

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ
ANA BİLİM DALI

METOTREKSAT-İNDÜKLÜ GASTROİNTESTİNAL
HASARA KARŞI SİLİMARİN'İN KORUYUCU
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

DUYGU DURNA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ASIM KART

2011-KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Duygu Durna yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "**Metotreksat-indüklü gastrointestinal hasara karşı silimarin'in koruyucu rolünün araştırılması**" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisanüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

08 / 09 /2011

Adı Soyadı	İmza
Başkan:
Üye :
Üye :
Üye :

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim kurulunun .../.../2011 tarih ve/..... Sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu araştırma Kafkas Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmada "Metotreksat-İndüklü Gastrointestinal Hasara Karşı Silimarin'in Koruyucu Rolü" araştırılmıştır.

Tez çalışmam boyunca bana her türlü desteği sağlayan, çalışmamın her aşamasında ilgisini esirgemeyen, bilgisi ve deneyimi ile yönlendiren danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Asım Kart'a, çalışmalarım esnasında ve tezin hazırlanması sürecinde katkılarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Abdullah Doğan, Doç. Dr. Mahmut Karapehlivan, Doç. Dr. Musa Karaman, ve Doç. Dr. Hasan Özen'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	VIII
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	IX
RESİMLERİN LİSTESİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1 METOTREKSAT	2
2.1.1 Metotreksatın Etki Mekanizması ve Kimyasal Yapısı	3
2.1.2 Metotreksatın Toksik Etkileri	5
2.2 SERBEST RADİKALLER	7
2.2.1 Serbest Radikallerin Kaynakları	8
2.2.1.1 Biyolojik Kaynaklar	8
2.2.1.2 İntrasellüler Kaynaklar	8
2.2.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	9
2.2.2.1 Süperoksit Radikali	10
2.2.2.2 Hidroksil Radikali	10
2.2.2.3 Hidrojen Peroksit Radikali	10
2.2.2.4 Nitrik Oksit Radikali	10
2.2.2.5 Singlet Oksijen Radikalı	11
2.2.2.6 Diğer Reaktif Oksijen Türleri	11
2.2.3 Serbest Radikallerin Yol Açtığı Hasarlar	11
2.2.3.1 Serbest Radikallerin Lipit Üzerine Etkileri	12
2.2.3.2 Serbest Radikallerin Protein Üzerine Etkileri	12
2.2.3.3 Serbest Radikallerin Karbonhidrat Üzerine Etkileri	12
2.2.3.4 Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri	13

2.3 ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI	13
2.3.1 Enzimatik Antioksidanlar	14
2.3.1.1 Süperoksit Dismutaz	14
2.3.1.2 Katalaz	15
2.3.1.3 Glutasyon Peroksidaz	15
2.3.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	16
2.3.2.1 Glutasyon	16
2.3.2.2 Vitamin E	16
2.3.2.3 Vitamin C	16
2.3.2.4 Vitamin A	17
2.3.2.5 Melatonin	17
2.4 SİLİMARİN	17
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	18
3.1 Gereç	18
3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
3.1.2 Kullanılan Alet ve Gereçler	19
3.1.3 Hayvanların Temini ve Bakımı	20
3.2 Yöntemler	20
3.2.1 Deney Gruplarının Oluşturulması ve İlaç uygulaması	20
3.2.2 Biyokimyasal Analizler	21
3.2.2.1 Tüm Kanda Glutasyon Tayini	21
3.2.2.2 Plazmada Malondialdehit Tayini	22
3.2.2.3 Kanda Total Sialik Asit Ölçümü	23
3.2.3 Histopatolojik İncelemeler	24
3.2.4 İstatistikî Analiz	24
4. BULGULAR	25
4.1 Biyokimyasal Bulgular	25
4.2 Histopatolojik Bulgular	40
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6.KAYNAKLAR	51
7. ÖZGEÇMİŞ	61

ÖZET**DENEYSEL METOTREKSAT İNDÜKLÜ GASTROİNTESTİNAL HASARA KARŞI SİLİMARİN'İN KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Bu çalışmada, silimarinin deneysel metotreksat indüklü gastrointestinal hasara karşı koruyucu rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Denekler her bir grupta 10 fare olacak şekilde taşıt kontrol, metotreksat, silimarin ve metotreksat+silimarin grupları olmak üzere 4'e ayrıldı. Kontrol grubundaki farelere % 0,9 NaCl, Silimarin grubuna 100 mg/kg dozda silimarin i.p. enjeksiyon ile 7 gün boyunca verildi. Metotreksat grubuna, metotreksat farelere i.p. enjeksiyon şeklinde 5 gün boyunca 15 mg/kg dozunda uygulandı. Silimarin+Metotreksat grubundaki farelere Silimarin, metotreksat uygulamasından 2 gün önce başlanarak metotreksatla (5 gün) beraber 7 gün boyunca uygulandı. İlaç uygulamalarını takiben biyokimyasal ve patolojik değerlendirmeler için kan ve doku örnekleri alındı. Deney sonunda metotreksat grubu plazma MDA seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Metotreksat grubu tam kan GSH seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu. Sadece metotreksat verilen farelerde plazma, mide ve barsak dokusundaki TSA seviyesi kontrol ve metotreksat+silimarin verilen farelere göre anlamlı şekilde yüksek gözlendi. Metotreksat'ın mide ve barsak dokusu MDA seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yükselttiği gözlendi. Silimarin'in metotreksat+silimarin grubunda mide ve barsak dokusu MDA ve TSA seviyelerini metotreksat grubuna göre anlamlı bir şekilde düşürdüğü tespit edildi. Yapılan patolojik incelemelerde metotreksat grubu farelerin mide dokusundaki epitel tabakada şiddetli dejenerasyon, nekroz, deskuamasyon ve oldukça yaygın ödem tespit edildi. Buna karşılık metotreksat+silimarin grubunda bu değişikliklerin daha az şiddette olduğu gözlendi. Sonuç olarak silimarin'in metotreksat-indüklü gastrointestinal hasara karşı koruyucu rolünün olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, Silimarin, Gİ Hasar, GSH, MDA, TSA

ABSTRACT**PROTECTIVE EFFECT OF SLYMARIN AGAINST METHOTRAXATE INDUCED GASTROINTESTINAL INJURY**

The aim of this master thesis is to investigate the protective effect of silymarin against methotrexate - induced gastrointestinal (GI) injury. The subjects are divided into 4 groups each containing 10 mice as control, methotrexate, silymarin and methotrexate + silymarin. 0.9 % NaCl and silymarin at 100 mg/kg were injected to the mice in groups control and silymarin via i.p. route for 7 days, respectively. Methotrexate was injected at 15 mg/kg to the mice in methotrexate group for 5 days. In methotrexate+silymarin group, silymarin was injected along with methotrexate starting from 2 days before methotrexate for 7 days. Following the experimental period, blood and tissue samples were collected from the animals for biochemical and pathological examinations. Plasma MDA levels in methotrexate group was significantly higher than in control, and whole blood GSH concentrations was lower in methotrexate group than in control. Plasma, intestinal and gastric TSA levels in methotrexate only group were significantly increased compared to control and methotrexate+silymarin groups. Furthermore, methotrexate significantly increased MDA levels of gastric and intestinal tissues compared to control. Silymarin in methotrexate+silymarin group significantly decreased MDA and TSA levels in comparison to methotrexate only group. In histopathology, gastric tissue of methotrexate treated mice showed degeneration, necrosis, desquamation and widespread edema. However, these alterations were less severe in methotrexate+silymarin group. In conclusion, silymarin could be protective against methotrexate-induced GI injury via antioxidant mechanism.

Keywords: Methotrexate, silymarin, GI injury, GSH, MDA, TSA

ÇİZELGELERİN LİSTESİ**Sayfa No**

Çizelge 1. Kaynaklarına ve Etki Mekanizmalarına göre Antineoplastik ilaç sınıfları.	1
Çizelge 2. Biyolojik Sistemlerdeki Önemli Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri.	9
Çizelge 3. Enzimatik ve Non-enzimatik Antioksidanlar	18
Çizelge 4. Deneysel gruplarda uygulama sonrası tam kan redükte glutasyon (GSH), plazma malondialdehit (MDA) ve total sialik asit (TSA) konsantrasyonları.	26
Çizelge 5. Deneysel gruplarda uygulama sonrası barsak doku redükte glutasyon (GSH), malondialdehit (MDA) ve total sialik asit (TSA) konsantrasyonları.	28
Çizelge 6. Deneysel gruplarda uygulama sonrası mide dokusu redükte glutasyon (GSH), malondialdehit (MDA) ve total sialik asit (TSA) konsantrasyonları.	30

ŞEKİLLERİN LİSTESİ**Sayfa No**

Şekil 1. Metotreksatın Kimyasal Yapısı.	3
Şekil 2. Folik Asidin Moleküler Yapısı.	4
Şekil 3. Dihidrofolatın Moleküler Yapısı.	4
Şekil 4. Deneysel gruplarda uygulama sonrası kandaki redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonları.	31
Şekil 5. Deneysel gruplarda uygulama sonrası plazma malondialdehit (MDA) konsantrasyonları.	32
Şekil 6. Deneysel gruplarda uygulama sonrası plazma total sialik asit (TSA) konsantrasyonları.	33
Şekil 7. Deneysel gruplarda uygulama sonrası barsak dokusuna ait redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonları.	34
Şekil 8. Deneysel gruplarda uygulama sonrası barsak dokusuna ait malondialdehit (MDA) konsantrasyonları.	35
Şekil 9. Deneysel gruplarda uygulama sonrası barsak dokusuna ait total sialik asit (TSA) konsantrasyonları.	36
Şekil 10. Deneysel gruplarda uygulama sonrası mide dokusuna ait redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonları.	37
Şekil 11. Deneysel gruplarda uygulama sonrası mide dokusuna ait malondialdehit (MDA) konsantrasyonları.	38
Şekil 12. Deneysel gruplarda uygulama sonrası mide dokusuna ait total sialik asit (TSA) konsantrasyonları.	39

RESİMLER LİSTESİ**Sayfa No**

- Resim 1:** Kontrol grubunda yer alan bir fare midесinin görünümü, (HE, x185). 41
- Resim 2:** Silimarin grubunda yer alan bir fare midесinin görünümü, (HE, x90). 42
- Resim 3:** Metotreksat grubunda yer alan bir fare midесinde, Lamina epitelyalide dejenerasyon, nekroz, (HE, x90). 43
- Resim 4:** Metotreksat grubunda yer alan bir fare midесinde fokal nekroz, (HE, x370). 44
- Resim 5:** Metotreksat ile birlikte Silimarin verilen grupta yer alan bir farenin midесinde lamina epitelyalide orta derecede dejenerasyon ve nekroz ile hafif mononükleer hücre infiltrasyonu, (HE, x185). 45

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

CAT:	Katalaz
DHF:	Dihidrofolat
DHFR:	Dihidrofolat Redüktaz
DNA:	Deoksiribonükleik asit
ER:	Endoplazmik Retikulum
İNOS:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
GİS:	Gastrointestinal Sistem
GSH:	Glutatyon
GSH-Px:	Glutatyon Peroksidaz
GSH-Rd:	Glutatyon Redüktaz
H₂O₂:	Hidrojen Peroksit
HOCl:	Hipokloröz Asit
L(R)OOH:	Hidroperoksit
MDA:	Malondialdehit
MTX:	Metotreksat
NO:	Nitrik Oksit
O₃:	Ozon
¹O₂:	Singlet Oksijen
O₂⁻:	Süperoksit Anyonu
ONOO⁻:	Peroksinitrit
OH⁻:	Hidroksil
R:	Karbon Merkezli Organik Radikaller
RA:	Romatoid Artrit
RNA:	Ribonükleik Asit
RNT:	Reaktif Nitrojen Türleri
RO:	Alkoksil
ROO:	Peroksil
ROO:	Peroksil Radikali
ROOH:	Organik Peroksitler
ROT:	Reaktif Oksijen Türleri

RS:	Tiyil Radikalleri
SOD:	Süperoksit Dismutaz
SOR:	Serbest Oksijen Radikalleri
THF:	Tetrahidrofolat

1. GİRİŞ

Kemoterapi vücutta yabancı hücre, virus, protozoa ve bakterilerin üremesini gelişimini engellemek veya öldürmek için ilaç uygulaması olarak tanımlanır. Bu uygulamaların başında da kanser tedavisi akla gelmektedir. Kemoterapide uygulanan ilaçlara da antineoplastik ilaçlar denilmektedir. Antineoplastik ilaçlar, diğer alanlarda kullanılan ilaçlardan daha zehirli ve sağaltım indeksleri genellikle küçüktür (53). Antineoplastik ilaçlar etki mekanizmaları veya kaynaklarına göre genellikle 7 grupta incelenilmektedir. Bu ilaçlar Tablo1 de sınıflandırılmıştır.

Çizelge 1. Kaynaklarına ve Etki Mekanizmalarına göre Antineoplastik İlaçlar (53).

Antineoplastik ilaçlar	Bazı örnek ilaçlar
Alkilleyici ilaçlar	Dakarbazin
Antimetabolitler	Metotreksat
Bitki kaynaklı ilaçlar	Vinkristin
Antibiyotikler	Doksorubisin
Enzimler	L-aspajinaz
Hormonlar ve hormon antagonistleri	Östrojen ve antagonistleri
Diğer maddeler	Sisplatin

Metotreksat (MTX) antineoplastik ilaçların antimetabolitler grubunda yer almaktadır. MTX lenforetiküler neoplazmalar ve insanların koryokarsinomları başta olmak üzere, geniş spektrumlu bir folik asit analogudur (53). Bu ilacın vücutta tedavi edici özelliğinin yanında bazı toksik etkiler meydana getirdiği literatürde bildirilmiştir. Bu toksik etkileri en aza indirmek için başta bitkiler olmak üzere çeşitli yöntemler koruyucu olarak uygulanmaktadır. Zaten bitkilerin tedavi edici özellikleri, ilkel çağlardan bu yana bilinmekte ve kullanılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde yaşayan insanların büyük bir kısmı çeşitli hastalıkların tedavisi için geleneksel uygulamalar geliştirmişlerdir. Dünya Sağlık Örgütü insanların % 80'inin başlıca geleneksel

ilaçlara güvendiğini ve geleneksel tedavilerin büyük bir kısmını bitki özütlerini veya bitkilerin aktif bileşenlerini kullanarak yaptıklarını 1993 yılında rapor etmiştir (45). Tedavi amaçlı kullanılan bitkilerden biri de silimarindir. *Silybum marianum* L. Gaertn. (devedikeni), Asteraceae familyasına ait bir bitkidir. Silimarin, *S. marianum* L. tohumlarından elde edilen bitkisel kaynaklı bir flavonoiddir. *S. marianum* L. tohumları, karaciğer ve safra kesesi hastalıkları ile toksin zehirlenmelerine karşı karaciğeri korumada; aynı zamanda mantar zehirlenmeleri, yılan sokması, böcek ısırıkları gibi durumların tedavisinde de 2000 yıldan beri kullanılmaktadır. *S. marianum* L. tohumlarından elde edilen ekstraktları bol miktarda silimarin içermektedir (100). Bu çalışmada da metotreksatın etkilerine karşı silimarinin koruyucu etkisi araştırılmaktadır. (19).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 METOTREKSAT

Kliniklerde çok yaygın olarak kullanılan antimetabolit etki mekanizmasına sahip bir antineoplastik ilaçtır (32). Malignite ve psöriasisde 1950'li yıllardan itibaren yoğun olarak kullanılmaktadır. Romatoid artrit (RA) tedavisinde FDA (Food and Drug Administration) tarafından 1988'de onaylanmış olup hastalığın tedavisinde en çok kullanılan modifiye ilaç olduğu bildirilmektedir (10). MTX'in etkileri başlıca 3 grupta toplanabilir. Bunlar;

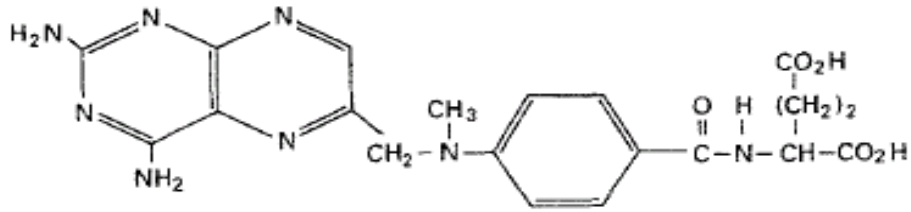
a) Metotreksat'ın antiproliferatif etkisi: MTX, yüksek dozlarda lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri gibi kanserlerin tedavisinde antiproliferatif olarak kullanılır (109).

b) Metotreksat'ın antiinflamatuvar etkisi: MTX, RA'da ve psöriatik artrit tedavisinde antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılmaktadır (50).

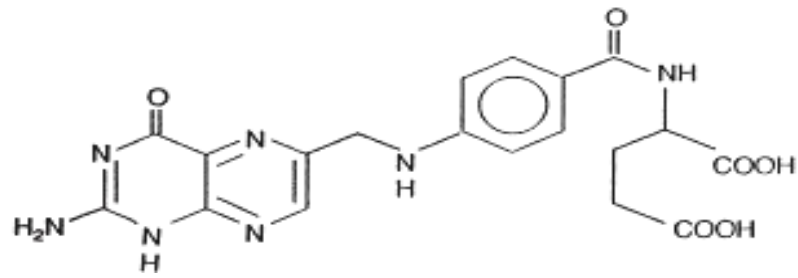
c) **Metotreksat'ın immunomodülatör etkisi:** İmmün mekanizmalar RA'nın patogeneğinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. B ve T lenfositlerdeki aktivite artışının MTX ile baskılandığı gösterilmiştir (56).

