



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METOTREKSATIN DALAK ÜZERİNDEKİ HASARINA LİPOİK ASİT
VE KUERSETİNİN ETKİSİ**

AYŞE AKDOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. NİHAL ŞEHKÂR OKTAY
BİYOKİMYA (ECZACILIK) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2024



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METOTREKSATIN DALAK ÜZERİNDEKİ HASARINA LİPOİK ASİT
VE KUERSETİNİN ETKİSİ**

AYŞE AKDOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. NİHAL ŞEHKÂR OKTAY
BİYOKİMYA (ECZACILIK) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ayşe AKDOĞAN

İmzası

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim başlangıcından sonuna kadar yardımlarını ve anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen, her daim yol gösterip ışık tutan, hem tecrübesiyle hem de pratikliğiyle her zaman tüm süreçte yanımda olan, bana akademiye sevdiren öğrencisi olduğum için hem çok şanslı hem de çok gururlu olduğum danışman hocam Sayın **Doç. Dr. Nihal Şehkâr Oktay’a**

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini aktararak beni aydınlatan **Prof. Dr. Ayşen Yarat’a, Prof. Dr. Tuğba Tunalı Akbay’a, Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan’a, Doç. Dr. Özlem Bingöl Akpınar’a ve Prof. Dr. Derya Özsavcı’ya**

Çalışmam için finansal destek sağlayan **Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne,**

Tez çalışmamda ve ders dönemlerinde bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım **Şükriye Çalışkan’a ve Aslıhan Cihan’a,**

Eğitimim boyunca ne zaman yardıma ihtiyacım olsa koşarak gelen benimle dertlenen ablam **Leyla Vural** ve üzerimdeki tüm emekleri için **Taş ve Akdoğan ailelerine,**

Yüksek lisans eğitimime başlarken bana olan güvenine ve tüm süreçte destek olan eşim **Fatih Akdoğan’a** ve her adımı birlikte attığımız varlığı ile beni tam eden canım kızım **Vera Akdoğan’a** sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından “TYL-2022-10429” numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
1.ÖZET	1
2.SUMMARY	2
3.GİRİŞ ve AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER.....	7
4.1. Metotreksat	7
4.1.1. Metotreksatın tarihsel süreci	7
4.1.2. Metotreksatın kimyasal yapısı	8
4.1.3. Metotreksatın farmakokinetik özellikleri	9
4.1.4. Metotreksatın etki mekanizması	10
4.1.5. Metotreksatın kullanım alanları ve yan etkileri	13
4.2. Dalak	15
4.2.1. Dalak embriyolojisi	16
4.2.2. Dalak anatomisi	16
4.2.3. Dalak ligamanları ve kan damarları	17
4.2.4. Dalak histolojisi	19
4.2.4.1. Kırmızı pulpa	19
4.2.4.2. Beyaz pulpa	20
4.2.4.3. Marjinal bölge	20
4.2.5. Dalağın Fonksiyonları	21
4.2.5.1. Filtreleme işlevleri	21
4.2.5.1.1. Culling	21
4.2.5.1.2. Pitting	21
4.2.5.1.3. Remodeling	22
4.2.5.2. İmmünolojik fonksiyonlar	23
4.2.5.2.1. Mikroorganizmaların ve antikor kaplı hücrelerin fagositozu	23
4.2.5.2.2. Antikor sentezi	24

4.2.5.2.3. Hücresel bağışıklık	24
4.2.5.2.4. Lenfositlerin üretimi	24
4.2.5.2.5. Tuftsin üretimi	24
4.2.5.2.6. Tamamlayıcı yolların işlevi	25
4.2.5.3. Rezervuar fonksiyonu	25
4.2.5.4. Hematopoez	25
4.2.5.5. Diğer splenik fonksiyonlar	26
4.2.6. Dalak anamolleri	26
4.3. Lipoik Asit	27
4.3.1. Lipoik asidin tarihçesi	27
4.3.2. Lipoik asit kaynakları	28
4.3.3. Lipoik asidin kimyasal yapısı ve sentezi	28
4.3.4. Lipoik asidin biyolojik işlevleri	30
4.3.5. Lipoik asidin antioksidan özelliği	31
4.4. Kuersetin	31
4.4.1. Kuersetinin tarihçesi	32
4.4.2. Kuersetin kaynakları	33
4.4.3. Kuersetinin yapısı	34
4.4.4. Kuersetinin biyolojik işlevleri	36
4.4.5. Kuersetinin antioksidan özelliği	37
4.5. Oksidatif Stres	38
4.5.1. Reaktif türler.....	39
4.6. Antioksidanlar	42
4.6.1. Antioksidanların sınıflandırılması	43
4.6.1.1. Endojen antioksidanlar	44
4.6.1.1.1. Enzimatik antioksidanlar	44
4.6.1.1.1.1. Süperoksit Dismutaz.....	44
4.6.1.1.1.2. Katalaz	45
4.6.1.1.1.3. Glutasyon peroksidaz	45
4.6.1.1.1.4. Glutasyon redüktaz	45
4.6.1.1.2. Nonenzimatik antioksidanlar	45
4.6.1.1.2.1. Glutasyon	46
4.6.1.1.2.2. Melatonin	46
4.6.1.1.2.3. Ürik Asit	46

4.6.1.1.2.4. Bilirubin.....	47
4.6.1.1.2.5. Albumin	47
4.6.1.1.2.6. Koenzim Q10.....	47
4.6.1.1.2.7. Lipoik asit.....	47
4.6.1.1.2.8. Selenyum	47
4.6.1.1.2.9. Seruloplazmin ve Transferrin	47
4.6.1.2. Eksojen Antioksidanlar	48
4.6.1.2.1. Vitamin Eksojen Antioksidanlar	48
4.6.1.2.1.1. Vitamin E	48
4.6.1.2.1.2. Vitamin C	48
4.6.1.2.1.3. β -karoten	49
4.6.1.2.1.4. Folik asit	49
5. GEREÇ ve YÖNTEM	50
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
5.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	51
5.3. Deney Hayvanları ve Oluşturulan Gruplar	52
5.4. Doku Örneklerinin Alınması, Homojenatın Hazırlanması ve İncelenen Parametreler...54	
5.5. Biyokimyasal Parametreler.....	55
5.5.1. Total Protein tayini (Lowry ve ark., 1951)	55
5.5.2. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Tayini (Ledwozyw ve ark., 1986)	56
5.5.3. Total nitrik oksit (NO) tayini (Miranda ve ark., 2001)	57
5.5.4. Total siyalik asit (SA) tayini (Warren, 1959)	59
5.5.5. Glutasyon Tayini (Beutler, 1975)	60
5.5.6. Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi tayini (Mylorie ve ark., 1986).....	61
5.5.7. Katalaz (KAT) aktivitesi tayini (Aebi, 1974)	63
5.6. İstatistiksel Değerlendirme	64
6. BULGULAR.....	65
6.1. Lipit peroksidasyon, nitrik oksit ve siyalik asit sonuçları	65
6.2. Glutasyon, süperoksid dismutaz aktivitesi ve katalaz aktivitesi sonuçları	66
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	68
8. KAYNAKLAR	74
9. ÖZGEÇMİŞ	88
10. BİLİMSEL FAALİYETLER	89

11. EKLER	90
------------------------	-----------

KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ

$^1\text{O}_2^-$	:	Singlet oksijen
7-OH-MTX	:	7-hidroksimetotreksat
CaCl_2	:	Kalsiyum klorür
KAT	:	Katalaz
CDNB	:	1-kloro-2,4-dinitro-benzenin
CoQ10	:	Koenzim Q10
DAMPA	:	2,4-diamino-N10-metilpteroik asit
DHF	:	Dihidrofolat
DHFR	:	Dihidrofolat redüktaz
DHLA	:	Dihidrolipoik asit
DTNB	:	5-5' ditiyobis 1-2 nitro benzoik asit
EDTA-Na	:	Etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu
FeCl_3	:	Demir III klorür
GCL	:	Glutamin sistein ligaz
GPx	:	Glutasyon peroksidaz
GR	:	Glutasyon redüktaz
GSH	:	Glutasyon
GSS	:	Glutasyon sentaz
GSSG	:	Okside glutasyon
H_2O_2	:	Hidrojen peroksit

H_2SO_4	:	Sülfirik asit
HCl	:	Hipokloröz asit
HOCl	:	Hipokloröz asit
i.p.	:	İntraperitoneal
IgG	:	İmmünoglobülin G
K	:	Kör
K_2HPO_4	:	Dipotasyum fosfat
KH_2PO_4	:	Potasyum dihidrojen fosfat
LA	:	Lipoik asit
Li_2SO_4	:	Lityum sülfat
LPO	:	Lipit peroksidasyon
MDA	:	Malondialdehit
MOLE	:	Moringa Oleifera yaprağı ekstresi
MTX	:	Metotreksat
N	:	Numune
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	:	İki sulu disodyum fosfat
Na_2HPO_4	:	Disodyum fosfat
NaCl	:	Sodyum klorür
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaOH	:	Sodyum hidrooksit
NEDD	:	N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorür
NO	:	Nitrik oksit

NO_2^-	:	Nitrit
NO_3^-	:	Nitrat
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
O_2^-	:	Süperoksit anyonu
$\text{OH}\cdot$	:	Hidroksil radikali
Ort	:	Ortalama
Que	:	Kuersetin
RES	:	Monosit makrofaj sistemi
RNT	:	Reaktif nitrojen türleri
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
SA	:	Siyalik asit
SOD	:	Süperoksit dismutaz
SR	:	Serbest radikal
$\text{ST}_{(n)}$	:	Standart _(n)
SULF	:	Sülfanilamidin asidik
TBA	:	Tiobarbitürik asit
TCA	:	Trikloroasesitasit
THF	:	Tetrahidrofolat
VCl_3	:	Vanadyun III klorür
ZnSO_4	:	Çinko sülfat

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa Numarası
Şekil 1.	Folik asit, Aminopeterin, MTX kimyasal yapıları ve yapısal benzerliklerinin gösterimi 7
Şekil 2.	MTX kimyasal yapısı 8
Şekil 3.	Folik asitin kimyasal yapısı 9
Şekil 4.	MTX'in metabolit yapıları 10
Şekil 5.	Folik asidin THF'ye dönüşümü sırasında MTX etkisi.....11
Şekil 6.	MTX'in hücre içine alınımı ve etkilediği yollar.....13
Şekil 7.	İnsan dalağının görüntüsü 15
Şekil 8.	İnsan vücudunda dalağın konumu 17
Şekil 9.	Dalağın diğer organlara komşuluğu, ligamanları ve damar yapısı.....18
Şekil 10.	LA'nın S ve R enantiyomer yapısı.....29
Şekil 11.	LA ve DHLA'nın kimyasal yapıları 30
Şekil 12.	Que'nin moleküler yapısı 33
Şekil 13.	Que içeren bazı meyve ve sebzeler 34
Şekil 14.	Que'nin yapısı ve metabolitleri 35
Şekil 15.	Que'nin antioksidan özelliği 37
Şekil 16.	Vücutta artan ROT değerlerine karşı homeostasi durumunu korumak için artan antioksidan seviyeleri.....42
Şekil 17.	Endojen antioksidanların sınıflandırılması.....44
Şekil 18.	Dalak dokusu LPO, NO ve SA seviyesinin grafiksel gösterimi.....66
Şekil 19.	Dalak dokusundaki GSH seviyesi, SOD ve KAT aktivitesinin grafiksel gösterimi 67

TABLO LİSTESİ

	Sayfa Numarası
Tablo 1. Dalağın bilinen fonksiyonları	21
Tablo 2. LA ve DHLA'nın reaktif oksijen ve nitrojen türlerini yakalama özellikleri...	32
Tablo 3. Deney hayvanlarının yem içeriği.....	52
Tablo 4. Total protein tayin yöntemi.....	56
Tablo 5. Lipid peroksidasyon tayin yöntemi	57
Tablo 6. Nitrik oksit tayin yöntemi.....	58
Tablo 7. Total siyalik asit tayin yöntemi	60
Tablo 8. Glutasyon tayin yöntemi.....	61
Tablo 9. Süperoksit dismutaz tayin yöntemi.....	62
Tablo 10. Katalaz tayin yöntemi	64
Tablo 11. Tüm gruplarda dalak dokusuna ait LPO, NO, SA değerleri ve karşılaştırılması	65
Tablo 12. Tüm gruplarda dalak dokusuna ait GSH, SOD aktivitesi ve KAT aktivitesi değerleri ve karşılaştırılması.....	67

1.ÖZET

Tezin başlığı : Metotreksatın Dalak Üzerindeki Hasarına Lipoik asit ve Kuersetinin Etkisi

Öğrencinin Adı Soyadı : Ayşe Akdoğan

Danışmanın Adı Soyadı : Doç. Dr. Nihal Şehkar Oktay

Programın Adı : Biyokimya (Eczacılık) Yüksek Lisans Programı

Amaç: Çalışmamızda folat antagonisti olarak görev alan antikanser ajan ve immünosüpresan özellikteki metotreksat ile oluşturulan dalak doku hasarına güçlü antioksidan özellikleri ile bilinen kuersetin ve lipoik asitin etkileri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 24 Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı ve eşit olarak 4 gruba ayrıldı. 1.grup: Kontrol grubu, 2.grup: Metotreksat grubu, 3.grup: Metotreksat+Kuersetin grubu, 4. Grup: Metotreksat+Lipoik asit grubu. Deney başlangıcından 6 gün sonra sıçanlar sakrifiye edilerek biyokimyasal analizler için dalak dokuları çıkarıldı ve homojenat elde edilerek oksidan parametrelerden lipit peroksidasyon, nitrik oksit ve siyalik asit tayini yapılırken, antioksidan parametrelerden glutatyon, süperoksit dismutaz aktivitesi ve katalaz aktivitesi yapıldı.

Bulgular: Metotreksat grubunda oksidan parametreler kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, Metotreksat+Kuersetin ve Metotreksat+Lipoik asit gruplarında Metotreksat grubuyla kıyasla anlamlı olarak azaldı. Ayrıca, Metotreksat grubunda glutatyon seviyesi kontrole göre anlamlı olarak artarken, süperoksit dismutaz aktivitesi azaldı. Metotreksat uygulamasından sonra kuersetin ve lipoik asit uygulanması bu parametrelerdeki değişimi tersine çevirdi. Katalaz aktivitesinde gruplar arası herhangi bir fark gözlemlenmedi.

Sonuç: Çalışmamız sonucunda metotreksatın dalak üzerinde oksidan parametreleri arttırarak neden olduğu hasara güçlü antioksidan kapasiteleri ile kuersetin ve lipoik asitin alternatif tedavi edici ajan olarak kullanılabileceği görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, oksidatif stres, kuersetin, lipoik asit, dalak

2. SUMMARY

Title of Thesis: Effect of Lipoic Acid and Quercetin on Methotrexate Damage to the Spleen

Student Name, Surname: Ayşe Akdoğan

Supervisor Name : Doç. Dr. Nihal Şehkar Oktay

Program Name: Biochemistry (Pharmacy) Master's Program

Objective: Our study investigated the effects of quercetin and lipoic acid, known for their potent antioxidant properties, on spleen tissue damage induced by methotrexate, an anticancer and immunosuppressive agent that acts as a folate antagonist.

Materials and Methods: A total of 24 male Wistar albino rats were used in the study and divided into four groups equally. 1st group: Control group, 2nd group: Methotrexate group, 3rd group: Methotrexate+Quercetin group, 4th group: Methotrexate+Lipoic acid group. Rats were sacrificed 6 days after the beginning of the experiment and spleen tissues were collected for biochemical analysis. Lipid peroxidation, nitric oxide, and sialic acid levels were determined for oxidant parameters, while glutathione level, superoxide dismutase, and catalase activities were analyzed for antioxidant parameters.

Results: While oxidant parameters increased significantly in the Methotrexate group compared to the control group, they decreased significantly in the Methotrexate+Quercetin and Methotrexate+Lipoic acid groups compared to the Methotrexate group. Also, glutathione level increased significantly in the Methotrexate group compared to the control, and superoxide dismutase activity significantly decreased. Application of quercetin and lipoic acid to methotrexate reversed the change in these parameters. No difference was observed between groups in catalase activity.

Conclusion: As a result of our study, it is seen that quercetin and lipoic acid can be used as alternative therapeutic agents with their strong antioxidant capacities against the damage caused by methotrexate on the spleen by increasing oxidant parameters.

Keywords: Methotrexate, oxidative stress, quercetin, lipoic acid, spleen

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Metotreksat (MTX) folat antagonisti olarak işlev gören bir anti metabolit ilaçtır. 1947 yılında Yellapragada Subbarow tarafından keşfedilmesinin ardından ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nden 1953 yılında onay almıştır. İlk kullanımı çocukluk dönemi akut lenfosit lösemi tedavisinin başarısından sonra birçok kanser türünün, romatoid artrit, sedef hastalığının, immünolojik anormalliklerin ve sistemik inflamasyon gibi hastalıkların tedavilerinde de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Cronstein ve Aune, 2020; Çakır ve ark., 2015).

MTX genel olarak folik asit metabolizmasını inhibe ederek, hücre döngüsünün S fazı sırasında sitotoksik etkisini sergiler ve böylece kemoterapötik etki göstermiş olur. MTX pürin ve timin sentezinde rol alan tetrahidrofolatın (THF) sentezi için gerekli olan dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine rekabetçi ve geri döndürülemez şekilde bağlanıp inhibe eder. MTX, folata kıyasla DHFR enzimine yaklaşık 1000 kat daha fazla afiniteye sahiptir. Böylece MTX dolaylı olarak DNA, RNA ve ATP sentezini engeller (Neuman ve ark., 1999; Rubino, 2001; Tabassum ve ark., 2010).

Uzun tedavi süresi ve yüksek doz uygulanan MTX olmak üzere çoğu MTX tedavisinde istenmeyen yan etkiler hatta çoklu organ hasarları gözlemlenmektedir. MTX'in neden olduğu bu toksite, doz programı ve tedavi süresinin yanı sıra hastaların risk faktörleri, hastalık tipi, genetik ve moleküler apoptotik faktörlerin varlığı gibi birçok faktörün etkileşiminin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Tabassum ve ark., 2010). Bu yan etkiler hepatotoksisite, nefrotoksisite, kemik iliği baskılanması, pulmoner fibrozis ve gastrointestinal mukozal hasar, kolestaz ve siroz olarak sıralanabilir. (Çakır ve ark., 2015; Yuksel ve ark., 2017).

MTX'in toksisitesinin farmakodinamiği tam olarak aydınlatılamasa da çeşitli çalışmalar MTX'in antiinflamatuvar ve apoptotik yolları değiştirdiğini ve reaktif oksijen türlerinde (ROT) artışa neden olduğunu göstermekte ve ayrıca MTX tedavisinin aşırı ROT oluşumuyla bağlantılı olarak yüksek düzeyde nötrofil infiltrasyonuna ve proinflamatuvar sitokin salınımına neden olduğunu bildirmektedir (Mercantepe ve ark., 2019).

Literatürde MTX'in aracılık ettiği oksidatif stresin kaynağı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların aktivitelerinin azalması ve lipid peroksidasyonunun artması olarak belirtilmiştir (Soliman ve ark., 2020). MTX'in ROT oluşumunu tetiklemesinin yanı sıra

antioksidan savunma sisteminde yer alan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) üretimini azaltarak hücreleri ROT'a karşı savunmasız hale getirir. Oksidan/antioksidan dengesini bozarak oksidatif strese ve doku hasarına neden olabilir (Yuksel ve ark., 2017).

MTX'in en büyük lenfoid dokulu organ olan dalak üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar olsa da doğrudan toksik etkileri konusunda net bir çalışma bulunmamaktadır. Dalak, vücudun homeostazisinde kritik öneme sahip, kanın filtreleme işlemini yaparak bağışıklık tepkisinde ve iltihap reaksiyonlarında yer alan hücrelerin sağlanmasından sorumlu bir organdır. Stresten etkilenen en kritik organ olmasına rağmen oksidatif stres hasarına ilişkin literatürde yeterli çalışma mevcut değildir (Feketeová ve ark., 2012; Soliman ve ark., 2020).

