serum MPO değerleri yönüyle gruplar değerlendirildiğinde en yüksek MPO düzeyine MTX + Kuersetin grubunda saptandı. Kuersetin grubunda ise MPO düzeyi en düşük değerde saptandı. Kontrol grubu serum MPO değerleri, MTX grubundan daha yüksek olarak bulundu. Gruplar serum MPO açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 12).



Grafik 6: Grupların serum MPO düzeyleri (Ort ± SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

4. 3. 4. Serum XO düzeyleri

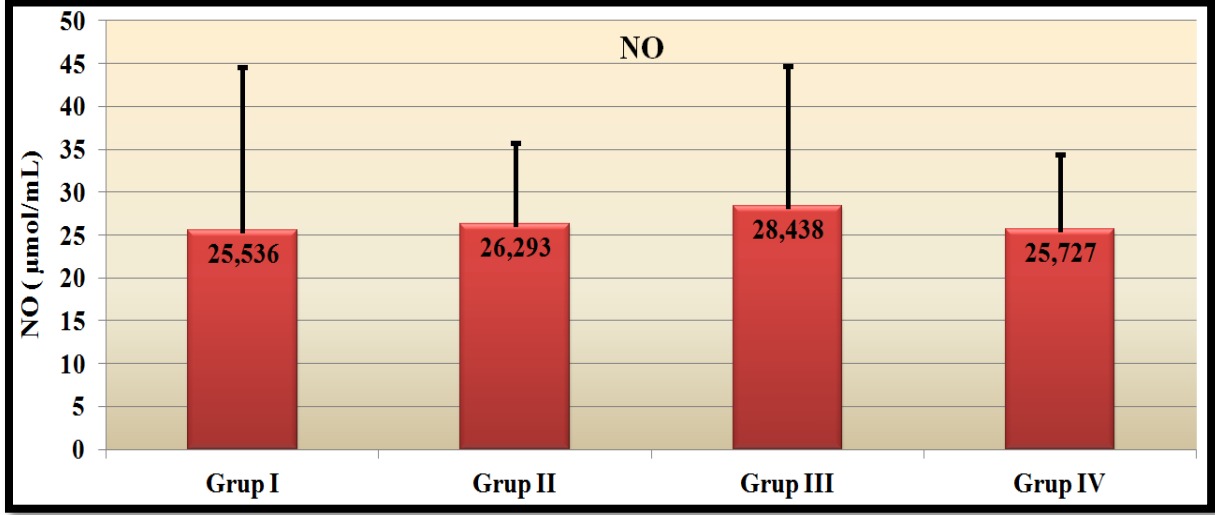
Kontrol grubu, MTX grubu, MTX + Kuersetin grubu ve Kuersetin grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu serum NO düzeyleri arasında istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 12).



Grafik 7: Grupların serum XO düzeyleri (Ort ± SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

4. 3. 5. Serum NO düzeyleri

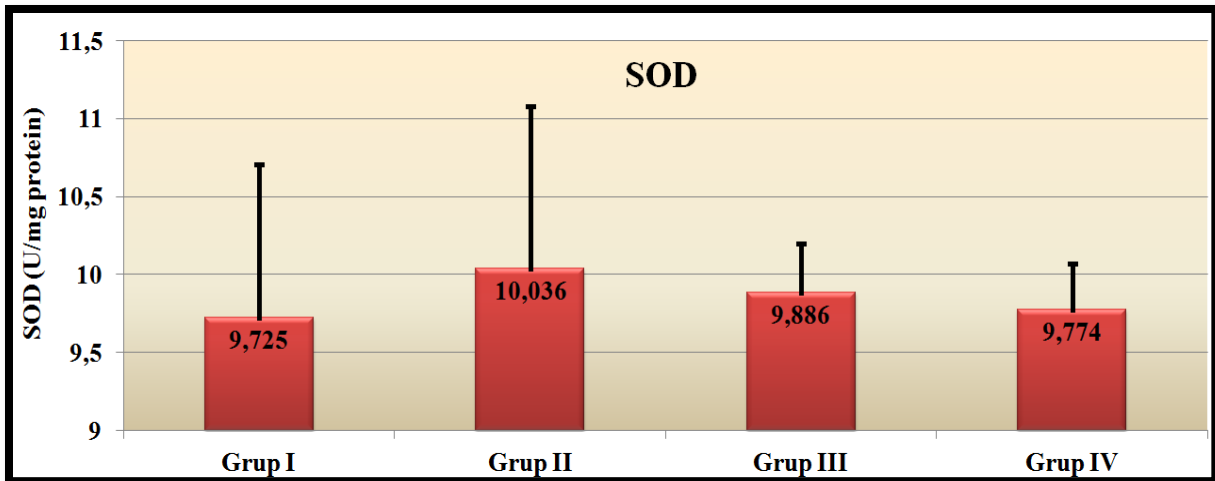
Kontrol grubu, MTX grubu, MTX + Kuersetin grubu ve Kuersetin grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu serum NO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 12).



Grafik 8: Grupların serum NO düzeyleri (Ort ± SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

4. 3. 6. Doku SOD düzeyleri

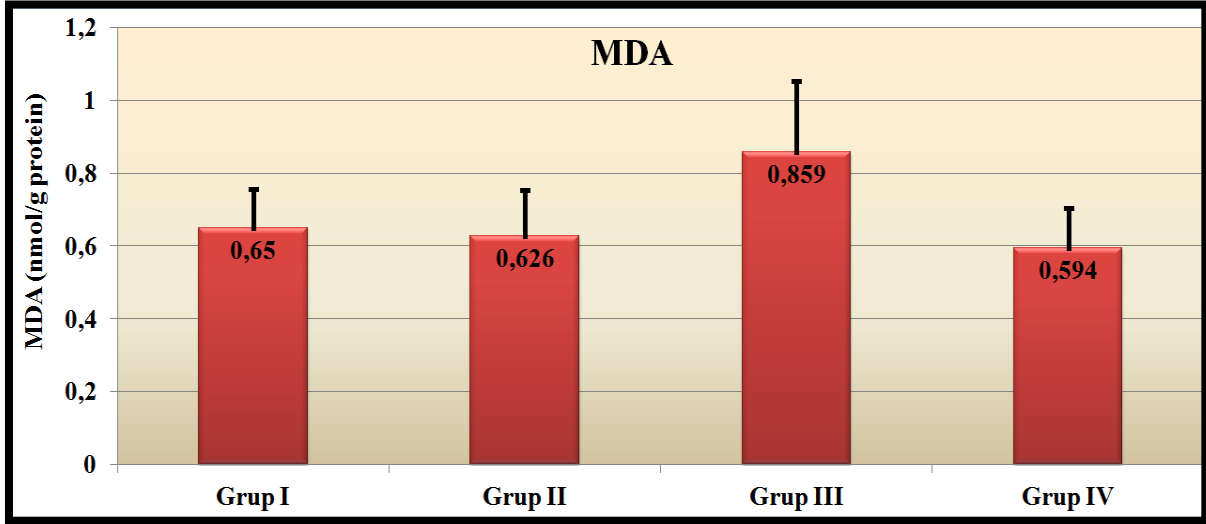
Kontrol grubu, MTX grubu, MTX + Kuersetin grubu ve Kuersetin grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu doku SOD düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 12).