2.1.1 Metotreksat'ın Etki Mekanizması ve Kimyasal Yapısı

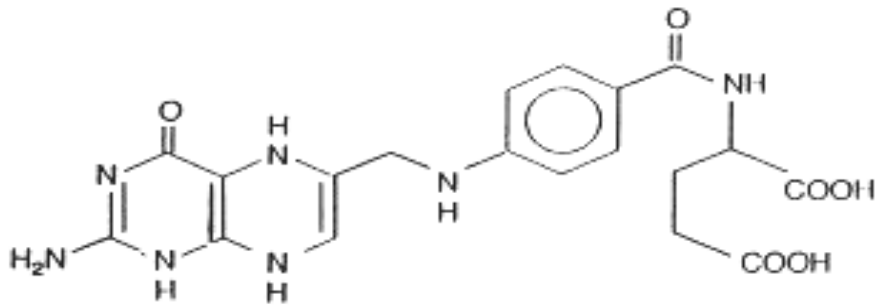
MTX folik asit sentezinde rol alan ve ara basamakta yer alan dihidrofolatı (DHF) tetrahidrofolata (THF) çeviren dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe etmektedir (27). MTX, folik asit, DHF'nin kimyasal yapısı Şekil 1, 2 ve 3 te gösterilmiştir. MTX'in moleküler yapısı DHF'a benzemektedir (27). Tetrahidrofolat pürin ve pirimidin sentezinin önemli bir parçası olan timidilatın üretiminde rol oynamaktadır (32). Pürin ve pirimidin nükleotidleri deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) sentezinde rol oynamaktadır. Bu nedenle MTX, THF eksikliğine yol açarak pürin, pirimidin metabolizması ve DNA sentezini içeren pek çok metabolik yolu etkilemektedir. Bu metabolik yollar üzerinde yaptığı değişiklikler ile MTX'in hem tedavi edici etkileri hem de toksik etkileri ortaya çıkmaktadır (48).



Şekil 1. Metotreksat'ın kimyasal yapısı (109).



Şekil 2. Folik asidin moleküler yapısı (90).



Şekil 3. Dihidrofolatın moleküler yapısı (90).

2.1.2 Metotreksat'ın Toksik Etkileri

Metotreksat tedavisi esnasında ortaya çıkan toksik etkiler oldukça yaygın olup toksik etkinin şiddeti değişkenlik göstermektedir. Bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme ve stomatit gibi istenmeyen etkilerin sıklıkla dozla ilişkili olduğu bildirilmektedir (68, 46, 24, 105).

Gebelik ve Laktasyon: MTX, 30 mg'a kadar olan kullanımlarında kadın fertilitasını olumsuz etkilememekte fakat erkekte geriye dönüşümlü steriliteye neden olabilmektedir. Embriyotoksik olduğu için doğurma çağındaki kadınlarda uygun kontrasepsiyon yapılmalıdır. Gebe kalmak isteyen kadın en az 3 ay önce ilacı kesmeli ve folatı almaya devam etmelidir. Çünkü metotreksat folat eksikliğine neden olabilmekte ve bu da fetüste nöral tüp defektlerine yol açabilmektedir. Benzer şekilde erkeklerde de konsepsiyondan 3 ay önce ilacı kesmelidirler. MTX'in gebelik ve laktasyonda kontrendike olduğu bildirilmiştir (80). MTX enfeksiyonlara karşı duyarlılığın artmasına, spermazoidlerde değişmeye ve oligospermiye neden olmaktadır (47).

Gastro İntestinal Sistemdeki (GİS) Toksik Etkileri: İştahsızlık, mide bulantısı, kusma, ishal, kilo kaybı gibi istenmeyen etkiler hastaların büyük kısmında hafif seyreder ve kısa sürer. Ancak hastaların % 2,5'unda ilacı kesecek şekilde olabilir. Yine çeşitli şiddette ağrılı ülser ve eritemden oluşan stomatitler görülebilir. GİS yan etkileri (bulantı, kusma) hastaların % 50'sinde görülmekte, ilacın alımından saatler içinde başlamakta ve birkaç gün içinde düzelmektedir. MTX'in peptik ülser iyileşmesini bozduğu bildirilmiştir. Peptik ülser MTX için göreceli bir kontrendikasyondur (10).

Kutanöz Toksik Etkiler: Alopesi, güneş ışığına hassasiyet, eritem, ürtiker ve kutanöz vaskülit olabilir. Ayrıca romatoid nodüllerin sayısında da artış görülebilmektedir (54, 115).

Renal Sistemdeki Toksik Etkileri: Düşük doz haftalık MTX ile renal toksisite bildirilmemiştir. İlaç böbreklerden atıldığı için renal yetmezlikte kullanılmamalıdır. Renal fonksiyonların düzenli takibi gerekmektedir (115).

Neoplastik Toksik Etkiler: Son yıllarda metotreksat kullanan olgularda lenfoma sıklığında artış gözlenmektedir. Hemotolojik malignite sıklığında ise artış saptanmıştır (54).

Akciğer Üzerine Toksik Etkileri: MTX ile pulmoner toksisite akut veya kronik olabilmektedir. Pulmoner reaksiyon % 3-5 sıklıkta bildirilmiştir. Akut başlayan öksürük, nefes darlığı, hafif ateş, taşipne, akciğer bazallerinde iki taraflı rallerin ortaya çıkması hekimi uyarmalıdır. Hastanın 60 yaşın üzerinde olması, akciğer ve plevra hastalıklarının varlığı, daha önce başka modifiye edici ajanların kullanılmış olması, albüminde düşüklük, sigara, diyabetes mellitus MTX'in akciğerlere toksisitesini kolaylaştırmaktadır (54, 47, 115).

Karaciğer Üzerine Toksik Etkileri: MTX kullanımına bağlı olarak düşen NADP (Nikotin amid difosfat) seviyeleri, hepatositleri reaktif oksijen radikallerine (süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hipoklorit radikalleri gibi) karşı duyarlılaştıran glutatyon seviyelerinin düşmesine ve bu da hepatosit hasarına sebep olmaktadır (103).

Diğer Toksik Etkiler: Baş ağrısı, kilo kaybı, yorgunluk, ateş, poliartralji, baş dönmesi, grip benzeri semptomlar görülmektedir (47).

Antikanser ilaçlar ile yapılan toksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerine dikkat çekilmektedir. Karaciğer, böbrek, ince barsak ve merkezi sinir sistemindeki MTX'in meydana getirdiği toksik etkilerin etki mekanizması olarak oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır (68, 46, 24, 105). Miyazono ve ark. (2004) MTX'in yan etkisi olarak rat ince barsağında süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitelerinde artma, GSH (Glutatyon) seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX'in yol açtığı ince barsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdir

(70). Benzer şekilde Devrim ve ark. (2005), MTX nefrotoksitesinde oksidatif stresin önemli rolünü ortaya koymuşlardır (24). Uz ve ark. (2005) MTX alan ratların böbrek dokularında nitrik oksit seviyelerinde artış olduğunu bildirmişlerdir (105). Bu nedenle MTX toksisitesinden korunmak için antioksidan ajanlarla birlikte kullanılması tavsiye edilmektedir. MTX'in gastrointestinal, hepatik, renal ve kemik iliği toksisiteleri en sık görülen toksik etkilerdir (91). Risk faktörleri renal fonksiyonlarda bozukluk, folik asit eksikliği ve katrimaksazol tedavisi (trimetoprim-sülfametoksazol) ve ileri yaşlıdır (10) .

2.2 SERBEST RADİKALLER

Serbest oksijen radikalleri (SOR), hücre metabolizmasında ortaya çıkan, en dış tabakalarında eşlenmemiş elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğiliminde olan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller hücrede lipit, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşikler üzerine etkilidir. Membranı oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler gibi doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri radikaller için oldukça çekici hedeflerdir (34). Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizmanın maruz kaldığı "oksidatif stres" sonucunda bozulan hücresel metabolizma, moleküler yıkım ve doku hasarını oluşturmaktadır. Oksidatif hasarın olduğu dokuda artan radikal metabolitler ve bunların oluşturduğu lipit peroksidasyonu ile protein ve DNA oksidasyonu sonucu hücre membranında kontrol kaybolmakta, geçirgenlik artışı ve hücresel ölüm gelişmektedir (34).

Reaktif Oksijen Türleri (ROT) terimi, okside edici etkileri olan hem oksijen türlerini hem de bazı nonradikal bileşikleri ifade eden geniş bir terimdir. Tüm oksijen radikalleri ROT 'tur, ancak tüm ROT 'lar oksijen radikali değildir (39). Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturmaktadır. Fakat yüksek ROT oluşumuna bağlı zincirleme reaksiyonlar kontrolsüz bir şekilde meydana gelirse hücrede hasarlara neden olmaktadır. Uzun yıllardan beri serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif

hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Günümüzde serbest radikaller ve reaktif moleküller ile bunların reaksiyonları ve ürünlerindeki artışın hücrel yaşamı tehdit ve tahrip ettiği, genetik mutasyonlara da yol açtığı bildirilmektedir (12).

2.2.1 Serbest Radikal Kaynakları: Serbest radikaller normal metabolik oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları sırasında, organizmada yabancı maddelerin (ksenobiyotiklerin) metabolize edilmesinde veya organizmanın radyasyon gibi dış etkilere maruz kalması sonucunda oluşabilir (55, 116). Organizmada serbest radikal kaynakları başlıca iki grupta toplanabilir.

2.2.1.1 Biyolojik Kaynaklar: Aktifleşmiş fagositler, antineoplastik ajanlar, radyasyon, bağımlılık yapan maddeler, çevresel ajanlar, stres bunlara örnek olarak verilebilir (54, 51, 71, 81).

2.2.1.2 İntrasellüler Kaynaklar: Küçük moleküllerin oksidasyonu, enzimler ve proteinler, mitokondrial elektron transport zinciri, endoplazmik retikulum (ER) ve nükleer membran transport sistemi, peroksizomlar, plazma membranı, oksidatif stres yapıcı durumlar bunlara örnek olarak verilebilir (15, 54, 82).

Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler (3). Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu oluşmaktadır (42), ve reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri (RNT) ve diğer reaktifler olmak üzere üç gruba ayrılır (97). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir (Çizelge 2) (54).

Çizelge 2. Biyolojik sistemlerdeki önemli Reaktif Oksijen ve Nitrojen türleri (54).

Biyolojik Önemi Olan Bazı Serbest Radikaller	
Radikaller	Non - radikaller
Süperoksit, O ₂ ⁻	Hidrojen peroksit, H ₂ O ₂
Hidroksil, OH ⁻	Hipokloröz asit, HOCl
Peroksil, RO ₂	Ozon, O ₃
Alkoksil, RO	Singlet oksijen, ¹ O ₂
Hidroperoksit, H ₂ O ₂	Peroksinitrit, ONOO

2.2.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Oksijen, canlı organizmaları oluşturan moleküllerin yapısına girmesi, besin kaynağı olan maddelerde temel element olması, aerobik canlılardaki oksidasyon redüksiyon reaksiyonları ve solunumda rol oynaması nedeniyle önemlidir (102, 28). Moleküler oksijen taşıdığı iki ortaklanmamış elektrondan dolayı bir diradikal olarak değerlendirilir (64). Vücuttaki moleküler oksijenin % 95 - 98'i enzimatik yollarla suya çevrilirken, geri kalan kısmı elektron eklenmesi sonucu hücre içi organellerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştiren, membranda oksidatif yıkıma neden olan reaktif oksijen türevlerini meydana getirir. Oksijenden oluşan önemli serbest radikaller arasında süperoksit anyonu (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikali (OH) ve singlet oksijen (¹O₂) yer almaktadır (5, 106, 116).

Oksijen elektron alarak en son suya indirgenir. Oksijene bir elektron eklenmesi sonucu süperoksit anyonu, iki elektron eklenmesi sonucu hidrojen peroksit, üç elektron eklenmesi sonucu hidroksil radikali ve en son dört elektron eklenmesi ile su oluşur (Reaksiyon 1.1, 1.2, 1.3, 1.4) (116, 38, 40).





2.2.2.1 Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^\cdot^-$) : Moleküler oksijene bir elektron bağlanmasıyla oluşan süperoksit anyonu bir serbest radikal olmasına karşın çok reaktif değildir. Lipit mebranlarının geçirgenlik yeteneğini azaltır bu nedenle üretildiği yerde çevrili olarak kalır (103).

2.2.2.2 Hidroksil Radikaller (OH $^\cdot$) : Hidrojen radikali 3 şekilde meydana gelebilir. Hidroksil radikali hidrojen peroksidin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ile (Fenton Reaksiyonu) hidrojen peroksidin süperoksit radikali ile reaksiyonu (Haber-Weiss Reaksiyonu) ve suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda meydana gelmektedir (15, 103, 97).

2.2.2.3 Hidrojen peroksit (H_2O_2) : Doğal oksijen molekülü başka bir molekülden iki elektron almışsa peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 H^+ molekülü ile birleşirse H_2O_2 oluşur. Hidrojen peroksit, süperoksidin SOD ile dismutasyonu sonucu veya spontan olarak üretilebilmektedir. H_2O_2 aslında radikal olmamakla birlikte üretildiği bölgede kalan süperoksidin aksine membranları geçen, sitosole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle süperoksidin ulaşamadığı yapılara kolaylıkla ulaşabilir. Burada süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Hidrojen peroksit başka bir şekilde de serbest Fe^{+2} ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur. H_2O_2 bir serbest radikal değildir ancak yapısında su bulundurmasından dolayı biyolojik membranlardan geçebildiği için çok önemli bir moleküldür. Başta hidroksil ve hipokloröz asit olmak üzere birçok oksidanın oluşmasına yol açtığı bildirilmiştir (22).

2.2.2.4 Nitrik Oksit (NO) : Nitrik Oksit (NO), nitrik oksit sentetaz (NOS) olarak bilinen sitozolik bir enzimin aktivitesi ile oluşur (35). NO serbest bir radikaldir.

Fizyolojik ve patofizyolojik olayların önemli bir aracısıdır. Makrofajlar, nötrofiller ve mast hücreleri en fazla oranda NO üreticileridir. İndüklenebilir NOS (inos) tarafından üretilen nitrik oksit, konağın çok özel olmayan savunma mekanizması olup, antimikrobiyal etkiye sahiptir. Aktivitesinin sepsis, astım, romatoit artrit, tüberküloz, doku reddi, multiple skleroz gibi pek çok durumda arttığı gösterilmiştir (29).

2.2.2.5 Singlet Oksijen (1O_2) : Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Oksijenin yüksek enerjili ve mutajenik formudur. Singlet oksijen *in vivo* ortamda sitokrom P450, endoperoksit sentetaz ve myeloperoksidaz reaksiyonlarıyla oluştuğu gibi iyonize radyasyonla da oluşabilir. Serbest radikal reaksiyonları sonucunda meydana gelebilir veya serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilir (7). Singlet oksijenin delta ve sigma olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Biyolojik olarak en önemli formunun delta singlet oksijen olduğu bildirilmiştir (43, 15, 95).

2.2.2.6 Diğer Reaktif Oksijen Türleri: Reaktif oksijen türlerinin diğer bir grubu, organik peroksitler (ROOH) ve bunların hemolitik yıkım ürünleri olan alkoksi (RO) ve hidroksiperoksil (ROO) veya indirekt olarak hidro ve semikinonlar veya nitroaromatlardır. Ayrıca karbon merkezli organik radikaller (R), tiyil radikalleri (RS) gibi önemli radikaller vardır (15, 73, 108).

2.2.3 Serbest Radikallerin Yol Açtığı Hasarlar

Serbest radikaller, genelde iç ve dış etkenlere bağlı olarak üretimindeki artış ve antioksidan sistemin yetersizliğine bağlı olarak başta membran lipidleri olmak üzere, proteinler, karbonhidratlar ve DNA ya önemli zararlar verebilmektedirler. Bu zararlar hücrenin cinsine, maruz kalınan strese ve şiddetine bağlı olarak; toksik, mutajenik veya karsinojenik olabilir (107, 33, 79).

2.2.3.1 Lipitler Üzerine Etkileri: Serbest oksijen gruplarının biyolojik sistemlerdeki en önemli etkileri lipitler üzerine olmaktadır. Bu olay lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve kısaca hücrelerdeki zar fosfolipitlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olarak tanımlanır (110). Bunun sonucunda membran akışkanlığında bozulma ve permeabilite değişiklikleri meydana geldiği bildirilmiştir (54). Serbest radikallerin zararlı etkilerinden en çok etkilenen yapı membran lipitleridir (15).

Lipit peroksitler daha sonra MDA ve hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler. Bu yıkım ürünleri de DNA ve proteinler ile reaksiyona girebilir ve mutajeniktirler. Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu MDA oluşmaktadır. MDA lipit peroksidasyonunun şiddeti ile orantılı olarak artar. Aynı zamanda membran bileşenlerinin polimerizasyonu ve çapraz bağlanmasına neden olabilir (66).

2.2.3.2 Proteinler Üzerine Etkileri: Proteinlerin serbest radikal hasarlarından ne derece etkileneceği proteinin aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi daha yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenmektedirler (79, 77). “Hem” proteinleri de serbest radikallerin oluşturduğu hasarlardan büyük ölçüde etkilenirler, özellikle oksihemoglobin, süperoksit ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek methemoglobini oluşturur (54, 88, 11, 26). Serbest radikallerin proteinler üzerinde neden olduğu başlıca değişiklikler aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu, proteinlerin agregasyonu ve çapraz bağlanmalar olarak sıralanabilir (28) .

2.2.3.3 Karbonhidratlar Üzerine Etkileri: Serbest radikallerin etkisiyle, monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehit yapısında ürünler meydana gelir. Okzoaldehidler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağ oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Bu yüzden kanser ve yaşlanma gibi olaylarda etkili oldukları düşünülmektedir (101).

2.2.3.4 DNA Üzerine Etkileri: İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikallerin mutajenik etkilerinden dolayı DNA üzerinde önemli hasarlara neden olduğu bilinmektedir (38, 63). Ayrıca aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membrandan geçerek hücre çekirdeğinde hasarlara yol açabilmektedir. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınlarında oluşursa purin ve primidin bazlarına etki ederek mutasyona neden olur. Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girerler (54).