Günümüzde MTX tedavisinin etkinliğinin artırılması ve yan etkileri giderebilecek veya azaltabilecek ek tedavi faktörlerine daha fazla önem verilmektedir. Bu ek tedavilerden özellikle bitkisel kaynaklı olarak flavonoidler grubuna ait kuersetin (Que) ve diyet kaynağının yanı sıra vücutta doğal olarak da sentezlenebilen güçlü antioksidan özellik gösteren lipoik asit (LA) araştırmacıların dikkatini çekmiş ve çeşitli çalışmalara konu olmuştur (Çakır ve ark., 2015; Yuksel ve ark., 2017)

Que flavonol olarak sınıflandırılan bir polifenolik bileşiktir ve genellikle yenilebilir bitkilerde oldukça bol miktarda bulunur. Antialerjik, anti-inflamatuar, antihipertansif, antiviral ve antiproliferatif aktiviteler gibi vücut üzerinde birçok yararlı etkisi olduğu bilinmektedir. Homolog flavonoidler arasında yapısal olarak toplam hidroksil grubu sayısı arttıkça oksijen temizleme kapasitesinin arttığı bildirilmiştir. Que'nin yapısında bulunan beş hidroksil grubu ile güçlü bir antioksidan özelliğe sahiptir. Que serbest radikallerle (SR) doğrudan reaksiyona girerek hidroksil (OH·) ve süperoksit (O₂⁻) radikallerini nötralize eder ve lipid peroksil radikallerini parçalayarak lipid peroksidasyonunu engeller ve metalleri şelatlayarak antioksidan özellik gösterir. (Batiha ve ark., 2020; Yuksel ve ark., 2017).

LA tiyoktik asit olarak da bilinmektedir. İnsan vücudunda doğal olarak bulunmasının yanında hem hayvanlar hem de bitkiler tarafından sentezlendiğinden diyet yoluyla da alınmaktadır. (Arpag ve ark., 2018; Tabassum ve ark., 2010). LA'nın dışarıdan takviyesinin, güçlü bir antioksidan görevi gösterdiği oksidatif stresi azaltabilen bağlanmamış LA seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Pınar ve ark., 2018). LA'nın serbest oksijen radikallerini azaltma kapasitesinin yanında metal şelatyonu, C, E vitamini ve glutatyon (GSH) gibi diğer endojen antioksidan ajanların oksitlenmiş formlarının rejenerasyon kapasitelerini artırma gibi antioksidan

özellikleri vardır (Pınar ve ark., 201). LA hem yağda hem de suda çözüldüğünden vücutta etkin bir şekilde etki göstererek hücresel membranlardaki lipid peroksitler de dahil olmak üzere SR'leri azaltmada ve ayrıca mitokondriyal kaynaklarındaki SR'leri temizlemede oldukça etkindir (Arpag ve ark., 2018; Tabassum ve ark., 2010).

MTX'in kullanıma bağlı yan etkilerin temelinde vücutta okidan/antioksidan dengesinin bozulması sonucu oluşan oksidatif stres yer almaktadır. Oksidatif metabolizmanın yan ürünleri olan O_2^- , peroksitler ve $OH\cdot$ gibi ROT ve nitrik oksit (NO) gibi reaktif nitrojen türleri (RNT) hücrelerde yer alan nükleik asitler, proteinler ve lipidler gibi makro moleküllere bağlanır. Bunun sonucunda birçok morfolojik ve fonksiyonel değişikliğe neden olarak dokuların işlevlerinin bozulmasına ve hatta kaybolmasına sebebiyet verir böylece birçok hastalığın patogenezi oluşturur. (İleritürk ve ark., 2020; Yuksel ve ark., 2017).

Vücutta homeostazi; normal şartlar altında düşük seviyelerde her daim üretilen oksidan moleküllerin antioksidan savunma sistemi tarafından temizlenmesi sonucu korunur. ROT içinde en reaktiflerinden biri olan O_2^- radikallerini enzimsel antioksidanlardan süperoksit dismutaz enzimi (SOD) tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürerek hücreleri lipid peroksidasyonundan korur. H_2O_2 ise katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri tarafından su ve moleküler oksijene dönüştürülmektedir. Ayrıca bu enzimsel antioksidanlar dışında önemli bir antioksidan tripeptid yapıdaki Glutatyon (GSH) SR'leri bağlayarak okside forma (GSSG) dönüşerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır. MTX ise hücre içi NADPH seviyelerini azaltarak dolaylı olarak hücre içi sitosolik bir antioksidan olan GSH'ın tükenmesine böylece de GSH azaldıkça, hücreler enfeksiyonlara karşı daha açık ve duyarlı hale gelir (İleritürk ve ark., 2020; Yuksel ve ark., 2017).

MTX tedavisi ile aşırı üretilen ROT antioksidan enzimlerin inaktivasyonuna sebebiyet verebilir. Yapılan çalışmalar SOD enziminin aktivitesindeki bir azalma sonucu O_2^- radikallerinin birikerek GPx enziminin etkisiz hale getirdiğini göstermektedir. Ayrıca son dönemde araştırmacılar MTX tedavisi ile vücutta artan ROT'un baskıladığı antioksidan savunmayı desteklemek için ek tedavi yöntemlerinden eksojen Que ve LA gibi güçlü antioksidan uygulanmalarının prooksidan-antioksidan dengeyi normale döndürmesi üzerinde durmaktadır (Tabassum ve ark., 2010).

Soliman ve ark. (2020) fareler üzerinde MTX uygulaması ile dalak üzerinde oluşan oksidatif stresi tedavi edebilmek için Moringa oleifera yaprağının ekstresi (MOLE) uygulamışlardır.

Deneylerinin sonucunda MTX enjekte edilmiş farelerin dalak homojenatlarında; MDA seviyelerinde bir artış, GSH ve SOD aktivitelerinde bir azalma gözlemlenmiştir. MOLE tedavisi MTX intoksikasyonundan önce bir hafta süreyle uygulanıp ve 5 gün süreyle devam ettirildiğinde, MTX intoksikasyonunun dalakta değiştirdiği MDA, GSH ve SOD düzeylerinde meydana gelen değişiklikler gözlenmemiş dalak dokusu oksidatif hasardan korunmuştur. MTX enjekte edilmiş farelerin serumundaki SOD, GSH ve KAT seviyeleri, kontrol ve MOLE uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmış, MDA seviyeleri ise artmıştır. MTX enjekte edilen gruba MOLE'nin önceden uygulanması, incelenen tüm enzimatik aktivitelerin normal seviyelere geri dönmesiyle sonuçlandığını bildirmişlerdir.

Custer ve ark. (1977) laboratuvarlarında toksik MTX dozunu tespit etmek için hem genç hem de daha olgun farelerle çalışmış her iki fare grubunda da yüksek dozlara rağmen uzun süre (12-18 ay) hayatta kalım süreleri gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu farelerle yaptıkları ileri araştırmalarda farelerin karaciğer ve akciğer dokularının normal kaldığı; farelerin bağırsaklarında folik asit sentezlediklerini tespit etmişler ve bu durum, MTX'i kısmen nötralize etmek ve böylece toksik etkilerini azaltmak için yeterli olabildiğini öne sürmüşlerdir. İnsan bağırsaklarında faredeki gibi folik asit sentezinin gerçekleşmemesi MTX deneyleri için fareleri uygun denek olmaktan çıkartmış araştırmacılar uygun bir deneysel model arayışında Wistar sıçanını seçerek çalışmalarını başarı ile gerçekleştirmişlerdir. Wistar sıçanlarında yaptıkları deneme sonucunda MTX'in dalak üzerindeki etkilerinin oldukça tutarlı olduğunu bildirmişlerdir.

MTX'in kanser ve romatoid artrit başta olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın kullanıma sahip olmasına rağmen yarattığı doku hasarları nedeniyle kullanımı çoğu zaman hastalarda istenmeyen sonuçlar doğurmaktadır. MTX'in oluşturduğu bu doku hasarlarının temelinde genel olarak vücutta oksidan/antioksidan dengesinin bozulması sonucu ROT artarak oksidatif stressin meydana gelmesi yatmaktadır.

Bu çalışmanın amacı güçlü antioksidan özellikleri ile bilinen Que ve LA'nın MTX ile oluşturulan dalak hasarına karşı olası iyileştirici etkilerini biyokimyasal olarak incelemektir. Çalışmamızda deneysel model olarak literatürle uyumlu Wistar sıçanları kullanılmış ve bu çalışma ile literatürde eksik olduğunu düşündüğümüz MTX kaynaklı dalakta oluşan oksidatif hasara ve antioksidan Que ve LA ile olası tedavisine ışık tutmak hedeflenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

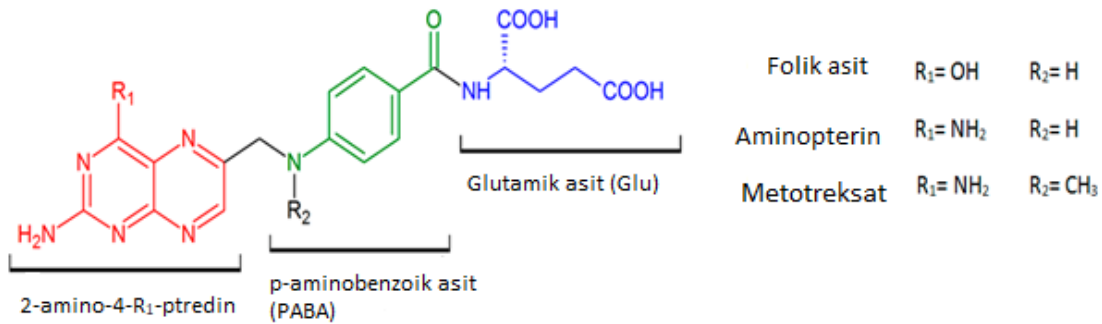
4.1. Metotreksat

MTX (4-amino-N10-metilpteroilglutamik asit), 1940'lı yıllarda ilk hedefi antikanser ajan olarak geliştirilen anti folat ilaçtır. Yapısal olarak folik aside çok benzerdir; yüksek oranda iyonlaşabilen iki karboksilik asit grubu içeren bir glutamik asit parçasına bağlı bir petridin-diamin çekirdeği ve bir p-aminobenzoil'den oluşur. Genel olarak etki mekanizması ise, DHFR enzimini ve dolayısıyla folik aside bağımlı pürin ve pirimidin, serin ve metiyonin sentezini inhibe ederek folik asidi antagonize etmektedir (Lucas ve ark., 2019; Karami ve ark., 2019).

MTX, akut insan lösemisi, meme kanseri, osteojenik sarkom, baş ve boyun karsinomları, prostat ve mesane kanserleri gibi çeşitli kanser türlerini tedavi etmek için yüksek dozda uygulanırken, romatoid artrit, sedef hastalığı, sarkoidoz ve sistemik lupus eritematozus gibi çeşitli otoimmün ve enflamatuvar hastalıklar için düşük dozda uygulanan geniş kullanım alanı olan bir ilaçtır (Karami ve ark., 2019).

4.1.1. Metotreksatın tarihsel süreci

MTX (eski adıyla amethopterin) ve aminopterin akıllı ilaç tasarımının ilk ürünleri olarak Harvard Üniversitesi'nde bir biyokimyacı olan Yellapragada Subbarow tarafından 1947 yılında, folik aside yapısal benzerlikleri ve folata bağımlı enzimleri inhibe etme kapasiteleri temel alınarak kanserlerin tedavisinde antikanser ajan olarak kullanılmak üzere geliştirilmiştir. (Cronstein ve Aune 2020; Karami ve ark., 2019)



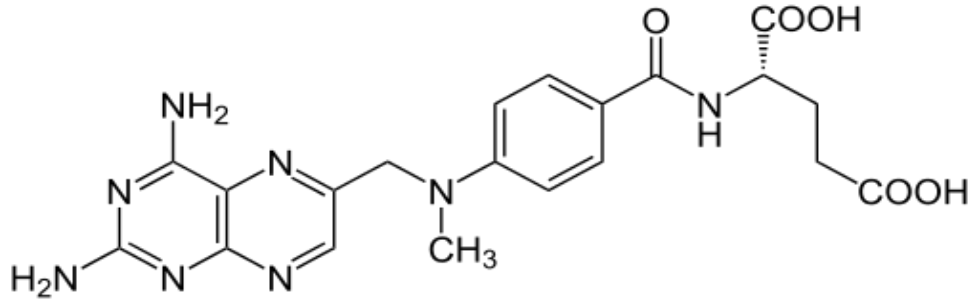
Şekil 1: Folik asit, Aminopeterin, MTX'in kimyasal yapıları ve yapısal benzerliklerinin gösterimi (Kozminski ve ark., 2020).

MTX ilk kez 1948'de yüksek dozlarda çocukluk dönemi akut lösemi ve diğer malignite formlarını tedavi etmek için kullanılmıştır (Ahmed ve ark., 2021; Cronstein ve Aune 2020). 1960'lar ve 1970'ler boyunca, düşük doz MTX tedavisi şiddetli sedef hastalığını tedavi etmek için giderek yaygın kullanılmaya başlanmış ve kullanımı romatoid artridli hastalara da yayılmıştır. 1980'lerin ortalarında, MTX romatoid artridli hastalarda başarıyla test edilmiş ve ardından 1988'de FDA tarafından romatoid artridli hastaların tedavisi için ruhsat alınmıştır. İlk onayından bu yana MTX kullanımı ve doktorların ilacın daha yüksek ve daha etkili dozlarını kullanma eğilimi doğurmuştur. Daha sonra ilacın oral biyoyararlanımının oldukça sınırlı olduğunun fark edilmesi; 2013 ve 2014 yıllarında romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere ilacın iki farklı parenteral (subkutan) formülasyonunun geliştirilmesine ve onaylanmasına yol açmıştır (Cronstein ve Aune 2020; Pekgöz, 2020).

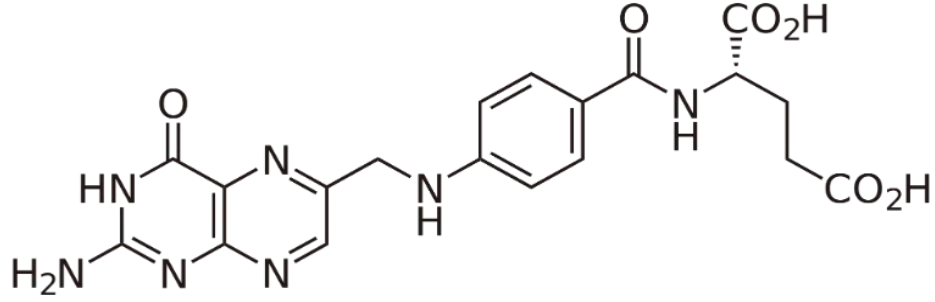
4.1.2. Metotreksatın kimyasal yapısı

MTX, kimyasal olarak N-(4(((2,4-diamino-6-pteridinil) metil) metil-amino) benzoil)-L-glutamik asittir. Folik asidin 4-amino-N10-metil analogu olan MTX amethopterin olarak adlandırılan anti folat terapötik grubuna ve Biyofarmasötik Sınıflandırma Sisteminin III. Sınıfına ait sentetik bir organik bileşiktir. MTX folik asidin (vitamin B9) anti metabolitidir, antikanser ajan ve immünsüpresan olarak görev yapmaktadır (Kozminski ve ark., 2020).

MTX, yüksek oranda iyonlaşabilen iki karboksilik asit grubu içeren bir glutamik asit parçasına bağlı bir petridin-diamin çekirdeği ve bir p-aminobenzoil bölümünden oluşmaktadır. Çözünürlüğü için nötr veya bazik çözeltiler gerektiğinden, çözünürlüğü pH'a bağlı olarak değişmektedir. Yapısında asimetrik bir karbonun varlığı, S ve R stereoizomerleri ile sonuçlanır ve S-MTX aktif form olarak kabul edilirken, R izomeri safsızlık olarak tanıtılır (Karami ve ark., 2019).



Şekil 2: MTX'in kimyasal yapısı



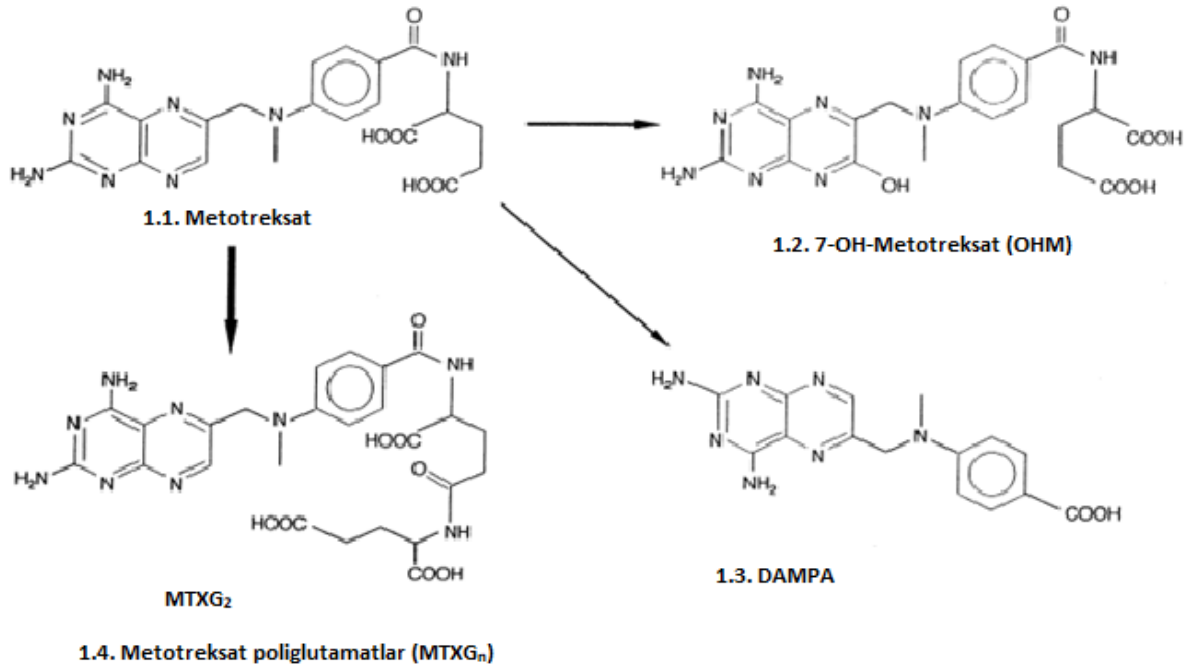
Şekil 3 : Folik asitin kimyasal yapısı

4.1.3. Metotreksatın farmakokinetik özellikleri

MTX, vücut büyüklüğüne, hasta yaşına ve takip edilen protokole bağlı olarak geniş dozlama varyasyonlarıyla; oral, intravenöz, subkutan, intramüsküler ve intratekal olmak üzere çeşitli yollarla uygulanabilmektedir. Besinler MTX'in absorpsiyonunu etkilemezken oral absorpsiyon, 30 mg/m²'ye kadar olan dozlara kadar uygulanabilmekte, 30 mg/m²'den daha yüksek dozlarda emilimin azalması nedeniyle ilaç intravenöz olarak uygulanmaktadır (Huffman, 1973; Shen ve Azarnoff, 1978). MTX'in serum yarılanma ömrü 6 ila 10 saat arasındadır ve serum MTX konsantrasyonları, oral uygulamadan 24 saat sonra saptanamaz. Subkutan MTX, oral MTX'e göre maksimum konsantrasyona ulaşması ve de yarılanma ömrüne ulaşması için geçen süre daha kısadır (Lucas ve ark., 2019).

MTX'in absorpsiyonundan sonra karaciğer hücre içinde tekrar serbest MTX'e dönüşen poliglutamat formuna dönüştürülür. MTX'in etkin formu olan MTX-poliglutamat dokularda uzun süre kalmaktadır (Kocaman, 2012).

MTX karaciğerde; aldehid oksidaz enzimi aracılığı ile %10 -15 oranında hidroksillenmiş bir bileşiği olan majör aktif metaboliti 7-hidroksimetotreksat (7-OH-MTX) dönüştürülürken bağırsakta, 2,4-diamino-N10-metilpteroik asit (DAMPA) ve glutamik aside metabolize edilir (Karami ve ark., 2019; Lucas ve ark., 2019). Vücuttan birincil atılımı bozulmamış ilaç formunda renal olarak atılır; daha düşük oranda diğer bir atılım yolu ise biliyer atılımla 7-hidroksi metaboliti formunda olmaktadır. (Lucas ve ark., 2019).



Şekil 4: MTX'in metabolit yapıları (Rubino, 2001).

MTX klirensi oldukça değişkenlik göstermekte olsa da yüksek dozlarda klirens azalmakta ve bu azalma MTX'in toksisitesinden sorumlu temel faktörlerden birisidir (Kocaman, 2012).

MTX ayrıca poliglutamasyona uğradığı kırmızı kan hücreleri tarafından da alınabilir ve hücre içinde taşınır (indirgenmiş folat taşıyıcılar yoluyla) ve daha sonra aktif poliglutaratlara metabolize edilir. Bu poliglutaratlar yavaş yavaş eritrositlerde birikerek hücre içinde tutulur ve 1-4 haftalık ortalama eliminasyon yarılanma ömrü gösterir (Karami ve ark., 2019; Lucas ve ark., 2019; Neuman ve ark., 1999).

