



**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI  
BÖBREK TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ELLAGİK  
ASİDİN KORUYUCU ETKİSİ**

**Sarab Hayder Weli WELİ**

**2022  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TIBBİ BİYOKİMYA**

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

**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI BÖBREK TOKSİSİTESİ  
ÜZERİNE ELLAGİK ASİDİN KORUYUCU ETKİSİ**

**Sarab Hayder Weli WELİ**

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

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

**KARABÜK  
Ocak 2022**

Sarab Hayder Weli WELİ tarafından hazırlanan “SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI BÖBREK TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ELLAGİK ASİDİN KORUYUCU ETKİSİ” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN

.....

Tez Danışmanı, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 27/1/2022

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN (KBÜ)

.....

Üye : Doç. Dr. Müslüm KUZU (KBÜ)

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ (VYYÜ)

.....

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.”*

Sarab Hayder Weli WELİ

## ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

### **SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI BÖBREK TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ELLAGİK ASİDİN KORUYUCU ETKİSİ**

**Sarab Hayder Weli WELİ**

**Karabük Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı:**

**Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN**

**Ocak 2022, 82 sayfa**

Bu çalışmada metotreksat (MTX)'ın böbrek dokusu üzerindeki olumsuz etkilerinin araştırılması amaçlandı. Ayrıca ellagik asidin (EA) böbrek dokusunda MTX'in neden olduğu olası biyolojik değişikliklere karşı koruyucu etkileri de değerlendirildi. Bu çalışmada 250-300g ağırlığındaki 32 adet wistar albino erkek sıçan 4 gruba ayrıldı: Kontrol, EA (75 mg/kg intragastrik), MTX (20 mg/kg intraperitoneal), MTX+EA (MTX, 20 mg/kg intraperitoneal; EA, 75 mg/kg intragastrik). Her grupta rastgele seçilen 8 adet sıçan yer aldı. 10 gün boyunca normal koşullarda standart yem ile beslendi. Deneme süresinin sonrasında, sıçanlara anestezi altında kardiyak perfüzyon uygulandı, kan ve böbrek dokuları biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için alındı. MTX grubunda; kontrol grubuna göre serum üre, ürik asit, kreatinin ve toplam protein düzeyleri ile böbrek dokusu MDA, TOS ve OSİ anlamlı derecede arttığı ( $p<0.05$ ), böbrek dokusu GSH ve TAS düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı ( $p<0.05$ ) saptandı. MTX+EA grubunda ellagik asit verilmesiyle; MTX grubuna göre

serum üre, ürik asit, kreatinin ve toplam protein düzeylerinde anlamlı derecede azalmalar ( $p<0.05$ ), böbrek dokusu MDA, TOS ve OSİ düzeylerinde anlamlı derecede azalma ( $p<0.05$ ) ile böbrek dokusu GSH ve TAS düzeylerinde anlamlı derecede artma ( $p<0.05$ ) saptanmıştır. Histopatolojik değerlendirmelerde MTX verilen grupta kontrol grubuna göre; böbrek dokusunda önemli derecede glomeruler, tubuler ve interstisyel hasar saptandı. MTX+EA grubunda ise ellagik asit verilmesi sonrası bu hasarların önemli derecede azaltıldığı tespit edildi. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre kemoterapide MTX kullanımına bağlı böbrek dokusunda oluşacak yan etkileri azaltmak için EA kullanımının faydalı olacağı söylenebilir.

**Anahtar Sözcükler:** Methotreksat, Ellagik asit, Oksidatif Stres, Toksikite, Böbrek dokusu.

**Bilim Kodu** : 1090

## **ABSTRACT**

**M. Sc. Thesis**

### **PROTECTIVE EFFECT OF ELLAGIC ACID IN METHOTREXATE- INDUCED RENAL TOXICITY IN RATS**

**Sarab Hayder Weli WELİ**

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

**Thesis Advisor:**

**Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN**

**Ocak 2022, 82 pages**

This study attempted to investigate the adverse effects of methotrexate (MTX) on renal tissue. Also, the protective effect of ellagic acid (EA) against possible biological changes caused by MTX in renal tissue was investigated. In this study, 32 male Wistar albino rats weighing 250-300 g were divided into 4 groups: Control, EA (75 mg/kg intragastrically), MTX (20 mg/kg intraperitoneally), MTX + EA (MTX, 20 mg/kg; EA, 75 mg/kg). Here, 8 rats in each group were randomly selected and fed standard chow for 10 days under normal conditions. After the experimental period, the rats underwent cardiac perfusion under anesthesia, and blood and kidney tissues were collected for biochemical and histopathological studies. In the MTX group, compared with the control group, serum levels of urea, uric acid, creatinine and total protein, and levels of MDA, TOS and OSI in kidney tissue were significantly increased ( $p < 0.05$ ), and levels of GSH and TAS in kidney tissue were significantly decreased ( $p < 0.05$ ). When ellagic acid was administered in the MTX + EA group,

significant decreases in serum urea, uric acid, creatinine and total protein ( $p < 0.05$ ), significant decrease in MDA, TOS and OSI levels in renal tissues ( $p < 0.05$ ) and significant increase in GSH and TAS levels in renal tissues ( $p < 0.05$ ) were observed compared to the MTX group ( $p < 0.05$ ). Histopathological examinations revealed significant glomerular, tubular and interstitial damage in renal tissue in the group receiving MTX compared to the control group. In the group MTX + EA it was found that these damages were significantly reduced after the administration of ellagic acid. According to the results of the study, it can be said that the use of EA is beneficial in reducing the side effects that may occur in the kidney tissue due to the use of MTX in chemotherapy.

**Key Word** : Methotrexate, Ellagic acid, Oxidative stress, Toxicity, Kidney tissue.

**Science Code** : 1090



## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN'a,

Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi tüm hocalara ve Yüksek lisans eğitimim boyunca bana bilgisini aktarak bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ ile Dr. Öğretim Üyesi Mehmet DEMİR'e,

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

Yüksek lisans tez verilerimin istatistik analizlerinde yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ufuk KARADAVUT ile Dr. Öğr. Üyesi Ahmad YAHYAZADEH'e,

Yüksek lisans tez çalışmalarım esnasında maddi destek sağlayan Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TYL-2020-2337),

Deneysel çalışmaların gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanı Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına,

Hayatımın her alanında desteğini benden esirgemeyen sevgili annem, babam, abim, kız kardeşim, dayım ve arkadaşlarıma bütün kalbimle teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 .....	4
GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. KANSER VE ANTİNEOPLASTİK İLAÇLAR .....	4
2.2. METOTREKSAT (MTX) .....	4
2.2.1. Metotreksatın Kimyasal Yapısı ve Metabolizması.....	5
2.2.2. Metotreksatın Farmakokinetik Özellikleri.....	8
2.2.4. Metotreksatın Yan Etkileri .....	11
2.2.4. Patofizyoloji.....	11
2.2.5. Böbrek Dokusu Toksisitesi.....	14
2.2.6. Metotreksat Toksisitesi ve Oksidatif Stres .....	17
2.3. OKSİDATİF STRES .....	19
2.4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ .....	20
2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar .....	21
2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar .....	23
2.4.3. Antioksidan Olarak Fitokimyasallar.....	23
2.5. ELLAGİK ASİT.....	26
2.5.1. Ellagik Asidin Antioksidan Aktivitesi.....	27

	<b><u>Sayfa</u></b>
2.5.2. Oksidatif Streste Ellagik Asit .....	29
2.5.3. In Vitro Oksidatif Streste Ellagik Asit .....	30
2.5.4. İn Vivo Oksidatif Streste Ellagik Asit .....	32
2.5.5. İnsanlarda Ellagik Asit ve Oksidatif Stres.....	32
<b>BÖLÜM 3 .....</b>	<b>34</b>
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>34</b>
3.1. GEREÇLER .....	34
3.1.1. Deney Hayvanları .....	34
3.1.2. Kullanılan Kimyasalar .....	34
3.1.3. Kullanılan Cihazlar .....	35
3.2. YÖNTEMLER .....	35
3.2.1. Deney Prosedürü .....	35
3.2.2. Numune Alınması.....	36
3.2.3. Doku Homojenizasyonu .....	36
3.2.4. Doku Malondialdehit (MDA) Analizi .....	36
3.2.5. Doku Glutatyon (GSH) Analizi .....	38
3.2.6. Doku Toplam Oksidan Seviye (TOS) Analizi.....	39
3.2.7. Doku Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Analizi.....	39
3.2.8. Doku Oksidatif Stres İndeksi (OSİ).....	40
3.2.9. Dokuda Toplam Protein Analizi .....	40
3.2.10. Serum Analizleri .....	40
3.2.11. Histopatolojik Analizler .....	40
3.2.12. İstatistik Analizler.....	42
<b>BÖLÜM 4 .....</b>	<b>43</b>
<b>BULGULAR .....</b>	<b>43</b>
4.1. BÖBREK DOKUSU BİYOKİMYASAL BULGULARI .....	43
4.1.1. Böbrek Dokusu MDA ve GSH Değerleri.....	43
4.1.2. Böbrek Dokusu TAS, TOS ve OSİ Değerleri.....	45
4.2. SERUMDA BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI.....	46
4.2.1. Serum Üre, Ürik Asit, Kreatinin ve Toplam Protein .....	46
4.3. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR .....	49

	<b><u>Sayfa</u></b>
BÖLÜM 5 .....	51
TARTIŞMA .....	51
BÖLÜM 6 .....	57
SONUÇ VE ÖNERİLER .....	57
KAYNAKLAR .....	58
EK AÇIKLAMALAR A. ETİK KURUL İZİNİ .....	79
ÖZGEÇMİŞ .....	82

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Metotreksatın kimyasal yapısı .....	6
Şekil 2.2. Folik asitin kimyasal yapısı .....	6
Şekil 2.3. Dihidrofolatın molekül yapısı .....	6
Şekil 2.4. Folik asitin tetrahidrofolata (FH <sub>4</sub> )'e dönüşümü .....	6
Şekil 2.5. MTX-PGs'nin timidilat sentaz, Dihidrofolat redüktaz ve AICAR transformilazı inhibe ettiği metabolic yollar .....	7
Şekil 2.6. Oral uygulamadan sonra MTX'in farmakokinetik süreci; emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı .....	9
Şekil 2.7. Metotreksat (MTX) taşıyıcıları, metabolik yollar ve hücre içi enzim hedefleri.....	10
Şekil 2.8. Folat AICRT'nin metabolik yolları .....	12
Şekil 2.9. Metotreksat ve folinik asidin hücre içi etki bölgeleri.....	13
Şekil 2.10. İlaça bağlı nefrotoksisite riskini artıran böbrek faktörleri.....	15
Şekil 2.11. Başlıca ROS' lar ve detoksifikasyon yolları .....	19
Şekil 2.12. Oksidatif stress kaynaklı hücre sel hasar.....	20
Şekil 2.13. Enzimatik antioksidanların genel etki mekanizması.....	22
Şekil 2.14. Ellagik asitin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.15. EA'nın farklı organ bölgelerindeki oksidatif stresteki rolü. ....	30
Şekil 4.1. Gruplar arasında MDA (nmol/mg protein) değerleri. ....	44
Şekil 4.2. Gruplar arasında GSH (µmol/mg protein) değerleri. ....	44
Şekil 4.3. Gruplar arasında TAS (mmol Trolox eqv/L) değerleri. ....	45
Şekil 4.4. Gruplar arasında TOS (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> eqv/L) değerleri.....	46
Şekil 4.5. Gruplar arasında OSI (AU) değerleri. ....	46
Şekil 4.6. Gruplar arasında serum üre (mg/dL) değerleri.....	47
Şekil 4.7. Gruplar arasında serum ürik asit (mg/dL) değerleri.....	48
Şekil 4.8. Gruplar arasında serum kreatinin (mg/dL) değerleri.....	48
Şekil 4.9. Gruplar arasında serum toplam protein (g/dL) değerleri. ....	49
Şekil 4.10. Böbrek dokusu histopatolojisi fotomikrografisi. a) Kontrol, b) EA, c) MTX, d) MTX+EA grubu.....	50

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 2.1. Biyolojik sistemlerdeki başlıca antioksidan enzim ve bileşikler .....	21
Çizelge 3.1. MDA deneyinin yapılışı.....	38
Çizelge 3.2. Hematoksilen & Eozin boyama protokolü.....	42
Çizelge 4.1. Böbrek dokusunda MDA, GSH değerleri.....	43
Çizelge 4.2. Böbrek dokusunda TAS, TOS ve OSİ değerleri.....	45
Çizelge 4.3. Serum üre, ürik asit, kreatinin ve toplam protein değerleri. ....	47
Çizelge 4.4. Histopatolojik hasar skoru tablosu.....	49

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### SİMGELER

$CCl_3OO$	: Triklorometilperoksil
OH	: Hidroksil
$O_2^-$	: Hidrojen peroksit
$H_2O_2$	: Dihidrofolat redüktazın
$Na_2HPO_4$	: Disodyum fosfat
NO	: Nitrik Oksit

### KISALTMALAR

ABCC	: ATP bağlayıcı kaset
ADA	: Adenozindeaminaz
AICAR	: 5-amino-imidazol-4-karboksamid ribonükleotid transformilaz
CAT	: Katalaz
DAMPA	: Deoksiaminopteroik Asit
DHFR	: Dihidrofolat redüktazın
DHF	: Dihidrofolat
DOX	: Doksorubisin
DTNB	: Ditiyobis 2-Nitrobenzoik asit
EA	: Elagik asit
EKG	: Elektrokardiyografi
FLS	: Fibroblast benzeri sinoviyositler
FPGS	: Folilpoliglutamil sentetaz
GARFT	: Glisinamid ribonükleotid transformilaz
GGH	: Gama-glutamil hidrolaz
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GSH	: Redükte Glutatyon

GST	: Glutasyon-S-Transferaz
GNE	: Gentamisin
GSSG	: Oksitlenmiş glutasyon
HD-MTX	: Yüksek doz metotreksat
HOS	: İnsan osteojenik sarkom
JNK	: Jun-N-terminal kinaz
LD-MTX	: Düşük doz metotreksat
MDA	: Malondialdehid
MTX	: Metotreksat
MTX-PG	: Metotreksat-poliglutamat
MPO	: Myeloperoksidaz
NF-kB	: Nükleer faktör-kappa B
NMDA	: N-metil-D-aspartat
Nrf2	: Nükleer eritroid faktör 2
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
RA	: Romatoid Artrit
RBF	: Renal Kan Akımı
RFC-1	: İndirgenmiş Folat Taşıyıcı-1
ROS	: Reaktif Oksijen Ürünleri
SAM	: S-adenosil-L-metionine
SC	: Subkütan enjeksiyon
SLC19A1	: Çözünen madde taşıyıcı ailesi 19, üye 1
SLC46A1	: Çözünen madde taşıyıcı ailesi 46, üye 1
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Tiyobarbitrik Asit
THF	: Tetrahidrofolata
TAS	: Total Antioksidan Seviye
TCDD	: Tetrakloro-dibenzo p-dioksinin
TOS	: Total Oksidan Seviye



## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Kontrolsüz hücre çoğalması, hücre ölümünden kaçış ve hayati dokuların işlevini bozma kabiliyeti ile karakterize edilen kanser, vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilecek geniş bir hastalık grubu için kullanılan genel bir terimdir. Son yıllarda artmış olan kanser hastalığı tedavisinde vazgeçilmez antitümöral ilaçlardan biri olan metotreksat (MTX), antikaserijen, antiinflamatuvar etkileri nedeniyle kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan sentetik bir folik asid analogudur [1]. İlk olarak 1948’li yıllarda çocukluk dönemi akut lösemilerinde geçici remisyon sağlamasının keşfiyle gündeme gelen MTX [2], 80’li yıllardan günümüze kadar romatoid artrit gibi çeşitli romatizmal [3] ve antipsoriatik ajan olarak ta kullanılmaktadır [4]. Ayrıca, erken yaş lösemi-lenfomaları başta olmak üzere osteosarkom, baş ve boyun kanserleri, meme kanseri, akciğer kanseri, üroepitelyal kanserler gibi solid organ tümörlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [5].

Antimetabolit özelliği dışında, son yıllarda yapılan çalışmalar MTX’in, antiinflamatuvar, immunosupresif, antiproliferatif, antipsoriatik etkilerinin olduğunu da ortaya çıkarmıştır [6]. Bu da MTX’i kanser tedavisi dışında, romatizmal ve psöriazis gibi inflamatuvar hastalıklar, sarkoidoz, Wegenergranülomatozisi, dermatomyozit, HIV ile ilişkili bakteriyel, parazitik enfeksiyonlar, ektopik gebelik, ilk trimesterde gebelik terminasyonları ve gestasyonel trofoblastik hastalıklar gibi jinekolojik ve obstetrik vakalarda da kullanımı önerilen bir ajan haline gelmiştir [7-10].

Son zamanlarda karaciğerde metabolize olan ve geniş kullanım alanlarına sahip MTX üzerine yapılan toksisite çalışmalarında MTX’in pnömoni, hepatotoksisite ve nefrotoksisiteye neden olduğu, ayrıca kardiyovasküler, hematolojik ve nörolojik yan etkiler gibi bir dizi advers reaksiyonlara neden olduğu belirlenmiştir [11-13].

Yapılan alışmalar, hepatotoksisite ve nefrotoksisite gibi MTX kaynaklı gelişen birçok yan etkinin reaktif oksijen radikallerinin (ROS) meydana getirdiği oksidatif hasar nedeniyle olduğu ortaya konulmuştur [13-15]. MTX NADPH üretiminde rol alan enzimleri inhibe ederek oksidatif stresi artırdığı bilinmektedir [16]. NADPH hücrenel metabolizmaya, protein modifikasyonuna ve ROS detoksifikasyonuna katılır [17]. Bazı önemli antioksidan enzimlerin etkinliğinin NADPH'nin mevcudiyeti ile yüksek oranda ilişkili olduğu kanıtlanmıştır [18].

Oksidatif stres, reaktif oksijen içeren bileşiklerin normal koşullar altında olduğundan daha yüksek sayıda olduğu bir hücre veya hücre grubunun spesifik bir durumudur [19]. Kronik kardiyovasküler hastalıklar [20, 21] ve özellikle kardiyovasküler yaşlanmada [22] sorumlu bir faktör olan oksidatif stres, karaciğer yapısını ve fonksiyonunu ciddi şekilde etkiler [23] ve ayrıca karaciğer kanserine [24, 25] neden olur. Son yıllarda, oksidatif stresin ortadan kaldırılması ve neden olduğu hasarın azaltılması için özellikle bitkilerden elde edilen farklı fitokimyasalların rolü üzerinde birçok çalışma yapılmıştır [25, 26].

Ellagik asit, farklı kimyasallar veya stresörlerin neden olduğu oksidatif strese karşı kullanılan, kapsamlı olarak çalışılmış fenolik antioksidanlardan biridir [26]. EA doğal bir polifenol antioksidandır ve siklosporin A ve izoniazid-rifampisin tarafından indüklenen hepatotoksisiteye karşı koruyucu bir role sahip olduğu bulunmuştur [27, 28]. EA, polifenol yapısı [29] ve yapısındaki hidroksil gruplarını ve laktonu sayesinde doğrudan ROS'ları inaktive eder [30]. Ayrıca, hücrelerde NADPH oksidaz enzimi gibi bazı önemli faz 2 antioksidan enzimlerinin ekspresyonunu ve aktivitesini artırdığı birçok araştırmacı tarafından kaydedilmiştir [31, 32].

Bu alışmada, MTX tedavisinin oluşturduğu oksidatif stresin neden olduğu böbrek hasarının güçlü bir antioksidant ajan olan ellagik asit kullanılarak azaltılması/önlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaca bağlı olarak çalışmada MTX kaynaklı oksidatif böbrek doku hasarı sonucu ellagik asidin böbrek dokusunda, malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH), toplam antioksidan seviye (TAS), toplam oksidan seviyesi (TOS) değerleri ile serumda üre, ürik asit, kreatinin

ve toplam protein düzeyleri üzerine etkisi analiz edildi. Ayrıca böbrek dokusundaki histopatolojik değişiklikler de ışık mikroskobu ile gözlemlenerek değerlendirildi.

## BÖLÜM 2

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1. KANSER VE ANTİNEOPLASTİK İLAÇLAR

Genetik bir hastalık olarak kanser, dünyada ve ülkemizde vaka sayısı, seyri ve yüksek ölüm oranları nedeniyle sağlığı tehdit eden önemli sorunlardan biridir [33]. Ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde ana ölüm nedeni olan kanser, gelişmekte olan ülkelerde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Raporlar, toplam ölümlerin yaklaşık %13'ünün (7,6 milyon) kanserden kaynaklandığını ve küresel yükün, başta sigara olmak üzere kansere neden olan davranışların artmasının yanı sıra, dünya nüfusunun hem yaşlanmasına hem de büyümesine bağlı olarak büyük ölçüde arttığını göstermektedir [34, 35]. Görülen vakaların çoğunu akciğer, mide, karaciğer, kolon ve meme kanseri oluşturmaktadır [36].

Kansere karşı uygulanan tedavilerin başında gelen kemoterapi, hastalığın sürecini yavaşlatmak, geriletmek ya da durdurmak amacıyla uygulanan antineoplastik ilaç kullanımının genel adıdır. 1940'ların başında malign hücrelerin büyümesini geriletmek ve durdurulması amacıyla meklorektamin ve türevlerini de içeren ortalama 70 çeşit antineoplastik ilaç geliştirilmiştir [37]. Antimetabolit grubunda halen kullanılan tek form olan metotreksat, folik asidin 4-aminoN10-metil analogudur [38].

#### 2.2. METOTREKSAT (MTX)

Eskiden ametopterin olarak da bilinen MTX, temel hücre yapılarının sentezi esnasında değişik basamaklarda orijinal olarak sentezlenen ve hücre proliferasyonunda pürin ve pirimidin sentezi için gerekli bir enzim olan dihidrofolat redüktazı (DHFR) inhibe etmek için yapısal olarak tasarlanmış birkaç folik asit

antagonistinden biridir [39]. Substrat ya da koenzim üzerindeki özgül bağlanma noktalarına bağlanarak enzimin çalışma mekanizmasını inhibe eder [40].

MTX, 1940'lı yıllarda ilk olarak çocukluk çağı lösemisi üzerinde klinik çalışmalarda kullanılmaya başlamıştır. Yella Pragada Subbarow bu yıllarda, karaciğerden folik asit ekstraksiyonu üzerinde durmuş, aynı zamanda diğer bazı araştırmacılar da deney hayvanlarına intravenöz yolla folik asit vermişler ve bu uygulamanın kanser hücrelerinin proliferasyonunu durduğunu belirtmişlerdir. [41].

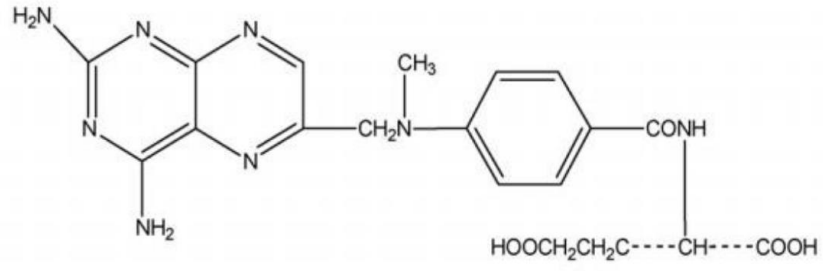
1950'lerde Subbarow ve arkadaşları'nın sentezlediği 4-aminopteroylglutamik asit (aminopterin) ve ametopterin molekülleri lösemide klinik kullanım için onaylanmış [42] ve yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır [43].

MTX'in malign ve malignite dışında birçok hastalıkta tedavi amaçlı kullanımı dolayısıyla Dünya Sağlık Örgütü tarafından yüksek başarı derecesine sahip temel ilaçlar arasına alınmıştır. MTX, yüksek dereceli lenfoblastik lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri gibi kanserlerin tedavisinde antiproliferatif olarak kullanılırken, romatoidartrit'de (RA), meme, testis, baş ve boyun kanseri gibi kanser türlerinde de kullanılmaktadır [44].

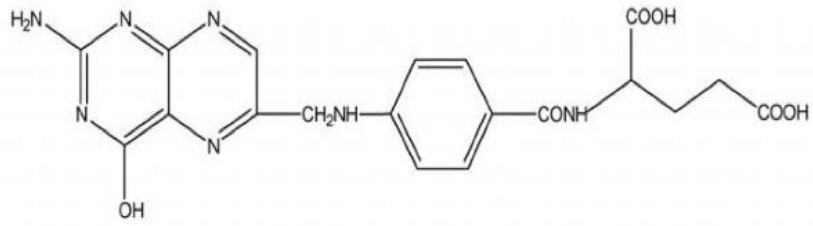
Görece düşük dozlarda otoimmün hastalıkların tedavisinde etkin terapötik bir ajan olan MTX, yüksek dozlarda pek çok malignite tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Klinikte folat antagonisti olarak yaygın şekilde kullanılan MTX, ticari olarak Metotreksat LPF, Metotreksat Sodyum, NSC-740, Amethopterin ve Rheumatrex olarak karşımıza çıkmaktadır [45].

### **2.2.1. Metotreksatın Kimyasal Yapısı ve Metabolizması**

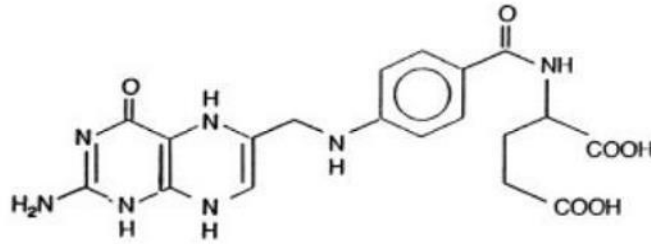
Yapısal olarak folik aside benzediğinden dolayı, MTX antineoplastik ajanlar arasında antimetabolitlerin folik asit metabolitleri grubunda yer almaktadır (Şekil 2.1), (Şekil 2.1), [46,47]. Metotreksat folik asidin 4-amino -N10- metil analogu olup dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin inhibitörüdür (Şekil 2.3), [48].



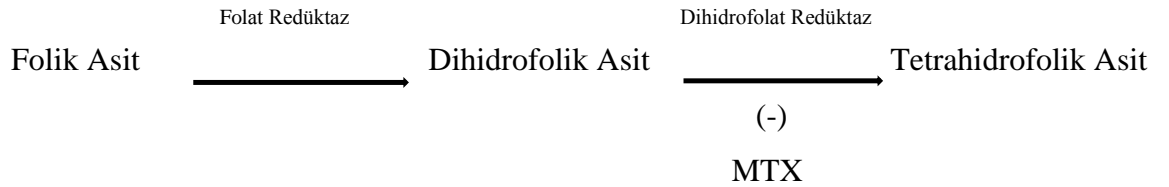
Şekil 2.1. Metotreksatın kimyasal yapısı [46].



