



**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI
BÖBREK TOKSİSİTESİ ÜZERİNE MORİNİN
KORUYUCU ETKİSİ**

Şeyda SEÇGİN

**2021
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN**

**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI BÖBREK TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE MORİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

Şeyda SEÇGİN

**T.C.
Karabük Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN**

**KARABÜK
Eylül 2021**

Şeyda SEÇGİN tarafından hazırlanan “SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI BÖBREK TOKSİSİTESİ ÜZERİNE MORİNİN KORUYUCU ETKİSİ” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN

Tez Danışmanı, Tıbbi Biyokimya

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 30/09/2021

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Ramazan ŞEKEROĞLU (SAÜ)

Üye : Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN (KBÜ)

Üye : Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ (KBÜ)

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Hasan SOLMAZ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Şeyda SEÇGİN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI BÖBREK TOKSİSİTESİ ÜZERİNE MORİNİN KORUYUCU ETKİSİ

Şeyda SEÇGİN

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN

Eylül 2021, 59 sayfa

Antimetabolit grubu ilaçların geniş kullanım alanları olmasına rağmen birçok yan etkisi de mevcuttur. Meydana gelen bu yan etkileri yok etmede bitkisel kökenli ürünlerin (özellikle flavonoidler) kullanımını birçok biyokimyasal ve farmakolojik yararlanımından dolayı oldukça önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı Morin (3, 5, 7, 2', 4'-pentahidroksiflavon, MOR) flavonoidinin sıçanlarda Metotreksat (MTX) antimetaboliti kaynaklı böbrek toksisitesinde antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri araştırmak için yapılmıştır. Bu çalışmada 32 deney hayvanı her bir grup 8 sıçandan oluşacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Grup 1 (Kontrol), Grup 2 (MOR), Grup 3 (MTX), Grup 4 (MTX+MOR) şeklinde gruplar oluşturulup MTX 20 mg/kg intraperitoneal tek doz, MOR ise 100 mg/kg dozunda intragastrik yolla 10 gün süre ile uygulandı. Oksidatif stres belirteçleri olan malondialdehid (MDA), Total Oksidan Seviyesi (TOS) değerlerinde MTX grubuna göre kontrol, MTX+MOR ve MOR grupları arasında anlamlı bir artış oldu ($p<0.05$). Total Oksidan Seviyesi (TOS)

değerlerinde ise MTX+MOR grubuna göre MTX grubunda anlamlı bir artış oldu ($p<0.05$). Antioksidan kapasite değerlendirilmesinde Total Antioksidan Seviyesi (TAS), glutatyon (GSH), Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) değerlerinde MTX+MOR grubuna göre MOR grupları arasında anlamlı bir azalış oldu ($p<0.05$). Oluşturulan böbrek toksisinde böbrek fonksiyon değerlerinin analizi için serumda üre ($p>0.05$), kreatinin ($p>0.05$), ürik asit ($p<0.05$) ve total protein ($p<0.05$) değerlerine bakıldı. Özellikle MTX grubunda tüm değerlerde artış vardı fakat sadece ürik asitte anlamlı bir artışın olduğu bulundu. Ayrıca MTX+MOR grubunda ise bu değerlerin MOR ile düzeltilebildiği tespit edildi. Böbrek dokusunun histopatolojik değerlendirilmesinde MOR ve Kontrol grubunda normal histopatolojik bulgulara rastlandı. MTX, MTX+MOR gruplarında tübüller intersitisyel alanlar, glomerüler yumakta; enflamasyon, fibrozis, atrofi, dejenerasyon ve nekroz gibi patolojik bulgulara rastlandı. Fakat bu patolojilerin MTX+MOR grubunda MTX grubuna göre anlamlı azalışın olduğu bulundu ($p<0.05$). Sonuç olarak MTX'in böbrek dokusunda oksidatif stres, enflamasyon ve apoptoz gibi birçok etkisinin dokudaki biyokimyasal ve histopatolojik bulgular sonucu var olduğu görüldü. MOR'un ise toksik etkisinin oldukça az olması avantajı ile MTX'in sebep olduğu toksikasyonu ciddi oranda azalttığı görüldü, benzer ve destekleyici çalışmalarla mekanizmaların daha da aydınlatarak katkı da sağlayacağı görüşüne varıldı.

Anahtar Sözcükler : Metotreksat, Morin, Oksidatif stres, Toksikite, Böbrek dokusu.

Bilim Kodu : 1090

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

PROTECTIVE EFFECT OF MORIN IN METHOTREXAT INDUCED RENAL TOXICITY IN RATS

Şeyda SEÇGİN

**Karabük University
Institute of Graduate Programs
Department of Medical Biochemistry**

Thesis Advisor:

Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN

September 2021, 59 pages

Antimetabolite is for widespread use in the field of education. My biological flavonoids are used to benefit from these tools. This purpose was made for investigations of Morine (3, 5, 7, 2', 4'-pentahydroxyflavone, MOR) flavonoid from Methotrexate (MTX) antimetabolites, inflammation in the body, and antiapoptotic treatments in mice. In this study, 32 experimental animals were divided into 4 groups, each group consisting of 8 rats. Groups as Group 1 (Control), Group 2 (MOR), Group 3 (MTX), Group 4 (MTX+MOR) were formed and MTX was administered at a dose of 20 mg/kg intraperitoneally as a single dose, and MOR at a dose of 100 mg/kg intragastrically for 10 days. Done. There was a significant increase in malondialdehyde (MDA), Total Oxidant Status (TOS) values, which are oxidative stress markers, between the control, MTX+MOR and MOR groups compared to the MTX group ($p<0.05$). There was a significant increase in Total Oxidant Status (TOS) values in the MTX group compared to the MTX+MOR group ($p<0.05$). In the evaluation of

antioxidant capacity, there was a significant decrease in Total Antioxidant Status (TAS), glutathione (GSH), Oxidative Stress Index (OSI) values between MOR groups compared to MTX+MOR group ($p < 0.05$). Serum urea ($p > 0.05$), creatinine ($p > 0.05$), uric acid ($p < 0.05$) and total protein ($p < 0.05$) values were measured for the analysis of kidney function values in the generated kidney toxicity. There was an increase in all values, especially in the MTX group, but only a significant increase in uric acid was found. In addition, it was determined that these values could be corrected with MOR in the MTX+MOR group. In the histopathological evaluation of the kidney tissue, normal histopathological findings were found in the MOR and Control groups. In MTX, MTX+MOR groups, tubular interstitial areas were in the glomerular tuft; Pathological findings such as inflammation, fibrosis, atrophy, degeneration and necrosis were encountered. However, these pathologies were found to be significantly decreased in the MTX+MOR group compared to the MTX group ($p < 0.05$). As a result, it was seen that many effects of MTX in kidney tissue such as oxidative stress, inflammation and apoptosis were present as a result of biochemical and histopathological findings in the tissue. MOR, on the other hand, has the advantage of having a very low toxic effect, and it has been observed that it significantly reduces the toxicity caused by MTX, and it has been concluded that similar and supportive studies will contribute by further illuminating the mechanisms.

Key Word : Methotrexate, Morin, Oxidative stress, Toxicity, Kidney tissue.

Science Code : 1090

TEŞEKKÜR

Öncelikle danışmanlığımı üstlenen, bana bu tezin hipotezinin oluşturulmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında beni sınırlandırmayıp her aşamasında destek olan, bilgi ve deneyimi ile bana yön veren danışmanım Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN'a

Histopatolojik incelemeleri yaparak tezimin tamamlanmasında yardımcı olan Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hikmet KELEŞ ve Doktora öğrencisi Veteriner Hekim Muhammad Nasir BHAY'a,

Yüksek lisans tez çalışmalarım esnasında maddi destek sağlayan Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TYL-2020-2336),

Deneysel çalışmaların gerçekleştirilmesinde Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deneysel Hayvanı Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına,

Bu yaşa kadar hayatımın her anında verdiği sevgisi ve öğütleriyle güçlendiğim dedem, babaannem, babam ve kardeşlerime,

Hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, sonsuz sevgi, sabır ve desteğiyle her zaman yanımda hissettiğim canım kızım ve eşim Arş. Gör. Yusuf SEÇGİN'e
TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
GENEL BİLGİ.....	3
2.1. BÖBREK.....	3
2.2. METOTREKSAT.....	4
2.2.1. Metotreksatın Kimyasal Yapısı ve Metabolizması.....	5
2.2.2. Metotreksatın Farmakokinetiği.....	9
2.2.3. Metotreksatın Yan Etkileri	10
2.2.3.1. Metotreksatın Böbrek Toksisitesi	12
2.3. FLAVONOİD.....	13
2.4. MORİN.....	14
2.5. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ, OKSİDATİF STRES.....	16
2.6. ANTİOKSİDAN MEKANİZMA.....	18
BÖLÜM 3	20
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	20
3.1. DENEY HAYVANLARI.....	20
3.2. KULLANILAN MALZEMELER.....	20
3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	22
3.4. NUMUNE ALINMASI.....	23

3.5. ÇALIŞMA ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI VE ANALİZ METOTLARI.....	23
3.5.1. Doku Homojenizasyonu	23
3.5.2. Dokuda Malondialdehit (MDA) Analizi	24
3.5.2. Doku Redükte-Glutatyon (GSH) Analizi	25
3.5.3. Doku Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi	26
3.5.4. Doku Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi	26
3.5.5. Doku Oksidatif Stres İndeksi (OSİ).....	27
3.5.6. Dokuda Total Protein Analizi.....	27
3.5.7. Serum Analizleri	27
3.5.8. Histopatolojik Analiz.....	27
3.5.9. İstatistiksel Analiz	28
BÖLÜM 4	29
BULGULAR.....	29
4.1. BÖBREK DOKUSUNA AİT BİYOKİMYASAL BULGULAR	29
4.1.1. Böbrek Dokusu Malondialdehit (MDA) Düzeyleri.....	29
4.1.2. Böbrek Dokusu Glutatyon (GSH) Düzeyleri.....	30
4.1.3. Böbrek Dokusu Total Oksidan Seviyesi (TOS) Düzeyleri.....	31
4.1.4. Böbrek Dokusu Total Antioksidan (TAS) Aktivite Düzeyleri.....	32
4.1.5. Böbrek Dokusu Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Aktivite Düzeyleri	33
4.2. SERUMDA BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI.....	34
4.2.1. Serumda Üre Düzeyleri	35
4.2.2. Serumda Kreatinin Düzeyleri	35
4.2.3. Serumda Total Protein Düzeyleri	36
4.2.4. Serumda Ürik Asit Düzeyleri	37
4.3. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	38
BÖLÜM 5	40
TARTIŞMA	40
KAYNAKLAR	48
EK AÇIKLAMALAR A. ETİK KURUL İZİNİ	56
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. MTX ve folik asitin kimyasal formülüzasyonu	6
Şekil 2.2. MTX-PGS'nin inhibe ettiği metabolik yollar	7
Şekil 2.3. MTX'in transmetilasyon tepkimesi mekanizması.	8
Şekil 2.4. MTX-PGS'nin hücre içi mekanizması	10
Şekil 2.5. Morinin moleküler formülü ($C_{15}H_{10}O_7$).....	14
Şekil 2.6. Morin'in elektron mikroskobu kristal yapısı	15
Şekil 4.1. Böbrek dokusu MDA düzeyleri (nmol/mg protein).....	30
Şekil 4.2. Böbrek dokusu GSH analizi değerleri ($\mu\text{mol/mg protein}$).....	31
Şekil 4.3. Böbrek dokusu TOS Aktivite Düzeyleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{equiv/L}$).....	32
Şekil 4.4. Böbrek dokusu TAS aktivite düzeyleri (mmol Trolox Equiv/L).....	33
Şekil 4.5. Böbrek dokusu OSİ Aktivite Düzeyleri.....	34
Şekil 4.6. Serumda üre düzeyleri (mg/dL).	35
Şekil 4.7. Serumda kreatinin düzeyleri (mg/dL).	36
Şekil 4.8. Serumda total protein düzeyleri (g/dL).	37
Şekil 4.9. Serumda ürik asit düzeyleri (mg/dL).	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal malzemeler.....	21
Çizelge 3.2. Kullanılan laboratuvar araç ve gereçleri.....	22
Çizelge 4.1. Böbrek dokusunda MDA, GSH, TOS, TAS ve OSİ değerleri.....	29
Çizelge 4.2. Serumda üre, kreatinin, total protein ve ürik asit değerleri.....	34

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

RO ⁻	: Alkoksil radikali
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum fosfat
C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	: Folik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
OH ⁻	: Hidroksil radikali
HOCl	: Hipokloröz asit
10-metilpteroil-L-glutamik asit	: Metotreksat
3, 5, 7, 2', 4'-pentahidroksiflavon:	Morin
NaMoS	: Morin-7-sülfat sodyum
NO ⁻	: Nitrik oksit radikali
ROO ⁻	: Organik peroksit radikali
HOO ⁻	: Perhidroksil radikali
¹ O ₂	: Singlet oksijen radikali
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
DTNB	: 5'- Ditiyobis 2-Nitrobenzoik asit

KISALTMALAR

TAT	: Alternatif tedavi
AİCAR	: Aminoidazol karboksamid ribozil 5 fosfat
ABCC	: ATP bağlayıcı kaset
dATP	: Deoksiadenozin, deoksiadenozin trifosfat
DHF	: Dihidrofolat
DHFR	: Dihidrofolat redüktazın
DOX	: Doksorubisin
LD-MTX	: Düşük doz metotreksat

FPGS	: Folilpoliglutamil sentetaz
GAR	: Glisinamid ribozil 5 fosfat
GFR	: Glomerüler filtrasyon hızı
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HE	: Hematoksilen-eozin
IL	: İnterlökin
IP	: İntraperitonal
CAT	: Katalaz
LOX	: Lipoksijenaz
MDA	: Malondialdehid
MTX	: Metotreksat
MPO	: Miyeloperoksidaz
MOR	: Morin
NAD+	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADP(H)	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NSAİD	: Non-steroid antiinflamatuvar
OSİ	: Oksidatif stres indeksi
MAPK	: Protein kinaz
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
RA	: Romatoid artrit
COX	: Siklooksijenaz
SC-MTX	: Subkutan metotreksat
SOD	: Süperoksit dismutaz
SAH	: S-Adenozil homosistein
THF	: Tetrahidrofolat
TAS	: Total antioksidan seviye
TOS	: Total oksidan seviye
STAT3	: Transkripsiyon 3
HD-MTX	: Yüksek doz metotreksat
7-OH-MTX7	: 7 Hidroksimetotreksat

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Folat antagonisti olan metotreksat (MTX) uzun yıllardır psöriatik artrit, romatoid artrit (RA), lösemiler, neoplazmalar, otoimmün hastalıkların tedavisinde yer almış günümüzde ise vaskülitler, sarkoidoz, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, sistemik lupus eritematozus ve diğer bağ dokusu hastalıkları, ektopik gebelik ve tıbbi düşüklerin tedavisinde de kombine veya tek başına verilen antimetabolit grubu bir ilaçtır [1, 2]. Birçok hastalığın endikasyonunda yer alan MTX'in birçok ciddi komplikasyonları vardır. Başlıca bu komplikasyonların hücre yenilenmesinin fazla olduğu kemik iliği, bağırsak lümeni, karaciğer ve böbrek dokusunda fazla görüldüğü klinik ve deneysel çalışmalarda belirtilmektedir [1, 3]. Komplikasyonlar akut kullanımdan ziyade uzun süre ve yüksek doz kullanımla doğru orantılı olarak görülmektedir. Antimetabolitler normal hücrede toksisite göstermezken hücre proliferasyonunun S fazında latent sitotoksik etki yaparak hücreyi apoptoza sürükler. Bu metabolik durum böbrek, karaciğer ve tümör hücresindeki etki mekanizmasını açıklamada karşımıza çıkmaktadır [4].

Eski çağlarından bu yana bitkilerin şifa kaynağı olarak kullanımı farmakolojik bir öneme sahiptir. Bitkisel kökenli maddelerin geleneksel tıpta da ne derece bir yere sahip olduğunu gittikçe artan ilgi doğrultusunda görmekteyiz. Organik ve bitkisel kökenli ürünlerin kullanımı gittikçe yaygınlık kazanmaktadır. Bitki, meyve ve sebzelerin doğrudan veya dolaylı olarak kullanımı modern tıpta ilaç sanayisinde de yerini almaktadır. Bu derece önemli olan ve fenolik bileşikler olarak adlandırdığımız bu maddeler antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser, hipolipidemik, hipoglisemik etkisi olan sekonder metabolitlerdir. Fenol bileşiklerden olan flavonoidin oksidatif strese karşı güçlü antioksidan etkisi ayrıca hipoglisemik ve hepatorenal sistemde koruyucu etkileri mevcuttur. Bu özelliklerinin yanı sıra enzimatik yollarda enzim inhibitörü rolü

ve çok fazla farmakolojik, biyokimyasal aktivitesinin olduğu literatürde yer almaktadır [5, 6].

Morin (MOR)'de birçok bitkide bulunan bitkisel ilaç olarak kullanılan bir polifenoldür. Birçok hastalığın tedavisinde kullanılabileceğine dair kanıtlar çalışmalarda yer almaktadır. Metabolizmadaki birçok enzimin etkisine işlevsel uyum sağlayarak antioksidan, antieflamatuar, nöroprotektif, antibakteriyel, antineoplazmik, antihipertansif etkiler göstermektedir [7].

MOR'un hidrofilik özelliğinin az olması sebebiyle MOR'dan sentezlenen morin-7-sülfat sodyum (NaMoS)'un klinik kullanım alanını genişletebileceği ve etkisinin artırabileceği yönünde çalışmalar yer almaktadır. MOR'un antikanser özelliğini kanıtlayıcı çalışmalar varken NaMoS'un fare melanom hücrelerinde etkisine bakılan çalışmada sinyal iletim inhibitörü rolü, hücre proliferasyonunu durdurucu ve hücreyi apoptoza sürükleyici özelliği olduğu tespit edilmiştir. Fakat bu çalışmaların arttırılarak belirsizliği kanıtlayıcı, destekleyici çalışmaların olması gerektiği vurgulanmıştır [8].

MOR uzun süreli ve yüksek doz kullanıldığı zaman toksikasyon etkisinin çok az olması nedeniyle tedavi amaçlı kullanımda oldukça avantajlı bir bileşik olarak karşımıza çıkmaktadır [9]. Birçok yan etkisi bulunan antimetabolit grubu ilaç MTX'in toksikasyonlarında MOR'un koruyucu etkisinin ortaya konması amaçlandı. MOR'un koruyucu etkilerinin ortaya çıkarılması ile klinikte antimetabolit ilaçlarla kombine tedavi şeklinde gıda takviyesi olarak eklenebileceği hipotezi kuruldu.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİ

2.1. BÖBREK

Böbrekler colomna vertebralis'in her iki tarafına yerleşmiş etrafında gevşek bağ ve yağ dokusu ayrıca ön yüzünde peritoneum'la örtülü bir idrarı kandan süzen bir organdır. Sağ böbrek sol böbreğe göre karaciğerin konumundan dolayı daha aşağıda bulunur [10, 11].

Böbreğin fonksiyonu arteryal kan basıncı dengesi, bazı hormonların salgılanması, metabolizasyonu ve atılımı, idrar oluşumu, atık ürünlerin ıtrahı, vücut sıvılarının osmolaritesinin ve elektrolit yoğunluğunun düzenlenmesi, asit baz dengesi gibi homoestazisin sağlanmasındaki olaylardır [10, 11].

Böbreğin kesitini incelediğimiz zaman dıştaki daha açık renkli kısma cortex renalis içerisindeki daha koyu kısma medulla renalis denilir. Orta kısımda yer alan geniş boşluğa ise sinüs renalis adı verilmektedir. Sinüs renalis'in içerisinde calix minor, calix major ve pelvis renalis yer alır. Cortex renalis'te idrarı süzen yapılar bulunurken, medulla renalis'te toplayıcı kanallar yer almaktadır [10, 11].