Birçok biyomolekül ile reaksiyona girerek, fizyolojik dengeye hasar veren ve patolojik durumların oluşmasına yol açan serbest radikallere karşı, vücutta birçok savunma mekanizması vardır. Vücutta enzimatik ya da enzim yapıda olmayan bu savunma bileşikleri antioksidanlar olarak adlandırılır.

2.3 ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Serbest radikaller organizmalarda sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemi tarafından düzenli olarak ortadan kaldırılan moleküllerdir. Bu mekanizmada serbest radikallerin oluşumu ile bunların antioksidan sistem tarafından ortadan kaldırılması arasında bir denge söz konusudur ki bu dengeye oksidatif denge adı verilir. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerin olumsuz etkilerinden zarar görmez. Antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalması veya serbest radikal oluşumunun artması nedeniyle oksidatif dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir (92, 44). Az miktarda serbest radikal oluşumu bazı durumlarda, örneğin bakterilerin nötrofiller tarafından oksijen radikalleri ile öldürülmesi gibi, organizmaya yararlı olabilir. Bunun yanında fazla miktarda serbest radikal oluşumu sonucu oluşan oksidatif stres ile hücrede DNA, proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve enzimlerin zarar görmesine yol açabilir (97, 79). Vücudun serbest radikallerin oluşturduğu bu zararlı etkilere karşı kullandığı savunma mekanizması antioksidanlardır.

Antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olup, hem doğrudan hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, kanser yapıcı ve toksik radikallerin istenmeyen etkilerine karşı organizmayı koruyan maddelerdir. Bu antioksidan maddelerin başında vitamin C, A, E, melatonin, bilirubin gibi moleküllerle, SOD, CAT, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GSH-Rd) gibi enzimler gelmektedir (67). Antioksidant etkili moleküllerin en önemlileri Çizelge 3 de gösterilmiştir.

Çizelge 3: Enzimatik ve Non-Enzimatik Antioksidanlar (111) .

Enzimatik Antioksidanlar	Non-Enzimatik Antioksidanlar
	Glutatyon
Süperoksit Dismutaz	Vitamin E
Katalaz	Vitamin C
Glutatyon Peroksidaz	Vitamin A
	Melatonin

2.3.1 Enzimatik Antioksidanlar

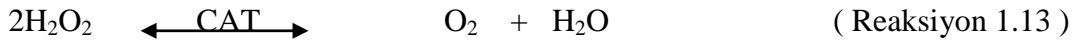
2.3.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD) : İlk olarak 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksit radikallerinin katalitik olarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen ve lipid peroksidasyonu inhibe eden bir metalloenzim olduğu bildirilmiştir (54, 65, 72) (Reaksiyon 1.9).



Süperoksit dismutazlar, merkezlerinde bulunan geçiş metallerine göre, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD olmak üzere üç sınıfa ayrılır (54, 41). Cu/Zn-SOD iki eşit

molekül ağırlıklı alt ünitelerden oluşur ve her alt ünitesinde bir bakır ve bir çinko atomu içerir ve hücrelerde en bol bulunan SOD izomeridir (73). Hayvan hücrelerinde Cu/Zn-SOD' lar daha çok sitosolde yerleşmekle beraber lizozomlarda, çekirdekte ve iç ve dış mitokondrial membran boşluklarında bulunmaktadır (54). Mn-SOD lar bakteri, bitki ve hayvan dokularında bulunabilir. Mitokondrial bir protein olup kovalent bağ oluşturamayan eşit molekül ağırlıklı dört alt üniteye sahiptir. Mn-SOD aktivitesi bulunduğu dokulara ve türe göre değişiklik göstermektedir. Fe-SOD da diğer SOD tiplerine göre süperoksitin dismutasyon oranı düşüktür (54).

2.3.1.2 Katalaz (CAT) : Katalaz, 1937 yılında Sumner ve Dounce tarafından sığır karaciğerinden izole edilmiştir. Katalaz, SOD'a benzer bir dismutasyon mekanizması ile hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalayarak biyolojik sistemleri H₂O₂'in zararlı etkilerine karşı korur (54, 79, 42) (Reaksiyon 1.13).



2.3.1.3 Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px): Glutatyon peroksidaz, elektron kaynağı olarak glutatyonu kullanarak hidrojen peroksit ve organik hiperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. Mitokondri, sitozol ve hücre membranlarında bulunur (22). Bu enzimin iki ana tipi tanımlanmıştır. Bunlardan biri aktif bölgesinde selenosistein formunda kovalent bağlı selenyum içeren selenyuma bağımlı GSH-Px (Se-GSH-Px) dir. Se-GSH-Px, organik hidroperoksitler ve H₂O₂'e karşı aktiftir. Diğerisi ise GST (Glutatyon-S-Transferaz) olarak adlandırılan, katalizleme işlemi için selenyuma bağımlı olmayan H₂O₂'e karşı ihmal edilebilir bir aktivite gösteren, daha çok organik hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan tiptir (41, 36, 17).

2.3.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.3.2.1 Glutasyon (GSH): Çok önemli bir antioksidan olan glutasyon, glutamik asit, sistein ve glisinden meydana gelen düşük molekül ağırlıklı bir tripeptiddir (54, 41). Hücrede en fazla sitozol, mitokondri ve nükleusta bulunur. Hücre içi glutasyonun büyük bir kısmı indirgenmiş olarak (tiyol), daha az bir kısmı da okside glutasyon (GSSG) formunda bulunur (41, 25, 74). GSH antioksidan özelliğini tiyol grubu sağlar. Glutasyon hidroksil ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerinin temizleyicisi olmakla beraber, diğer serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreyi oksidatif hasarlara karşı korurlar. Bundan başka proteinlerdeki sülfidril (-SH) gruplarını redükte halde tutarak protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engellerler (54, 13). Glutasyon dokularda birbiriyle dengede bulunan, indirgenmiş glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunur. Hücre içi GSH, selenyum içeren glutatyon peroksidaz (Se-GSH-Px) enzimi ile GSSG' ye dönüştürülür(57).

2.3.2.2 Vitamin E (Tokoferol): İlk olarak 1922 yılında izole edilen E vitamini, α , β , γ , δ -tokoferol olarak adlandırılan bileşiklere verilen genel bir isimdir. Bu bileşikler arasında doğal dağılım olarak ve biyolojik aktivitesi en yüksek olan α -tokoferoldür. Membranca zengin olan mitokondri ve mikrozom gibi yapılarda yoğun olarak bulunmaktadır. (41, 83). Lipit peroksidasyonunun erken safhalarında membranda serbest radikal toplayıcı etkisiyle, hücre membranında bulunan doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyarak, lipit peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturur (54).

2.3.2.3 Vitamin C (Askorbik asit): Organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici olarak görev yapar (41). Süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolaylıkla reaksiyona girerek bu radikallerin temizlenmesinde görev yapar (54). C vitamininin diğer bir özelliği de antioksidan özelliğinin yanı sıra oksidan olarak da görev yapmasıdır. Çünkü C vitamini ferri demiri (Fe^{++}) ferro demire (Fe^{+3}) indirger böylece fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile etkileşmeye uygun olan ferro demir oluşur.

Reaksiyon sonucunda ise süperoksit radikalının oluşmasına yol açar. Bu özelliğinden dolayı bir prooksidan olarak değerlendirilir (54, 8).

2.3.2.4 Vitamin A: A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten son derece güçlü bir singlet oksijen temizleyicisidir. Ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleri ile de doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunun önlenmesinde rol alır. β -Karoten düşük oksijen seviyelerinde etkili olduğundan daha yüksek oksijen seviyelerinde etkili olan vitamin E nin antioksidan etkisinin tamamlayıcısıdır (54).

2.3.2.5 Melatonin: Pineal bez hormonu olan melatonin, hidroksil radikalini temizleyen en güçlü ajanlardan biridir (54, 86). Lipofilik olması nedeniyle hemen hemen tüm hücre organellerine ve birçok dokuya kolaylıkla girip daha geniş bir alanda etki gösterebilir, hücre çekirdeğine girerek DNA' yı oksidatif hasarlara karşı koruyabilir, yüksek konsantrasyonlarda dahi toksik etki göstermez ve prooksidan aktiviteye sahip olmadığı bildirilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı diğer antioksidan maddelere göre daha fazla etkiye sahiptir (23, 87) Yaşa bağlı olarak üretiminde azalma olduğu bildirilmiştir (54).

Diğer antioksidan maddeler ise bilirubin, albumin, ürik asit, seruloplazmin, transferin, glukoz, piruvat, taurin, karoten, sistein olarak sıralanabilir (111).

2.4 SİLİMARİN

Silybum marianum L. Gaertn. (devedikeni), Asteraceae familyasına ait bir bitkidir (100). Silimarin, *silybum marianum* (Meryemana diken) bitkisinin tohumlarından elde edilen karmaşık bir bileşik olup başlıca komponentini silybin oluşturmakla beraber yapısında diğer flavolignanlardan isosilybin, silychristin, silydianin ve flavonoid bir yapı olan taxifolinden oluşur. Silybin, silimarin kompleksi içinde en etkin antihepatotoksik madde olarak bilinir (85). Klasik olarak *silybum marianum* bitkisinin ekstraktı tarih boyunca başlıca karaciğer ve gastro-intestinal hastalıkların

tedavisinde kullanılmış olup günümüzde de siroz, kronik hepatit, alkolle ilgili karaciğer hastalıklarında ve çeşitli çevresel toksik maddelere karşı kullanılmaktadır (59). Silimarin kuvvetli antioksidan, serbest radikal süpürücü ve hücre membranlarının stabilizasyonunda etkisi olan bir maddedir. Bu etkileri birçok çalışmada gösterilmiş olup hücre koruyucu etkisinde bu özelliklerinin rolü olduğu bildirilmektedir (2, 6, 58). Serbest radikal üretimine bağlı oluşan bir çok toksisite ve hastalık durumlarında silimarin koruyucu olarak kullanılmıştır. Örneğin, antrasiklin türevi antitümör ilaçları kullanımını takiben serbest radikal üretimi ve oksidatif strese bağlı oluşan kardiotoksisite silimarin ile önlendiği bildirilmiştir (16).

Yine böbreklerde yapılan iskemi-reperfüzyon sonucu serbest radikal üretimi ve oksidatif strese bağlı oluşan nekroz ve hücre ölümü silimarinle önlenebilmiştir (99). Silimarinin lipooksijenaz yolağında lökotrien sentezini önleyerek antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu ve bu etkiye bağlı olarak midede ülser oluşumuna karşı koruyucu rol aldığı bildirilmiştir (1). Silimarin immunomodülatör ve anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğu kanıtlanmış bir bileşiktir (52).

Özellikle son yıllarda çevresel toksik maddelerin yol açtığı organ toksikasyonlarına karşı silimarinin koruyucu rolü araştırılmış ve bu tip toksik etkilere karşı koruyucu olarak değerli bir kemoterapötik olarak ortaya çıkmaktadır. Genelde karaciğer koruyucu rolü üzerinde durulmakla beraber silimarinin metotreksatın özellikle gastrointestinal sistemde meydana getirdiği toksik etkilere karşı koruyucu rolü hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. Bu çalışma ile MTX kaynaklı Gİ hasara karşı silimarinin koruyucu rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1 Gereç

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğin'den 40 adet 3 aylık Swis-Albino ırkı erkek fare araştırmada materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Metafosforik asit (Merck)

Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) (Merck)

Sodyum klorür (NaCl) (Merck)

Sodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck)

5,5'-(2-ditoyobis nitrobenzoik asit) (DTNB) (Sigma)

Sodyum sitrat (Merck)

Redükte glutatyon (GSH) (Merck)

Tiyobarbütirik asit (TBA) (Merck)

Triklor asetik asit (TCAA) (Merck)

Vanadyum (III) klorür (VCl_3) (Merck)

N-(1-Naftil)etilendiamin dihidroklorür (NEDD)

Sulfanilamid (SULF) (Lancaster)

Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)

Çinko sülfat (ZnSO_4) (Merck)

1, 1, 3, 3-tetraetoksipropan (TEP) (Sigma)

n-Bütanol (Merck)

Hidroklorik asit (HCl) (Merck)

3.1.2 Kullanılan Alet ve Gereçler

Spektrofotometre (UV-1201, Shimadzu)

Santrifüj (Heraeus christ)

Su banyosu (SB100, Nüve)

Otomatik pipetler (10-100 µL, 100-1000 µL) (Eppendorf)

Hassas terazi (Scaltec)

Vorteks (Labinco)

Derin dondurucu (So-low Environmental Equip. Co.)

Distile su cihazı (Heidolpph, type-mono, Dest-3000)

Manyetik karıştırıcı (Labinco-532)

pH metre (Consort C 732)

3.1.3 Hayvanların Temini ve Bakımı

Hayvanlar, her grupta 10 tane olmak üzere 4 gruba ayrılarak, paslanmaz çelik kafeslerde, sessiz, sıcaklığın $17\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve nemin % 60-65 arasında kontrol altında tutuldu. Ayrıca 12 saat ışık, 12 saat karanlık ışık döngüsünün sağlandığı bir odada barındırıldılar. Standart pellet yem ve içme suyu ile beslendiler.

3.2.1 Deney Gruplarının Oluşturulması ve İlaç Uygulaması

Denekler her bir grupta 10 fare olacak şekilde kontrol, metotreksat, silimarin ve metotreksat+silimarin grupları olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Taşıt madde (silimarin için) kontrol grubundaki farelere 7 gün boyunca i.p olarak % 0,9 NaCl içinde hazırlanmış propilen glikol 75/25 (v/v) ile injekte edildi. Silimarin grubunda, farelere 100 mg/kg dozda silimarin (% 0,9 NaCl içinde hazırlanmış propilen glikol 75/25 (v/v) de çözdürülerek) i.p injeksiyon ile 7 gün boyunca verildi. Metotreksat grubunda, farelere metotreksat (% 0,9 NaCl içinde hazırlanmış propilen glikol 75/25 (v/v) de çözdürülerek) i.p injeksiyon şeklinde 5 gün boyunca 15 mg/kg dozunda uygulandı. Silimarin+Metotreksat grubundaki farelere Silimarin, metotreksat uygulamasından 2 gün önce başlanarak metotreksatla (5 gün) beraber 7 gün boyunca uygulandı. İlaç uygulamalarını takiben kan örnekleri alınarak, akabinde fareler yüksek doz pentobarbital ile ötenazi edildi. Biyokimyasal ve patolojik

değerlendirmeler için kan, barsak ve mide dokuları alınarak biyokimyasal analiz için -70 C de saklandı.

3.2.2 Biyokimyasal Analizler

3.2.2.1 Tüm kanda glutatyon tayini (GSH) : Tüm kanda GSH analizi Beutler ve ark (1963) bildirdiği metod'a göre yapıldı (9).

Deneyin Prensipleri: EDTA'lı kanın distile su ile hazırlanan hemolizatında, sülfidril (-SH) grupları taşımayan tüm proteinler çöktürücü çözeltiyle çöktürülür ve berrak sıvıda SH gruplarının DTNB (5,5'-(2-ditiobis nitrobenzoik asit) ile oluşturduğu sarı renkli kompleks, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülür.

Deneyde Kullanılan Çözeltiler

Çöktürücü Çözelti: 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl alınarak, bir miktar distile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Fosfat Çözeltisi (0,3 M Na₂HPO₄): 53,4 g Na₂HPO₄·2H₂O distile suda çözülerek, hacim litreye tamamlandı.

DTNB (Ellman's çözeltisi): 40 mg DTNB alındı ve % 1'lik sodyum sitrat ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Sodyum Sitrat Çözeltisi (% 1): 1g sodyum sitrat alınarak hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Standart GSH Çözeltisi: 20 mg GSH distile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Kör, standart ve test olarak işaretlenen tüplerden test tüpüne, EDTA'lı kandan 200 µl, standart tüpüne standart çözeltisinden 200 µl alındı. Üzerine 1,8 ml distile su (kanın hemoliz olması için) ve 3 ml çöktürücü çözelti eklendi. Kör olarak işaretlenen tüpe 800 µl distile su üzerine 1,2 ml çöktürücü çözelti pipetlendi. Tüpler karıştırıldı ve buzlu suda 5 dakika bekletilip, 3000 devirde 10' saniye sanrifüj edildi. Kör tüpü aynen alındı, standart ve test olarak işaretlenen yeni tüplere 2'şer ml süpernatant alındı. Bütün tüplere 8'er ml fosfat çözeltisi ilave edilip karıştırıldı. 1ml DTNB eklenerek 412 nm dalga boyunda köre karşı standart ve testin optik dansitesi okundu.

Sonuçların Hesaplanması: Tüm kan GSH konsantrasyonu mg/dl olarak aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı.

GSH (mg/dl) = (Testin Optik Dansitesi / Standardın Optik Dansitesi) x Standardın konsantrasyonu (20 mg/dl).

3.2.2.2 Plazmada MDA (Malondialdehit) Tayini: Plazmada MDA analizi Yoshioka ve ark.'nın (1979) bildirdiği yöntemle yapıldı (112).

Deneyin Prensi: Tiyobarbütirik asit (TBA) tepkimesinde lipit içerik, düşük pH ve TBA varlığında ısıtıldığında 535 nm'de minimum pik oluşturan stabil kırmızı-pembe renk meydana gelir. Kırmızı-pembe renk, MDA molekülü ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojenden dolayıdır. MDA'nın bir kısmı peroksidasyon sırasında, büyük çoğunluğu ortam asitleştirildikten sonra uygulanan ısıtma aşamasında LPO'nun yıkılması sonucu oluşur.

Deneyde Kullanılan Çözeltiler

Triklorasetik asit (% 20): 20g triklorasetik asit (TCAA) distile suda çözüldü ve hacim 100ml'ye tamamlandı.

Tiyobarbütirik asit (% 0,67): 1,675 g tiyobarbütirik asit (TBA) distile suda çözüldü ve hacim 250 ml'ye tamamlandı.