Şekil 2.2. Folik asitin kimyasal yapısı [47].



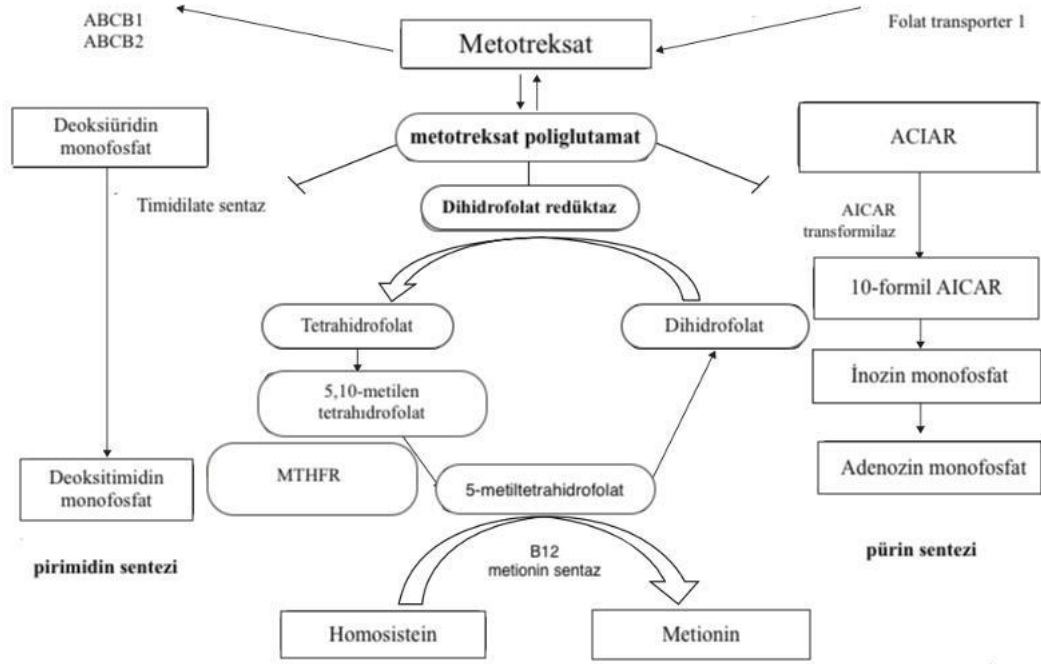
Şekil 2.3. Dihidrofolatın molekül yapısı [48].



Şekil 2.4. Folik asitin tetrahidrofolata (THF)'e dönüşümü [49].

Folinik asit ve diğer tetrahidrofolat türevi koenzimler, vitamin şeklindeki besinlerden alınabilen folik asidin vücuttaki yararlı şeklidir. Timidilatın, purinlerin, metionin ve glisinin sentezinde görev alan bu koenzimler tek-karbon transferi reaksiyonlarında

görev alırlar. Bu, folik asidin dihidrofolat türevi (DHF) üzerinden tetrahidrofolat (THF)' a dönüşümü şeklinde olur (Şekil 2.4). Özellikle hücre döngüsünün “S” evresinde kuvvetli etki gösteren MTX, kıl kökleri, kemik iliği ve spermatojenik hücreler gibi hızla bölünme geçiren hücrelerde ve çoğalma kapasitesi fazla olan bölgelerde de etki göstermektedirler [40, 48].



Şekil 2.5. MTX-PGs'nin timidilat sentaz, Dihidrofolat redüktaz ve AICAR transformilazı inhibe ettiği metabolic yollar [50].

Tetrahidrofolat üretiminde hız sınırlayıcı enzim olan dihidrofolat redüktazın güçlü bir inhibitörü olarak pürin ve pirimidinlerin de novo üretimini azaltır (Şekil 2.5) ve DNA sentezine müdahale eder. Bu nedenle, hedef dokularda T limfositleri gibi iltihaplı hücrelerin yüksek bir dönüşümünün yaygın olduğu iltihaplı hastalıklarda uygulama bulabilmesi şaşırtıcı değildir [51]. MTX'in metiyonin sentetaz üzerindeki inhibisyonu ile metiyonin S-adenosil-L-metionine SAM yolu vasıtasıyla lenfotoksik poliaminlerin oluşumunun engellenmesine sebep olmaktadır [52]. Poliaminler putresin, spermidin ve spermin, çoğalma, farklılaşma, protein sentezi ve bağışıklık aracılı hücresel reaksiyonlar dahil olmak üzere hücre fonksiyonları için gerekmektedir [53].

Ancak MTX'in hücre döngüsünün engellenmesi kemik iliği baskılanması ve stomatit gibi birçok yan etkisinin arkasındaki suçludur. Bununla birlikte, bu yan etkileri azaltmanın bir yolu olarak folik asit veya folinik asidin yaygın kullanımı, anti-enflamatuar etkililikte herhangi bir azalma ile bağlantılı değildir, bu nedenle, tek başına folat antagonizmi ile varsayılan anti-enflamatuar etki mekanizmasına yönelik bir ikilem yaratır [51]. Diğer yandan yüksek dozlardaki folinik asit, taşıyıcı proteini RFC-1 tarafından MTX'in gastrointestinal alımıyla rekabet eder ve böylece antiinflamatuar etkilerine müdahale eder. Bununla birlikte, kırmızı hücre folat konsantrasyonlarındaki varyasyonlarla ilişkili olmasına rağmen folat yolu polimorfizmleri, MTX'de romatoid artritli hastalarda hastalık aktivitesinin habercisi değildir [54].

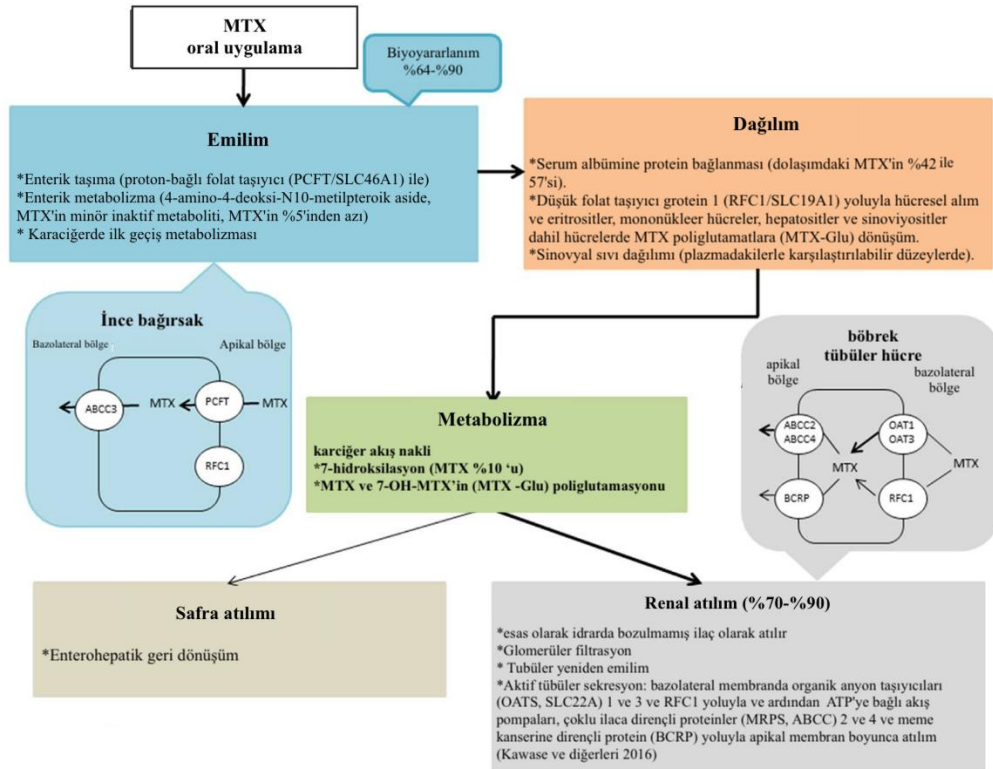
### **2.2.2. Metotreksatın Farmakokinetik Özellikleri**

İnflamatuar otoimmün hastalıkların tedavisinde, MTX genellikle ağızdan haftalık tek doz olarak uygulanmaktadır. Klinik pratikte tedaviye 10 mg/hafta dozunda başlanır, klinik cevaba veya intoleransa bağlı olarak 2-4 haftada bir 5 mg'lık bir artışla maksimum 20-30 mg/hafta doza kadar tedavi başlanmaktadır [55-60]. Düşük dozlarda (<25 mg/kg) oral yolla alınarak tamamına yakını gastrointestinal sistemden absorbe olabilen MTX'in, artan dozlarında gastrointestinal sistemde absorpsiyonu azalmakta ve bu nedenlerden dolayı özellikle subkutan (SC) enjeksiyon şeklinde kullanımı son zamanlarda tercih edilen yöntem olarak kullanılmaktadır. SC MTX'in, oral forma kıyasla daha fazla klinik etkinliğe ve gelişmiş tolere edilebilirliğe sahip olduğu gösterilmiştir. SC MTX uygulaması şu anda yetersiz klinik yanıt veya oral MTX ile intolerans durumlarında önerilmektedir [60, 61]. Juvenil İdiyopatik Artritte (JIA), MTX'in 10 ila 20 mg/m<sup>2</sup> dozunda etkili olduğu kanıtlanmıştır. Oral uygulamadan sonra, MTX proksimal jejunumda indirgenmiş folatları ve MTX'i taşıyan proton-bağlı folat taşıyıcı (PCFT/SLC46A1) tarafından emilir [62] (Şekil 2.6).

Oral ve SC uygulanmasında merkezi sinir sistemi hariç doku dağılımı iyidir. Merkezi sinir sistemine, sistemik dolaşımdaki dozun %3' ü kadar geçer. Plevral ve peritoneal kavite gibi vücut boşluklarına dağılımı yavaş olmaktadır. Bundan dolayı, plevral



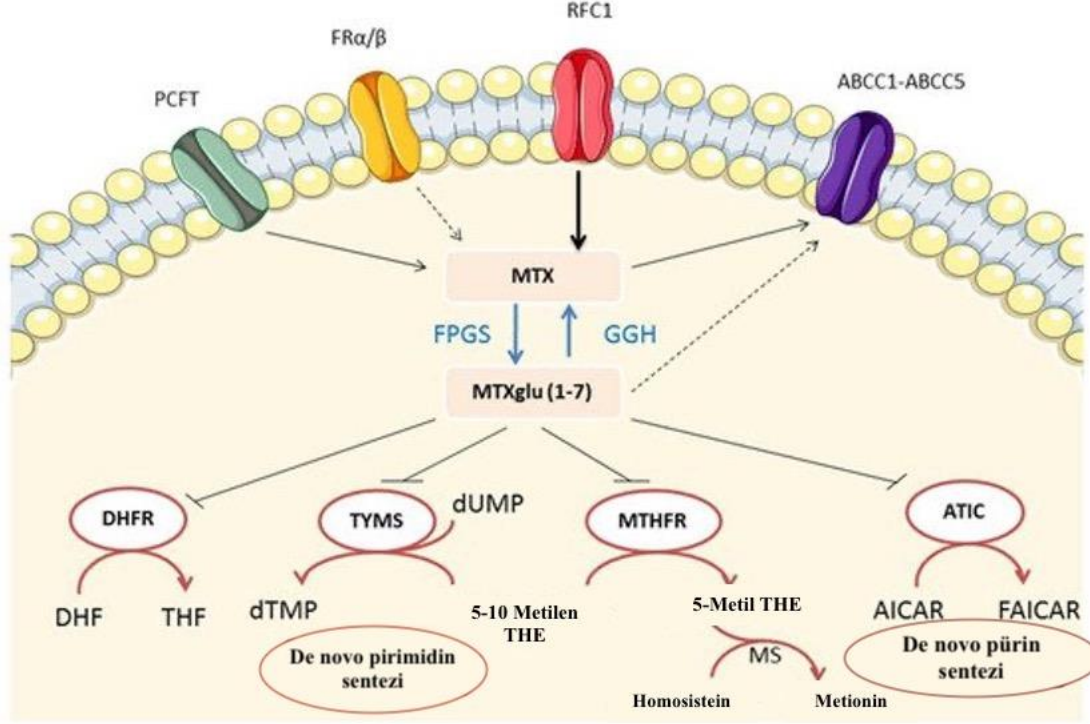
efüzyon ya da asit gibi nedenlerle meydana gelecek genişlemeler, ilacın yavaş salınımına ve plazma konsantrasyonundaki artışa neden olur ve toksisite bulguları gelişebilir. Plazma proteinlerine zayıf bir şekilde (yaklaşık %50) bağlanır. Sülfonamidler ve salisilatlar ile birlikte verilirse bağlanma oranı azalır ve buna bağlı olarak MTX toksisitesi ortaya çıkabilir [40]. İnsanda genellikle minimal düzeyde metabolize olan MTX, karaciğerde bir enzimatik sistem aracılığıyla majör metaboliti olan 7- hidroksimetotreksata dönüşür [44].



Şekil 2.6. Oral uygulamadan sonra MTX'in farmakokinetik süreci; emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı [44].

MTX ve metabolitleri %90'a kadar olan büyük bir kısmı 48 saat içerisinde (çoğu ilk 8-12 saat içerisinde) primer olarak böbrekler yoluyla glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyonun kombinasyonu ile atılır. Az bir miktarı da dışkı ve safra ile atılır. Bu nedenlerden dolayı, renal kan akımını azaltan, nefrotoksik ya da zayıf organik asit yapısındaki ilaçlarla kullanımı, renal atılımı azaltarak daha ciddi myelosupresyona neden olabilir [63]. Eliminasyonun son aşamasında, olası böbrek hasarı nedeniyle oluşabilecek gecikmeler ilacın kemik iliği, gastrointestinal epitel ve cilt üzerindeki toksik etkilerinin artmasına neden olur [54].

MTX'in hücre alımına,  $\alpha$  ve  $\beta$  folat reseptörlerinin sınırlı katkısıyla indirgenmiş folat taşıyıcı protein 1 (RFC1/SLC19A1) aracılık eder [59, 62] (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Metotreksat (MTX) taşıyıcıları, metabolik yollar ve hücre içi enzim hedefleri [44].

MTX'in hücre alımı, çok sayıda ilaç ve kemoterapötik ajan için taşıyıcı olarak önemli bir rol oynayan ATP bağlayıcı kaset proteinleri (ABCC) tarafından yönetilir [62, 63]. Hücre içinde, intraselüler MTX'in bir kısmı, folilpoliglutamat sentetazın (FPGS) katalitik etkisi ile yedi kadar glutamat kalıntısı MTX'e eklenerek MTX poliglutamatlara dönüştürülür [64]. Üç glutamat kalıntısından daha uzun zincirlere sahip MTX türevleri, ABCC exporter proteinleri için substrat oluşturmadığından hücre alımını artırır. Poliglutamasyon, gama-glutamil hidrolaz (GGH) tarafından katalize edilen ve sabit bir hücre içi MTX seviyesi üreten bir deglutamasyon süreci ile tersine çevrilir [65, 66]. MTX-poliglutamatlar, oral uygulamadan sonra kırmızı kan hücrelerinde, nötrofillerde, mononükleer hücrelerde, hepatositlerde ve sinoviyositlerde bulunur [67]. MTX poliglutamatların hücre içi birikimi, ilacın sürekli etkinliği ile sonuçlanır ve nispeten kısa plazma eliminasyon yarı ömrüne rağmen haftada bir kez MTX uygulamasına izin verir [68]. MTX-poliglutamat düzeylerinin romatoid artritli hastalarda klinik yanıtla korele

olduğundan, MTX poliglutamalarının ilacın aktif formu olduğuna inanılmaktadır [69].

### **2.2.3. Metotreksatın Yan Etkileri**

Yaşamı tehdit edebilecek boyutlara ulaşabilen MTX'in yan etkileri, bu ilacın gastrointestinal emiliminin bireyler arası değişkenliği nedeniyle değişkendir. Yan etkiler ve şiddeti uygulama dozuna ve sıklığına bağlıdır. En sık rastlanan yan etkiler hafif ve geri dönüşümlüdür ve genellikle iki hafta içinde sonumlanmaktadır [70].

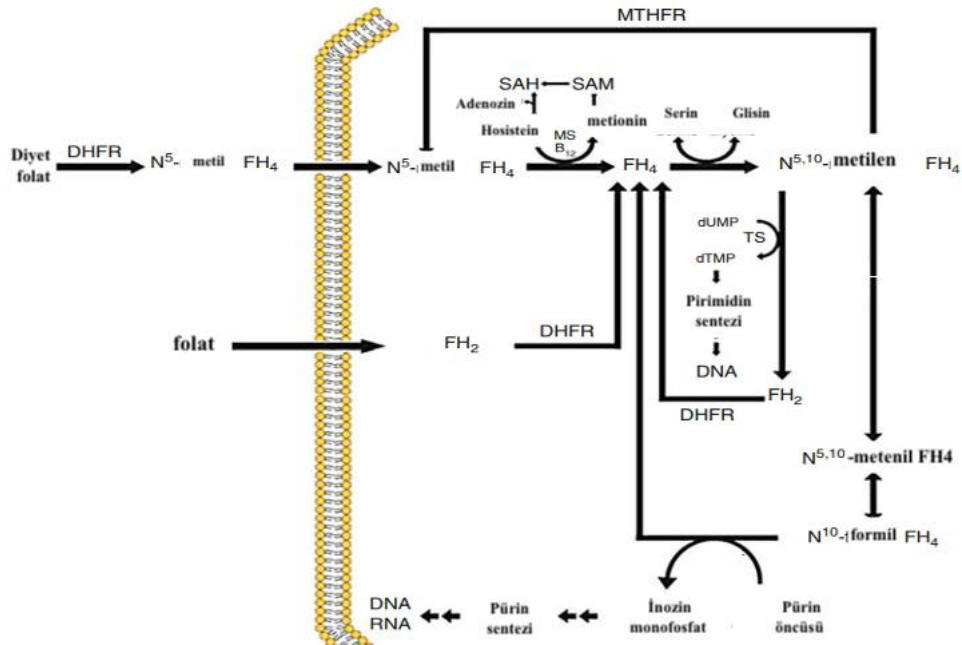
MTX'in neden olduğu bazı yan etkiler ilacın pürin, pirimidin, folat ve poliamin gibi metabolik yolların bozuklukları ile doğrudan ilişkilendirilmektedir. MTX esas olarak psoriatik lezyonlarda olduğu gibi, folat metabolizmasını antagonize ederek antineoplastik özellik göstermekte iken, neoplastik hücreler yanında hızlı bölünen diğer hücrelerde de nükleik asitlerin yapımını engellemektedir [71]. Oral ülserler ve dispepsi tipik olarak en sık görülen erken semptomlardır ve tedavinin başlamasından sonraki haftalar içinde ortaya çıkabilir. Erken dermatolojik raporlar esas olarak olası kemik iliği hasarı ile ilgili gibi görünseler de sonraki çalışmalar bunun karaciğer fonksiyonundaki değişiklikleri ile de ilgili olduğunu rapor etmişlerdir [72]. MTX'in kullanım dozu ve süresine bağlı olarak renal toksisite, nörotoksisite, hematolojik toksisite, kutanomuköz toksisite ve pulmoner toksisite ortaya çıkabilmektedir [73].

### **2.2.4. Patofizyoloji**

Çeşitli otoimmün ve inflamatuvar bozukluklarda yaygın kullanımına rağmen, düşük dozlarda dahi olsa MTX ilaç toksisitesinden muaf değildir. MTX ile ilişkili en yaygın advers reaksiyonlar gastrointestinal belirtiler (bulantı, kusma, stomatit, iştahsızlık) ve hepatotoksisitedir. Genel olarak, MTX tedavisinin kesilmesinin ana nedeni, etkinlik eksikliği değil, toksisitedir [74]. Dikkatli ve uygun hasta izlemesi (kan hücresi sayımı, karaciğer enzimleri, kreatinin) ile yapılacak olan periyodik izleme MTX'in etkilerinin erken gözlenmesi açısından önemlidir ve oluşacak risklerin önemli ölçüde en aza indirilmesi bakımından kayda değer görülmektedir [75].

Folat eksikliği ile ilişkili olmayan toksisiteler arasında nodüloz, pulmoner fibroz, uyuşukluk, yorgunluk ve böbrek yetmezliği yer alır. MTX'in moleküler etki mekanizmalarının anlaşılması, MTX ile ilişkili toksisitelerin çoğunu açıklamaya yardımcı olabilir [76].

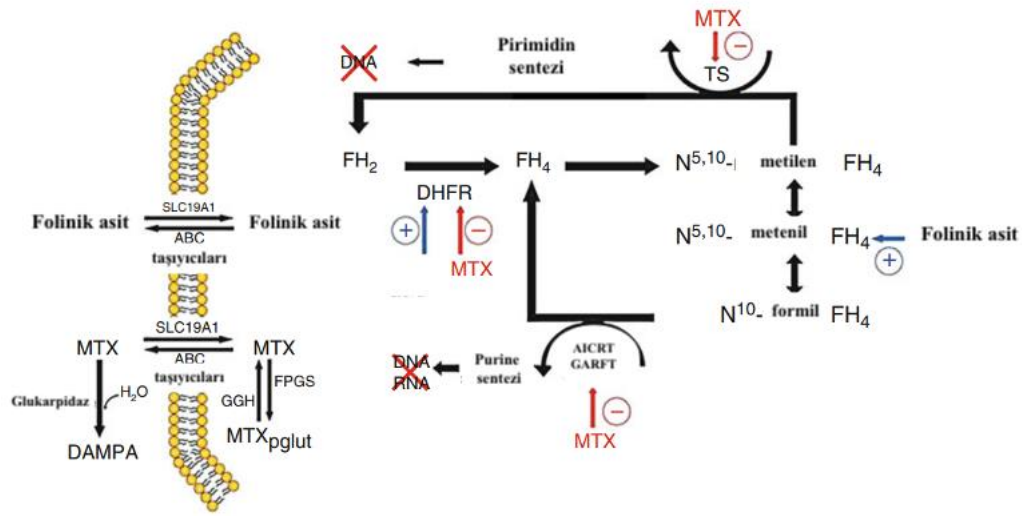
Bir folat antagonisti olan MTX'in etki mekanizmaları ve toksisitesi folik asidin metabolik yollarını incelenerek daha iyi anlaşılabilir (Şekil 2.8). Folat, tetrahidrofolata (THF) dönüştürüldüğü hücelere taşınır. Dihidrofolat redüktaz (DHFR), metiyonin sentaz (MS), timidilat sentaz (TS), aminoimidazol karboksamid ribonükleotid transformilaz (AICRT) ve glisinamid ribonükleotid transformilaz (GARFT) enzimlerini içeren pirimidin ve purin sentezleri için gerekli bir dizi metabolik reaksiyona katılır. Folatlar hücre içinde poliglutamasyona uğrarlar, bu da azalmış akış ve artan alım nedeniyle hücre içi depolarını artırır [77].



Şekil 2.8. Folat AICRT'nin metabolik yolları [77].

Metotreksat ve folinik asidin ana hücre içi etki bölgeleri (Şekil 2.9)'da gösterilmiştir. Metotreksat hücre dışı konsantrasyonları 20  $\mu\text{mol/L}$ 'yi aştığında, hücre zarı boyunca pasif difüzyon gerçekleşir. ATP bağlayıcı kaset (ABCC) taşıyıcıları (esas olarak ABCC1-4, ABCG2) metotreksatı hücrelerden pompalar. Hücre içi metotreksat (folatın yanı sıra), hücrelerde uzun süre tutulan aktif bir forma (metotreksat

poliglutam; MTXpglut) poliglutamasyona uğrar. Poliglutamasyon, hassas enzimler için metotreksatın afinitesini artırır. Poliglumatlanmış kuyruk (>5 glutamik asit kalıntısı) ne kadar uzun olursa, hücrelerden difüzyon daha yavaş olur ve inhibe edilen enzimlere afinitesi daha güçlüdür.  $\gamma$ -glutamil hidrolaz (GGH) ile hidroliz, metotreksatın poliglutamasyonunu tersine çevirir. Bu, metotreksat ve kısa zincirli MTXpglut'un hücrel akışı ile sonuçlanır [77].



Şekil 2.9. Metotreksat ve folinik asidin hücre içi etki bölgeleri [77].

Metotreksat ve MTXpglut tarafından DHFR, timidilat sentaz ve AICRT-GARFT olmak üzere üç enzim inhibe edilir. Metotreksatın DHFR'ye bağlanması, stokiometrik ve rekabetçidir; THF sentezini durdurmak için %95 inhibisyon gereklidir. Bu, sırasıyla pirimidin ve pürin sentezinde yer alan timidilik asit ve inozin monofosfatın THF tükenmesine ve sentezinin azalmasına neden olur. DHFR'nin inhibisyonundan kaynaklanan düşük THF ve N5-metil THF konsantrasyonları ayrıca homosistein ve metabolitlerinin ve uyarıcı amino asitlerin N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin uyarıcı agonistleri birikmesine neden olur. Azalan metiyonin arzı, nihayetinde nöronal miyelin kılıfının sentezinin azalmasına neden olur. Timidilatın inhibisyonu ise pirimidin sentezinin azalmasına neden olmaktadır. AICRT-GARFT enzimlerinin inhibisyonu nedeniyle de pürin sentezi azalır. Dolayısıyla hem doğrudan enzim inhibisyonu ve hem de THF'ün tükenmesi yoluyla DNA, RNA ve protein sentezi MTX ve MTXpglut tarafından bloke edilmektedir [78-81].