Glomerulus'tan başlayıp papilla renalis'teki foramen papillare ile son bulan kanal sistemine tubulus renalis denir. Tubulus renalis'in birinci bölümünü idrar kanalcıkları oluşturur ve bu bölüm idrarın kandan süzülme işleminin olduğu yerdir. Bu bölüm bowman kapsülü ve içerisindeki glomerulus adı verilen damar ağından oluşmuştur. Bu damar ağına ve etrafındaki bowman kapsülüne corpusculum renale denir. Bir böbreğin cortex kısmında yaklaşık olarak 1.250.000 tane corpusculum renale bulunur. Corpusculum renale ile buna bağlı idrar kanalcığı nefron adı verilen kandan idrarı süzme işini yapan birimleri oluşturur. İkinci bölümü ise idrarın taşınmasında görev

alan toplayıcı kanallar meydana getirir. Bu kanal sistemi sırasıyla proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül, toplayıcı tübül ve kanallardan oluşur. Henle kulpu idrarın yoğunlaştırılması ve dilüzyonunda rol alır. Henle kulpunun inen ince kolu suya çok geçirgen NaCl ye ise az geçirgen iken çıkan ince kolu tam tersidir. Distal tubulün duvarındaki modifiye epiteloid hücrelerden renin sentezlenir ve salgılanır. Ayrıca burada yer alan macula densa hücreleri sodyum (Na) iyon konsantrasyonu azaldığında glomerüler filtrasyonuda azaltırlar. Bu durum macula densa hücreleri tarafından jukstra glomerüler apparatusa iletilerek renin sentezlenir ve salgılanır. Bunun neticesinde meydana gelen anjitenin II damarları daraltarak bu düşen kan basıncını arttırılmasında rol alır [10, 11].

2.2. METOTREKSAT

MTX, antineoplastik grubunun sentetik folik asit antimetaboliti olarak etki gösteren bir ilaçtır [3, 12]. Bilim adamları 1940'lı yıllarda New York'ta çocukluk çağı lösemisiyle baş edebilmek için birçok deneysel, klinik çalışmalar üzerine durmaya başlamışlardır. Bu yıllarda Hint kökenli Amerikalı biyokimyacı Yella Pragada Subbarow da karaciğerden folik asit ekstraksiyonu üzerine çalışmaktaydı. Bu durumdan haberi olan diğer bilim insanları deneysel çalışmalarında hayvanlara intravenöz yolla folik asit vermişler ve hayvanlarda kanser hücrelerinin proliferasyonunun durduğu gözlemlemişlerdir. Fakat verdikleri preparatın tam olarak ne içerdiği ile ilgili fark etmedikleri bir durum söz konusuydu. Daha sonra Faber ve ark. [13] bu deneyi kliniğe taşıyarak, hastalara verilen folik asit takviyeleri sonucunda hastalarda kötüye giden klinik bir durum söz konusu oldu. Tabii yine de her şey bitmiş değildi. Tümör hücrelerini bu bileşikten yoksun bırakarak tümör hücresi proliferasyonunun ortadan kaldırılabilceği oldukça akıllı bir fikirdi. Faber'in verdiği destek ile Subbarow ve ark. hücre proliferasyonunda önemli bileşik olan folik asit antagonistini tedavide kullanılırsa, DNA ve RNA sentezindeki aksaklıkla tümör hücrelerinin büyümesi baskılanacağı hipotezine varmışlardır [14]. Daha sonra Subbarow ve meslektaşları 4-aminopteroylglutamik asit (aminopterin) ve amopterin moleküllerini sentezlemişlerdir. 1950'de de bu moleküller lösemide klinik kullanım için tavsiye edilmiştir [15].

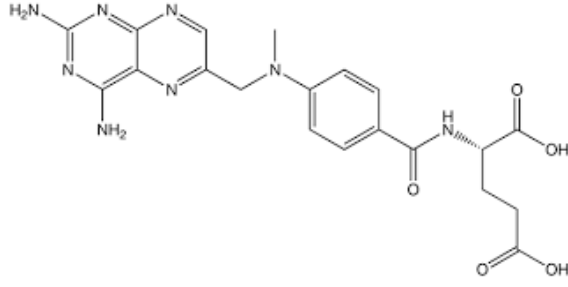
Aminopterin molekülünün kararsızlığı ve sentezinin zorluğundan dolayı analog Amethopterin kliniklerde yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır [14]. Yapılan diğer çalışmalarda aminopterinin steroide benzer etkilerini gözlemleyerek bu duruma dikkat çekip RA, psoriatik artrit, sedef hastalığında aminopterin uygulamışlar ve yan etkilerinin yanında iyileşmeler de gözlemlemişlerdir [3, 16, 17]. Fakat gelişen bu yan etkiler (yara iyileşmesinde gecikme, ishal, alopesi, oral ülserasyon gibi) klinik kullanımını kısıtlayan sorunlar olarak ortaya çıkmıştır. Daha sonra MTX (N-10-metilaminopterin) molekülü Subbarow tarafından sentezlenmiştir [14].

MTX'in hem malign hem de malignite dışında çok fazla hastalığın tedavisinde kullanılmasından dolayı Dünya Sağlık Örgütü'nce de başarı derecesi büyük temel ilaçların arasında kabul edilmektedir [2]. Klinikte en yaygın olarak kullanılan folat antagonisti olan bu ilaç piyasada karşımıza Metotreksat LPF, Metotreksat Sodyum, NSC-740, Amethopterin ve Rheumatrex olarak çıkmaktadır [18].

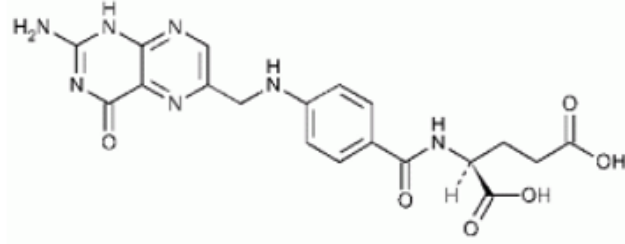
2.2.1. Metotreksatın Kimyasal Yapısı ve Metabolizması

Kimyasal yapısı folik asite (pteroil glutamik asit, $C_{19}H_{19}N_7O_6$) benzeyen MTX (4-amino-4-deoksi-N 10-metilpteroil-L-glutamik asit, $C_{20}H_{22}N_8O_5$) zayıf bir karboksilik asittir [19]. Birden fazla metil grubu olan MTX'te dihidrofolat (DHF) bileşiğinin hidroksil grubunun olduğu yerde NH_2 yer alır (Şekil 2.1), [3, 15].

Metotreksat



Folik asit



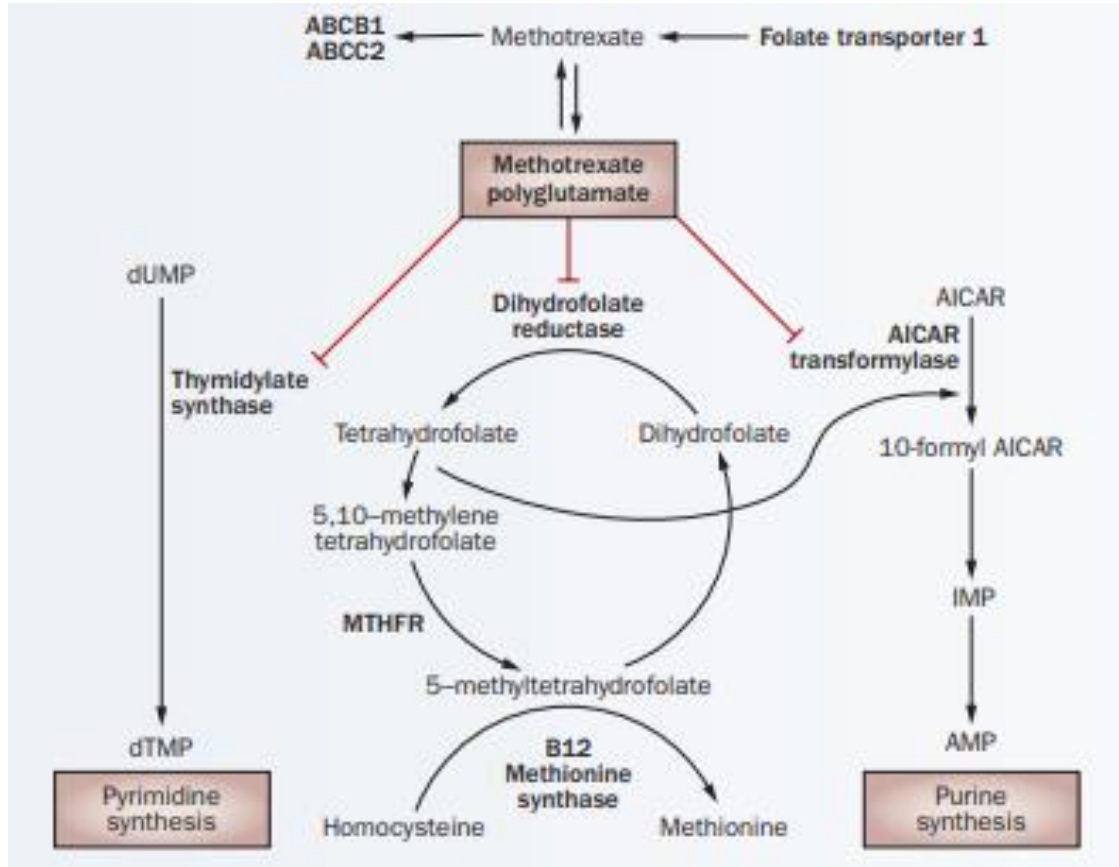
Şekil 2.1. MTX ve folik asitin kimyasal formülüzasyonu [20].

Bu benzerlikle birlikte afinitesi folik asite göre daha yüksek olan MTX dihidrofolatın (DHF), tetrahidrofolata (THF) dönüşümü aşamasında görev alan dihidrofolat redüktazın (DHFR) inhibisyonunda önemli rol oynar. Bu inhibisyon sonucunda DHF ortamda dihidrofolatglutamat şeklinde birikerek hücrede transformilaz enzimlerinin baskılanmasıyla poliglutamatlar; 1-4 glutamat gruplar ile folilpoliglutamil sentetazlarında (FPGS) eklenmesi sonucu MTX- PGs (poliglutamil türevleri) meydana gelir [1, 21].

MTX-PGS'ler DHFR'ın inhibisyonu ile ortamda THF oluşumuna engel olarak, 5-10 metilen THF redüktaz, aminoidazol karboksamid ribozil 5 fosfat (AİCAR) formiltransferaz, glisinamid ribozil 5 fosfat (GAR) formiltransferaz enzimlerini baskılar ve pürin nükleotitleri, pirimidin timidilat sentezine etki ederek hücre proliferasyonu için gerekli DNA, RNA'nın sentezi inhibe eder ve yüksek enerjili ATP'nin üretimini olumsuz etkiler [22].

Poliglutamatlar vücutta hepatositler, fibroblast, sinoviyosit, kemik iliği, eritrositlerde ölçümleri yapılmış olup vücudun neredeyse çoğu hücresinde bulunduğu kaynaklarda yer almaktadır. [2, 23]. İmmün hücre sınıfında yer alan nötrofil, T hücre ve makrofaj gibi çeşitli hücrelerle etkileşimi olan adenzin, birçok güçlü fizyolojik özelliği olan önemli bir antienflamatuardır. Hücre içinde MTX-PGS'nin inhibe ettiği AİCAR

formiltransferaz enzimi sonrasında AİCAR birikimi ekstraselüler sıvıya adenozin salınımına sebep olur [24]. Adenozinin immün hücrelerle oluşan antiinflamuar etkisinin yanında; homosistesinin metiyonine dönüşümü sırasında baskılanmaya sebep olan MTX, hücrede homosistein birikimi ile adenozin salınmasına sebep olur [25]. Adenozinin ekstraselüler sıvıya salınmasına sebep olan bu olaylar MTX'in antiinflamuar ve immünosupresif etkileridir (Şekil 2.2), [2, 25].



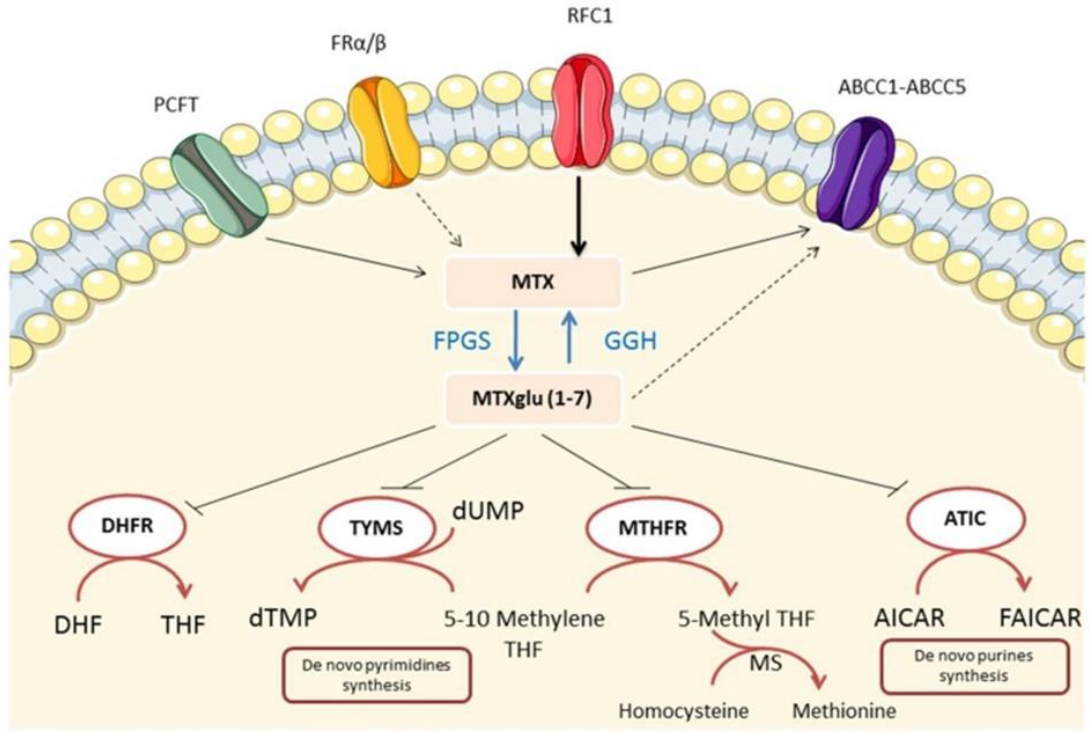
Şekil 2.2. MTX-PGS'nin inhibe ettiği metabolik yollar [26].

MTX'in transmetilasyon tepkimelerine de DHF redüktazı inhibe etmesiyle metil vericileri aşağı yönde baskılayarak belirgin etkisi olduğu bilinmektedir [27].

Metiyonin sentetaz üzerindeki inhibisyonu ile metiyonin, SAM yolu vasıtasıyla lenfotoksik poliaminlerin oluşumunun engellenmesine yol açmaktadır [28]. Yapılan bir klinik çalışma da romatoid artritli hastalarda sinovyal sıvı ve dokularında idrarlarında belirgin şekilde poliamin (spermin ve spermidin) birikimi olduğu tespit edilmiştir [29]. Monositlerce H₂O₂ ve NH₃'e dönüştürülen poliaminler bu şekilleriyle

2.2.2. Metotreksatın Farmakokinetiği

1947'den beri HD-MTX antineoplastik amaçlı kanser tedavilerinde kullanılmaktadır. LD-MTX ise ilk 1950'de antienflamatuar etkisi ile psoretik artirit ve sedef hastalığının tedavisinde 1980 yılında ise RA hastalığının tedavilerinde de kullanılmaya başlanmıştır [31]. LD-MTX klinikte enflamatuar otoimmün hastalıkların tedavisinde başlangıçta bir haftalık 10 mg dozunda oral kullanım uygulanır. Tedavideki yanıtı göre 2-4 haftada 5 mg artış ile 20-30 mg/hafta doza kadar çıkarılabilmektedir. Parantral olarak özellikle subkutan metotreksat (SC-MTX) son yıllarda kullanımı yaygınlaşmış olup oral yola göre etkinliği ve tolerasyonu yüksek olmasıyla daha fazla fayda görülmektedir [32-34]. MTX oral alım ile absorpsiyonu jejunum'da bağırsak bakterilerince 4 amino 4 deoksi N10 metilpterroik aside dönüşür sonra da karaciğerde aldehit oksidaz enzimi aracılığıyla daha toksik olan major metaboliti 7 hidroksimetotreksata (7-OH-MTX) dönüşür [31]. Dolaşımdaki MTX in yaklaşık %35-50 si plazma proteinine bağlıdır [3, 31]. Hücre içinde MTX-PGS'ye dönüşen poliglutamat türevleri sinoyosit, nötrofil, eritrosit, hepatosit ve mononükleer hücrelerde rastlanır. MTX hücre içerisine alımı indirgenmiş folat taşıyıcıları ile olup γ -glutamil hidrolaz ve folilpoliglutamat sentetaz enzimleri aracılığıyla reversibl olarak poliglutamat formlarına dönüştürülürler. Bu poliglutamasyon transmembran proteini olan ATP bağlayıcı kaset (ABCC) ailesi taşıyıcılar tarafından olup MTX'in hücreden dışarı çıkışını azaltır ve bu sebeple hücre içinde yarılanma ömrünü arttırır. MTX-PGS'nin hücre içinde birikimi etkisinin uzun süreli olması tedavilerde de aralıklı uygulamaya izin verir (Şekil 2.4), [2].



Şekil 2.4. MTX-PGS'nin hücre içi mekanizması [2].

MTX'in insan vücudunda metabolizması %5 oranda olup geri kalan kısmı atılır. Metabolitin çoğunluğu oluşturan kısmı (%60-90'ı) böbrekten atılım ile, çok az kısmı biliyer atılım ve az bir miktarı ise enterohepatik yolla geri emilim ile olmaktadır [3, 35]. Renal atılım glomerüler filtrasyon, tübüllerden sekresyon ve yeniden emilim ile gerçekleşir [18]. MTX'in vücutta kalış süreci doz ve veriliş yoluna göre değişmekte hatta aynı koşullarda verilen farklı bireylerde bile farklılık gösterebildiği görülmüştür. MTX'in atılımda bu kadar önemli organ olan böbrekte meydana gelebilecek fonksiyon bozukluğu veya böbrek fonksiyonunu etkileyen diğer ilaçlarla birlikte verilmesi durumunda toksikasyon ve birçok yan etki göz önünde bulundurmaktadır [2, 18].

2.2.3. Metotreksatın Yan Etkileri

MTX'in uygulama dozu ve sıklığındaki artış veya azalışlar, tedavi süresinin uzunluğu veya kısalığı, hastaların sahip oldukları bazı hastalıklar MTX'in toksik etkisini arttırarak önümüze hastalığın ağır semptomları olarak gelmektedir [36]. Dozla alakalı

olarak sıklıkla ALT-AST yükselmesi, gastrointestinal sistemde oral ülserasyon ve ağrı, bulantı, kusma, stomatit, ishal gibi semptomlar ortaya çıkmaktadır [3].

MTX sitotoksik ajan olarak birçok özelliğe sahip olup, bu toksisitesi sadece tümör hücrelerine özgü değildir [14]. Karaciğer, böbrek, mide-bağırsak mukozası, kemik iliği hücreleri üzerine toksik etkileri ile karşılaşmaktadır. Bu yan etkiler tam mekanizması açıklanamasa da hücre içinde biriken poliglutamat türevlerinin oluşması ile alakalı olduğu yapılan deneysel çalışmalar ve klinikte karşımıza çıkmaktadır [36, 37].

MTX-PGS'lerin oluşması sonrasında baskılanan olaylar ile transmetilasyon tepkimelerinin inhibisyonu, poliamin birikmesine, THF eksikliği ile DNA ve RNA öncülleri olan pirimidin timidilat'ın ve pürin de nova sentezlerinin azalmasına sebep olmaktadır [2, 30].

Yine MTX-PGS'nin Adenozin deaminazın inhibisyonu sonucu adenozin, metabolitleri (deoksiadenozin, deoksiadenozin trifosfat (dATP)) birikimi ile bu metabolitlerin yoğunluklarının artışı kromozom kırıklarına sebep olmaktadır. Ayrıca homosistein-metiyonin-poliamin mekanizmasındaki S-adenozil homosistein (SAH) hidrolaz enziminin inaktivasyonu ile metilasyon tepkimelerini baskılayıp toksisite oranı artmaktadır [30, 38].