Standart Çözelti: 0,494 ml 1.1.3.3-tetraetoksipropan (d: 0,92; % 97; MA: 220,3) 100 ml alkolde çözülerek, 20 mmol/L'lik stok standart çözelti hazırlandı. Bundan 0,1 ml alınarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı ve 20µmol/L'lik standart çözelti elde edildi

Deneyin Yapılışı: Test ve kör olarak işaretlenen cam deney tüpleri alındı ve test tüpüne 0,5 ml plazma pipetlendi. Kör tüpüne 3 ml ve test tüpüne 2,5 ml %20'lik TCAA ilave edildi. Daha sonra her iki tüpe 1ml TBA alındı ve tüpler 90°C'lik su

banyosunda 30 dakika inkübe edildi, soğutuldu ve üzerine 4 ml n-bütanol pipetlenerek 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra n-bütanol tabakası başka bir tüpe aktarılarak 535 nm’de köre karşı testin absorbansı spektrofotometrede okundu.

Sonuçların hesaplanması:

MDA ($\mu\text{mol/L}$) = (Testin Optik Dansitesi / Standardın Optik Dansitesi) x Standardın konsantrasyonu ($20\mu\text{mol/L}$)

3.2.2.3 Kanda TSA (Total Sialik Asit) Ölçümü

Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

%5’lik Perklorik Asit Çözeltisi (V/V): 7,04 ml Perklorik asit alınarak bir miktar distile su içeren balon joje’ye konuldu ve hacmi 100 ml’ye tamamlandı.

Ehrlich Ayracı: 5 gr P-dimetilaminobenzaldehid 50 ml yoğun HCl asit içerisinde çözüldü ve üzerine 50 ml distile su ilave edilerek hacmi 100 ml’ye tamamlandı (Ehrlich Ayracı, her ölçümden önce taze olarak hazırlandı).

TSA Ölçüm Metodu: TSA ölçümü Sydow’un (1985) metodu kullanılarak yapıldı (98). 0.2 ml Serum üzerine 1,5 ml perklorik asitten ilave edildi. 100°C ’de 5 dakika kaynatıldı ve soğutuldu. Tüpün dibinde oluşan tortu 2500 rpm’de 4dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 1 ml alınarak diğer temiz tüplere aktarıldı. Üzerine 0,2 ml Ehrlich ayıracı ilave edilerek 100°C ’de 15 dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra tüpler tekrar soğutuldu ve 1 ml distile su ilave edilerek 525 nm’de optik dansiteleri (OD) spektrofotometrik olarak okundu. NANA (Sigma) standardından 100 mg/dl stok standart çözeltisi hazırlandı. Stok standart çözeltilerden, 100, 75, 50, 25 ve 12,5 mg/dl konsantrasyonunda dilüsyonlar yapıldı. Elde edilen OD’ler aşağıda belirtiler formül kullanılarak hesaplandı.

Sonuçların hesaplanması:

TSA (mg/dl) = (Testin Optik Dansitesi / Standardın Optik Dansitesi) x Standardın konsantrasyonu (25mg/dl)

3.2.3 Histopatolojik İncelemeler

Çalışmanın 8. gününde ötenazi edilen ve sistemik nekropsileri yapılan deneklerin tamamından mide ve barsak dokularından histopatolojik bulguları belirlemek amacıyla doku örneği alınıp %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit yapıldı. Daha sonra tespit edilen dokular rutin işlemlerden geçilerek parafin bloklar hazırlandı. Elde edilen bu bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı ve hematoksilin eozin ile boyanarak dejenerasyon, nekroz ve yangısal hücre infiltrasyonu yönünden değerlendirildi.

3.2.4 İstatistikî Analiz

Gruplarda veriler, ortalama±standart sapma olarak verildi. İstatistikî analizler, SPSS 10.0 programıyla yapıldı. Daha sonra verilere tek yönlü Varyans Analizi uygulandı ve gruplar arasındaki farklar Tukey testi ile tespit edildi. P'nin 0,05 den küçük olduğu değerler istatistikî olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Biyokimyasal Bulgular

4.1.1 Tam Kan Redükte Glutatyon (GSH), Plazma Malondialdehit ve Total Sialik Asit Seviyeleri

Gruplarda uygulama sonrası tam kan GSH, plazma MDA ve TSA konsantrasyonları Çizelge 4, Şekil 4-6'da sunulmuştur. Metotreksat uygulanan grupta tam kan GSH konsantrasyonu kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş gösterirken metotreksat+silimarin uygulanan farelerdeki GSH seviyeleri ile kontrol grubundaki fareler arasında istatistiksel bir fark gözlenmedi. Sadece silimarin verilen gruba ait GSH değerleri diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p < 0,05$). Plazma MDA seviyeleri metotreksat uygulanan grupta kontrol ve silimarin grubuna göre yüksek tespit edildi. Metotreksat+silimarin uygulanan grupta silimarin uygulaması plazma MDA seviyesini düşürerek kontrol grubundaki değerlere yaklaştırmasına ve normalleştirmesine rağmen istatistiksel olarak metotreksat grubundan farklı değildi ($p < 0,05$). Plazma TSA konsantrasyonları kontrol ve metotreksat+silimarin verilen gruplar arasında istatistiksel olarak farklı bulunmazken, sadece metotreksat verilen farelerde plazma TSA seviyesi kontrol ve metotreksat+silimarin verilen farelere göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0,05$).

Çizelge 4: Deneysel gruplarda uygulama sonrası tam kan redükte glutatyon (GSH), plazma malondialdehit (MDA) ve total sialik asit (TSA) konsantrasyonları.

Parametre	Kontrol	Metotreksat	Met+Sly	Silimarin
GSH	20,09±2.21 ^b	12,92±2.59 ^a	18,66±1,80 ^b	24,96±1,08 ^c
MDA	13,04±0,53 ^{ab}	16,01±1,79 ^c	14,62±3,02 ^{bc}	11,17±1,15 ^a
TSA	58,55±1,45 ^b	61,19±1,26 ^c	59,08±1,67 ^b	47,03±1,13 ^a

^{a, b, c} : Aynı satır içinde farklı üst simgeli harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir, $p < 0,05$. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.2 Barsak Dokuda Redükte Glutatyon (GSH), Malondialdehit (MDA) ve Total Sialik Asit (TSA) Seviyeleri

Deney yapılan gruplarda uygulama sonrası barsak dokuda redükte GSH, MDA ve TSA konsantrasyonları Çizelge 5, Şekil 7-9'da sunulmuştur. Silimarin uygulanan gruptaki farelerin barsak dokusundaki GSH seviyeleri kontrol grubu farelere göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Kontrol, metotreksat ve metotreksat+silimarin uygulanan gruplarda barsak doku GSH seviyeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Kontrol grubu farelerle silimarin grubu farelerin barsak dokusundaki MDA seviyeleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmazken metotreksat grubu farelerin barsak dokusundaki MDA seviyeleri kontrol grubu farelere göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Metotreksat+silimarin uygulanan gruptaki farelerin barsak dokusundaki MDA seviyeleri metotreksat grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu. Kontrol grubu farelerle silimarin uygulanan farelerin barsak dokusundaki TSA seviyeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmezken metotreksat grubu farelerin barsak dokusundaki TSA seviyeleri kontrol grubu farelere göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Metotreksat+silimarin grubu farelerin barsak dokusundaki TSA seviyeleri metotreksat grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu.

Çizelge 5: Deneysel gruplarda uygulama sonrası barsak doku redükte glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) ve total sialik asit (TSA) konsantrasyonları.

Parametre	Kontrol	Metotreksat	Met+Sly	Silimarin
GSH	2,84±0,07 ^a	2,91±0,22 ^a	2,63±0,41 ^a	3,52±0,27 ^b
MDA	1,06±0,13 ^a	2,15±0,21 ^c	1,51±0,33 ^b	1,05±0,08 ^a
TSA	2,36±0,21 ^a	4,43±0,51 ^b	2,45±0,46 ^a	2,39±0,47 ^a

^{a, b, c} : Aynı satır içinde farklı üst simgeli harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir, $p < 0,05$.

4.1.3 Mide Dokusunda Redükte Glutatyon (GSH), Malondialdehit (MDA) ve Total Sialik Asit (TSA) Seviyeleri

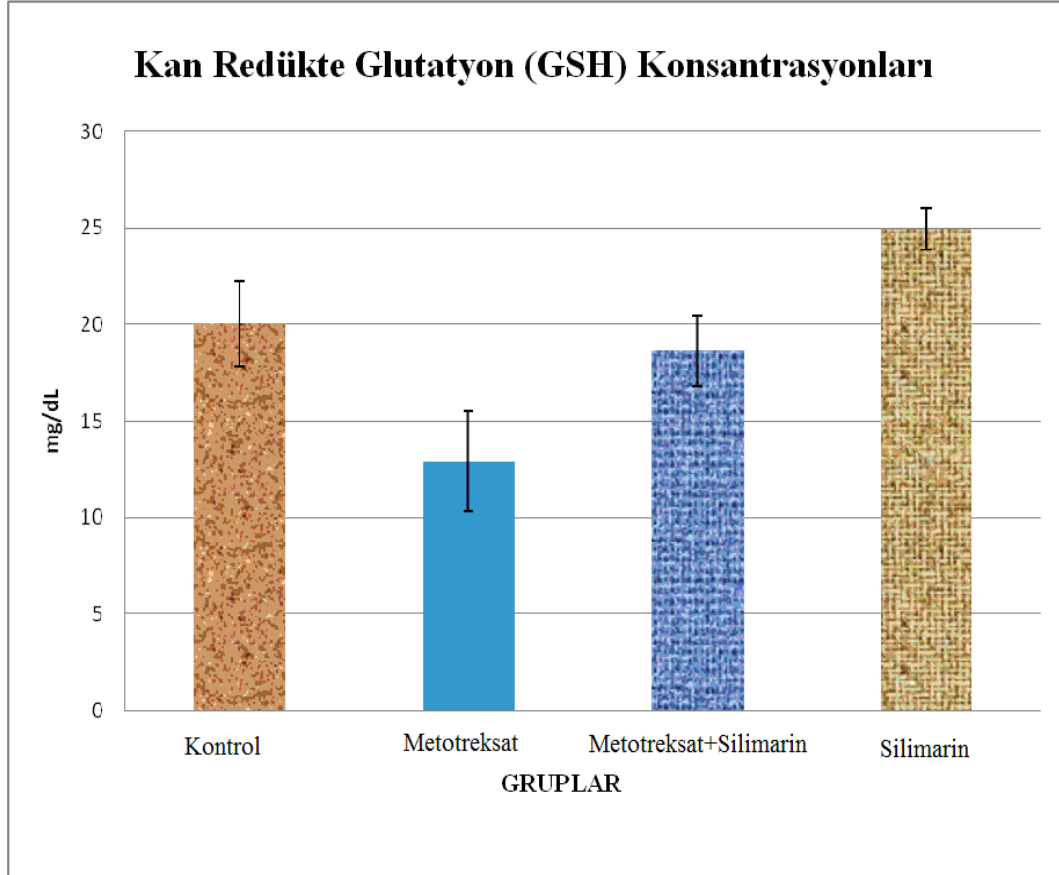
Uygulama yapılan grupların mide dokusundaki redükte GSH, MDA ve TSA konsantrasyonları Çizelge 6, Şekil 10-12’de sunulmuştur. Metotreksat uygulanan gruptaki farelerin mide dokusundaki GSH seviyeleri kontrol ve metotreksat+silimarin grubuna göre istatistiki olarak farklı bulunmazken silimarin grubu farelerdeki mide dokusu GSH seviyeleri kontrol grubu farelere göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Metotreksat uygulanan gruptaki farelerin mide dokusundaki MDA seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Silimarin grubu farelerin mide dokusundaki MDA seviyeleri metotreksat+silimarin grubuna göre istatistiksel olarak farklı bulunmazken metotreksat+silimarin grubu farelerin mide dokusundaki MDA seviyeleri metotreksat grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu. Silimarin uygulanan gruptaki farelerin mide dokusundaki TSA seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, metotreksat+silimarin grubu farelerin mide dokusu TSA seviyeleri metotreksat grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu. Metotreksat grubu farelerin mide dokusundaki TSA seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu.

Çizelge 6: Deneysel gruplarda uygulama sonrası mide dokusu redükte glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) ve total sialik asit (TSA) konsantrasyonları.

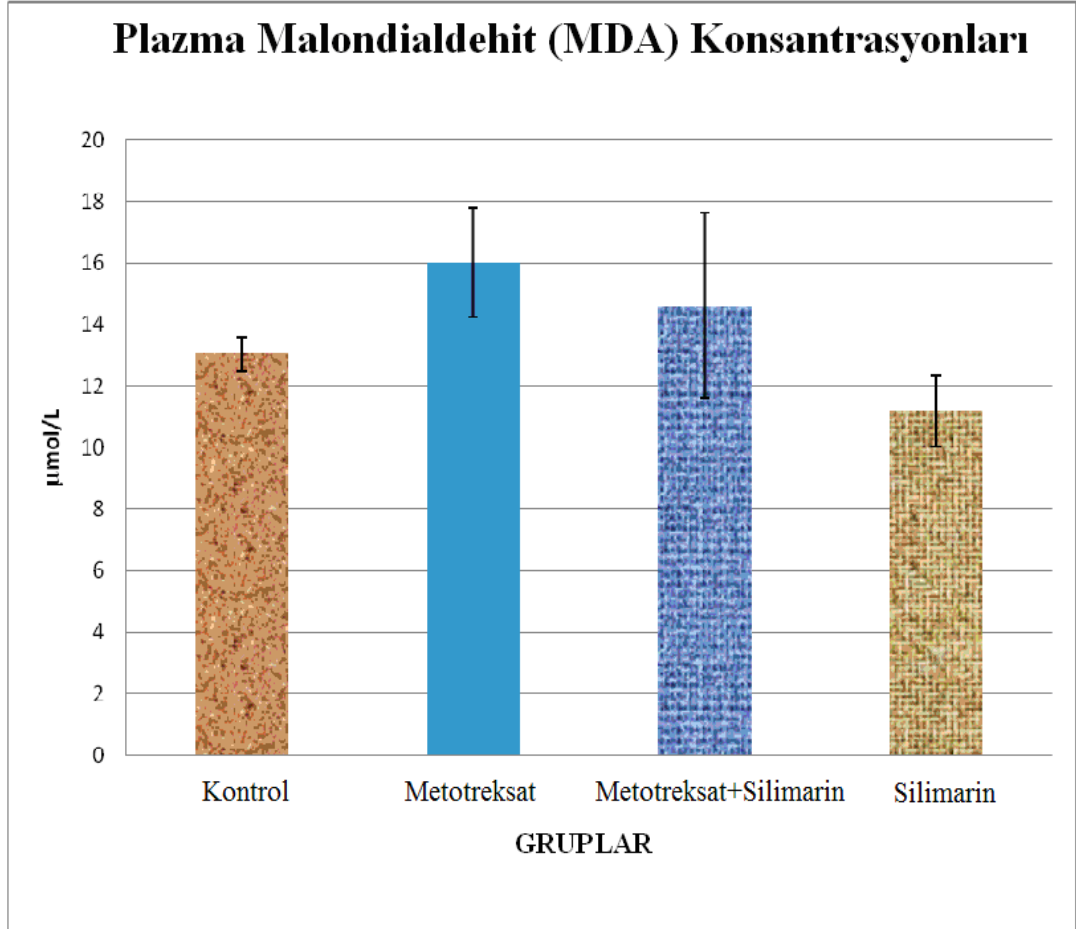
Parametre	Kontrol	Metotreksat	Met+Sly	Silimarin
GSH	1,05±0,13 ^a	0,96±0,08 ^a	0,99±0,05 ^a	1,50±0,26 ^b
MDA	0,43±0,03 ^a	0,64±0,11 ^c	0,53±0,08 ^b	0,45±0,04 ^a
TSA	0,27±0,03 ^a	0,72±0,08 ^c	0,43±0,05 ^b	0,33±0,04 ^a

^{a, b, c} : Aynı satır içinde farklı üst simgeli harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir, $p < 0,05$.

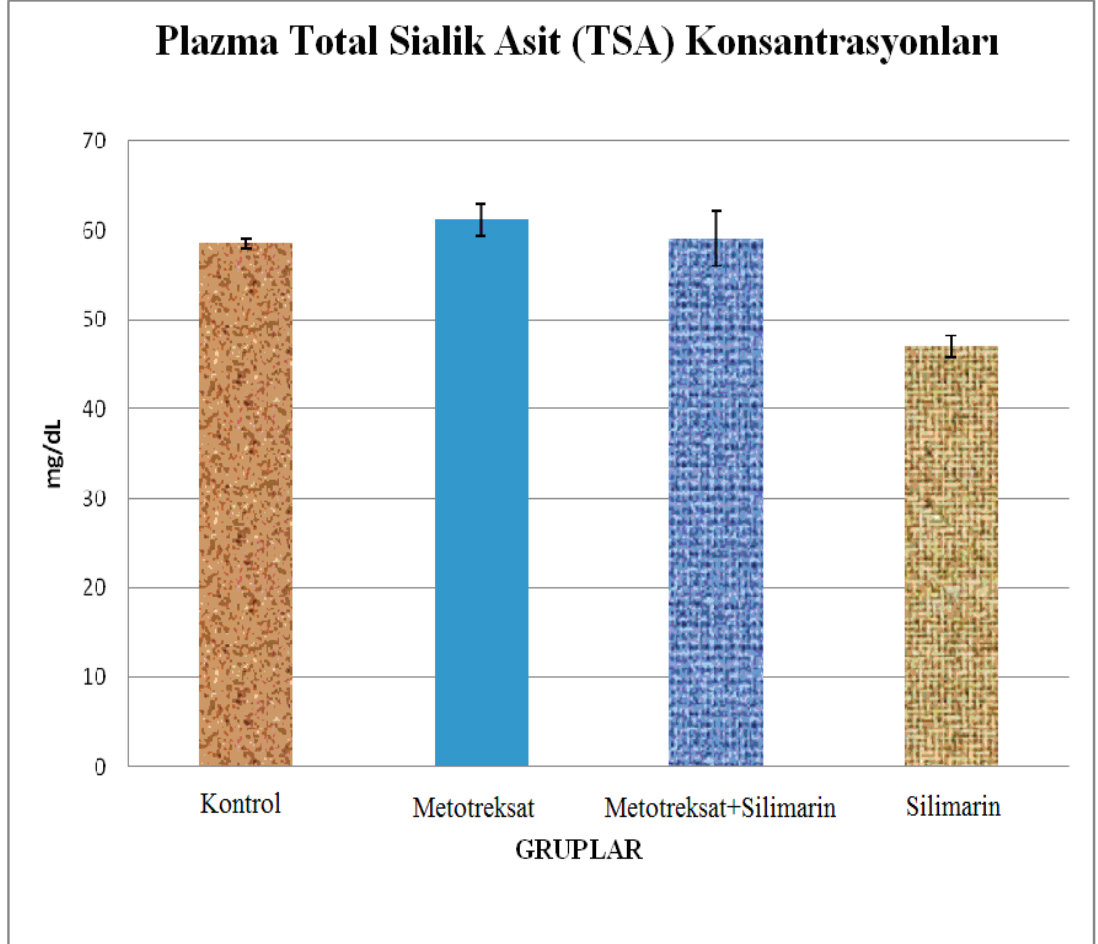
Şekil 4. Deneysel gruplarda uygulama sonrası tam kan redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonları (ortalama±standart hata).