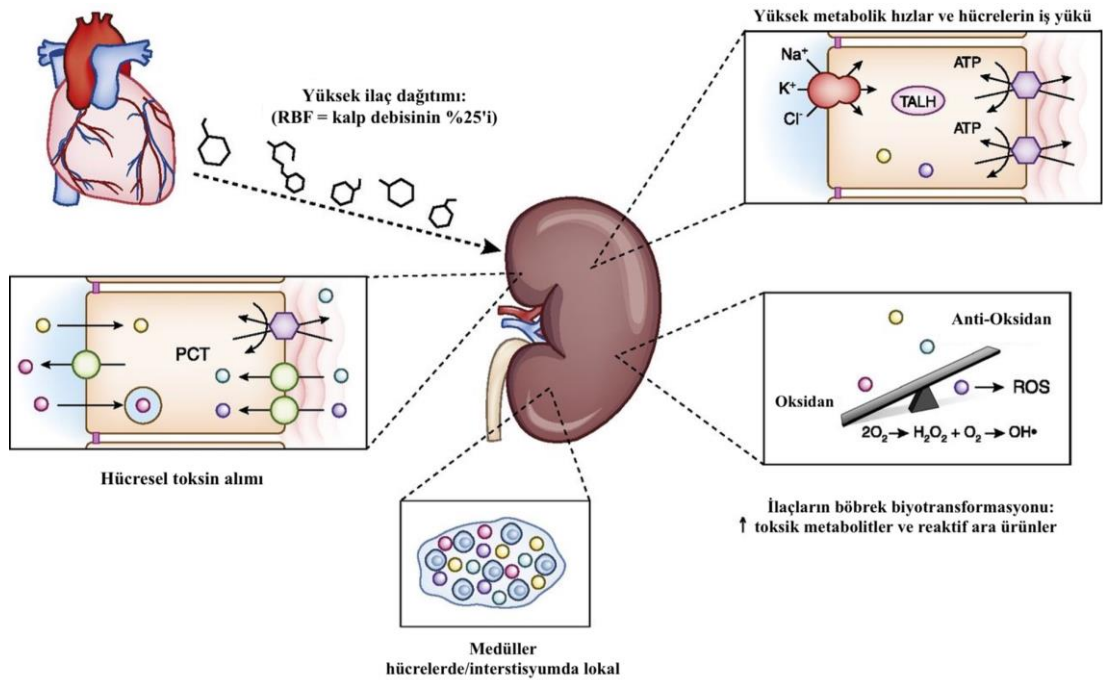
Metotreksat sitotoksitesinin şiddeti ve türü hem konsantrasyona hem de maruz kalma süresine bağlı olarak değişir. Yüksek konsantrasyonlara (dakikalar veya saatler boyunca mmol/L) kısa süreli maruziyet tolere edilebileceği gibi, aynı zamanda akut böbrek, karaciğer ve merkezi sinir sistemi toksisitesine de yol açabilir [77]. Uzun süreli düşük konsantrasyonlar ise (örn. 24-48 saat boyunca 0.05-0.1 µmol/L) kemik iliği ve gastrointestinal etkiler dahil yaşamı tehdit eden toksisiteye neden olabilir [82]. Poliglutamasyon, hücreler 6 saat boyunca 2 µmol/L'lik metotreksat konsantrasyonlarına maruz kaldığında meydana gelir ve bu, HD-MTX ile ilişkili daha yüksek toksisite insidansı ve şiddetini ortaya çıkarır [83]. HD-MTX'i takiben metotreksatın DHFR inhibitör aktivitesinin yaklaşık 1/100-1/200'üne sahip olan 7-hidroksi-metotreksat oluşur [84]. 7-hidroksi-metotreksat da poliglutamataşır ve bu form hücrelerde uzun süre kalarak toksisitenin artmasına neden olur [77]. Ekstra folat, intraselüler olarak DHFR tarafından THF'e indirilmesi, MTX kaynaklı DHFR inhibisyonunda ekstra folatın neden MTX toksisitesi için bir antidot olarak kullanılmayacağını açıklar. Ayrıca, dneysel bir çalışmada folik asidin metotreksatın böbrek geri emilimini azalttığı da gösterilmiştir [85].

### **2.2.5. Böbrek Dokusu Toksikitesi**

Metotreksat (MTX)'in da dahil olduğu birçok çeşitli ilaçlar ve toksinler böbrek tarafından metabolize edilmekte ve salgılanmaktadır. Bu mekanizma da ilaca bağlı nefrotoksisiteye önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Düşük doz MTX'in böbrek hasarı gösterebileceği iyi belgelenmiş [44, 86] olmakla birlikte, MTX kaynaklı böbrek hasarının altında yatan mekanizma bilinmemektedir. Yüksek doz MTX'in, asit idrarda MTX ve onun ana metaboliti olan 7-OH-MTX'in çökmesi yoluyla böbrek hasarına neden olabileceği ve bunun da intratübüler obstrüksiyona ve böbrek fonksiyonunda bozulmaya katkıda bulunabileceği bildirilmiştir [87].

Kalp debisinin (RBF) yaklaşık %25'ine denk gelen yüksek renal kan akımının bir sonucu olarak böbreğe yüksek oranda ilaç ve toksin iletimi, böbreği yüksek dereceli ilaç konsantrasyonlarına maruz bırakmaktadır [87, 88]. TALH tübüler hücrelerinin, özellikle Henle kulpundakiler, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz güdümlü taşıma ile aktif çözünen taşınmasıyla ilişkili yüksek metabolik oranları nedeniyle oluşan nispeten hipoksik

ortam bu hücrelerin aşırı hücrel iş yükü, nefrotoksik ile ilişkili yaralanma riskini artırmaktadır [81]. MTX gibi bazı ilaç ve metabolitler böbrek medtr5ullasında ve interstisyumda yüksek konsantrasyonlarda birikerek doğrudan toksisite yoluyla böbrek hasarına ve ayrıca azalmış prostaglandin ve artan tromboksan üretiminden kaynaklanan iskemik hasara neden olabilmektedir [81, 87]. Ayrıca, MTX ile ilişkili böbrek hasarının, adenozin plazma konsantrasyonunun indüklenmesi ve ardından böbrek parankimindeki A1 reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla aracılık ederek, böbrek kan akışını azaltarak ve dolayısıyla böbrek fonksiyonunu azaltarak olabileceği öne sürülmüştür [89]. MTX uygulamaları sonucu oluşan toksik metabolitleri ve ROS, böbrek metabolizması içerisinde yerel antioksidanları bastırır ve tübüler hasarı teşvik ettiği de düşünülmektedir [88] (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. İlaça bağlı nefrotoksisite riskini artıran böbrek faktörleri [77].

MTX'in %90'ından fazlası böbrekler tarafından atılmaktadır [77, 90]. MTX'in neden olduğu böbrek fonksiyon bozukluğunun etiyolojisine, MTX'in ve onun metabolitlerinin renal tübüllerde çökeltilmesi veya MTX'in renal tübüller üzerindeki doğrudan toksik etkisinin aracılık ettiği düşünülmektedir. MTX, asidik pH'ta az çözünür ve metabolitleri 7-OH-MTX ve DAMPA, sırasıyla MTX'ten altı ila on kat daha az çözünür [91].

Metotreksat, pH'ı 4.8-5.5 olan zayıf bir asittir ve asidik bir ortamda az çözünür. İdrar pH'ı 5.5'te 2 µmol/L üzerinde renal metotreksat konsantrasyonları üretilebilir [77]. İdrar pH'sında 6.0'dan 7.0'a bir artış, MTX ve metabolitleri olan 7-OH-MTX ve DAMPA'nın altı ila on kat daha az çözünmesine neden olur. 7-OH-MTX ayrıca tübüler sekresyonda metotreksat ile rekabet edebilir. Bu nedenle asidik idrarda metotreksat ve metabolitler renal tübüllerde çökerek oligürik olmayan, genellikle geri dönüşümlü böbrek yetmezliğine neden olur. İdrar pH'ını 5'ten 7'ye çıkarmak metotreksat çözünürlüğünü 23 kat, 7-OH-MTX'ı 12 kat ve DAMPA'yı 17 kat artıracaktır. Yeterli hidrasyon ve idrar akışı metotreksata bağlı böbrek yetmezliği riskini ve bunun sonuçlarını azaltabilir [82, 92, 93].

Yüksek dozlardaki MTX'nin neden olduğu akut tübüler nekroza bağlı akut böbrek yetmezliği nadir (%2-4) görülmekle birlikte ciddi ve şüphelidir [82]. Bu toksisite, böbrek tübüllerinde MTX veya metabolitlerinin çökmesi [94] nedeniyle obstrüksiyona ve renal klirensin azalmasına ve dolayısıyla MTX yüksek seviyelerinin uzamasına neden olur. MTX aynı zamanda tübüler epitel üzerinde doğrudan bir toksin görevi görebilir [95] ve afferent arteriyol devazo konstriksiyona neden olabilir [96].

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada uzun süreli düşük doz MTX uygulamasının böbrek dokusunda MTX birikmesine ve oksidatif strese bir artış yoluyla ciddi glomerüler ve tübüler hasara neden olduğunu gösterilmiştir [97].

MTX esas olarak renal atılımla temizlendiğinden, MTX'in neden olduğu böbrek fonksiyon bozukluğu, MTX'in eliminasyonunun gecikmesine yol açmakta ve sonuçta ortaya sürekli yüksek plazma MTX konsantrasyonu çıkmakta ve MTX toksisitelerinde belirgin bir artışa yol açabilmektedir [98].

MTX redoks değiştirici özellikleri, ilacın immünosupresif etkilerinin önemli bir mekanizması olarak öne çıkmaktadır. Düşük doz MTX'in, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi yoluyla transforme T hücrelerinin apoptozunu indüklediği bulunmuştur [99, 100]. MTX ile indüklenen ROS oluşumuna tetrahidrobiopterin tükenmesi aracılık edebilir. MTX, DHFR'nin güçlü bir inhibitörüdür. DHFR,



dihidrobiopterinin nitrik oksit sentazlar (NOS'lar) tarafından NO sentezi için gerekli bir kofaktör olan tetrahidrobiopterine indirgenmesini katalize eder. Tetrahidrobiopterinin tükenmesi NOS'u ayırarak NO sentezinin kaybına ve ROS üretiminde artışa neden olur [101]. Farelerde, hem tetrahidrobiopterin hem de dihidrobiopterin, endotelial NOS'u (eNOS) eşit afinite ile bağlar. Tetrahidrobiopterin NO üretimini teşvik ederken, dihidrobiopterin eNOS ayrışmasını ve süperoksit üretimini teşvik eder [102].

MTX tedavisi yapılan vahşi tip farelerde dihidrobiopterin seviyelerinde bir yükselme ve bir azalma tetrahidrobiopterin: dihidrobiopterin oranı ile sonuçlanmıştır [102]. İn vitro olarak, dönüştürülmüş insan T hücre hattında (jurkat hücreleri) MTX ile indüklenen apoptozun, artan ROS üretimi ve Jun-N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonunun aracılık ettiği bulunmuştur. T hücrelerinin aksine, MTX, görünüşe göre FLS'lerde T hücrelerine kıyasla aşırı düşük NOS enzim seviyeleri nedeniyle, FLS'lerde ROS sentezini ve JNK aktivasyonunu indüklemeye başarısız oldu düşünülmektedir [103]. Ayrıca, yapılan başka bir çalışmada, MTX'in IL6 ile indüklenen ROS oluşumunu ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [104].

### **2.2.6. Metotreksat Toksikitesi ve Oksidatif Stres**

MTX, bir dihidrofolat redüktaz inhibitörüdür ve daha genel olarak konuşursak, birçok NAD(P)H'ye bağlı oksidoredüktazdır ve klinik kullanımı çeşitli toksisitelerle ilişkilidir. DHFR'nin tüm hücrel havuzunun inhibisyonunu indüklemek için yüksek MTX dozları gerekmektedir ve yan etkilerinin artan sıklığı ve şiddeti ile ilişkilidir [14].

MTX, glikoz metabolizmasına dahil olan birçok enzimi inhibe ettiği görülebilir. Bu şekilde inhibe edilen enzimlerin tümü dehidrojenaz enzimleridir ve NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>'nin NADH/NADPH'ye indirgenmesinde rol oynar [105].

Hem G6PD hem de 6PGD enzimleri, oksitlenmiş glutatyonun azaltılmasında, NADPH oksidaz yoluyla serbest radikallerin üretilmesinde, kolesterol üretimi,

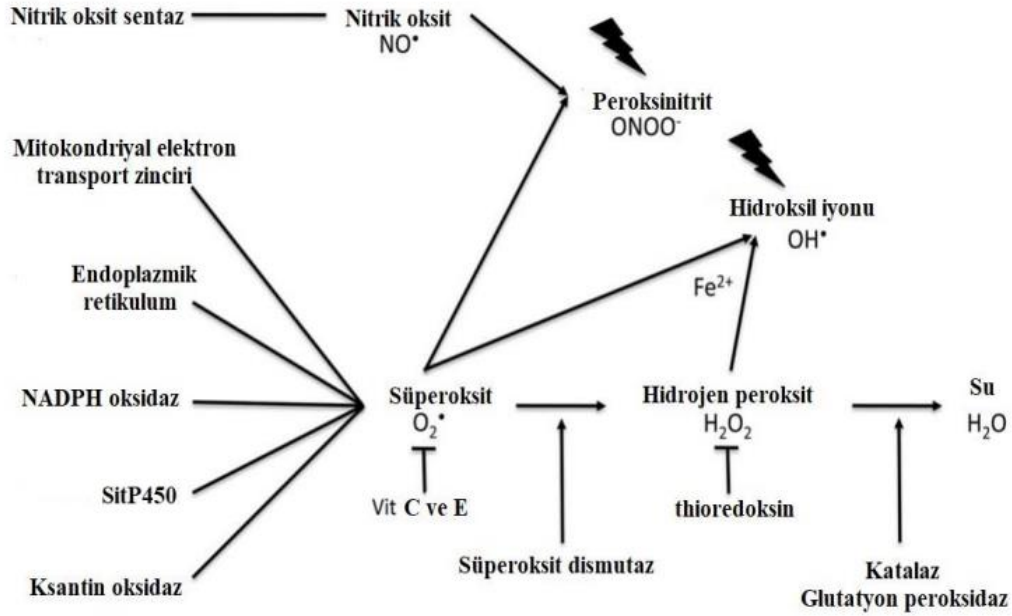
steroidojenezde nihai kullanım için pentoz fosfat yolağında NAD(P)<sup>+</sup>'nın NAD(P)H'ye indirgenmesini katalize eder. Kalan enzimler büyük ölçüde TCA döngüsü reaksiyonlarında yer alır ve bu da mitokondri içinde NAD<sup>+</sup>'nın NADH'ye indirgenmesine neden olur. Çoğalan hücrelerde, pentoz fosfat yolu ve malik enzimin etkileri hücrel NAD(P)<sup>+</sup> rejenerasyonunun en önemli kaynağı olarak kabul edilmektedir [14]. Bu enzimlerin bloke edilmesiyle, hücrel olarak glutasyonu yeniden oluşturma ve oksidatif stresle baş etme yeteneği engellenir. Oksidatif stresle mücadelede hücrelerin glutamine bağımlılığını vurgulayan glutaminaz-2 üretiminin kaybı, NAD(P)H üretiminin azalmasına, glutasyon üretiminin azalmasına ve kanser hücrelerini iyonlaştırıcı radyasyonla indüklenenler gibi oksidatif streslere duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır [106]. MTX dozları arttıkça hem normal hem de anormal hücreler için ölümcül olduğunu kanıtlayan daha büyük bir oksidan tamponlama engeline neden olur [107].

Invivo MTX metabolizması, folilpoliglutamil sentetaz enzimi yoluyla poliglutamasyon ile doğal folatlara benzer bir yol izler [109, 110]. Özellikle üç veya daha fazla glutamat kalıntısı içeren MTX poliglutamatlar, değiştirilmemiş MTX'ten daha uzun süre ve daha yüksek enzim etkinliğiyle hücrelerde tutulur. Poliglütamathı metotreksatın hücrel konsantrasyonları, dolaşımdaki ilacın yokluğunda bile hücrel etki başlayıncaya kadar yükselir [108].

Oksidan strese artan duyarlılıkla birlikte azalmış NADH ve glutasyon, metotreksat tedavisine benzer bir etkiye neden olur [109]. Organizmalar, reaktif oksidanların seviyesini ve bunların neden olduğu hasarı sınırlamak için birçok savunma mekanizması geliştirmişlerdir [110]. Hücrenin serbest radikallerden kaynaklanan oksidatif hasara karşı koymak için antioksidan savunma sistemine rağmen, DNA ve proteinlerin radikalle ilişkili hasarının kanser, arteriyoskleroz, artrit, eurodejeneratif bozukluklar gibi yaşa bağlı hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Reaktif oksijen türleri, DNA bazları dahil olmak üzere hücrel bileşenlerle etkileşime girer ve hasarlı bazlar veya iplik kopmaları oluşturur [111]. Oksijen radikalleri, eklentiler oluşturarak DNA ile reaksiyona giren ara maddeler oluşturan lipidleri veya proteinleri oksitler.

### 2.3. OKSİDATİF STRES

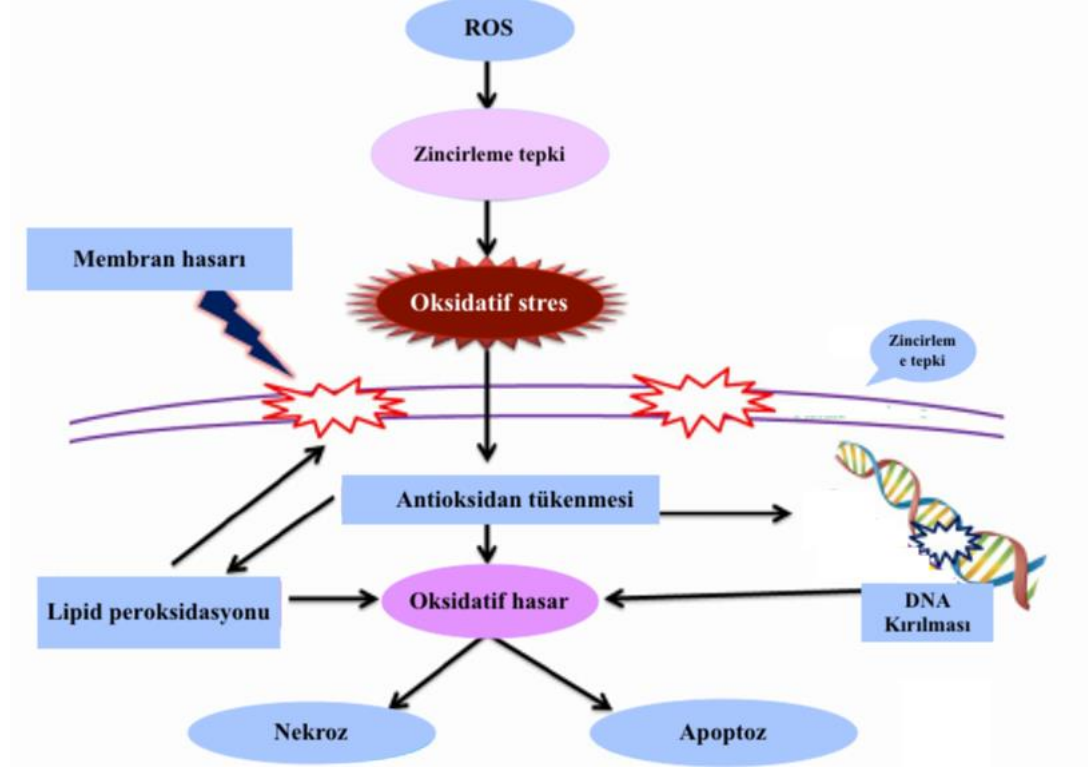
Oksidatif stres, reaktif oksijen içeren bileşiklerin normal koşullar altında olduğundan daha yüksek sayıda olduğu bir hücre veya hücre grubunun spesifik bir durumudur. Biyolojik sistemdeki oksidan türler lehine oksidan-antioksidan denge oranının bozulması olarak da tanımlanabilir [112]. Bu, iç savunma sisteminin oksidan türleri nötralize etme potansiyeline sahip olmadığı anlamına gelir. Bu oksidan türler reaktif oksijen türleri (ROS) veya reaktif nitrojen türleri (RNS) [113] veya oksitlenmiş lipidler olabilir [114]. Başlıca ROS'lar ve onların detoksifikasyon yolları (Şekil 2.11)'de özetlenmiştir [115].



Şekil 2.11. Başlıca ROS'lar ve detoksifikasyon yolları [115].

Hücrel metabolizma başta olmak üzere sinyal iletimi ve gen transkripsiyonu gibi birçok yaşamsal faaliyetler için temel bir unsur olan moleküler oksijen aynı zamanda dokunun tahrip olmasının ve/veya normal işlev görme yeteneğinin bozulmasının da bir nedeni olabilmektedir (Şekil 2.12). Oksidanlar, serbest radikaller, oksijensiz radikaller (OFR) veya daha genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılırlar. Bazı durumlarda ROS, temel biyolojik işlevlere hizmet etmek için özel olarak üretilirken, diğer durumlarda bunlar metabolik süreçlerin yan ürünleridir [116]. Ortalama bir insanda her gün her vücut hücresine saldıran yaklaşık 10.000–

20.000 serbest radikal vardır [32]. Nitrik oksitler (NO), vasküler düz kas hücre gevşeme ve çoğalması, anjiyogenez, trombosit agregasyonu, lökosit adezyonu tromboz, vasküler tonus ve hemodinamik düzenleme işlevlerini gerçekleştirmektedir [36, 117].



Şekil 2.12. Oksidatif stres kaynaklı hücresel hasar [116].

Oksidatif stres, kronik kardiyovasküler hastalıklar [118, 119], yaşlanma [120], karaciğer yapısı ve fonksiyonu bozuklukları [121] ve kanseri [122], farklı nörodejeratif hastalıklar [6], AIDS, diyabet, katarakt, Alzheimer ve Parkinson gibi çok çeşitli patolojik durumların ana nedenlerinden biri olduğu bulunmuştur [123-130].

#### 2.4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarın önlenmesi için genel olarak vücutta ve hücresel bazda "antioksidan savunma sistemi" adı verilen oksidatif strese karşı güçlü bir savunma sistemleri vardır. Serbest radikal

tutucular ve bazı enzimler oluşturduğu savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkilidir [131].

ROS ve metabolitlerinin yüksek derecede toksik etkilerinden kurtulmak için doğanın kendisi, eksojen veya endojen kaynaklardan doğrudan veya dolaylı yollarla uygulanan bazı koruyucu önlemler geliştirmiştir. ROS ile karşılaşabilen ve ROS'un neden olduğu hasara direnebilen maddeler topluca antioksidanlar olarak adlandırılabilir (Çizelge 2.1), [132].

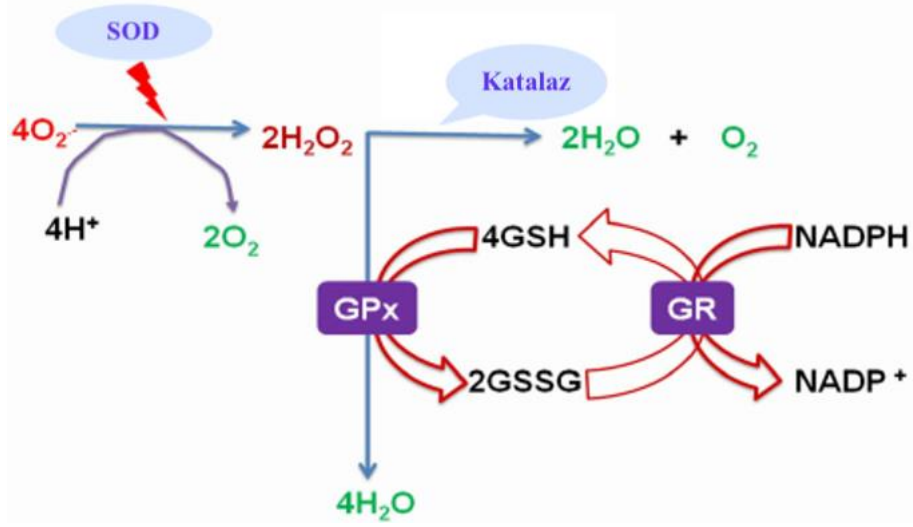
Çizelge 2.1. Biyolojik sistemlerdeki başlıca antioksidan enzim ve bileşikler [132].

<b>Antioksidan Enzimler</b>	<b>Endojen Bileşikler</b>	<b>Ekzojen Bileşikler</b>
Süperoksit dismutaz (SOD)	Askorbik asit	Polifenoller
Katalaz (CAT)	Glutasyon (GSH)	Karatenoidler
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Alfa-tokoferol	Flavanoidler
Glutasyon redüktaz (GR)	Ürik asit	Kurkuminoidler Alkaloidler

Hücrelerdeki endojen antioksidan bileşikler, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan (metabolik ve besleyici) antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir.

#### **2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar**

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GPx) ve glutasyon redüktaz (GRx) gibi ROS'un nötralizasyonunda doğrudan rol oynayan başlıca enzimatik antioksidanlar, moleküllerin son yörüngesinden elektron transfer ederek detoksifikasyon sağlarlar [133]. Serbest radikallere karşı ilk savunma hattı olan SOD, süperoksit anyon radikalının ( $O_2^{\cdot-}$ ) indirgenerek hidrojen peroksite ( $H_2O_2$ ) dismutasyonunu katalize eder. Oluşan oksidan ( $H_2O_2$ ), katalaz (CAT) veya glutasyon peroksidaz (GPx) tarafından su ve oksijene ( $O_2$ ) dönüştürülür. Selenoprotein GPx enzimi, indirgenmiş glutasyonu (GSH) oksitlenmiş glutatona (GSSG) oksitlemek için kullanarak  $H_2O_2$ 'yi uzaklaştırır. Bir flavoprotein enzimi olan glutasyon redüktaz, indirgeyici güç kaynağı olarak NADPH ile GSSG'den GSH'yi yeniden üretir. Hidrojen peroksitin yanı sıra GPx, glutasyonu (GSH) oksitlerken lipit veya lipit olmayan hidroperoksitleri de azaltır (Şekil 2, 13) [134].



Şekil 2.13. Enzimatik antioksidanların genel etki mekanizması [116].

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit anyonunun hidrojen perokside dismutasyonu reaksiyonunu katalizleyerek hücre için daha az zarar olan  $H_2O_2$ 'yu oluşturur. SOD enzimi SOD1, SOD2 ve SOD3 olmak üzere üç izoenzim halinde bulunur. Metal kofaktörleri olarak bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren SOD1 sitozolde bulunur. Mitokondriyal izoform olan SOD2 metal kofaktör olarak manganez (Mn) içerirken, hücre dışı formu kodlayan SOD3 ise bakır (Cu) ve çinko (Zn) içerir [129, 130]. Glutatyon peroksidaz (GPx) ve CAT oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı en önemli enzimatik savunma mekanizmalarıdır [131, 135].

Tetramerik yapıda ve 4 selenyum atomu içeren Glutatyon (GSH) enzim ailesi, Glutatyon peroksidaz (GPx), Glutatyon S-transferaz (GST) ve Glutatyon redüktaz (GR) olmak üzere üç ana grupta toplanırlar [136, 137]. GPx, hidrojen peroksidlerin indirgenmesinden sorumlu olan sitozolik bir enzimdir. GPx ve Glutatyon redüktaz (GR), birlikte çalışır ve glutatyon harcayarak  $H_2O_2$ 'nin redüksiyonunu katalizlerler [131]. GSH'lerin tükenmesi durumunda hücrede  $H_2O_2$  konsantrasyonunda artış meydana gelir ve DNA hasarına neden olabilir. Hidroperoksidlerin redükte olması ile meydana gelen okside glutatyon (GSSG), glutatyon redüktazın katalizlediği ters reaksiyon katılır ve bir protonun NADPH'den GSSG'ye aktarımı ile tekrar GSH'a dönüşür [136, 138].