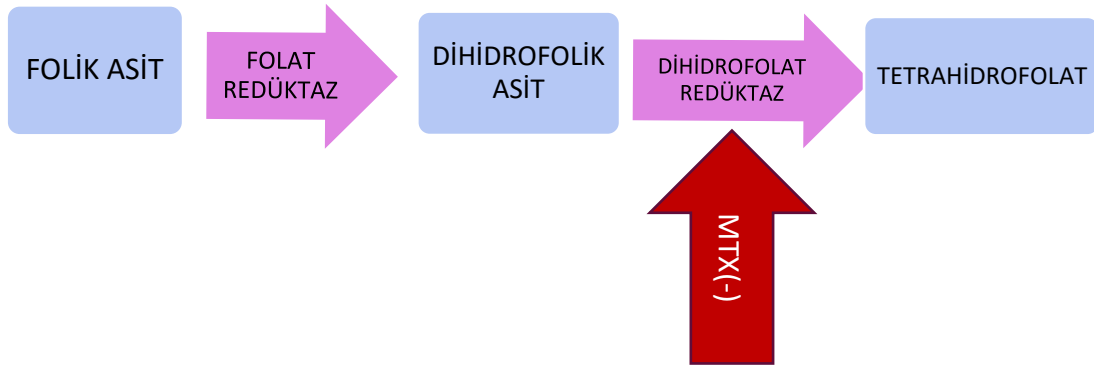
4.1.4. Metotreksatın etki mekanizması

Hücrelerin bölünmesi ve protein metabolizmasının sağlıklı bir şekilde işleyebilmesi için hücre içindeki folatların indirgenmesi gerekmektedir. MTX'in hedefi, dihidrofolatın (DHF) THF indirgenmesi için gerekli olan DHFR enzimini inhibe etmektir (Chabner ve ark., 1985).

THF, DNA zincirlerinin sentezi, onarımı veya replikasyonu için gerekli olan pirimidin ve pürin nükleotid sentez yollarındaki çeşitli transmetilasyon reaksiyonlarında önemli bir koenzim olarak hizmet eder. Aslında, metil-THF, DNA'ların, RNA'ların, proteinlerin, fosfolipitlerin ve amino asit sentezlerinin sayısız metilasyon reaksiyonlarında proksimal metil donörü görevi

görür. Hücre içi THF üretiminin inhibisyonu MTX tarafından hücre proliferasyonunun bozulmasına ve metabolik dengesizliğine neden olur (Kozminski ve ark., 2020).

MTX'in moleküler yapısı DHFR enzimine benzerdir; MTX'in yapısında birden fazla metil grubu vardır ve DHF'deki OH grubu yerine NH₂ bulunur. MTX DHFR enzimine folik asitten daha fazla afinite ile bağlanarak folik asidin (S-fazı sırasında DNA sentezi için gerekli bir molekül olan) THF'ye dönüşümünü sınırlar (Neuman ve ark., 1999).



Şekil 5: Folik asidin THF'ye dönüşümü sırasında MTX etkisi.

MTX, DHFR enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe eder ve metiyonin, timidilat ve pürin biyosentezinde çok önemli bir rol oynayan indirgenmiş folatların tükenmesine yol açar. THF üretiminin baskılanması ile nükleotitlerin indirgenmesi, kanserli hücrelerde DNA sentezini baskılar. MTX'e maruz kalan hücrelerin, indirgenmiş folatların tükenmesinden öldüğü varsayılmaktadır. (Chabner ve ark., 1985; Karami ve ark., 2019). MTX, DHF metabolitleri ve MTX'in poliglutamat formları tarafından folat bağımlı enzimleri de (timidilat sentaz) inhibe eder (Karami ve ark., 2019). Ayrıca THF aracılı metilasyonun sürekli azalması, romatoid artritli hastaların hücre dışı sıvılarında ve lenfositlerinde spermin ve spermidin poliaminlerin birikimini azaltır. Bu poliaminler, lenfositlerdeki temel hücresel büyüme faktörlerindendir. MTX etkisi, romatoid artritli hastalarında T hücresi proliferasyonunu ve immünoglobulinlerin veya romatoid faktörün sentezini inhibe etmektedir (Kozminski ve ark., 2020).

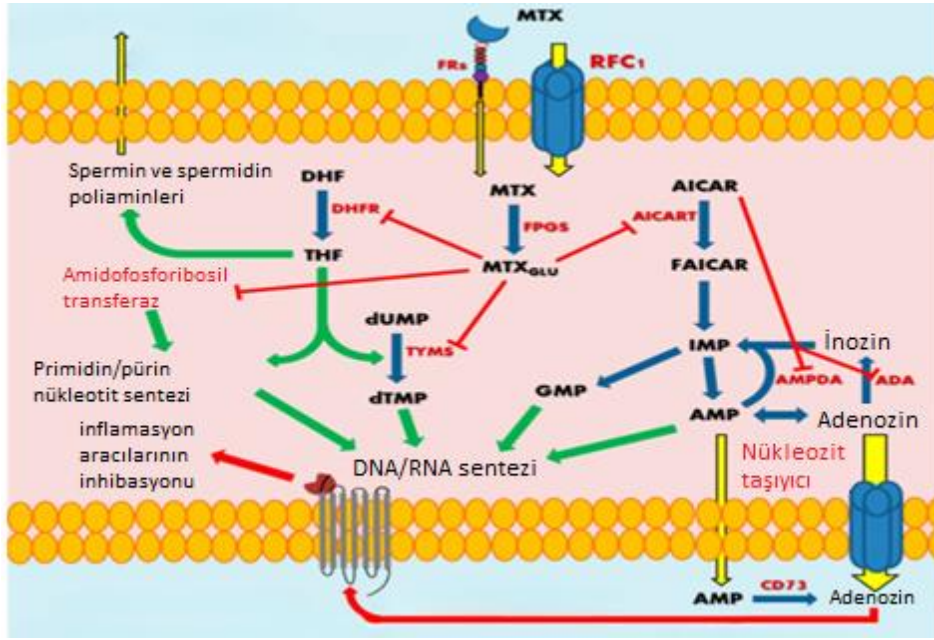
MTX oldukça iyonize olur ve genellikle hidrofiliktir. İlacın biyoyararlanımı ve biyodağılımı aktif taşıma sistemi tarafından belirlenir (Inoue ve Yuasa, 2014; Matherly ve Goldman, 2003). MTX'in bağırsak dokusuna adsorpsiyonu, proton-bağılı folat taşıyıcılar tarafından gerçekleşirken, hücre içine taşınımı esas olarak bir ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı olan

indirgenmiş folat taşıyıcı 1 tarafından olur. Daha az miktarda MTX ise, bağlı folatları ve folat konjugatlarını taşıyabilen glikosil-fosfatidil-inositol-bağlantılı membran proteinleri olan folat reseptörleri yoluyla, reseptör aracılı endositoz ile taşınır (Kozminski ve ark., 2020).

Fizyolojik folatların karaciğer, eritrositler ve çeşitli dokularda intraselüler olarak poliglutamil formlarına dönüştürüldüğü uzun yıllardır bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda önce eritrositlerin ve ardından insan karaciğerinin, alışılmadık bir gama-peptit bağlantısında glutamil gruplarının eklenmesi yoluyla MTX'i poliglutamat formlarına dönüştürdüğü kanıtlanmıştır (Chabner ve ark., 1985). Hücrelerin içinde, MTX poliglutamat formda depolanması uzun süreli ilaç uygulaması sonrasında MTX poliglutamatların birikmesine ve folat düzeylerinin düşmesine neden olabilir (Neuman ve ark., 1999). Hücre içi olarak MTX, folilpoliglutamil sentaz tarafından bir poliglutamat türevlerine metabolize edilir; bu, ilk MTX formuna kıyasla önemli ölçüde artmış hücrede kalış süresi ve biyoaktivite gösterir. MTX poliglutamatların bir diğer önemli özelliği, folat-bağımlı enzimler için belirgin şekilde artan afiniteye sahip olmalarıdır (Chabner ve ark., 1985; Kozminski ve ark., 2020).

Folat bağımlı enzimlerden; timidilat sentaz, indirgenmiş folatın çeşitli formlarını birbirine dönüştüren üçlü enzim kompleksi olan 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotit transformilaz ve amido-fosforiboziltransferaz pürin ve pirimidin nükleotitlerinin de novo biyosentezine katılır. Bu enzimler MTX poliglutamatlar tarafından inhibasyona uğrattılır (Chabner ve ark., 1985; Kozminski ve ark., 2020).

Hücrelerin MTX'in poliglutamatlarını oluşturma yeteneğinin tümü MTX'in sitotoksik etkisini artıran bir dizi sonucu vardır. İlk olarak, MTX'in bir poliglutamata dönüştürülmesi, hücre dışı ilaçla kararlı durumda olmayan bir ilaç depo formu oluşturur. Böylece, bu dönüşümü gerçekleştiren hücreler, DHFR enzimine bağlı olandan daha fazla, geniş hücre içi ilaç depolarını biriktirebilir. Dolayısıyla, poliglutamatların "serbest" konsantrasyonu, ana bileşiğin bağlanmamış hücre içi havuzundan çok daha fazladır. Poliglutamatlar hücreler tarafından tercih edilerek tutulur. Hücre dışına serbest ilaç çıkarıldığında, bağlanmamış önemli bir kısmı hücreden kaybolur. Daha yüksek poliglutamatların tutulması, zincir uzunluklarının doğrudan bir fonksiyonudur. Dolayısıyla, bağlanmamış MTX glutamatların çoğu, hücre dışı ilacın çıkarılmasından sonra en az 24 saat hücrelerde kalır ve DHF, DNA sentezi ve hücre canlılığı üzerinde inhibe edici bir etki göstermeye devam eder (Chabner ve ark., 1985).



Şekil 6: MTX'in hücre içine alınımı ve etkilediği yollar (Kozminski ve ark., 2020). MTX: metotreksat; MTXGlu: poliglutamatlı metotreksat; FR: folat reseptörleri; RFC1: indirgenmiş folat taşıyıcısı 1; DHF: dihidrofolat; FPGS: folilpoliglutamil sentaz; DHFR: dihidrofolat redüktaz; THF: tetrahidrofolat; dUMP: deoksiüridin monofosfat; TYMS: timidilat sentaz; dTMP: deoksitimidin monofosfat; DNA: deoksiribonükleik asit; RNA: ribonükleik asit; AICAR: 5-aminoimidazol-4 karboksamid ribonükleotid; AICART: 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid transformilaz; GMP: guanozin monofosfat; FAICAR: 5-formamidoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid; AMPDA: adenosin monofosfat deaminaz; ADA: adenosin deaminaz; AMP: adenosin monofosfat; CD73 :ekto-50-nükleotidaz. Yeşil oklar uyarımı, kırmızı oklar ve çubuklar inhibisyonu, mavi oklar biyokimyasal dönüşümü, sarı oklar göçü temsil eder.

Sonuç olarak, MTX poliglutamatlar DNA sentezi bozukluklarına ve ardından hücre apoptozuna yol açar. MTX aktivitesinin, aktif olarak bölünen hücrelerde, özellikle hücre döngüsünün S fazında en fazla olması ve aslında yüksek oranda çoğalan kanser hücrelerinin bu ilacın sitotoksik etkisine duyarlı olması, bu ilacın antagonizmasına işaret eder (Kozminski ve ark., 2020).

4.1.5. Metotreksatın kullanım alanları ve yan etkileri

Anti-folatlar, 19. Yüzyılın ortalarından itibaren klinikte ilgi ile kullanılan birinci sınıf anti-metabolitlerdir. Folat antagonistleri ise geliştirilen ilk antineoplastik ajanlardandır. 1948'de folik asidin 4-amino türevi (aminopterin; MTX) ilk olarak çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemide remisyon sağlamak için kullanılmış daha sonra araştırmacıların ilgisini çekerek günümüze kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaya devam etmiştir (Cronstein ve

Aune 2020). MTX günümüzde modern kanser tedavisinin önemli bir bileşenidir. MTX, ilk uygulaması olan akut lenfoblastik lösemi tedavisinde günümüzde, tek başına veya diğer ilaçlarla birlikte hem merkezi sinir sistemine yayıldığında hem de oradan vücudun farklı bölgelerine yayılmasını önlemek için ve ayrıca diğer hematolojik maligniteleri olan insanları tedavi etmek için FDA tarafından onaylıdır. MTX ayrıca; beyin tümörleri, meme kanseri, hepatom, akciğer kanseri, lenfomalar, bazı baş, boyun ve özofagogastrik karsinom türleri, mide kanseri, diğer organlara yayılmamış osteosarkom gibi birçok kanser türünün tedavisinde de kullanılması onaylanmıştır. Organ nakilleri veya birincil tümör cerrahisi, prostat ve mesane kanserleri veya gebelik trofoblastik neoplazisi sonrasında da kullanımı mevcuttur (Kozminski ve ark., 2020).

Bu geniş tedavi yelpazesine ve yaygın kullanımına rağmen MTX'in etkin konsantrasyonu ve minimum toksik konsantrasyonu oldukça küçüktür ve ilacın çok dar bir terapötik aralığı vardır. Bu nedenle etkin kullanım için ilacın farmakokinetiğini izlemek ve toksisite riskini azaltmak için MTX'in terapötik ilaç izlemesine ihtiyaç vardır. Ayrıca özellikle aspirin, ibuprofen veya naproksen gibi diğer ilaçları düzenli olarak alan hastalarda yan etki riski dahada artmaktadır (Kozminski ve ark., 2020; Lucas ve ark., 2019).

Ayrıca MTX'in etkinliği ve toksisitesi hücre içi MTX poliglutamatların miktarı ile doğrudan ilişkili olduğundan MTX'in romatoid artrit tedavisi, psöriazis, ankilozan spondilit ve kanserde farmakokinetik-farmakodinamik profilini değerlendirirken MTX poliglutamatların izlenmesi ve tedavinin buna göre değerlendirilmesi önemlidir (Karami ve ark., 2019).

Özellikle onkolojik tedavide uygulanan yüksek dozlarda kullanılan MTX büyük ölçüde hastanın tedavi süresine, yaşına ve durumuna bağlı olarak çok ciddi, yaşamı tehdit eden yan etkilere de neden olabilir. Genel olarak, yüksek dozlarda kullanılan MTX ile onkolojik tedavi sırasında, advers reaksiyon etkileri 1 ila 10 kişiden fazla (> %10) görülmektedir. (Karami ve ark., 2019; Lucas ve ark., 2019). Yüksek dozlarda kullanılan MTX, uzun süre uygulandığında kan hücrelerinin sayısında düşmeye, bağışıklık sisteminin aktivitesinde azalmaya, solunum yetmezliğine ve karaciğer hastalığı komplikasyonlarına (özellikle yaşlılarda, obez veya diyabetiklerde), ciddi cilt reaksiyonlarına, ağız, mide veya bağırsaklarda hasara ve hatta cenin zararına veya ölüme kadar çok ciddi yan etkilere neden olabilir (Tabassum ve ark, 2010). MTX esas olarak böbrekler tarafından elimine edilir ve klirens yaşa, ırka, cinsiyete, rejime ve böbrek fonksiyonuna göre büyük farklılıklar gösterir. Ayrıca MTX ve daha az çözünür metabolitleri olan 7-OH-MTX ve DAMPA idrarda çökmesine bağlı olarak renal toksisite meydana

gelebilir. Bu sebeple, MTX tedavisi alan hastanın sağlığının yakından izlenmesini ve gerekirse doz değişikliklerini, folik asit veya lökovorin (folinik asit) kurtarma uygulamasını ve hatta tedavi planından tamamen çekilmeyi gerektirebilir (Karami ve ark., 2019; Kozminski ve ark., 2020).

4.2. Dalak

2000’li yılların başına kadar tam olarak yapısı ve işlevi aydınlatılamayan dalak, Galen tarafından ‘bilinmeyenlerle dolu bir organ’ olarak tanımlarken, Pliny, Aristo, Plato gibi hekim ve filozoflar tarafından ise gerek ‘gereksiz organ’ gerekse gerçeğe yakın bir tanımlama olan ‘süzme organı’ gibi çeşitli tanım ve isimlendirmelerle anılmıştır. Bu dönemlerde duygu ifade eden ( fke, neşe, mizah vs.) kavramların kaynağı da dalak olarak görülmüştür. 20. yüzyıla gelene kadar dalağın yapısı ve işlevine ilave olarak enfeksiyonlardaki rolü aydınlatılamamış olup bu yüzyılın ortalarına doğru artan çalışmalarla gerekli önemi anlaşılmıştır ( rgil, 1994).

Lenfoid organlardan en büyüğü olan dalak insan vücudunda karın boşluğunun sol arka üst kısmında diyafram ve kaburgalar arasında yer almaktadır. Dalak büyüklüğü yaşa, cinsiyete ve boy uzunluğuna göre değişmekte olup bir yetişkinde ortalama dalak ağlığı 80-120 gr iken boyutları yaklaşık olarak 13 ila 15 cm uzunluğunda, 8 ila 10 cm genişliğinde ve 4 cm kalınlığına sahiptir (Kizir,2022).



şekil 7: İnsan dalağının görüntüsü (Güdek, 2020).

Dalak, immün ve hematopoetik sistemde aktif rol oynayan bir organdır. Dalak kanın filtre edilerek bakteri ve yabancı cisimlerin yok edilmesini sağlayarak immün sistemdeki görevini yerine getirirken ayrıca kırmızı kan hücreleri ve trombositlerin yıkım merkezi olup antikorla

kaplanmış veya hatalı üretilmiş olanları da filtre eder. Dalak aynı zamanda kırmızı kan hücrelerinin depolandığı organdır (Ulusoy ve ark., 2014).

Dalakta intrauterin dönemde eritrositler üretilir fakat doğumdan sonra bu hematopoetik yeteneği kaybolmaz, fakat faaliyetini durdurur. Bazı hastalıklarda (miyeloskleroz gibi) tekrar aktive olarak eritrosit üretimi başlayabilir (Eichner ve City, 1979; Ulusoy ve ark., 2014).

4.2.1. Dalak embriyolojisi

Embriyonik hayatın erken evresinde dalak dorsal mezenterden köken alır. Dalak; dorsal mezenter tabakaları arasında bulunan mezenkimal hücre kitlelerinden meydana gelmektedir. Bu mezenkimal hücreler farklılaşarak dalak pulpası, destekleyici bağ dokusu yapıları ve dalak kapsülünü oluşturur. Splenik arter bu ilk oluşan dalak yapısına birleşir ve arterioller bağ dokusu içerisinde dallanarak dalak sinusoidlerini meydana getirir (Kılıç, 2018).

Dorsel mezenter dalak tarafından iki parçaya bölünür, bunlar; splenogastrik ligaman ön tarafta ve arkada splenorenal ligamandır. Pankreas ise henüz retroperitoneal olmayıp, dorsal mezenter içerisinde yer almaktadır. Dorsal mezenterin dalak, splenik damarlar ve pankreası içeren parçası anterior retroperitoneal yüzeyle birleşmeye başlayarak ve gastrosplenik ligaman ve dalağın çıplak alanını meydana getirir. Eğer bu evrede birleşme tam olarak gerçekleşmezse, dalak retroperitona sadece uzun bir mezenterle tutunur ve mobil ya da "gezici" dalak oluşmuş olur. Yenidoğan döneminde ise dorsel menzenterin ayrılması tamamlanmış olup pankreas retroperiotenel duruma geçmiştir. Dalak dokusunu bir bölümü ise retroperitona birleşiktir. Pankreasın kuyruk kesimi dalak hilusu ile yakın ilişkilidir (İrgil,1994; Kılıç, 2018).

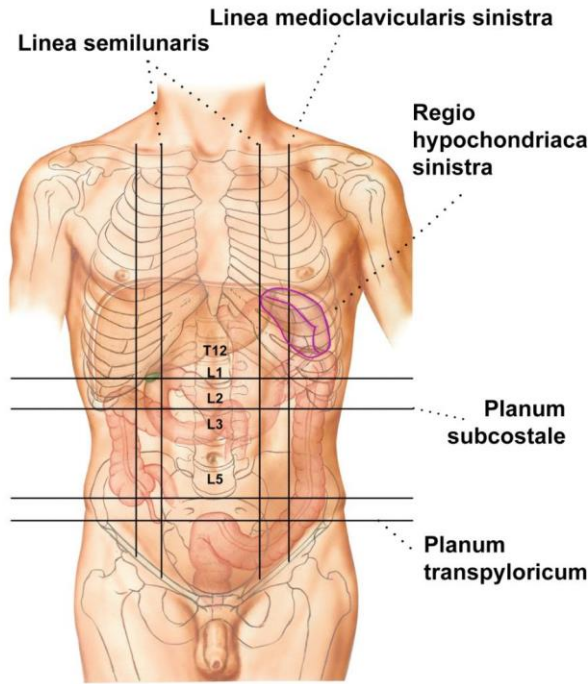
Splenik primordiumdaki mezenkimal hücreler dalak kapsülü, dalağın parankimini, bağ dokusu çerçevesini oluşturmak için farklılaşırlar. Dalak fonksiyonları geç fetal hayata kadar hematopoetik bir merkez olarak aktif bir şekilde sürdürür, yetişkin dönemde ise kan hücresi oluşumu için potansiyelini korur (Kılıç, 2018).