Metilasyon tepkimelerinde homosistesin-metiyonin dönüşümündeki inhibisyon hücre içinde hiperhomosisteinemiye sebep olmakta ve vasküler hastalıkları olan kişilerde toksisite oranını arttırdığı çalışmalarda görülmektedir [30, 39].

MTX in antifolat özelliği dolayısıyla en büyük etki gösterdiği bir diğer organda karaciğerdir. Hepatositlerde folat azalması ve MTX-PGS'nin birikmesinden dolayı toksisite meydana gelmektedir. MTX in yan etkilerinin folik asit ve folinik asit takviyesi ile incelenen bir çalışmada her iki folat grubunda karaciğer enzimleri üzerinde iyileştirici sonuçlara ulaşılmıştır [30]. NAD⁺ (nikotinamid adenin dinükleotit) bağımlı malat dehidrogenazı izositrat dehidrogenaz, 2-oksogluterat dehidrogenaz, piruvat dehidrogenaz mitokondrial enzimleri, malik enzimi ve

nikotinamid adenozin difosfat bağımlı dehidrojenaz sitozolik enzimi inhibisyonu NADPH'ın da kaynağını oluşturan enzimler olduğu için proliferen hücredeki NADPH seviyesi de azalmış olur [3]. MTX hücre içi reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan savunma görevi gören glutatyon redüktaz enziminin çalışmasında önemli rol oynayan Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat'ın (NADP(H)) azalması ile redükte glutatyon (GSH) azalır, oksidatif stres seviyesi artar ve hepatositlerde hasar meydana gelmektedir [1].

HD-MTX antiproliferatif etkisiyle akut lösemi, nispeten yüksek HD-MTX ile şiddetli psöriazis meydana gelmektedir. Yüksek MTX maruziyeti serbest radikal oluşturma sebebiyle toksisite oluşturarak hepatorenal sistemi etkiler bundan dolayı oksidatif stresten sorumlu tutulmaktadır [40]. Toksik kimyasalların atılımı ve detoksifikasyonunda önemli role sahip karaciğer ve böbrek birlikte çalışan organdır.

2.2.3.1. Metotreksatın Böbrek Toksisitesi

MTX atılımının %90'ının böbrekten olması dolayısıyla toksisitesinin çok olduğu dokular arasında yer almaktadır [3]. Eliminasyonu glomerülerden filtre edilir, aktif tübüler sekresyonla birlikte tekrardan emilir [2]. İlacın farmakokinetiğinde bu derece öneme sahip olan böbreğin, tedavi uygulanan hastalara verilirken fonksiyonu göz önünde bulundurulup doz ayarı ona göre yapılmalı hatta tolerasyon durumuna göre doz azaltımına gidilmeli veya tedavide sonlandırılma işlemi yapılması gerekebilir [41].

MTX ve metabolitlerinin ıtrahının çok büyük kısmı renal yolla olurken tübüllerde birikmesi potansiyel bir toksikasyondur [3]. MTX'in böbrek toksikasyonunun mekanizması; kimyasalın direk toksikasyonu, DNA sentezi aksaklığının beraberinde getirdiği enzim inhibisyonları, nötrofil infiltrasyonu ve oksidatif stresidir [42, 43]. Nötrofillerin kümeleşmesi ve aynı zamanda aktifleşmesi serbest radikaller ve miyeloperoksidaz (MPO) sentezini meydana getirmektedir [42]. Ratlarla yapılan çalışmalarda intraperitoneal (i.p) MTX uygulaması sonucu MPO, Malondialdehid (MDA) artışı, GSH düzeyinde azalma ile oksidatif stres ile ilgili anlamlı sonuçlara varılmıştır [40].

MTX in nefrotoksitesitesi hem LD-MTX hem de HD-MTX kullanım dozlarında da olduğu yapılan deneysel çalışmalar ve klinik vaka raporlarında karşımıza çıkmaktadır [44]. Akut lösemi gibi kanser tedavisinde HD-MTX kullanımı sonrasında serum kreatinin seviyesi artışı, idrarda kan ve üremi tablosuyla akut böbrek yetmezliği (ABY) gelişebileceği yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır [45]. HD-MTX uygulamasında gelebilecek ABY'ye karşı üriner alkalizasyon ve yeterli idrar çıkışı sağlanmalıdır [46]. RA tedavisinde kullanılan dozun düşük olması bile MTX'inde böbrek tübül ve glomerüllerinin fonksiyonlarında bozukluklar, kreatinin seviyesinde artma olduğu görülmüştür [44, 47]. Seideman ve ark. deneysel olarak 11 hasta ile yaptığı 15mg/hafta doz ile glomerüler filtrasyon hızında (GFR) %11 ve tübüler sekresyonda %14 azalma olduğu bildirilmiştir. Bu oran belki az gibi dursa dahi uzun dönem maruziyetinin böbrek fonksiyonlarında yetmezliğe kadar sonuçlanabileceği göz ardı edilmeyecek güçlü ihtimallerdendir [47].

MTX uygulaması ile renal hasar oluşturulan öktek ve ark çalışmasında lipid peroksidasyonu için belirleyici katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) parametrelerinde azalma, MDA seviyesinde artış olduğu gözlemlenmiştir [48]. Öktek ve ark. diğer bir çalışmasında ise MTX kaynaklı nefrotoksitede dokularda ksantin oksidaz, ADA ve nitrik oksit seviyelerinde belirgin artış gözlenmiştir [49]. Başka bir çalışmada ise MTX kaynaklı nefrotoksitede dokularda ksantin oksidaz, ADA ve nitrik oksit seviyelerinde belirgin artış gözlemlenmiştir [50].

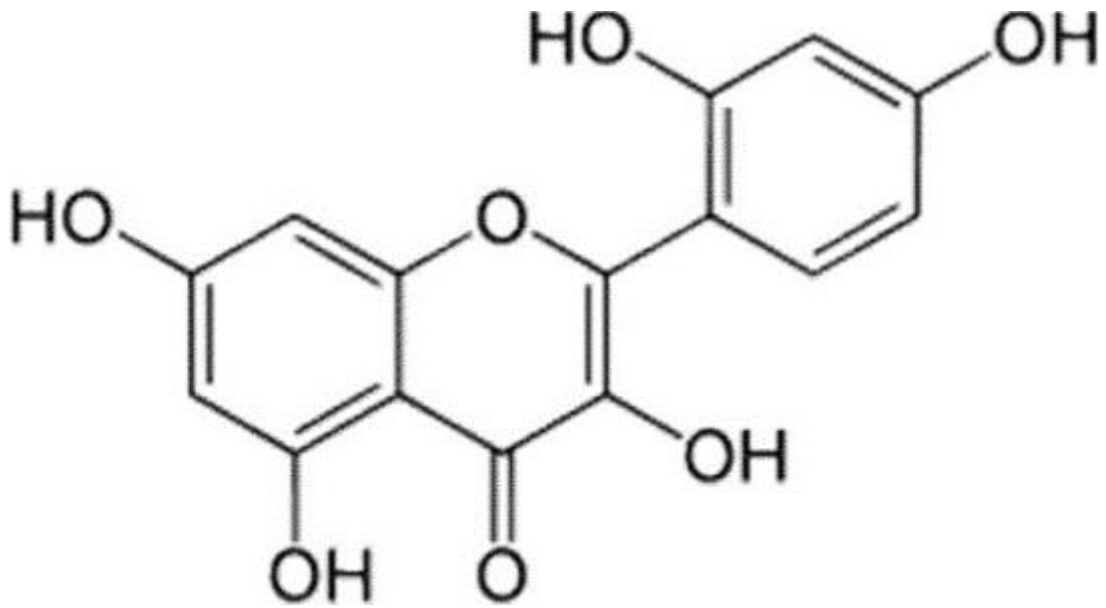
2.3. FLAVONOİD

Flavonoidler, sebze, meyve, şarap, çay, kakao ve soyada bulunan flavanoller, flavonlar, flavanonlar, antosiyanidinler, ve izoflavonlar olarak gibi çeşitli alt grupları olan biyokimyasal ve farmakolojik özelliğe (antienflamatuvar, antimikrobial, sitoprotektif etki, enzim inhibitörü, antimitojenik, antioksidan) sahip polifenollerdir [51-53]. Flavonoidler 4000 den fazla izole edilmiş halde bulunan 'Tamamlayıcı Tıp' veya 'Alternatif Tıp' ta da çare arayışlarında önemli yeri vardır [51]. Doğada yaygın olarak bulunan bu önemli bileşik 1940'lı yıllarda oldukça merak uyandırmış günümüzde de etkilerinden oldukça yararlanılmaktadır [6].

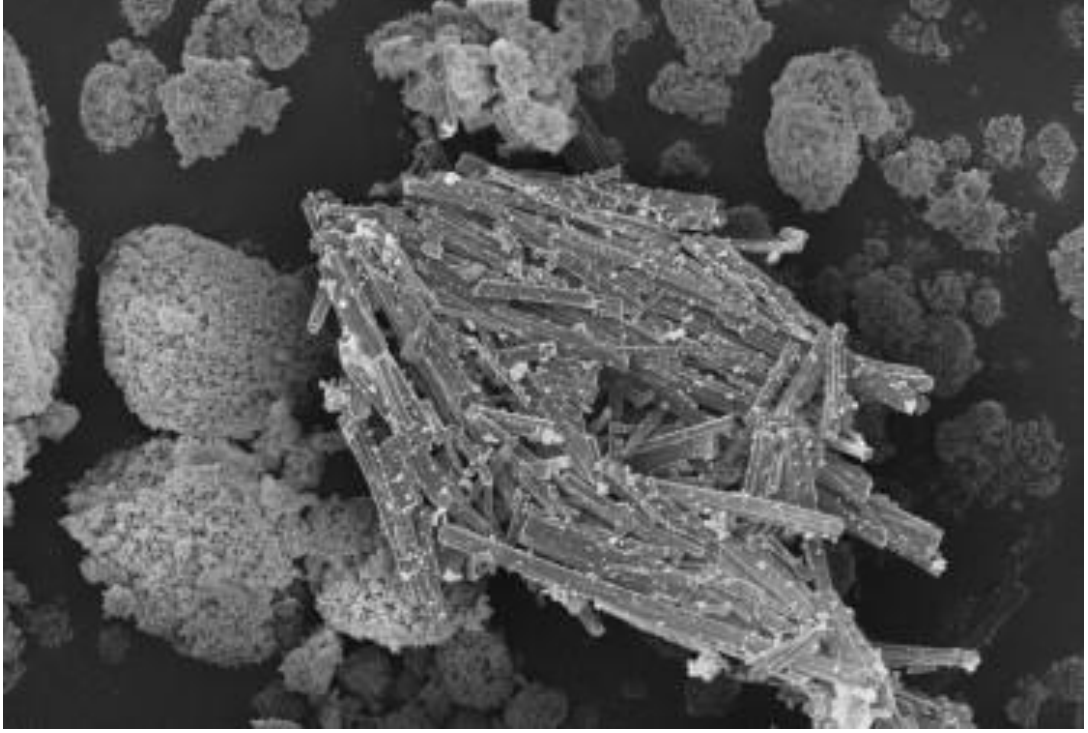
Flavonoller flavonoidlerin alt sınıflarından olan ve en fazla yapı çeşitliliğine sahip en çok yükseltgenebilme özelliğine sahip gruptur. Amorf veya kristalimsi yapısı olup rengi sarı ya da sarıya yakın, oksijene dayanıklılığı az olan bileşiklerdir. Flavonollerin yapısında bulunan hidroksil grubunun varlığı ile ilgili antioksidatif etki arasındaki bağlar araştırmalarda yer almaktadır. Morin'de bu antioksidan özelliğe sahip bir flavonoldür [6].

2.4. MORİN

MOR *Maclura pomifera*, *Chlorophora tinctoria*, *Morus tinctoria*, *Maclura tinctoria* *Psidium guajava* ve *Prunus dulcis* bitkilerinden izole edilen bir flavonoidtir. [9]. *Moraceae* familyasına ait birçok bitkide bulunan morin (3, 5, 7, 2', 4'-pentahidroksiflavon) sarımsı renkte bir flavonoldür (Şekil 2.5,2.6), [54, 55].



Şekil 2.5. Morinin moleküler formülü ($C_{15}H_{10}O_7$) [56].



Şekil 2.6. Morin'in elektron mikroskobu kristal yapısı [57].

MOR'un suda çözünürlüğünün az olması sebebiyle klinik kullanım açısından sınırlama getirmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda hidrofolik özelliğinin artırılması için morin hidrat NaMoS şeklinde kullanılarak etkilerine bakılması çalışmalara olumlu şekilde etki edeceğine inanılmıştır. MOR'un antiaterosklerotik, antialerjik, antihiperüremik, antineoplastik, antimutajenik, sitoprotektif, antioksidan, antienflamatuar, hepatoprotektif, kardiyoprotektif, nöroprotektif, nefroprotektif biyolojik etkileri vardır [5, 58, 59].

Sıçanlarda akrilamidin sebep olduğu karaciğer ve böbrek dokularındaki toksisiteye karşı morinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada antiapoptoz, antienflamatuar etkilerinin yanında hücrelerde gerçekleşen organel hasarı ve yanlış DNA katlaması ile proteinlerin lizozomal bozulmasıyla otofaji denilen hücre içi yıkıma karşı antiotofajik etki gösterildiği bulunmuştur [9]. MOR'un sisplatin ile indüklenen böbrek dokusunda; transkripsiyon 3 (STAT3) ve sinyal dönüştürücü aktivasyonun inhibisyonu ile antikanser özelliği, TNF- α ve IL-1 β ekspresyonunu zayıflatması ile antienflamatuar etkisi ve ROS a karşı antioksidan etkilerinin aynı zamanda Bax ve kaspas 3 ekspresyonun aktivasyonu sağlayarak böbrek tübüllerinde antiapoptotik etki

göstermiştir [58]. MOR gut hastalığı gibi hiperüriseminin olduğu klinik durumlarda ksantin oksidaz aktivasyonunun inhibe ederek üratın yeniden emilimini engellemeyi sağlamaktadır [60]. MOR'un antienflamatuar etki mekanizması belirsizliği devam etmekle birlikte enflamatuarlı dokuda enflamatuar sitokinlerinin interleükin (IL) üretimini baskılaması, TNF- α düzeyinin azalması, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) üretimi ve nükleer faktör kappa NF- κ B inhibiyonu sonucunda antienflamatuar etki gösterebileceği yapılan çalışmalarla desteklenmektedir [61, 62]. Enflamatuar yanıtta lipoksijenaz (LOX) ve siklooksijenaz (COX) enzim yollarının inhibisyonu ile MOR antienflamatuar etki gösterdiği literatürde yer almaktadır [63]. Oksidatif stresle ilişkili, hiperglisemi durumunda ROS etkisi sonucu MOR mitokondriyal apoptozu önleyerek karaciğer hücre hasarına karşı koruyuculuğu antioksidan özelliğiyle açıklanmaktadır [64]. Non-steroid antienflamatuar (NSAİD)'lar uzun süreli kullanımlarda enflamatuar ve harabiyet oluşturmaktadır. Güçlü NSAİD olan indometazin sebep olduğu hasara ve eflamasyona karşı MOR mide hücresinin apoptozunu önlemiş ve gastroprotektif rol oynamıştır [65]. Tip2 diabette pankreas β hücrelerinde ve alzheimer hastalığında beyinde anormal amiloid oluşumu mevcuttur. Bu iki hastalığın birbiri ile ilişkisini araştıran birçok çalışma vardır. Quercetin, kaempferol, myricetin gibi hidrokisflavonların amiloid oluşumunda inhibisyon etkisinin morin hidrata göre daha az olması sonucu morin hidratin yeni bir IAPP (adacık amiloid polipeptiti) amiloid inhibitörünü temsil edeceği vurgulanmıştır [66]. Üç farklı insan kardiyosinde oksijen radikallerine maruziyette MOR, MDA seviyesini azaltarak toksik olmayan bir antioksidan özellik göstermiştir [54].

Birçok antienflamatuar amaçlı kullanılan ajanlar canlı organizmaya verilirken toksisite etkilerine karşı dikkat edilmektedir. MOR ise bu konu da çok yüksek dozlarda bile toksisitesinin oldukça az olduğu bildirilmiştir [9, 67].

2.5. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ, OKSİDATİF STRES

Oksijen canlıda hücrelerin temel ihtiyacı olan enerjiyi sağladığı için kritik bir öneme sahiptir. Serbest oksijen radikalleri ise bu enerji ihtiyacının karşılanması sırasında ortaya çıkan bir veya daha fazla serbest elektronu en dış tabakasında barındıran, kısa ömürlü, moleküler ağırlığı düşük, kararsız, yüksek reaktiviteye sahip çoğunlukla

zararlı maddelerdir. Bu serbest elektron barındırma özelliğinden dolayı serbest oksijen radikalleri ile tepkimeye giren her bir molekül reaktif hale gelmektedir. Bu reaktivite hücrelerin DNA, lipit ve protein yapısına zarar vermekte ve bu reaktivite ileri aşamada hücredeki değişikliklere bağlı ciddi doku hasarlarını meydana getirmektedir. Bu tepkimeyi sadece antioksidan maddeler terse çevirebilmektedir. Ama serbest oksijen radikallerinin bakterilerin fagositasyonunda, mitokondrial respirasyonda, hücrel sinyalizasyonda, ksenobiyotiklere karşı savunmada, karaciğer detoksifikasyonunda yararlı etkileri de mevcuttur [36-38, 68-71].

Hidroksil Radikali (OH^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksil radikali (ROO), perhidroksil radikali (HOO^-), süperoksit radikali (O_2^-), nitrik oksit radikali (NO), alkoksil radikali (RO^-), singlet oksijen radikali ($^1\text{O}_2$), hiperoksi radikali, hipokloröz asit radikali (HOCl) olmak üzere birçok reaktif oksijen ürünleri (ROS) türevi yer almaktadır. Serbest radikallerin hücrede hasar oluşturması üç mekanizma ile oluşmaktadır. Bu mekanizmalar disülfit bağ oluşumu, DNA hasarı ve membran lipitlerinin peroksidasyonudur. Disülfit bağ oluşumu, hücrede milimolar düzeyde bulunan glutatyon (GSH) ve benzeri tiyollerin oksidasyonu sonucunda meydana gelen ROS'un proteinlerdeki sülfür ile birleşmesi ile meydana gelmektedir. DNA hasarı, ROS'un DNA zincirini bozması sonucunda mutasyona ve genomik bozukluklara açık hale getirmesi ile oluşur. Membran lipitlerinin peroksidasyonu, ROS'un membran lipit yapısını bozarak membranın sertleşmesine böylece membran geçişinin zorlanmasına sebep olmaktadır. [36-38, 68-72].

Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak veya minimuma indirmek için hücreler antioksidan maddeler üretirler. Bu antioksidan üretimi hızı ile serbest oksijen radikali oluşum hızı arasında dengesizlik meydana gelir ve bu dengesizlik serbest oksijen radikallerine doğru kayarsa oksidatif ya da oksidan stres meydana gelir. Dolayısıyla oksidatif stres iki şekilde meydana gelebilmekte bunlardan birincisi antioksidan sistem baskılanırsa, ikincisi ise serbest oksijen radikalleri fazla üretilirse meydana gelir. Bu oksidatif stres sonucunda birçok doku ve hücrede yapısal ve işlevsel hasar, tahribat meydana gelmektedir. Oksidatif stresten beyin, kalp gibi oksijeni fazla tüketen organlar daha fazla etkilenmektedir. Özellikle ateroskleroz, alzheimer, parkinson gibi dejeneratif hastalıklarda önemli bir etkisi mevcuttur.

Oksidatif stres hücrel bölünme mekanizmasını bozduğu ve genomik kararsızlığa neden olduğu için tümöral oluşumlara sebep olmaktadır. Ayrıca hücre membran lipit ve proteinlerini yıkar, membran geçişini zorlaştırır, bağışıklık sistemi hücrelerini yıkar, immun sistemi zayıflatır ve DNA'yı mutasyonlara karşı savunmasız hale getirmektedir [36-38, 68, 69, 71].