Glutasyon peroksidaz, GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 ve GPx5'ten oluşan beş izoform halinde bulunur. Sitozolik bir izoform olan GPx1, dokularda yaygın olarak bulunurken, GPx2 ise gastrointestinal bir formdur. GPx3, plazma ve epididim sıvısında bulunur. Diğer bir sitozolik enzim olan GPx4 (fosfolipid hidroperoksid glutasyon peroksidaz) da monomerik selenyum atomu ihtiva eder ve membrane fosfolipid hidroperoksidlerini, alkollere indirgeyerek detoksifiye eder. Membrana bağlı en önemli antioksidanlardan olan vitamin E yetersizliğinde, GPx4 membranı peroksidasyona karşı korunmasını sağlar [136-140]. GPx5 ise epididimde bulunmaktadır. GSH'lar solunum patlaması sırasında fagositik hücrelerde oluşabilecek zararı, serbest radikal peroksidasyonu ile önler. Eritrositlerde de oluşabilecek oksidatif strese karşı en etkili antioksidan olan GSH'lar, aktivitesindeki azalma sonucu artan hidrojen peroksitine bağlı olarak şiddetli hücre hasarına neden olabilir [136- 138].

Katalaz, yapısındaki hem- grubundan dolayı hemoprotein olarak kabul edilmektedir [141]. Karaciğer, böbrek, müköz membran, kemik iliği ve kanda yüksek konsantrasyonda olup, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır [142].

#### **2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**

Metabolik antioksidanlar ve besleyici antioksidanlar olarak ikiye ayrılan enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit (C vitamini), GSH, E vitamini, beta-karoten ve flavonoidler gibi antioksidanlardan oluşmaktadır [143, 144].

Suda çözünen bir vitamin olan askorbik asit (C vitamini), lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korunmasını sağlar. Oksidanların anti-proteazları inactive etmesini engeller. C vitamininin antioksidan potansiyeli, O<sub>2</sub><sup>-•</sup> ve OH<sup>•</sup>'nin doğrudan uzaklaştırılması ile ilgilidir. Ayrıca, E vitamini rejenerasyonunda görev alan askorbik asit, tokoferoksil radikalının  $\alpha$ -tokoferole indirgeyerek, oksitlenmiş E vitamininin yenilenmesinde rol oynar. Antioksidan etkilerinin yanında düşük konsantrasyonlarda, organizmada

fenton reaksiyonu olarak bilinen, ferri demiri ( $Fe^{+3}$ ) ferro demire ( $Fe^{+2}$ ) indirgeyerek hidrojen peroksitle etkileşimi olan süperoksit radikali üretimine neden olur. Bu etkisi nedeniyle askorbik asit aynı zamanda pro-oksidan olarak da kabul edilmektedir [144-148).

Yağda çözünen ve zincir-kırıcı bir antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol'ün en önemli görevi oksijen serbest radikallerine karşı membrane lipidlerindeki yağ asitlerini korumaktır. Plazma membrana, endoplazmik retikuluma ve mitokondri membranına fosfolipitlerinin  $\alpha$ -tokoferol affinitesi çok yüksektir. Tokoferoller fenolik bir hidrojeni peroksidasyona uğramış bir doymamış yağ asidindeki serbest peroksit radikale aktarır ve serbest radikal zincir reaksiyonlarının kırılmasını sağlarlar [117]. Oluşan serbest  $\alpha$ -tokoferol radikali diğer bir serbest peroksit radikaliyle reaksiyona girer ve böylece  $\alpha$ -tokoferol geri dönüşlü oksidasyona uğramaz [149, 150].

A vitamininin öncü maddesi olan  $\beta$ -karoten yağda çözünen bir antioksidan olarak serbest radikalleri biyolojik hedeflerle reaksiyona girmeden doğrudan yakalayabilir. Ayrıca zincir kıran bir antioksidan olarak  $O_2^-$  ve serbest radikallerin oluşumunu engel olur [151-154].

Oksidatif hasara karşı hücre korumasında önemli rol oynayan GSH, sitozolde ve mitokondride bulunur. GSH ayrıca çekirdekte DNA onarım ve ekspresyonu için gerekli olan sülfhidril proteinlerinin redoks durumunu korur [155].

C ve E vitaminlerine göre daha etkili olan antioksidanlar olan flavonoidler, radikal süpürme için ideal yapıdadırlar. Flavonoidlerin antioksidan aktivite yapısı,  $H^+$  ve elektronların donör ajanı olarak reaktivite; oluşan flavanol radikalinin stabilitesi; diğer antioksidanlara kıyasla reaktivitesi; şelat geçiş metalleri kapasitesi; çözünürlük ve membranlarla etkileşimi olmak üzere beş faktör tarafından belirlenebilir. Flavonoidlerin serbest radikalleri süpürme aktivitesi, oksidasyon potansiyelinin büyüklüğüyle ters orantılıdır [156].



### 2.4.3. Antioksidan Olarak Fitokimyasallar

Fitokimyasallar, genel olarak bitkilerden elde edilen kimyasallar olarak tanımlanabilir. Bu kimyasallar, bitki metabolizmasındaki rollerine bağlı olarak birincil veya ikincil bileşenler olarak sınıflandırılır. Birincil bileşenler, şekerler, amino asitler, proteinler, nükleik asitlerin pürin ve pirimidinlerini, klorofilleri vb. içerir. İkincil bileşenler, alkaloidler (amino asitlerden türetilen), terpenler (bir grup lipit) ve fenolikler (karbonhidratlardan türetilen) gibi geri kalan bitki kimyasallarıdır [157].

Antioksidanlar, vücutta, meyve ve sebze gibi bitkilerde doğal olarak bulunan ikincil bileşenler veya metabolitlerdir. Bir antioksidan, hassas bir substratın oksidasyonunu engelleyen herhangi bir şey olarak basit terimlerle tanımlanabilir. Bitkiler, duyarlı substratın oksidasyonunu önlemek için karotenoid, flavonoid, sinnamik asit, benzoik asit, folik asit, askorbik asit, tokoferoller ve tokotrienollerini içeren çok etkileyici bir antioksidan bileşikler dizisi üretir [157]. Yaygın olarak bilinen antioksidanlardan bazıları beta-karoten, askorbik asit ve alfa tokoferoldür [155]. Beta-karoten, A vitamininin öncüsü olarak bilinir; karaciğerde ve ince bağırsağın mukoz membranlarında A vitaminine dönüştürülür. Beta karoten, vücutta toksik etki olmaksızın neredeyse sınırsız miktarlarda alınabildiğinden daha güvenli bulunmuştur [148]. Askorbik asit, çok işlevli özelliklere sahiptir. Koşullara bağlı olarak askorbik asit, bir antioksidan, pro-oksidan, bir metal şelatör, bir indirgeme ajanı veya bir oksijen tutucu olarak işlev görebilir. Askorbik asit, metal içeren sulu sistemlerde, bunları indirgeyerek, daha düşük değerlikli hallerinde daha aktif oksidasyon katalizörleri haline gelen bir pro-oksidan görevi görebilir. İlave metallerin yokluğunda askorbik asit, yüksek konsantrasyonlarda etkili bir antioksidandır [157].

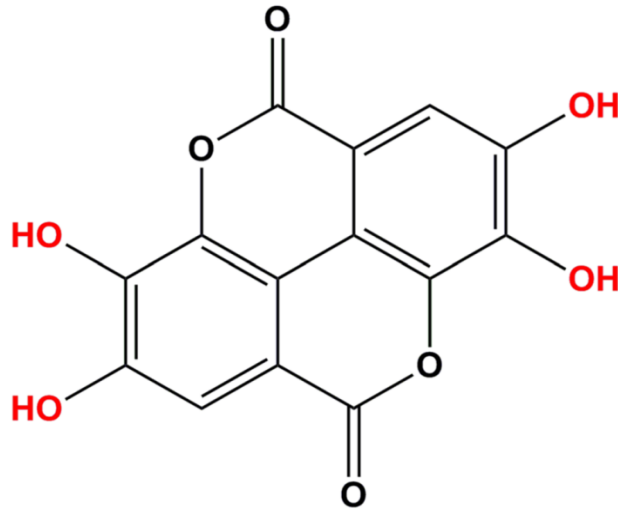
E vitamini, iyi bilinen antioksidan fonksiyonlara sahip bir bileşikler grubudur. E vitamini bileşikleri arasında tokoferol ve özellikle  $\alpha$ -tokoferol, en güçlü biyolojik aktiviteye sahiptir. Tokoferol, yaygın olarak memeli dokusunda bulunur [158]. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu geciktirerek doku esnekliğini koruyan, doğal olarak oluşan bir antioksidandır ve glutatyon peroksidazın önemli bir bileşenidir. Eksikliği, kardiyovasküler hastalık (konjestif kardiyo miyopati),

hızlandırılmış ateroskleroz, iskelet kası miyopatisi, artmış kanser riski, yaşlanma, katarakt ve bozulmuş bağışıklık fonksiyonunun gelişmesine katkıda bulunan faktör olarak belirtilmiştir [159]. C vitamini (askorbat), E vitamini (tokoferol) ve kantonoidler gibi küçük moleküllü diyet antioksidanları, antikarsinojenler ve dejeneratif hastalıklara karşı savunma olarak özel ilgi uyandırmıştır [58].

Ellagik asit, farklı kimyasallar veya stresörlerin neden olduğu oksidatif strese karşı kullanılan, kapsamlı olarak çalışılmış fenolik antioksidanlardan biridir. EA'nın oksidatif streste potansiyel ve mekanik rolünü anlamak için EA'nın biyolojik sistemdeki antioksidan yeteneğini üzerine son yıllarda önemli çalışmalar yapılmıştır.

## **2.5. ELLAGİK ASİT**

Ellagik asit (EA) doğal ve kuvvetli bir antioksidandır. Kimyasal adı 2,3,7,8-tetrahidroksi-kromeno [5,4,3-cde] -kromen5,10-dion'dur. Yapı, dört hidroksil grubu ve iki lakton fonksiyonel grubundan oluşur. İki hidroksil grubunun varlığı nedeniyle bu fenolik bileşik polifenolik olarak sınıflandırılmıştır. EA'nın güçlü antioksidan potansiyelinin ana sebebi iki çift hidroksil grubu içermesidir. Deneysel sonuçlar ayrıca EA'nın gallik asit, kafeik asit, proto-katekuik asit, epikateşin ve kaempferole benzer antioksidan aktiviteye sahip olduğunu, ancak ferulik asitten daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Barch ve ark. [160], bu iki çift hidroksil grubunun EA'nın antikanserojenik aktivitesinde önemli bir rol oynadığını ortaya çıkarmışlardır. Hidroksil, nitrür, nitrik oksit, CCl<sub>3</sub>OO radikali, ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) gibi farklı serbest radikaller olduğunda radikaller çözelti içinde EA ile reaksiyona girer ve bu radikallerin konsantrasyonu önemli ölçüde azalır [30]. EA'da iki aromatik halkanın varlığı, doğada ve suda çözünürlüğün düşmesine büyük katkıda bulunmuştur (Şekil 2.14). Bu, doğal kaynaklarda ortaya çıkmasının nedeni olabilir.



Şekil 2.14. Ellagik asitin kimyasal yapısı [113].

Ellagik asit, sert kabuklu yemişlerde, sebzelerde ve meyvelerde bulunmaktadır (161-163). Çeşide ve iklim koşullarına göre değişen oranlarda bulunabilen EA, özellikle ahududu meyvelerinde yüksek miktarlarda bulunmuştur. Kakadu eriği meyvelerinde çilek ve böğürtlene göre daha yüksek miktarda serbest EA (%70'ten fazla) bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [163, 164]. *Okaliptüs globulus* [165], *Epilobium hirsutum* [166] ve *Terminalia chebula* [167] da iyi EA kaynaklarıdır. Nar oksidatif stres için kullanılan önemli EA kaynaklarından biridir [168]. *Momordicacharantia*'da bulunan EA'nın diyabetik sıçanların karaciğerindeki oksidatif stresi, fibrozu ve inflamasyonu önlediği gösterilmiştir [169].

EA, çeşitli sağlık koşullarının iyileştirilmesinde önemli ve faydalı bir rol oynamaktadır. Vattem ve Shetty [170]'nin EA'nın biyolojik işlevleri üzerine yaptığı çalışmada, EA'nın dış strese karşı hücrel yanıtı sürdürmek için enzim yanıtını modüle ettiğini göstermiştir. EA'nın sinir sistemi üzerindeki güçlü nöro-koruyucu etkilerini gösteren iki derleme yayınlanmıştır [171, 172]. Güçlü bir anti-kanserojen role sahip olan EA'nın [173, 174], metabolitleri de tıbbi açıdan önemlidir [175-177].

### 2.5.1. Ellagik Asidin Antioksidan Aktivitesi

EA, güçlü bir doğal antioksidandır. Fujitave ark. [178], askorbik asidin otoksidasyonunun inhibisyon mekanizmasını tanenler ve flavonoidlerin yardımıyla

incelemiş ve ellagitanninlerin otoksidasyonun inhibisyonunda etkili olduğunu göstermişlerdir. Nanosaniye puls radyoliz tekniği, sıçan karaciğer mikrozomların dalı pidperoksidasyonunu inhibe etmede EA'nın antioksidan aktivitesinin arkasındaki gerçek mekanizmayı belirlemek için kullanılmıştır [30]. Benzer şekilde, EA'nın ve bazı türevlerinin antioksidan kabiliyetinin mekanizması, farklı yoğunluk fonksiyonel seviyeleri kullanılarak çalışılmıştır [179]. Buna göre üç farklı reaksiyon mekanizması belirlenmiştir; (1) hidrojen atom transferi (HAT), (2) elektron transferi ve ardından proton transferi (SET-PT) ve (3) sıralı proton kaybı elektron transferi (SPLET). HAT mekanizmasının tüm ortamlarda EA ve türevleri tarafından tercih edildiği görülmüştür. Larrosa ve ark. [180], yaptıkları çalışmada EA ve ellagitanninlerin vasküler sağlıktaki rolünü incelemiş ve EA'nın plazmada bulunan metabolitlerden biri olduğu, ürolitinler gibi diğer metabolitlerin de plazmada serbest veya konjuge formda mevcut olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, EA ve ellagitanninlerin metabolitlerinin daha aktif olduğu ancak daha az radikal temizleme kapasitesine sahip olduğu sonucuna varmışlardır. Bayraktar ve ark. [181], EA'nın in vitro radikal temizleme ve antioksidan kapasitesini, farklı spektroskopik teknikler veya metodolojiler kullanarak incelemişlerdir. Yazarlar, EA'nın bir linoleik asit emülsiyonunun lipidperoksidasyonunu inhibe ettiğini (%71,2) bulmuşlardır. Ayrıca EA, incelenen tüm radikaller için etkili bir radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. EA'nın hidroksil, süperoksit radikal ve hidrojen peroksit karşı güçlü antioksidan özellikleri nedeniyle, farklı terapötik uygulamalarda bir antioksidan olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir.

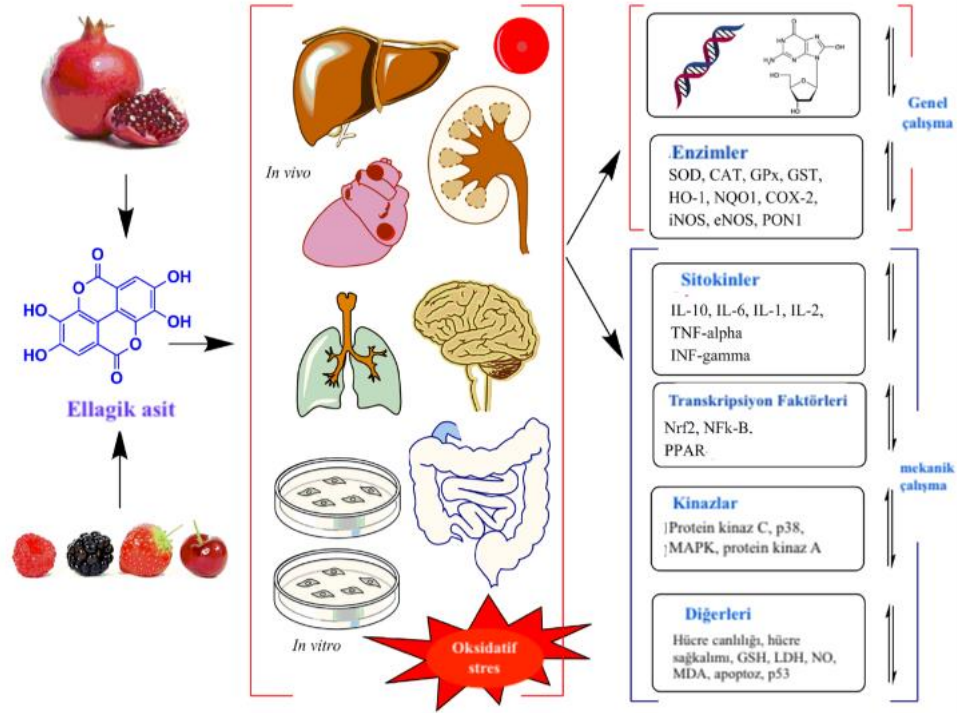
Barch ve Rundhaugen [182], yaptıkları transfeksiyon çalışmalarında EA'nın kinonredüktaz (QR) geninin transkripsiyonunu indüklediğini gösteren ve bu indüksiyonun QR geninin antioksidan yanıt veren bileşeni aracılığıyla gerçekleştiğini doğrulamışlardır. Mitomisin-C ve hidrojen peroksit uygulanan Çin Hamsteri yumurtalık (CHO) hücrelerinde EA, hidrojen peroksit kaynaklı reaktif oksijen türlerine karşı yüksek reaksiyon göstermiştir [183]. Ayrıca, EA'nın DNA'nın çift sarmalını alkilleyici ajanların neden olduğu hasardan koruduğu bulunmuştur. Meyer ve ark. [184], EA'nın LDL oksidasyonu üzerindeki antioksidan aktivitesini kullanarak kateşin, kuersetin, siyanidin ve kafeik asitinsinerjik veya antagonistik etkilerini incelemiştir. EA'nın diğer polifenollerle önemli bir antagonistik etki

gösterdiği bulunmuştur. Bu yazarlar ayrıca, bu antagonistik etkileşimin arkasındaki mekanizmanın, EA'daki kateşin içindeki dihidroksil grupları ve karbonil grupları arasındaki hidrojen bağlanmasına bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Benzer şekilde, CHO kültür hücrelerinde EA, hidrojen peroksit ve Bleomisin tarafından indüklenen DNA hasarını önemli ölçüde korumuştur [184, 185]. Sıçanlarda uygulanan EA, alkole bağlı toksisiteye karşı güçlü bir antioksidan olduğu gözlemlenmiştir [186]. Bununla birlikte, deneysel sonuçlar, EA kompleksinin güçlü potansiyel antioksidan özelliğinin serbest EA ile karşılaştırıldığında karbon tetraklorür kaynaklı karaciğer toksisitesinde daha iyi hepato-koruyucu aktivite sağladığını da göstermiştir [187]. EA antioksidanın artırılmış gücü, bu nedenle kronik hastalığın tedavisinde verimli olabilir. Örneğin, Kumar ve ark. [188], EA'nın oral uygulamasının sıçanlarda antioksidan statüsünü önemli ölçüde koruduğunu gösterdi. Yazarlar ayrıca EA'nın ornitindekarboksilaz ekspresyonunun transkripsiyonelinaktivasyonunu etkilediğini ve böylece EA'nın kolorektal kansere karşı kemo-önleyici etkinliğini işaret ettiğini rapor etmiştir.

### **2.5.2. Oksidatif Streste Ellagik Asit**

EA'nın çeşitli yolları düzenleyerek oksidatif streste faydalı etkiler ürettiği bilinmektedir. Bunlar arasında Nrf2 (nükleer eritroid faktör 2) kullanılarak antioksidan yanıtın aktivasyonu [189, 190], NF-kB (nükleer faktör-kappa B) yardımıyla siklooksijenaz 2 (COX-2) [191, 192] ve sitokinlerin inhibisyonu [193], hücre sağkalımı veya apoptozun modülasyonu [194], biyolojik antioksidanların ve antioksidan enzimlerin aktivitesini artırılması bulunmaktadır [195]. Bu oksidatif stres çalışmalarının detayları (Şekil 2.15)'da gösterilmektedir. EA'nın bazı önemli kaynaklarını ve farklı in vitro ve in vivo stresörlerin neden olduğu oksidatif stresi göstermektedir. Oksidatif stresin antioksidan enzimlerde, DNA hasarında ve oksitlenmiş DNA'da çalışıldığı gösterilmiştir. Mekanizma çalışmaları sitokinlerin, transkripsiyon faktörlerinin, kinaz enzimlerinin ve hücre özelliklerinin belirlenmesini içermektedir. Bu çalışmalarda oksidatif stres, birkaç endojen ve eksojen faktör kullanılarak incelenmiştir. Endojen faktörler arasında beyin, kalp, karaciğer ve böbrek hastalıkları gibi hastalıklar ve ilgili kanserler yer alırken, Eksojen faktörler UV ve  $\gamma$ -radyasyonları ve kimyasal kaynaklı oksidatif streslerdir. Ayrıca, tavşanlarda

Termal olarak oksitlenmiş lipidlerin neden olduğu oksidatif stres EA kullanılarak kartırılmış GSH tedavisi ile zayıflatılmıştır [196].



Şekil 2.15. EA'nın farklı organ bölgelerindeki oksidatif stresteki rolü. [197].

### 2.5.3. In Vitro Oksidatif Streste Ellagik Asit

Çin Hamster akciğer (V79-4) ve insan osteojenik sarkom (HOS) hücrelerinde, hidrojen peroksit kullanılarak oksidatif stresi indüklemiş, V79-4 hücrelerinde EA (4–100 µg / mL) ve Bax'ın yukarı regülasyonu ve kaspaz-3 aktivasyonu yoluyla HOS hücrelerinde apoptoz tedavisinde antioksidan enzimlerden (SOD, CAT, GPx) aktivitesinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur [31]. İnsan fibroblast (IMR-90) hücrelerinde, hidrojen peroksit tarafından indüklenen oksidatif stresi tedavi etmek için 10 µg/mL EA kullanılmış, DNA hasarı ve lipid peroksidasyonunun önemli ölçüde azaldığı, hücre içi GSH'nin ise arttığı bulunmuştur. Ayrıca hidrojen peroksitin neden olduğu oksidatif stresten hücreleri koruduğu bulgusuna ulaşılmıştır [198]. Khanduja ve ark. [199], hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif stresin normal insan periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC'ler) EA'nın lipid peroksidasyonu önemli ölçüde inhibe edildiğini ve PBMC hücrelerinde oksidatif

strese karşı DNA hasarını koruduğunu bildirmiştir. Bu çalışmalar, hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif stresin ve buna bağlı olumsuz etkilerinin EA ile azaltılabileceğini açıkça göstermektedir [200].

Diğer bir çalışmada da UV-A ile indüklenen oksidatif strese EA'nın koruma mekanizması incelenmiştir. SOD, MDA, LDH ve HO-1 gibi oksidatif stres belirteçleri çalışıldığı bu araştırmada EA'nın antioksidan sistemi, Nrf2 hücrelerinin yukarı regülasyonu ve stabilizasyonu yoluyla etkinleştirdiğini bulgusuna ulaşılmıştır. Mevcut sonuçlar çerçevesinde EA'nın bir ilaç veya kemoterapötik ajan olarak veya ciltte radyasyona bağlı oksidatif stresi iyileştirmek için gıda takviyesi olarak kullanılabileceği sonucuna varmıştır [201].

EA ile muamele edilmiş hücrelerde süperoksit anyonlarının ve hidroksil radikallerinin oluşumunu hem enzimatik hem de enzimatik olmayan şekilde inhibe ettiği sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde, PC-12 hücreleri demir, hidrojen peroksit ve t-BHP'nin indüklediği oksidatif strese maruz bırakılmış, 6,2-26  $\mu\text{M}$  dozlarında uygulanan EA ile stresin indirgeniği ölçülmüştür [202].

İnsan karaciğer hücre hatlarında, karbonil siyanür ve rotenon ile indüklenen oksidatif stres 18 saat süreyle 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda uygulanan EA ile azalmıştır. Hücre ölümü, GSH, ALT ve AST yükselmesi kontrol altına alınması EA'nın sito-koruyucu etkileri olduğunu düşündürmektedir [203].

Oksidatif stres sırasında lipid peroksidasyonu, fenolik bileşikler kullanılarak kontrol edilebilen önemli bir faktördür. In vitro çalışmalar, EA'nın astrositler gibi hücreler çalışmalarda lipid peroksidasyonunun iyi bir inhibitörü olduğunu göstermiştir [204].

Sonuç olarak, in vitro çalışmalar çoğunlukla, tedaviyi insan deneklere yaymak için önemli noktalardan biri olan insan hücre kültürlerine odaklanmıştır. Çalışmaların çoğu, EA mekanizmasının antioksidan savunma sisteminin belirli genlerinin aktivasyonunu içerdiğini göstermiştir.

#### **2.5.4. İn Vivo Oksidatif Streste Ellagik Asit**

Farelerde embriyo ve plasenta dokularında yapılan çalışmalarda tetrakloro-dibenzo p-dioksinin (TCDD) hayvanlarda oksidatif stresi indüklediği bulunmuştur. Fetal dokularda TCDD'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı, EA'nın E vitamininden daha iyi koruma sağladığını göstermiştir [205]. EA, farelerde süperoksit anyonlarını, lipid peroksidasyonunu ve DNA hasarını önemli ölçüde azaltmış ve bu da fetal gelişimde yararlı bir rol olduğunu düşündürmüştür. Benzer şekilde, farelerin beyin dokusunda TCDD'nin neden olduğu oksidatif strese karşı EA ve vitamin E aktivitesi karşılaştırıldığında ise E vitamininin EA'ya karşı daha iyi koruma sağladığı rapor edilmişse de EA yine de sinir sistemindeki oksidatif stres için faydalı bir ajan olarak kullanılabilir sonucuna varılmıştır [205]. Vijayapadma ve ark. [206], TCDD ile indüklenen oksidatif streste EA'nın CYP1A1 aktivitesinin baskılanmasına aracı olduğunu ve antioksidan mekanizmayı güçlendirdiğini göstermiştir. CYP1A1 aktivitesindeki azalmanın, EA'nın CYP1A1'e doğrudan bağlanmasından veya aril hidrokarbon reseptör antagonizminden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür.