Grafik 9: Grupların doku SOD düzeyleri (Ort ± SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

4. 3. 7. Doku MDA düzeyleri

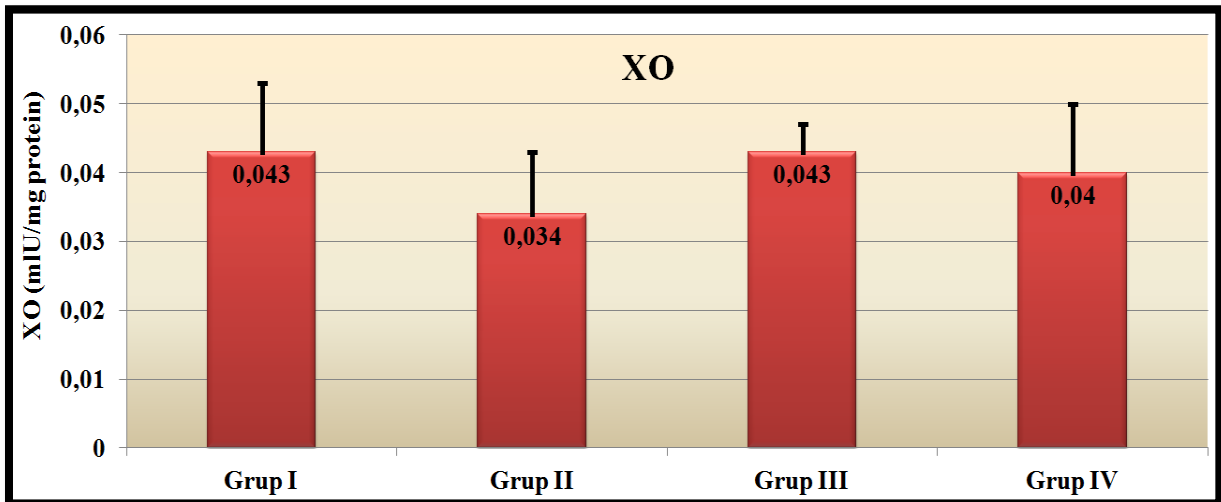
MTX + Kuersetin grubunda MDA düzeyleri diğer gruplara göre artmış bulundu. Kontrol grubu, MTX grubu, MTX + Kuersetin grubu ve Kuersetin grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 12).



Grafik 10: Grupların doku MDA düzeyleri (Ort \pm SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin)

4. 3. 8. Doku XO düzeyleri

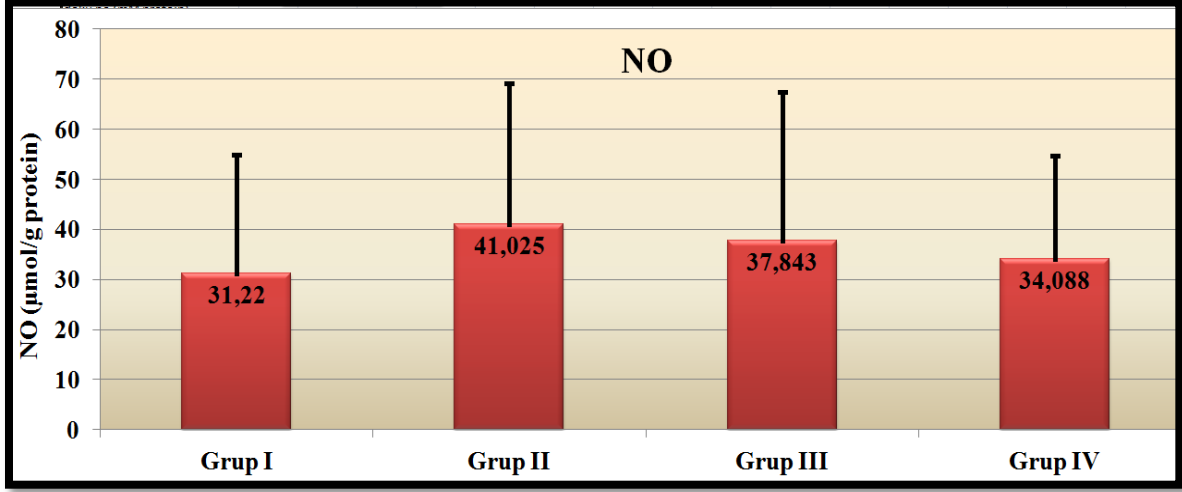
Kontrol grubu, MTX grubu, MTX + Kuersetin grubu ve Kuersetin grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu doku XO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo12).



Grafik 11: Grupların doku XO düzeyleri (Ort \pm SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

4. 3. 9. Doku NO düzeyleri

Kontrol grubu, MTX grubu, MTX + Kuersetin grubu ve Kuersetin grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucu doku NO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 12).



Grafik 12: Grupların doku NO düzeyleri (Ort ± SS). (Grup I: Kontrol, Grup II: MTX, Grup III: MTX + Kuersetin, Grup IV: Kuersetin).

5. TARTIŞMA

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser, kalp-damar hastalıklarından sonra ölümcül hastalıklar listesinde ikinci sırada yer almaktadır. Kanserlerin tedavisi tam olarak bilinmese de kanserin tip ve evresine göre farklı kemoterapötik ajanlar denenmektedir. Antikanser ilaçların çoğu sitotoksik etkilerinden dolayı malign hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını önlerken diğer yandan, malign hücrelerle birlikte vücuttaki sağlıklı hücreleri de olumsuz etkilemektedir.

Metotreksat (MTX); antimetabolitler sınıfında yer alan bir folik asit antagonistidir ve halen en çok kullanılan kemoterapötik ajanlardan birisidir. Özellikle kan, lenf, meme ve uterus, baş ve boyun tümörleri gibi pek çok malign kanser türünde sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanında düşük dozda romatoid artrit ve psöriazis gibi kanser ile ilgili olmayan bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (30, 187).

MTX'in kısa ve uzun dönem kullanımlarına bağlı olarak pek çok yan etkileri hem klinik gözlemlerde hem de yapılmış deneysel çalışmalarda saptanmıştır. Bu yan etkiler; mukozit, gastrointestinal ülserler, kemik iliği süpresyonu, pulmoner fibrozis, hepatotoksisite, nefrotoksisite, saç dökülmesi, öksürük, mide bulantısı, kusma ve ishal olarak sıralanabilir (39, 50).

Metotreksat vücuttan böbrekler yoluyla atılmasından dolayı özellikle yüksek dozlarda ve uzun süreli kullanıldığında nefrotoksisiteye neden olmaktadır ve kemoterapötik amaçlı kullanımını kısıtlamaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda da metotreksat verildikten sonra böbrek tübüllerinde ve glomerüler alanda morfolojik değişimlerin olduğu gösterilmiştir (188).