4.2.2. Dalak anatomisi

Erişkim sağlıklı bir insanda dalak koyu morumsu bir renkte, yumuşak dokuda, zengin vaskülarizasyonlu yapıda bir organdır. Konum olarak vücudun sol üst kadranda, diyafram altında, karında sol hipokondrium bölgesinde, arkada 9., 10. ve 11. kaburgalarla komşu diaphragma ve recessus costodiaphragmaticus ile ayrılmaktadır. Önünde mide ve pankreas, alt kısımda flexura colli sinistra, iç yan tarafında ise sol böbrek bulunmaktadır. Genellikle 9. ve

12. kotlar arasındadır ve dinlenim durumunda 10. kot dalak hilumunu çapraz olarak geçmektedir. (İrgil, 1994; Kılıç, 2018; Ulusoy ve ark., 2014)

Ortalama ağırlığı 150 gr olup, ağırlığı 80 gr ile 300 gr arasında değişmekte, boyutu ise ortalama 12x7x4 cm'dir. Yüksek oranda vasküler bir yapısı olduğu için kolayca yırtılabilen yumuşak strükture sahiptir. Dalak boyutu 13 yaşında maksimuma ulaşmaktadır. Dalağın hacmi sindirimden sonra artmakta ve yine vücudun beslenme durumuna göre değişiklik göstermektedir (Güdek 2020; İrgil, 1994; Toklu, 2017)



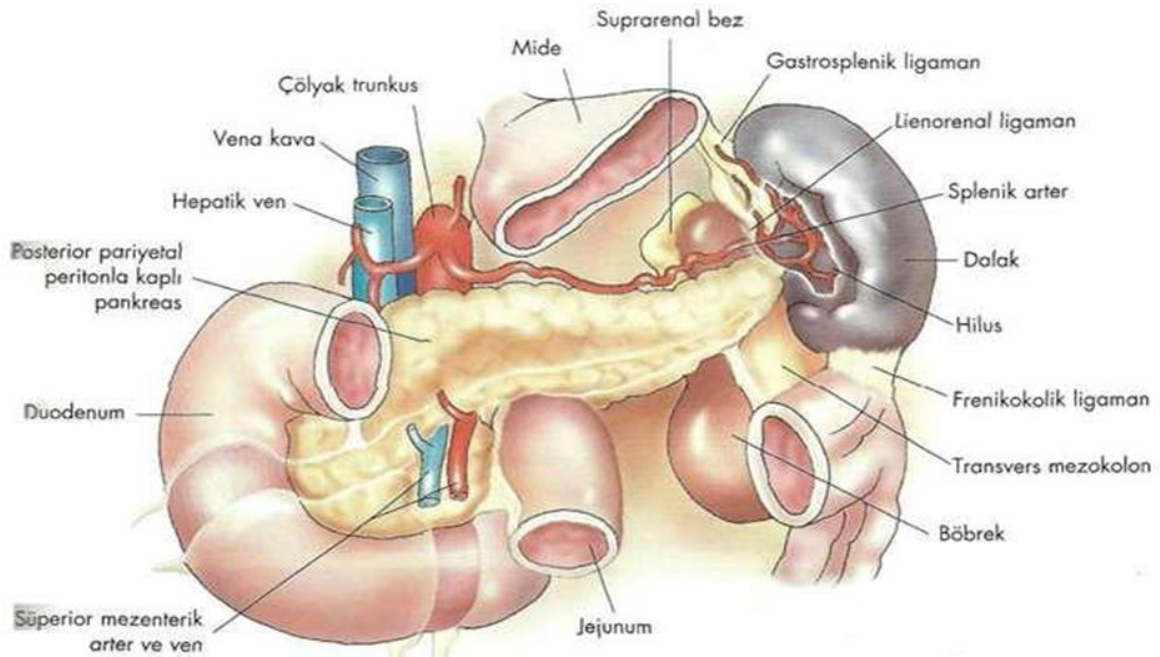
Şekil 8: İnsan vücudunda dalağın konumu (Güdek, 2020).

4.2.3. Dalak ligamanları ve kan damarları

Dalağın, diyaframa ve organlara bakan olmak üzere iki yüzü (facies diaphragmatica, facies visceralis), iki kenarı (margo superior, margo inferior) ve de iki de ucu (extremitas anterior, extremitas posterior) bulunmaktadır. Dalağın diyafragmatik yüzü; sol akciğer, sol plevra ve 9-11'inci kotlalarla komşuluk yapar. Visseral yüzü (organlara bakan); mide, sol böbrek, cauda pancreatis, ligamentum phrenicocolicum ve flexura coli sinistra ile komşudur ve hatta bazen sol suprarenal bezle komşuluk yapar (Güdek, 2020).

A.splenica (splenik arter) v. splenica (splenik ven) ve sinirlerinin geçtiği hilum splenicum dalağın organlara bakan yüzü olan visseral yüzde bulunmaktadır. Dalak, çölyak trunkusun en büyük dalı olan A. Splenica ile beslenir. A.splenica bursa omentalisin arka duvarından geçerek dalağa doğru uzanır ve dalağı saran tunica fibrosa tarafından kaplanır. A. splenica dalak içinde birden fazla kola ayrılarak dalağın beslenmesini sağlar. Ayrılan bu kollar hilumdan dalağa geçerek trabeküler arterleri meydana getirir. Trabeküler arterlerin devamı olan santral arterlerden çıkan penisillar arteriyollar ise kanı sinozoidlere taşır. V. splenica v.mesenterica inferior'la birleştikten sonra bu birleşime v. mesenterica superior katılır ve sonuç olarak v.porta hepatis oluşturmaktadır. Lenfatik drenaj ise; splenik hiler, splenik arteryel, pankreatik ve çölyak lenf nodlarında meydana gelmektedir (Güdek, 2020; Kılıç, 2018).

Dalak, sıkı bağ dokusu yapısında (fibröz) ince ve gergin bir kapsül ile sarıdır ve bu kapsülden dalak dokusunun derinine doğru yer yer anastomoz yapan uzantılar veya dalak iskeletini destekleyen trabeküller çıkmaktadır. Bu uzantılar hilus yakınında büyük damar dallarını da içerir. Kapsül ve damarlar histolojik olarak dalak iskeletini meydana getirir. Dalak parankimasında lenf damarı bulunmamakta ve esas itibarı ile kapsül ve trabeküllerin arasını dolduran retiküler bağ dokusundan oluşmaktadır. (Kazancı ve ark., 2013; Kılıç, 2018; Ulusoy ve ark., 2014)



Şekil 9: Dalağın diğer organlara komşuluğu, ligamanları ve damar yapısı (Toklu, 2017).

4.2.4. Dalak histolojisi

Diğer lenfoid organlar gibi dalak dokusu da retiküler dokudan oluşan bir ağ içine yerleşmiş lenfoid hücreler, makrofajlar ve antijen sunan hücrelerden meydana gelmiştir. Dalağı saran kapsül ve bu kapsülün organın iç kısımlara penetre olarak oluşturduğu trabeküller dalak iskeletini oluşturur. Bu iskeletin iç kısmına dalak pulpası denmektedir ve bu pulpa bağ dokudan oluşmakta ve içerisinde sadece birkaç düz kas hücresi bulunmaktadır (Kazancı ve ark., 2013; Kılıç, 2018).

Bir dalak kesitinde koyu kırmızı renkli kısımlar kırmızı pulpa, soluk renkte görünen kısımlar ise beyaz pulpadır. Dalak pulpasının büyük bir kısmı ise kan damarlarından zengin ve kanın filtre edilmesi görevinin yerine getiren kırmızı pulpadan oluşurken, kırmızı pulpanın etrafının çevreleyen T ve B lenfositlerden zengin gri-beyaz renkli lenfoid dokuya ise beyaz pulpa denmektedir. Bu iki pulpa arası ise marjinal zone olarak adlandırılmaktadır (Kazancı ve ark., 2013; Sills, 1987; Ulusoy ve ark., 2014).

4.2.4.1. Kırmızı pulpa

Dalak parankiminin büyük bir kısmını oluşturan kırmızı pulpa anastomozlar yapan arter ve vasküler sinüsler sistemidir. Bu pulpada temel olarak iki yapı görülmekte olup; ilki büyük dallara ayrılan ince duvarlı kan damarlarından oluşan dalak sinüsleri, ikincisi ise sinüsler arasında yer alan ve hücre dokuları birbirinden ayıran kordonlardır (Kazancı ve ark., 2013). Kırmızı pulpaya giren kanın büyük çoğunluğu retiküler liflerle (tip III kolajen) desteklenmiş gevşek bir retiküler hücre ağından oluşan dalak kordonlarına girmektedir. (Kılıç, 2018; Sills, 1987). Bu kordonlar fagositik retiküler hücreler ve endotelial makrofajlarla kaplıdır. Kordonlar komşu venöz sinüslerle aynı bazal membranı paylaşır. Damarlardaki kan, endotelial sinüs hücreleri arasındaki 1 ila 5/ μ m'lik pencerelerden veya yarıklardan venöz sinüslere geçmektedir. Sinüslere girdikten sonra kan, splenik ven yoluyla dalaktan çıkar. Bu rota "açık" bir sirkülasyon olarak kabul edilir. Kırmızı posanın kan akışının çok daha küçük bir yüzdesinin, "kapalı" bir dolaşım yoluyla arteriyollerden doğrudan venöz sinüslere giden kordonları atladığı düşünülmektedir. Kırmızı pulpada filtre edilen kan splenik vene boşalır ve hepatik veni oluşturmak üzere mezenterik venle birleşir. Splenik venöz sistemde kapak olmaması splenik vendeki basınç artışının portal vene doğrudan yansımalarının sebebidir (Kazancı ve ark., 2013; Sills, 1987).

Kırmızı pulpanın birincil işlevi hem bakterilerin hem de partiküllü maddenin fagositozudur. Bunun yanı sıra anormal kan hücrelerinin ayıklanması ve çukurlaştırılması da gerçekleştirilir.

Kırmızı pulpada kordonlarda kan dolaşımı yavaştır. Kordonlara giren hemokonsantre kanın akışı, venöz sinüslere çıkış için mevcut olan sınırlı sayıda fenestrasyon nedeniyle yavaşlar. Kordonların içindeki aktif fagositik hücreler, sınırlı oksijen ve glikoz kaynaklarını tüketerek eritrosit metabolizmasını zorlar. Bu, alyuvar deforme olabilirliğini azaltır ve fenestrasyonlardan ve kordonlardan dışarı kan akışını daha da yavaşlatır. Bu yavaş akış, dalağın hassas fagositik astar hücrelerinin partikül maddeyi alma, kan hücrelerini ayırma ve çukurlaştırma ve antikörle kaplı hücreleri tanıma ve çıkarma yeteneğini artırır (Kazancı ve ark., 2013; Sills, 1987). Kırmızı pulpa ayrıca bağışıklık yanıtlarında da rol oynar. İmmünolojik olarak aktif çözünür antijenleri beyaz pulpa doğrudan alır, ancak partikül halindeki antijenler genellikle kırmızı pulpa tarafından yutulur (Sills, 1987).

4.2.4.2. Beyaz pulpa

Beyaz pulpa, arteria centralis çevresinde yer alan lenfoid dokusundan oluşur. Trabeküler arterler, beyaz pulpaya giren merkezi arterlere dallanır. Beyaz pulpa, küçük arteriyel dalların etrafında kılıflar oluşturan yaygın ve nodüler silindirik lenfoid doku kütleleri halinde düzenlenmiş yoğun lenfosit (T ve B) ve monosit hücrelerini içerir. Bu periarteriyel kılıflar içinde ayrı germinal merkezler bulunur. Beyaz pulpanın ara kısımlarında ise antijen sunucu hücreler ve fagositik makrofajlar bulunur (Sills, 1987; Ulusoy ve ark., 2014)

Beyaz pulpanın birincil işlevi immünolojiktir ve yapısı bu amaç için idealdir. Dolaşımdaki antijenler beyaz pulpada makrofajlar tarafından fagosit edilir, antikör üretimi ve T lenfosit aktivasyonu ile immün yanıt oluşturulur. Beyaz pulpayı besleyen arter dalları santral arterlerden dik açılarla ayrılır. Akış dinamikleri, eritrositler marjinal bölgeye doğru ilerlemeye devam ederken, neredeyse saf plazmanın beyaz pulpaya kaymasına neden olur. Böylece çözünür antijenler, immün tanıma ve işleme için doğrudan immünolojik olarak aktif beyaz pulpaya iletilir. (Kazancı ve ark., 2013; Sills, 1987).

4.2.4.3. Marjinal bölge

Marjinal bölge beyaz ve kırmızı pulpa arasında, gevşek bir lenfoid dokuda sinüslerin yoğun olarak bulunduğu bölgedir. Plazma beyaz pulpaya sıyrıldıktan sonra, nispeten plazması tükenmiş kanın geri kalanı marjinal bölgeye geçer. İmmünolojik aktivitede önemli bir role sahip olan marjinal bölgede bol miktarda aktif makrofaj ve az sayıda lenfosit bulunmaktadır (Kılıç, 2018; Sills, 1987).

4.2.5. Dalağın Fonksiyonları

Dalağın bilinen birçok işlevi bulunmaktadır. Bunlar aşağıdaki tablo-1’de listelenmiştir.

Tablo 1: Dalağın bilinen fonksiyonları (Sills, 1987).

FİLTRELEME İŞLEVLERİ	Culling (Ayıklama) Pitting (Çukurlaştırma) Remodeling (Tadilat)
İMMÜNOLOJİK FONKSİYONLAR	Mikroorganizmaların ve antikor kaplı hücrelerin fagoitozisi Antikor sentezi Hücrel bağışıklık Lenfosit üretimi Tuftsın üretimi Tamamlayıcı yolların işlevi
REZERVUAR FONKSİYONU	
HEMATOPOETEZ	
DİĞER SPLENİK FONKSİYONLAR	Faktör VIII Üzerindeki Etkiler Demir metabolizması Serum anjiyotensin dönüştürücü enzim aktivitesi üzerindeki etkiler Epinefrit kaynaklı böbrek yetmezliği ve miyokard nekrozunun modülasyonuna dair deneysel kanıtlar (sadece hayvanlarda)

4.2.5.1. Filtreleme işlevleri

Dalağın bilinen fonksiyonları içinde en önemli görev sayılabilecek kanın filtrelene işlevi dalak tarafından gerçekleştirirken 3 temel adım bulunur, bunlar; culling (ayıklama), pitting (çukurlaştırma) ve remodeling (yeniden yapılandırma) işlevleridir (Sills, 1987).

4.2.5.1.1. Culling

Culling, dalağın yaşlanmış veya kusurlu kan hücrelerini tanıma ve çıkarma yeteneğini ifade eder. Bakteriler de dahil olmak üzere partikül maddelerin uzaklaştırılması da splenik bir

işlevdir. Yavaş kan akışının gerçekleştiği splenik kordonlarda yer alan hassas fagositik hücreler, anormal kan hücrelerini tanımlar. Bu splenik kordonlar ideal bir metabolik ortamdır. Normal ve deforme olabilen eritrositler sinüslere geçecek, ancak anormal hücreler culling edilecektir. Ortalama olarak eritrositler 120 günlük bir yaşamdan sonra osmotik dengelerini, membran bütünlüğünü kaybederler. Dalak, anormal kırmızı hücreleri ayırmada retiküloendotelial sistemin geri kalanından çok daha etkilidir (İrgil, 1994; Sills, 1987).

4.2.5.1.2. Pitting

Çukurlaşma, dalağın tüm hücreyi yok etmeden intraeritrositik inklüzyonları çıkarma yeteneğini ifade eder. Bu çıkarılan katı strüktürler; Howell-Jolly cisimcikleri (nükleer kalıntılar), çekirdekler, Heinz cisimcikleri (denatüre hemoglobin), siderotik granüller, yüzey çukurları ve sıtma ve bartoneia gibi hücre içi organizmalardır. Sinüsler, daha katı inklüzyonların geçişini geciktirerek rijid cisimcikler de fagositoya uğrar. Katı cisimlerden arınan eritrositler tekrar genel dolaşıma katılır (Eichner ve City, 1979; İrgil, 1994; Sills, 1987).

4.2.5.1.3. Remodeling

Dalak ayrıca aşırı membrana ve zayıf bir negatif yüzey yüküne sahip olan retikülositleri yeniden şekillendirerek, genç eritrositin işlevini geri kazanmasını ve hayatta kalma süresinin iyileştirilmesine izin verir. Normal dalakta 25 ml kadar kan bulunmakta ve eritrositler 120 günlük yaşam siklusunda en az 2 günü dalakta geçirirler. Olgun eritrositlerle karşılaştırıldığında, retikülositler; azaltılmış bir negatif yüzey yüküne sahiptir, daha az esnektir, gereksiz organelleri içerir ve daha büyük yüzey hacimlerine ve çaplarına sahiptir. Bu özellikler, retikülositin kemik iliği dışındaki ilk 2 gün boyunca kırmızı pulpa içinde tutulmasını sağlar. Burada hücre yeniden şekillenir ve hücrel organellerden arınmış, daha büyük bir negatif yüke, daha fazla esnekliğe ve daha az yüzey alanına sahip olgun bir eritrosit olarak ortaya çıkar (Eichner ve City, 1979; İrgil, 1994; Sills, 1987).

Artıklardan arınmış olan yeni kırmızı hücreler, mikro damar sisteminde dört ay boyunca dolaşmak için gerekli deforme olabilirliğe sahip olarak dalaktan salınır. Bu sürenin sonunda yaşlanan hücreler enzimatik aktivitelerini ve zar plastisitelerini kaybederler, böylece dalakta hapsolurlar ve yok edilirler (Eichner ve City, 1979).

4.2.5.2. İmmünolojik fonksiyonlar

Dalağın enfeksiyonlardaki rolü 1970'lerde splenektomi (dalağın çıkartılması) işlemi yapılan hastalarda sonra artan enfeksiyonlar ve buna bağlı artan ölümlerden sonra aydınlatılmaya başlanmıştır (İrgil, 1994).

Dalağın immünolojik fonksiyonları şunlardan oluşur:

1. Mikroorganizmaların ve antikor kaplı hücrelerin fagositozu
2. Antikor sentezi
3. Hücresel bağışıklık
4. Lenfositlerin üretimi
5. Tuftsin üretimi
6. Tamamlayıcı yollar üzerindeki etkiler (Sills, 1987).

4.2.5.2.1. Mikroorganizmaların ve antikor kaplı hücrelerin fagositozu

Dalak dokusunun yapısı fagositoz ve bağışıklık yanıtları için oldukça ideal bir bölgedir. Vücutta dolaşan tüm kanın dakikada %5'i dalağa ulaşmakta, kan yoluyla taşınan antijenik bilginin immün sisteme aktarılmasında dalak önemli bir merkezdir. Oponize olmayan taneciklerin fagositozu karaciğerde gerçekleştirilememektedir. Bu tanecikler ve kısmi oponize olanlar dalakta fagositoza uğramaktadır. Karaciğer oponize edilmiş bakterileri daha yüksek oranda temizleyebilse de, bunun başlıca nedeni karaciğerin çok daha büyük boyutu ve kan akışıdır. Hepatik kupfer hücreleri fagositoz için daha fazla antikor gerektirir çünkü yüksek fagositik etkinlik için temas süresi çok kısadır. Birim doku ağırlığı başına, dalak fagositoz için daha verimli bir bölgedir çünkü dalakta kanın yavaş sirkülasyonu, büyük ölçüde artan temas süresine ve gelişmiş fagositik etkinliğe izin verir. Dalak bakteriyel yayılımın erken döneminde ana direnç noktasıdır (Sills, 1987; van der Valk ve ark., 1984).

Bakteriler sistemik dolaşıma ulaştığında karaciğerde yerleşmiş monosit-makrofaj sistemi (RES) kritik bir rol üstlenir. RES içindeki gerçek klirens bölgesi, büyük ölçüde spesifik antibakteriyel antikorun varlığına bağlıdır, bu tür spesifik antikorların yokluğunda, bakterilerin hepatik klirensi son derece verimsiz hale gelir. Bununla birlikte, splenik fagositoz etkili olmaya devam eder (Sills, 1987).