Başka bir oksidatif stres etkeni olan Siklofosamid (CP), spermde, plazma MDA seviyesinde ve eritrosit SOD'de anormalliğe neden olduğunu belirlenmiş, CAT aktivitesinde, nekrozda ve olgunlaşmamış germ hücrelerinin üretiminde azalma, tıkanıklık ve testiküler atrofi oluşmasına neden olmuştur. EA kullanımına bağlı olarak bu etkilerde kayda değer azalmalar olmuştur [207].

#### **2.5.5. İnsanlarda Ellagik Asit ve Oksidatif Stres**

EA'nın insan oksidatif stresindeki etkinliği ile ilgili sınırlı literatür mevcut olup, çalışmaların çoğu, spesifik insan hücre dizilerine dayanmaktadır. Zhang ve ark. [208] yaptıkları çalışmalarda EA'nın gelecekteki araştırmalar için güçlü bir antikanser ajan potansiyeli taşıdığını rapor etmişlerdir. Örneğin Stoner ve ark. [209] dondurularak kurutulmuş siyah ahududuların (BRB) tolere edilebilirliğini belirlemek ve plazma ve idrardaki spesifik polifenolik bileşikler ölçmek için 11 insan denek üzerinde bir klinik çalışma bildirmiştir. Günlük olarak dondurularak kurutulmuş BRB alımının iyi



tolere edildiğini ve plazma ve idrarda ölçülebilir antosiyaninler ve EA bulunduğunu rapor etmiş ve oksidatif strese karşı yardımcı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Morillas-Ruiz ve ark. [210], EA içeren antioksidan takviyeli içeceklerin egzersizin neden olduğu oksidatif stres üzerindeki etkilerini test etmiş, bazal ile egzersiz sonrası plazma TBARS arasında anlamlı bir fark belirlenememiştir. Ancak egzersiz sonrası antioksidan içeren içecek alan grupta karbonil miktarının %29 azaldığı gözlenmiştir. Çalışma sonucunda, EA içeren antioksidan takviyenin egzersizin neden olduğu oksidatif strese %70 oranında karşı koyabileceğini ve bu nedenle sağlıklı kabul edildiğini ileri sürülmüştür. Aynı grup tarafından egzersizle indüklenen oksidatif stres üzerine EA antioksidan içeren içecek ile benzer sonuçlar bildirilmiştir [210]. Bununla birlikte, bu çalışmalar, incelenen deneklerdeki EA eyleminin mekanizması hakkında bilgi içermemektedir. Hayashi ve ark. [211], EA ve kurkuminin insan serum GST seviyeleri üzerindeki etkilerini incelemiş, EA ve kurkuminin zaman ve konsantrasyona bağlı olarak GST M1-1, M2-2 ve P1-1 inaktivasyonu sağladığı görülmüştür. Bu sonuçlar, malignitelerde GST aşırı ekspresyonu vakalarında kemo-modülatörler olma rolleri açısından insan GST'lerinin seçilmiş polifenolik bileşiklerle olan etkileşimini anlamamızı sağlamıştır. Benzer şekilde Chen ve ark. [212], EA içeren nar suyunun insan plasenta gelişimi sırasında oksidatif stres üzerindeki koruyucu rolünü bildirmişlerdir. Bununla birlikte yazarlar, plasental trofoblastta in vitro oksidatif stresi incelemiş ve nar suyunun fetüs gelişimi sırasında plasenta hasarını önleyebileceğini öne sürmüştür.

## BÖLÜM 3

### GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. GEREÇLER

Bu çalışma, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nın Protokol No:2020/11, 08/04/2020 tarihli onayı ile etik kurul izni alındı. Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün TYL-2020-2337 kararı ile desteklendi.

##### 3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmada hayvan materyali, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 32 adet, iki aylık erkek Wistar-Albino cinsi 250-300 gr ağırlığında sıçan kullanıldı. Sıçanlar standart şartlarda 20-24°C sabit ısı, %50-60 düzeyinde nem ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık ortamda olmak üzere, pelet ve ad-libitum yemi ile beslendi.

##### 3.1.2. Kullanılan Kimyasalar

Metotreksat, Ellagik asit, Alfa ketamin, Amonyum sülfat, Asetik asit, Sülfat pentahidrat, Bovine serum albümin, N-butanol-1, Ksilazin, Di-sodyum hidrojen fosfat, Benzoik asit, Etanol, Etilen diamin tetra asetik asit, Fenol, Folin-Ciocalteu'nun fenol reaktifi, Glutasyon reduktaz, Formaldehit, Metafosforik asit, Potasyum dihidrojen fosfat, Potasyum sodyum tartarat, Sodyum dihidrojen fosfat, Sodyum nitroprosid, Sodyum dodeksil sülfat, Sodyum hipoklorid, Sodyum hidroksit, Sodyum karbonat, Sodyum klorid, Sodyum sitrat, 1,1,3,3-Tetrahidropropan, Piridin,

Tiobarbitürük asit, TAS Analiz Kiti (Rel Assay (Sıçan) 96'lık) TOS Analiz Kiti(Rel Assay (Sıçan) 96'lık).

### **3.1.3. Kullanılan Cihazlar**

ELISA Mikroplate Okuyucu (Thermo), Vorteks (Velp ZX3), Homojenizatör (Bioprep-24), Etüv (Nüve), Ph Metre (AD 1000), Derin Dondurucu (-80 C°) (Nüve FR 490), soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200), manyetik karıştırıcı (Termal N11150M), Su Banyosu (Nüve ST 30), Mikropipet Seti (İsolab), Distile Su Cihazı (Nüve), Hassas Terazi (Radwog As 220), pH metre (AD 1000),

## **3.2. YÖNTEMLER**

### **3.2.1. Deney Prosedürü**

Deneme grubunda yer alan 32 adet sıçan her grupta 8 hayvan yer alacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı.

1. Kontrol grubu: Bu grupta yer alan her bir sıçana; ilk gün intraperitoneal yolla %0,9 serum fizyolojik, diğer 10 gün boyunca her bir sıçana intragastrik yolla (%10 DMSO içeren serum fizyolojik çözeltisi) uygulandı
2. EA grubu: Bu grupta yer alan her bir sıçana; 10 gün boyunca 75 mg/kg ellagik asit (%10 DMSO içeren serum fizyolojik çözeltisi içinde çözdürülerek) intragastrik yolla uygulandı [213].
3. MTX grubu: Bu grupta yer alan her bir sıçana; ilk gün tek doz MTX 20 mg/kg intraperitoneal (i.p.) yolla uygulandı [214].
4. MTX + EA grubu: Bu grupta yer alan her bir sıçana; ilk gün tek doz 20 mg/kg MTX intraperitoneal (i.p.) yolla, diğer 10 gün boyunca 75 mg/kg ellagik asit (EA) (%10 DMSO içeren serum fizyolojik çözeltisi içinde çözdürülerek) intragastrik yolla uygulandı.

Ellagik asit (EA) çözeltilisinin hazırlanması:

Ellagik asit, her bir sıçana 75mg/kg içecek şekilde %10 DMSO içeren serum fizyolojik içinde çözdürülerek günlük olarak vortekste karıştırılarak hazırlandı [213].

### **3.2.2. Numune Alınması**

Çalışmamızın 11. gününde tüm gruptaki sıçanlar; 90/10 ksilazin-ketamin ile genel anesteziye alındı. Göğüs boşluğu makasla açılarak kardiak perfüzyon uygulandı. Alınan kan örnekleri 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen serumlar biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -40 C°'de saklandı. Sıçanların her iki böbrek dokuları alınarak serum fizyolojikle yıkandı. Böbreklerin biri biyokimyasal analizler için sıvı azot ile dondurularak derin dondurucuda analize kadar -40°C'de muhafaza edildi, diğeri ise ikiye bölünerek histopatolojik değerlendirmeleri için %10'luk formaldehit içerisine aktarıldı.

### **3.2.3. Doku Homojenizasyonu**

Analizlerin öncesinde böbrek dokuları derin dondurucudan alındı, oda ısısına getirildi. Böbrek dokusu numuneleri cam tüplerde tartıldı üzerine, 1/10(a/h) olacak şekilde soğuk fosfat tamponu çözeltilisi ilave edildi. Dokular, homojenizatör yardımıyla 10000-12000 devir/dk hızda 1-2 dk homojenize edildi. Elde edilen homojenizantlar soğutmalı santrifüj cihazında +4 °C'de 30 dk süreyle 5000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlarda biyokimyasal analizler gerçekleştirildi. Böbrek dokusu süpernatantlarında; malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), toplam antioksidan kapasite (TAS) ve toplam oksidan kapasite (TOS) analiz edildi. Oksidatif stres indeksi (OSİ) = TOS/TASx10 formülünden matematiksel olarak hesaplandı.

### **3.2.4. Doku Malondialdehit (MDA) Analizi**

Malondialdehit analizi [215]'nin metoduna göre yapıldı. Testin prensibi; numunelerdeki malondialdehit (MDA)'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95°C de

reaksiyona girmesi sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturması sonrası ELİSA cihazında kolorimetrik olarak 532 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına bağlıdır.

### **Solüsyonlar**

Stok malondialdehit standart solüsyonunun hazırlanması: 1,1,4,4 tetrametoksipropan 0.92 g tartıldı 1 mL suda çözdürüldü.

Günlük çalışma tetrametoksipropan solüsyonunun hazırlanması: 10 mL 'lik hazırlanan çözüm stok tetrametoksipropan çözeltisi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Çalışma sırasında 1/10 oranında sulandırılarak çalışma standartları elde edildi ve analizde kullanıldı.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonu: 8.1 g sodyum dodesil sülfat (SDS) tartılıp balon jøjeye aktarıldı, distile su ile çözdürülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Asetik asit solüsyonu: 20 mL asetik asit pH 3,5 ölçülüp 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.

n-bütanol-pridin solüsyonu: Stok piridinin 1 mL'si 15 mL n-bütanol ile karıştırılarak hazırlandı.

TBA solüsyonu: Tiyobarbiturik asit 0.8 g tartıldı, balon jøjeye aktarıldı, distile su ile çözdürülerek 100 mL'ye tamamlandı.

### **Deney**

Kapaklı deney tüplerine aşağıdaki işlemler uygulandı.

Çizelge 3.1. MDA deneyinin yapılışı.

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Numune</b>
Distile su µL	400	350	350
Numune(homojenat) µL	-	-	50
Standart (1/10) µL	-	50	-
Asetik asit solüsyonu µl	750	750	750
SDS solüsyonu µL	100	100	100
TBA solüsyonu µL	750	750	750

Tüpler 95 C°'de 30 dk su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonra musluk suyu ile soğutularak üzerlerine 500 µL distile su ve 2.500 µL n-bütanol-bridin eklendi Tüpler iyice kapakları kapatılıp vorteks yardımı ile beyazlaşmıca kadar karıştırıldı. Arkasından 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant sıvısından 1 mL alınıp 532 nm dalga boyunda ELISA cihazında köre karşı kolorimetrik olarak ölçüldü. Kalibrasyon eğrisi aracılığı ile MDA düzeyleri hesaplandı.

### **3.2.5. Doku Glutatyon (GSH) Analizi**

Doku GSH analizi Beutler ve ark. [216]'nın tarif ettiği yönteme göre yapıldı. Prensip numunelerde bulunan glutatyon ile Ellman's solüsyonu DTNB'in reaksiyonu sonucunda oluşan sarı renkli bileşik mikropalakaların kuyucuklarına deney gruplarına göre yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda ELISA cihazı kullanılarak ölçüldü.

### **Solüsyonlar**

Çöktürücü solüsyonu: Etilendiamintetraasetik asid (EDTA) 0.2 g, metafosforik asit 1.67 g, sodyum klorür 30 g olacak şekilde tartılıp distile su ile çözdürüldü ve 100 mL'ye tamamlandı (3 hafta dayanır).

DTNB (Elmans solüsyonu): Dinitrobenzoik asit (DTNB) 40 mg olacak şekilde tartılıp %1 sodyum sitrat ile 100 mL'ye distile su ile tamamlanarak hazırlandı

Fosfat solüsyonu: Disodyum fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 26.7 gr olacak şekilde tartılıp 500 mL'ye distile su ile tamamlanarak hazırlandı.

GSH standard solüsyonu: GSH 40 mg olacak şekilde tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanarak hazırlandı.

### **Deney;**

1. Kör: Tüpe 2 mL distile su ile 3 mL çöktürücü ekleyerek solüsyon hazırlandı.
2. Standart: Tüpe 3 mL çöktürücü, 0.2 mL GSH standardı, 1.8 mL distile su eklendi karıştırıldı ve yaklaşık 5dk beklendi. Daha sonra tüpteki içerik adi süzgeç kâğıdı ile süzüldü ve 1 ml süpernatant alındı başka yeni bir tüpe aktarıldı bu tüpe 4 mL fosfat ve 0.5 ml DTNB çözeltisi eklenerek karıştırıldıktan sonra distile suya karşı 10 dk içerisinde ELİSA okuyucuda 412 nm dalga boyunda okunarak ölçüldü.
3. Numune: Tüpe 0.2 ml doku süpernatantı alınır, 1.8 mL distile su ile karıştırılır daha sonra 3 mL çöktürücü eklenerek karıştırıldı 5 dk beklendi Bundan sonraki yapılan işlemler standarttaki gibidir.

### **3.2.6. Doku Toplam Oksidan Seviye (TOS) Analizi**

Doku süpernatantındaki TOS düzeyleri Erel'in tarif ettiği yönteme göre yapıldı [217]. Prensipten ferrik iyonların kromojen çözeltisi karşısında oluşturduğu turuncu renkli karışımın 530 nm'de 25 C° sıcaklıkla ELİSA okuyucuda absorbansı okunarak ölçüldü. Total oksidan Status kiti (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Türkiye) kullanılarak analiz edildi. Test, hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv /L olarak kabul edildi.

### **3.2.7. Doku Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Analizi**

Doku süpernatantındaki TAS düzeyleri Erel'in tarif ettiği yönteme göre yapıldı [218]. TAS düzeyi, Rel Assay Brand kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak analiz edildi. Prensipten antioksidan moleküllerinin kararlı ve renkli ABTS

(2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) katyonik radikalini redüklemesi sonucu ortaya çıkan bu renkli özellikteki radikalın dekolarize olması yöntemine dayanır. Kit talimatlarına göre reaktif 1 ve süpernatantın mikropalakaların kuyucuklarına deney gruplarına göre yerleştirilerek 660 rpm'de 25 C° ELİSA cihazında ilk okuma yapıldı. Sonra reaktif 2 ilave edilerek aynı dalga boyunda ikinci okuma gerçekleştirildi. Her bir numune için iki okuma arasındaki absorbans farkı tanımlandı. Kalibratör olarak E vitaminin eşdeğeri olan Trolox kullanıldı ve sonuçlar mmol Trolox Equiv/L olarak elde edildi.

### **3.2.8. Doku Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)**

Oksidatif stres indeksini (OSİ) hesaplamak için çalışmamızda elde edilen TOS'un TAS'a oranı OSİ olarak kabul edildi  $OSİ = TOS (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}) / TAS (\mu\text{mol Trolox equivalent/L}) \times 10$  formülü kullanılmıştır [219-221].

### **3.2.9. Dokuda Toplam Protein Analizi**

Çalışmamızda böbrek dokusu enzim aktivitesini ölçülmek için toplam protein düzeylerine [222]'nin yöntemine göre bakıldı. Sonuçlar ELİSA okuyucuda köre karşı 550 rpm'de mg protein/mL olarak verildi.

### **3.2.10. Serum Analizleri**

Derin dondurucuda -40 °C'de saklanan serumlar analiz günü çıkarıldı oda ısısına getirilerek serumda üre, ürik asit, kreatinin, total protein düzeyleri otomatik otoanalizör cihazında kit ile analiz edildi. Üre, kreatinin ve ürik asit sonuçları mg/dL olarak verildi. Toplam protein ise g/dL olarak verildi.

### **3.2.11. Histopatolojik Analizler**

Sıçanlardan alınan böbrek dokuları %10'luk nötral tamponlanmış formaline (NTF) (104003, Formaldehyde solution %37, Merck, ABD) konuldu. Daha sonra örnekler 3-4 mm'lik daha küçük parçalara ayrılıp, takip kasetlerine alınarak NTF'de 48 saat



süre ile fikse edildi. Fiksasyon muayenesinin ardından takiben parçalar 24 saat boyunca çeşme suyu altında yıkanan dokuların trimleri gerçekleştirildi, daha sonrası 2x45 dakika %70, %80, %95 ve %96'lık artan alkol serilerinden sırasıyla geçirilerek dehidre edildi (Etanol, 1.00971.2500, Merck, ABD) ve ksilol (108661, Merck, USA) ile 2x30 dakika şeffaflandırıldı. Şeffaflama işleminin ardından 2x30 dakika paraffin (Surgipath EM-400, Leica, GER) içerisinde bekletildi. Doku takibi için Leica TP 1020 (Leica, GER) doku takibi cihazı kullanıldı (GER). Gömme işlemi ardından bloklar soğumaya bırakıldı. Mikrotomu ile parafin bloklardan Leica FINESSE ME+ (Leica, GER) 5 µm'lik kesitler ışık mikroskopik incelemeler için lamlara alındı ve 2 saat boyunca 37°C'lik etüvde bekletildi. Kesitlere genel histolojik yapıyı izlemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi kullanıldı. Kesitler deparafinizasyon basamağı için sırasıyla 60°C etüvde ve 60°C sıcaklıktaki ksilol içerisinde 1 saat bekletildi. Ardından boyama işlemi gerçekleştirildi.

Histopatolojik Değerlendirme: Renal hasar interstisyel, tubuler ve glomerüler değişikliklerin derecesi ve yaygınlığına göre semikantitatif olarak belirlendi. Buna göre dokular; interstisyel değişiklikler (interstisyel fibrosis, interstisyel nefrit ve vasküler konjesyon), tubuler değişiklikler (tubuler dejenerasyon, tubul lümeninde hyalen silindirler, tubuler bazal membran distorsiyonu ve tubuler nekroz), glomerüler değişiklikler (glomerüler atrofi, glomerüler inflamasyon, glomerüler hipersellüerite, glomerüler deposit, glomerüler bazal membran distorsiyonu) yönünden incelendi. Her kesitten X20'lik büyütmede 10 alan incelendi. Hasarın şiddetine göre; 0 (değişiklik yok), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (ağır) olarak skorlandı. Maksimum hasar skoru interstisyel değişiklikler için 9, tubuler değişiklikler için 12 ve glomerüler değişiklikler için 15 idi. Preparatlar ışık mikroskobu ve görüntü analiz sistemi ile incelenerek skorlandı ve fotoğrafları çekildi [223].

Çizelge 3.2. Hematoksilen & Eozin boyama protokolü.

% 100 Alkol	2 dakika
% 96 Alkol	2 dakika
% 80 Alkol	2 dakika
% 80 Alkol	2 dakika
Distile suda yıkama	3 dakika
Hematoksilen	3 dakika
Akar su	5 dakika
Akarsuda yıkama	Daldır çıkar
Amonyaklı su	Doku mor renk alana kadar
Akar su	Daldır çıkar
Distile suda yıkama	5 dakika
Eozin	1,5 dakika
% 80 Alkol yıkama	3 dakika + 3 dakika
% 96 Alkol yıkama	3 dakika + 3 dakika
% 96 Alkol yıkama	3 dakika + 3 dakika
Ksilol	5 dakika + 5 dakika + 5 dakika
Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı	

### 3.2.12. İstatistik Analizler

Tüm istatistiksel analizler SPSS (SPSS for Windows version 14.0) istatistiksel yazılım programı ile yapıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma (SS) olarak ifade edildi. Bu özellikler bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal Wallis testi yapıldı. Farklı grupları belirlemede Dunet çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi %5 olarak alındı.

## BÖLÜM 4

### BULGULAR

#### 4.1. BÖBREK DOKUSU BİYOKİMYASAL BULGULARI

##### 4.1.1. Böbrek Dokusu MDA ve GSH Değerleri

MTX uygulaması böbrek dokusu MDA düzeylerinde kontrol ve EA gruplarına göre artışa ( $p<0.05$ ) neden olurken, EA ile MTX birlikte uygulaması MDA düzeylerinde MTX grubuna göre düşüğe neden oldu ( $p<0.05$ ). MTX uygulaması böbrek dokusu GSH seviyelerinde kontrol ve EA gruplarına göre anlamlı düşüğe sebep olurken ( $p<0.05$ ), EA ile tedavi edilmesi MTX grubuna göre anlamlı artışlar ( $p<0.05$ ) ortaya konuldu. Böbrek dokusu ortalama MDA değerleri (nmol/mg protein) Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1’de sunuldu.

Çizelge 4.1. Böbrek dokusunda MDA, GSH değerleri

Gruplar	MDA (nmol/mg protein)	GSH ( $\mu$ mol/ mg protein)
Kontrol	1,08 $\pm$ 0,20	117,48 $\pm$ 12,58
EA	1,05 $\pm$ 0,19	140,91 $\pm$ 8,61
MTX	2,58 $\pm$ 0,48 <sup>a,b</sup>	65,23 $\pm$ 7,92 <sup>a,b</sup>
MTX+EA	2,06 $\pm$ 0,58 <sup>c,d</sup>	80,03 $\pm$ 8,31 <sup>c,d</sup>

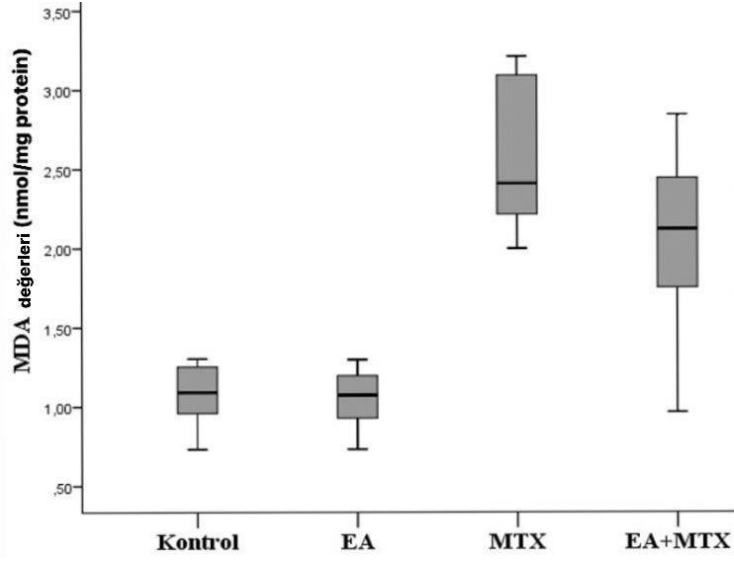
Veriler, aritmetik ortalama  $\pm$ SS olarak verildi.

a. MTX ile kontrol

b. MTX ile EA.

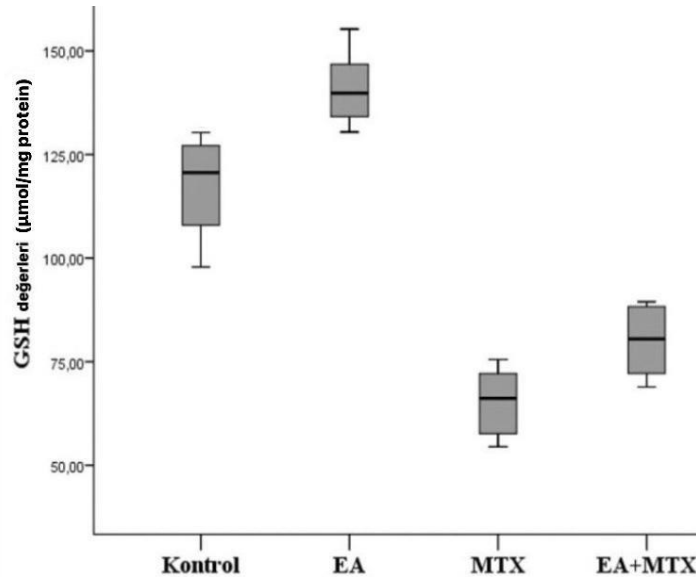
c. MTX+EA ile kontrol ve EA

d. MTX+EA ile MTX



Şekil 4.1. Gruplar arasında MDA (nmol/mg protein) değerleri.

MTX uygulaması böbrek dokusu GSH değerlerinde kontrol ve EA gruplarına göre anlamlı düşüşe sebep olurken ( $p < 0.05$ ), EA ile tedavi edilmesi MTX grubuna göre artışlar ( $p < 0.05$ ) tesbit edildi. Böbrek dokusu ortalama GSH değerleri (nmol/mg protein) Şekil 4.2 ve Çizelge 4.1’de sunuldu.



Şekil 4.2. Gruplar arasında GSH (µmol/mg protein) değerleri.

#### 4.1.2. Böbrek Dokusu TAS, TOS ve OSI Değerleri

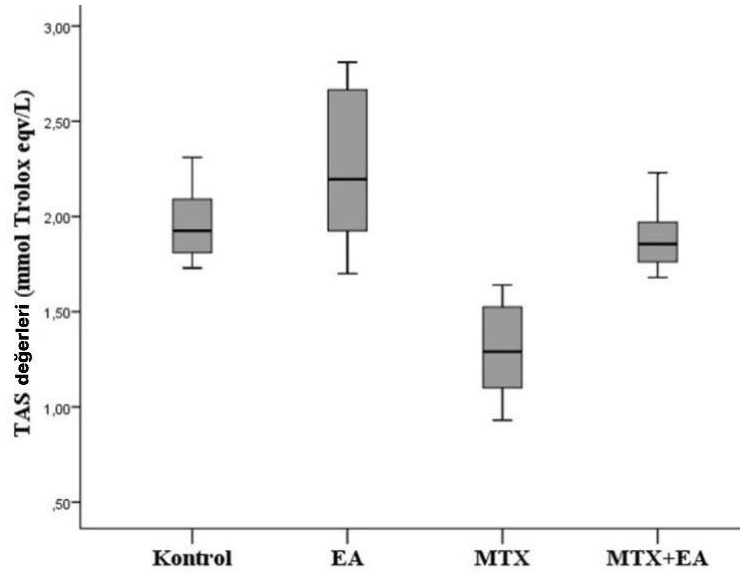
MTX uygulanması böbrek dokusu TAS değerlerinde kontrol ve EA gruplarına göre düşüşe ( $p<0.05$ ) neden olurken TOS ve OSİ değerlerinde ise ciddi artışlara ( $p<0.05$ ) neden oldu. EA ile MTX birlikte uygulandığında MTX grubuna göre TAS değerlerinde artış ( $p<0.05$ ) neden olurken TOS ve OSİ değerlerinde ise ciddi düşüşler gözlemlendi. Ortalama böbrek dokusu TAS ve TOS ve OSİ düzeyleri Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Çizelge 4.2’de sunuldu.