Metotreksat kullanımından kaynaklanan nefrotoksisitenin nedenleri; MTX ve metaboliti olan 7 hidroksi MTX'in böbrek tübül hücreleri üzerine direk toksik etkisi, folik asit metabolizmasındaki inhibisyon etkisinden kaynaklanan DNA sentezi, ATP sentezi ve diğer metabolik olaylardaki inhibisyon etkisi olarak bilinmektedir (189).

Son dönemde yapılan bilimsel araştırmalarda kemoterapötik ilaçların organlar üzerindeki toksik etkilerinde, bu ajanların dokularda serbest radikal üretimini arttırarak oluşturdukları oksidatif hasarın büyük rolü olduğu anlaşılmıştır. Metotreksat nefrotoksisitesinde de oksidatif hasarın rolü olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (54, 60, 61, 65).

Serbest radikaller hücre metabolizmasında birçok reaksiyonu etkilediklerinden DNA hasarına ve neticede de apoptoz veya nekrozla hücre ölümüne yol açarlar (190). Metotreksat, DHFR'ı inhibe ederek timidilat sentezini dolaylı olarak da DNA sentezini baskılar. Metotreksatın oksidatif strese yol açmasında, nikotinamid adenosin difosfat dehidrojenaz ve malik enzimlerini inhibe ederek hücrede NADPH'ın azalması ve hücrede serbest oksijen radikallerine karşı savunmada en önemli antioksidan mekanizma olan GSH'nın azalmasının önemli rolü vardır. GSH azalması sonucu hücreler oksidan maddelere karşı daha duyarlı hale gelir. Sonuç olarak hücrelerin antioksidan savunma mekanizması oksidatif hasarı engellemeye yetmez ve hücre oksidatif strese maruz kalır (8, 65, 191).

Kuersetin flavonoidlerin flavonol grubunda yer alan ve antioksidan özelliğiyle ön plana çıkan bir bitki pigmentidir. Kuersetin elma, soğan, baklagiller, domates, turunçgiller, çay ve üzüm gibi bitkisel gıdalarda bol miktarda bulunan bileşiklerdir. Kuersetin gibi flavonoidler patolojik durumlarda hücrede fazla miktarda oluşan serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler (98, 99, 118). Flavonoidlerin antioksidan etkileri dışında farklı klinik etkileri de bulunmaktadır. Bunlar; antiaterosklerotik etki, antiinflamatuvar etki, antitümöral etki, antitrombojenik etki, antiosteoporotik etki, antiviral etki, antialerjik etkilerdir (82, 112, 122, 192, 193).

Kuersetin serbest radikallere bağlı hasardan korunmayı çeşitli yollarla yapar. Bu yollardan en önemlisi serbest radikallerle reaksiyona girerek direkt temizleme özelliğidir. Kuersetin; hidroksil (OH[•]) ve süperoksit radikalini nötrale eder ve lipid peroksil radikalini de parçalayarak lipid peroksidasyonunu sonlandırır (119-121). Ayrıca Fe⁺² ve Cu⁺² gibi geçiş

metallerini şelatlama özelliğiyle, bu iyonların H₂O₂'den OH⁻ radikali oluşturmasını engellerek lipid peroksidasyonunu önler (122). Çalışmalarda da flavonoidlerin lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeylerini anlamlı oranda düşürdükleri gösterilmiştir (194, 195).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan antineoplastik ajanların etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak amacıyla yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir. Dokuları metotreksat gibi sitotoksik ajanların verdiği harabiyetten korumak amacıyla birçok çalışmada nikotinamid, melatonin, metiyonin, E vitamini ve N-asetilsistein, CAPE gibi antioksidan ajanlar denenmiştir (54, 57, 62, 196).

Literatürde MTX'in böbrek dışında diğer organlarda da oksidatif hasara sebep olduğu gösterilmiştir. Bunlar karaciğer (57-59), omurilik (70), ince barsak (67-69), kalp (65, 66) ve testis (64) olup; bütün çalışmalarda metotreksatın oksidatif hasar oluşturduğu ve doku oksidatif stres parametrelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda metotreksatın böbrekte lipid peroksidasyonuna neden olarak MDA düzeyini arttırdığı da belirlenmiştir (62, 197).

Apoptoz vücudumuzda fizyolojik veya patolojik nedenlerle meydana gelen hücre ölümüdür. Apoptozun hücrede belirli bir dengede bulunması gerekir. Gereğinden fazla artması ya da azalması patolojik bir durumu ifade eder. Hücre içi ve hücre dışı kökenli birçok nedenden dolayı hücre apoptoza gider. Hücre dışından kaynaklanan nedenler arasında antikanser ilaçlar yer almaktadırlar. Antikanser ilaçların çalışmalarda apoptotik hücre ölümünü arttırdıkları görülmüştür. (198). Kaspazlar apoptozu kontrol eden ve apoptozun başlamasında kritik bir rol oynayan proteazlardır (199). Bugüne kadar 14 farklı türü tanımlanmıştır. Özellikle kaspaz-3 apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik yolağında aktive olan bir proteazdır ve apoptozda geri dönüşümsüz noktanın en önemli göstergesidir (200). Çalışmalarda metotreksatın da organ hasarı ve oksidatif strese bağlı olarak böbrek ve diğer organlarda apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (7, 201). Yapılan araştırmalarda bir

antioksidan olan kuersetinin de apoptozu azaltıcı yönde etkisinin olduğu belirlenmiştir (107-109).

Kuersetin, bugüne kadar iskemi/reperfüzyon hasarları ve kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların toksik etkileri gibi deneysel çalışmalarda oksidatif strese bağlı hücre hasarının tedavisindeki etkinliğinin araştırılması amacıyla birçok kez kullanılmıştır.

Bu çalışmada metotreksatın kullanımından kaynaklanan nefrotoksisitedeki etkinliğinin; hem histopatolojik açıdan, hem de biyokimyasal parametreler açısından araştırılması çalışmanın özgün yönüdür. Bu amaçla ilgili rat gruplarına metotreksat ve/veya kuersetin verildikten sonra onuncu gün ratlar sakrifiye edildi ve böbrek dokuları ve kanları alınarak; SOD, MDA, XO, NO ve MPO gibi oksidatif hasar ile direkt ya da indirekt olarak ilgili olan enzim ve diğer parametreler çalışılarak kuersetinin koruyucu etkisi araştırıldı.

Yapılan biyokimyasal çalışmalar sonucunda metotreksat verilen ratların serum örneklerinde SOD ve MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü. Bir antioksidan enzim olan SOD miktarındaki artış metotreksatın neden olduğu oksidatif hasardan kaynaklanan rölatif artış olarak değerlendirildi. MDA düzeyindeki artış oksidatif hasarın göstergesi olarak kabul edildi. Metotreksat grubunda böbrek dokularındaki SOD düzeylerinde azalma ve böbrek dokusu MDA düzeyinde hafif artma gözlemlendi. Serum SOD ve MDA düzeylerinin metotreksatla birlikte kuersetin verilen grupta ve Kuersetin grubunda Metotreksat grubuna göre daha az olduğu görüldü. Bununla birlikte MTX'in doku NO düzeyini arttırdığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Özellikle iskemik durumlarda artan ve oksidatif bir enzim olarak bilinen XO düzeylerinde de MTX verildikten sonra böbrek dokusunda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Bunu serumdaki XO aktiviteleri de doğrulamaktadır. Oksidatif stres ile ilgili çalıştığımız biyokimyasal parametreler MTX verilen ratların serum örnekleri ve böbrek dokularında biyokimyasal parametreler açısından hafif oranda oksidatif hasarın etkisini göstermektedir.