2.6. ANTIOKSİDAN MEKANİZMA

Antioksidan mekanizma, serbest radikallerin yıkımlayıcı etkisini nötralize etmek için ortaya çıkan bir savunma mekanizmasıdır. Antioksidanların ROS'u nötralize etmesi için dört aşaması vardır. Bunlar; temizleme (Scavenging), baskılama (Quencher), onarma (Repair) ve zincir koparma etkisidir. Antioksidanlar enzimatik (Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon-S-Transferaz, Süperoksit Dismutaz, Glutasyon Redüktaz, Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz, Katalaz) ve non-enzimatik (Glutasyon, E Vitamini, Transferrin, Taurin, Albümin, β -Karoten, Piruvat, Melatonin, Glukoz, Sistein, Bilirubin, laktoferrin, C Vitamini, Seruloplazmin, Polifenol, S-Adenozil Metionin) olmak üzere iki temel sınıfa ayrılırlar [36, 37, 68-70, 73, 74].

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), tetramerik yapıda ve metaloenzim grubunda yer alan bu antioksidan hücre membranındaki hidrojen peroksitleri alkole/suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir. Fagositik hücrelerde ve eritrositlerde oksidatif strese karşı savunmada yer alan önemli bir antioksidandır. Eğer hücre sitoplazması ve mitokondriyonda bu antioksidanın azalması hidrojen peroksitleri artırır ve hücre hasarına/yıkımına neden olur. Hücre membranındaki vitamin E'nin herhangi bir sebeple azalması durumunda membrandaki fazla oluşacak hidrojen peroksite karşı koruma görevinde yardımcı olmaktadır [36, 37, 68-70].

Süperoksit dismutaz (SOD), 1968 yılında ilk kez ortaya konulan bu antioksidan enzim superoksiti hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürerek oksidatif strese karşı görev almaktadır. Bu antioksidanın büyük bir kısmı extrasellüler sıvı ve sitolazmada az bir kısmı ise mitokondride yer almaktadır. Metaloenzim grubundadır ve SOD oksidatif strese karşı oluşacak antioksidan mekanizmanın öncülerindedir. Hücrede en fazla bakır ve çinko iyonlarını barındıran formu bulunur. SOD daha çok hücre içerisinde

görev alır ve oksijen tüketimine ihtiyaç duyan organlarda daha fazla ihtiva etmektedir [36, 37, 68-70, 75].

Katalaz (CAT), büyük bir çoğunluğu peroksizomlarda yer alan ve yapısında dört hem grubu bulunan bir hemoproteindir. GSH-Px gibi hidrojen peroksiti suya indirgeyerek detoksifiye eder. Fakat GSH-Px mitokondriyonda ve sitoplazmada fazla miktarda bulunurken CAT peroksizomlarda daha fazla bulunmaktadır [36, 37, 68-70, 76].

Glutasyon, tripeptid yapıda olan bu antioksidan hücreleri oksidatif stresten korumada ve oksidatif stresin oranını belirlemede kullanılmaktadır. Sentezi karaciğer dokusu tarafından yapılmakta ve ROS'un zararlı etkisini zararsız hale dönüştürmektedir [36, 37, 68-70].

E vitamini, hücre membranında ve ekstrasellüler sıvıda bulunan tokoferol yapısında, dört çeşidi olan bir antioksidandır. En fazla α -tokoferol hali bulunan ve zincir koparma özelliği ile öne çıkmış bir antioksidandır. C vitamini, E vitamini gibi ekstrasellüler yapıda bulunan temizleme (Scavenging) özelliği olan bir antioksidandır. β -Karoten, temizleme (Scavenging) özelliği olan hücre membranında yer alan vitamin A'nın öncüsü olan bir antioksidandır [36, 37, 68, 69, 77].

Melatonin, corpus pinealede salgılanan, hücre membranından kolay geçen, indolamin yapısındaki bir antioksidandır. S-Adenozil Metionin, hücre büyümesinden sorumlu glutasyon prekürsörü olan bir antioksidandır. Transferrin, kardiovasküler sistemdeki serbest demiri bağlayan bir antioksidandır. Bilirubin, serbest oksijen radikallerini tutan bir antioksidandır. Piruvat, H_2O_2 'yi bağlayıcı bir antioksidandır. Taurin, ksenobiyotikleri bağlayıcı ve lipid peroksidasyonu indirgeyici bir özelliği mevcuttur. Albümin, lipid hidrojen peroksidi toplar. Sistein hipoklorid, glikoz ise hidroksil radikal tutucusudur [36, 37, 68, 69].

BÖLÜM 3

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmaya Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Deneyleri yerel etik kurulunun (Protokol no: 2020/12) 28 nolu kararı ile 21/04/2020 tarihinde başlandı. Aynı zamanda çalışmamız Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün TYL-2020-2336 kararı ile desteklendi.

3.1. DENEY HAYVANLARI

Çalışmada kullanılan deney hayvanları, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışmamızda 250-300 gr ağırlığında 32 erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar deney sürecine kadar standart bakım odasında 20-24 C°'de, %50-60 oda neminde, 12 saat ışıklı ortamda (08:00-20:00), 12 saat karanlık ortamda (20:00-08:00) bakım uygulanarak ve pelet yem ile ad libitum olarak beslendi.

3.2. KULLANILAN MALZEMELER

Çalışma süresince kullanılan kimyasal malzemeler çizelgede gösterildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal malzemeler.

• Metotreksat	Fisher BioReagent
• Morin (2',3,4',5,7-Pentahidroksi-flavon)	ABCR
• Alfa ketamin	Aven Kimya
• Ksilazin	Aven Kimya
• Amonyum sülfat	Isolab
• Asetik asit	Isolab
• Sülfat pentahidrat	AFG
• Bovine serum albumin	AFG
• N-butanol-1	Carlo Erba
• Di-sodyum hidrojen fosfat	AFG
• Benzoik asit	Acros
• Etanol	Carlo Erba
• Etilen diamin asetik asit	Carlo Erba
• Fenol	Merck
• Folin-Ciocalteu'nun fenol reaktifi	Merck
• Formaldehit	Isolab
• Glutatyon reduktaz	Carl Roth
• Metafosforik asit	Carlo Erba
• Piridin	Carl Roth
• Potasyum dihidrojen fosfat	AFG
• Potasyum sodyum tartarat	AFG
• Sodyum dihidrojen fosfat	Acros
• Sodyum nitroprosid	Merck
• Sodyum dodeksi sülfat	Carlo Erba
• Sodyum hipoklorid	Carlo Erba
• Sodyum hidroksit	Isolab
• Sodyum karbonat	AFG
• Sodyum klorid	AFG
• Sodyum sitrat	AFG
• 1,1,3,3-Tetrahidropropan	Sigma
• Tiobarbitürik asit	Sigma
• TAS Kiti Rel Assay (Sıçan) 96'lık	Rel Assay
• TOS Kiti Rel Assay (Sıçan) 96'lık	Rel Assay

Çalışma süresince kullanılan cihazlar çizelgede gösterildi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Kullanılan laboratuvar araç ve gereçleri.

• ELISA mikropate okuyucu	Thermo
• Derin dondurucu (-80 C°)	Nüve FR 490
• Homojenizatör	Bioprep-24
• Santrifüj cihazı	Nüve NF 1200
• Etüv	Nüve
• Su banyosu	Nüve ST 30
• Hassas terazi	Radwog As 220
• Distile su cihazı	Nüve
• Vorteks	Velp ZX3
• Mikropipet seti	İsolab
• Ph metre	AD 1000

3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Her bir grupta 8'er adet sıçan olacak şekilde 32 adet 250-300 gr ağırlığındaki sıçan dört ayrı gruba bölündü.

1. Kontrol Grubu: İlk gün %0,9 serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (i.p) yolla diğer 10 gün süre ile her bir sıçana intragastrik yolla tris-base HCl uygulandı.
2. Morin (MOR): Gruptaki her bir sıçana 10 gün süre ile 100 mg/kg dozunda intragastrik yolla MOR (tris-base HCl çözücü içinde) uygulandı [78].
3. Metotreksat Grubu (MTX): Gruptaki her bir sıçana 20 mg/kg MTX %0,9 SF içinde çözdürülerek ilk gün tek doz olarak i.p yolla uygulandı [48].
4. Metotreksat + Morin (MTX + MOR): Gruptaki her bir sıçana 20 mg/kg MTX %0,9 SF içinde çözdürülerek ilk gün tek doz olarak i.p. yolla, diğer 10 gün süre ile 100 mg/kg dozunda intragastrik yolla MOR (tris-base HCl çözücü içinde) uygulandı.

Morin (MOR) çözeltisinin hazırlanması:

MOR, 300 gr sıçana 30 mg etken madde 900 uL tris-base HCl tamponunda pH=9 olacak şekilde hazırlandı ve her bir sıçana 100 mg/kg olacak şekilde 2. ve 4. gruplara intragastrik gavaj ile uygulandı.

3.4. NUMUNE ALINMASI

Deneme süresinden bir gün sonra 90/10 mg/kg ksilazin/ketamin uygulanarak deneme grupları anestezi altına alındı. İlk önce sıçanların thorax boşluğu açılarak kalbin apex bölümünden 10'luk enjektör ile 4-8 mL intrakardiyak punksiyon ile kan alındı. Daha sonra abdomen boşluğu da açılarak her iki taraftaki böbrek dokusu alındı. Alınan her bir sıçanın iki böbrek dokusu ikiye bölünerek dört eşit parça elde edildi ve farklı böbreğe ait iki parça doku analizleri için bir numune kabına, yine iki farklı böbreğe ait diğer iki doku ise histopatolojik analiz için başka bir numune kabına alındı. Böbrek dokuları biyokimyasal çalışmalar için ilk önce SF ile kanlar temizlendikten sonra sıvı azot ile kademeli dondurulup numune kabına alındı. Histopatolojik çalışmalar için ise %10'luk formaldehit solüsyonu içeren numune kaplarına konuldu. Kalbin apex bölümünden alınan kanlar biyokimyasal çalışmalar için sarı kapaklı jelli tüplere aktarıldı. Aktarılan bu kan 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum kısmı ayrılıp biyokimyasal ölçümler yapılincaya kadar -80 C° sıcaklıkta saklandı.

3.5. ÇALIŞMA ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI VE ANALİZ METOTLARI

3.5.1. Doku Homojenizasyonu

Sıvı azot yardımı ile dondurulan ve daha sonrasında derin dondurucuda (-80 C°) saklanan böbrek dokuları çalışma günü çıkarılarak tartıldı. Tartılan dokuların üzerine 1/10 (w/v) olacak şekilde fosfat tamponu ilave edildi. Fosfat tamponu ilave edilen bu cam tüpler kuru buz içerisinde 10.000-12.000 devirde 1-2 dk. manuel homojenizatör yardımı ile homojenize edildi. Bu elde edilen homojenatlar +4 C°'de 5000 rpm'de 30

dk. santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant eppendorf tüplerine aktarıldı ve daha sonra bu süpernatantlar, analize kadar derin dondurucuda (-80 C°) saklandı.

3.5.2. Dokuda Malondialdehit (MDA) Analizi

Çalışmada malondialdehit (MDA) analizi Ohkawa ve ark. [79] kullandığı modifiye yöntemle analiz edildi. Deneyin prensibi, lipid peroksidasyon ürünleri arasında en kararlı olan MDA'nın 95 C°'deki TBA ile reaksiyona girmesi sonucunda meydana gelen pembe kırmızı renkli ürünün mikropelatelere yerleştirilmesi ile 532 nm dalga boyunda ELİSA cihazında spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirilmesidir.

Kullanılan reaktifler;

Stok tetrametoksiopropan çözeltisi: Tetrametoksiopropan 0.92 gr olacak şekilde tartıldı ve 1 mL distile suda çözdürüldü.

Günlük tetrametoksiopropan çözeltisi: 10 mL'lik hazırlanan stok tetrametoksiopropan çözeltisi 100 mL'ye distile su ile tamamlanır ve kullanım esnasında 1/10 oranında seyreltilerek kullanılır.

SDS çözeltisi: SDS 8.1 gr kadar tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanarak çözdürüldü.

TBA çözeltisi: TBA 0.8 gr kadar tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanarak ısı etkisiyle çözdürüldü.

Asetik Asit çözeltisi: 20 mL kadar asetik asit 100 mL'ye distile su ile tamamlandı ve pH 3,5 olacak şekilde ayarlandı.

n-bütanol-piridin çözeltisi: Stok piridin 1 ml'si 15 mL n-bütanol ile karıştırılarak hazırlandı. MDA ölçümündeki tüm reaktifler ihtiyaca göre yazılan oranlarda ayarlanarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: SDS, Asetik Asit, TBA çözeltisi ve distile su belirlenen oranlarda tüplere alınarak 95 C°'de 30 dk. süre ile su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüpler soğuması için musluk suyunun altında bekletildi. Daha sonra tüplere distile su ve 2,5 mL n-bütanol-piridin eklendi. Tüm tüpler vortex kullanılarak beyazlaşınca kadar karıştırıldı. Vortexlenen bu tüpler 4000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant platelere alınıp 532 nm dalga boyunda ELİSA cihazında köre karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.5.2. Doku Redükte-Glutatyon (GSH) Analizi

Çalışmada redükte GSH analizi, Beutler ve ark. [80] metodu ile analiz edildi. Deneyin prensibi, numunelerde yer alan glutatyon ile 5,5'- ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB)'in reaksiyonu sonucunda oluşan sarı renkli kompleksin mikropelatelere yerleştirilmesi ile 412 nm dalga boyunda ELİSA cihazı kullanılarak kolorimetrik olarak ölçülerek değerlendirilmesidir.

Kullanılan çözeltiler;

Çöktürücü: Tüpe 0.2 gr EDTA, 1.67 gr metafosforik asit, 30 gr NaCl ekleyerek 100 mL'ye distile su aracılığı ile tamamlanarak çözdürüldü.

Fosfat çözeltisi: Disodyum fosfat (Na_2HPO_4) 26.7 gr kadar tartılıp 500 mL'ye distile su aracılığı ile tamamlanarak çözdürüldü.

DTNB: DTNB 40 mg kadar tartılıp %1 sodyum sitrat çözeltisi ile 100 mL'ye distile su aracılığı ile tamamlanarak çözdürüldü.

GSH standardı: GSH 40 mg kadar tartılıp 100 mL'ye distile su aracılığı ile tamamlanarak çözdürüldü. GSH ölçümündeki tüm reaktifler ihtiyaca göre yazılan oranlarda ayarlanarak hazırlandı.

Deneyin yapılışı: Deneyin kör, standart ve numune hazırlama olmak üzere üç aşama vardır.

Kör hazırlanışı: 2 mL distile su ile 3 mL çöktürücü kullanılarak hazırlandı.

Standart hazırlanışı: 0.2 mL GSH standardı, 3 mL çöktürücü, 1.8 mL distile su eklenerek karıştırıldı ve yaklaşık 5 dk. beklenildi. Bekleme sonrasında tüpteki bu karışım adi süzgeç kâğıdı kullanılarak süzüldü ve yaklaşık 1 mL süpernatant başka bir tüpe alındı. Daha sonra bu tüpe 0.5 mL DTNB ve 4 mL fosfat çözeltisi eklenerek distile suya karşı 10 dk içerisinde ELİSA cihazı ile okutuldu.

Numune hazırlanışı: Doku süpernatantı 0.2 ml alındı üzerine 1.8 mL distile su eklendi, karıştırıldı sonra 3 mL çöktürücü eklendi, karıştırıldı ve 5 dk. beklendi. Bundan sonraki yapılan işlemler ise standart hazırlanışı ile aynıdır.

3.5.3. Doku Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi

Çalışmada kullanılan bu metot Erel'in [81] oluşturduğu prensip üzerine yapılmıştır. Ferrik iyonların kromojen solüsyonu karşısında oluşturduğu turuncu renkli kompleksin 530 nm'de 25 C° sıcaklıkla ELİSA cihazında kolorimetrik olarak ölçülerek değerlendirilmesidir. Bu analiz esnasında Total Oksidan Status kiti (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep/Türkiye) kullanıldı. Test, hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{equiv/L}$ olarak elde edildi.

3.5.4. Doku Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi

Çalışma sonucunda elde edilen böbrek dokusundaki TAS değeri Erel'in [82] oluşturduğu metotta göre analiz edildi. Bu analiz metottu antioksidan moleküllerinin kararlı ve renkli ABTS (2,2 '-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radikalini indirgemesi sonucunda bu renkli özellikteki radikalın dekolore olması prensibine dayanır. Bu metot esnasında Rel Assay brand kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep/Türkiye) kullanıldı ve 660 rpm'de 25 C° ELİSA cihazında kolorimetrik olarak çift okuma ile değerlendirildi. Test, vitamin E eşdeğeri olan Trolox ile kalibre edildi ve sonuçlar $\text{mmol Trolox Equiv/L}$ olarak elde edildi.

3.5.5. Doku Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Çalışma sonucunda elde edilen TOS'un TAS'a oranı OSİ olarak kabul edildi. Kısaca; TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L) / TAS ($\mu\text{mol Trolox}$ equivalent/L) formülü kullanılarak OSİ değeri elde edildi [83-85].

3.5.6. Dokuda Total Protein Analizi

Çalışma sonucunda elde edilen böbrek dokusuna ait total protein analizi Lowry ve ark. [86]'nın oluşturduğu metot ile analiz edildi. ELİSA cihazında köre karşı 550 rpm'de mg protein/mL cinsinden sonuçlar elde edildi.

3.5.7. Serum Analizleri

Dondurulmuş serumlar deney günü derin dondurucudan (-80 C°) çıkarılarak otoanalizör cihazı ile analizleri yapıldı. Serumlar derin dondurucudan çıkartılarak oda ısısına getirildi. Serumda total protein, üre, ürik asit, kreatinin düzeyleri kitle otomatik otoanalizör cihazı ile gerçekleştirildi. Üre, kreatinin ve ürik asite ait sonuçlar mg/dL olarak elde edildi. Total protein ise g/dL olarak elde edildi.

3.5.8. Histopatolojik Analiz

Histopatolojik analizler sırasında hassas terazi (Bel Engineering, Italy), kronometre (Isolab Laborgerate GmbH), distile su cihazı (Nüve ND8), doku takip cihazı (Leica TP 1020), mikrotom (Leica RM 2155), ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ci), görüntüleme yazılımı (Hayear®) kullanıldı. Histopatolojik analizler öncesi makroskobik olarak sıçanların karın boşluğu açıldı ve böbrek diseke edilerek çıkarıldı. Makroskobik muayenenin ardından böbrek dokusu trimlenerek uygun büyüklükte parçalar elde edildi ve bu parçalar %10'luk tamponlu nötral formalinde tespit edildi. Formalin tespitinden sonra uygun büyüklükte küçültülen doku örnekleri takip kasetlerine alındı. Bir gece boyunca çeşme suyu altında yıkanan dokular otomatik doku takip cihazında (Leica TP 1020) düşükten-yüksek dereceli alkole doğru (50, 70, 80, 96'luk ve absolut alkol) dehidre edildi ve ksilol ile şeffaflaştırıldı. Ksilollü parafin

ve 56-58°C'de erimiş parafinde ikişer saat tutulan dokulardan parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklar rotary mikrotom (Leica RM 2155) ile kesildi ve alınan 5 mikrometre (μm) kalınlığındaki kesitler su banyosu içerisinde lamlara transfer edildi. Etüvde kurutulan kesitler ksilol serileri ile absolut, 96, 80, 70 ve 50'lik alkollerden geçirilerek hematoksilin-eozin (HE) ile boyanıp (Luna, 1968) entallen yardımıyla lamelle kapatıldı. Süreç sonunda elde edilen preparatlar ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse Ci) olası lezyonlar yönünden değerlendirilerek 0'dan 6'ya kadar skorlamaya gidildi. Bulgu yokluğu 0, varlığı ise hafiften şiddetliye 1-6 arasında değerlendirildi. Tespit edilen histopatolojik bulgular mikroskoba bağlı dijital kamera (Hayear®) ile mikroskopik olarak görüntülendi [87].

3.5.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin grup içi ve gruplar arası istatistiksel analizi için Microsoft Excel (version 2016) ve SPSS (version 21.0) kullanıldı. Tüm sonuçlara ait tanımlayıcı istatistiklerde ortalama \pm standart sapma değerlerine yer verildi. Parametrelerin normal dağılıma uyup uymadıkları Shapiro Wilk normalite testi kullanılarak test edildi. Parametrelerin varyans homojenliği Levene testi ile test edildi. Normal dağılım gösteren verilere ait grupların karşılaştırılmasında One Way Anova testi uygulandı ve varyansı homojen veriler için Tukey HSD testi, varyansı homojen olmayan veriler için Dunnett T3 testi uygulandı. Normal dağılım göstermeyen verilere ait grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi uygulandı ($p < 0.05$ istatistiki olarak anlamlı kabul edildi).