Dalak ayrıca antikor kaplı kan hücrelerini de fagosit eder. İmmünoglobulin G (IgG) antikoru ile kaplı herhangi bir kan hücresi dalak tarafından saldırıya uğrar ve genellikle yok edilir. Çünkü

dalak monositleri, kan hücresini kaplayan IgG'nin Fc fragmanı için yüzey reseptörlerine sahiptir. Splenik makrofajlar, eritrosit membranlarının IgG ile kaplı kısımlarını çıkararak sonuç olarak zarın kaybı bir sferosit oluşturur. Bu sert form genellikle fenestrasyonlardan splenik sinüslere geçemez. Böylece sferosit dalakta sıkışıp kalır ve sonunda kordonlarda yok edilir. Aynı şekilde, sabit orak hücreler ve hemoglobin C hücreleri dalak gözeneklerinden geçemeyecek kadar katıdır ve dalaktaki dolaşımında yok edilir (Sills, 1987; Eichner ve City, 1979).

4.2.5.2.2. Antikor sentezi

En büyük lenfoid organ olan dalak, antikor üretiminin önemli bir bölgesidir. Dalak makrofajları ve kan arasındaki verimli temas, dalağa intravenöz antijenlerin işlenmesinde benzersiz bir rol sağlar. Splenik makrofajlar, bu tür antijenleri dalağın immünokompetan hücrelerine iletir ve humoral antikor üretimi ile sonuçlanır (Sills, 1987).

4.2.5.2.3. Hücresel bağışıklık

Dalağın hücresel bağışıklıktaki rolü açık bir şekilde tanımlanamamıştır. Çünkü asplenik hastalarda hücre aracılı bağışıklık çalışmaları sıklıkla çelişkili veriler sağlamıştır. T hücre reaktivitesinde değişken ve genellikle geçici bir azalma bildirilmiştir. B hücre fonksiyonunun arttığı veya değişmeden kaldığı kaydedilmiştir. Hayvan çalışmaları ise dalağın; T hücresi aktivitelerinde önemli bir rol oynayabileceğini ve katı tümör hücrelerine karşı konak savunması sağlamada rol oynayabileceğini göstermiştir (Sills, 1987).

4.2.5.2.4. Lenfositlerin üretimi

Doğumdan sonra, lenfopoez, normalde dalakta devam eden tek hematopoez şeklidir. Beyaz pulpada lenfositler ve plazma hücreleri üretilir, ancak dalaktaki lenfopoezin önemi veya derecesi bilinmemektedir (Sills, 1987).

4.2.5.2.5. Tuftsin üretimi

Bazı araştırmacılar tetrapeptit tuftsinin hem nötrofil hem de makrofaj fagositik aktivitesinin güçlü bir uyarıcısı olduğuna ve ayrıca insanlarda mononükleer hücrelerin göçünü uyardığını bildirmiştir. Tuftsinin, bir aşaması dalakta meydana gelen enzimatik bölünme ile IgG'nin Fc fragmanından kaynaklandığı düşünülmektedir. Anatomik veya fonksiyonel olarak asplenik olan bireyler hem düşük tuftsin seviyeleri hem de bozulmuş fagositoz yeteneği gösterirler. Konjenital tuftsin eksiklikler Staphylococcus aureus ile tekrarlanan enfeksiyonlarla ilişkilidir,

ancak *Streptococcus pneumoniae* veya *Hemophilus influenzae* gibi kapsüllenmiş bakterilerle ilişkili değildir (Sills, 1987).

4.2.5.2.6. Tamamlayıcı yolların işlevi

Komplement sistem, *S. pneumoniae* gibi bakterilerin fagositozunu teşvik etmede antikorla sinerji içinde çalışır. Kompleman komponent C3b'nin mevcudiyetinde, fagositoz için gereken IgG miktarı 100 kat azalır. Tipe özgü antikorun yokluğunda kompleman bağlanmasının rolü daha da önemlidir. Asplenik hastaların enfeksiyona yatkınlığı nedeniyle, dalağın kompleman sistemindeki rolü yoğun bir şekilde incelenmiştir. Asplenik hastalarda klasik kompleman yolu normal olmasına rağmen, bazı çalışmalarda alternatif yoldaki çeşitli anormallikler bildirilmiştir (Sills, 1987).

4.2.5.3. Rezervuar fonksiyonu

Dalağın rezervuar fonksiyonu trombositlerin depolanması ile sınırlıdır. Trombositlerin toplam %30'u dalakta depolanır bu havuz yaşam süresi 10 gün olan sirkülasyondaki trombositlerle devamlı değişim gösterir. Trombositler epinefrin gibi uygun uyarılarla salınmaya hazırdır. Ayrıca insanda dalakta, kırmızı hücre hacminin %5'inden daha azını temsil eden (20 ila 60 ml) eritrositlerde depo edilir. Bu eritrositlerin miktarı yalnızca patolojik durumlarda artar ve bu dalak rezervuarı eritrosit için önemli bir rezervuar değildir. Normal sağlıklı bir dalakta belirgin bir granülosit havuzu bulunmamaktadır (İrgil, 1994; Sills, 1987).

4.2.5.4. Hematopoez

Dalak, fetüste nispeten küçük bir hematopoez organıdır. Bazı lenfopoez dışında, doğumdan sonra gerçek hematopoez olduğuna dair çok az kanıt vardır. Şiddetli kemik iliği stresini takiben, dalakta küçük hematopoetik hücre kümeleri belirir. Bu kümeler muhtemelen stresli kemik iliğinden dışarı atılan ve daha sonra çoğalmalarının iki veya üç hücre bölünmesiyle sınırlı olduğu dalakta hapsolan dolaşımdaki hematopoetik tavanları temsil eder. İnsanda yalnızca miyelofibroзда gerçek dalak hematopoezi meydana gelir. Dalağın kemik iliği hematopoezi üzerinde bir miktar humoral kontrole sahip olabileceği öne sürülmüştür. Bazı çalışmalar, eritroid ve miyeloid öncü hücrelerin dağılımı ve proliferasyonu üzerinde dalak etkisinin olduğunu ima etmiştir. Ayrıca dalağın kan hacmini kontrol etmedeki potansiyel rolü de öne sürülmüştür (Sills, 1987).

4.2.5.5. Diğer splenik fonksiyonlar

Dalağın ek işlevleri şunları içerir:

- 1) Faktör VIII üzerindeki etkileri; dalak, stres, epinefrin ve l-deamino-8-D-arginin vazopressinin etkisi altında meydana gelen salınım ile Faktör VIII için bir depolama alanı olarak kabul edilmiştir. Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarla dalağın rolünün sadece depolama olmadığını, bunun yerine dalak, Faktör VIII'in pıhtılaştırıcı aktivitesinin (Faktör VIII:C) kısmen aktif olmayan bir formunu aktive etmeye yardımcı olduğunu göstermektedir. Dalak, RES'in diğer bölümlerinde olduğu gibi, Faktör VIII antijenini ve Faktör VIII:ristosetin kofaktör aktivitesini depolayabilir ve serbest bırakabilir.
- 2) Demir metabolizmasındaki rolü; dalak demirin yeniden kullanılmasına katılır. Dalak kordonlarında tahrip olan kırmızı hücrelerden elde edilen demir, plazmaya geri döner ve sonunda kemik iliğinde biriktirilir.
- 3) Serum anjiyotensin dönüştürücü enzim aktivitesi üzerindeki etkisi; splenektomiden sonra serum anjiyotensin dönüştürücü enzim seviyelerinde artış bulunur. Dalak, bu enzimin oluşumunu, serbestleşmesini veya bozulmasını düzenleyebilir. Bu düşüşün önemi ve enzim aktivitesi bilinmemektedir.
- 4) Deneysel epinefrin kaynaklı renal yetmezliği ve miyokard nekrozu; dalak, deneysel epinefrin kaynaklı böbrek yetmezliğini ve miyokard nekrozunu etkiler. Bu nedenle, splenektomize hayvanlar, epinefrin kaynaklı akut tübüler nekroz ve miyokardiyal nekroza koruma gösterir. Muhtemelen dalak, epinefrin infüzyonu sırasında plazma norepinefrin seviyelerini ve/veya renal prostaglandin E₂ aktivitesini modüle eden bir faktör salar. Bu fenomenin insanda meydana gelip gelmediği bilinmemektedir (Kazancı ve ark., 2013; Sills, 1987).

4.2.6. Dalak anamolileri

Yaralanmalarda, karın bölgesine alınan darbelerde en kolay hasara uğrayan organlardan biri de dalaktır. Dalak anamolileri anatomik ve fonksiyonel olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır. Aspleni, polispleni, aksesuar dalak, splenogonodal füzyon, gezici dalak anomalileri anatomik sınıflandırmaya dahil iken, portal hipertansiyon ve parazitozlarda oluşan hipersplenizm, splenektomi, sarkoidoz ve radyoterapi sonrası oluşan hiposplenizm vs. ise fonksiyonel sınıflandırmaya dahildir. Trombositoz ve lökositoz ise dalağın rezeervuar işlevi sekteye uğradığında gelişen hastalıklardır (Kazancı ve ark., 2013; Şenyüz, 2010).

4.3. Lipoik Asit

SR'lerin diabetes mellitus, katarakt ve karaciğer sirozu gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca kanser, romotoid artrid gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan MTX ve benzeri ilaçların sebebiyet verdiği yan etkiler arasında oksidan moleküllerin meydana getirdiği harabiyetlerde yer almaktadır. Son yıllarda ise buna karşı olarak antioksidan moleküllerin terapötik amaçlı kullanımı yaygınlaşmıştır (Yapar ve Eskiocak, 2014).

LA tiotik asit olarak da bilinir ve bitki ve hayvan dokularında yaygın bulunur. Tiyol grubu içeren bu bileşik yapısındaki ditiyolan halkası sayesinde yüksek bir indirgeme özelliği kazanır. LA lipid ve sulu ortamda kolayca çözünmesi onun bağırsaklardan hızlı emilimini sağlar. Hücre içinde eksojen olarak alınmasının yanında insan vücudunda mitokondride sentezlenebilmektedir. LA kimyasal olarak R ve S olmak üzere 2 enantiyomerik formda bulunur. R-LA doğal olarak bulunurken S formu sentetiktir. Vücutta doğal olarak bulunan R-LA indirgenme yükseltgenme tepkimeleri ile birbirine dönüşerek dihidrolipoik asiti (DHLLA) oluşturur. LA/DHLLA çifti ise ideal antioksidan olarak tanımlanmaktadır (Morris ve ark., 1995; Yapar ve Eskiocak, 2014).

4.3.1. Lipoik asidin tarihçesi

LA insan vücudunda sentezlenebilmesine rağmen keşfi 1937 yıllarına dayanır. 1937 yılında yapılan çeşitli çalışmalarda, laktik asit bakterilerinin büyümesini stimüle edici olan asetatin yerinin alabileceği ve bu laktik asit bakterileri tarafından piruvatın oksidatif dekarboksilasyonu için gerekli olan kristal yapıdaki bir bileşik karaciğerden hazırlanmıştır. Daha sonra 1950'lerde asetat yokluğunda apo-piruvat dehidrojenazının bir aktivatörü olarak Streptococcus lactis'in büyümesi için oldukça aktif olan kalıntılar bulmuş ve bu kalıntılar 'lipoik asit' adı verilmiştir. Bu isim ise bileşiğin yağ çözücülerinde oldukça çözünür olması, asidik olması ve piruvatın oksidatif dekarboksilasyonu yoluyla yağ asitlerinin bir öncüsü olan asetat oluşumunda yer alması gerçeğinden türetilmiştir (Reed ve ark., 1951). Daha sonra moleküler yapının tespiti ile 1,2-ditiolan-3-pentanoik asit olarak adlandırılmıştır. Morris ve ark. (1994), yaptıkları çalışmada lipoik asiti; 'Escherichia coli'nin piruvat dehidrojenaz, α -ketoglutarat dehidrojenaz ve glisin parçalayıcı enzim komplekslerinin işlevi için gerekli olan, kovalent olarak bağlı disülfür içeren bir kofaktördür' olarak tanımlamışlardır.

4.3.2. Lipoik asit kaynakları

İnsan vücudunda doğal olarak sentezlenmesinin dışında eksojen LA kaynakları mitokondriyal kompleksleri bakımından zengin hayvansal dokular ve bitkisel kaynaklar sayılabilir. Hayvan dokuları arasında kaslı etler, karaciğer, dalak, böbrek, kalp, pankreas, beyin görece daha yoğun LA içerirken bitkisel kaynaklar ise; ıspanak, brokoli, domates, bezelye, brüksel lahanası, pirinç görece daha az LA içeren besinlerdir (Uygur ve ark., 2019).

LA normal beslenme kaynaklarından elde edilebilmesine rağmen, tipik Batı diyetinde kayda değer miktarlarda LA tüketilmesi olası değildir. LA'nın birincil kaynakları 50 ile 600 mg arasında değişen diyet takviyeleridir ve biyoyararlanımına ilişkin çoğu bilgi, takviyelerin kullanıldığı çalışmalardan gelir. Vücuda diyet takviyesi olarak alınan LA'nın biyoyararlanımına dair yapılan farklı çalışmalarda; LA'yı tüketirken serbest asit veya tuz formunda olması ve yemekle birlikte alınıp alınmadığı, birlikte alınan besinlerin emilimine etkisi, hücre içine taşınımında çoklu taşıyıcı proteinlere bağlı değişkenlik gösterebileceği, ortamda bulunan tuzlardan ve pH'a bağımlı inhibasyonlardan etkilenebileceğini tespit edilmiştir (Shay ve ark., 2009).

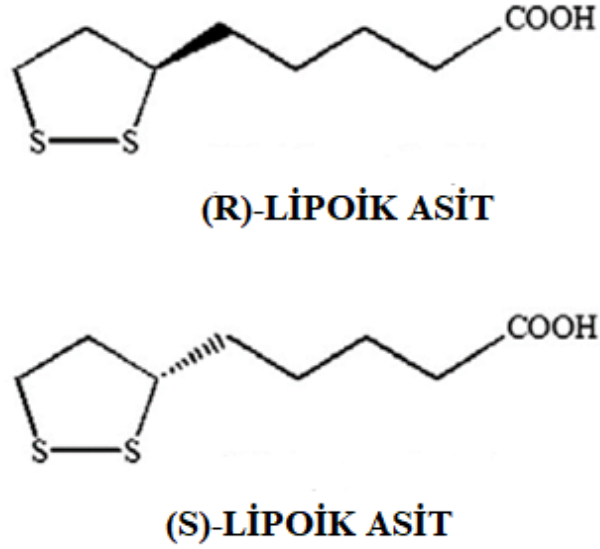
4.3.3. Lipoik asidin kimyasal yapısı ve sentezi

LA, diğer adıyla tiyotik asit, ilk olarak vitamin olarak sınıflandırılmış, daha sonra insan ve hayvan vücudunda sentezlediği keşfedilmiştir (Packer ve ark., 1995). LA diyetle yeterli miktarda bulunmasına rağmen, mitokondride bulunan lipoik asit sentaz tarafından sentezlenebilmektedir (Tabassum ve ark., 2010; Yapar ve Eskiocak 2014).

LA, oktanoik asit ve sisteinden mitokondride enzimatik olarak sentezlenen, doğal olarak oluşan bir ditiol bileşiğidir. LA, mitokondriyal α -ketoasit dehidrojenazlar için gerekli bir kofaktördür ve bu nedenle mitokondriyal enerji metabolizmasında kritik bir rol oynar. LA, senteze ek olarak diyet kaynaklarından bozulmadan emilir ve birçok dokuda geçici olarak birikir (Shay ve ark., 2009).

LA şekil 10'da görüldüğü gibi bir kiral merkeze sahip olup hem R- hem de S-enantiyomerik formları bulunmaktadır. Bununla birlikte, yalnızca doğal olarak bulunan R-LA, farklı mitokondriyal proteinlerin bir amid bağlantısından korunmuş lizin kalıntılarının ϵ -amino gruplarına kovalent bağ ile bağlanır. Bu nedenle bu izoformu biyolojik sistemlerde bir kofaktör olarak gereklidir. Bu proteinlerin çoğu tipik olarak α -keto asitlerin oksidatif dekarboksilasyonunu (örn. piruvat dehidrojenaz, 2-okso-glutarat dehidrojenaz ve transketolaz)

ve glisin bölünmesini katalize eden mitokondriyal çoklu enzim komplekslerinin yapısında bulunmaktadır. LA bu çoklu enzim komplekslerinin kofaktörü olarak görev almakta ve krebs çemberinde ATP üretimi için karbon taşıyıcı olarak metabolik sürece katılmaktadır (Shay ve ark., 2009; Yürük ve Ayaz, 2014).

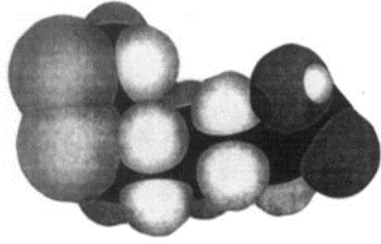
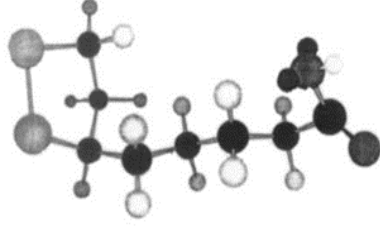
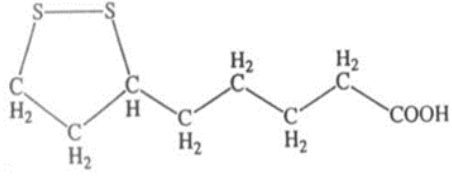


Şekil 10: LA'nın S ve R enantiyomer yapısı (Shay ve ark., 2009).

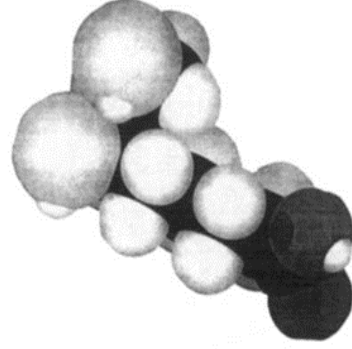
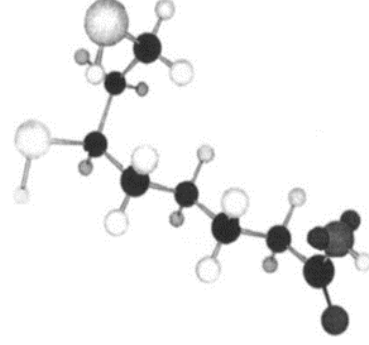
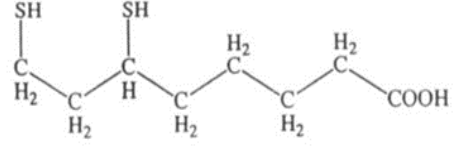
De novo sentezi, aracı metabolizmadaki rolü için gerekli tüm LA'yı sağlıyor gibi görünse de LA diyetten de emilebilir. LA'nın bir kofaktör olarak doğrudan rolleri iyi anlaşılmış olsada, diyet ile alınan LA'nın kesin metabolik fonksiyonları hakkında daha az şey bilinmektedir (Shay ve ark., 2009)

Diyet ile alınan LA ince bağırsaklardan emilerek karaciğere taşınır. LA'nın redoks tepkimeleriyle birbirine dönüşebilen okside ve redükte formlarda organizmada etki gösterir. LA'nın redükte formu olan DHLA biyolojik olarak LA'dan daha aktiftir. LA da ve DHLA da S- metilasyona ve β - oksidasyona uğrayabilir. Diyet ile alınan LA'nın yaklaşık %80'i idrarla atılır (Yürük ve Ayaz, 2014).

LA'nın kimyasal yapısı



DHLA'nın kimyasal yapısı



Şekil 11: LA ve DHLA'nın kimyasal yapıları (Packer ve ark., 1995).

4.3.4. Lipoik asidin biyolojik işlevleri

Bir maddenin iyi bir antioksidan olarak kabul edilmesi için; emilimin kolay olması biyoyararlanımının yüksek olması, dokularda, hücrelerde ve hücreler arası sıvıda konsantrasyonunu yüksek olması, sulu veya zar alanlarında veya iki ortamda da etki gösterebilmesi gerekmektedir. Bu kriterler göz önüne alındığında "ideal" bir antioksidanın bu kriterlerin tümünü karşılaması beklenir. LA/DHLA redoks çifti ideale yaklaşır ve "evrensel bir antioksidan" olarak anılmaktadır. (Packer ve ark., 1995).

LA'nın diyet ile alımında kolayca emilir, nispeten geçici ve düşük hücresel birikimine rağmen, çok sayıda araştırma, LA'nın güçlü bir antioksidan özellik göstermesinin yanında farklı işlevleri olduğunda kanıtlamıştır (Shay ve ark., 2009). LA vücuda alındıktan sonra muhtemelen birçok

dokuda hızla DHLA'ya dönüştürülür. Hem DHLA hem de LA metal şelatlama aktivitesine sahiptir. DHLA, diğer antioksidanlarla sinerjistik olarak hareket eder ve bu, diğer antioksidanları radikal veya inaktif formlarından yeniden üretebildiğini gösterir. Ayrıca, düzenleyici proteinler ve normal büyüme ve metabolizma ile ilgili genler üzerinde etkileri olabileceğine dair kanıtlar vardır. Bu antioksidan özellikler nedeniyle, LA'nın diyabet, iskemi-reperfüzyon hasarı, ağır metal zehirlenmesi, radyasyon gibi durumlarda terapötik bir ajan olarak kullanabileceğini gösteren bir dizi deneysel ve klinik çalışma yapılmıştır (Packer ve ark., 1995).