Doku düzeyinde yaptığımız histopatolojik incelemelerde H-E ve PAS boyamalar değerlendirildiğinde MTX grubunda böbrek hasarını gösteren parametrelerin hepsinde artış görüldü. Metotreksat grubunda tübüler bölgede atrofi-nekroz, belirgin şekilde vakuoler dejenerasyon ve proksimal tübül epitelinde mikrovillus kaybı görüldü. Tübüler hasar bulguları distal tübüllerde proksimal tübüllere göre daha fazla izlendi. Glomerüler alanda Bowman mesafesinde daralma ve nadir alanda glomerüler fibrozis görüldü. Vasküler konjesyon belirgindi. Bu bulgular diğer gruplarla kıyaslandığında hasar bulgularının Metotreksat grubunda anlamlı oranda artmış olduğu görüldü ($p<0.05$). Kontrol grubu, Kuersetin grubu ve MTX + Kuersetin grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

MTX ve kuersetinin böbrek dokusunda yaptığı apoptotik değişiklikleri incelemek amacıyla yapılan TUNEL ve immünohistokimyasal olarak kaspaz-3 boyama sonucunda MTX grubunda diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha yoğun olarak distal tübül ve toplama kanallarında TUNEL (+) ve kaspaz-3 (+) hücre sayısında artış görüldü. Bu artışın tedaviye kuersetin eklenmesiyle anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0.004$). Kontrol grubu ve kuersetin grubunda az miktarda TUNEL (+) hücreye rastlandı. Kaspaz-3 ekspresyonları da Kontrol grubu, Metotreksat + Kuersetin grubu ve Kuersetin grubunda Metotreksat grubuna göre daha az oranda izlendi.

Sonuç olarak; Metotreksatın böbrekte histolojik ve biyokimyasal olarak hasar oluşturduğu; bu hasarların bir kısmının kuersetin verilmesiyle düzelme gösterebileceği gözlenmiştir. Böbrekte neden olduğu değişiklikler üzerine kuersetinin etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için farklı süre ve dozların kullanıldığı ve farklı parametrelerin değerlendirildiği araştırmaların yapılması faydalı olacaktır.

6. ÖZET

Metotreksat (MTX), folat antagonisti olan antineoplastik bir ilaçtır. Yapılan çalışmalarda MTX'a bağlı nefrotoksisite bildirilmiştir. Bilimsel kanıtlarla bir flavonoid türü olan kuersetin; antioksidan, antiproliferatif, antialerjik ve antiinflamatuvar etkilere sahiptir. Bu bilgilere dayanarak kuersetin, MTX'a bağlı oluşan böbrek hasarını önlemede alternatif bir profilaktik ajan olabilir.

Çalışmamızda 24 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Her bir grupta 6 adet rat olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Gruplar; Kontrol (SF; 0.5 cc/i.p. 9 gün), Metotreksat (3. Gün tek doz 20 mg/kg, i.p.; 8 gün SF 0.5 cc/i.p.), Metotreksat (3. günde tek doz, 20 mg/kg, i.p.) + Kuersetin (50 mg/kg oral, 8 gün) ve Kuersetin (50 mg/kg oral, 9 gün) olacak şekilde planlandı. Deneysel çalışma sonunda böbrek dokusunda histopatolojik incelemeler yapıldı. Serum örneklerinde MDA, SOD, XO, NO, MPO ve böbrek dokusunda SOD, MDA, XO, NO gibi biyokimyasal parametreler çalışıldı.

Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda serumda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyelerinde, MTX kullanılan ratlarda, kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın gözleendiği ve bu artışın kuersetin kullanımı ile azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$). Antioksidan enzim olan SOD seviyeleri, MTX kullanımına bağlı anlamlı olarak azalırken, kuersetin kullanımı bu enzim düzeylerini arttırmıştır ($p < 0.05$).

Biyokimyasal bulgulara paralel olarak, MTX grubuna ait böbrek dokularının histolojik incelemelerinde oksidatif hasarın göstergesi olabilecek bulgular gözleendi. MTX ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, MTX grubunda nefrotoksik bulgularda ve apoptotik hücre ölümünde kontrol grubuna göre anlamlı artış görülürken ($p < 0.05$); MTX ile birlikte kuersetin verilmiş gruptaki histopatolojik hasar bulgularında ve apoptotik hücre sayısında anlamlı ölçüde azalma izlenmiştir ($p < 0.05$).

Sonuç olarak, MTX'in rat böbrek dokusu üzerine olan toksik etkilerine kuersetinin literatüre uygun dozunda yararlı olabileceği sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, Kuersetin, Oksidatif doku hasarı, Antioksidan, Nefrotoksisite

7. SUMMARY

Methotrexate, a folat antagonist, is an antineoplastic drug. Methotrexate-induced nephrotoxicity has been reported in previous studies. Scientific evidence achieved from previous studies suggests that Quercetin which is a type of flavonoid has antioxidant, antiproliferative, anti-allergy and anti-inflammatory effects. Based on that information Quercetin could be an alternative prophylactic agent against methotrexate-induced renal toxicity.

A total of twenty-four male Sprague Dawley rats were included in this study. Animals were equally divided into four groups as follows: Control group (0.5 cc of saline i.p.), MTX group (20 mg/kg, i.p, 3rd day single dose and 0.5 cc/i.p. saline for 8 days), MTX (20 mg/kg, i.p, 3rd day single dose) and Quercetin (50 mg/kg, oral for 8 days) group and Quercetin group (50 mg/kg oral for 9 days). At the end of this experimental study, kidney tissues and blood samples were collected for histopathological and biochemical analysis.

According to the biochemical findings, a lipid peroxidation marker, MDA levels were significantly increased in MTX treated group to control and by the use of Quercetin this increase was found reduced. Antioxidant enzyme SOD levels were significantly decreased with MTX and increased with Quercetin.

Parallel to biochemical findings, in histological examinations of kidney tissues, there were evidences as the indicator of oxidative damage. MTX compared with the control group, there was significant increase ($p < 0.05$) in nephrotoxic findings and apoptotic cell death in the

MTX group compared with control group together with MTX given quercetin group showed significantly lower histopathological findings of damage and apoptotic cell death.

As a result, quercetin may be useful in accordance dose with the literature the toxic effects of MTX on rat kidney tissue.