Çizelge 4.2. Böbrek dokusunda TAS, TOS ve OSİ değerleri

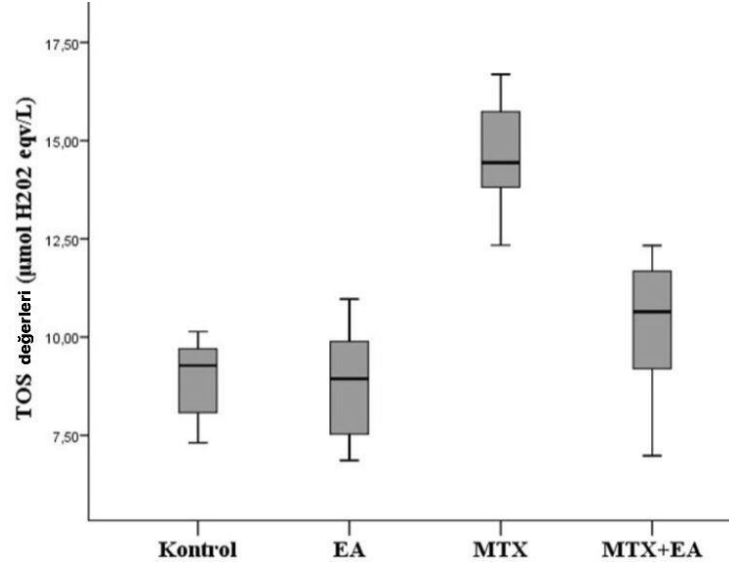
Gruplar	TAS (mmol Trolox equiv/L)	TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv/L)	OSİ (AU)
Kontrol	1,96 $\pm$ 0,21	9,26 $\pm$ 1,05	0,45 $\pm$ 0,05
EA	2,26 $\pm$ 0,42	8,94 $\pm$ 1,48	0,41 $\pm$ 0,09
MTX	1,30 $\pm$ 0,27 <sup>a,b</sup>	14,44 $\pm$ 1,44 <sup>a,b</sup>	1,09 $\pm$ 0,28 <sup>a,b</sup>
MTX+EA	1,89 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>	10,65 $\pm$ 1,80 <sup>c</sup>	0,54 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>

Veriler, aritmetik ortalama  $\pm$ SS olarak verildi.

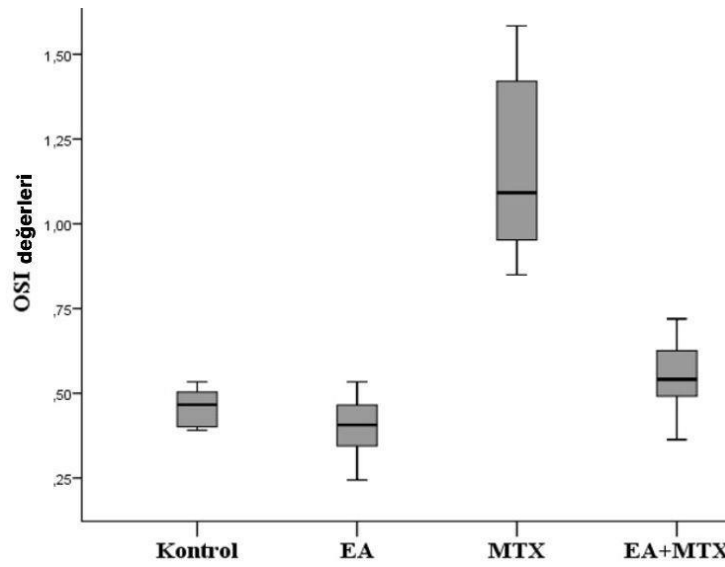
- a. MTX ile kontrol                      c. MTX+EA ile MTX  
b. MTX ile EA.



Şekil 4.3. Gruplar arasında TAS (mmol Trolox eqv/L) değerleri.



Şekil 4.4. Gruplar arasında TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  eqv/L) değerleri.



Şekil 4.5. Gruplar arasında OSI (AU) değerleri.

## 4.2. SERUMDA BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI

### 4.2.1. Serum Üre, Ürik Asit, Kreatinin ve Toplam Protein

MTX uygulaması ile böbrek hasarına bağlı olarak serum üre, ürik asit, kreatinin ve toplam protein değerlerinde kontrol grubuna göre ciddi artışlara ( $p < 0.05$ ) neden oldu. Ancak MTX ile birlikte EA uygulaması yapıldığında MTX gruplarına göre anlamlı

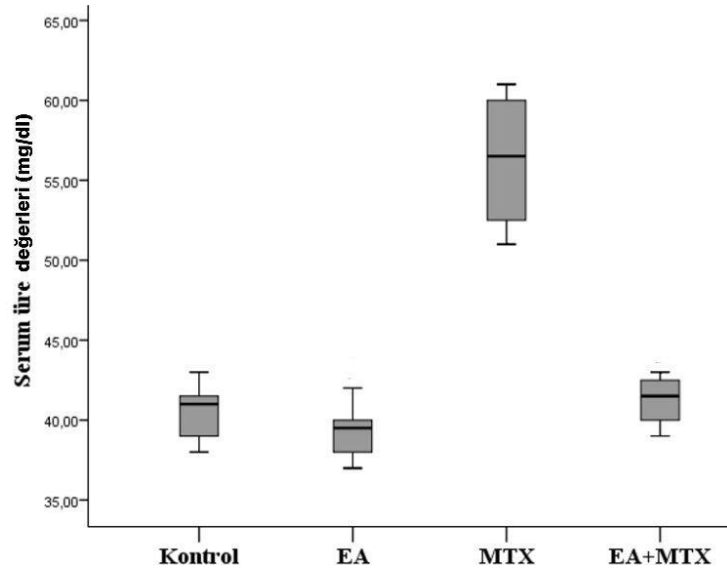
düşüşler ( $p<0.05$ ) tespit edildi. İlave olarak EA tedavisi üre, ürik asit ve kreatinin seviyelerinde kontrol grubu değerlerine yakın bir düşüşe neden oldu. Ortalama serum üre, ürik asit ve kreatinin değerleri Şekil 4.6 Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Çizelge 4.3 'de sunuldu.

Çizelge 4.3. Serum üre, ürik asit, kreatinin ve toplam protein değerleri.

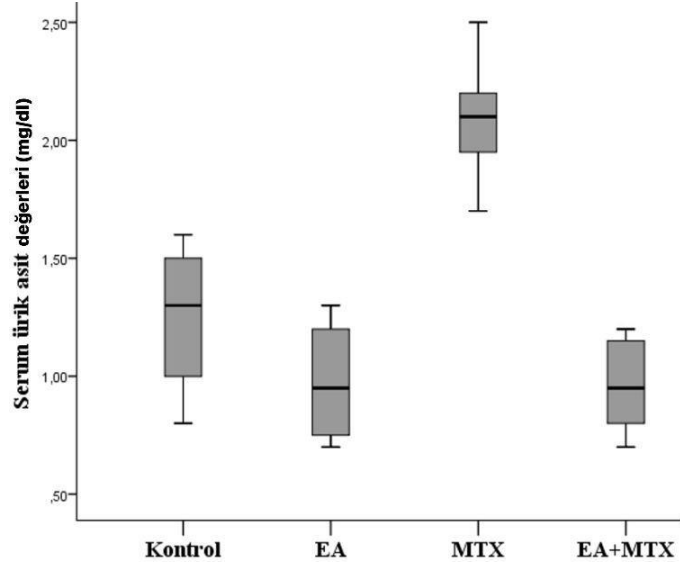
Gruplar	Üre (mg/dl)	Ürik asit (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	Toplam protein (g/dl)
<b>Kontrol</b>	41,50±1,70	1,3±0,29	0,11±0,02	3,98±0,41
<b>EA</b>	39,5±1,58	0,95±0,23	0,13± 0,03	3,93±0,49
<b>MTX</b>	56,5±3,99 <sup>a,b</sup>	2,1±0,23 <sup>a,b</sup>	0,21±0,03 <sup>a,b</sup>	5,04±0,38 <sup>a,b</sup>
<b>MTX+EA</b>	41,5±1,48 <sup>d</sup>	0,95±0,19 <sup>d</sup>	0,13±0,03 <sup>d</sup>	4,69±0,63 <sup>c,d</sup>

Veriler, aritmetik ortalama ±SS olarak verildi.

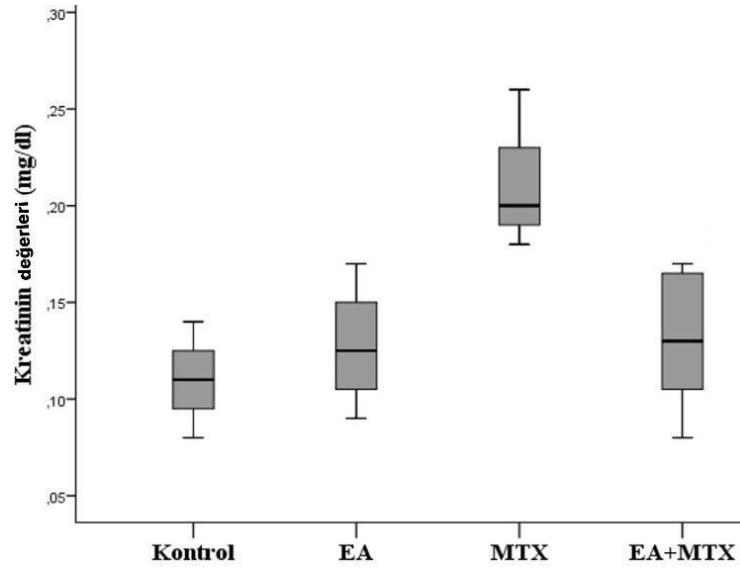
- a. MTX ile kontrol                      c. MTX+EA ile kontrol ve EA  
b. MTX ile EA.                              d. MTX+EA ile MTX



Şekil 4.6. Gruplar arasında serum üre (mg/dL) değerleri.

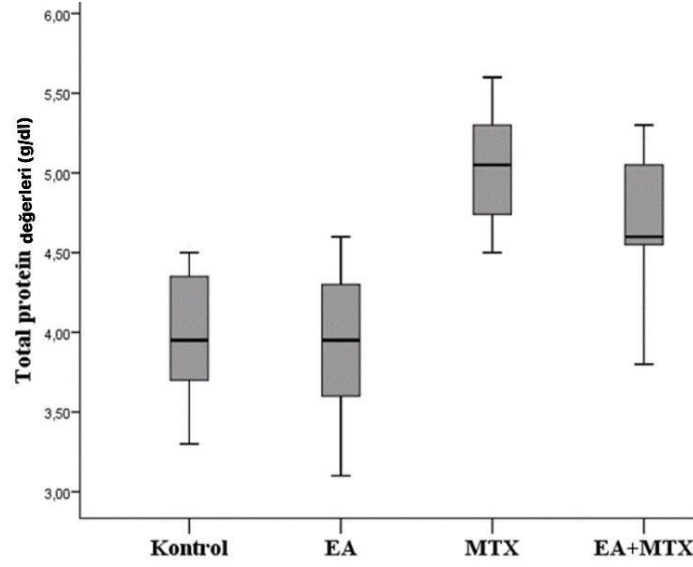


Şekil 4.7. Gruplar arasında serum ürik asit (mg/dL) değerleri.



Şekil 4.8. Gruplar arasında serum kreatinin (mg/dL) değerleri.





Şekil 4.9. Gruplar arasında serum toplam protein (g/dL) değerleri.

### 4.3. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Histopatolojik analizler sonucunda EA ve kontrol grubuna ait böbrek dokusunda normal histolojik bulgular saptandı (Şekil 4.10; a, b). MTX ve MTX+EA gruplarında ise interstisyel fibrozis, tubuler dejenerasyon, vasküler konjesyon, interstisyel nefrit, tubül lümeninde hiyalin silindir, tübüler bazal membran distorsiyonu, glomerular yangı, atrofi, tübüler nekroz, bazal membran bozukluğu ve hücre artışı gibi patolojik bulgulara rastlandı (Şekil 4.10; c, d). En yüksek hasar skoru  $5.62 \pm 0.56$  oranı ile MTX grubunda saptandı (Çizelge 4.4). MTX grubu ile kontrol ve ellagik asid grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı bir artışın olduğu bulundu ( $p < 0.05$ ). MTX grubu ile MTX+EA grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı bir azalışın meydana geldiği bulundu ( $p < 0.05$ ).

Çizelge 4.4. Histopatolojik hasar skoru tablosu

Gruplar	İnterstisyel Hasar	Tubuler Hasar	Glomerüler Hasar
Kontrol	$1.62 \pm 0.37$	$1.00 \pm 0.18$	$0.25 \pm 0.16$
EA	$2.12 \pm 0.35$	$1.37 \pm 0.32$	$0.37 \pm 0.26$
MTX	$5.37 \pm 0.26^{a,b}$	$5.62 \pm 0.56^{a,b}$	$2.50 \pm 0.26^{a,b}$
MTX + EA	$3.75 \pm 0.25^{c,d}$	$3.37 \pm 0.46^{c,d}$	$1.12 \pm 0.54^{c,d}$

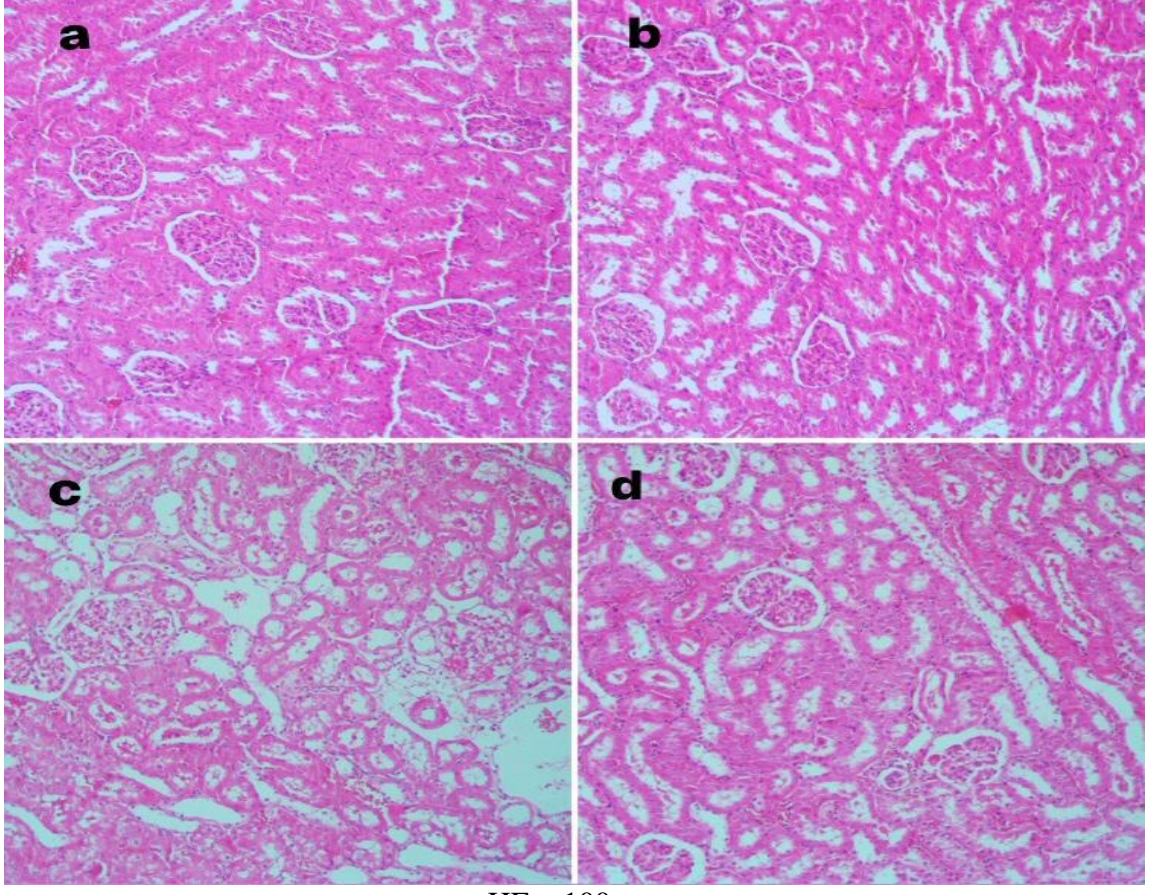
Veriler, aritmetik ortalama  $\pm$ SS olarak verildi.

a. MTX ile kontrol

b. MTX ile EA.

c. MTX+EA ile kontrol ve EA

d. MTX+EA ile MTX



HE, x100.

Şekil 4.10. Böbrek dokusu histopatolojisi fotomikrografisi. a) Kontrol, b) EA, c) MTX, d) MTX+EA grubu

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA

Kanser dünyada ve ülkemizde başlıca sağlık sorunlarından birisi olarak tanımlanmaktadır. Vaka sayısı, seyri ve yüksek ölüm oranları ile beraber bir yandan da mevcut tedavi yöntemlerinin olumsuz etkileri ve bunların ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmalar da yapılmaktadır.

Kanser hastalığı tedavisinde vazgeçilmez antitümöral ilaçlardan biri olan metotroksat psöriyat artrit, romatoid artrit (RA) lösemiler, neplazmalar, otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [1, 44, 224]. MTX özellikle hücre döngüsünün “S” evresinde kuvvetli etki gösterip DNA replikasyonunda anahtar enzim olan dihidrofolat redüktaz’a bağlanarak pürin ve pirimidin yapımı için gerekli tetrahidrofolat sentezini inhibe eder [108]. MTX hücre içi azaltılmış folat düzeylerini tüketen bir antifolat ilaçtır. Hücre içi azaltılmış folat düzeylerinin bu tükenmesi, hücre proliferasyonun hızlı olduğu kıl foliküllerinde, kemik iliği, oral mukoza mide-bağırsak yolu gibi organlarda çeşitli toksik etkiler baş göstermektedir [53, 54, 225].

MTX’ in hem tedavideki etkinliği hem de toksik etkileri hastadan hastaya değişkenlik gösterdiği için diğer antineoplastik ilaçlardan farklı olarak MTX geniş bir doz aralığında uygulanmaktadır [79]. Akut lenfoblastik löseminin sürekli tedavisinde ve psöriyat artrit, RA gibi hastalıkların tedavisinde haftada 20 mg/m<sup>2</sup> dozda uygulanırken, onkolojik hastalıklarda 1000-33000 mg/m<sup>2</sup> gibi yüksek dozlarda kullanılmaktadır [226]. Bu özelliğinden dolayı çalışmaların birçoğunda yararlı etkisinin toksik etkisini geçmemesi için kısa süre ve etkin dozda kullanılmıştır. Çalışmada; MTX dozu daha önceden doku toksisite çalışmalarında belirlendiği gibi tek doz olarak ve 20 mg/kg i.p olarak uygulandı [227].

Metotreksat (MTX) birincil atılım yeri (%60-90) renal doku olması nedeniyle böbreklerde yan etkileri ve toksikasyonun büyük bölümü meydana gelmektedir. Ayrıca MTX kalıntıları glomerülerden filtre edilmekte ve tübüllerden aktif sekresyon gerçekleştikten sonra distal tübülden aktif reabsorpsiyon işlevi gerçekleşmektedir. Böylece MTX kalıntıları renal tübüllerde çökerek tübüllerin doğrudan epitel hücrelerine toksik etki göstermekte ve tübüllerde kristalleşen MTX kalıntıları tübül içi obstruksiyona yol açarak renal harabiyete neden olmaktadır [2].

Fitokimyasalların son yıllarda hastalıklardan korunma ve tedavi üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı tıpta kullanımları gittikçe artmaktadır. Fitokimyasallar, genel olarak bitkilerden elde edilen, tedavide tamamlayıcı olarak kullanılan ucuz ve doğal yapılarından dolayı güvenli olmaları açısından tercih edilmektedir. Birçok çalışmada fitokimyasalların antioksidan, antiapoptotik, nefrotoksisite, hepatotoksisite, kardiyotoksisite gibi özellikleri olduğu göstermiştir.

Ellagik asit (EA) polifenol olarak sınıflandırılan doğal ve güçlü bir antioksidandır. EA'nın yapısının iki çift hidroksil gruba sahip olması güçlü antioksidan potansiyalinin ana sebebidir [160]. EA'nın bir linoleik asit emülsiyonunun lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini (%71,2) göstermişlerdir. Ayrıca EA'nın hidroksil, hidrojen peroksit ve süperoksit radikallerine karşı kuvvetli antioksidan etkileri nedeniyle farklı terapötik uygulamalarda bir antioksidan olarak kullanılabilirdiği bilinmektedir [181].

Bütün bu kanıtlardan yola çıkarak, ellagik asidin nefrotoksisite etkilerini incelemek için böbrek dokusu ve serumundaki biyokimyasal parametreler ve oksidatif stres belirteçlerini ayrıca histopatolojik incelemeler yapıldı.

Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA, serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stresin bir göstergesidir. MTX, ROS'un artmasına sebep olarak mitokondrinin fonksiyon bozukluğuna ve apoptozise neden olur (228, 229), MTX'in hepatositlerde uzun vadede birikimi sonucu hepatosit nekrozuna sebep olur. Bu çalışmada Çizelge 4.1. incelendiğinde MTX uygulamasını takiben MDA seviyelerini artırarak böbrek dokusunun lipid peroksidasyon seviyelerinde yükselmeler

belirlendi. Ek olarak, EA MTX ile birlikte uygulanması, sıçan böbrek dokusu lipid peroksidasyonunda önemli bir iyileşme ile sonuçlandı. ROS oluşumunun neden olduğu MTX kaynaklı böbrek doku hasarına karşı böbrek dokusu antioksidan savunma sistemini güçlendirerek böbreklerin korunmasında, özellikle MTX kaynaklı böbrek hasarına karşı koruyuculukta önemli bir rol oynamaktadır. Jahovic ve ark, yaptıkları deneysel çalışmada MTX uygulanan sıçanların kan, böbrek, karaciğer ve ince barsak dokularında MDA üretiminin arttığını ve GSH düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir [12].

MTX, hücre içinde sitozolik nikotinamid adenin fosfat dehidrojenaz (NADPH)'nın azalmasına sebep olur. Bunun sonucu olarak NADPDH ve NADP bağımlı malik enzim bloke edilir. NADPDH, glutatyon reduktaz (GSSG-R) enzimi için de gerekmektedir. Bu enzim sitozolik antioksidan olan indirgenmiş GSH'nin seviyesini korumaktadır. Böylece, MTX kullanımına bağlı olarak GSH seviyesinin ve hücreleri ROS'lara karşı koruyan antioksidan savunma mekanizmalarının etkinliğinin azalması ile sonuçlanmaktadır [230]. Bu çalışmada Çizelge 4.1. incelendiğinde MTX uygulaması GSH seviyeleri düşmesine sebep olmuştur. Yapılan başka bir çalışmada [231] 7 gün boyunca 20 mg/kg intraperitoneal MTX enjeksiyonu yapılan sıçanların böbrek dokusu GSH, nitrik oksit, katalaz düzeylerinde azalış; MDA, ADA düzeylerinde artış tespit edilmiştir. Ayrıca serum üre, kreatinin seviyelerinde artış gösterilmiştir.

59 yaşında bir kadın hastanın uzun süreli düşük doz MTX kullanımına bağlı ilerleyen böbrek fonksiyon bozukluğu olduğu bildirilmiştir. Hastanın böbrek biyopsisinde vasküler skleroz ve glomerüler fibroz saptanmıştır [232]. Çalışmamızda histopatolojik inceleme sonucunda tubuler dejenerasyon, interstisyel fibrozis, vasküler konjesyon, tubül lümeninde hiyalin silindir, glomerular yangı, atrofi, interstisyel nefrit, tübüler nekroz bazal membran distorsiyonu, bazal membran bozukluğu gibi patolojik bulgulara en çok MTX grubunda tespit edildi. Deneysel çalışmamızdaki MTX kaynaklı böbrek dokusu hasarları yapılan çalışmalarda elde edilen bulgularla uyum sağlamaktadır.

Lee ve ark'nın [233] toplam 23 ay süren çalışmasında böbrek fonksiyon bozukluğu olan 120 hastanın (66 yeni geliştirilmiş, 54 önceden geliştirilmiş) dahil edildiği romatoid artrit ve MTX tedavisi kullanılan bir klinik çalışmada glomerüler filtrasyon hızı baz alınarak böbrek fonksiyon değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışmada iki grup hastada %30 toksisite bildirilmiştir. %5,8 oran ile renal toksisite saptanmış ve iki grup hasta arasında toksisite oranında çok farklılık gözlemlenmemiştir (66 hastada 23, 54 hastada 12).

Organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında sürekli olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot seviyeleri (RNS) meydana gelmektedir. Dengeli bir şekil vücudumuzda bulunan savunma mekanizmaları (antioksidan) bu oksidanları parçalayarak azaltmaktadır. Vücudumuzda oksidan ve antioksidanlar denge içindedir. Çizelge 4.2. incelendiğinde MTX verilen grupta EA ve kontrol grubuna göre total antioksidanların azaldığı ve oksidanların ise arttığı görülmektedir. MTX ile birlikte EA verildiğinde ise MTX verilen gruba göre TAS'da önemli derecede artma, TOS'da ise önemli derecede azalma görülmektedir. Bu sonuçlar bize MTX'in vücuttaki oksidatif stresi önemli derecede arttırdığını, EA'in ise MTX kaynaklı oksidatif stresi önemli derece azaltarak kanser tedavisinde kullanılan bu ajanın vücuttaki yan etkilerini ve nefrotoksisteyi azaltmada yardımcı bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir. İnan ve ark [234] yaptıkları çalışmada; sıçanlarda EA'in uygulaması ile piridinin neden olduğu oksidatif hasarı iyileştirdiğini; TOS ve OSI değerlerini düşürdüğünü, TAS değerini ise yükselttiğini tespit etmişlerdir.