4.3.5. Lipoik asidin antioksidan özelliği

LA'nın antioksidan özelliği ilk olarak 1959'da C vitamini eksikliği olan kobaylarda iskobüt semptomlarının önlediği ve α -tokoferolden yoksun diyet ile beslenen sıçanlarda E vitamini eksikliği semptomlarını önlediği tespit edilmesiyle keşfedilmiştir (Packer ve ark., 1995).

Endojen ve eksojen SR oluşturma süreçlerinin sonucunda DNA, lipidler ve proteinlerin bozulmasına karşı LA'nın koruyucu bir etkisi olduğuna dair önemli miktarda kanıt bulunmaktadır (Tabassum ve ark., 2010).

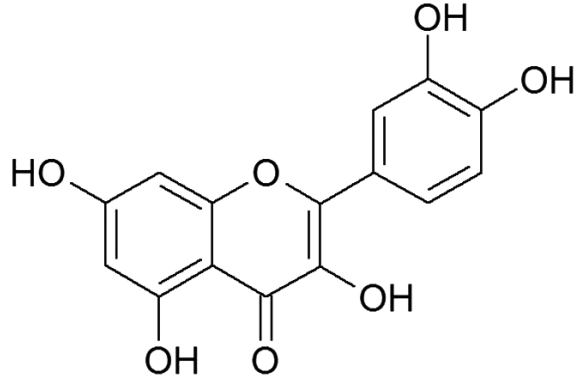
LA, küçük boyutu ve yüksek lipofilikliği nedeniyle biyolojik zarları kolayca geçerek hücrenin tüm bölmelerine ulaşır. LA'nın hem suda hem de yağda çözünmesi onu hücre zarlarındaki lipid peroksitler dahil olmak üzere SR'leri azaltmada ve aynı zamanda SR'leri mitokondriyal kaynaklarında temizlemede oldukça etkili kılar. LA'nın indirgenmiş formu olan DHLA'nın antioksidan etkinliği LA'dan daha fazla olmasına rağmen redükte DHLA ve okside LA formları hipokloröz asidi (HOCl), OH $\cdot$, ve singlet oksijeni ($^1\text{O}_2$) doğrudan temizler, H $_2\text{O}_2$ ise redükleyerek vücutta bulunan SR'leri temizler. Aşağıda yer alan tablo 2'de LA ve DHLA'nın antioksidan özellikleri verilmiştir. LA diyet yoluyla alındığında antioksidan özelliğinin yanında metal şelasyonu, GSH'ın rejenerasyonu, askorbik asid (vitamin C), vitamin E, ubikinol ve gibi antioksidanların yeniden oluşumunu sağlayarak hücrenin antioksidan kapasitesini arttırmaktadır. Ayrıca LA kan-beyin bariyerini geçme potansiyeli sayesinde bir beyin antioksidanı ve terapötik ajan olarak görev alabilir (Packer ve ark., 1995; Tabassum ve ark., 2010; Shay ve ark., 2009; Yapar ve Eskiocak, 2014).

Tablo 2: LA ve DHLA'nın reaktif oksijen ve nitrojen türlerini yakalama özellikleri (Yürük ve Ayaz, 2014)

ANTIOKSİDAN ÖZELLİK	LİPOİK ASİT	DHLA
Hidrojen peroksit	X	X
Singlet oksijen	X	-
Hidroksil radikali	X	X
Nitrik oksit radikali	X	X
Süperoksit radikali	-	X
Hipokloröz asit	X	X
Peroksinitrit	X	X
Peroksil radikali	-	X

4.4. Kuersetin

Kimyasal formülü $C_{15}H_{10}O_7$ olan (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) kuersetin (Que), flavonoidler grubuna ait ve bu grupta en çok üzerinde çalışılanlardan biri olan antioksidan özellikte flavonoldur. Diyet ile bitkilerden alınan flavonoid Que, üç benzen halkası ve beş hidroksil grubundan (şekil 12) meydana gelir ve yapısındaki bu farklı gruplar flavonoidlerin SR yakalama ve antioksidan özelliklerini kazandırır. Bir benzen halkasındaki o-dihidroksi (kateşol) grubu radikal hedef yeri olarak görev alırken diğer halkasındaki 4-okso grubu ile 2-3 çift bağı elektron delokalizasyonu için gereklidir. Hidroksil grupları ise maksimal radikal yakalama ve metal şelatlama yeteneği kazandırır. (Çetinel, 2002; Deepika ve Maurya, 2022; Kahraman ve ark., 2022)



Şekil 12: Que'nin moleküler yapısı (Andres ve ark., 2018)

Que genellikle farklı sebzelerde, meyvelerde, saplarda, çiçeklerde ve ağaç kabuğunda yaygın olarak bulunur. Çiçeklere rengini veren bileşiklerden olan Que kristalimsi, acı bir bileşiktir (Deepika ve Maurya, 2022).

Yapılan çeşitli in vivo çalışmalarda Que'nin SR oluşumunu azalttığından dolayı ksantin oksidazı inhibe etme yeteneğine sahip olduğunu göstermekte ve bu nedenle potansiyel bir antioksidan olarak kabul edildiğini bildirmektedir. Que'nin hidrojen atomlarını bağışlama ve ROT aktivitesini söndürme yeteneğine sahiptir ve hücre içi sinyal yolları ile doğrudan etkileşime girebilmektedir. Antioksidan olmasının yanı sıra Que anti kanser, anti alerjik, anti diyabetik, anti viral gibi birçok fonksiyona sahip biyolojik işlevi çeşitli olan bir flavonoiddir (Deepika ve Maurya, 2022; Reyes-Farias ve Carrasco-Pozo, 2019).

4.4.1. Kuersetinin tarihçesi

Que ilk olarak 1936 yılında Szent-Gyorgyi tarafından izole edilmiş ve tanınmıştır. Que, flavonoid bileşiklerinin altı alt sınıfından biri olan bir flavonol grubunda kategorize edilir. Que adı ise 1857'den beri kullanılmaktadır ve bu ad Latince bir terim olan “Quercetum”, “meşe ormanı” anlamına gelen kelimeden türetilmiştir. (Deepika ve Maurya, 2022; Li ve ark., 2016)

4.4.2. Kuersetin kaynakları

İnsan vücudunda sentezlenemeyen Que bitkilerde bol miktarda bulunur ve diyet yoluyla meyve ve sebzelerden alınır. Diyet ile alınan Que öncelikle glikozolit formlarıyla alınmaktadır ve bu çeşitli gıda maddelerinde farklı Que-glikozit formları şeklinde olmaktadır. En yaygın olarak elma, çilek, kiraz, soğan gibi farklı meyve ve sebzelerde büyük miktarlarda bulunurken kuşkonmaz, biber, brokoli, bezelye ve domateste küçük miktarlarda bulunur. Şifalı bitkilerden; Sambucus canadensis, Hypericum perforatum ve Ginkgo biloba'da bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca turuncgillerde, tohumlarda ve kabuklu yemişlerde ve kırmızı üzümlerde bulunduğu

bilinmektedir. Soğan en yüksek Que miktarına sahip olduğu bilinmekte olup ayrıca soğanını en dış halkaları ve köke yakın kısımları görece daha yüksek konsantrasyonda Que içermektedir. Que'in ayrıca dereotu, belirli çay çeşitleri, şaraplar, çeşitli bitki ve çiçek özlü ballar gibi bitki bazlı yiyecek ve içeceklerde de bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca yapılan bir çalışmada organik domateslerin, kimyasal olarak yetiştirilenlerden %79 daha fazla miktarda Que içerdiğini tespit edilmiştir. Diyet ile alınana gıdalarda belirlenen en yüksek ve en düşük Que miktarları; yüksek konsantrasyonda çiğ kaparıde (234 mg/100 g), en düşük konsantrasyon ise siyah veya yeşil çayda (*Camellia sinensis*) (2 mg/100 g)'dır (Andres ve ark., 2018; Deepika ve Maurya, 2022; Li ve ark., 2016).



Şekil 13: Que içeren bazı meyve ve sebzeler (Deepika ve Maurya, 2022).

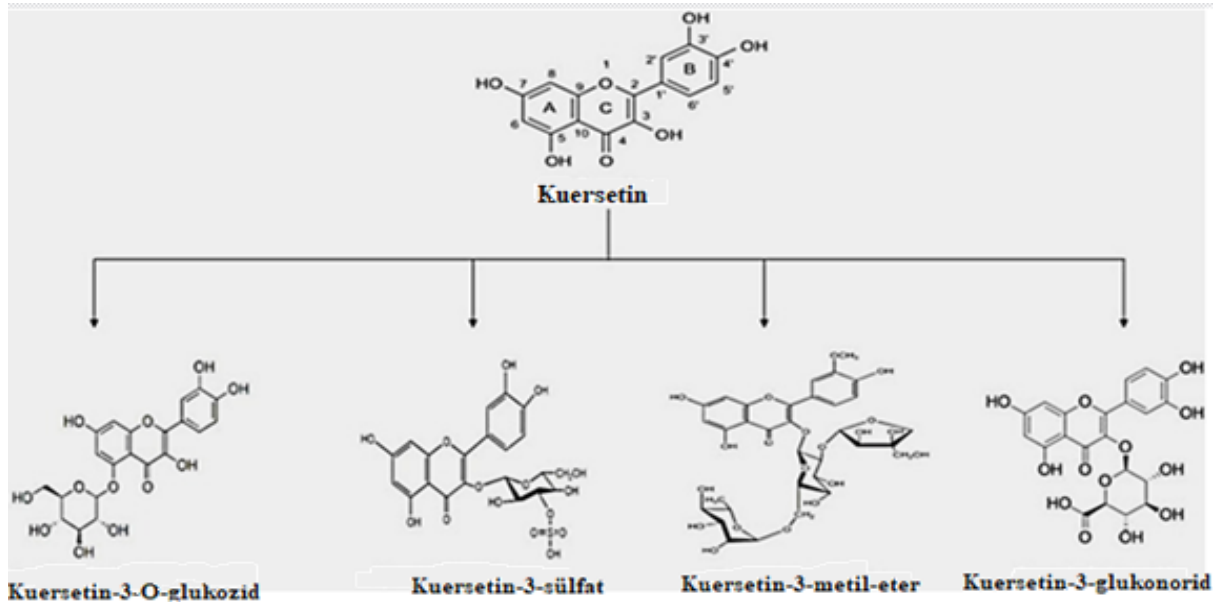
Que, batı diyetinde en yaygın diyet flavonollerinden biridir. ABD Sağlık ve İnsani Hizmetler Departmanına göre, insanlarda Que'nin ortalama günlük alımı yaklaşık 25 mg'dır. Fakat dünya genelinde ülkelerin kültürüne bağlı diyet alışkanlıklarının değişmesi, Que kaynaklarının farklı oluşu, yaz ve kış beslenme değişikliği gibi faktörlerle Que'nin diyet yoluyla alım miktarı değişkenlik göstermektedir (Li ve ark., 2016, Reyes-Farias ve Carrasco-Pozo, 2019).

4.4.3. Kuersetinin yapısı

Bitkilerde flavonoid Que'nin sentezi amino asit fenilalanin ile sinamik asidin birleşmesiyle ilk adımı gerçekleşen fenilpropanoid yolu ile meydana gelmektedir (Deepika ve Maurya, 2022).

Que'nin ($C_{15}H_{10}O_7$) Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) terminolojisine göre adlandırılması 3, 3', 4', 5, 7-pentahidroksiflvanon'dur. Que'nin 3, 5, 7, 3' ve 4' konumlarına

bağlı bir hidroksil (OH) grubu bulunmaktadır. Que flavonol grubunun bir üyesidir ve doğada bol miktarda bulunan bir polifenoldür. Yapı, iki benzen halkasından oluşan ortak bir flavon çekirdeğini paylaşarak bir heterosiklik piron halkası ile birbirine bağlanır. Que yaygın olarak glikozitler halinde, yani şeker kalıntılarıyla konjüge formda bulunur. Que'nin yapısı ve metabolitleri şekil 14'de gösterilmiştir (Deepika ve Maurya, 2022; Li ve ark., 2016a).



Şekil 14: Que'nin yapısı ve metabolitleri (Deepika ve Maurya, 2022).

Que parlak limon sarısı renginde, iğne görünümünde kristal yapılıdır. Suda çözünürlüğü çok az iken lipid ve alkolde iyi çözünür (Hosseini ve ark., 2021; Li ve ark., 2016a).

Que bağlı bir şeker içermeyen bir aglikondur fakat OH gruplarından birinin (genellikle 3 konumunda) yerine bir glikozil grubunun (rutinoz, ramnoz veya glikoz, gibi bir şeker) eklenmesiyle bir Que glikozit oluşabilir. Bu bağlanan glikozil grubu çözünürlüğü, emilimini ve in vivo etkileri değiştirebilmektedir. Que'ye bağlı glikozil grubunun varlığı, Que aglikonla kıyaslandığında suda çözünürlüğü de attırmaktadır (Li ve ark., 2016a).

Ayrıca bu bağlı glikozil formları çoğunlukla Que'nin hidrofilik özellik kazanmasına ve emilimini engelleyerek oral biyoyararlanımının düşük olmasına neden olmaktadır. Que absorpsiyonu ise glikozitin aglikon formuna hidrolize edilmesinden sonra artış (%65-81'e kadar) göstermektedir (Deepika ve Maurya, 2022).

4.4.4. Kuersetinin biyolojik işlevleri

Que'nin çeşitli biyolojik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Antioksidan bir bileşik olmasının yanı sıra anti-mutajenik, anti-kanser, anti-diyabetik, anti-iskemik, anti-alerjik anti-trombotik, antiinflamatuvar ve anti-viral etkilerinin yanında damar sertliği ve koroner kalp hastalığı üzerindeki önleyici etkileri ve hücresel bağışıklığın uyarılması gibi birçok biyolojik işlevi de bulunmaktadır. Yapılan in-vivo çalışmalarda Que'nin birçok kanser hücrelerinin inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, trombositler üzerinde topaklanmayı önleyici etkiler ve anti-hipertansif etkiler gösterdiği bulunmuş, renal glomerüler hücre kültürleri ile yapılan başka bir çalışmada ise Que'nin antiapoptotik etkiler de gösterdiği bildirilmiştir (Erboğa ve ark., 2015; Reyes-Farias ve Carrasco-Pozo, 2019).

Que'nin anti-viral etkisi, viral proteinlere bağlanma yeteneğidir. Örneğin metil Que poliovirüsünün replikasyonunu hücresel protein sentezini bloke ederek önlediği bulunmuştur (Kahraman ve ark., 2002).

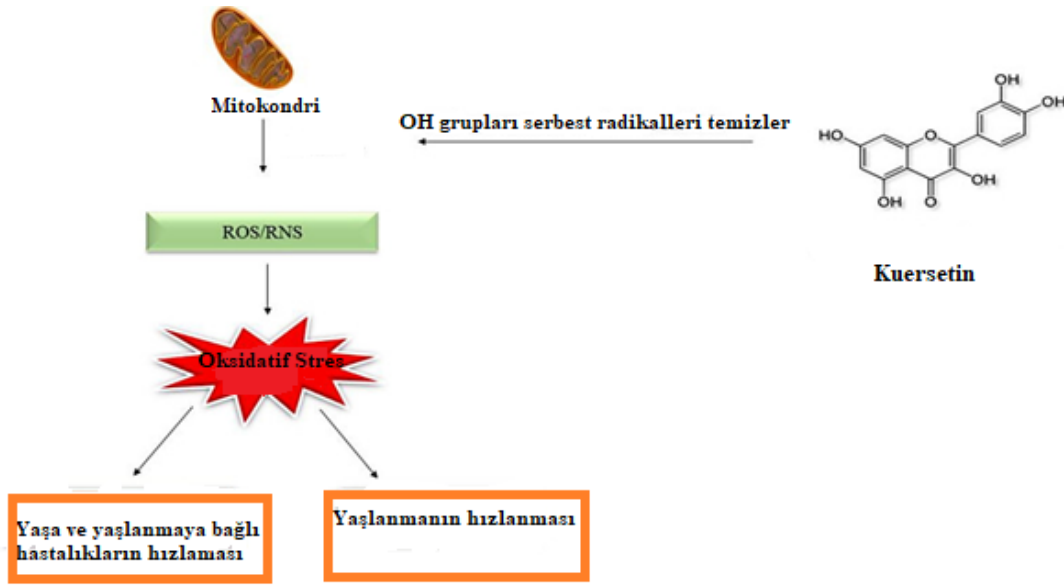
Diyabet olan hastalarda tedavi amaçlı Que uygulandığında kan glukoz düzeylerinde azalma, insülin düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir. Que ve diğer türevleri anti-trombotik özellik göstererek inme oluşumunu azaltırken ayrıca antioksidan özelliği sayesinde yaşa bağlı hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Que, ROT için güçlü bir temizleyicidir ve böylece vücudu oksidatif strese karşı korumaktadır. Que'nin hücre membranında yer alan lipid çift tabakasının stabilitesini ve akışkanlığını etkilediği ve ATP'ye bağımlı protein taşıyıcının aktivitesini de etkilediği bildirmiştir (Deepika ve Maurya, 2022).

Oral olarak alınan biyoflavonoidlerden Que emilimini kısıtlayan ana basamak intestinal atılımıdır. Farklı membran taşıyıcı türleri, çoklu ilaç dirençli protein ve meme kanseri direnç proteini dahil olmak üzere adenosin trifosfat bağlayıcı kaset süper ailesi taşıyıcıları, bazı flavonoidlerin bağırsak akışının düzenlenmesinde rol oynar ve dolayısıyla bu taşıyıcılar, sistemik dolaşıma emilen Que (flavonoidlerin) miktarı üzerinde etkilidir (Hosseini ve ark., 2021).

Que ve onun konjuge formları (Que glikozit, Que sülfat, Que eterleri ve prenilatlanmış Que) bir besin takviyesi olarak güvenli doz aralığı 1 g/gün şeklinde kullanılmaktadır (Deepika ve Maurya, 2022).

4.4.5. Kuersetinin antioksidan özelliği

Flavonoidler içinde yapısındaki toplam hidroksil grubu sayısı arttıkça oksijen tutma kapasitesinin arttığı bilinmektedir (Erboğa ve ark., 2015). Fenolik grubun ve çift bağın varlığı ayrıca yapısındaki hidroksil gruplarının sayesinde Que antioksidan özellik kazanır. Hidroksil grupları aktif hidrojen sağlayarak vücuttaki SR'leri (ROT ve RNT) inaktive eder ve böylece bu SR'leri oksitleyerek onları oldukça kararlı hale getirir ve bu nedenle doymamış yağ asidi oksidasyonunu önler (Deepika ve Maurya, 2022).



Şekil 15: Que'nin antioksidan özelliği (Deepika ve Maurya, 2022).

Que'nin konsantrasyonuna ve hücrenin redoks durumuna bağlı olarak hem antioksidan hem de pro-oksidatif özelliklere sahip olduğu belgelenmiştir. Çalışmalar, düşük konsantrasyonlarda bir antioksidan gibi davrandığını ve daha yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidanlar gibi davrandığını göstermektedir. Pro-oksidan özelliğinden tümörlerin büyümesinin önlenmesinde (kemoterapötik) yararlanılırken, antioksidan özelliği vücudun redoks dengesini korumaktadır (Deepika ve Maurya, 2022).

Kanser tedavisine yönelik yapılan bazı çalışmalarda Que ile yapılan ön tedavinin sonucunda Que'nin, H_2O_2 ile indüklenen ROT artışını bastırarak ve ölüm promotörünün fosforilasyonunu ve tümör nekroz faktörü reseptörü 1'in seviyesini önemli ölçüde aşağı yönde regüle ettiğini,

ayrıca Que, H₂O₂ ile muamele edilmiş Dalton lenfoma asit hücrelerinde protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu seviyesini arttırdığı kanıtlanmıştır (Reyes-Farias ve Carrasco-Pozo, 2019).

Yapılan hayvan ve hücre kültürü deneylerinde Que'nin GSH sentezinin indüklendiği tespit edilmiş ayrıca Que ön tedavisi ile SOD, KAT ekspresyonunda artış bildirilmiştir. Kapsamlı çalışmalar ise, Que'nin, DNA ile kovalent bağlanarak doğrudan DNA ile etkileşime girdiğini göstermektedir. Fakat Que'nin DNA'yı tamir edip etmediği veya onu oksidatif hasardan koruyup korumadığı tam olarak anlaşılamamıştır (Deepika ve Maurya, 2022).