Keywords: Methotrexate, Quercetin, Oxidative tissue damage, Antioxidant, Nephrotoxicity

8. KAYNAKLAR

1. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji: Medipress yayıncılık; 2009.
2. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R, editor: Palme yayıncılık; 2006.
3. Braun J, Rau R. An update on methotrexate. *Current opinion in rheumatology*. 2009;21(3):216-23.
4. Yüncü M, Kanter M. Farelerde Metotreksatın İnce Barsak Mukozasında Yaptığı Hasara Karşı E vitaminiin Koruyucu Etkisi: Elektron Mikroskopik Çalışma. *Tıp Araştırmaları Dergisi*. 2006;4(2):1-6.
5. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med*. 1983;309:1094–104.
6. Olson J. Klinik Farmakoloji. 1.baskı ed. Ankara: Hacettepe Taş Yayıncılık; 2000.
7. Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2004;39(11):1119-27.
8. Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell biochemistry and function*. 1998;16(4):283-93.
9. Kayaalp O. Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 13. Baskı ed. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2012.
10. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2002;13(10):572-84.
11. Inal ME, Akgun A, Kahraman A. Radioprotective effects of exogenous glutathione against whole-body gamma-ray irradiation: age- and gender-related changes in malondialdehyde levels, superoxide dismutase and catalase activities in rat liver. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2002;24(4):209-12.
12. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochemical pharmacology*. 1991;42(9):1673-81.
13. Abdel-Raheem IT, Abdel-Ghany AA, Mohamed GA. Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2009;32(1):61-7.
14. Moore KL, Dalley AF. Kliniğe yönelik anatomi. 4. Baskı ed. Şahinoğlu PDK, editor: Nobel Tıp Kitabevi; 1999.
15. Yıldırım M. İnsan Anatomisi. 5. Baskı ed: Nobel Tıp Kitabevi; 2000.
16. Ozan H. Ozan Anatomisi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi; 2004.
17. <http://www.mezatforum.com/forum/showthread.php?7664-Omurgal%FDIarda-bo%FEalt%FDm>.
18. Gray H, Carter HV. Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice. 40. Baskı ed2008.
19. 20anatomy.htm hlokeganNu.
20. http://www.mwap.co.uk/quick_renal_notes.html.
21. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji (Basic Histology). Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu, Prof. Dr. Yener Aytakin, editors: Nobel Kitabevi; 2009.
22. <http://embryology.med.unsw.edu.au/Notes/urogen7.htm>.
23. <http://www.markedbyteachers.com/university-degree/biological-sciences/the-functional-part-of-the-kidney-are-called-the-nephrons-in-each-of-the-kidney-there-are-about-1-million-functional-nephrons-they-control-the-molecules-that-passes-through-the-kidney-and-also-filter.html>.
24. http://www.tumblr.com/tagged/glomerulus?language=tr_TR.
25. Guyton AC, Hall JE. Guyton & Hall Tıbbi Fizyoloji. 11. Basım ed. Çavuşoğlu H., Ç. YB, editors. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007.
26. Barret KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi. 23. Baskı ed. Gökbel H, editor. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2011.
27. <http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcapan/anat2/notes/Notes3%20urinary%20system>.
28. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11. Baskı ed. Ankara: Hacettepe-Taş Yayıncılık; 2005.
29. Page CP, Curtis MJ, Sutter MJ, Walker MJ, Hoffman BB. *Integrated Pharmacology*. Barcelona, Spain1997.
30. Şendur N, Karaman G, Şavk H, Şahinkarakaş E. Akut Metotreksat Toksisitesinin Erken Belirtisi; Deri Ülserleri. *T Klin Tıp Bilim*. 2002;22:593-6.
31. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. Anti Metabolitler. In: K B, editor.1997.
32. Mycek MJ, Champe PC, Harvey RA. Lippincott's Illustrated Review Serisinden: Farmakoloji. 2. Baskı ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1997.
33. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1998;27(5):277-92.

34. Waltham MC, Holland JW, Robinson SC, Winzor DJ, Nixon PF. Direct experimental evidence for competitive inhibition of dihydrofolate reductase by methotrexate. *Biochemical pharmacology*. 1988;37(3):535-9.
35. Madhyastha S, Somayaji SN, Rao MS, Nalini K, Bairy KL. Hippocampal brain amines in methotrexate-induced learning and memory deficit. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2002;80(11):1076-84.
36. Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji* 1994. 1035-7 p.
37. Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M, Pasvogel A, Hutter J, Krull K, et al. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biological research for nursing*. 2005;6(3):187-95.
38. Olsen EA. The pharmacology of methotrexate. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1991;25(2 Pt 1):306-18.
39. Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology*. 9. Edition ed. Singapore: The McGraw-Hill Companies; 2004.
40. Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkiewicz IM, Shear NH. Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatocytotoxicity. *Clinical biochemistry*. 1999;32(7):519-36.
41. Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R, et al. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Medicinal research reviews*. 2001;21(2):105-28. Epub 2001/02/27.
42. Winn HR, Rubio R, Berne RM. Brain adenosine production in the rat during 60 seconds of ischemia. *Circulation research*. 1979;45(4):486-92. Epub 1979/10/01.
43. Baggott JE, Morgan SL, Ha TS, Alarcon GS, Koopman WJ, Krumdieck CL. Antifolates in rheumatoid arthritis: a hypothetical mechanism of action. *Clinical and experimental rheumatology*. 1993;11 Suppl 8:S101-5. Epub 1993/03/01.
44. Chladek J, Martinkova J, Sispera 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.
45. Nuernberg B, Koehnke R, Solsky M, Hoffman J, Furst DE. Biliary elimination of low-dose methotrexate in humans. *Arthritis and rheumatism*. 1990;33(6):898-902. Epub 1990/06/01.
46. Masuda M, Iizuka Y, Yamazaki M, Nishigaki R, Kato Y, Ni'inuma K, 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.
47. *Cancer Chemotherapy*. In: BG K, editor. *Basic&Clinical Pharmacology*. 6. Edition ed. East Norwalk: Appleton& Lange; 1995. p. 832-3.
48. 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.
49. Cronstein BN. *Molecular therapeutics. Methotrexate and its mechanism of action*. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(12):1951-60. Epub 1996/12/01.
50. Kane D, Gogarty M, O'Leary J, Silva I, Bermingham N, Bresnihan B, et al. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(10):3286-95. Epub 2004/10/12.
51. Quemeneur L, Gerland LM, Flacher M, Ffrench M, Revillard JP, Genestier L. Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J Immunol*. 2003;170(10):4986-95. Epub 2003/05/08.
52. Kishi T, Tanaka Y, Ueda K. Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy. *Cancer*. 2000;89(4):925-31. Epub 2000/08/22.
53. Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis and rheumatism*. 1986;29(7):832-5. Epub 1986/07/01.
54. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *Journal of pineal research*. 2003;34(4):282-7. Epub 2003/03/29.
55. Linnebank M, Pels H, Kleczar N, Farmand S, Fliessbach K, Urbach H, et al. MTX-induced white matter changes are associated with polymorphisms of methionine metabolism. *Neurology*. 2005;64(5):912-3. Epub 2005/03/09.
56. Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M, Pasvogel A, Hutter J, Krull K, et al. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biological research for nursing*. 2005;6(3):187-95. Epub 2004/12/08.
57. Cakir T, Ozkan E, Dulundu E, Topaloglu U, Sehirli AO, Ercan F, et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2011;63(12):1566-71. Epub 2011/11/09.
58. Tunali-Akbay T, Sehirli O, Ercan F, Sener G. Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for*

- Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques. 2010;13(2):303-10. Epub 2010/09/08.
59. Tabassum H, Parvez S, Pasha ST, Banerjee BD, Raisuddin S. Protective effect of lipoic acid against methotrexate-induced oxidative stress in liver mitochondria. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2010;48(7):1973-9. Epub 2010/05/11.
60. Uz E, Oktem F, Yilmaz HR, Uzar E, Ozguner F. The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Molecular and cellular biochemistry*. 2005;277(1-2):165-70. Epub 2005/09/01.
61. Devrim E, Cetin R, Kilicoglu B, Erguder BI, Avci A, Durak I. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Renal failure*. 2005;27(6):771-3. Epub 2005/12/15.
62. Oktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzare E, et al. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology and industrial health*. 2006;22(6):241-7. Epub 2006/08/24.
63. Abraham P, Kolli VK, Rabi S. Melatonin attenuates methotrexate-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Cell biochemistry and function*. 2010;28(5):426-33. Epub 2010/07/01.
64. Oktar S, Gokce A, Aydin M, Davarci M, Meydan S, Ozturk OH, et al. Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. *Toxicology and industrial health*. 2010;26(7):433-8. Epub 2010/05/28.
65. Jahovic N, Sener G, Cevik H, Ersoy Y, Arbak S, Yegen BC. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell biochemistry and function*. 2004;22(3):169-78. Epub 2004/05/05.
66. Singh K, Malviya A, Bhorji M, Marar T. An in vitro study of the ameliorative role of alpha-tocopherol on methotrexate-induced oxidative stress in rat heart mitochondria. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 2012;23(4):163-8. Epub 2012/10/18.
67. Kesik V, Uysal B, Kurt B, Kismet E, Koseoglu V. Ozone ameliorates methotrexate-induced intestinal injury in rats. *Cancer biology & therapy*. 2009;8(17):1623-8. Epub 2009/07/21.
68. Dadhania VP, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Intervention of alpha-lipoic acid ameliorates methotrexate-induced oxidative stress and genotoxicity: A study in rat intestine. *Chemico-biological interactions*. 2010;183(1):85-97. Epub 2009/11/11.
69. Somi MH, Hajipour B, Abad GD, Hemmati MR, Ghabili K, Khodadadi A, et al. Protective role of lipoic acid on methotrexate induced intestinal damage in rabbit model. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*. 2011;30(1):38-40. Epub 2011/03/23.
70. Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, Bas O, Kilbas S, et al. The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology*. 2006;218(2-3):125-33. Epub 2005/12/06.
71. Hempel L, Misselwitz J, Fleck C, Kentouche K, Leder C, Appenroth D, et al. Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. *Medical and pediatric oncology*. 2003;40(6):348-54. Epub 2003/04/15.
72. Kovacs GT, Paal C, Somlo P, Koos R, Schuler D, Borsi JD. Proteinuria due to suboptimal hydration with high-dose methotrexate therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1993;33(3):262-3. Epub 1993/01/01.
73. Bannwarth B, Pehourcq F, Schaeverbeke T, Dehais J. Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clinical pharmacokinetics*. 1996;30(3):194-210. Epub 1996/03/01.
74. Iqbal MP, Sultana F, Mehboobali N, Pervez S. Folinic acid protects against suppression of growth by methotrexate in mice. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2001;22(4):169-78. Epub 2001/12/18.
75. Schiff MH, Whelton A. Renal toxicity associated with disease-modifying antirheumatic drugs used for the treatment of rheumatoid arthritis. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2000;30(3):196-208. Epub 2000/12/22.
76. Yüce A, Aksakal M. Ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine melatoninin etkisi. *FÜ Sağlık Bil Dergisi*. 2006;20(1):51-9.
77. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. 1997;3(4):92-5.
78. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(17):7915-22. Epub 1993/09/01.
79. Arisi AC, Simizu K, Kogake M, Bainy AC, Silva MA, Barros SB, et al. Brain and liver lipid peroxidation levels following acute and short-term lindane administration in the rat. *Toxicology letters*. 1994;74(1):61-8. Epub 1994/10/01.
80. Shibamoto T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2006;41(1):12-25. Epub 2006/02/25.

81. Çakar H. Etanolün oluşturduğu karaciğer hasarı üzerine quercetin'in etkisi. Afyonkarahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2005.
82. Kahraman A. Ultraviole A (UVA) Işığının Oluşturduğu Oksidatif Stres Üzerindeki Quercetin'in rolü 1998.
83. Kandaswami C, Middleton E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. D A, editor. New York: Plenum Press; 1994.
84. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. *Annals of internal medicine*. 1987;107(4):526-45. Epub 1987/10/01.
85. Jialal I, Grundy SM. Effect of combined supplementation with alpha-tocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation. *Circulation*. 1993;88(6):2780-6. Epub 1993/12/01.
86. Steinberg FM, Chait A. Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. *The American journal of clinical nutrition*. 1998;68(2):319-27. Epub 1998/08/13.
87. Rao AV, Agarwal S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000;19(5):563-9. Epub 2000/10/07.
88. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*. 2000;108(8):652-9. Epub 2000/06/17.
89. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*. 2001;54(3):176-86. Epub 2001/03/17.
90. Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2002;53(4 Pt 1):515-24. Epub 2003/01/07.
91. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-6. Epub 1988/06/16.
92. Marin J, Rodriguez-Martinez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacology & therapeutics*. 1997;75(2):111-34. Epub 1997/08/01.
93. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, EM G. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Pediatr*. 2001;10(4):226-35.
94. Arnold J. Properties, function and secretion of human myeloperoksidase. Germany: Universität Leipzig; 2003.
95. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*. 2004;266(1-2):37-56. Epub 2005/01/14.
96. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free radical biology & medicine*. 2002;33(6):774-97. Epub 2002/09/05.
97. Irmak MK, Koltuksuz U, Kutlu NO, Yagmurca M, Ozyurt H, Karaman A, et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with alpha-tocopherol in rat kidneys. *Urological research*. 2001;29(3):190-3. Epub 2001/08/03.
98. Pikulski M, Brodbelt JS. Differentiation of Flavonoid Glycoside Isomers by Using Metal Complexation and Electrospray Ionization Mass Spectrometry 2003.
99. Cook NC, Saman S. Flavonoids - Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. *J Nutr Biochem*. 1996;7:66-76.
100. Miura S, Watanabe J, Sano M, Tomita T, Osawa T, Hara Y, et al. Effects of various natural antioxidants on the Cu(2+)-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 1995;18(1):1-4. Epub 1995/01/01.
101. Yamada J, Tomita Y. Antimutagenic Activity of Water Extracts of Black Tea and Oolong Tea. *Biosci Biotech Biochem*. 1994;58:2197-200.
102. Shivji GM, Zielinska E, Kondo S, Mukhtar H, Sander DN. *J Invest Dermatol*. 1996;787(106).
103. Han C. Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols. *Cancer letters*. 1997;114(1-2):153-8. Epub 1997/03/19.
104. Santos KF, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Oliveira MG. Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 1999;40(6):493-6. Epub 2000/02/08.
105. Hamilton-Miller JM. Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(11):2375-7. Epub 1995/11/01.
106. Matsuo N, Yamada K, Yamashita K, Shoji K, Mori M, Sugano M. Inhibitory effect of tea polyphenols on histamine and leukotriene B4 release from rat peritoneal exudate cells. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 1996;32(6):340-4. Epub 1996/06/01.
107. Ishikawa Y, Kitamura M. Bioflavonoid quercetin inhibits mitosis and apoptosis of glomerular cells in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;279(2):629-34. Epub 2000/12/19.