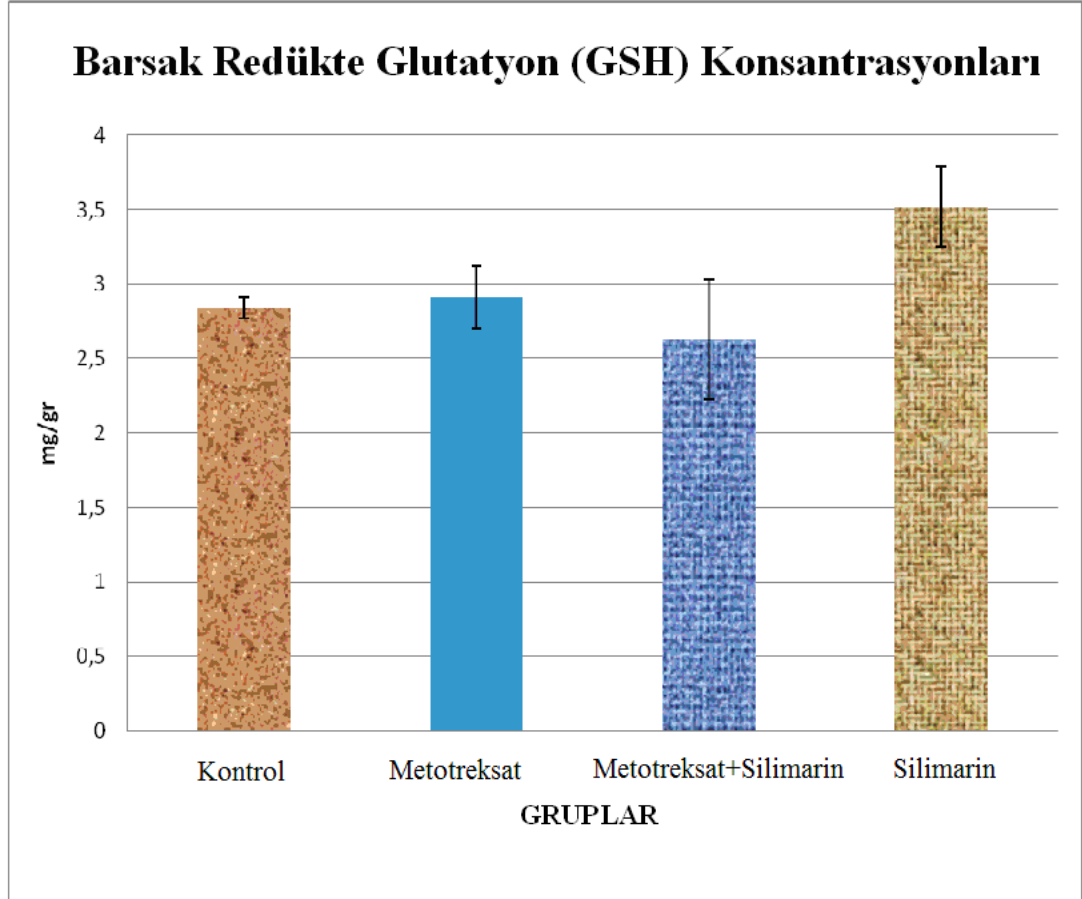
Şekil 5. Deneysel gruplarda uygulama sonrası plazma malondialdehit (MDA) konsantrasyonları (ortalama±standart hata).



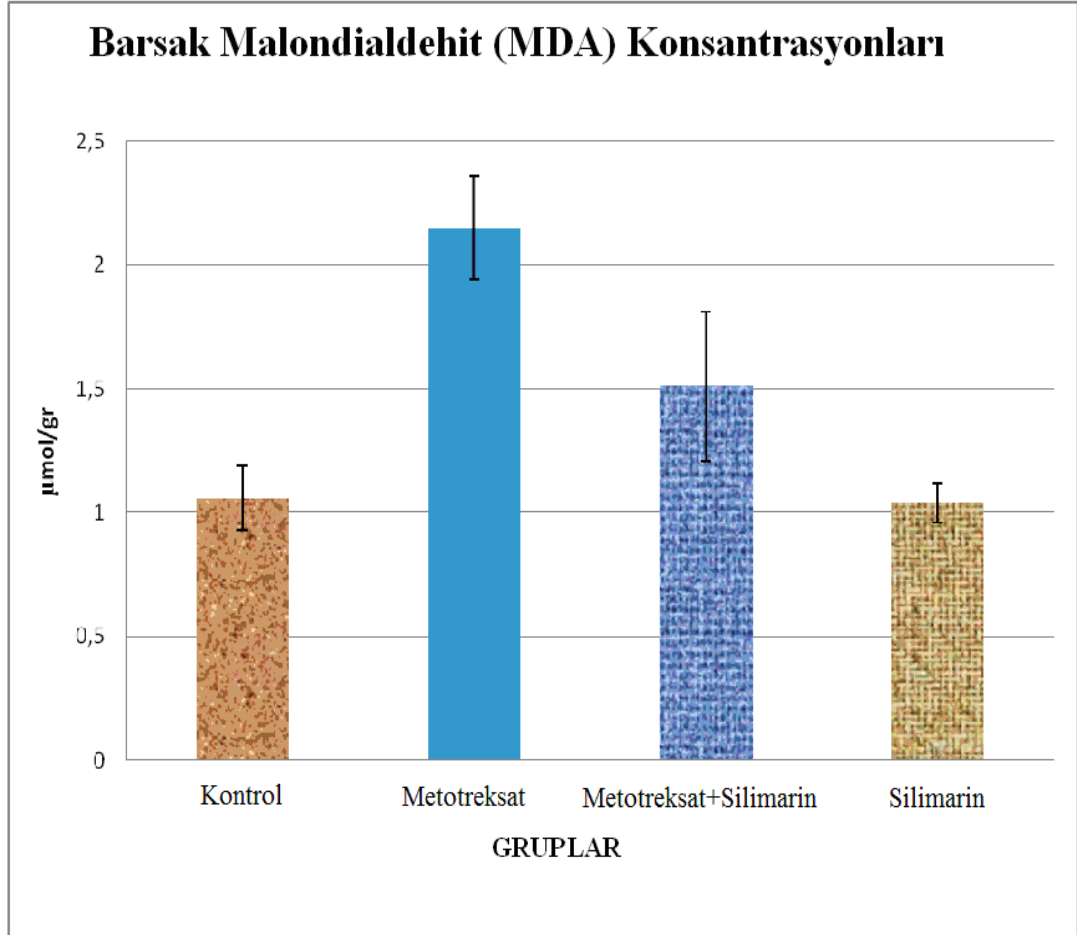
Şekil 6. Deneysel gruplarda uygulama sonrası plazma total sialik asit (TSA) konsantrasyonları (ortalama±standart hata).



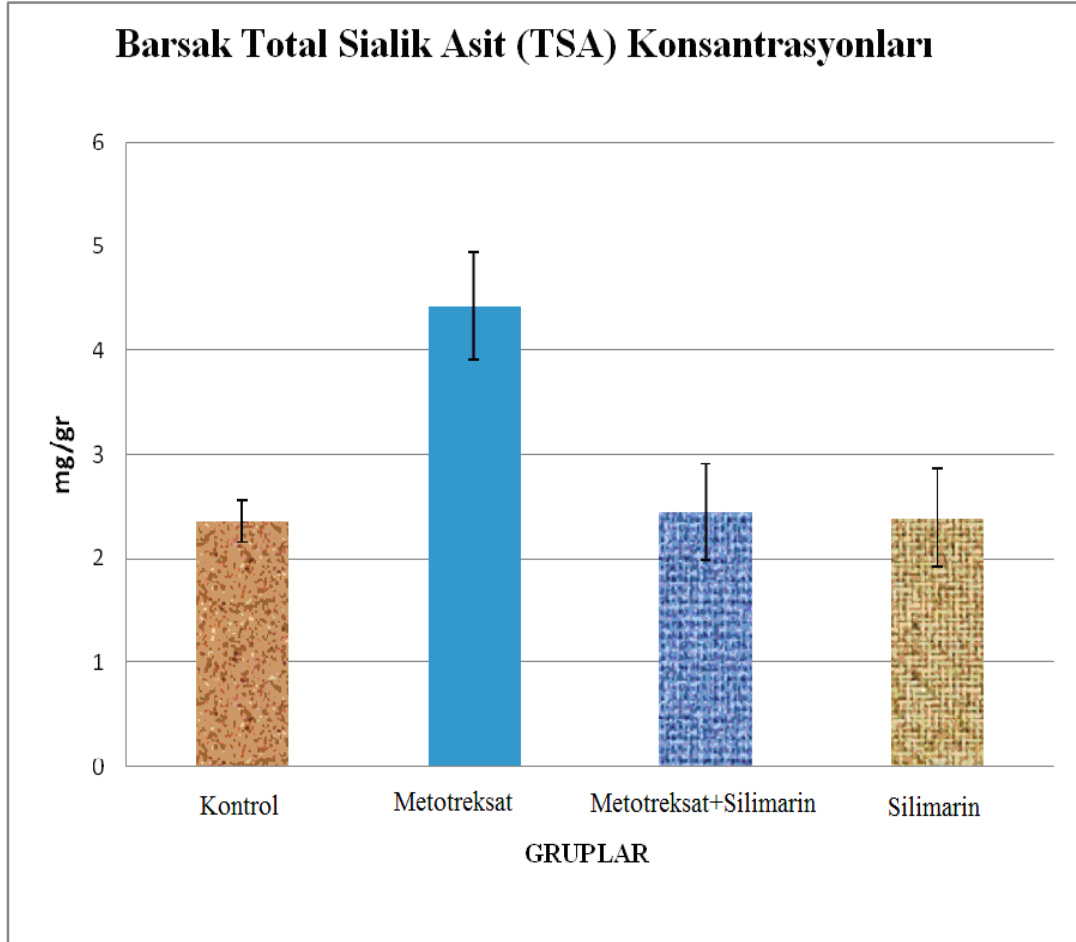
Şekil 7. Deneysel gruplarda uygulama sonrası barsak doku redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonları (ortalama±standart hata).



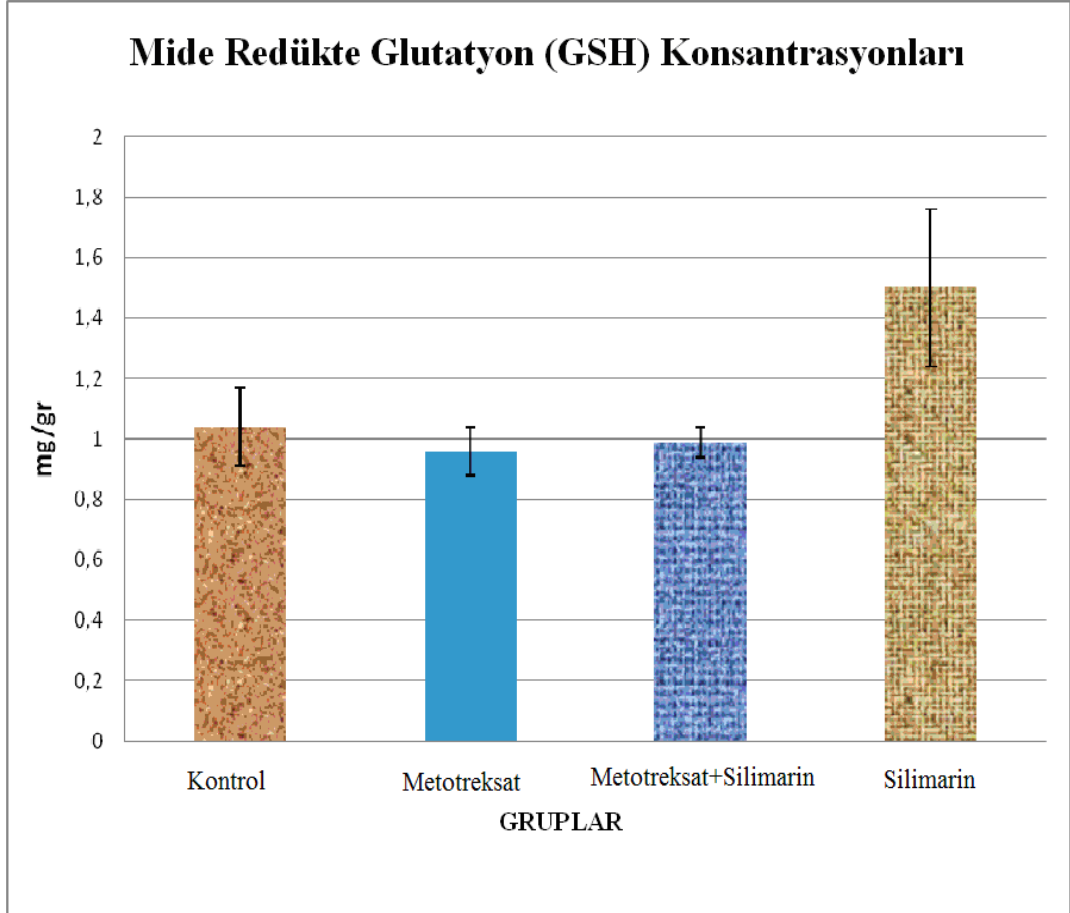
Şekil 8. Deneysel gruplarda uygulama sonrası barsak doku malondialdehit (MDA) konsantrasyonları (ortalama±standart hata).



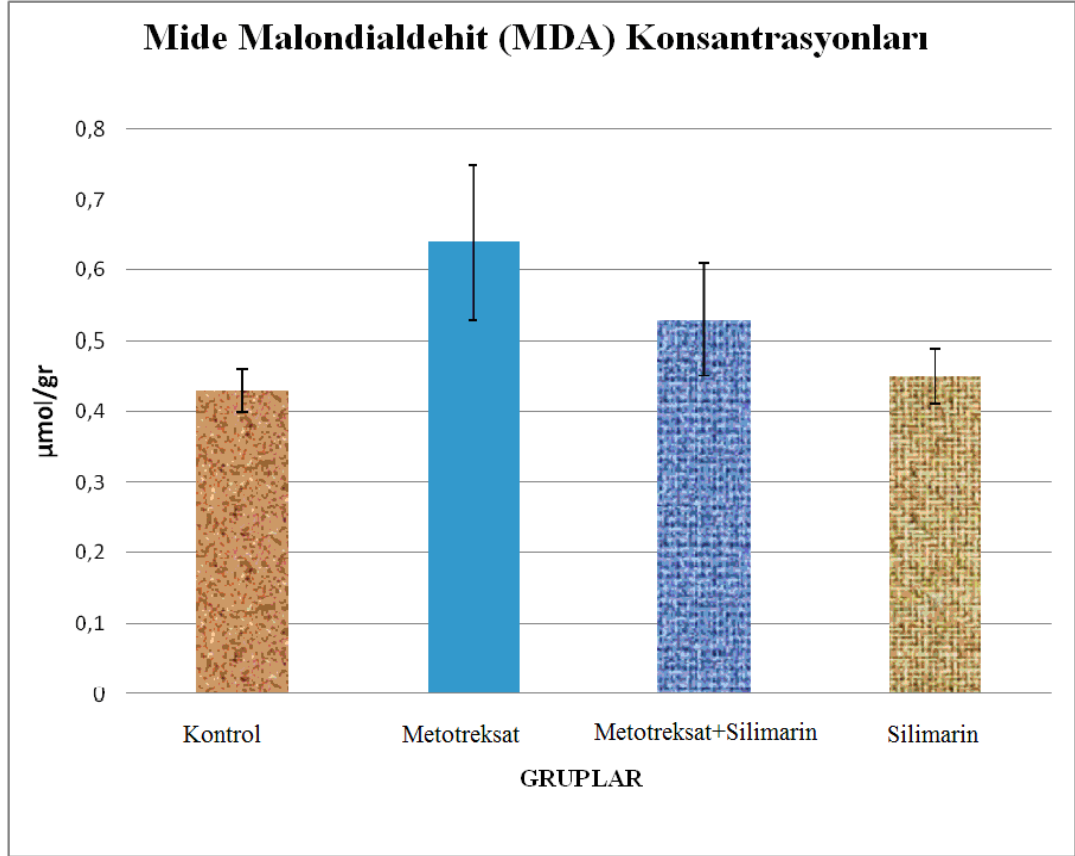
Şekil 9. Deneysel gruplarda uygulama sonrası barsak doku total sialik asit (TSA) konsantrasyonları (ortalama±standart hata).