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. BÖBREK DOKUSUNA AİT BİYOKİMYASAL BULGULAR

Böbrek dokusuna ait MDA, GSH, TOS, TAS, OSİ biyokimyasal bulguları çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Böbrek dokusunda MDA, GSH, TOS, TAS ve OSİ değerleri.

	MDA nmol/mg protein	GSH µmol/mg protein	TOS µmol H ₂ O ₂ equiv /L	TAS mmol Trolox Equiv/L	OSİ
Grup 1: Kontrol	1.18±0.27	116.51±33.54	10.51±2.29	1.54±0.20	0.70±0.19
Grup 2: MOR	1.10±0.43	122.05±34.36	6.71±2.15 ^d	1.88±0.32 ^e	0.35±0.08 ^e
Grup 3: MTX	2.64±0.98 ^a	65.47±14.95 ^c	12.36±2.54	1.42±0.20	0.87±0.15
Grup 4: MTX+MOR	2.02±0.80	76.00±24.83 ^b	8.46±2.00 ^b	1.43±0.24	0.62±0.21 ^b

^ap<0.05 Grup 3 vs Grup 1, 2, 4

^bp<0.05 Grup 4 vs Grup 3

^cp<0.05 Grup 3 vs Grup 1, 2

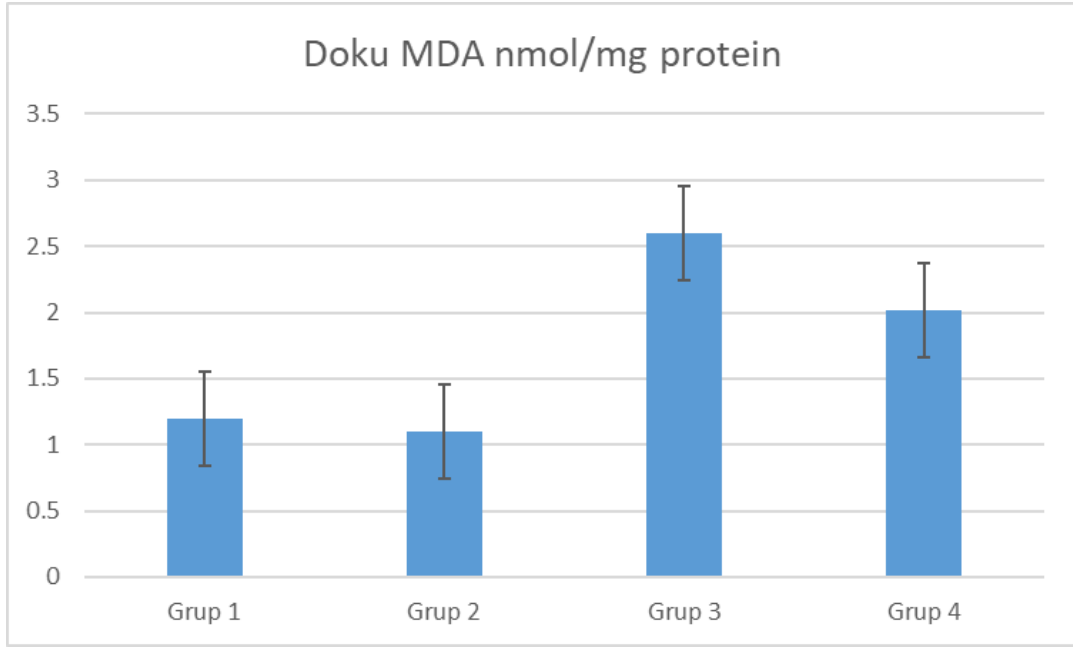
^dp<0.05 Grup 2 vs Grup 1, 3

^ep<0.05 Grup 2 vs Grup 1, 3, 4

4.1.1. Böbrek Dokusu Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

MTX ve MOR’un böbrek dokusu üzerine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada grup 1 (Kontrol), grup 2 (MOR), grup 3 (MTX), grup 4 (MTX+MOR)’e ait MDA düzeyleri sırasıyla 1.184 ± 0.271, 1.103 ± 0.425, 2.639 ± 0.980, 2.022 ± 0.798 nmol/mg protein

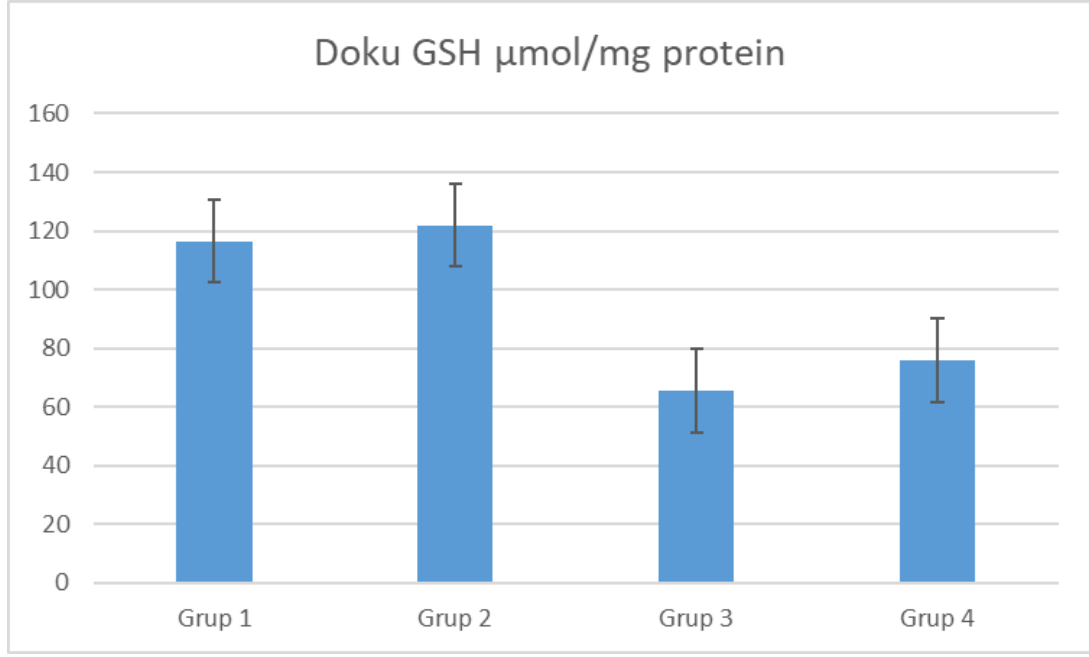
olarak bulundu (Şekil 4.1). Dört grupta normalite testi olan Shapiro Wilk testi ile test edildi ve tüm grupların normal dağılım gösterdiği bulundu. Levene testi ile grupların varyanslarının homojen dağılım göstermediği bulundu ve grupların arasında ortalama bakımından anlamlı bir fark bulundu ($p<0.05$). Dunnett T3 testi ile MTX grubuna göre kontrol grubu, MTX+MOR grubu ve MOR grubunda anlamlı bir azalışın olduğu görüldü ($p<0.05$). Ayrıca MTX grubuna göre MTX+MOR grubunda anlamlı azalışın oldu görüldü($p<0.05$).



Şekil 4.1. Böbrek dokusu MDA düzeyleri (nmol/mg protein).

4.1.2. Böbrek Dokusu Glutatyon (GSH) Düzeyleri

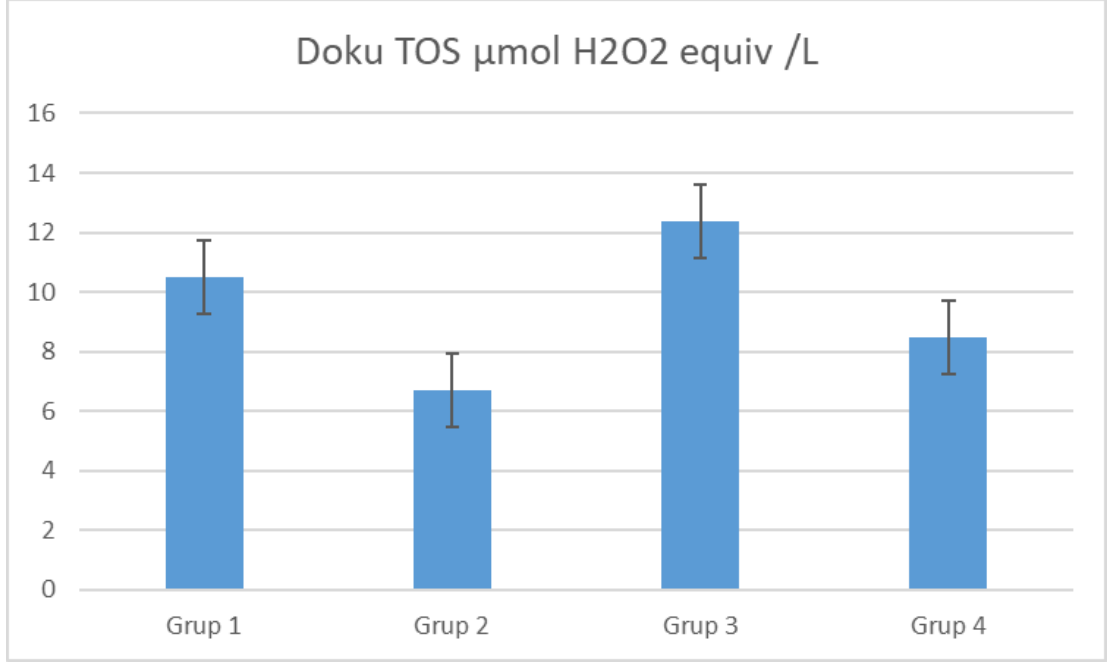
Grup 1 (Kontrol), grup 2 (MOR), grup 3 (MTX), grup 4 (MTX+MOR)'e ait GSH analizi değerleri sırasıyla 116.512 ± 33.543 , 122.053 ± 34.360 , 65.468 ± 14.945 , 75.997 ± 24.828 $\mu\text{mol/L}$ protein olarak bulundu (Şekil 4.2). Levene testi ile grupların varyanslarının homojen dağılım göstermediği bulundu ve grupların arasında ortalama bakımından anlamlı bir fark bulundu ($p<0.05$). Dunnett T3 testi ile MTX grubuna göre kontrol ve MOR grubunda anlamlı bir artışın olduğu bulundu($p<0.05$). Ayrıca MTX grubuna göre MTX +MOR grubunda anlamlı bir artışın olduğu bulundu ($p<0.05$).



Şekil 4.2. Böbrek dokusu GSH analizi değerleri (μmol/mg protein).

4.1.3. Böbrek Dokusu Total Oksidan Seviyesi (TOS) Düzeyleri

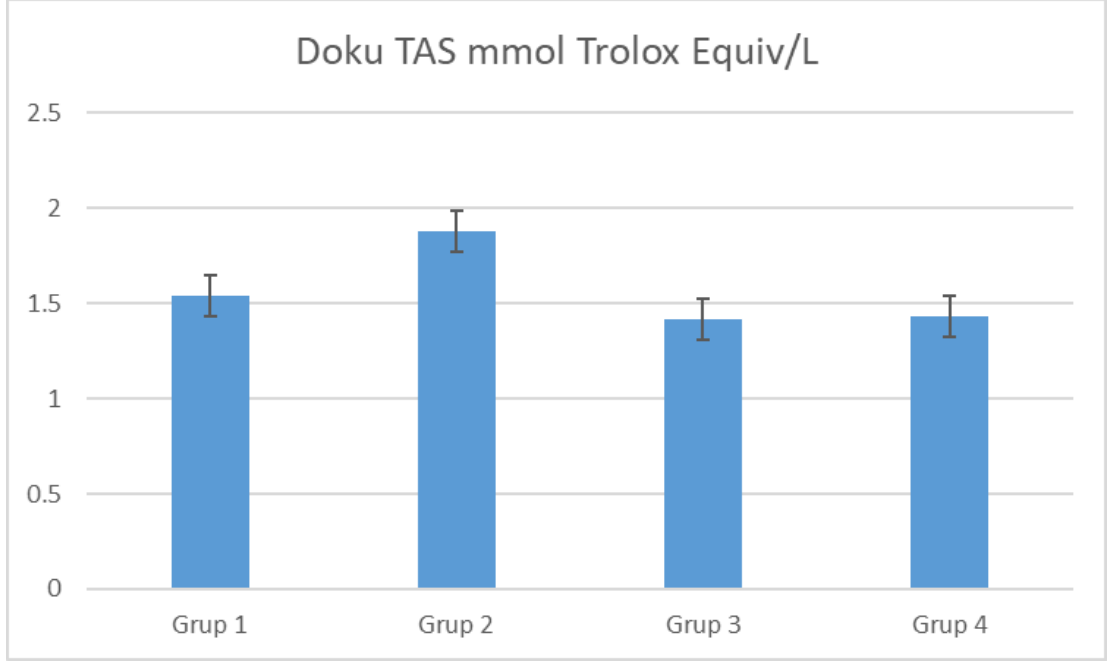
Grup 1 (Kontrol), grup 2 (MOR), grup 3 (MTX), grup 4 (MTX+MOR)'e ait TOS aktivite düzeyi değerleri sırasıyla 10.506 ± 2.287 , 6.706 ± 2.154 , 12.356 ± 2.538 , 8.464 ± 2.000 μmol H₂O₂ equiv /L olarak bulundu (Şekil 4.3). Tüm gruplar normalite testi olan Shapiro Wilk testi ile test edildi ve tüm grupların normal dağılım gösterdiği bulundu. Varyansların homojen olup olmadığı Levene testi ile test edildi ve homojen dağılım gösterdiği bulundu. Gruplar arasında ortalama bakımından anlamlı bir fark vardı ($p < 0.05$). Tukey HSD testi ile MOR grubuna göre kontrol ve MTX grubunda anlamlı bir artışın olduğu bulundu. Ayrıca MTX grubuna göre MTX+MOR grubunda anlamlı bir azalışın olduğu bulundu ($p < 0.05$).



Şekil 4.3. Böbrek dokusu TOS Aktivite Düzeyleri (µmol H₂O₂ equiv /L).

4.1.4. Böbrek Dokusu Total Antioksidan (TAS) Aktivite Düzeyleri

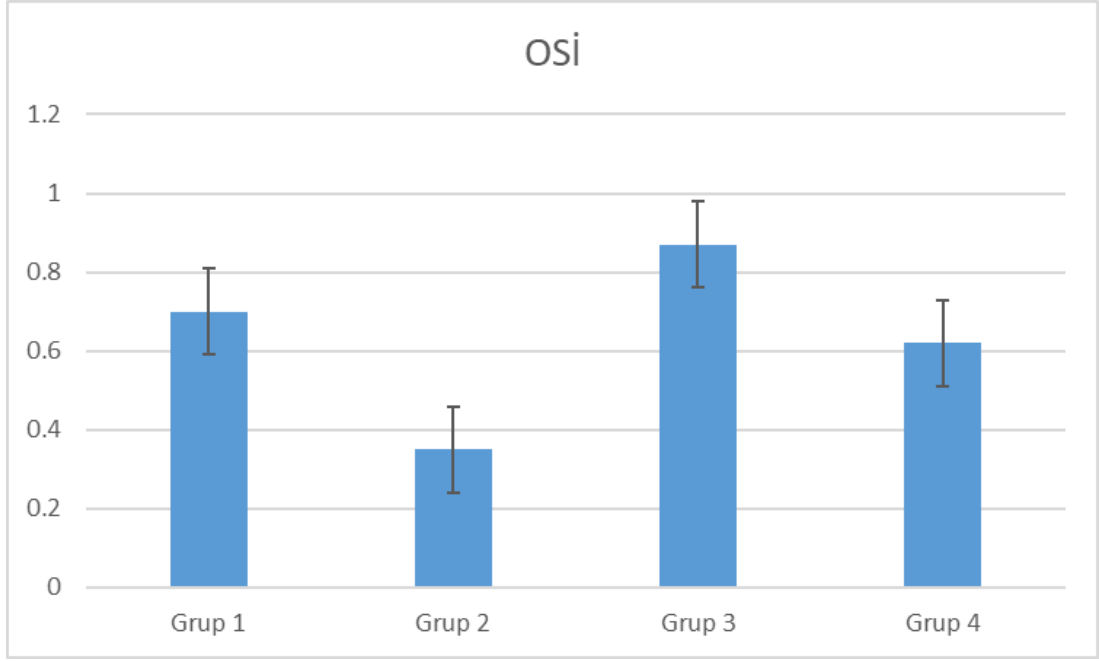
Grup 1 (Kontrol), grup 2 (MOR), grup 3 (MTX), grup 4 (MTX+MOR)'e ait TAS aktivite düzeyi değerleri sırasıyla 1.535 ± 0.200 , 1.880 ± 0.324 , 1.421 ± 0.200 , 1.431 ± 0.239 mmol Trolox Equiv/L olarak bulundu (Şekil 4.4). Her bir grup normalite testi olan Shapiro Wilk testi ile test edildi ve tüm grupların normal dağılım gösterdiği bulundu. Levene testi ile grupların varyanslarının homojen dağılım gösterdiği bulundu. Grupların arasında ortalama bakımından anlamlı bir fark elde edildi ($p < 0.05$). Tukey HSD testi ile MOR grubuna göre kontrol, MTX ve MTX+MOR grubunda anlamlı bir azalışın olduğu bulundu ($p < 0.05$). Ayrıca MTX grubuna göre MTX+MOR grubunda artışın olduğu görüldü fakat anlamlı olarak bulunamadı ($p > 0.05$).



Şekil 4.4. Böbrek dokusu TAS aktivite düzeyleri (mmol Trolox Equiv/L).

4.1.5. Böbrek Dokusu Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Aktivite Düzeyleri

Grup 1 (Kontrol), grup 2 (MOR), grup 3 (MTX), grup 4 (MTX+MOR)'e ait OSİ aktivite düzeyi değerleri sırasıyla 0.697 ± 0.191 , 0.353 ± 0.075 , 0.872 ± 0.153 , 0.616 ± 0.210 olarak bulundu (Şekil 4.5). Dört grupta normalite testi olan Shapiro Wilk testi ile test edildi ve tüm grupların normal dağılım gösterdiği bulundu. Grupların varyanslarının homojen olup olmadığı Levene testi ile test edildi ve homojen dağılım göstermediği bulundu. Grupların arasında ortalama açısından anlamlı bir fark bulundu ($p < 0.05$). Dunnett T3 testi ile MOR grubuna göre kontrol, MTX ve MTX+MOR gruplarında anlamlı bir artışın olduğu bulundu. Ayrıca MTX+MOR grubuna göre MTX grubunda anlamlı bir artışın olduğu bulundu ($p < 0.05$).



Şekil 4.5. Böbrek dokusu OSİ Aktivite Düzeyleri

4.2. SERUMDA BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI

Serumda üre, kreatinin, total protein ve ürik aside ait biyokimyasal bulgular çizelge 4.2’te özetlenmiştir.