Ellagik asit, NF-kB (nükleer faktör-kappa B), aktivatör protein (AP1) ve c-fos gibi transkripsiyon faktörlerini uyararak antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını arttırmanın yanında, oksidoredüktaz gibi birçok antioksidan enzimin aktivitesini artırarak oksidatif stresi baskılamaktadır [235]. Ayrıca prokarsinojenler olarak da bilinen sitokrom-P450 ailesine etki ederek ve mitokondriyal aktiviteyi azaltarak reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşmasını inhibe etmektedir [236]. Bu veriler, antioksidan ajanların gen ekspresyonunu düzenleyerek apoptoz oluşumunu önleyebildiğini gösteren bulgularla desteklenmektedir. Örneğin, ellagik asidin cisplatin verilen sıçanların böbreğinde antioksidan enzimleri aktive ederek

nefrotoksisiteyi düzelttiği gösterilmiştir [237]. Ayrıca karaciğerde antioksidan sistem aracılığıyla tetra-klorür indüklü oluşan hepatotoksisiteyi düzelttiği rapor edilmiştir [238]. Pulmoner disfonksiyonlara sebep olan siklofosfamidinin sıçan akciğerinde oksidan hasara yol açtığı EA verilmesinin ise bu hasarı düzelttiği bildirilmiştir [239]. Ellagik asidin kalpte GSH, CAT, SOD aktivitesini artırdığı; ROS, ksantin oksidaz (KO) ve tiyobarbitürik asit reaktif türleri (TBARS) seviyesini ise azaldığı da gösterilmiştir [240, 241].

EA'nın, DNA'da oksidatif hasarın büyük bir kısmını bloke ederek kanser ilerlemesini büyük ölçüde durdurduğu yönündeki bilgiler gün geçtikçe artmaktadır [242, 243]. EA karsinogenlerin DNA'ya direkt bağlanmasını bloke ederek antimutajenik etki sağlamaktadır [244]. Ayrıca ksenobiyotik metabolizmasının enzimlerini engellemektedir [245]. Bu veriler, kanser oluşumunu önleyebildiğini gösteren bulgularla desteklenmektedir. Örneğin, Pb toksisitesine maruz kalan bıldırcınlarda EA takviyesi karaciğer dokusunda kaspaz-3 ve -9 seviyelerini azaltarak Pb kaynaklı apoptozu hafiflettiği bıldırcınlarda yumurta verimi performansını artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca karaciğer ve böbrek dokularında MDA seviyesini düşürdüğü ve GSH, GSH-Px, CAT aktivitesini artırdığını gösterilmiştir [246]. Ellagik asidin uygulanması karbon tetraklorüre karşı hepatoprotektif bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [247]. Sıçan kemik iliğinde kromozomal aberasyonları alfa-tokoferol kadar düşürdüğü [248], lenfositlerinde de radyasyon indüklü DNA zinciri kırılmalarını tamir ettiği bildirilmiştir [249]. Ellagik asidin, CP indüklü oluşan hepatotoksisiteyi düzelttiği rapor edilmiştir [250]. Ayrıca, EA'nın kansere karşı koruyucu etkisinin quersetinden ve vitamin E den daha güçlü olduğu da ortaya koymuştur [251, 252].

Warpe ve ark, ellagik asidin DOX ile indüklenen kardiyotoksisitede koruyucu aktivitesini tespit ettiği çalışmasında EKG ve hemodinamik parametreler incelenmiş, EA'in antioksidan etkisi ile histopatolojik incelemede ellagik asit ile muamele edilmiş doksorubisin ile indüklenen grup sıçan kalbinin mikroskopik kesitinde, daha az inflamatuvar hücre infiltrasyonu, nekroz ve kalp kası lifinde hiperemi saptanmıştır. Bizim yaptığımız MTX uygulanan grupta böbrek dokusunda önemli derecede glomeruler, tubuler ve interstisyel hasar tesbit edildi. MTX ile oluşan bu yan etkilerin

EA verilmesi ile önemli derecede azaltıldığı ortaya konuldu. Çalışma histopatolojik sonuçları bu çalışmalarla uyum içindedir [253].



## BÖLÜM 6

### SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Sıçanlara tek doz 20 mg/kg MTX'in intraperitoneal uygulanması, MTX uygulanmayan gruplarla kıyasla ortalama serum üre, ürik asit, kreatinin ve toplam protein anlamlı olarak azaltmıştır. Böbrek dokusu MDA, TOS ve OSİ düzeylerinin arttığı ve ayrıca GSH ve TAS düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir.
2. MTX+EA grubuna 75 mg/kg EA'in oral yoldan verilmesi MTX'in olumsuz etkilerine karşı deneme hayvanlarını korumuştur. MTX+EA grubunda; MTX grubuna göre serum üre, ürik asit, kreatinin ve toplam protein anlamlı ölçüde azalmış, EA verilmesi sonrası serum üre, ürik asit, kreatinin düzeyleri, kontrol grubu seviyesine kadar inmiştir. MTX+EA grubunda, MTX grubuna göre; böbrek dokusu MDA, TOS ve OSİ düzeyleri anlamlı derecede azaldığı ve ayrıca (GSH ve TAS) anlamlı derecede arttığını gösterilmiştir.
3. Histopatolojik bulgularda MTX grubuna ait böbrek dokusunda yapısal bozukluklar gösterilmiştir. Bu histopatolojik değişiklikler MTX+EA grubunda EA uygulaması ile MTX grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı ortaya konulmuştur.
4. Kemoterapi tedavisinde MTX kullanımına bağlı böbreklerde oluşabilecek zararlı etkileri azaltmak için ellagik asidin kullanımının faydalı olacağını düşünüyoruz.

## KAYNAKLAR

1. Perez A, Woods A, Grattan CE., “Methotrexate: A useful steroid-sparing agent in recalcitrant chronic urticaria”, *Br J Dermatol*, 162(1): 191-4 (2010).
2. Bleyer WA, Poplack DG., “Prophylaxis and treatment of leukemia in the central nervous system and other sanctuaries”, *Semin Oncol*, 12: 131–148 (1985)
3. Yaşar ZS, Gürlü G, Çakırbay H., “Methotrexate”. *Türkiye Klinikleri J PM&R-Special Topics*, 7(4): 25-30 (2014).
4. Saraç G, Koca T, Demirdağ H., “Treatment options in management of psoriasis”, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24(3): 339-347 (2015).
5. Panetta JC, Sparreboom A, Pui CH, Relling MV, Evans WE., “Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells”, *PloS Comput Biol*, 2: 6(12) (2010).
6. Salim S, “Oxidative stress and the central nervous system”, *J Pharmacol Exp Ther*, 360(1):201–205,2017.
7. Conaghan PG, Brooks P., “Disease-modifying antirheumatic drugs, including methotrexate, gold, sulfasalazine, antimalarials and D-penicillamine”, *Curr Opin Rheumatol*, 8(3): 176–82 (1996).
8. Van Outryve S, Schrijvers D, van den Brande J, Wilmes P, Bogers J, vanMarck E, Vermorken JB., “Methotrexate-associated liver toxicity in a patient with breast cancer: Case report and literature review”, *Neth J Med*, 60(5): 216- 22 (2002).
9. Koyama S, Sato E, Takamizawa A, Tsukadaira A, Haniuda M, et al., “Methotrexate stimulates lung epithelial cells to release inflammatory cell chemotactic activities”, *Exp Lung Res*, 29: 91-111 (2003).
10. Turesson C, Matteson EL., “Genetics of rheumatoid arthritis”. *Mayo Clin Proc.*, 81(1):94-101 (2006).
11. Pesce C, Mansi C, Bogliolo G, Tobia F, Pannacciulli I., “Pulmonary toxicity in mice after high-dose methotrexate administration with and without leucovorin rescue”, *Eur J Cancer Clin Oncol*, 21(7):875-80 (1985).
12. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yeğen BC, Sener G., “Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats”, *J Pineal Res*, 34(4): 282-7 (2003).

13. Abraham P, Kolli VK, Rabi S., “Melatonin attenuates methotrexate-induced oxidative stress and renal damage in rats”, *Cell Biochem Funct*, 28(5): 426-33 (2010).
14. Babiak, RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB., “Methotrexate: Pentosecycle and oxidative stress”, *Cell Biochem Funct*, 16(4): 283–293 (1998).
15. Kolli VK, Abraham P, Isaac B, Selvakumar D. “Neutrophil infiltration and oxidative stress may play a critical role in methotrexate-induced renal damage”, *Chemotherapy*, 55(2): 83-90 (2009).
16. Caetano NN, Campello AP, Carnieri EG, Kluppel ML, Oliveira MB. “Effect of methotrexate (MTX) on NAD(P)+ dehydrogenases of HeLacells: Malicenzyme, 2-oxoglutarate and isocitrate dehydrogenases”, *Cell Biochemistry and Function*, 15(4): 259-64 (1997).
17. Tedeschi PM, Lin H, Gounder M, et al., “Suppression of cytosolic NADPH pool by thionicotinamide increases oxidative stress and synergizes with chemotherapy”, *Mol Pharmacol*, 88:720–727 (2015).
18. Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, et al., “Mechanisms of protection of catalase by NADPH kinetics and stoichiometry”, *J Biol Chem*, 274:13908–13914 (1999).
19. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. “Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that over expresses HER2”, *N Engl J Med*, 344(11): 783–92 (2001).
20. Surh YJ, Na HK, Lee SS., “Transcription factors and mitogen-activated protein kinases as molecular targets for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals”, *Biofactors*, 21(1-4):103–8 (2004).
21. Gonzalez de Mejia E, Song YS, Ramirez-Mares MV, Kobayashi H., “Effect of yerbamate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation”, *J Agric Food Chem*, 53(6): 1966–73 (2005).
22. Wiseman H., “The bioavailability of non-nutrient plant factors: Dietary flavonoids and phyto-oestrogens”, *Proc Nutr Soc*, 58(1): 139– 46, (1999).
23. Sreelatha S, Padma PR., “Antioxidant activity and total phenolic content of moringa oleifera leaves in two stages of maturity”, *Plant Foods Hum Nutr*, 64(4): 303–11 (2009).
24. Doughari JH, Human IS, Benadé AJ, Ndakidemi PA., “Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: Possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria”, *Planta medica*, 3(11): 839–48 (2009).

25. Liu RH., “Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet”, *Adv Nutr*, 4(3): 384–92 (2013).
26. Tamimi RM, Hankinson SE, Campos H, Spiegelman D, Zhang S, Colditz GA, et al., “Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and risk of breast cancer”, *Am J Epidemiol*, 161(2): 153–60 (2005).
27. Pari L, Sivasankari R., “Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats”, *Fundam Clin Pharmacol*, 22: 395–401 (2008).
28. Ambrose SS, Solairaj P, Subramoniam A., “Effectiveness of ellagic acid on isoniazid-rifampicin induced liver damage in rats”, *J Pharmacol Pharmacother*, 4: 60–62 (2013).
29. Pandey KB, Rizvi SI., “Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease”, *Oxid Med Cell Longev*, 2: 270–278 (2009).
30. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H., “Free radical studies of ellagic acid, A natural phenolic antioxidant”, *J Agric Food Chem*, 50(7): 2200–2206 (2002).
31. Han DH, Lee MJ, Kim J., “Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid”, *Anticancer Res* 26(5A): 3601–3606 (2006).
32. Lee W-J, Ou H-C, Hsu W-C, et al., “Ellagic acid inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, ROS generation, and inflammation in human endothelial cells”, *J Vasc Surg*, 52: 1290–1300 (2010).
33. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D., “Global cancer statistics”, *CA Cancer J Clin*, 61(2):69–90 (2011).
34. Zhang J., “Can We Discover “Really safe and effective” anticancer drugs?”, *Adv Pharmaco epidemiol Drug Safety*, 2012.
35. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer JL, Bufer PA, Omenn GS., “Current perspective on the global and united states cancer burden attributable to lifestyle and environmental risk factors”, *Annu Rev Public Health*, 34:97–117 (2013).
36. Chen W, Zheng R, Zhang S, Zhao P, Zeng H, Zou X, et. al., “Annual report on status of cancer in China, 2010”, *Chin J Cancer Res*, 26(1):48–58 (2014).
37. Gately, D., Howell, S., “Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review”, *Br J Cancer*, 67, 1171–1176 (1993).
38. Kayaalp O., “Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji”, *Hacettepe-Taş Yayıncılık*, 11. Baskı. Ankara, 1:317-343 (2005).
39. Thiersch, I.B., “Bone-marrow changes in man after treatment with aminopterin, amethopterin, and aminoanfol. With special reference to megaloblastosis and tumor remission”, *Cancer*, 2: 877–883 (1949).

40. Kayaalp O., “Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji”, *Pelikan Yayıncılık, Ankara*, 12 ed: 328-618 (2009).
41. Seçgin Ş., “Sıçanlarda metotreksat kaynaklı böbrek toksisitesi üzerine morinin koruyucu etkisi”, *Karabük Üniv., Lisansüstü Eğitim., Tıbbi Biyokimya AD*, (2021).
42. Uzun, F., “Sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarına karşı ellajik asitin etkileri”, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon* (2018).
43. 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*, 19(9): 844-51 (2016).
44. Bedoui Y, Guillot X, Selambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC et al., “Methotrexate an old drug with new tricks”, *Int J Mol Sci*, 20(20) (2019).
45. Çınar İ, Süleyman H., “Tiyamin pirofosfatın sıçanlarda metotreksatla oluşturulan gastrotoksisite üzerindeki koruyucu etkisinin biyokimyasal olarak araştırılması”, *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum* (2013).
46. Uzar, E., “Metotreksat uygulanan ratların siyatik sinir ve medulla spinalisinde oksidan / antioksidanların durumu: Kafeik asit fenetil ester’in antioksidan koruyucu etkisi”, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı* (2006).
47. Padmanabhan, S., Tripathi, D.N., Vikram, A., Ramarao, P., Jena, G.B., “Methotrexateinduced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: Intervention of folic and folinic acid”, *Mutation Research*, 673: 43–52, 2009.
48. Atal S., “Erişkin erkek sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarında kurkuminin etkisi”, *Eskişehir Osmangazi Üniv. Sağlık Bil. Enst. Histoloji ve Embriyoloji AD*, (2014).
49. Aşçı H., “Metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında misoprostolün koruyucu etkisi”, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi* (2010).
50. Aithal GP., “Hepatotoxicity related to methotrexate. Drug-induced liver disease”, *Elsevier*, 593-604 (2013).
51. Cronstein BN., “Low-dose methotrexate: A mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis”, *Pharmacol Rev*, 57(2): 163-7 (2005).
52. 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*, 26(3): 187-95 (2005).

53. Yukioka K, Wakitani S, Yukioka M et al., “Polyamine levels in synovial tissues and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis”, *J Rheumatol*, 19(5):689-92 (1992).
54. Chan ESL, Cronstein BN., “Mechanisms of action of methotrexate”, *Bull Hosp JtDis*, 71 (Suppl 1): S5-8 (2013).
55. Bostrom BC, Erdmann GR, Kamen BA., “Systemic methotrexate exposure is greater after intrathecal than after oral administration”, *J. Pediatr. Hematol. Oncol*, 25(2): 114–117 (2003).
56. Bertram G, Katzung., “Basic and clinical pharmacology”, *The Mc GrawHill Companies*, 9. Edition, Singapore, 898-931 (2004).
57. Kao, TT, Lee GH, Fu CC, Chen BH, Chen LT, Fu TF., “Methotrexate-induced decrease in embryonic 5-methyl-tetrahydrofolate is irreversible with leucovorin supplementation”, *Zebrafish*, 10(3): 326 337 (2013).
58. Ryan S. Funk, Nasreen J. Talib, Kanecia O. Zimmerman, Leonvan Haandel, Mara L. Becker., “Altered folate homeostasis in children with down syndrome: A potential basis for enhanced methotrexate toxicity”, *The Journal of Pediatrics*, 221:235-239 (2020).
59. 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*, 68: 1094–1099 (2008).
60. Bello AE, Perkins EL, Jay R, Efthimiou P., “Recommendations for optimizing methotrexate treatment for patients with rheumatoid arthritis”, *Open Access Rheumatol*, 9: 67–79 (2017).
61. Desmoulin SK, Hou Z, Gangjee A, Matherly LH., “The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer”, *Cancer Biol. Ther*, 13: 1355–1373 (2012).
62. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL., “Goodman and Gilman’s the pharmacological basis of therapeutics”, *McGraw- HillCompanies, New-York*, (2006).
63. Panetta JC, Wall A, Pui CH, Relling MV, Evans WE., “Methotrexate Intracellular Disposition in Acute Lymphoblastic Leukemia: A mathematical model of  $\gamma$ -glutamyl hydrolase activity”, *Clin. Cancer Res*, 8: 2423–2429 (2002).
64. Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD., “Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers”, *Nat. Rev. Rheumatol*, 12: 731 (2016).
65. Murakami T, Mori N., “Involvement of multiple transporters-mediated transports in mizoribine and methotrexate pharmacokinetics”, *Pharmaceuticals*, 5: 802–836 (2012).

66. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Frampton C, James J, Barclay ML., "Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment", *Arthritis Rheum*, 60: 2248–2256 (2009).
67. Grim J, Chládek J, Martínková J., "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases", *Clin. Pharm*, 42: 139–151 (2003).
68. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Caldwell J, Kremer J., "Pharmacogenetic and metabolite measurements are associated with clinical status in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: Results of a multicentred cross sectional observational study", *Ann. Rheum. Dis*, 64: 1180–1185 (2005).
69. Quemeneur L, Gerland LM, Flacher M, Ffrench M, Revillard JP, Genestier L. "Differential control of cellcycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides", *Journal of immunology*, 15;170(10): 4986-95 (2003).
70. Maeda T, Miyazono Y, Ito K, Hamada K, Sekine S, Horie T. "Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats", *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 65(6):1117-23 (2010).
71. Benedek TG., "Methotrexate: from its introduction to non-oncologic therapeutics to anti-TNF", *ClinExpRheumatol*, 28: S3-8 (2010).
72. Olsen EA., "The pharmacology of methotrexate", *J Am Acad Dermatol*, 25: 306-318 (1991).
73. Romão VC, Lima A, Bernardes M, Canhão H, Fonseca JE., "Three decades of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis: Can we predict toxicity?" *Immunol. Res*, 60: 289–310 (2014).
74. Braun J., "Optimal administration and dosage of methotrexate", *Clin. Exp. Rheumatol*, 28: 46–51 (2010).
75. Tian H, Cronstein BN., "Understanding the mechanisms of action of methotrexate: Implications for the treatment of rheumatoid arthritis", *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis*, 65: 168–173 (2007).
76. Bentur Y, Lurie Y., "Methotrexate. In: Brent J. et al. (eds)" *Critical Care Toxicology*. Springer, (2017).
77. Schmiegelow K., "Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: A review". *Br J Haematol*, 146(5): 489–503 (2009).
78. Walling J., "From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates", *Invest New Drugs*, 24(1): 37–77 (2006).

79. Fotoohi AK, Albertioni F., “Mechanisms of antifolate resistance and methotrexate efficacy in leukemia cells”, *Leuk Lymphoma*, 49(3): 410–26 (2008).
80. Afshar M, Birnbaum D, Golden C., “Review of dextromethorphan administration in 18 patients with subacute methotrexate central nervous system toxicity”, *Pediatr Neurol*, 50(6): 625–9 (2014).
81. Widemann BC, Adamson PC., “Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity”, *The Oncologist*, 11(6): 694–703 (2006).
82. Treon SP, Chabner BA., “Concepts in use of high-dose methotrexate therapy”, *Clin Chem*, 42(8 Pt 2): 1322–9 (1996).
83. Fotoohi K, Jansen G, Assaraf YG, et al., “Disparate mechanisms of antifolate resistance provoked by methotrexate and its metabolite 7-hydroxymethotrexate in leukemia cells: Implications for efficacy of methotrexate therapy”, *Blood*, 104(13): 4194–201 (2004).
84. Huang KC, Wenczak BA, Liu YK., “Renal tubular transport of methotrexate in the rhesus monkey and dog”, *Cancer Res*, 39(12): 4843–8 (1979).
85. Brugnoletti F, Morris EB, Laningham FH, Patay Z, Pauley JL, et al. “Recurrent intrathecal methotrexate induced neurotoxicity in an adolescent with acute lymphoblastic leukemia: Serial clinical and radiologic findings”, *Pediatr Blood Cancer*, 52: 293-295 (2009).
86. Perazella MA., “Renal vulnerability to drug toxicity”, *Clin J Am Soc Nephrol*, 4: 1275–1283 (2009).
87. Markowitz GS, Perazella MA., “Drug-induced renal failure: A focus on tubulointerstitial disease”, *Clin Chim Acta*, 351: 31–47 (2005).
88. Cummings BS, Schnellmann RG., “Pathophysiology of nephrotoxic cell injury. In: Diseases of the kidney and urogenital tract”, *Edited by Schrier RW, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkinson*, 1071–1136 (2001).
89. Ueland PM., “Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase”, *Pharmacol Revü*, 34: 223-53 (1982).
90. Weiss HD, Walker MD, Wiernik PH, “Neurotoxicity of commonly used antineoplastic agents (first of two parts)”, *N Engl J Med*, 291: 75-81 (1974).
91. Buchen S, Ngampolo D, Melton RG, et al., “Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure”, *Br J Cancer*, 92(3): 480–7 (2005).



92. Mir O, Ropert S, Babinet A, et al., "Hyper alkalinization without hyperhydration for the prevention of high-dose methotrexate acute nephrotoxicity in patients with osteosarcoma", *Cancer Chemother Pharmacol*, 66(6): 1059–63 (2010).
93. Campbell MA, Perrier DG, Dorr RT, Alberts DS, Finley PR., "Methotrexate: Bioavailability and pharmacokinetics", *Cancer Treat Rep*, 69(7–8): 833–8 (1985).
94. Frei E 3rd, Blum RH, Pitman SW, Kirkwood JM, Henderson IC, et al., "High dose methotrexate with leucovorin rescue. Rationale and spectrum of antitumor activity", *Am J Med*, 68: 370-376 (1980).
95. Widemann BC, Hetherington ML, Murphy RF, Balis FM, Adamson PC., "Carboxypeptidase-G2 rescue in a patient with high dose methotrexate-induced nephrotoxicity", *Cancer*, 76: 521-526 (1995).
96. Bertino JR., "Clinical pharmacology of methotrexate", *Med Pediatr Oncol*, 10: 401-411, (1982).
97. Hande KR, Balow JE, Drake JC, Rosenberg SA, Chabner BA., "Methotrexate and hemodialysis", *Ann Intern Med*, 87: 495-496 (1977).
98. Messmann R, Allegra C., "Antifolates. In: Chabner B, Longo D (Eds) Cancer Chemotherapy and Biotherapy", *Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins*, 139-84, (2001).
99. Phillips DC, Woollard KJ, Griffiths HR., "The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species", *Br. J. Pharm*, 138: 501–511 (2003).
100. Chalupsky K, Cai H., "Endothelial dihydrofolate reductase: Critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 9056–9061 (2005).
101. Crabtree MJ, Hale AB, Channon KM., "Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling in tetrahydrobiopterin deficiency", *Free Radic. Biol. Med*, 50: 1639–1646 (2011).
102. Spurlock CF, Gass HM, Bryant CJ, Wells BC, Olsen NJ, Aune TM., "Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes", *Rheumatology*, 54: 178–187 (2015).
103. Sung JY, Hong JH, Kang HS, Choi I, Lim SD, Lee JK, Seok JH, Lee JH, Hur GM., "Methotrexate suppresses the interleukin-6 induced generation of reactive oxygen species in the synoviocytes of rheumatoid arthritis", *Immunopharmacology*, 47: 35–44 (2000).
104. Sies H, "Oxidative stress: From basic research to clinical application", *Am J Med*, 91(3C):31–38 (1991).

105. Akkemik EH, Budak M, Ciftci., “Effects of some drugs on human erythrocyte 6phosphogluconate dehydrogenase: An in vitro study”, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*, 25 (4): 476–479 (2010).
106. Kohanski MA, DJ Dwyer B, Hayete CA, Lawrence JJ, Collins A., “Common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics”, *Cell*, 130 (5): 797–810 (2007).
107. Chabner BA, CJ Allegra, GA Curt, NJ Clendeninn, J Baram, S Koizumi, JC Drake, J Jolivet., “Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug?” *J. Clin. Invest.* 76 (3): 907–912 (1985).
108. Weigand ME, Frei N, Graf M, Wiessler., “Comparative analysis of methotrexate polyglutamates in lymphoblast preparations from bone marrow and blood and the contribution of residual red blood cells”, *J. Cancer Res. Clin. Oncol*, 126: (7) 407–411 (2000).
109. Gong SS, L Guerrini, C Basilico., “Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation”, *Mol. Cell. Biol*, 11 (12): 6059–6066 (1991).
110. Seven A, İnci F, Civelek S, Burçak G, İnci E, Korkut N., “Larenks kanserli olgularda lipid peroksidasyon ve antioksidan statü göstergelerinin dokuda incelenmesi”, *Türk ORL Arşivi*, 36: 33—36 (1998).
111. Rotoli BM, J Uggeri, V Dall'Asta, R Visigalli, A Barilli, R Gatti, G Orlandini, GC Gazzola, O Bussolati., “Inhibition of glutamine synthetase triggers apoptosis in asparaginase-resistant cells”, *Cell Physiol. Biochem*, 15 (6): 281–292 (2005).
112. Pisoschi AM, Pop A., “The role of antioxidants in the chemistry of oxidativestress: A review”, *Eur J Med Chem*, 97: 55–74 (2015).
113. Zeb A., “A reversed phase HPLC-DAD method for the determination of phenolic compounds in plant leaves”, *Anal Methods*, 7(18): 7753–7757 (2015).
114. Keelo H., “Pinealektomize edilmiş ve streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda nefropati üzerine krosinin koruyucu etkilerinin araştırılması”, *Karabük Üniv. Lisansüstü Eğitim Enst. Tıbbi Biyokimya AD*, (2021).
115. Finosh T, Jayabalan M., “Reactive oxygen species-control and management using amphiphilic biosynthetic hydrogels for cardiac applications”, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4: 1134-1146 (2013).
116. Halliwell B., “Biochemistry of oxidative stress”, *Biochemical Society Transactions*, 35 (5): 1147-1150 (2000).
117. Wu J, Xia S, Kalionis B, Wan W, Sun T., “The role of oxidative stress and inflammation in cardiovascular aging”, *BiomedResInt, Art, N:615312*, pp.13 (2014).