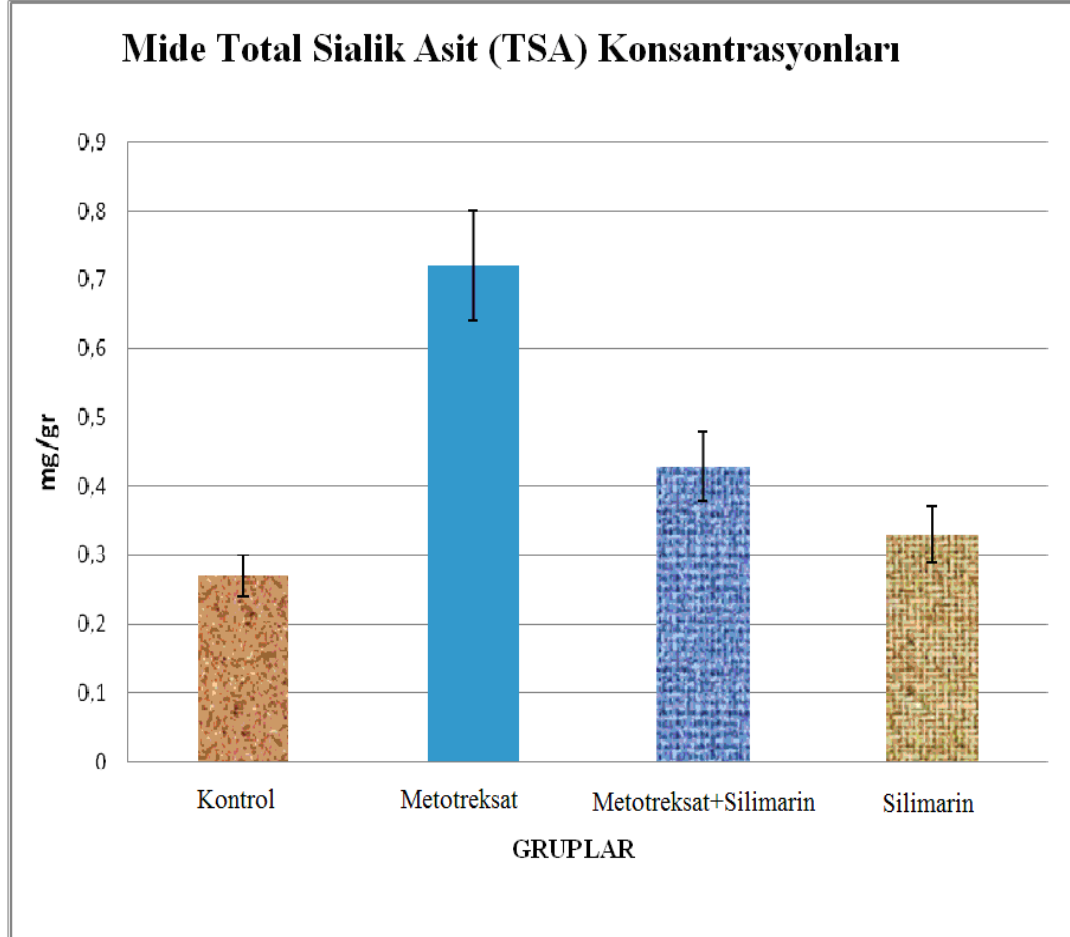
Şekil 10. Deneysel gruplarda uygulama sonrası mide dokusu redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonları (ortalama±standart hata).



Şekil 11. Deneysel gruplarda uygulama sonrası mide dokusu malondialdehit (MDA) konsantrasyonları (ortalama±standart hata).



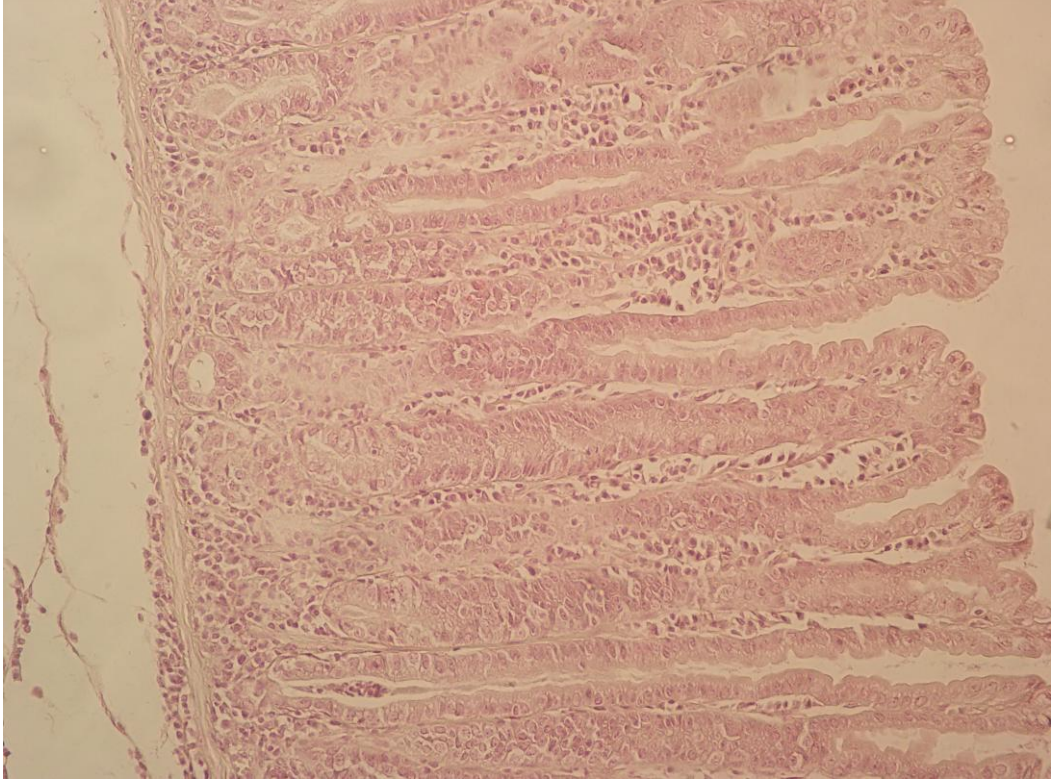
Şekil 12. Deneysel gruplarda uygulama sonrası mide dokusu total sialik asit (TSA) konsantrasyonları (ortalama±standart hata).



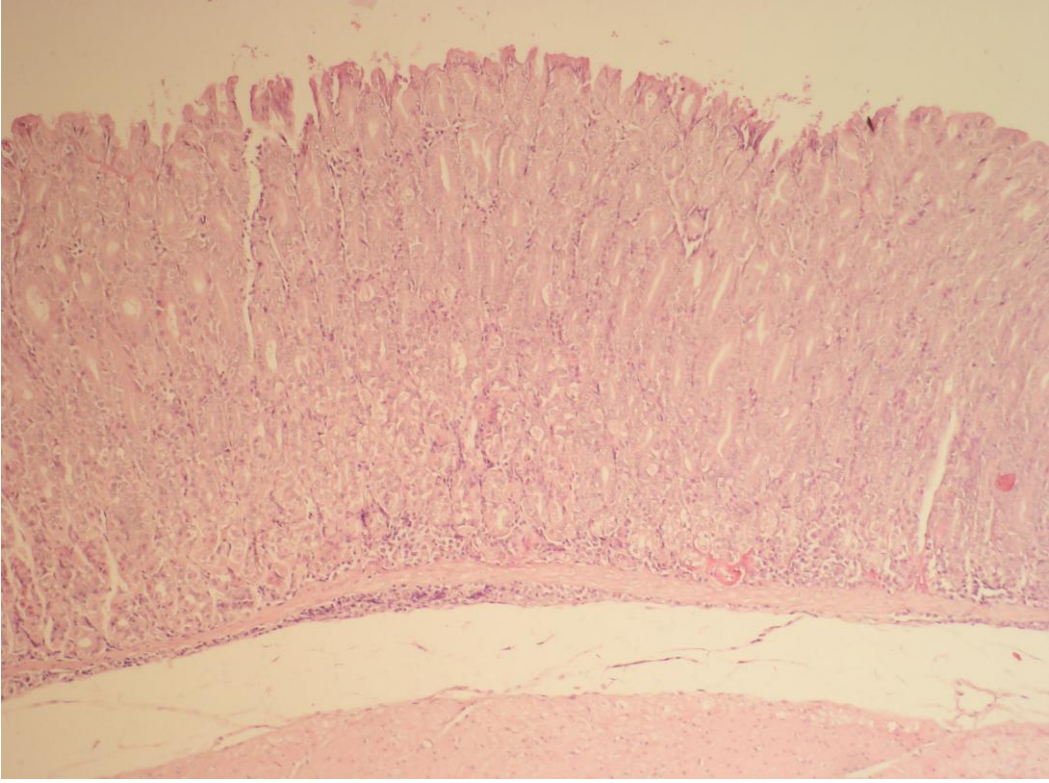
4.2 Histopatolojik Bulgular

Çalışmada kontrol (Resim 1) ve Silymarın (Resim 2) grubunda yer alan deneklerin mide dokularının normal yapıda olduğu görüldü. Araştırmada 5 gün süreyle Metotreksat uygulanan deneklerin midelerinde 4 vakada şiddetli, 2 vakada ise orta derecede olmak üzere Tunika mukazanın Lamina epitelyalisinde dejenerasyon, nekroz ve deskuamasyon tespit edildi (Resim 3). Mukoza yüzeyine yakın olan Paryetal hücrelerde de belirgin dejenerasyon ve nekroz gözlemlendi. Bir denekte ise lamina propriyada geniş nekroz alanına rastlandı (Resim 4) . Şiddetli derecede etkilenen deneklerde daha belirgin olmak üzere Tunica mukaza ile Tunica muskularis arasında oldukça yaygın ödem ile orta derecede mononükleer hücre infiltrasyonuna tespit edildi. Metotreksat ile birlikte Silimarın uygulanan deneklerde ise, 1 vakada şiddetli, 2 vakada orta, 3 vakada hafif derecede olmak üzere dejenersyon ve nekroza rastlandı (Resim 5). Şiddetli, dejenerasyon ve nekrozun şekillendiği vaka haricinde diğer deneklerin midelerinde yangısal hücre infiltrasyonu ve ödeme rastlanmadı.

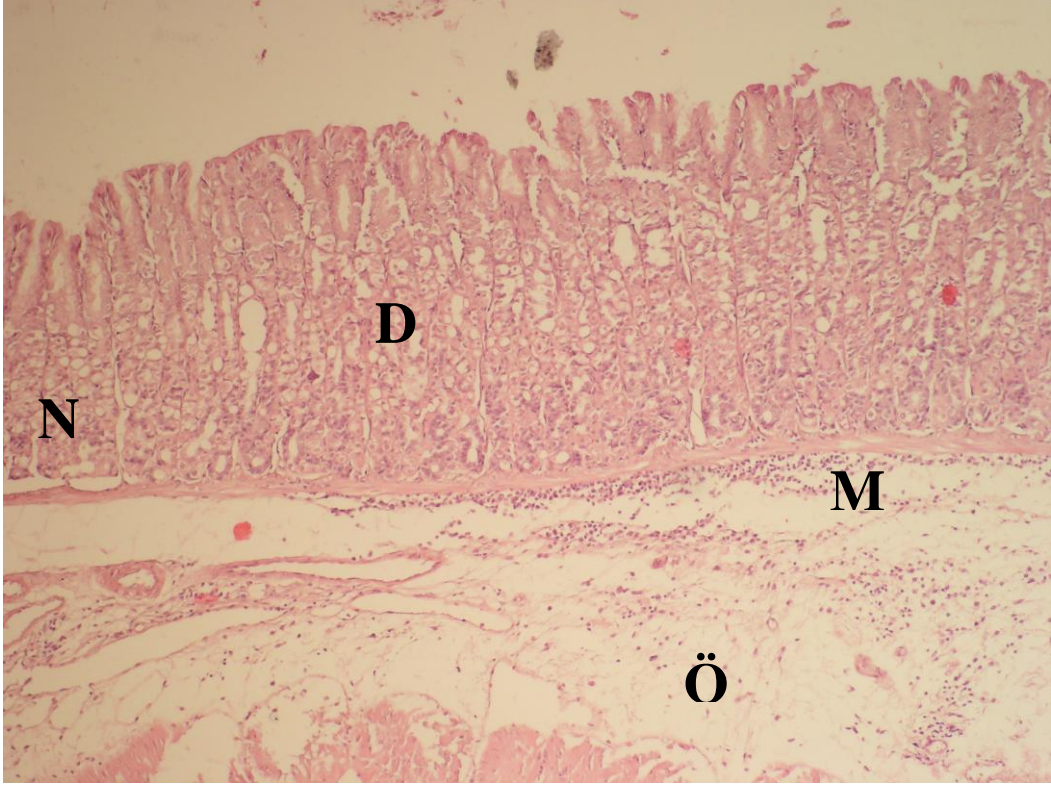
Çalışmada yer alan deneklerin mide dışındaki organları normal yapıda olduğu görüldü.



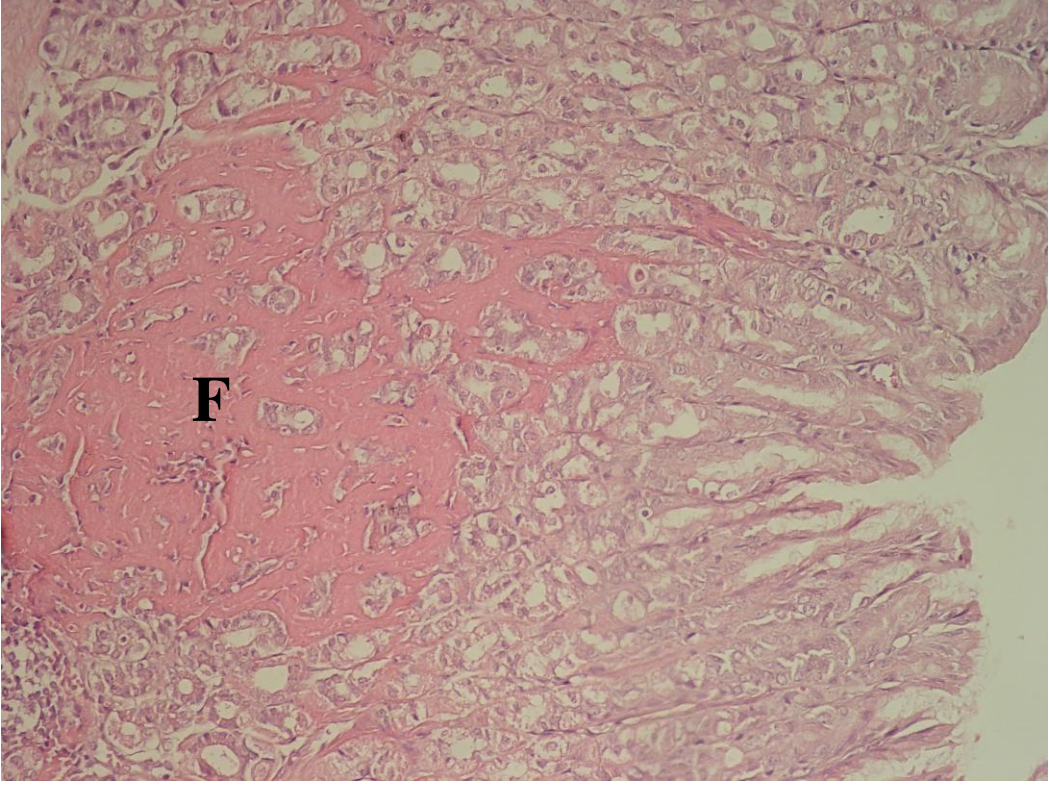
Resim 1: Kontrol grubunda yer alan bir fare midesinin görünümü, (HE, x185).



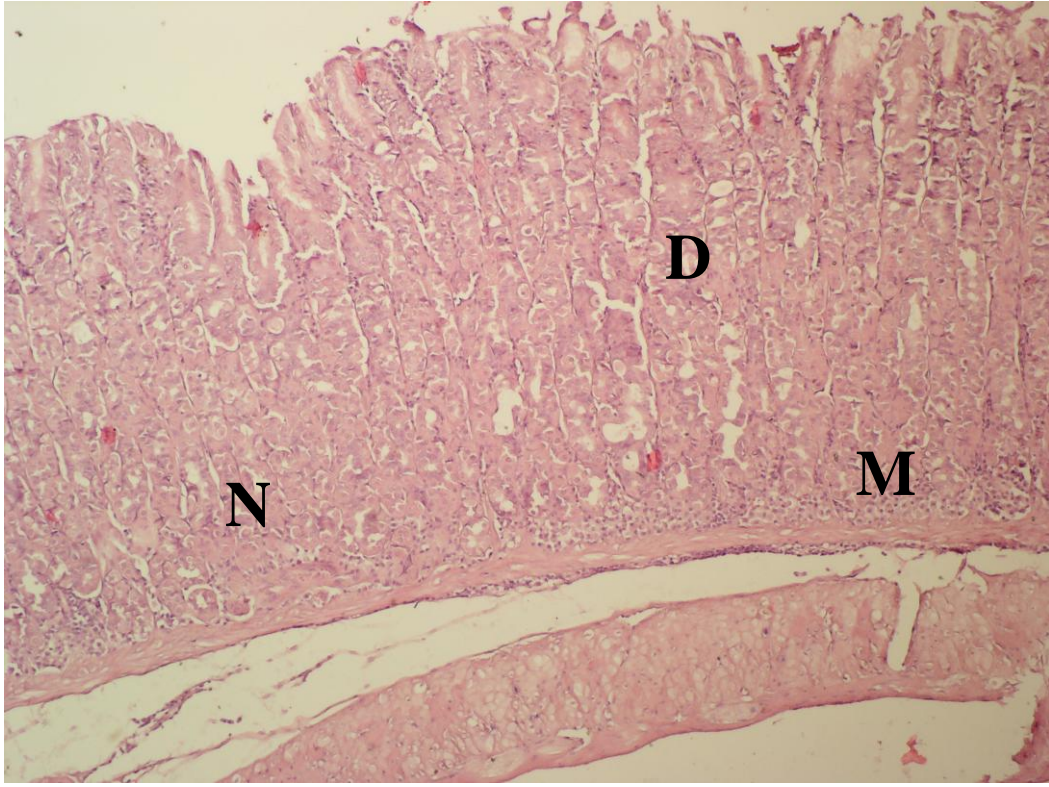
Resim 2: Silimarin grubunda yer alan bir fare midesinin görünümü, (HE, x90).