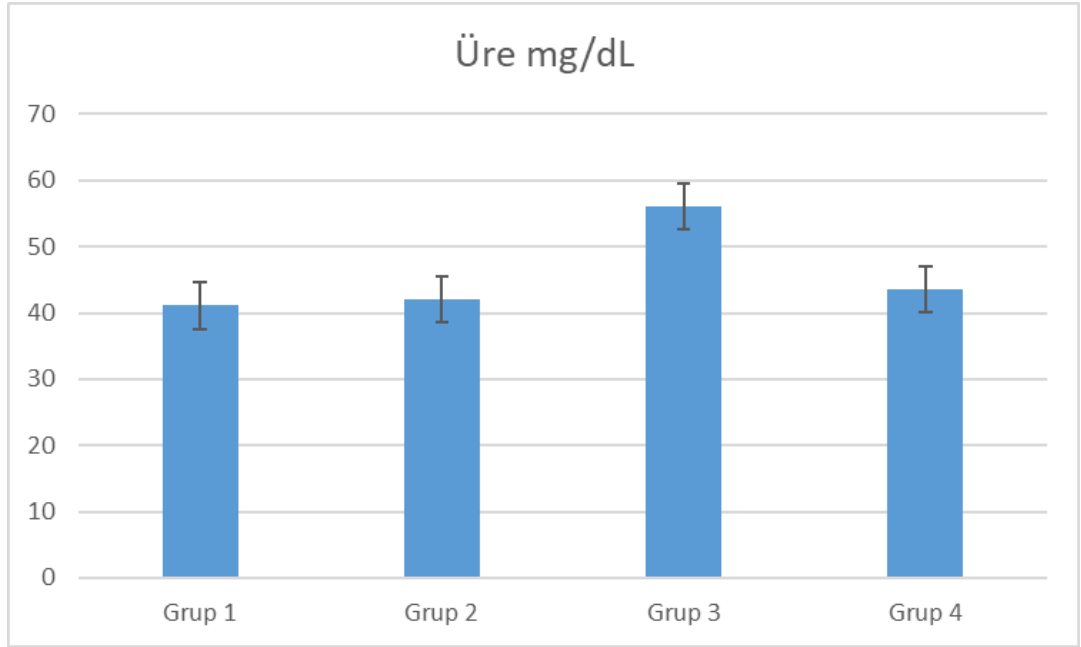
Çizelge 4.2. Serumda üre, kreatinin, total protein ve ürik asit değerleri.

	Üre mg/dL	Kreatinin mg/dL	Total protein g/dL	Ürik Asit mg/ dL
Grup 1: Kontrol	41.13±4.40	0.12±0.07	3.93±1.02	1.26±0.31
Grup 2: MOR	42.00±3.12	0.17±0.17	3.71±1.17	0.91±0.42
Grup 3: MTX	56.00±22.51	0.22±0.07	4.98±0.76	2.23±0.89 ^a
Grup 4: MTX+MOR	42.63±4.27	0.21±0.10	4.80±0.74	0.91±0.31

^ap<0.05 Grup 3 vs Grup 2, 4

4.2.1. Serumda Üre Düzeyleri

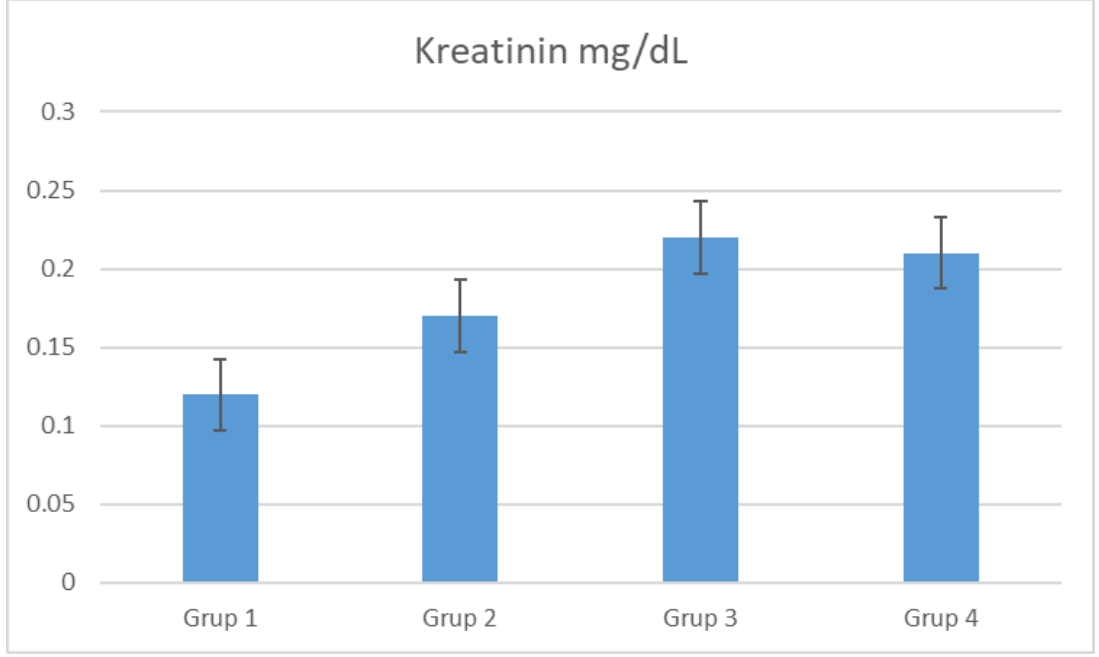
İntrakardiyak kanlardan elde edilen serumların grup 1 (Kontrol), grup 2 (MOR), grup 3 (MTX), grup 4 (MTX+MOR)'e ait üre değerleri ise sırasıyla 41.125 ± 4.390 , 42.000 ± 3.117 , 56.000 ± 22.507 , 42.625 ± 4.274 mg/dL olarak bulundu (Şekil 4.6). Tüm analiz grupları normal dağılım gösterdi ve varyansları homojen olarak dağılmamaktaydı. Grupların arasında ortalama açısından anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Dunnett T3 testine göre gruplar arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0.05$).



Şekil 4.6. Serumda üre düzeyleri (mg/dL).

4.2.2. Serumda Kreatinin Düzeyleri

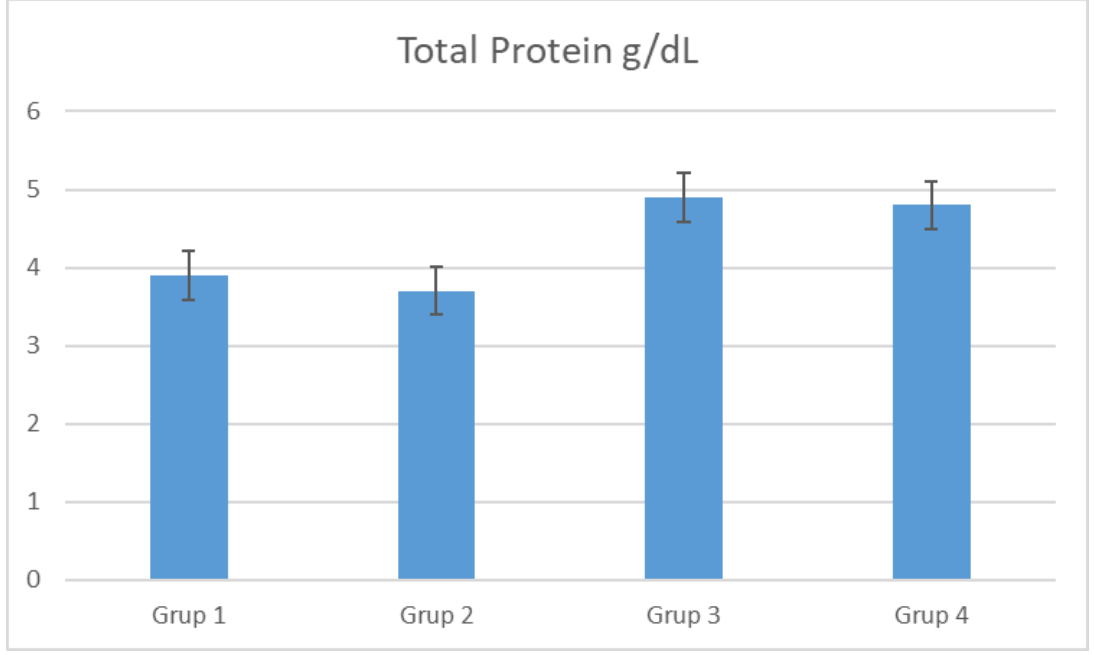
Grup 1 (Kontrol), grup 2 (MOR), grup 3 (MTX), grup 4 (MTX+MOR)'e ait kreatinin değerleri ise sırasıyla 0.119 ± 0.073 , 0.174 ± 0.171 , 0.215 ± 0.066 , 0.206 ± 0.099 , mg/dL olarak bulundu (Şekil 4.7). Grupların varyansları homojen dağılım göstermekteydi fakat gruplar arasında ortalama açısından anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Tukey HSD testine göre gruplar arasında anlamlı bir ilişki ortaya konulamadı ($p>0.05$).



Şekil 4.7. Serumda kreatinin düzeyleri (mg/dL).

4.2.3. Serumda Total Protein Düzeyleri

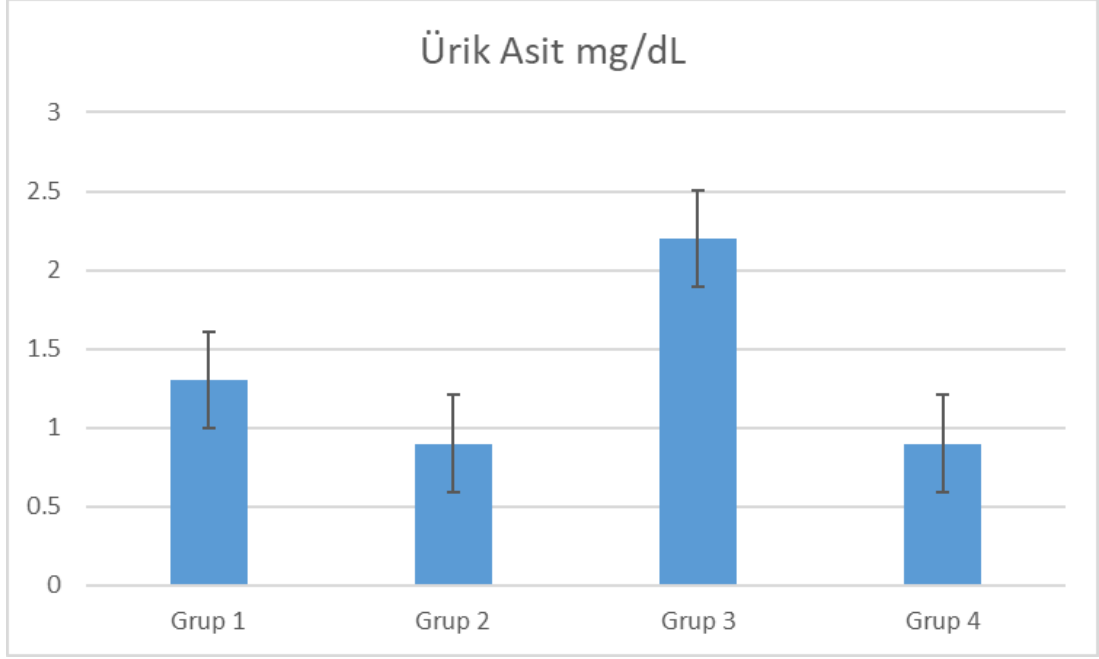
Grup 1 (Kontrol), grup 2 (MOR), grup 3 (MTX), grup 4 (MTX+MOR)'e ait total protein değerleri ise sırasıyla 3.925 ± 1.021 , 3.713 ± 1.173 , 4.975 ± 0.761 , 4.800 ± 0.738 g/dL olarak bulundu (Şekil 4.8). Tüm gruplar normal dağılım göstermedi ve grupların varyanslarının homojen dağılım gösterdiği bulundu. Grupların arasında ortalama açısından anlamlı bir fark vardı ($p < 0.05$).



Şekil 4.8. Serumda total protein düzeyleri (g/dL).

4.2.4. Serumda Ürik Asit Düzeyleri

Grup 1 (Kontrol), grup 2 (MOR), grup 3 (MTX), grup 4 (MTX+MOR)'e ait ürik asit analizi değerleri ise sırasıyla 1.262 ± 0.312 , 0.912 ± 0.416 , 2.225 ± 0.888 , 0.912 ± 0.309 mg/dL olarak bulundu (Şekil 4.9). Tüm gruplar normal dağılım gösterdiği bulundu. Grupların varyansı homojen dağılım göstermediği bulundu. Gruplar arasında ortalama bakımından anlamlı bir fark vardı ($p < 0.05$). Dunnett T3 testi ile MTX grubuna göre MTX+MOR ve MOR gruplarında anlamlı bir azalışın olduğu bulundu ($p < 0.05$).



Şekil 4.9. Serumda ürik asit düzeyleri (mg/dL).

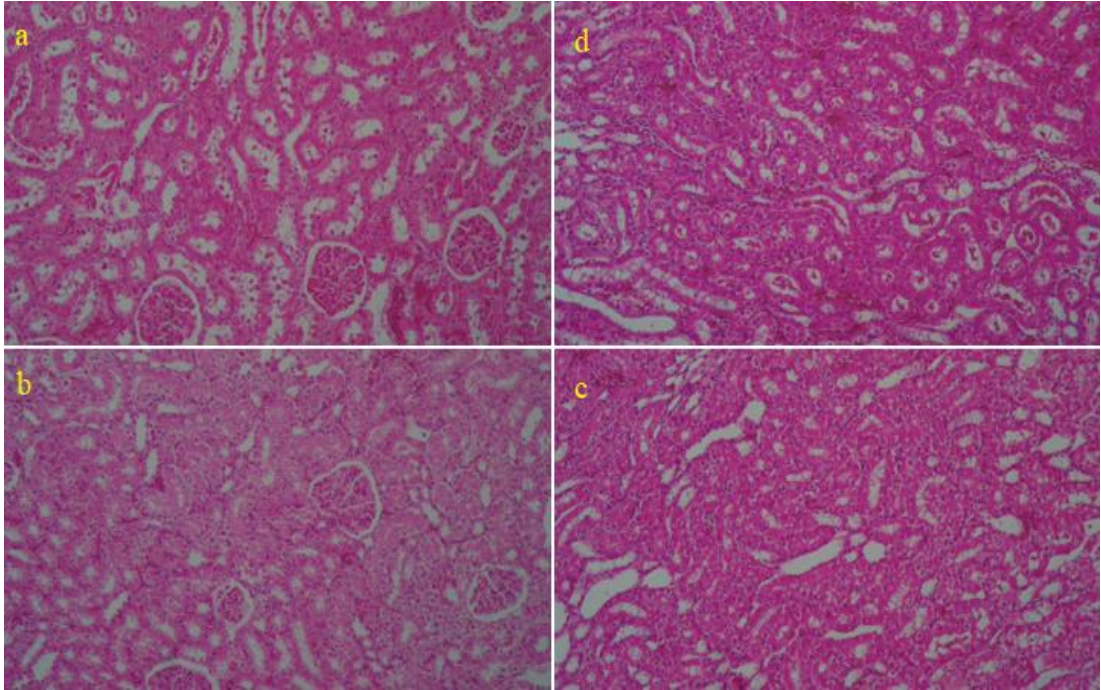
4.3. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Histopatolojik analizler sonucunda MOR ve kontrol grubuna ait böbrek dokusunda normal histolojik bulgular saptandı (Şekil 4.10; a, b). MTX ve MTX+MOR gruplarında ise interstisyel fibrozis, interstisyel nefrit, vasküler konjesyon, tubuler dejenerasyon, tubül lümeninde hiyalin silindir, tübüler bazal membran distorsiyonu, glomerular yangı, atrofi, hücre artışı, bazal membran bozukluğu ve tübüler nekroz gibi patolojik bulgulara rastlandı (Şekil 4.10; c, d). En yüksek hasar skoru 6.75 ± 2.30 oranı ile MTX grubunda saptandı (Çizelge 4.3). MTX grubu ile kontrol ve morin grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı bir artışın olduğu bulundu ($p < 0.05$). MTX grubu ile MTX+MOR grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı bir azalışın meydana geldiği bulundu ($p < 0.05$).

Çizelge 4.3. Histopatolojik hasar skoru tablosu.

Gruplar	Hasar Skoru (Mean±Standart Deviasyon)
Kontrol	0.67±0.49
MOR	0.83±0.58
MTX	6.75±2.30 ^{a, b}
MTX+MOR	3.83±1.47

^ap<0.05 Grup 3 vs Grup 1, 2 ^bp<0.05 Grup 3 vs Grup 4



Şekil 4.10. 10'lük büyütmadaki histopatolojik bulgular (a: Kontrol, b: MOR, c: MTX, d: MTX+MOR grubu).

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Çağımızın morbite ve mortalite oranı yüksek olan kanser hastalığı için tıp, geçmişten günümüze birçok tedavi metodu ile hastalığın prognozunu iyileştirerek daha kaliteli yaşam sürdürmeyi amaçlamıştır. Tıbbi tedavi yöntemlerinden kemoterapide akıllayıcı ajanlar, antimetabolitler, kortikosteroidler, antitümör antibiyotikler, topoizomerraz inhibitörleri ve mitotik inhibitörler olan antineoplastik ilaçlar yer almaktadır. İlaçların içeriğindeki sitotoksik maddelerin tedavi amacının yanında oldukça ciddi yan etkileriyle karşılaşmaktadır. Hücre proliferasyonunun hızlı olduğu mukozal alanlarda, kıl foliküllerinde, bazı ilaçların özellikle metabolizasyonlarının ve itrahının çok olduğu organlarda çeşitli toksik etkiler baş göstermektedir [88, 89].

Antimetabolitler vitaminlerle ilgili yapılan çalışmalar sonucu bulunan ve alkilleyici ajanlarla birlikte antikanser ilaçların temelini atan ajanlardır [90]. Antimetabolit grubu ilaçlar sadece kanser tedavisinde kullanıma özgü olmayıp romotolojik, otoimmün hastalıklar ve bakteriyel bazı hastalıklar gibi çeşitli tedavi protokollerinde yer alan bir ilaçtır. Antimetabolitler hücreysel olaylarda koenzim olarak rol oynayan doğal metabolitlerle benzerliğinden dolayı analog görevi görür. Bundan dolayı biyokimyasal tepkimelerde benzer metabolitin yerine geçerek o yolda blokaj veya metabolik yolu değiştirerek hücrenin metabolizmasını bozar. Antimetabolitler nükleozid ve nükleotit analogu, pürin ve pirimidin analogu ve antifolatlar olmak üzere alt gruplara ayrılır. Metotreksat antifolat grubunda yer alan ve hücre siklusunun “S” fazında sitotoksik etki yapan bir antimetabolittir [89, 91, 92].

Bu çalışma MTX'in böbrek dokusuna verdiği hasarı belirlemek ve ayrıca MTX'in zararlı etkisine karşı MOR'un koruyucu etkisini ortaya koymak amacıyla yapıldı. MTX; vaskülitler, akut lösemiler, ostesarkomlar, meme kanseri, akciğer kanseri enflamatuvar bağırsak hastalıkları, RA, psöriatik artrit, sarkoidoz, sistemik lupus

eritematozus gibi bağ dokusu hastalıkları gibi birçok hastalığın tedavi protokolünde uzun yıllar yer almış antimetabolit bir ilaçtır. Bu kadar geniş kullanımına rağmen birçok yan etkisi yer almaktadır. Örneğin; bağırsak lümeni, karaciğer, kemik iliği, böbrek dokusu, mide üzerine ciddi toksik etkileri mevcuttur [2, 37, 38].

Kanserde birçok tamamlayıcı ve alternatif tedavi (TAT) yöntemi kullanılmaktadır. TAT kullanımının yaygınlığıyla ilgili ülkemiz dahil on dört Avrupa ülkesinin olduğu bir çalışmada %15-%73 geniş dağılımlı olarak, ortalama ise %36 oranında sayısal veri elde edilmiştir. Yapılan araştırmaların içeriğine bakıldığında bitkilerden yapılan karışımların kullanımı oldukça yaygın olup TAT kullanımın gittikçe arttığı bildirilmiştir [88].

Kanserde kullanılan bitkisel içerikler incelendiğinde karsinojenlerin oluşumunu baskılayıcı veya etkilerini ortadan kaldırıcı antikanserejenik maddeler olduğu tespit edilmiştir. Bunlar A, C, E vitaminleri, selenyum, β-karoten, indoller, flavonoid gibi bitkisel kaynaklı doğal öğelerdir [91].

MOR suda çözünürlüğü az olan ve bitkilerden elde edilen bir flavonoiddir. MOR'un literatüre göre birçok biyolojik etkisi mevcuttur. Bunlar; kardiyoprotektif, antialerjik, antineoplastik, sitoprotektif, antihiperüremik, antimutajenik, nöroprotektif ve nefroprotektif etkidir. Bu çalışma MOR'un nefroprotektif etkisinden yararlanarak MTX'in böbrek dokusuna karşı yaptığı etki önlenbilir mi ya da durdurulabilir mi hipotezi üzerine yapıldı [5, 59, 60].