118. Kim SJ, Jung HJ, Hyun DH, Park EH, Kim YM, Lim CJ., “Glutathione reductase plays an antiapoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells”, *Biochimie*, 92: 927-932 (2010).
119. Pillon Barcelos R, FreireRoyes LF, Gonzalez-Gallego J, Bresciani G., “Oxidative stress and inflammation: Liver responses and adaptations to acute and regular exercise”, *Free Radic Res*, 51(2): 222–236 (2017).
120. Qasim M, Bukhari SA, Ghani MJ, Masoud MS, Huma T, Arshad M, Haque A, Ibrahim Z, Javed S, Rajoka MI., “Relationship of oxidative stress with elevated level of DNA damage and homocysteine in cardiovascular disease patients”, *Pak J Pharm Sci* 29(6(Suppl)): 2297–2302 (2016).
121. Ivanov AV, Valuev-Elliston VT, Tyurina DA, Ivanova ON, Kochetkov SN, Bartosch B, Isagulians MG., “Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcino genesis”, *Oncotarget*, 8(3): 3895–3932 (2017).
122. Gupta VK, Sharma SK., “Plants as natural antioxidants”, *Indian Journal of Natural Product Radiance*, 5 (4): 326-334 (2006).
123. Pillai CK, Pillai KS., “Antioxidants in health”, *Indian Journal. Physiol Pharmacology*, 46 (1): 1-5 (2002)
124. Maxwell SR., “Anti-oxidant therapy: Does it have a role in the treatment of human disease?”, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 6 (3): 211-236 (1997).
125. Joshi R, Kamat JP and Mukherjee T., “Free radical scavenging reactions and antioxidant activity of embelin: Biochemical and pulse radiolytic studies”, *Chemico-Biological Interactions*, 167 (2): 125-134 (2007).
126. Scandalios JG., “Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses”, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, USA, 300-350 (1997).
127. Yagi K., “Lipid peroxides and human diseases”, *Chemistry and Physics of Lipids*, 45 (2-4): 337-351 (1987).
128. Jose N, Janardhanan KK., “Antioxidant and antitumour activity of pleurotus florida”, *Current Science*, 79 (7): 941-943 (2000).
129. Kruk J, Aboul-Enein HY., “Reactive oxygen and nitrogen species in carcinogenesis: Implications of oxidative stress on the progression and development of several cancer types”, *Mini Rev Med Chem*, 17(11): 904–919 (2017).
130. Şener E, Eksioğlu-Demiralp, M Cetiner, F Ercan, S Sirvanci, N Gedik, BC Yegen., “L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death”, *Cell Biol. Toxicol*, 22(1): 47–60 (2006).

131. Kohe R., "Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress-New approaches for their evaluation", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 53: 181-192 (1999).
132. Halliwell B., "Reactive oxygen species in living systems: Source, Biochemistry and role in human disease", *J. The American Journal of Medicine*, 91(3C): 14-22 (1991).
133. Hwang JM, Cho JS, Kim TH, Lee YI., "Ellagic acid protects hepatocytes from damage by inhibiting mitochondrial production of reactive oxygen species", *Biomed Pharmacother*, 64(4): 264– 270 (2010).
134. Ceballos L, Triver JM, Nicole A., "Age correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes", *J. Clin. Chem*, 36(1): 66-70 (1992).
135. Droge W., "Free radicals in the physiological control of cell function", *Physiological Reviews*, 82 (1): 47-95 (2002).
136. Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB., "Impact of oxidative stress on female fertility", *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 21 (3): 219 (2009).
137. Marrocco I, Altieri F, Peluso I., "Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-33 (2017).
138. Perkins A V., "Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia", *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 46 (2): 77-83 (2006).
139. Smith EL, Hill RL, Lehmal R. "Principle of biochemistry", *Mc Graw Hill, inc*, 7th ed. USA. S:382-383 (1983).
140. Fujii J, Iuchi Y and Okada F., "Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3 (1): 1-10 (2005).
141. Mello LD and Kubota LT., "Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation", *Talanta*, 72 (2): 335-348 (2007).
142. Sharma RK and Agarwal., "A. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases", *Reproductive Medicine and Biology*, 3 (4): 177-199 (2004).
143. Steinberg D., "Antioxidants and atherosclerosis". *Circulation* 84:1420-1425, 1991.
144. Valko M, Rhodes CJB, Moncol J, Izakovic MM and Mazur M., "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1): 1-40 (2006).

145. Tang VJ, Konigsfeld KM, Aguilera JA and Milligan JR., "DNA binding hydroxyl radical probes", *Radiation Physics and Chemistry*, 81 (1): 46-51 (2012).
146. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and Telser J., "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (1): 44-84 (2007).
147. Comhair SA, Erzurum SC., "Antioxidant responses to oxidant mediated lung diseases", *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283 (3): 246-255 (2002).
148. Berger SJ, Gosky D, Zberowska E., "Sensitive enzymatic cycling in diabetes", *J. Diabetes*, 46(4): 405-412 (1991).
149. Burton G, Traber M., "Vitamin E: Antioxidant activity biokinetics and bioavailability", *J. Annu. Rev. Nutr*, 10: 357-382 (1990).
150. Repine J., "Oxidant-antioxidant balance: Some observations from studies of ischemia-reperfusion in isolated perfused rat hearts", *Am J Med*, 91: 30-45 (1991).
151. Limón-Pacheco J and Gonsebatt ME., "The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674 (1-2): 137-147 (2009).
152. Ellerby LM, Cabelli DE, Graden JA and Valentine JS., "Copper-zinc superoxide dismutase: Why not pH-dependent?", *Journal of The American Chemical Society*, 118 (28): 6556-6561 (1996).
153. Wassmann S., Wassmann K and Nickenig, G., "Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells", *Hypertension*, 44 (4): 381-386 (2004).
154. Rahman I, Biswas SK and Kode A., "Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases", *European Journal of Pharmacology*, 533 (1-3): 222-239 (2006).
155. Barreiros AL, David JM and David JP., "Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo", *Química nova*, 29: 113-123 (2006).
156. Niki E., "Antioxidants in relation to lipid peroxidation", *Chemistry and Physics of Lipids*, 44 (2-4): 227-253 (1987).
157. Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A. "The European perspective on vitamin E: Current knowledge and future research", *Am J Clin Nutr*, 76(4):703-16 (2002).

158. Zima AV, Copello, JA, Blatter LA., “Effects of cytosolic NADH/NAD<sup>+</sup> levels on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in permeabilized rat ventricular myocytes”, *The Journal of Physiology*, V. 555/3, P. 727-741 (2004).
159. Zafrilla P, Ferreres F, Tomas-Barberan FA., “Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams”, *J Agric Food Chem*, 49(8): 3651–3655 (2001).
160. Barch DH, Rundhaugen LM, Stoner GD, Pillay NS, Rosche WA., “Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid”, *Carcinogenesis*, 17(2): 265–269 (1996).
161. Landete JM., “Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health”, *Food Res Int*, 44(5): 1150–1160 (2011).
162. Raudone L, Bobinaite R, Janulis V, Viskelis P, Trumbeckaite S., “Effects of raspberry fruit extracts and ellagic acid on respiratory burst in murine macrophages”, *Food Funct*, 5(6): 1167– 1174 (2014).
163. Bobinaite R, Viskelis P, Bobinas Č, Mieželiene A, Alenčikienė G, Venskutonis PR., “Raspberry marc extracts increase antioxidative potential, ellagic acid, ellagitannin and anthocyanin concentrations in fruit purees”, *LWT- Food Sci Technol*, 66: 460– 467 (2016).
164. Williams DJ, Edwards D, Pun S, Chaliha M, Sultanbawa Y., “Profiling ellagic acid content: The importance of form and ascorbic acid levels”, *Food Res Int*, 66: 100–106 (2014).
165. Liu Z, Chen Z, Han F, Kang X, Gu H, Yang L., “Microwave-assisted method for simultaneous hydrolysis and extraction in obtaining ellagic acid, gallic acid and essential oil from *Eucalyptus globulus* leaves using Brønsted acidic ionic liquid [HO<sub>3</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>mim] HSO<sub>4</sub>”, *Ind Crop Prod*, 81: 152–161 (2016).
166. Karakurt S, Semiz A, Celik G, Gencler-Ozkan AM, Sen A, Adali O., “Contribution of ellagic acid on the antioxidant potential of medicinal plant *Epilobium hirsutum*”, *Nutr Cancer*, 68(1): 173– 183 (2016).
167. Sarabhai S, Harjai K, Sharma P, Capalash N., “Ellagic acid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. Increase the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to stress by inhibiting polyphosphate kinase”, *J Appl Microbiol*, 118(4): 817–825 (2015).
168. González-Sarrías A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez M, Tomé-Carneiro J, Zafrilla P, Mulero J, Tomás-Barberán FA, Espín JC., “Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts”, *J Funct Foods*, A 19: 225–235 (2015).

169. Arafat SY, Nayeem M, Jahan S, Karim Z, Reza HM, Hossain MH, Shohel M, Alam MA., “Ellagic acid rich Momordica charantia fruit pulp supplementation prevented oxidative stress, fibrosis and inflammation in liver of alloxan induced diabetic rats”, *Orient Pharm Exp Med*, 16(4): 267–278 (2016).
170. Vatter DA Shetty K., “Biological functionality of ellagic acid: A review”, *J FoodBiochem*, 29(3): 234–266 (2005).
171. Ahmed T, Setzer WN, Nabavi SF, Orhan IE, Braidy N, SobarzoSanchez E, Nabavi SM., “Insights into effects of ellagic acid on the nervous system: A mini review”, *Curr Pharm Des*, 22(10): 1350–1360 (2016).
172. De Oliveira MR. “The effects of ellagic acid upon brain cells: A mechanistic view and future directions”. *Neurochem Res* 41(6): 1219–1228 (2016).
173. Bell C, Hawthorne S., “Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer: A mini review”, *J Pharm Pharmacol*, 60(2): 139–144 (2008).
174. Naiki-Ito A, Chewonarin T, Tang M, Pitchakarn P, Kuno T, Ogawa K, Asamoto M, Shirai T, Takahashi S., “Ellagic acid, a component of pomegranate fruit juice, suppresses androgen dependent prostate carcinogenesis via induction of apoptosis”, *Prostate*, 75(2): 151–160 (2015).
175. Tomás-Barberan FA, Espín JC, García-Conesa MT., “Bioavailability and metabolism of ellagic acid and elagitannins. In: an underestimated class of bioactive plant polyphenols”, *plant polyphenols*, pp 273–297 (2009).
176. Espin JC, Larrosa M, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan F., “Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: The evidence so far”, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013: 270418 (2013).
177. Tomás-Barberán FA, González-Sarrías A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez MA, Selma MV, García-Conesa MT, Espín JC., “Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status”, *Mol Nutr Food Res*, 61(1):1500901 (2017).
178. Fujita Y, Komagoe K, Sasaki Y, Uehara I, Okuda T, Yoshida T., “Studies on inhibition-mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. 1. Inhibition-mechanism of tannins on Cu (II)-catalyzed autoxidation of ascorbic acid”, *YakugakuZasshi-J PharmaceutSoc Japan*, 107(1): 17–22 (1987).
179. Mazzone G, Toscano M, Russo N. “Density functional predictions of antioxidant activity and UV spectral features of nasutin A, isonasutin, ellagic acid, and one of its possible derivatives”, *J Agric Food Chem*, 61(40): 9650–9657 (2013).
180. Larrosa M, Garcia-Conesa MT, Espin JC, Tomas-Barberan FA., “Ellagitannins, ellagic acid and vascular health”, *Mol Asp Med*, 31(6): 513–539 (2010).

181. Bayraktar M, Kılıç S, Özdemir İ, Aydemir S, Ulu R., “The investigation of serum malondialdehyde levels and erythrocyte antioxidant enzymes in hypertension patients”, *J Health Sci*, 14(2): 76-81 (2005).
182. Barch DH, Rundhaugen LM., “Ellagic acid induces NAD(P)H: Quinone reductase through activation of the antioxidant responsive element of the NAD(P)H: quinone reductase gene”, *Carcinogenesis*, 15(9): 2065–2068 (1994).
183. Cozzi R, Ricordy R, Bartolini F, Ramadori L, Perticone P, De Salvia R. “Taurine and ellagic acid: Two differently-acting natural antioxidants”, *Environ Mol Mutagen*, 26(3): 248–254 (1995).
184. Meyer AS, Heinonen M, Frankel EN., “Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation”, *Food Chem*, 61(1–2): 71–75 (1998).
185. Festa F, Aglitti T, Duranti G, Ricordy R, Perticone P, Cozzi R., “Strong antioxidant activity of ellagic acid in mammalian cells in vitro revealed by the comet assay”, *Anticancer Res*, 21(6A): 3903–3908 (2001).
186. Devipriya N, Sudheer AR, Menon VP., “Dose-response effect of ellagic acid on circulatory antioxidants and lipids during alcohol-induced toxicity in experimental rats”, *Fundam Clin Pharmacol*, 21(6): 621–630 (2007).
187. Murugan V, Mukherjee K, Maiti K, Mukherjee PK., “Enhanced oral bioavailability and antioxidant profile of ellagic acid by phospholipids”, *J Agric Food Chem*, 57(11): 4559–4565 (2009).
188. Kumar KN, Raja SB, Vidhya N, Devaraj SN., “Ellagic acid modulates antioxidant status, ornithine decarboxylase expression, and aberrant crypt foci progression in 1,2-dimethylhydrazine-instigated colon preneoplastic lesions in rats”, *J Agric Food Chem*, 60(14): 3665–3672 (2012).
189. Baluchnejadmojarad T, Rabiee N, Zabihnejad S, Roghani M., “Ellagic acid exerts protective effect in intrastriatal 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson’s disease: Possible involvement of ERbeta/Nrf2/HO-1 signaling”, *Brain Res*, 1662: 23–30 (2017).
190. Ding Y, Zhang B, Zhou K, Chen M, Wang M, Jia Y, Song Y, Li Y, Wen A., “Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis: Role of Nrf2 activation”, *Int J Cardiol*, 175(3): 508–514 (2014).
191. Ahad A, Ganai AA, Mujeeb M, Siddiqui WA., “Ellagic acid, an NF-kappaB inhibitor, ameliorates renal function in experimental diabetic nephropathy”, *Chem Biol Interact*, 219 (1): 64–75 (2014).
192. Chatterjee A, Chatterjee S, Das S, Saha A, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay SK., “Ellagic acid facilitates indomethacin-induced gastric ulcer healing via COX-2 up-regulation”, *Acta Biochim Biophys Sin*, 44 (7): 565–576 (2012).



193. Anderson KC, Teuber SS., “Ellagic acid and polyphenolics present in walnut kernels inhibit in vitro human peripheral blood mononuclear cell proliferation and alter cytokine production”, *Ann N Y Acad Sci*, 1190: 86–96 (2010).
194. Ho CC, Huang AC, Yu CS, Lien JC, Wu SH, Huang YP, Huang HY, Kuo JH, Liao WY, Yang JS, Chen PY, Chung JG., “Ellagic acid induces apoptosis in TSGH8301 human bladder cancer cells through the endoplasmic reticulum stress- and mitochondria-dependent signaling pathways”, *Environ Toxicol*, 29(11): 1262–1274 (2014).
195. Anitha P, Priyadarsini RV, Kavitha K, Thiyagarajan P, Nagini S., “Ellagic acid coordinately attenuates Wnt/beta-catenin and NF-kappaB signaling pathways to induce intrinsic apoptosis in an animal model of oral oncogenesis”, *Eur J Nutr*, 52(1): 75–84 (2013).
196. Akbar A., “In-vivo effects of ellagic acid against the toxicity of thermally oxidized lipids”, *University of Malakand Lower Dir*, (2017).
197. Zeb A., “Ellagic acid in suppressing in vivo and in vitro oxidative stresses”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 448: 27–41 (2018).
198. Chen CH, Liu TZ, Chen CH, Wong CH, Chen CH, Lu FJ, Chen SC., “The efficacy of protective effects of tannic acid, gallic acid, ellagic acid, and propyl gallate against hydrogen peroxide induced oxidative stress and DNA damages in IMR-90 cells”, *Mol Nutr Food Res*, 51(8): 962–968 (2007).
199. Khanduja KL, Avti PK, Kumar S, Mittal N, Sohi KK, Pathak CM., “Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: A Bcl-2 independent mechanism”, *Biochim Biophys Acta*, 1760(2): 283–289 (2006).
200. Zeb A, Muhammad B, Ullah F., “Characterization of sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil from pakistan for phenolic composition, quality characteristics and potential beneficial properties”, *J Food Meas Charact*, 11(3): 1362–1369 (2017).
201. Zeb A., “Chemistry and liquid chromatography methods for the analyses of primary oxidation products of triacylglycerols”, *Free Radic Res*, 49(5): 549–564 (2015).
202. Pavlica S, Gebhardt R., “Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PC12 cells”, *Free Radic Res*, 39(12): 1377–1390 (2005).
203. Rong S, Hu X, Zhao S, Zhao Y, Xiao X, Bao W, Liu L., “Procyanidins extracted from the litchi pericarp ameliorate atherosclerosis in ApoE knockout mice: Their effects on nitric oxide bioavailability and oxidative stress”, *Food Funct*, 8(11): 4210–4216 (2017).

204. Yang CS, Tzou BC, Liu YP, Tsai MJ, Shyue SK, Tzeng SF., “Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium”, *J Cell Biochem*, 103(3): 825– 834 (2008).
205. Hassoun EA, Walter AC, Alsharif NZ, Stohs SJ., “Modulation of TCDD-induced fetotoxicity and oxidative stress in embryonic and placental tissues of C57BL/6J mice by vitamin E succinate and ellagic acid”, *Toxicology*, 124(1): 27–37 (1997).
206. Vijayapadma V, KalaiSelvi P, Sravani S., “Protective effect of ellagic acid against TCDD-induced renal oxidative stress: Modulation of CYP1A1 activity and antioxidant defense mechanisms”, *Mol Biol Rep*, 41(7): 4223–4232 (2014).
207. Ceribasi AO, Sakin F, Turk G, Sonmez M, Atessahin A., “Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages”, *Exp Toxicol Pathol*, 64(7–8): 717–724 (2012).
208. Zhang HM, Zhao L, Li H, Xu H, Chen WW, Tao L., “Research progress on the anticarcinogenic actions and mechanisms of ellagic acid”, *Cancer Biol Med*, 11(2): 92–100 (2014).
209. Stoner GD, Sardo C, Apseloff G, Mullet D, Wargo W, Pound V, Singh A, Sanders J, Aziz R, Casto B, Sun X., “Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days”, *J Clin Pharmacol*, 45(10): 1153–1164 (2005).
210. Morillas-Ruiz J, Zafrilla P, Almar M, Cuevas MJ, López FJ, Abellán P, Villegas JA, González-Gallego J., “The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: Results from a placebo-controlled double-blind study in cyclists”, *Eur J Appl Physiol*, 95(5): 543–549 (2005).
211. Hayeshi R, Mutingwende I, Mavengere W, Masiyanise V, Mukanganyama S., “The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin”, *Food Chem Toxicol*, 45(2): 286–295 (2007).
212. Chen B, Tuuli MG, Longtine MS, Shin JS, Lawrence R, Inder T, Michael Nelson D., “Pomegranate juice and punicalagin attenuate oxidative stress and apoptosis in human placenta and in human placental trophoblasts”, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(9): E1142–E1152 (2012).
213. Nejad KH, Dianat M, Sarkaki A, Naseri MK G, Badavi M, Farbood Y., “Ellagic acid improves electrocardiogram waves and blood pressure against global cerebral ischemia rat experimental models”, *Electronic physician*, 7(4): 1153 (2015).

214. 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*, 22(6): 241-7 (2006).
215. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K., "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Anal Biochem*, 95(2): 351-8 (1979).
216. Beutler E, Kelly BM., "The effect of sodium nitrite on red cell GSH", *Experientia*, 19: 96-7 (1963).
217. Erel O., "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status", *Clin Biochem*, 38(12): 1103-11 (2005).
218. Erel O., "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation", *Clin Biochem*, 37(4): 277-85 (2004).
219. 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*, 33(6): 1070-4 (2009).
220. Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S., "Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking", *Int J Cardiol*, 100(1): 61-4 (2005).
221. Harma M, Harma M, Erel O., "Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole", *Swiss Med Wkly*, 133(41-42): 563-6 (2003).
222. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ., "Protein measurement with the folin phenol reagent", *J Biol Chem*, 193(1): 265-75 (1951).
223. Luna LG., "Manual of histologic staining methods of the armed forces", *Institute of Pathology*, (1968).
224. 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*, 10(1): 23-7 (2011).
225. Baykara O., "Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar", *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3):154-65 (2016).
226. Kocaman N., "Tekrarlayan dozlarda metotreksat uygulamasının sıçan karaciğer dokusu üzerine etkileri", *Firat Tıp Dergisi*, 18: 141-145 (2013).
227. Sener G, Eksioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Yegen BC., "Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects", *Eur J Pharmacol*, 542: 170-178 (2006).

228. Miyazono Y, Gao F, Horie T., "Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats", *Scand J Gastroenterol*, 39(11): 1119-1127 (2004).
229. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM., "Molecular mechanisms of fluoride toxicity", *Chem Biol Interact*, 188: 319–333 (2010).
230. Cetinkaya A, Kurutas EB, Bulbuloglu E, Kantarceken B., "The effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced oxidative renal damage in rats", *Nephrol Dial Transplant*, 22(1): 284-285 (2007).
231. Ahmed W, Zaki A & Nabil T., "Prevention of methotrexate-induced nephrotoxicity by concomitant administration of garlic aqueous extract in rat", *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45(3): 507-516 (2015).
232. 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*, 64(4): 315-9 (2005).
233. 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*, 40(5): 765-70 (2020).
234. Kaya İ, Deveci HA, Karapehlivan M, Kükürt A., "Investigation of oxidative stress index in pyridine and ellagic acid treated mice", *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 31(3): 148-151 (2015).
235. Siglin JC, Barch DH, Stoner GD., "Effects of dietary phenethyl isothiocyanate, ellagic acid, sulindac and calcium on the induction and progression of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats", *Carcinogenesis*, 16: 1101-1106 (1995).
236. Kanai S, Okano H., "Mechanism of the protective effects of sumac gall extract and gallic acid on the progression of CCl4-induced acute liver injury in rats", *Am J Chin Med*, 26: 333-341 (1998).
237. Al-Kharusi N, Babiker HA, Al-Salam S, Waly MI, Nemmar A, Al-Lawati I, Yasin J., "Beegam S, Ali BH Ellagic acid protects against cisplatin- induced nephrotoxicity in rats: A dose-dependent study", *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 17: 299-310 (2013).
238. Singh K, Khanna AK, Chander R., "Hepatoprotective activity of ellagic acid against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats", *Indian J Exp Biol*, 37: 1025-1026 (1999).
239. Saba, Khan S, Parvez S, Chaudhari B, Ahmad F, Anjum S, Raisuddin S., "Ellagic acid attenuates bleomycin and cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in Wistar rats", *Food Chem Toxicol*, 58: 210-219 (2013).

240. Lin MC & Yin MC., "Preventive effects of ellagic acid against doxorubicin-induced cardio-toxicity in mice", *Cardiovascular Toxicology*, 13(3): 185-193 (2013).
241. Andersson DC, Fauconnier J, Yamada T, Lacampagne A, Zhang SJ, Katz A, Westerblad H "Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the  $\beta$ -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes", *J Physiol*, 589: 1791-1801 (2011).
242. Lin SS, Hung CF, Tyan YS, Yang CC, Hsia TC, Yang MD, Chung JG., "Ellagic acid inhibits arylamine N-acetyltransferase activity and DNA adduct formation in human bladder tumor cell lines", *Urol Res*, 29: 371-376 (2001).
243. Whitley AC, Stoner GD, Darby MV, Walle T., "Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid--extensive binding to protein and DNA", *Biochem Pharmacol*, 66: 907-915 (2003).
244. Teel RW, Martin RM., "Disposition of the plant phenol ellagic acid in the mouse following oral administration by gavage", *Xenobiotica*, 18: 397-405 (1988).
245. Zhang Z, Hamilton SM, Stewart C, Strother A, Teel RW., "Inhibition of liver microsomal cytochrome P450 activity and metabolism of the tobacco-specific nitrosamine NNK by capsaicin and ellagic acid", *Anticancer Res*, 13: 2341-2346 (1993)
246. Mutlu SI, Seven I, Arkalı G, Birben N, Arslan AS, Aksakal M & Seven PT., "Ellagic acid plays an important role in enhancing productive performance and alleviating oxidative stress, apoptosis in laying quail exposed to lead toxicity", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208: 111608 (2021).
247. Singh K, Khanna AK, Chander R., "Hepatoprotective activity of ellagic acid against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats", *Indian J Exp Biol*, 37: 1025-1026 (1999).
248. Chen C, Shen G, Hebbar V, Hu R, Owuor ED, Kong AN ., "Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells", *Carcinogenesis*, 24: 1369-1378 (2003).
249. Thresiamma KC, George J, Kuttan R., "Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity", *J Exp Clin Cancer Res*, 17: 431-434 (1998).
250. Yalçın A, Keleş H, Kahraman T, Bozkurt MF, Aydın H., "Protective effects of ellagic acid against chemotherapy-induced hepatotoxicity", *Duzce Medical Journal*, 22(2): 124-130 (2020).

251. Mertens-Talcott Su, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H., "Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers", *J Agric Food Chem*, 54: 8956-8961 (2006).
252. Hassoun EA, Walter AC, Alsharif NZ, Stohs SJ., "Modulation of TCDD-induced fetotoxicity and oxidative stress in embryonic and placental tissues of C57BL/6J mice by vitamin E succinate and ellagic acid", *Toxicology*, 124: 27-37 (1997).
253. Warpe VS, Mali VR, Arulmozhi S, Bodhankar S L, Mahadik K R., "Cardioprotective effect of ellagic acid on doxorubicin induced cardiotoxicity in wistar rats", *Journal of acute medicine*, 5(1): 1-8 (2015).

**EK AÇIKLAMALAR A.**

**ETİK KURUL İZİNİ**

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

Sayı : 29  
Konu: Kararlar

21.4.2020

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Toksikite de Ellagik Asidin Koruyucu Etkisi.
	ARAŞTIRMANIN İNGİLİZCE ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Protective Effect of Ellagic Acid in Methotrexate-Induced Toxicity in Rats.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Prof.Dr.Tahir KAHRAMAN
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Sarab Hayder Weli WELI, Prof.Dr.Hikmet KELEŞ, Prof.Dr.Idris TÜREL
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2020/11	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	İmzası
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.Üğur 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 ÇETINKAYA (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 : 154  
Konu:

15.10.2021

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

Kurulumuzdan 08.04.2021 tarihinde etik onay alan 2020/11 nolu "Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Toksikite de Ellagik Asidin 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 Ellagik Asidin Koruyucu Etkisi" olarak değiştirilmesi ve çalışmanın bitiş süresinin 31 Aralık 2021 tarihine kadar uzatılması 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	
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 ÇETINKAYA (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 AKUNAL 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

Sarab Hayder Weli WELI ilk, orta ve lise öğrenimini Kerkük şehrinde tamamladı. Kerkük Alnasır Lisesi'nden mezun oldu, 2013'te Kerkük Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2017'da mezun oldu. 2019 yılında Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına öğrenci olarak kabul edildi.