Resim 3: Metotreksat grubunda yer alan bir fare midesinde, Lam epitelyalide dejenerasyon (D), nekroz (N), şiddetli ödem (Ö) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (M), (HE, x90).



Resim 4: Metotreksat grubunda yer alan bir fare midesinde fokal nekroz (F), (HE, x370).



Resim 5: Metotreksat ile birlikte Silimarin (met+sily) verilen grupta yer alan bir farenin midesinde lamina epitelyalide orta derecede dejenerasyon (D) ve nekroz (N) ile hafif mononükleer hücre infiltrasyonu (M), (HE, x185).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada metotreksat-indüklü GİS hasara karşı silimarinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. MTX kanser kemoterapisinde ve romatoid artritte yaygın şekilde kullanılan antimetabolit bir ilaçtır (20). Metotreksat tedavisi esnasında ortaya çıkan yan etkiler oldukça yaygın ve uzun vadeli klinik kullanımı, gastrointestinal toksik etkileri sebebiyle sınırlıdır (68, 46, 24, 105, 20). MTX'a bağlı başlıca toksik etkilerden biride intestinal hasar ve enterokolittir (75). MTX'e bağlı ince bağırsak hasarında ROT'nin önemli rol oynadığı bildirilmiştir (35). Çalışmamızda metotreksat grubu farelerin barsak dokusundaki MDA seviyesi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Bu durumda lipit peroksidasyonunun rol oynadığını düşünmekteyiz. MTX uygulamasını takiben lipit peroksidasyonunda MDA'nın arttığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (14). Ayrıca GİS regülasyonunda antioksidan aktivitenin önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Glutasyon ve glutasyon ile ilgili enzimlerin GİS üzerindeki koruyucu rolü olabildiği ve deneysel çalışmalarda SOD'un lokal koruyucu etkisinin saptandığı rapor edilmiştir (94, 49). Williams ve ark.'nın (1990) yapmış olduğu bir çalışmada kontrol grubuna kıyasla inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda, nötrofil ve monositlerin yüksek oranlarda SOR'leri ürettiği bildirilmiştir (69). Ayrıca çok sayıda deneysel çalışmada bildirildiğine göre inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastaların fagositik hücrelerinde artma ve aşırı artmış SOR'nin mevcut olduğu tespit edilmiştir (117). Yapılan çalışmalarda deneysel kolit modelleri üzerine, tedavi amaçlı, birçok madde denenmiştir. Bu denenen maddelerin bir kısmının antioksidan ajanlar olduğu rapor edilmiştir. Örneğin, aktif ülseratif kolit durumunda antioksidan enzim aktivitelerinde ve GSH düzeylerinde azalma tespit edildiği gösterilmiştir (78). Miyazono ve ark. (2004) MTX'ın yan etkisi olarak rat ince bağırsağında SOD ve CAT aktivitesinde artma, GSH seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX'ın yol açtığı ince bağırsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdir (70). Fakat çalışmamızda oksidatif stres yaptığını düşündüğümüz metotreksat uygulanan gruptaki farelerin mide dokusundaki GSH seviyesini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi. Diğer taraftan kanda metotreksat grubu GSH seviyesini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulduk. Hücreler oksidatif strese maruz kaldıklarında,

savunmada görevli antioksidan enzimlerin hem aktivitesinde hem de gen ifadelerinde bir artma meydana geldiği rapor edilmektedir. Literatürde bildirildiğine göre çok aşırı miktarda oksidatif strese maruz kalan hücrelerde bu mekanizmanın bozulması hücrelerin antioksidan enzim aktivitesinde ve bu enzimlerin gen ifadelerinde bir azalma meydana getirirken, orta şiddetteki oksidatif stresin hücrelerdeki antioksidan enzim aktivitesi ve gen ifadelerinde artma meydana getirdiği bildirilmektedir (89). Son zamanlarda yapılan çalışmalar çeşitli stres faktörlerinin SOR oluşumunu hızlandırdığını ve lipid peroksidasyonlarına yol açtığını göstermektedir. *In vivo* ve *in vitro* yapılan deneylerde endojen GSH'ın çeşitli hasarlarda mide mukozası bütünlüğünün korunmasında önemli bir mediatör olabileceği görüşü ileri sürülmektedir. Oksidatif stres ile GSH düzeylerinin azaldığı bilinmektedir. Kansere, diyabete, alkolik karaciğer hastalığı, katarakt, AIDS ve Parkinson hastalığı da dahi olmak üzere birçok dejeneratif hastalığın patogeneğinde bozulmuş GSH durumu gösterilmiştir (18). Benzer şekilde Devrim ve ark. (2005) MTX nefrotoksitesinde oksidatif stresin önemli rolünü ortaya koymuşlardır (24). Gİ hasara ek olarak, hepatik, renal, kemik iliği toksisiteleri en sık görülen toksik etkilerdir (91). Antikanser ilaçlarla yapılan toksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerine dikkat çekilmektedir. Gİ hasara benzer şekilde karaciğer, böbrek ve merkezi sinir sistemindeki MTX'in toksik etkilerinden oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır (68, 46, 24, 105). Kuralay ve ark. (2003), deneysel kolit modelinde oksidatif strese cevap olarak SOD aktivitesinin arttığını ve bu artışın da antioksidan ajanlarla azaldığını bildirmişlerdir (60). Bu nedenle MTX toksisitesine karşı koruyucu olarak antioksidan ajanlarla birlikte kullanılması tavsiye edilmektedir (91). Bu ajanlardan biri de silimarin olup çalışmamızda silimarinin koruyucu etkisi incelenmiştir. Silimarin kuvvetli antioksidan, serbest radikal süpürücü ve hücre membranlarının stabilizasyonunda etkisi olan bir maddedir. Bu etkileri birçok çalışmada gösterilmiş olup hücre koruyucu etkisinde bu özelliklerinin rolü olduğu bildirilmektedir (2, 6, 58). Çalışmamızda oksidatif stres sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA'nın kan, barsak ve mide dokusundaki seviyeleri incelendi. Metotreksat+silimarin grubu farelerin barsak ve mide dokusundaki MDA seviyeleri metotreksat grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda silimarinin oksidatif hasara karşı barsak ve midede koruyucu bir etki

oluşturduğu ve bununda antioksidan özelliğinin sonucu olduğunu düşünmekteyiz. Serbest radikal üretimine bağlı birçok toksisite ve hastalık durumlarında silimarin koruyucu olarak kullanılmıştır. Örneğin silimarin ve aktif bileşenlerinin, hayvan modellerinde tüberküloz ve kemoterapide kullanılan ilaçların hepatotoksik etkilerine karşı koruyucu özellikleri vardır (30). Antioksidan özelliği bilinen silimarinin etkilerine benzer olarak antiinflamatuvar, antiproliferatif ve immünmodülatör etkileri olan leflunomid adlı bir ajanla yapılan çalışmada bu ilacın metotreksata bağlı ince bağırsak hasarında oksidatif stres sorumlu tutulmuş ve oksidatif parametreleri düzelttiği bildirilmiştir (61). Silimarin ayrıca protein sentezini teşvik ederek karaciğerin yenilenmesine yardımcı olmaktadır. Silimarinin hepatobiliyer hastalıklarda karaciğer koruyucu ve ilaçlara bağlı hepatotoksisteye faydalı olduğu bildirilmiştir (84). Başka bir çalışmada da sıçanlarda sisplatin kullanımına bağlı nefrotoksisteye ve dolaylı olarak oluşan hepatotoksisteye karşı silimarinin toksik etkileri azalttığı rapor edilmiştir (62). Yapılan başka bir çalışmada elde edilen sonuçlarda MTX'in sıçanların ince bağırsağındaki zararlı etkilerine karşı senil sarımsak özütünün koruyucu olabileceği gösterilmiştir (113). Sıçanlarda MTX'in intestinal toksisitesine karşı alfa-lipoik asitin olası koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada MTX'a bağlı intestinal toksisteye karşı düzelmeye olduğu bildirilmiştir (20). Yine başka bir çalışmada da prostaglandin E'nin sentetik bir analogu olan OP-1206'nın muhtemelen MTX uygulanmasına bağlı olarak oluşan ince bağırsak hasarına karşı koruma sağlayarak kemoterapiye yardımcı olabileceği rapor edilmiştir (35). Ayrıca etkilerinin antioksidan özelliklerinin sonucu olduğu düşünülen proantosiyanidinin MTX kaynaklı zararlara karşı sıçanların ince bağırsaklarını koruyabileceği gösterilmiştir (37). Bir çalışmada sarımsak veya silimarin verilmesi karaciğer toksisitesini anlamlı derecede düşürmesine rağmen, kombine yöntemin hepatotoksik gelişmeyi önlemede daha etkili olduğu bildirilmiştir (93).

Araştırmamızda MTX indüklü toksik hasara karşı silimarinin koruyuculuğunu belirlemek için biyokimyasal olarak kan, barsak ve mide dokusundaki TSA değerleri de incelendi. Renal hastalıklarda, şeker hastalığında, merkezi sinir sistemi hastalıklarında, behçet hastalığında, bakteriyel enfeksiyonlarda, chron, psoriasis, artrit gibi inflamatuvar hastalıklarda total sialik asit miktarında önemli düzeyde artış görülmektedir. Çalışmamızda metotreksat grubu farelerin plazma TSA seviyeleri

kontrol ve metotreksat+silimarin grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek gözlemlendi. Ayrıca metotreksat grubu farelerin barsak ve mide dokusundaki TSA seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulundu. Miyokard infarktüsü sonrası, diyabet ve kanser hastalarında sialik asit miktarı yüksek olduğu bildirilmiştir (21, 96). Bir başka çalışmada yaşa bağlı olarak artan serbest radikaller sonucu oluşan hücre hasarı, enzim inaktivasyonu ve bunlara bağlı olarak şekillenen hücresel bozukluklar sonucu plazma sialik asit düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (4, 104). Çalışmada artan TSA düzeylerinin membran yapısında şekillenen hücresel harabiyet sonucu membranlardan sialik asit salınımına bağlı olarak artabileceği görüşünü paylaşmaktadırlar (104). Fakat birçok farklı hastalıkta sialik asit düzeyinin yüksek olmasını açıklayan bir mekanizma halen çok net değildir. Ölçümü yapılan parametrelerden GSH ve TSA ile ilişkili olarak Warren ve Felsenfeld (1962) sialik asit biyosentezinde glutatyona gereksinim duyulduğunu rapor etmişlerdir (114). Serbest radikallerden etkilenen membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda gelişen lipit peroksidasyonundan sonra oluşan lipit hidroperoksitlerin aldehit ve karbonil bileşiklerine dönüşmesi sonucunda MDA meydana gelmektedir. MDA oksidatif hasarın, sistemik dolaşımında düzeyi saptanabilen dolaylı bir göstergesidir. Plazma MDA konsantrasyonu enzimatik olmayan oksidatif lipitperoksit parçalanması sonucu oluşmaktadır. MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipitler ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini göstermektedir (21). Bazı çalışmalar değişik türdeki kanser tiplerinde düşük MDA ve artmış GSH seviyelerini göstermektedir (31, 76). Fakat kanserde MDA ve GSH seviyeleri ile ilgili bir görüş birliği yoktur. Bir çalışmada da mide kanserinde serum TSA seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca GSH azalmış ve MDA'nın da arttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı rapor edilmiştir. GSH daki düşmesinde glutatyonun TSA sentezinde kullanılması ve artmış oksidatif stres nedeniyle olabileceği değerlendirilmektedir. Ayrıca bahsedilen çalışmada TSA ve GSH seviyeleri arasında ve GSH ile MDA seviyeleri arasında zayıf bir ilişki saptandığını bildirmiştir (21).

Araştırmamızda mide ve barsak dokusu histopatolojik yönden incelendi ve çalışmamızı destekleyecek nitelikte patolojik bulgular saptadık. Metotreksat grubu farelerin mide dokusundaki epitel tabakada şiddetli dejenerasyon, nekroz,

deskuamasyon ve oldukça yaygın ödem tespit ettik. Buna karşılık metotreksat+silimarin grubu farelerin mide dokusundaki epitel tabakada orta derecede dejenerasyon ve nekroz saptanırken ödeme rastlanmadı. Silimarin kullanılarak yapılan bir başka çalışmada I/R gruplarında % 60 oranında çok önemli düzeyde tübüler hasar meydana gelmiştir. Silimarinin verilen grupta kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edilmesi silimarinin ROT etkisini önleyebileceğinin göstergesidir (99).

Sonuç olarak, bu bulgular ışığında MTX'in oluşturduğu gastro-intestinal hasara karşı silimarinin koruyucu olduğu gözlenmektedir. Silimarinin antioksidan etkisine ek olarak değişik mekanizmalara bağlı koruyucu özellikleri bulunduğu literatürde rapor edilmişse de, bu çalışmanın kapsamı dahilinde koruyucu etkiyi oluşturan özelliklerinden birisinin de silimarinin antioksidan özelliğinden kaynaklandığı ve silimarinin metotreksat indüklü Gİ hasara karşı kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- 1) Alarcon de la Lastra, A.C., Martin, M.J., Motilva, V., Jimenez, M., La Casa, C., Lopez, A.: Gastroprotection induced by silymarin, the hepatoprotective principle of *Silybum marianum* in ischemia-reperfusion mucosal injury: role of neutrophils. *Planta. Med.*, 61: 116-119, 1995.
- 2) Asghar, Z., Masood, Z.: Evaluation of antioxidant properties of silymarin and its potential to inhibit peroxy radicals in vitro. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 21: 249-254, 2008.
- 3) Altan, N., Dinçel, A.S., Koca, C.: Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Turk. J. Biochem.*, 31(2): 51-56, 2006.
- 4) Aydoğdu, N., Erbaş, H., Kaymak, K.: Taurin, melatonin ve n-asetilsisteinin kadmiyuma bağlı akciğer hasarındaki antioksidan etkileri. *Trakya Üniv. Tıp Fak. Derg.*, 24 (1): 43-48, 2007.
- 5) Barnes, P.J.: Reactive Oxygen Species and Airway Inflammation. *Free. Radic. Biol. Med.*, 9: 235–243, 1990.
- 6) Basiglio, C., Sanchez Pozzi, E.J., Mottino, A.D., Roma, M.G.: Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and hepatocellular lysis. *Chem. Biol. Interact.*, 179: 297-303, 2009.
- 7) Bast, A., Haenen, G.R. M.M. and Doelman, C.J.A.: Oxidants and Antioxidants: State of the Art. *Am. J. Med.*, 91: 2-13, 1991.
- 8) Bendich, A., Marchlin, L.J., Scandurra, O., Burton, G.W. and Wayner, D.D.M.: The Antioxidant Role of Vitamin C. *Adv. Free Radical Bio.*, 2: 419–444, 1986.
- 9) Beutler, E., Duran, O., Kelley, B.M.: Improved method for determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61: 882-888, 1963.
- 10) Block, S.R.: American College of Rheumatology subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.*, 46: 328-46, 2002.
- 11) Brantley, R.E.: The Mechanism of Autoxidation of Myoglobin. *J. Biol. Chem.*, 268: 6995–7010, 1993.
- 12) Bulkley, G.B.: The role of oxygen free radicals in human disease process. *Surgery.*, 94: 407-411, 1983.

- 13) Burton, G.W.: Vitamin E: Molecular and Biological Function. Proc. Nutr. Soc., 53 (2): 251–262, 1994.
- 14) Ciralik, H., Bülbüloğlu, E., Çetinkaya, A., Kurutaş, E.B., Çelik, M., Polat, A.: Effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced small intestinal damage in rats. Mt. Sinai. J. Med., 73: 1086-92, 2006.
- 15) Cheeseman, K.H. and Slater, T.F.: An Introduction to Free Radical Biochemistry. Br. Med. Bull., 49(3): 481-93, 1993.
- 16) Chlopcikova, S., Psotova, J., Miketova, P., Simanek, V.: Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part I. Silymarin and its flavonolignans. Phytother. Res., 18: 107-110, 2004.
- 17) Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Van- Zanden, J. and Van Bladeren, P.J.: The Interplay of Glutathione Related Processes in Antioxidant Defense. Environ. Toxicol. Pharmacol., 10: 141-152, 2001.
- 18) Coles, B., Ketterer, B.: The role of glutathione transferases in chemical carcinogenesis. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 25: 47-70, 1990.
- 19) Cowan, M.M.: Plants products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev., 12: 564-582, 1999.
- 20) Dadhania, V.P., Tripathi, D.N., Vikram, A., Ramarao, P., Jena, G.B.: Intervention of α -lipoic acid ameliorates methotrexate-induced oxidative stress and genotoxicity: A study in rat intestine. Chem. Biol. Interact., 183: 85-97, 2010.
- 21) Dadük, Y.: Mide kanserinde total sialik asit, glutatyon, malondialdehit seviyeleri ve bu parametrelerin birbirleriyle ve kanser evresi ile ilişkisinin incelenmesi. Uzmanlık tezi, Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi I. Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul, 36-42, 2006.
- 22) Deaton, C.M. and Marlin D.J.: Exercise-Associated Oxidative Stress. Clin. Tech. Equine Pract., 2(3): 278-291, 2003.
- 23) Delibaş, N. ve Özçankaya, R.: Serbest Radikaller. S.D.Ü Tıp Fak. Derg., 2 (3): 11-17, 1995.
- 24) Devrim, E., Cetin, R., Kiliçoğlu, B., Ergüder, B.I., Avcı, A., Durak, I.: Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. Ren. Fail., 27 (6): 771-773, 2005.