108. Liu CM, Zheng YL, Lu J, Zhang ZF, Fan SH, Wu DM, et al. Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2010;29(2):158-66. Epub 2010/03/01.
109. Lugli E, Ferraresi R, Roat E, Troiano L, Pinti M, Nasi M, et al. Quercetin inhibits lymphocyte activation and proliferation without inducing apoptosis in peripheral mononuclear cells. *Leukemia research*. 2009;33(1):140-50. Epub 2008/09/09.
110. Ergüzel ET. Quercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon)'in bakır (II) ve çinko (II) komplekslerin kararlılık sabitlerinin tayini. [Yüksek lisans tezi.]: Marmara Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü; 2006.
111. Chirumbolo S. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflammation & allergy drug targets*. 2010;9(4):263-85. Epub 2010/10/05.
112. Kahraman A, Serteser M, Köken T. Flavonoidler. *KocatepeTıp Dergisi*. 2002;3:1-8.
113. Karadag R. The determination of stability constants of luteolin (3'4',5,7-tetrahydroxyflavone) aluminium (III) and iron (III) complexes by potentiometric and spectrophotometric methods. *Chem Analysis*. 2003;48(6):931-7.
114. Chow JM, Shen SC, Huan SK, Lin HY, Chen YC. Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H2O2-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochemical pharmacology*. 2005;69(12):1839-51. Epub 2005/05/07.
115. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*. 2000;52(4):673-751. Epub 2000/12/21.
116. Lamson DW, Brignall MS. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2000;5(3):196-208. Epub 2000/06/27.
117. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1996;2(4):659-68. Epub 1996/04/01.
118. Casagrande R, Georgetti SR, Verri WA, Jr., Jabor JR, Santos AC, Fonseca MJ. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(1):E10. Epub 2006/04/06.
119. Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mechanisms of ageing and development*. 2004;125(4):315-24. Epub 2004/04/06.
120. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in enzymology*. 1990;186:343-55.
121. de Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental & clinical pharmacology*. 1998;12(3):249-55.
122. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1995;33(12):1061-80.
123. Booth AN, Deeds F, Jones FT, Murray CW. The metabolic fate of rutin and quercetin in the animal body. *The Journal of biological chemistry*. 1956;223(1):251-7. Epub 1956/11/01.
124. Price KR, Casascelli F, Colquhoun IJ, Rhodes MJ. Composition and content of flavonol glycosides in broccoli florets (*Brassica olearacea*) and their fate during cooking. *J Sci Food Agric*. 1998;77(4):468-72.
125. Price KR, Colquhoun IJ, Barnes KA, Rhodes MJ. Composition and Content of Flavonol Glycosides in Green Beans and Their Fate During Processing. *J Agric Food Chem*. 1998;46(12):4898-903.
126. Çimen MBY. Flavonoidler Ve Antioksidan Özellikleri. *T Klin Tıp Bilim*. 1999;19(5):296-304.
127. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;74(4):418-25. Epub 2001/09/22.
128. Gugler R, Leschik M, Dengler HJ. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *European journal of clinical pharmacology*. 1975;9(2-3):229-34. Epub 1975/12/19.
129. Murota K, Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2003;417(1):12-7. Epub 2003/08/19.
130. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in enzymology*. 1990;186:343-55. Epub 1990/01/01.
131. Arıcı M. Kas flepleri iskemi reperfüzyon hasarında quercetin'in etkileri: deneysel çalışma [Uzmanlık tezi]: Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi; 2006.

132. Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, et al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;69(1):87-94. Epub 1999/01/30.
133. Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, et al. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochemical pharmacology*. 1993;45(1):13-9. Epub 1993/01/07.
134. İkizler M, Erkasap N, Dernek S, Kural T, Kaygisiz Z. Dietary polyphenol quercetin protects rat hearts during reperfusion: enhanced antioxidant capacity with chronic treatment. *Anadolu kardiyoloji dergisi : AKD = the Anatolian journal of cardiology*. 2007;7(4):404-10. Epub 2007/12/11.
135. Şen S. Hücre zedelenmesi ders notları. Ege Ü Tıp Fak Patoloji AD
136. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2005;37(11):719-27. Epub 2005/11/05.
137. Mene P, Amore A. Apoptosis: potential role in renal diseases. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1998;13(8):1936-43. Epub 1998/08/27.
138. Ayaşlıoğlu E. Apoptoz. *T Klin Tıp Bilim*. 2001;21(1):57-62.
139. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine reviews*. 1993;14(2):133-51. Epub 1993/04/01.
140. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57. Epub 1972/08/01.
141. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96(2):245-54. Epub 1999/02/13.
142. Jefferson KP, Persad RA, Holly JM. Apoptosis and its relevance to urologists. *BJU international*. 2000;86(5):598-606. Epub 2000/09/06.
143. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *British medical bulletin*. 1997;53(3):451-65. Epub 1997/01/01.
144. Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*. 1995;136(6):2770-5. Epub 1995/06/01.
145. Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in cell biology*. 1995;5(1):21-6. Epub 1995/01/01.
146. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, et al. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol*. 1992;149(12):4029-35. Epub 1992/12/15.
147. Çalışkan M. Apoptosis: Programlanmış Hücre Ölümleri. *Türk J Zool*. 2000;24:31-5.
148. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516. Epub 2007/06/15.
149. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;108(4 Suppl):S99-103. Epub 2001/10/05.
150. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*. 1998;94(6):695-8. Epub 1998/09/30.
151. Bates S, Vousden KH. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 1999;55(1):28-37. Epub 1999/03/05.
152. Oren M, Rotter V. Introduction: p53--the first twenty years. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 1999;55(1):9-11. Epub 1999/03/05.
153. Ulukaya E. Hücre siklusu ve apoptozis. Engin K, Özyardımcı N, editors. Bursa: Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti.; 2001.
154. Kabsch K, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *Journal of virology*. 2002;76(23):12162-72. Epub 2002/11/05.
155. Padosch SA, Vogel P, Bottiger BW. [Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, physiopathology and treatment strategies]. *Der Anaesthesist*. 2001;50(12):905-20. Epub 2002/02/05. *Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie. Grundlagen, Pathophysiologie und Interventionsmöglichkeiten*.
156. Safi Z. İnsan papilloma virusun apoptozisle ilişkisi. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2005;3:1-6.
157. Shehata MF. Rel/Nuclear factor-kappa B apoptosis pathways in human cervical cancer cells. *Cancer cell international*. 2005;5(1):10. Epub 2005/04/29.
158. Cohen JJ. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1993;28(12):35-43. Epub 1993/12/15.
159. Matsushita K, Matsuyama T, Kitagawa K, Matsumoto M, Yanagihara T, Sugita M. Alterations of Bcl-2 family proteins precede cytoskeletal proteolysis in the penumbra, but not in infarct centres following focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*. 1998;83(2):439-48. Epub 1998/02/14.

160. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74(4):609-19. Epub 1993/08/27.
161. Zhao H, Yenari MA, Cheng D, Sapolsky RM, Steinberg GK. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. *Journal of neurochemistry*. 2003;85(4):1026-36. Epub 2003/04/30.
162. Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2003;27(2):267-82. Epub 2003/03/27.
163. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *Journal of neurochemistry*. 2000;74(1):1-20. Epub 2000/01/05.
164. Fujita N, Nagahashi A, Nagashima K, Rokudai S, Tsuruo T. Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene*. 1998;17(10):1295-304. Epub 1998/10/15.
165. Salvesen GS. Caspases and apoptosis. *Essays in biochemistry*. 2002;38:9-19. Epub 2002/12/05.
166. Fisher MT, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of loss of mitochondrial membrane potential in epididymal spermatozoa by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicology letters*. 2005;157(2):99-107. Epub 2005/04/20.
167. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(16):7162-6. Epub 1995/08/01.
168. Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY. Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(28):16487-90. Epub 1995/07/14.
169. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology*. 1992;119(3):493-501. Epub 1992/11/01.
170. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*. 1995;7(1):61-4. Epub 1995/12/29.
171. Kaya Dagistanli F, Susleyici Duman B, Ozturk M. Protective effects of a calcium channel blocker on apoptosis in thymus of neonatal STZ-diabetic rats. *Acta histochemica*. 2005;107(3):207-14. Epub 2005/06/21.
172. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1996;44(9):959-68. Epub 1996/09/01.
173. Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Molecular human reproduction*. 1998;4(8):757-62. Epub 1998/09/11.
174. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2006;12(8):BR274-8. Epub 2006/07/26.
175. Sener G, Eksioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Yegen BC. Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *European journal of pharmacology*. 2006;542(1-3):170-8. Epub 2006/06/24.
176. Sener G, Eksioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N, et al. L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *Cell biology and toxicology*. 2006;22(1):47-60. Epub 2006/02/08.
177. Rabb H, Ramirez G, Saba SR, Reynolds D, Xu J, Flavell R, et al. Renal ischemic-reperfusion injury in L-selectin-deficient mice. *The American journal of physiology*. 1996;271(2 Pt 2):F408-13. Epub 1996/08/01.
178. Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *American journal of physiology Cell physiology*. 2003;284(5):C1309-18. Epub 2003/04/05.
179. Barut S, Unlu YA, Karaoglan A, Tuncdemir M, Dagistanli FK, Ozturk M, et al. The neuroprotective effects of z-DEVD.fmk, a caspase-3 inhibitor, on traumatic spinal cord injury in rats. *Surgical neurology*. 2005;64(3):213-20; discussion 20. Epub 2005/08/16.
180. Tuncdemir M, Ozturk M. Deneysel Diyabetik Nefropatideİrbesartan'ın Apoptoz Üzerine Koruyucu Etkileri. *Cerrahpasa Tıp Dergisi*. 2009;40(1):15-22.
181. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75. Epub 1951/11/01.
182. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*. 1988;34(3):497-500. Epub 1988/03/01.
183. Corrocher R, Casaril M, Bellisola G, Gabrielli GB, Nicoli N, Guidi GC, et al. Severe impairment of antioxidant system in human hepatoma. *Cancer*. 1986;58(8):1658-62. Epub 1986/10/15.

184. Dahle LK, Hill EG, Holman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1962;98:253-61. Epub 1962/08/01.
185. Ridnour LA, Sim JE, Hayward MA, Wink DA, Martin SM, Buettner GR, et al. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media. *Analytical biochemistry*. 2000;281(2):223-9. Epub 2000/06/28.
186. Zhang T, Zhang X, Shao Z, Ding R, Yang S, Ruan J, et al. The prophylactic and therapeutic effects of cholinolytics on perfluoroisobutylene inhalation induced acute lung injury. *Journal of occupational health*. 2005;47(4):277-85. Epub 2005/08/13.
187. Mahoney DH, Shuster JJ, Nitschke R. Acute neurotoxicity in children with B precursor acute lymphoid leukemia: an association with intermediate-dose intravenous methotrexate and intrathecal triple therapy: A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1998;16:1712-22.
188. Skretkiewicz J, Sekulska M, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M, Polakowski P. Effect of some anticancer drugs and combined chemotherapy on renal toxicity. *Biological signals*. 1996;5(1):51-8. Epub 1996/01/01.
189. van den Bongard HJ, Mathjt RA, Boogerd W, Schornagel JH, Soesan M, Schellens JH, et al. Successful rescue with leucovorin and thymidine in a patient with high-dose methotrexate induced acute renal failure. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2001;47(6):537-40. Epub 2001/07/19.
190. Lavine JE. Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study. *The Journal of pediatrics*. 2000;136(6):734-8. Epub 2000/06/06.
191. Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında N-Asetil sisteinin etkileri. *Fırat Tıp Dergisi*. 2005;10(4):151-5.
192. Heller W, Forkmann G. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*. Harborne JB, editor. London: Chapman & Hall; 1988. 399-425 p.
193. Skaper SD, Fabris M, Ferrari V, Dalle Carbonare M, Leon A. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free radical biology & medicine*. 1997;22(4):669-78. Epub 1997/01/01.
194. Kahraman A, Erkasap N, Serteser M, Köken T. Protective effect of quercetin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Nephrol*. 2003;16.
195. Devi PS, Shyamala DC. Protective effect of quercetin in cisplatin-induced cell injury in the rat kidney. *Indian J Pharmacol*. 1999;31(6):422-6.
196. Muralikrishnan G, Amalan Stanley V, Sadasivan Pillai K. Dual role of vitamin C on lipid profile and combined application of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil treatment in fibrosarcoma-bearing rats. *Cancer letters*. 2001;169(2):115-20. Epub 2001/06/30.
197. Asvadi I, Hajipour B, Asvadi A, Asl NA, Roshangar L, Khodadadi A. Protective effect of pentoxifylline in renal toxicity after methotrexate administration. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2011;15(9):1003-9. Epub 2011/10/22.
198. Kuş İ, Zararsız İ, Akpolat N, Ögetürk M, Kuş MA, Özen OA, et al. Deneysel formaldehit zehirlenmesinde omega-3 yağ asitlerinin testislerdeki antiapoptotik etkileri: İmmunohistokimyasal bir çalışma. *Fırat Tıp Dergisi*. 2008;13(3):162-6.
199. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2003;25(9):888-96. Epub 2003/08/26.
200. Arama E, Agapite J, Steller H. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Developmental cell*. 2003;4(5):687-97. Epub 2003/05/10.
201. Celtikci B, Lawrance AK, Wu Q, Rozen R. Methotrexate-induced apoptosis is enhanced by altered expression of methylenetetrahydrofolate reductase. *Anti-cancer drugs*. 2009;20(9):787-93. Epub 2009/07/14.