Flavonoidlerin ve dolayısıyla Que'nin nörodejenerasyon sürecini geciktirerek nörodejeneratif hastalıkları önlemede yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Que lipid peroksidasyonunu azaltarak nöronların oksidatif hasarını önler. Nöronal hücreler, Que ile düşük konsantrasyonlarla (5 -10 µM) tedavi edildiğinde Que antioksidan olarak işlev görürken daha yüksek konsantrasyonlarla (20-40 µM ve daha fazlası) tedavide ise Que toksik etki gösterir (Deepika ve Maurya, 2022).

Que'nin antioksidan olma özelliğinin yanında diğer antioksidanları da (askorbik asit ve alfa tokoferol) rejenere ederek vücutta tekrar kullanılmasını sağladığı bilinmektedir. Bu yüzden de Que'nin askorbik asit (vitamin C) ve alfa tokoferolden (vitamin E) daha güçlü bir antioksidan olduğu düşünülmektedir (Kahraman ve ark., 2002).

4.5. Oksidatif Stres

Oksidanlar 20. Yüzyılın başlarında oksijenin bir elektron ile indirgenmesi çalışmalarını takiben H₂O₂'nin ve diğer oksidan moleküllerin keşifleriyle araştırmacıların dikkatini çekmiş, araştırmacılar oksijen aktivasyonunun biyokimyasına ve ROT'un biyolojik önemine büyük bir ilgi ile odaklanmışlardır (Sies, 1986). 1956 yılında Denham Harman SR-yaşlanma teorisini ortaya koymuş ve bu teoride endojen olarak üretilen reaktif oksidanların, yaşlanma fenotipiyle sonuçlanan makromoleküllerde kümülatif oksidatif hasara neden olduğunu varsaymıştır. (Harman, 1956; Zhang ve ark., 2015). Daha sonra oksidatif stres 1985 yılında Sies tarafından formüle edilmiş, 'oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki, oksidanlar lehine potansiyel olarak hasara yol açan bir dengesizlik, 'oksidatif stres' olarak adlandırılır' şeklinde tanımlanmıştır. (Sies, 1986; 1997; 2015)

Oksidatif stres, oksidanların yani zararlı SR'lerin ve aktif ara maddelerin üretimi, bunları nötralize etme ve ortadan kaldırma yeteneğine sahip antioksidan savunmaların kapasitesini aştığında ortaya çıkar. Oksidatif stres reaktif türlerin üretimi ile biyolojik sistemin reaktif ara

maddeleri kolayca detoksifiye etme veya ortaya çıkan hasarı onarma yeteneği arasındaki dengesizliği temsil eder (Arazi ve ark., 2021; Perrone ve ark., 2012; Rahman ve ark., 2012).

Oksidanlar, aerobik metabolizmanın doğal bir ürünü olarak oluşur ancak antioksidan/oksidan dengesinin bozulması hücrelerde nadir görülen bir olgu değildir. Oksidan üretiminin ve antioksidan tamponlama kapasitesinin her zaman metabolik, patofizyolojik değişiklikler ve çevresel strese maruz kalma ile değişmesi nedeniyle oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres oksidan/antioksidan dengesinin bozulduğu ve genellikle lipid peroksidasyonu ve proteinlerin ve nükleik asitlerin oksidatif modifikasyonu dahil olmak üzere hücre sağkalımına zararlı etkilerin eşlik ettiği oksidatif bir duruma doğru yöneldiğinde ortaya çıkar. (Sies 1997; Zhang ve ark., 2015)

Her hücrenin kendi içerisinde belirli hücresel bileşenlerinde depolanan elektron konsantrasyonu bulunmakta ve bunların oluşum ve salınımı hücrenin redoks durumunu oluşturmaktadır. Hücrelerin bu normal redoks durumundaki bozukluklar peroksitler ve SR üreterek hücre içindeki proteinler, lipidler ve DNA dahil olmak üzere hücrenin tüm bileşenlerine zarar vererek toksik etkilere neden olabilir. Redoks durumunu bozulmasıyla üretilen bazı ROT'leri haberci olarak bile hareket edebilir; düşük seviyelerde sinyal molekülleridir ve yüksek seviyelerde organellere, özellikle mitokondriye zarar verebilirler. Oksidatif hasar ve ilişkili mitokondriyal disfonksiyon, enerji tükenmesine, sitotoksik mediatörlerin birikmesine ve bunu sonucu olarak hücre ölümüne neden olabilir (Perrone ve ark., 2012).

SR'ler, dış kabuğunda bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan ve oksijenin spesifik moleküllerle etkileşimi ile oluşabilen çok reaktif atomlar veya moleküllerdir. Bu radikallerin üretimi hücrelerde bir elektronun kaybı veya kabulü ile olmakta ve dolayısıyla bu SR'ler oksidanlar veya indirgeyiciler gibi davranmaktadırlar (Arazi ve ark., 2021).

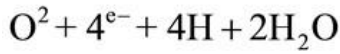
4.5.1. Reaktif türler

Hücrelerde SR'lerin oluşumunda ki ana sebep; her oksijen atomunun dış değerlik kabuğunda bir eşleşmemiş elektrona ve moleküler oksijenin iki eşleşmemiş elektrona sahip olması ile doğrudan ilişkilidir. Oksijen atomu eşleşmemiş atomunu paylaşmak için bir ikiz atom bulamazsa, hidrojene, su (H_2O) oluşturmak üzere bağlanır, ancak bu bağlanmada bir elektron eksik veya fazla olabilir, bu durumda da kararlılık oluşmaz. Oluşan bu kompleks bir SR'yi temsil eder. SR'ler her biri bir sonraki adımı tetikleyerek yeni bir SR oluşturan zincirleme reaksiyonlara yol açabilir. Bu reaksiyonlarda başlatma, yayma ve sonlandırma olmak üzere üç faz vardır (Perrone ve ark., 2012).

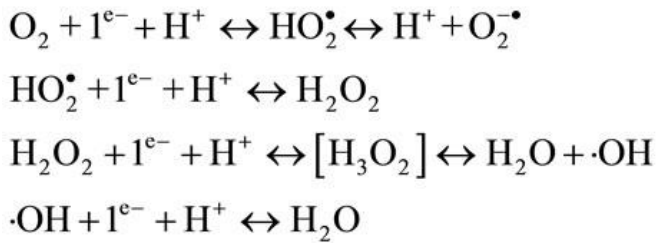
SR türleri oksijen merkezli radikaller (süperoksit, hidroksil, alkol, peroksil, hidrojen peroksit), nitrojen merkezli radikaller (nitrik oksit, nitrojen dioksit, peroksinitril), karbon merkezli radikaller ve kükürt merkezli radikaller olmak üzere çeşitlidir. Reaktif türler oluşturan endojen kaynaklar; nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz, miyeloperoksidaz, lipoksijenaz ve anjiyotensin II. vb. iken, eksojen kaynaklar; vücutta SR'lere metabolize olan hava kirliliği, tütün, alkol, ilaçlar, endüstriyel solventler vb.'dir (Arazi ve ark., 2021; Perrone ve ark., 2012).

Hücrelerde oluşan ROT'un ana kaynağının memeli hücrelerinde ATP üretimi için temel olan mitokondriyal solunum zincirindeki elektron sızmaları olduğu kabul edilen yaygın bir görüştür. O_2^- anyonu birincil ROT olarak kabul edilir ve bu anyon ikincil ROT üretebilir. Aslında O_2^- , mitokondriyal komplekslerden esas olarak kompleksler I ve III'de elektronları sızdırabilir, bu da oksijenin kendiliğinden veya SOD aracılı katalizi ile çok hızlı bir şekilde O_2^- indirgenmesine yol açar (Filomeni ve ark., 2015; Perrone ve ark., 2012).

Mitokondride oksijenli solunum işlemi sırasında, oksijen bir elektron alıcısı olarak kullanılır ve dört elektronun alınmasıyla tamamen suya indirgenir:



Bu süreç aşağıdaki adımlarla gerçekleştirildiğinde radikal oluşumu ile sonuçlanır. Bu adımlar;



Oksijen molekülünün indirgemesi sırasında şu üç ara ürün üretilir; süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$). Bu üretilen ara ürünlerden H_2O_2 en kararlı olanıdır ve hücre içinde büyük miktarlarda birikebilir (Perrone ve ark., 2012).

Mitokondride üretilen ROT'un toplam oksijen tüketimi oranının $\sim\%1-2$ 'si olduğu tahmin edilmektedir. Bu oran düşük gibi görünse de insan vücudunun her bir hücresinde günlük oksijen tüketimi ($\sim 2,5 \times 10^{-18}$ mol/s) göz önüne alındığında hücre içinde üretilen günlük ROT miktarı

~1 milyar moleküle kadar ulaşabilmekte, insan vücudundaki toplam hücre sayısının da ~50 trilyon olduğu düşünüldüğünde fizyolojik olarak maruz kaldığımız ROT akışının yoğunluğu ortaya çıkmaktadır (Filomeni ve ark., 2015).

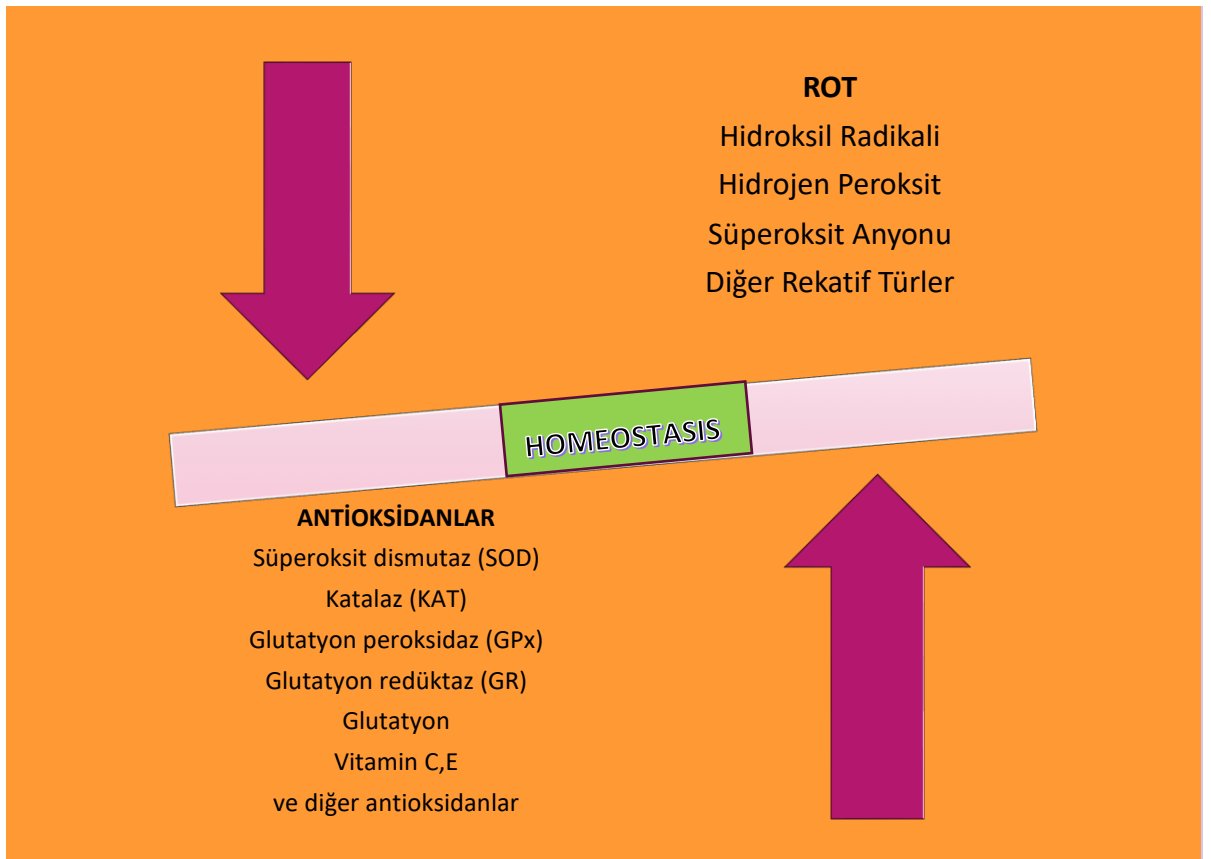
Normal mitokondriyal işlevin yanı sıra, bazı durumlarda mitokondriyal solunum zinciri boyunca elektron akışının yoğunlaştığı (örn., artan enerji talebi üzerine) veya mitokondriyal etkinliğin (örn., yaşlanma sırasında) düşebileceği göz önüne alındığında insan vücudunda oluşan ROT miktarının değişkenlik göstereceği ortadadır. SR üretiminin hem endojen (örn., oksidazlar ve oksijenazlar) hem de eksojen (örn. UV radyasyonu) birçok kaynağı vardır (Filomeni ve ark., 2015; Perrone ve ark., 2012).

$\text{OH}^\cdot$ ve O_2^- radikalleri ve H_2O_2 ve $^1\text{O}_2^-$ gibi ROT ile sınırlı oksidatif stres kavramı, NO, peroksinitrit gibi RNT'lere ve son zamanlarda S-nitrosothiolere kadar genişletilmiştir. Hücrelerde, moleküllerin bir elektron soyutlaması ile kükürt, oksijen, karbon ve nitrogen merkezli SR'ler üretilebilir (Perrone ve ark., 2012; Rahman ve ark., 2012)

NO, son yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron içermesinden kaynaklı da nadiren kararlı yapıda olan bir SR kaynağıdır. NO, çözünür guanilat siklazın prostetik grubu ile etkileşime girerek siklik guanozin-monofosfat oluşumunu teşvik eder ve böylece siklik guanozin-monofosfata bağlı iyon kanallarını ve kinazları aktive eder. NO oluşumu ise Nitrik oksit sentaz (NOS) katalizi ile meydana gelir. Ayrıca NO, oksijen ile nispeten yavaş reaksiyona girerek çok reaktif bir radikal tür olan turuncu-kahverengi gaz nitrogen dioksit ($\cdot\text{NO}_2$) üretebilir (Perrone ve ark., 2012).

ROT ve RNT üreten diğer potansiyel endojen kaynaklar arasında enflamatuar hücre aktivasyonu (fagositlerin ve bazı endotelial hücrelerin NADPH oksidazları yoluyla), monoksijenaz sistemi, NOS ve enflamatuar süreçte yer alan diğer bazı enzimlerde yer almaktadır. Vücuttaki oluşan ROT miktarı metalloprotein komplekslerinden salınan 'serbest' metallerin (demir, bakır ve manganez gibi) varlığıyla daha da artabilmektedir. Bu metallere demir, plazma proteinleri tarafından kompleks oluşturmaz ise, Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları yoluyla O_2^- ve H_2O_2 'in SR türlerine dönüşümünü katalize eder. Bir diğer ROT üreten endojen hücresel kaynaklar ise; aktive edilmiş nötrofiller, eozinofiller ve makrofajlardır. Ayrıca stres faktörleri; tümör nekroz faktörü alfa gibi hem hayatta kalma yanlısı hem de hücre ölümü yanlısı faktörlerin aktivasyonuna yol açan bir redoks kaskadı ile ROT üretiminde artışa neden olabilir. Endojen kaynakların yanı sıra SR'ler çevresel ajanlar ve ksenobiyotikler (metal iyonları, radyasyonlar, barbitüratlar) gibi eksojen kaynaklar tarafından da üretilebilir (Perrone ve ark., 2012)

SR'lerin kaynağı ister endojen ister eksojen olsun, proteinler, karbohidratlar, lipitlerle ve hatta DNA ile reaksiyona girerek hücrenin tüm bileşenlerine zarar verebilecek toksik etkileri oluşturur. Ayrıca hem hücre içi hem de hücreler arası homeostazda sonuç olarak değişiklik yaparak olası hücre ölümü ve rejenerasyonuna yol açar. Oksidatif stres genetik, metabolik ve hücresel tepki gibi çok geniş etki alanına sahiptir. Vücutta oluşan oksidatif koşulların çoğu, gen ekspresyonunu modüle edecek, hücre büyümesini uyaracak veya koruyucu bir geçici büyüme durmasına neden olacaktır. Nekroz ise en aşırı sonuçtur ve doğrudan hücre yıkımını içerir (Perrone ve ark., 2012; Rahman ve ark., 2012).



Şekil 16: Vücutta artan ROT değerlerine karşı homeostasi durumunu korumak için artan antioksidan seviyeleri

4.6. Antioksidanlar

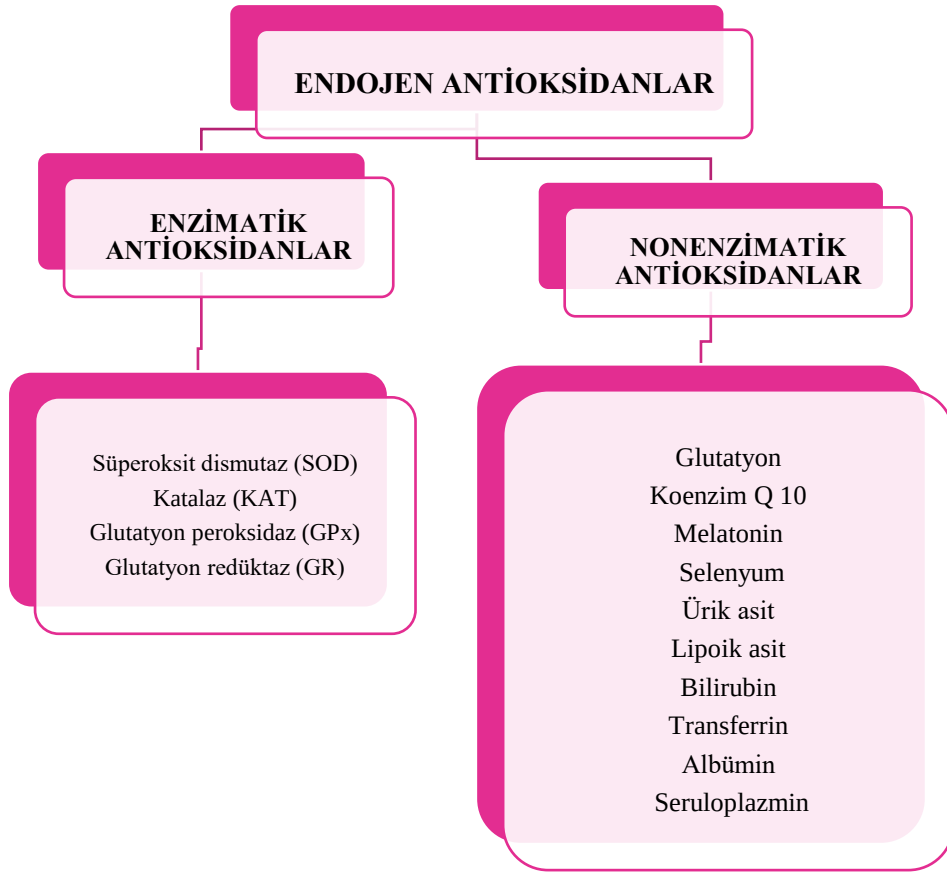
NAD(P)H oksidazlarının önemli ölçüde uyarılmasıyla veya mitokondriyal solunum zincirinde üretilen büyük miktarlarda ROT, oksidatif metabolizmanın istenmeyen yan ürünleridir. Yüksek oranda ROT'ların aşırı üretimi çeşitli hücre organellerinde DNA ve proteinlerin değiştirilmesi, lipitlerin peroksidasyonu gibi kimyasal değişikliklere neden olabilir (Somogyi ve ark., 2007).

Organizmalar ROT'a karşı ilk savunmayı bunların oluşumunu engellemeye çalışarak yapar. Şayet bu engeller aşıp oksidanlar birikmeye başlayıp redoks durumu bozulursa antioksidan savunma sistemi devreye girer. Canlı organizmalar yapısındaki redoks durumundaki sık dalgalanmalara uyum sağlamak için oksidan/antioksidan dengesini regüle eder; oksidatif strese yanıt olarak antioksidan seviyelerini düzenleyerek dinamik bir şekilde korur. Organizmadaki antioksidan kapasitesindeki bu artış nükleofilik ton olarak adlandırılır ve bu artış sayesinde aşırı oksidanların uzaklaştırılması sağlanarak daha fazla ciddi oksidatif hasarın önüne geçilmiş olur. Antioksidanların, reaktif moleküllerin yarattığı oksidatif strese tepkisi hem içsel hem de dışsal oksidatif saldırıların zararlı etkileriyle mücadele etmek için kritik bir savunma mekanizması olarak evrimsel süreçte tüm organizmalarda gelişmiştir (Sies, 1997; Zhang ve ark., 2015).