Çalışmamızda MTX ve MOR'un böbrek dokusu üzerine etkisinin gözlenebilmesi için deney grubu dörde ayrıldı ve literatüre uygun olarak 10 gün süre ile ilaç uygulaması yapıldı. MTX doz uygulaması ve süre seçimi konusunda keskin sınırı olan ve ayrıca bu sınırlar aşıldığı zaman ciddi yan etkileri olan bir antimetabolit ilaçtır. Bu özelliğinden dolayı deneysel çalışmaların çoğunluğunda yararlı etkisinin toksik etkisini geçmemesi için kısa süre ve etkin dozda uygulanmıştır.

MTX'in büyük bir çoğunluğu (%60-90) renal dokudan atılmaktadır. Bu sebepten dolayı böbrek toksikasyonun büyük olduğu bir dokudur. MTX metabolitleri

glomerüler yumaktan süzülür ve tübüllerden aktif sekresyon gerçekleştikten sonra distal tübülden aktif yeniden emilim meydana gelmektedir. Bundan dolayı MTX metabolitleri renal tübüllerde birikerek; tübüllerin doğrudan epitel hücrelerine toksik etki yapar ve tübüllerde kristalleşen MTX metabolitleri intratübüler obstriksiyona yol açarak renal hasar meydana getirmektedir. Böbrekte meydana gelen hasar sonucu böbreğin fonksiyonlarında da aksaklıklar görülmesi kaçınılmazdır. MTX'in renal klirens ve kreatinin klirensi (CL_R) ile ilişkisi hücre dışı plazma adenozin konsantrasyonunun artışı, böbrek parankim dokusunda al reseptörlerinin aktivasyonu sonucu renal kanlanmanın azalması, tuz ve su tutulumu ile ilişkili olduğu şeklinde açıklanmıştır. LD-MTX ve HD-MTX kullanımlarda akut ve kronik böbrek yetmezliklerinin görüldüğü klinik çalışmalarda bildirilmiştir. Böbrek fonksiyon testi olan serum kan üre nitrojeni (BUN) ve kreatinin düzeylerinde artış, üremi ve idrarda kan gibi vakaların olduğu bildirilmiştir. Özellikle böbrek rahatsızlığı olan hastalarda doğru doz verilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Ayrıca renal kanlanmanın azalmasına sebep olabilecek distal tübülden geri emilimi etkileyecek zayıf organik asit içeren ilaç ve nefrotoksik ilaçların MTX'le birlikte kullanımı renal atılımın azalmasına sebep olabilmektedir. MTX kullanırken hidrasyonun sağlanması böbrek fonksiyonunu sağlanması için önemlidir. Böbreğin fonksiyonlarından olan eritropoeziste renal hasardan etkilenmektedir. Kemik iliği üzerindeki toksik etkisi pansitopeni tablosunun ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. MTX plazma konsantrasyonunu etkilemesinden dolayı böbreği ciddi oranda etkileyen bir unsurdur. Çünkü böbrek kanın süzüldüğü yerdir [2, 3, 31, 40-42, 93, 94]. Meydana gelen MTX'in sebep olduğu nefrotoksisite mekanizmalarında oksidatif strese yer almaktadır. MTX renal dokuda antioksidan savunma sisteminin azalmasına ve lipit peroksidasyon ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır [48]. MTX'in nefrotoksisitesinde özellikle HD-MTX tedavilerinde akut böbrek hasarı meydana gelme oranı %2 – 12 oranında olduğu kaynaklarda yer almaktadır. Bu tabloyu önlemek amaçlı ürünler alkolizasyon, hidrasyon, lökoverin (kalsiyum folinat) kurtarıcısı başlatıla bilinmektedir. MTX klirensinin bozulması vücudun bu toksik maddeye karşı maruz kalma süresinin arttırdığı için toksik etkilerde artmaktadır. Bu toksik etkiler mukozit, miyelosupresyon ve hepatotoksisite gibi komplikasyonlardır [95].

Kolli ve ark. [42] erkek sıçanlara MTX 7 mg/kg dozunda 3 gün boyunca uygulama yapılmış ve sonrasında ışık mikroskopisi ve biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiş. MTX ile tedavi edilen sıçanların böbreklerinde kontrollerle karşılaştırıldığında nötrofil infiltrasyonu belirteci miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinde önemli artış olmuş, protein ve lipit peroksidasyonuna bakmak için protein karbonil içeriği ve MDA düzeylerinde ve serum kreatinin düzeyinde önemli ölçüde artış olduğu bulunmuştur. Antioksidan enzimlerden SOD, CAT, GSH-PX düzeylerine önemli ölçüde azalmıştır. Çalışmamızdaki TAS, TOS, OSİ analizleri ve lipit peroksidasyon değerlendirilmesine ek olarak MPO ve protein karbonil içeriğine bakılarak önümüzdeki çalışmalarda yer verilebilecek farklı belirteçlerin varlığına ışık tutan bu çalışma ile çalışmamız benzer analizlerde birbirini desteleyici ve katkıda bulunabilir niteliktedir. Ayrıca MTX'in doz ve veriliş süresinin farklı olması iki çalışma arasındaki serum kreatinin düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılmasında farklılar doğurmasına sebep olmuştur.

MTX'in bu yan etkisinden dolayı çalışmamızda böbrek dokusu tercih edildi. Doğal flavonoid olan MOR'un MTX kaynaklı nefrotoksitesine karşı koruyucu etkileri araştırıldı. Çalışmamızda MOR ile oksidatif hasar belirteçleri MDA, GSH, antioksidan kapasite için TAS, TOS, OSİ seviyeleri, böbrek fonksiyon testi üre, kreatinin, ürik asit gibi biyokimyasal belirteçlerin seviyeleri ve histopatolojik inceleme ile renoprotektif etkilerine bakıldı. Çalışmamızın sonucuna göre MTX grubu ile kontrol grubu, MTX+MOR grubu ve MOR grubu arasında anlamlı ilişki bulundu. Bu sonuçta gösteriyor ki antioksidan olan MOR MTX'in renal doku üzerine yaptığı hasarı azaltmaktadır.

Literatür taraması yapıldığında MTX'in renal toksik etkisine karşı MOR flavonoidinin koruyuculuğu üzerine çok az çalışma yer almaktadır. MTX'in renal toksikasyonlarının mekanizmaları ile ilgili açıklayıcı çalışmalar diğer toksik etkilerinin olduğu dokulara nazaran daha az olduğu için bizim çalışmamız bu konuda oldukça aydınlatıcı ve katkıda bulunabilecek niteliktedir. HD-MTX kullanım olgularında nefrotoksik etkilerin olduğu bilinirken LD-MTX kullanımında 59 yaşındaki kadın bir hastada yavaş ilerleyen bir böbrek fonksiyon bozukluğu olduğu fark edilmiştir. Kadının böbrek biyopsisinde böbrekte glomerüler fibroz ve vasküler skleroz patolojik sonucu tespit edilmiştir [45]. Bizim çalışmamızda histopatolojik incelememiz sonucunda

interstisyel fibrozis, interstisyel nefrit, vasküler konjesyon, tubuler dejenerasyon, tubül lümeninde hiyalin silindir, tübüler bazal membran distorsiyonu, glomerular yangı, atrofi, hücre artışı, bazal membran bozukluğu ve tübüler nekroz gibi patolojik bulgulara en fazla MTX grubunda rastlandı. Bu sonuç ile çalışmamız MTX kaynaklı böbrek dokusundaki hasarların neler olduğunu açıklayıcı nitelikte olup böbrek fonksiyonlarının bozulmasındaki sebebin aydınlatılmasına katkıda bulunmuştur.

Romotoid artrit gibi uzun süre ve düşük dozda MTX alan hastalarda uzun dönemde gelişen toksikasyonlardan biri de renal hasar olduğunu belirtmiştik. LD-MTX kullanımında CL_R değeri bireyler arası çeşitlilik göstermekle birlikte RA hastalarında genellikle glomerüler filtrasyonun azalmasıyla CL_R düşüş görülmüştür [31]. 77 hastanın dahil edildiği klinik bir çalışmada CL_R düşükten yükseğe doğru şeklinde 4 grup oluşturulmuş ve MTX uygulaması sonrası 2 ve 8 saat sonrasında kan örnekleri alınmıştır. Çıkan sonuçlarda CL_R düşük olan 1. Grup ve sırasıyla 2., 3., 4. gruplarda böbrek fonksiyon bozukluğu giderek daha da azalan şekilde sonuç elde edilmiştir [41]. Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz serum analizlerindeki böbrek fonksiyon testi olan ürik asit düzeyinin MTX grubunda diğer gruplara göre anlamlı bir artışın olduğu ayrıca MTX'le birlikte MOR kullanımının ürik asit düzeyinde anlamlı azalış ile olumlu etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Klinik bir çalışmada RA hastalarında LD-MTX (15mg/2 doz) ve corasprin kombine tedavisinde özellikle coraspinle düşük doz bile olsa MTX kullanımı böbrekte glomerüler ve tübüler hasar oluşmuştur ve bu durum klinikte oldukça önemli bir durum olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca bu tarz hastaların belli aralıklarla serum kreatinin seviyelerinin takibi ile böbrek fonksiyon değerlendirilmesi yapılması gerektiği belirtilmiştir [47]. Bizim çalışmamızda MTX toksikasyonunda serum kreatinin düzeyinde artış gözlemlendi fakat anlamlı sonuç elde edilmedi bunun sebebinde deney süresinin kısıtlı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Böbrek fonksiyon bozukluğu olan 120 hastanın (66 yeni, 54 önceden) dahil edildiği RA'lı ve MTX tedavisi uygulanan bir klinik çalışmada glomerüler filtrasyon hızı baz alınarak böbrek fonksiyon değerlendirilmesi yapılmıştır. Ortalama 23 ay süren bu çalışmada iki grup hastada %30 toksisite görülmüştür. %5,8 oran ile renal toksisite

görülmüş ve iki grup arasında toksisite oranında çok farklılık gözlemlenmemiştir (66 hastada 23, 54 hastada 12) [96]. Deneysel çalışmamızda böbrek dokusunda MTX'in olumsuz sonuçlarını histopatolojik ve doku analizlerimizde daha anlamlı sonuçlar elde etmiş olmamız böbrek fonksiyonunun bozulabileceğine katkıda bulunabilir nitelikte olmasına karşın serum analizlerinde bu sonuçları elde edemememizin sebebini yine deney süresinin az olması ve verilen ilaç dozuyla ilgili olabileceği kanaatindeyiz.

Öktem ve ark. [48] yaptığı sıçan modüllerinin kullanıldığı MTX'in renal toksikasyonunda oksidatif stres belirteci MDA seviyesinde artış ve antioksidan durumu değerlendirmek için SOD, CAT, GSH-PX seviyelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan olan kafeik asitin MTX'le birlikte verildiği grupta ise MDA seviyesinde azalış ve SOD, CAT, GSH-PX seviyesinde artış ile oksitadif koruyuculuk sağlanmıştır. Çalışmamızda bakılan antioksidan kapasite ve oksidatif stres değerlendirilmesinde TAS, TOS ve OSİ düzeylerindeki sonuçlar bu çalışmayı destekler nitelikte olup kullandığımız MOR maddesiyle koruyuculuk sağlanması antioksidan özelliğinin olduğunu göstermiştir.

Glukarpidaz 2012 yılında ABD tarafından böbrek fonksiyonunun bozuk olan hastalarda MTX klirensinin bozulması ve beraberinde gelen serumdaki seviyesini azalmak için piyasaya sunulan bakteriyel bir enzimdir. Artmış serum MTX konsantrasyonunda 1 µM/L'den fazla azalttığı ve bunun yanında kusma, hipotansiyon, kızarıklık, baş ağrısı gibi yan etkilerinin olduğu kaynaklarda belirtilmiştir. Pediatrik, yetişkin toplam 3887 hastaya uygulanan glukarpidaz ve profilaktik tedavi (hidrasyon, üriner alkolizasyon, lökoverin, diyaliz) uygulanmış bir klinik çalışmada böbrek yetmezliği sebebiyle ölümlerle sonuçlanan tedaviler olmuştur [48]. Çalışmada kullanılan flavonoid olan MOR'in toksik etkisinin olmadığı dolayısıyla klinik kullanımda yan etki görülmemesi açısından avantajlı bir koruyucu olabileceği düşünülmektedir.

Sisplatin kaynaklı hepatik ve renal hasarda MOR'un (50 mg/kg, 100 mg/kg oral) koruyuculuğunu araştıran bir çalışmada serbest radikal süpürme özelliği ve enflamatuar sitokinlerin modülasyonu ile MOR hepatorenal dokuda antioksidan koruculuğu olabilecek bir bileşik olarak gösterilmiştir. Ayrıca MOR iki farklı dozda kullanılarak etkisine bakılan bu çalışmada yüksek dozda daha etkin olduğu ve negatif

bir sonuca sebep olmadığı tespit edilmiştir [67]. Bizim çalışmamızda renal dokuda bakılan oksidatif stres belirteçlerinden olan MDA, TOS, OSİ ve antioksidan kapasite değerlendirilmesi için kullanılan TAS, GSH düzeylerinde MTX alan gruba göre, MTX ile MOR'un (100 mg/kg) birlikte verildiği grupta flavonoidin pozitif etkisi istatistiksel sonuçlara yansdı.

Sisplatin kaynaklı renal toksisitede MOR'un etkilerinin ne olduğunu belirten bir çalışmada da toksikasyon mekanizmaları araştırılmıştır. Sisplatinin nefrotoksik mekanizması net olmasa da apoptoz ana neden olarak bilinmektedir. Wei ve ark.'nın yaptığı çalışmada sisplatin kaynaklı nefrotoksisitede apoptoz durumunu değerlendirmek için bax ve kaspaz3 aktivasyonları aynı zamanda tümör baskılayıcı p53 aktivasyonlarına bakılmış böbrek hasarında oldukça önemli belirteçler olduğu bildirilmiştir. Bu belirteçlerin MOR ile önemli derecede azaldığı ise çalışma verilerinde yer almaktadır. Sisplatinin böbrekte serbest radikal (Hidroksil-OH, süperoksit anyonu- O_2^-) üretmesi ve lipid peroksidasyonuna sebep olduğu için SOD ve GSH-PX aktivasyonlarına bakılmış, MOR ile bu belirteçlerin azaldığı sonucuna varılmıştır [58]. Çalışmamızda oluşturulan renal toksisitede MOR'nin etkisi histopatolojik olarak inceleme ile yapılmış olup anlamlı sonuç elde edilmiştir. Fakat önümüzdeki çalışmalarda immünohistokimyasal analizlerle daha ayrıntılı bulgular elde edilebilir.

Doksorubisin (DOX) de antineoplastik amaçlı kullanılan ve oldukça toksik etkisi bulunan bir ilaçtır. DOX böbrek, kalp ve karaciğerde oksidatif stres, enflamasyon ve apoptotik etkiye sebep olduğu kaynaklarda yer almaktadır. Kuzu ve ark.'nın yaptığı deneysel çalışmada SOD, CAT, GSH-PX, GSH, MDA oksidatif hasar belirteçleri hepatorenal dokuda incelenmiş ve MOR ile koruyuculuğuna bakıldığında antioksidan etki göstermiştir. Ayrıca her iki dokudaki hasar için hem histokimyasal hem de serum ALT, AST, üre, kreatinin değerleri ile fonksiyon değerlendirilmesi yapılmış ve MOR'un bu değerleri azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada enflamatuvar sitokinlerin (NF- κ B, TNF- α , IL-1 β) seviyelerinde MOR düzenleyici etki göstermiştir. Histopatolojik incelemede DOX grubunun renal dokusunda kortekste ve medulla da tübüler epitelde pıhtılaşma nekrozu, hiperemi ve interstisyel damarlarda kanama görülmüş MOR (100mg/kg) alan grupta hafif nekroz ve orta derece hiperemi

görülmüştür [97]. Bu literatür çalışmamızdaki böbrek toksisitesindeki MOR etkisinde doku analizi MDA, GSH ve histopatolojik analiz sonuçlarımızı destekleyici niteliktedir.

Sıçanlara MOR ön uygulaması ile MTX' in farmakokinetiğindeki değişiklikleri inceleyen bir deneysel çalışmada MTX'in total klirensi %72 ve renal klirensi %42 oranında azaldığı rapor edilmiştir. Ayrıca sadece MTX verilen gruplarda sistemik maruziyetin artması sebebiyle yarılanma ömründe de artış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak MOR ön uygulaması ile MTX'in renal atılımı ve plazma farmakokinetiğinde önemli ölçüde değişiklikler tespit edilmiştir [98].

Çalışma elde edilen biyokimyasal ve histopatolojik analizler sonucunda MTX'in yüksek toksisitesinin MOR'nin antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği ile böbrek hasarını azaltılabileceği kanaatine varıldı. Ayrıca bu konuyla ilgili yapılacak çalışmalara da katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Kutluana, U., Nevin, O., Yılmaz, M., Yönetci, N., Kaptanoğlu, B., Özütemiz, Ö., "Ratlarda metotreksata bağlı oksidatif intestinal hasarda leflunomidinin koruyucu etkisinin araştırılması", *Akademik Gastroenteroloji Dergisi.*, 2011;10(1):23-7.
2. Bedoui, Y., Guillot, X., Selambarom, J., Guiraud, P., Giry, C., Jaffar-Bandjee MC., ve ark. "Methotrexate an old drug with new tricks", *Int J Mol Sci.*, 2019;20(20).
3. Armağan, İ., "Metotreksat'ın karaciğer ve böbrekte neden olduğu hasarda oksidatif stresin rolü", *Medical Journal of Suleyman Demirel University.*, 2015;22(4).
4. Melih, K., "Sıçanlarda methotrexate kaynaklı testis hasarına karşı Camellia sinensis (Yeşil Çay) kateşinlerinin antioksidan ve antiapoptotik etkileri", Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi*, Trabzon, 2014.
5. Gül, Ntd., Muhammed, Ay., "Streptozotosin ile oluşturulan diyabetik sıçanlarda morin'in (2', 3, 4', 5, 7-pentahydroxyflavone) koruyucu etkileri", *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, Ankara, 2012.
6. İnan, B., "Bazı flavonoidlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi, asetilkolinesteraz ve karbonik anhidraz enzimleri üzerine etkilerinin incelenmesi", *Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2015.
7. Caselli, A., Cirri, P., Santi, A., Paoli, P., "Morin: a promising natural drug", *Curr Med Chem*, 2016;23(8):774-91.
8. Li, HW., Zou, TB., Jia, Q., Xia, EQ., Cao, WJ., Liu, W., ve ark. "Anticancer effects of morin-7-sulphate sodium, a flavonoid derivative, in mouse melanoma cells", *Biomed Pharmacother*, 2016;84:909-16.
9. Kandemir, FM., Yildirim, S., Kucukler, S., Caglayan, C., Darendelioglu, E., Dortbudak, MB., "Protective effects of morin against acrylamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity: A multi-biomarker approach", *Food Chem Toxicol*, 2020;138:111190.
10. Kaplan, Arıncı., Alaattin, E., "Anatomi (kemik,eklemler, kaslar, iç organlar)", *Güneş Tıp Kitapevi*, Ankara, 2016.
11. Arifoğlu, Y., "Her Yönüyle Anatomi", *İstanbul Tıp Kitapevleri*, İstanbul, 2019.