- 25)** Dickinson, D.A. and Forman, H.J.: Cellular Glutathione and Thiols Metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 64: 1019-1026, 2002.
- 26)** Domigan, N.M., Charlton, T.S., Duncan, M.W., Winterbourn, C.C. and Kettle, A.J.: Chlorination of Tyrosyl Residues in Peptides by Myeloperoxidase and Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 270: 16542–16548, 1995.
- 27)** Dutz, J.P., Ho, V.C.: Immunosuppressive agents in dermatology. An update. *Dermatol. Clin.*, 16 (2): 235-251,1998.
- 28)** Erenel, G., Erbaş, D. ve Arıcıoğlu, A.: Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistemler. *Gazi Tıp Derg.*, 3: 243-250, 1992.
- 29)** Ergönül, S., Aşkar, T.K.: Anaplasmosisli Sığırlarda Isı Şok Protein (HSP), Malondialdehit (MDA), Nitrik Oksit (NO) ve İnterlökin (IL-6, IL-10) Düzeylerinin Araştırılması . *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 15(4): 575-579, 2009.
- 30)** Eminzade, S., Uras, F., İzzettin, V.F.: Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals. *Nutr. Metab.(Lond.)*, 5 (18): 1-8, 2008.
- 31)** Engin, A.: Differences in blood glutathione levels of patients with advanced or localised carcinoma. *Tumori.*, 81: 132-134, 1995.
- 32)** Flores, F., Kerdel, F.A.: Other novel immunosuppressants. *Dermatol. Clin.*, 18 (3): 475-483, 2000.
- 33)** Freeman, B.A. and Crapo, J.D.: Free Radicals and Tissue Injury. *Lab. Invest.*, 47: 412-426, 1982.
- 34)** Freeman, B.A., Crapo, J.D.: Biology of disease: free radicals and tissue damage. *Laboratory Investigation*, 4: 412-426, 1982.
- 35)** Gao, F., Horie, T.: A synthetic analog of prostaglandin E₁ prevents the production of reactive oxygen species in the intestinal mucosa of methotrexate-treated rats. *Life. Sci.*, 71: 1091-1099, 2002.
- 36)** Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G. And Siest, G.: Biological Variability of Superoxide Dismutase, Glutathione peroxidase, and Catalase in Blood. *Clin. Chem.*, 37 (11): 1932-1937, 1991.
- 37)** Gülgün, M., Erdem, O., Öztaş, E., Kesik, V., Balamtekin, N., Vurucu, S., Kul, M., Kısmet, E., Köseoğlu, V.: Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stres. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 62 (2): 109-115, 2010.

- 38)** Halliwell, B.: Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. *Nutr. Rev.*, 52: 253-265, 1994.
- 39)** Halliwell, B.: Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant. Physiol.*, 141: 312-322, 2006.
- 40)** Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.: Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease. *Biochem. J.*, 219: 1-14, 1984.
- 41)** Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.: Free Radicals in Biology and Medicine. Third Edition, Oxford University Pres. Inc., New York, 936s, 1996.
- 42)** Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.: Free Radicals in Biology and Medicine. Third Edition, Oxford University Pres. Inc., New York, 936s, 1999.
- 43)** Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.: Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease. *Methods. Enzymol.*, 280: 1-85, 1990.
- 44)** Hermes-Lima, M. and Zenteno-Savin, T.: Animal Response to Drastic Changes in Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 133: 537–556, 2002.
- 45)** Iqbal, A., Zafar, M. and Faiz, M.: “Screening of some indian medicinal plants for their antimicrobial properties”. *J. Ethnopharmacol.*, 62: 183-193, 1998.
- 46)** Jahovic, N., Sener, G., Cevik, H., Ersoy, Y., Arbak, S., Yegen, B.C.: Amelioration of methotrexate induced enteritis by melatonin in rats. *Cell. Biochem. Funct.*, 22 (3): 169-178, 2004.
- 47)** James, R.: Metotrexate use in rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.*, 23: 779-96, 1997.
- 48)** Jolivet, J., Cowan, K.H., Curt, G.A., Clendeninn, N.J., Chabner, B.A.: The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N. Engl. J. Med.*, 3 (18): 1094-1104, 1983.
- 49)** Jubeh, T.T., Antler, S., Haupt, S., Barenholz, Y., Rubinstein, A.: Local prevention of oxidative stress in the intestinal epithelium of the rat by adhesive liposomes of superoxide dismutase and tempamine. *Mol. Pharm.*, 2: 2-11, 2005.
- 50)** Kane, D., Gogarty, M., O'leary, J., Silva, I., Bermingham, N., Bresnihan, B., Fitzgerald, O.: Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis. Rheum.*, 50 (10): 3286-3295, 2004.

- 51)** Kappus, H.: A Survey of Chemicals Inducing Lipid Peroxidation in Biological systems. *Chem. Phys. Lipids.*, 45: 105–115, 1987.
- 52)** Katiyar, S.K.: Silymarin and skin cancer prevention: anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects. *Int J Oncol.*, 26: 169-176, 2005.
- 53)** Kaya, S., Pirinçci, İ., Ünsal, A., Karaer, Z., Traş, B., Bilgili, A., Akar, F.: *Veteriner Farmakoloji*. Cilt 2, Baskı 4: 700-708, 2007.
- 54)** Kayış, T.: Diazinon'un subletal konsantrasyonlarının *pimpla turionellae* L.'nin eşey oranı ve bazı biyokimyasal parametreleri üzerine etkileri. Doktora uzmanlık tezi, Çukurova Üniv. Fen Bil. Ens., Biyoloji AD., Adana, 1-27, 2010.
- 55)** Kehrer, J.P.: Free Radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.*, 23: 21–48, 1993.
- 56)** Kimura, E., Nishimura, K., Sakata, K., Oga, S., Kashiwagi, K., Igarashi, K.; Methotrexate differentially affects growth of suspension and adherent cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36(5): 814-825, 2004.
- 57)** Konukoğlu, D., Akçay, T.: Glutasyon Metabolizması ve Klinik Önemi. *T. Klin. Tıp Bil.*, 15: 214-218, 1995.
- 58)** Köksal, E., Gülcin, I., Beyza, S., Sarıkaya, O., Bursal, E.: In vitro antioxidant activity of silymarin. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, 24: 395-405, 2009.
- 59)** Kren, V., Walterova, D.: Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.*, 149: 29-41, 2005.
- 60)** Kuralay, F., Yıldız, C., Özütemiz, O.: Effects of trimetazidine on acetic acid-induced colitis in female Swiss rats. *J. Toxicol. Environ. Health. A.*, 66 (2):169–179, 2003.
- 61)** Mana, S.K., Aggarwal, B.B.: Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF- dependent nuclear factor-kappaB activation and gene expression. *J. Immunol.*, 162: 2095-102, 1999.
- 62)** Mansour, H.H., Hafez, H.F., Fahmy, N.M.: Silymarin modulates Cisplatin-Induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J.of Biochem. Mol. Biol.*, 39 (6): 656-661, 2006.
- 63)** Marnett, L.J.: Oxyradicals and DNA Damage. *Carcinogenesis.*, 21: 361-370, 2000.

- 64)** Mates, J.M.: Effects of Antioxidant Enzymes in the Molecular Control of Reactive Oxygen Species, *Toxicology*. *Toxicology.*, 153: 83-104, 2000.
- 65)** Mccord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erithrocuprein (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244: 6049-6055, 1969.
- 66)** Memişoğulları, R.: Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fak. Derg.*, 3: 30-39, 2005.
- 67)** Mercan, U.: Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 15: 91-96, 2004.
- 68)** Miketova, P., Kaemingk, K., Hockenberry, M., Pasvogel, A., Hutter, J., Krull, K., Moore, I.M.: Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol. Res. Nurs.*, 6 (3): 187-195, 2005.
- 69)** Miller, A.L.: Therpeutic Considerations of L-Glutamine. A Review of the Literature. *Altren. Med. Rev.*, 4: 239-248, 1999.
- 70)** Miyazono, Y., Gao, F., Horie, T.: Oxidative stress contributes to methotrexate induced small intestinal toxicity in rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, 39 (11): 1119-1127, 2004.
- 71)** Mohammad, A., Akram, R., Shahin, S., Shekoufeh , N. and Ali, R.: Pesticides and Oxidative Stress: A Review. *Med. Sci. Moni.*, 10(6): 141-147, 2004.
- 72)** Moscone, D.: Determination of Superoxide Dismutase Activity with an Electrochemical Oxygen Probe. *Analytica Chemica Acta.*, 211: 195-204, 1988.
- 73)** Mruk, D.D., Silvestrini, B., Meng-Yun, M.O. and Cheng, C.Y.: Antioxidant Superoxide Dismutase -a Review: Its Function, Regulation in the Testis, and Role in Male Fertility. *Contraception.*, 65: 305-311, 2002.
- 74)** Mytilineou, C., Kramer, B.C. and Yabut, J.A.: Glutathione Depletion and Oxidative Stress. *Parkinsonism. Relat. Disord.*, 8: 385-387, 2002.
- 75)** Nagakubo, J., Tomimatsu, T., Kitajima, M., Takayama, H., Aimi, N., Horie, T.: Characteristics of transport of fluoresceinated methotrexate in rat small intestine. *Life. Sci.*, 69: 739-47, 2001.
- 76)** Navarro, J., Obrador, E., Carretero, J., Petschen, I., Avino, J., Perez, P., Estrela, J.M.: Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer

cells associate with tumour growth *in vivo*. Free. Radic. Biol. Med., 26: 410-418, 1999.

77) Netto, L.E., Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F. and Vercesi, A.E.: Thiol Enzymes Protecting Mitochondria against Oxidative Damage. Methods. Enzymol., 348: 260-270, 2002.

78) Nieto, N., Torres, M.I., Fernandez, M.I., Giron, M.D., Rios, A., Suarez, M.D., Gil, A.: Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. Dig. Dis. Sci., 45: 1820-1827. 2000.

79) Nordberg, J. and Arner, E.S.J.: Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. Free. Radic. Biol. Med., 31: 1287– 1312, 2001.

80) O'Dell, J.R.: Metotrexate leflunomide and combination therapies In:Harris, E.D., Budd, RC., Firestein, G.S., Genovese, M.C., Sargent, J.S., Ruddy, S., Sledge, C.B.: Kelley's Textbook of Rheumatology. Philadelphia, Elsevier Saunders, 7: 900-919, 2005.

81) Oruc Ozcan, E., Sevgiler, Y. and Uner, N.: Tissue-specific Oxidative Stress Responses in Fish Exposed to 2,4-D and Azinphosmethyl. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 137: 43-51, 2004.

82) Özkan, A. and Fiskin, K.: Free Radicals, Carcinogenesis and Antioxidant Enzymes. Tr. J. Hem. Oncol., 14: 52-60, 2004.

83) Packer, L., Weber, S.U. and Rimbach, G.: Molecular Aspects of Alpha-Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling. J. Nutr., 31: 369-373, 2001.

84) Pradhan, S.C., Girish, C.: Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Indian. J. Med. Res., 124: 491-504, 2006.

85) Ramasamy, K., Agarwal, R.: Multitargeted therapy of cancer by silymarin. Cancer. Lett., 269: 352-362, 2008.

86) Reiter, R.J.: Interactions of the Pineal Hormone Melatonin with Oxygen-Centered Free Radicals. Braz. J. Med. Biol. Res., 26: 1141-1155, 1993.

87) Reiter, R.J.: Antioxidant Actions of Melatonin. Adv. Pharmacol., 38: 103-110, 1997.

88) Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T. and Symons, M. C. R.: Techniques in Free Radicals Research. Elsevier, Amsterdam, 22: 1-278, 1991.

- 89)** Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V., Reiter, R.J.: Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal. Res.*, 36: 1-9, 2004.
- 90)** Rubino, F.M.: Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 764: 217-254, 2001.
- 91)** Sener, G., Eksioğlu-Demiralp, E., Cetiner, M., Ercan, F., Yegen, B.C.: Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur. J. Pharmacol.*, 542: 170-178, 2006.
- 92)** Serafini, M. and Del Rio, D.: Understanding the Association Between Dietary Antioxidants, Redox Status and Disease: Is the Total Antioxidant Capacity the Right Tool? *Redox. Rep.*, 9 (3): 145-152, 2004.
- 93)** Shaarawy, S.M., Tohamy, A.A., Elgendy, S.M., Abd Elmageed, Y.Z., Bahnasy, A., Mohamed, M.S., Kandil, E., Matrougui, K.: Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity. *Int. J. Biol. Sci.*, 5 (6): 549-557, 2009.
- 94)** Siegers, C.P., Riemann, D., Thies, E., Younes, M.: Glutathione and GSH dependent enzymes in the gastrointestinal mucosa of the rat. *Cancer. Lett.*, 40: 71-6, 1988.
- 95)** Sies, H.: Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *Am. J. Med.*, 91: 31-38, 1991.
- 96)** Sillanaukee, P., Pannio, M., Jaaskelainen, I.P.: Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur. J. Clin. Invest.*, 29: 413-425, 1999.
- 97)** Song, O.: Oxidative Stress: A Theoretical Model or Biological Reality? *C.R. Biologies.*, 327: 649-662, 2004.
- 98)** Sydow, G.: A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. *Biomed. Biochim. Acta.*, 44: 1721-1723, 1985.
- 99)** Şentürk, H., Kabay, S., Bayramoğlu, G., Özden, H., Yaylak, F., Yucel, M., Olgun, E.G., Kutlu, A.: Silymarin attenuates the renal ischemia/reperfusion injury-induced morphological changes in the rat kidney. *World. J. Urol.*, 26: 401-407, 2008.
- 100)** Şentürk, H., Kolankaya, D., Şahin, Y.: Renal İskemi-Reperfüzyonnu Sırasında Sıçan Böbreğinde Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Silimarin Etkisi. *Çankaya University Journal of Science and Engineering.*, 7 (1): 59-74, 2010.

- 101)** Thornaley, P.J. and Vasak, M.: Possible Role of Metallothionein in Protection against Radiation-Induced Oxidative Stress: Kinetics and Mechanism of Its Reaction with Superoxide and Hydroxyl Radicals. *Biochim. Biophys. Acta.*, 827: 35–44, 1985.
- 102)** Thurnham, D.I.: Antioxidants and Prooxidants in Malnourished Populations. *Proc. Nutr. Soc.*, 49: 247–259, 1990.
- 103)** Uraz, S., Tahan, V., Aygun, C., Eren, F., Unluguzel, G., Yuksel, M., Senturk, O., Avsar, E., Haklar, G., Celikel, C., Hulagu, S., Tozun, N.: Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate induced liver toxicity. *Dig. Dis. Sci.*, 53(4): 1071-1077, 2008.
- 104)** Uslu, İ., Uslu, E., Belet, A., Kolođlu, E., Altuđ, T.: Yaşlanmanın sialik asit metabolizması üzerine etkisi. *Endokron. Yn. Derg.*, 4: 23-25, 1995.
- 105)** Uz, E., Oktem, F., Yilmaz, H.R., Uzar, E., Oztgner, F.: The activities of purinecatabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol. Cell. Biochem.*, 277: 165-170, 2005.
- 106)** nl, M. ve Akkaya, A.: Reaktif Oksijen Metabolitleri ve Akciğer Hastalıkları. *Solunum Hast.*, 10: 207–211, 1999.
- 107)** Vaca, C.E., Wilhelm, J. and Harms-Ringdahl, M.: Interactions of Lipid Peroxidation Products with DNA. A review. *Mutat. Res.*, 195: 137–149, 1987.
- 108)** Valavanidis, A., Vlahoglanni, T., Dassenakis, M. and Scoullas, M.: Molecular Biomarkers of Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Toxic Environmental Pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64: 178–179, 2006.
- 109)** Van Ede, A.E., Laan, R.F., Blom, H.J., De Abreu, R.A., Van de Putte, L.B.: Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin. Arthritis. Rheum.*, 27 (5): 277-292, 1998.
- 110)** Yarsan, E.: Lipit peroksidasyon olayı ve nlenmesine yönelik uygulamalar. *Y.Y.. Vet. Fak. Derg.*, 9: 89-95, 1998.
- 111)** Yılmaz, O.: Probiyotiklerin ratlarda metotreksat toksisitesi üzerine olan etkileri. Uzmanlık tezi, Sleyman Demirel niv. Tıp Fak. İ Hastalıkları AD., Isparta, 1-7, 2008.

- 112)** Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., Mori, M.: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active-oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135: 372-376, 1979.
- 113)** Yüncü, M., Eralp, A., Çelik, A.: Effect of aged garlic extract against methotrexate-induced damage to the small intestine in rats. *Phytother. Res.*, 20: 504-510, 2006.
- 114)** Warren, L., Felsenfeld, H.: The biosynthesis of sialic acid. *J. Biol. Chem.*, 237 (5): 1421-1431, 1962.
- 115)** Weinblatt, M.E.: Methotrexate. In: Wilicam N. Kelley, *Textbook of Rheumatology*. 4: 767-778, 1993.
- 116)** Wickens, A.P.: Aging and Free Radical Theory. *Respir. Physiol.*, 128: 379-391, 2001.
- 117)** Williams, J.G., Hughes, L.E., Hallet, M.B.: Toxic oxygen metabolite production by circulating phagocytic cells in inflammatory bowel disease. *Gut.*, 31(2): 187-193, 1990.

7. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Kars'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kars'da tamamladı. 2003 yılında girdiği Kafkas Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü'nden 2007 yılında mezun oldu. 2007-2008 yılları arasında İstanbul Kadıköy Acıbadem Hastanesinde hemşire olarak görev yapmıştır. 2008 yılı içerisinde Arpaçaya'a bağlı Koçköy Sağlık Ocağı'nda hemşire olarak görev yapmıştır. 2008 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2008 den beri Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde hemşire olarak görev yapmaktadır.