12. Zakeri-Milani, P., Shirani, A., Nokhodchi, A., Mussa Farkhani, S., Mohammadi, S., Shahbazi Mojarrad, J., ve ark. "Self-assembled peptide nanoparticles for efficient delivery of methotrexate into cancer cells", *Drug Dev Ind Pharm*, 2020;46(4):521-30.
13. Farber, S., Diamond, LK., "Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid", *N Engl J Med*, 1948;238(23):787-93.
14. Malaviya, AN., "Landmark papers on the discovery of methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases: a fascinating story", *Int J Rheum Dis*, 2016;19(9):844-51.
15. Uzun, F., "Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Ellajik Asitin Etkileri", Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon, 2018.
16. Patel, A., Burns, E., Burkemper, NM., "Methotrexate use in allergic contact dermatitis: a retrospective study", *Contact Dermatitis*, 2018;78(3):194-8.
17. Rees, RB., Bennett, JH., Hamlin, EM., Maibach, HI., "Aminopterin for Psoriasis. A Decade's Observation", *Arch Dermatol*, 1964;90:544-52.
18. Çınar, İ., Süleyman, H., "Tiyamin Pirofosfatın Sıçanlarda Metotreksatla Oluşturulan Gastrotoksisite Üzerindeki Koruyucu Etkisinin Biyokimyasal Olarak Araştırılması", *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 2013.
19. Bleyer, WA., "The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug", *Cancer*, 1978;41(1):36-51.
20. Savran, M., "Ratlarda metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında c vitaminin koruyucu etkisinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi*, Isparta, 2011.
21. Elwood, PC., "Platelets, aspirin and cardiovascular disease", *J R Coll Physicians Lond*, 1976;10(4):347-50.
22. Tıbbi, Korty., "Farmakoloji. 12. baskı", *Pelikan Yayıncılık Ltd. Şti*, Ankara, 2009.
23. Uzar, E., "Metotreksat uygulanan ratların siyatik sinir ve medulla spinalisinde oksidan. antioksidanların durumu: kafeik asit fenetil ester'in antioksidan koruyucu etkisi", Uzmanlık Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı*, 2006.
24. Whittle, SL., Hughes, RA., "Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review", *Rheumatology (Oxford)*, 2004;43(3):267-71.

25. Seyhan, A., Erdem, B., Canaz, E., Güraslan, H., Bestel, A., Akbayır, Ö., "Persistan gestasyonel trofoblastik neoplazide metotreksat kullanımına bağlı nadir görülen kutanöz ülserler-olgu sunumu", *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*, 47(4):121-4.
26. Aithal, GP., "Hepatotoxicity related to methotrexate. Drug-induced liver disease", *Elsevier*, 2013. p. 593-604.
27. Chan, ES., "Cronstein BN. Methotrexate--how does it really work?", *Nat Rev Rheumatol*, 2010;6(3):175-8.
28. Miketova, P., Kaemingk, K., Hockenberry, M., Pasvogel, A., Hutter, J., Krull, K., ve ark., "Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia", *Biol Res Nurs*, 2005;6(3):187-95.
29. Caspi, D., Anouk, M., Golan, I., Paran, D., Kaufman, I., Wigler, I., ve ark., "Synovial fluid levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and IgA rheumatoid factor in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and osteoarthritis", *Arthritis Rheum*, 2006;55(1):53-6.
30. Van Ede, AE., Laan, RF., Blom, HJ., De Abreu, RA., van de Putte, LB., "Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity", *Semin Arthritis Rheum*, 1998;27(5):277-92.
31. Grim, J., Chladek, J., Martinkova, J., "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases", *Clin Pharmacokinet*, 2003;42(2):139-51.
32. Deutschman, E., Ward, JR., Kumar, A., Ray, G., Welch, N., Lemieux, ME., ve ark., "Condensin II protein dysfunction impacts mitochondrial respiration and mitochondrial oxidative stress responses", *J Cell Sci*, 2019;132(22).
33. Bello, AE., Perkins, EL., Jay, R., Efthimiou, P., "Recommendations for optimizing methotrexate treatment for patients with rheumatoid arthritis", *Open Access Rheumatol*, 2017;9:67-79.
34. Visser K, van der Heijde D. Optimal dosage and route of administration of methotrexate in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(7):1094-9.
35. Kocaman, N., Çolakoğlu, N., "Tekrarlayan Dozlarda Metotreksat Uygulamasının Sıçan Böbrek Dokusu Üzerine Etkileri", *Fırat Tıp Dergisi*, 2013;18(4):198-202.
36. Berber, M., "Primula Vulgaris L.'Nin Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Antioksidan ve Antiapoptotik Etkisi", *Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon, 2017.
37. Birden, B., "Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulmuş karaciğer ve böbrek hasarlanmasına l-name ve aminoguanidin'in etkilerinin incelenmesi", *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, 2010.

38. Uzar, De., "Metotreksat uygulanan ratların siyatik sinir ve medulla spinalisinde oksidan/antioksidanların durumu: kafeik asit fenetil ester'in antioksidan koruyucu etkisi", Yüksek Lisans Tezi, **Süleyman Demirel Üniversitesi**, Isparta, 2006.
39. Sullivan, GW., Sarembock, IJ., Linden, J., "The role of inflammation in vascular diseases", **Journal of Leukocyte Biology**, 2000;67(5):591-602.
40. Jahovic, N., Cevik, H., Sehirli, AO., Yegen, BC., Sener, G., "Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats", **J Pineal Res**, 2003;34(4):282-7.
41. Bressolle, F., Bologna, C., Kinowski, JM., Sany, J., Combe, B., "Effects of moderate renal insufficiency on pharmacokinetics of methotrexate in rheumatoid arthritis patients", **Ann Rheum Dis**, 1998;57(2):110-3.
42. Kolli, VK., Abraham, P., Isaac, B., Selvakumar, D., "Neutrophil infiltration and oxidative stress may play a critical role in methotrexate-induced renal damage", **Chemotherapy**, 2009;55(2):83-90.
43. Neuman, MG., Cameron, RG., Haber, JA., Katz, GG., Malkiewicz, IM., Shear, NH., "Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatocytotoxicity", **Clin Biochem**, 1999;32(7):519-36.
44. Fiehn, C., "The other opinion: nephrotoxicity of low-dose methotrexate - a problem which does not exist", **Z Rheumatol**, 2011;70(10):825-6.
45. Izzedine, H., Launay-Vacher, V., Karie, S., Caramella, C., de Person, F., Deray, G., "Is low-dose methotrexate nephrotoxic? Case report and review of the literature", **Clin Nephrol**, 2005;64(4):315-9.
46. Asvadi, I., Hajipour, B., Asvadi, A., Asl, NA., Roshangar, L., Khodadadi, A., "Protective effect of pentoxifylline in renal toxicity after methotrexate administration", **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 2011;15(9):1003-9.
47. Seideman, P., Muller-Suur, R., "Renal effects of aspirin and low dose methotrexate in rheumatoid arthritis", **Ann Rheum Dis**, 1993;52(8):613-5.
48. Oktem, F., Yilmaz, HR., Ozguner, F., Olgar, S., Ayata, A., Uzare, E., ve ark, "Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester", **Toxicol Ind Health**, 2006;22(6):241-7.
49. Uz, E., Oktem, F., Yilmaz, HR., Uzar, E., Ozguner, F., "The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester", **Mol Cell Biochem**, 2005;277(1-2):165-70.

50. Öktem, F., Yilmaz, HR., Ozguner, F., Olgar, S., Ayata, A., Uzar, E., ve ark., "Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester", *Toxicology And Industrial Health*, 2006;22(6):241-7.
51. Peluso, I., Miglio, C., Morabito, G., Ioannone, F., Serafini, M., "Flavonoids and immune function in human: a systematic review", *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015;55(3):383-95.
52. Carrero, P., Ortega, H., Martinez-Botas, J., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, MA., "Flavonoid-induced ability of minimally modified low-density lipoproteins to support lymphocyte proliferation", *Biochem Pharmacol*, 1998;55(7):1125-9.
53. Rice-Evans, C., "Flavonoid antioxidants", *Curr Med Chem*, 2001;8(7):797-807.
54. Wu, TW., Zeng, LH., Wu, J., Fung, KP., "Morin: a wood pigment that protects three types of human cells in the cardiovascular system against oxyradical damage", *Biochem Pharmacol*, 1994;47(6):1099-103.
55. Sharma, SH., Kumar, JS., Chellappan, DR., Nagarajan, S., "Molecular chemoprevention by morin - A plant flavonoid that targets nuclear factor kappa B in experimental colon cancer", *Biomed Pharmacother*, 2018;100:367-73.
56. Çağlayan, C., "Morin'in karbonik anhidraz, asetilkolinesteraz ve β -glikozidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri", *Journal of the Institute of Science and Technology*, 9(3):1443-51.
57. Masek, A., Chrzescijanska, E., Zaborski, M., "Morin hydrate as pro-ecological antioxidant and pigment for polyolefin polymers", *Comptes Rendus Chimie*, 2013;16(11):990-6.
58. Wei, Z., He, X., Kou, J., Wang, J., Chen, L., Yao, M., ve ark., "Renoprotective mechanisms of morin in cisplatin-induced kidney injury", *Int Immunopharmacol*, 2015;28(1):500-6.
59. Zhang, ZT., Cao, XB., Xiong, N., Wang, HC., Huang, JS., Sun, SG., ve ark., "Morin exerts neuroprotective actions in Parkinson disease models in vitro and in vivo", *Acta Pharmacol Sin.*, 2010;31(8):900-6.
60. Yu, Z., Fong, WP., Cheng, CH., "The Dual Actions of Morin as a Hypouricemic Agent: Uricosuric Effect and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005.
61. Wang, J., Guo, C., Wei, Z., He, X., Kou, J., Zhou, E., ve ark., "Morin suppresses inflammatory cytokine expression by downregulation of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated primary bovine mammary epithelial cells", *Journal of dairy science*, 2016;99(4):3016-22.

62. Kim, JW., Lee, JH., Hwang, BY., Mun, SH., Ko, NY., Kim, B., ve ark., "Morin inhibits Fyn kinase in mast cells and IgE-mediated type I hypersensitivity response in vivo", *Biochemical pharmacology*, 2009;77(9):1506-12.
63. Ponrasu, T., Veerasubramanian, PK., Kannan, R., Gopika, S., Suguna, L., Muthuvijayan, V., "Morin incorporated polysaccharide–protein (psyllium–keratin) hydrogel scaffolds accelerate diabetic wound healing in Wistar rats", *RSC advances*, 2018;8(5):2305-14.
64. Kapoor, R., Kakkar, P., "Protective role of morin, a flavonoid, against high glucose induced oxidative stress mediated apoptosis in primary rat hepatocytes", *PLoS One*, 2012;7(8):e41663.
65. Sinha, K., Sadhukhan, P., Saha, S., Pal, PB., Sil, PC., "Morin protects gastric mucosa from nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin induced inflammatory damage and apoptosis by modulating NF-kappaB pathway", *Biochim Biophys Acta*, 2015;1850(4):769-83.
66. Noor, H., Cao, P., Raleigh, DP., "Morin hydrate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide and disaggregates amyloid fibers", *Protein Sci*, 2012;21(3):373-82.
67. K, VA., Madhana, RM., Kasala, ER., Samudrala, PK., Lahkar, M., Gogoi, R., "Morin Hydrate Mitigates Cisplatin-Induced Renal and Hepatic Injury by Impeding Oxidative/Nitrosative Stress and Inflammation in Mice", *J Biochem Mol Toxicol*, 2016;30(12):571-9.
68. Altınler, A., Atalay, H., Bilal, T., "Serbest radikaller ve stres ile ilişkisi", *Balikesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2018;7(1):51-5.
69. Yerer, M., Aydoğan, S., "Oksidatif stres ve antioksidanlar", *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2000;9(1):49-53.
70. Murphy, MP., Holmgren, A., Larsson, N-G., Halliwell, B., Chang, CJ., Kalyanaraman, B., ve ark., "Unraveling the biological roles of reactive oxygen species", *Cell metabolism*, 2011;13(4):361-6.
71. Pham-Huy, LA., He, H., Pham-Huy, C., "Free radicals, antioxidants in disease and health", *International journal of biomedical science: IJBS*, 2008;4(2):89.
72. Reuter, S., Gupta, SC., Chaturvedi, MM., Aggarwal, BB., "Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?", *Free radical biology and medicine*, 2010;49(11):1603-16.
73. Ebrahimian, T., Touyz, RM., "Thioredoxin in vascular biology: role in hypertension", *Antioxid Redox Signal*, 2008;10(6):1127-36.

74. Wassmann, S., Wassmann, K., Nickenig, G., "Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells", *Hypertension*, 2004;44(4):381-6.
75. Wilkes, JG., Alexander, MS., Cullen, JJ., "Superoxide Dismutases in Pancreatic Cancer", *Antioxidants (Basel)*, 2017;6(3).
76. Bianchi, C., Kostygov, AY., Kraeva, N., Zahonova, K., Horakova, E., Sobotka, R., ve ark., "An enigmatic catalase of Blastocrithidia", *Mol Biochem Parasitol*, 2019;232:111199.
77. Abudu, N., Miller, JJ., Attaelmannan, M., Levinson, SS., "Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E", *Clin Chim Acta*, 2004;339(1-2):11-25.
78. Kuzu, M., Yildirim, S., Kandemir, FM., Kucukler, S., Caglayan, C., Turk, E., ve ark., "Protective effect of morin on doxorubicin-induced hepatorenal toxicity in rats", *Chem Biol Interact*, 2019;308:89-100.
79. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Anal Biochem*, 1979;95(2):351-8.
80. Beutler, E., Kelly, BM., "The effect of sodium nitrite on red cell GSH", *Experientia*, 1963;19:96-7.
81. Erel, O., "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status", *Clin Biochem*, 2005;38(12):1103-11.
82. Erel, O., "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation", *Clin Biochem*, 2004;37(4):277-85.
83. Yumru, M., Savas, HA., Kalenderoglu, A., Bulut, M., Celik, H., Erel, O., "Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: a comparative study", *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009;33(6):1070-4.
84. Kosecik, M., Erel, O., Sevinc, E., Selek, S., "Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking", *Int J Cardiol*, 2005;100(1):61-4.
85. Harma, M., Harma, M., Erel, O., "Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole", *Swiss Med Wkly*, 2003;133(41-42):563-6.
86. Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J Biol Chem*, 1951;193(1):265-75.
87. Luna, LG., "Manual of histologic staining methods of the Armed Forces" *Institute of Pathology*, 1968.

88. Kav, S., Hanođlu, Z., Algier, L., "Türkiyede kanserli hastalarda tamamlayıcı ve alternatif tedavi yöntemlerinin kullanımı: literatür taraması", *International Journal of Hematology & Oncology/UHOD: Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 2008;18(1).
89. Baykara, O., "Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar", *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2016;5(3):154-65.
90. Temel, Mk., "Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi", *Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi*, 2015;30(1).
91. Aksoy, C., Yücecan, S., Çiftçi, N., Tayfur, M., Akgün, B., Taşçı, N., "Kanser hastalığında tedavi amacıyla kullanılan yöresel bitkiler", *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 1988;17(1):111-20.
92. Öztürk, Ye., Dömbekci, Ha., Ünal, Sn., "Geleneksel tamamlayıcı ve alternatif tıp kullanımı", *Bütünleyici ve Anadolu Tıbbı Dergisi*, 2020;1(3):23-35.
93. Rollino, C., Beltrame, G., Ferro, M., Quattrocchio, G., Tonda, L., Quarello, F., "Cancer treatment-induced nephrotoxicity: BCR-Abl and VEGF inhibitors", *G Ital Nefrol*, 2010;27 Suppl 50:S70-4.
94. Oguz, Y., Eyileten, T., Karaman, M., Ay, SA., Yilmaz, MI., "Methotrexate-induced pancytopenia in two patients with renal dysfunction", *Turkish Nephrology Dialysis And Transplantation Journal*, 2011;20(1):93-5.
95. Howard, SC., McCormick, J., Pui, CH., Buddington, RK., Harvey, RD., "Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate", *Oncologist*, 2016;21(12):1471-82.
96. Lee, JS., Oh, JS., Kim, YG., Lee, CK., Yoo, B., Hong, S., "Methotrexate-related toxicity in patients with rheumatoid arthritis and renal dysfunction", *Rheumatol Int*, 2020;40(5):765-70.
97. Kuzu, M., Yıldırım, S., Kandemir, FM., Küçükler, S., Çağlayan, C., Türk, E., ve ark., "Protective effect of morin on doxorubicin-induced hepatorenal toxicity in rats", *Chemico-Biological Interactions*, 2019;308:89-100.
98. Hong, SS., Jin, MJ., Han, HK., "Enhanced systemic availability of methotrexate in the presence of morin in rats", *Biopharm Drug Dispos*, 2008;29(4):189-93.

EK AÇIKLAMALAR A.

ETİK KURUL İZİNİ

T.C
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 28
Konu: Kararlar

21.4/2020

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Toksikite de Morinin Koruyucu Etkisi
	ARAŞTIRMANIN İNGİLİZCE ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Protective Effect of Morin Methotrexate-Induced Toxicity in Rats.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Prof.Dr.Tahir KAHRAMAN
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Y.Lisans Öğrencisi Şeyda SEÇKİN, Prof.Dr.Hikmet KELEŞ, Prof.Dr.İdris TÜREL
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2020/12	Tarih (Date): 08.04.2020
	Prof.Dr.Tahir KAHRAMAN'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın 32 adet sıçan ile gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık alanı	Kurumu
Prof.Dr.Tufan MERT (Başkan)	Biyofizik AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi
Prof. Dr. Yeşim YENER (Üye)	Temel Eğitim Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Eğitim Fakültesi
Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cerrahi AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi
Doç.Dr.Uğur ÜYETÜRK (Üye)	Üroloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi
Doç.Dr.Mustafa DİLEK (Üye)	Çocuk Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi
Dr.Öğr.Üyesi Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ORALLAR (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ÇETİNKAYA (Üye)	Fizyoloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi
Dr.Öğr.Üyesi Canan AKÜNAL TÜREL (Üye)	Nöroloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi
Dr.Öğr.Üyesi ÖZGÜR Mehmet YİS (Üye)	Biyokimya AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi
Dr.Öğr.Üyesi Şevki GÜLER	Periodontoloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Diş Hekimliği Fakültesi
Veteriner Hekim Enes EĞİLMEZ (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	BAİBÜ Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
Veteriner Hekim Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLU BEYPİLİÇ AŞ.
Av.Cihan YAVUZ (TC Üyesi)	Avukat	Aşağı Soku Mah. Şair Şinasi Sok. Ayşe Hanım Apt.24/6 BOLU



T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 53
Konu:

15/19/2021

Sayın Prof.Dr.Tahir KAHRAMAN
Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Kurulumuzdan 08.04.2021 tarihinde etik onay alan 2020/12 nolu "Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Toksikite de Morinin Koruyucu Etkisi" Başlıklı tez çalışmasında böbrek dokusuna etkisi ve biyokimyasal analizler böbrek dokusunda gerçekleştirildiği için tez savunmasında tez jüri üyelerinin önerisi ile tezin adının "Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Böbrek Toksikitesi Üzerine Morinin Koruyucu Etkisi" olarak değiştirilmesi, çalışmanın bitiş süresinin 31 Aralık 2021 tarihine kadar uzatılması ve çalışmada yardımcı araştırmacı olan Yüksek Lisan Öğrencisi Şeyda'nın soy isminin SEÇGİN olarak değiştirilme talebinizin etik olarak uygun olduğuna, mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir

Prof. Dr. İdris TÜREL
Hayvan Araştırmaları
Yerel Etik Kurul Başkanı

Üyeler	Uzmanlık Alanı	Kurumu	İmza
Prof.Dr. İdris TÜREL (Başkan)	Farmakoloji AD. Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	ÇALIŞMAYA DAHİL
Prof.Dr. Seyit Ali KAYIŞ (Başkan Yardımcısı)	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Yeşim YENER (Üye)	Temel Eğitim Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Eğitim Fakültesi	
Prof. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cerrahi AD. Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Uğur ÜYETÜRK (Üye)	Üroloji AD. Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Mustafa DİLEK (Üye)	Çocuk Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Ayhan ÇETİNKAYA (Üye)	Fizyoloji AD. Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. ÖZGÜR Mehmet YİS (Üye)	Biyokimya AD. Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Hayriye SOYTÜRK (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Canan AKÜNAL TÜREL (Üye)	Nöroloji AD. Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Vetr. Hek. Enes EĞİLMEZ (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	BAİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi	
Vet. Hek. Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLU BEYPİLİÇ AŞ.	
Av. Cihan YAVUZ (TC Üyesi)	Avukat	Aşağı Soku Mah. Şair Şinasi Sok. Ayşe Hanım Apt. 24/6 BOLU	

ÖZGEÇMİŞ

Şeyda SEÇGİN ilk, orta ve lise öğrenimini Manisa şehrinde tamamladı; Alaşehir Atatürk Anadolu Lisesi'den mezun oldu. 2013'te Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Mezun olduktan sonra İzmir Medical Park Hastanesi'nde (2017) hemşirelik görevine başladı. Daha sonra Karabük Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'de (2018) göreve başladı ve halen görevine devam etmektedir.