Antioksidan teriminin bir tanımı, "oksitlenebilir bir substratınkine kıyasla düşük konsantrasyonlarda bulunduğu, bu substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen herhangi bir madde" olarak belirtilmektedir. Bu tanımdan da anlaşıldığı gibi antioksidanlar enzimatik yapıya sahip olduğu kadar enzimatik olmayan bileşikler de içerir. Antioksidanların çeşitliliğinin sebebi pro-oksidanların çeşitliliğine bağlıdır ve bunlar eşleşir (Sies, 1997).

4.6.1. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar sınıflandırılırken endojen ve eksojen kaynaklardan olmak üzere temel iki grup altında toplanabilir. Ayrıca endojen antioksidanlar enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar olarak 2 alt gruba ayrılır (Karabulut ve Gülay, 2016).



Şekil 17: Endojen antioksidanların sınıflandırılması

4.6.1.1. Endojen antioksidanlar

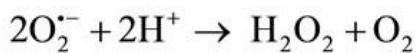
Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki alt grupta sınıflandırılabilir.

4.6.1.1.1. Enzimatik antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar; Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (KAT), Glutatyon peroksidaz (GPx) ve Glutatyon redüktaz (GR) olmak üzere bu 4 enzimdir.

4.6.1.1.1.1. Süperoksit Dismutaz

Oksijen metabolizması sırasında üretilen birincil ROT, oldukça reaktif, sitotoksik bir ROT olan $O_2^{\cdot-}$ 'dir. $O_2^{\cdot-}$, SOD olarak bilinen bir metalloenzim ailesi tarafından çok daha az reaktif bir ürün olan H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüştürülür. Her yerde bulunan SOD'lar, $O_2^{\cdot-}$ moleküler oksijen ve peroksit ile orantısızlığını katalize eder ve bu nedenle hücreyi aerobik solunumun toksik ürünlerine karşı korumak için kritik öneme sahiptir. H_2O_2 daha sonra, KAT ya da GPx ile ortamdan uzaklaştırılır (Rahman ve ark., 2012).

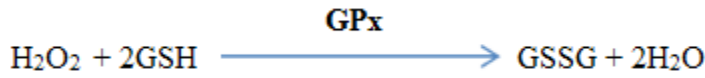


4.6.1.1.1.2. Katalaz

SOD enziminin O_2^- 'i H_2O_2 'e çevirmesinin ardından katalaz oluşan bu H_2O_2 'yi, su (H_2O) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder. Hidrojen peroksit hücrede tek başına zarar veren bir radikal olmamasına rağmen, Fenton reaksiyonu ile (bakır ve demir katalizörlüğünde) en reaktif ROT olan $OH^\cdot$ radikali oluşumuna öncülük etmektedir. KAT, hücre içinde çoğunlukla peroksizomlar ve daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda yer alır. Dört alt birimden oluşur ve her alt birimde bir hem grubu ile yüzeye yakın ve sıkıca bağlı bir NADPH molekülü bulunur. (Arazi ve ark., 2021).

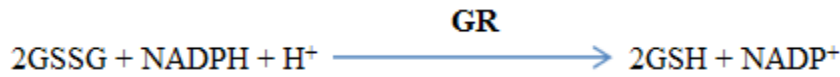
4.6.1.1.1.3. Glutatyon peroksidaz

GPx, elektron kaynağı olarak GSH'ı kullanarak H_2O_2 'yi ve organik hidroperoksitleri (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) metabolize eden antioksidan bir enzimdir. Bu, birçok hücrede H_2O_2 metabolizmasının ana yoludur ve membran lipitlerinin oksidasyona karşı korunması için önemlidir. GPx, hücrelerin sitoplazmasında yer alır ve her birinde bir selenyum atomu içeren dört protein alt biriminden oluşur. Hücreleri H_2O_2 'den $OH^\cdot$ 'nin oluşmasını engelleyerek oksidatif hasara karşı korur (Karabulut ve Gülay, 2016; Rahman ve ark., 2012)



4.6.1.1.1.4. Glutatyon redüktaz

GR, flavin adenin dinükleotid içeren flavoprotein yapıdaki bu enzim NADPH'nin bir elektronunu okside GSH'ın disülfid bağlarına aktararak yeniden GSH'ye dönüştüren enzimdir. Temel olarak H_2O_2 ve $^1O_2^-$, uzaklaştıran iki (diğeri GPx) önemli enzimsel antioksidandan biridir. SR hasarını engellemek için gerekli olan ve bu tepkimede elektron verici olarak kullanılan NADPH'in en önemli kaynağı heksoz monofosfat (pento fosfat) yoludur (Filomeni ve ark., 2015).

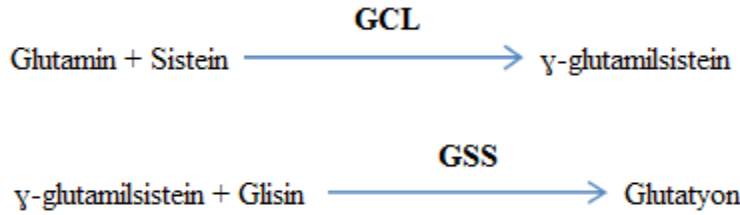


4.6.1.1.2. Nonenzimatik antioksidanlar

Enzimsel olmayan antioksidanlar arasında glutatyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, koenzim Q10 (CoQ10), selenyum, lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin sayılabilir.

4.6.1.1.2.1. Glutasyon

GSH, çoğu memeli hücresinde çoğunlukla sitozolde bulunan en önemli antioksidandır. GSH'ın sentezi iki önemli aşamada olur. İlk olarak glutamin-sistein ligaz (GCL), glutamin ve sisteini bağlayarak γ -glutamilsisteini oluşturur. İkinci olarak glutasyon sentetaz (GSS), γ -glutamilsisteine glisinini bağlayarak GSH molekülünü meydana getirir (Rahman ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2015).



GSH, metabolizmada sürekli oluşan reaktif oksijen ara ürünlerini ve SR'leri yok etme gibi önemli bir işleve sahiptir. GPx'in katalitik etkisiyle GSH substrat olarak kullanılır ve böylece GSH, lipid peroksidleri ve H_2O_2 'yi ya da $^1\text{O}_2^-$ ve $\text{OH}^\cdot$ 'yi detoksifiye eder. Ayrıca GSH'ın plazma membranından aminoasit transportunu sağlamasının yanında bir diğer önemli fonksiyonu ise C ve E vitamini gibi önemli antioksidanları rejenere ederek yeniden kullanılmasının sağlamasıdır. GSH direkt olarak vitamin E'nin tokoferol radikalini, dolaylı olarak da askorbatı semi-dehidroaskorbata indirgeyebilir (Rahman ve ark., 2012).

4.6.1.1.2.2. Melatonin

Melatonin dolaylı bir antioksidan olarak vücudun farklı bölgelerinde faaliyet göstermesi sayesinde çok geniş çaplı bir koruma sağlar. Melatonin $\text{OH}^\cdot$ radikalini, H_2O_2 , $^1\text{O}_2^-$, NO, peroksinitrit anyonu ve peroksinitrik asit içeren reaktif türleri ve SR'lerin farklı formlarını temizlemenin yanında SOD, KAT, GPx ve GR içeren antioksidan enzimlerin bazılarını uyarır (Karabulut ve Gülay, 2016).

4.6.1.1.2.3. Ürik Asit

Azot metabolizmasının atık ürünü ürik asit, kanın toplam antioksidan kapasitesinin yaklaşık yarısından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ürik asit, birçok ROT ve RNT'yi etkisizleştirilmesinin yanında ve demir ve bakır gibi geçiş metallerini de şelatlar. Ayrıca lipid peroksidasyonu engelleyerek koruyucu olarak görev alır (Dündar ve Aslan, 1999a; Karabulut ve Gülay, 2016).

4.6.1.1.2.4. Bilirubin

Yaşlanmış eritrositlerin parçalanmasıyla atık olarak oluşan bilirubin, peroksil radikallerini etkileyerek zincir kırıcı etki gösterirken antioksidan kapasitesi ortamdaki oksijen konsantrasyonundan etkilenir (Dündar ve Aslan, 1999a; Karabulut ve Gülay, 2016).

4.6.1.1.2.5. Albumin

Albüminin yapısında bulunan sistein GSH gibi çeşitli bileşikler ile bir disülfid bağı yaparak indirgenir böylece OH⁻'ı süpürebilmektedir. Plazmada yüksek oranda bulunması sebebiyle en önemli ve en etkili antioksidanlardandır. Nötrofil ve monosit gibi aktif fagositlerden salınan myeloperoksidaz enzimi güçlü bir oksidan olan HOCl oluşmasını katalize eder. Albümin ise bu oluşan HOCl oksidanlarını süpürebilmenin yanında bakır iyonlarının da şelatlar (Dündar ve Aslan, 1999a; Karabulut ve Gülay, 2016).

4.6.1.1.2.6. Koenzim Q10

CoQ10 (ubikinon, vitamin Q10), insan vücudunda tirozinden doğal olarak sentezlenen yağda çözünen vitamin benzeri benzokinon bileşiğidir. CoQ10 antioksidan etkisini membranlardaki konumundan dolayı burada üretilen SR'lerin komşu lipit ve proteinlerle etkileşime girmesini engelleyerek gösterir. CoQ10'nun indirgenmiş formu olan ubikinol ise elektron taşıma sisteminde elektron ve proton taşınmasına katılır ve oksidanlara elektron verici olarak davranarak nötralize eden güçlü bir lipofilik antioksidandır. CoQ10, vitamin C ile benzer mekanizmayla etki gösterirken α -tokoferol ile sinerjik olarak çalışarak aktif formlarını yeniden oluşturur. (Karabulut ve Gülay, 2016; Toprak ve Ayaz 2019).

4.6.1.1.2.7. Lipoik asit

LA ve indirgenmiş formu DHLA hem sulu ortamda hem de zarlar arasında çözünebildiğinden vücudun her yerinde aktif radikal temizleyebilen güçlü antioksidandır (Tabasuum ve ark. 2010)

4.6.1.1.2.8. Selenyum

Selenyum GPx enziminin yapısında yer alır ve bu enzimin aktivitesini artırarak ROT oluşumunu baskılar (Karabulut ve Gülay, 2016).

4.6.1.1.2.9. Seruloplazmin ve Transferrin

Seruloplazmin ve transferrin insan vücudunda beyinde dâhil olmak üzere birçok dokuda sentezlenen önemli antioksidan proteinlerdir. Seruloplazmin kandaki bakır elementinin büyük bir kısmını taşıyan bir serum glikoproteinidir ve bakıra geri dönüşümlü olarak bağlanarak bakır metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Seruloplazmin ferrokسيداز ve SOD enzimleri gibi

etki göstererek eritrosit zarlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini oksidanlardan korur. (Karabulut ve Gülay, 2016). Hücrelere demir taşınmasından sorumlu taşıyıcı bir protein olan transferrin plazma demir konsantrasyonunu bire üç oranında demiri bağlayarak düşürür. Antioksidan etkisini, SR oluşum reaksiyonları katalizleyen demir iyonları transferrinle tutulduğu için tepkime sayısı azaltarak gösterir (Dündar ve Aslan, 1999a).

4.6.1.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen kaynaklı antioksidanları, vitamin eksojen antioksidanlar ve ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırabilir.

4.6.1.2.1. Vitamin Eksojen Antioksidanlar

Bunlar; α -Tokoferol (Vitamin E), β -karoten (Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C) ve folik asit (Vitamin B9) olmak üzere dört vitamindir.

4.6.1.2.1.1. Vitamin E

Vitamin E, yüksek antioksidan potansiyelli SR'leri nötralize etmek için tokokromanollerin aromatik halkasındaki hidroksil grubunun hidrojen verici olarak davranmasından kaynaklanmaktadır. Vitamin E sekiz stereoizomeri olan asimetric bir bileşiktir. Bu sekiz stereoizomerden insanlarda en biyoaktif olanı ise α -tokoferoldür. α -tokoferol, lipit peroksidasyonuna karşı hücre membranlarını koruyan bir antioksidandır. Vitamin E'nin antioksidan kapasitesi yüksek ve çok çeşitlidir; SR'lerin yok edilmesi, zincirin kırılması, baskılanması, onarılması ve endojen savunma sistemlerinin güçlendirilmesi gibi mekanizmaların tamamını kullanarak antioksidan görevini yerine getirir. Lipitte çözünen en iyi antioksidan vitamin olan vitamin E'nin en önemli fonksiyonlarından biri ise SR'leri sabit hale getirerek ($^1\text{O}_2^- \text{OH}$ ya da O_2 indirgemek) peroksidasyon zincirini kırmasıdır. Ayrıca α -tokoferolün NO_2 ile reaksiyonu bir nitrozatlama maddesi verirken, γ -tokoferol nitrozan türler oluşturmadan NO_2^- yi NO^- ya çevirmektedir. Vitamin E hücre zarında peroksitlerin oluşumunu engellerken, hücre içinde GPx oluşmuş olan peroksitleri ortadan kaldırarak sinerjik olarak çalışırlar (Dündar ve Aslan, 1999b, 2016; Pınarlı 2023; Sies, 1997).

4.6.1.2.1.2. Vitamin C

Vitamin C (askorbik asit), altı karbonlu yapısındaki ikinci ve üçüncü karbonları arasında yer alan çift bağdan iki elektron vererek antioksidan özellik gösterir. Elektron verdikten sonra kendisi oksitlenir ve oluşan semidehidroaskorbik asit veya askorbil radikali diğer radikal türlerine göre oldukça karardır. Vitamin C reaktif türleri temizlerken oluşturduğu daha karardır radikal ortamdaki reaktif türlerin azalmasını sağlamış olur (Pınarlı, 2023). ROT ve RNT'leri temizleyebilen etkin bir antioksidandır. Suda çözünen bir vitamin antioksidan olmasına karşın,

lipofilik radikallerin temizlenmesi ile üretilen α -tokoferoksil radikallerinden α -tokoferolün yeniden oluşturulmasını sağladığı için koantioksidan olarak da görev alır. Bunlara rağmen Vitamin C, Fe^{+3} 'ü, Fe^{+2} 'ye dönüştürerek lipid peroksidasyonunu artmasına sebep olarak oksidan davranış da gösterir (Karabulut ve Gülay, 2016).

4.6.1.2.1.3. β -karoten

Aktif $^1\text{O}_2^-$ toplayıcısı olarak görev alan β -karoten karotenoidlerin yağda çözünen bir üyesi olup aktivitesi ortam oksijen konsantrasyonuna göre değişkenlik gösterir (Dündar ve Aslan, 1999a).

4.6.1.2.1.4. Folik asit

Suda çözünen folik asit (vitamin B9) ROT'ları temizleyen güçlü bir antioksidan olmasının yanı sıra plazma homosistein seviyesini düşürerek oksidatif vasküler hasarını engellemede etkilidir (Karabulut ve Gülay, 2016).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullandığımız maddeler analitik saflıktadır. Kullanılan kimyasal maddelerden aşağıda belirtilenler; Sigma, Merck, Mp-Biomedisis, Fluka, Alfa Asear Biolabo ve İnvitrogen firmalarından elde edilmiştir.

- Sodyum karbonat [Merck 106392]
- Bakır sülfat [Merck 102791]
- Sodyum potasyum tartarat tetrahidrat [Merck 1.08085]
- Sodyum tungstat [Merck 106673]
- Sodyum molibdat [Merck 106521]
- HCl [Merck 1.00317]
- NaCl [Merck 106404]
- CaCl₂ [Sigma 12022]
- Sodyum sitrat [Sigma S1804]
- NaOH [Merck 106498]
- TCA (Triklorasetik asit) [Merck 100810]
- n-butanol [Merck 101988]
- meta-fosforik asit (% 85 H₃PO₄) [Merck 100546]
- EDTA-Na (Etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu) [Sigma ED2P]
- Na₂HPO₄.2H₂O (iki sulu disodyum fosfat)
- KH₂PO₄ [Merck 104873]
- Albumin [Sigma-A-2153]

- DTNB (5-5'-ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) [Sigma-D8130]
- CDNB (1-kloro-2,4-dinitro-benzenin) [Fluka-24440]
- GSH (Glutatyon) [Sigma-G-6529]
- Riboflavin [Sigma-R0508]
- O-dianisin [Mp-Biomedisis-195136]
- SOD (120 IU/ml) stok standardı [Sigma S-2515-3000 U]
- H₂O₂ (Hidrojen peroksit) [Merck-641-85198900]
- TBA (Tiobarbitürik asit) [Merck 108180-00252]
- Sodium meta periodate [Alfa Asear A13U004]
- Sodium m-Arsenite [Sigma S-7400]
- Siklohegzanon [Merck 109666]
- H₂SO₄ [Merck 100713]
- FeCl₃ [Merck 803945]
- Lityum sülfat [Sigma Aldrich 238031]
- Folin Reagent [Sigma Aldrich F9252]
- Metotrekasat [Koçak Farma]
- Kuersetin [Sigma Aldrich Q4951]
- Lipoik asit [Sigma Aldrich T1395]

5.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Vortex JANKE & KUNKEL, IKA LABOR TECHNIK

Santrifüj HERAEUS-CHRIST- GmbH, 00902

Soğutmalı Santrifüj HERAEUS- SUPRAFUGE 22

Mikro Santrifüj HERAEUS- BIOFUGE

Etüv NUVE FN 400

Distile su cihazı PURELAB OptionQ DV25

Buzdolabı ARÇELİK

PH Metre LCS, DIGITAL PH METER LD-II- METTLER TOLEDO

Magnetik Karıştırıcı JANKE&KUNKEL, IKA LABOR TECHNIK

Elektronik terazi SARTORIUS

Otomatik pipetler GILSON

Spektrofotometre RAYLEIGH UV-1800

Su banyosu (37 °C) BOEHRINGER-MANNHEIM

Su banyosu (100 °C) NUVE, BT 400

Buz yapma makinesi KING

Cam malzemeler ISOLAB

5.3. Deney Hayvanları ve Oluşturulan Gruplar

Çalışmamız Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (MÜHDEK) (protokol No: 01.2023mar) tarafından onaylanmış olup çalışmada kullanılan hayvanlar İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiş, Wistar albino yetişkin erkek sıçanlar (2 aylık, 200-250 gr.) kullanılmıştır. Hayvanlar, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsünde ve oda sıcaklığında kafeslerde en fazla 4 sıçan olacak şekilde muhafaza edilmiştir. Standart sıçan yemi ile beslenerek musluk suyu içmişlerdir.

Tablo 3: Deney hayvanlarının yem içeriği

Yemin İçeriği	Miktarı	Alt Sınır	Üst Sınır
Ağırlık	100,00	100,00	100,00

Tablo 3: Deney hayvanlarının yem içeriği (devamı)

Yemin İçeriği	Miktarı	Alt Sınır	Üst Sınır
Kuru Madde	88,21	86,00	90,00
Ham Protein	20,00	20,00	20,00
Ham Selüloz	6,00	0,00	7,00
Ham Kül	5,20	0,00	8,00
Ham Yağ	2,7	0,00	6,00
Kalsiyum	0,97	0,80	1,00
Total Fosfor	0,50	0,00	0,50
Ortalama Fosfor	0,19	0,00	0,44
Lizin	0,95	0,00	1,20
Metiyonin	0,40	0,00	1,00
Metiyonin+Sistein	0,66	0,00	1,00
Sodyum	0,14	0,14	0,14
Linoleik asid	1,13	0,00	2,00

Sağladığı metabolik enerji: 2600 kalori/ kg.

Deney prosedüründe kullanılan MTX (20 mg/kg), LA (50 mg/kg) ve Que (50 mg/kg) uygulama doz ve yöntemleri literatürle uyumlu olacak şekilde belirlendi (Aslankoc ve ark.,2020; Bae ve ark.,2009; Ulusoy ve ark.,2016; Toklu ve ark.,2010, Gündoğdu ve ark. 2019).

Deney Protokolü

• **Kontrol grubu (K):** Bu gruptaki sıçanlara 5 gün boyunca serum fizyolojik intraperiotoneal (i.p.) olarak uygulandı ve 6.gün sakrifiye edildi.

- **Metotreksat grubu (MTX):** Bu gruptaki sıçanlara 1. gün 20 mg/kg metotreksat i.p. olarak uygulanmasının ardından 5 gün boyunca serum fizyolojik i.p. olarak verildi ve 6. gün sakrifiye edildi.

- **Metotreksat + Kuersetin grubu (MTX+Que):** Bu gruptaki sıçanlara 1. gün 20 mg/kg MTX i.p. uygulanmasının ardından 5 gün boyunca serum fizyolojikte çözünmüş 50 mg/kg Que i.p. olarak verildi, 6. gün sakrifiye edildi.

Metotreksat + Lipoik Asit grubu (MTX+LA): Bu gruptaki sıçanlara 1. gün 20 mg/kg MTX i.p. uygulanmasının ardından 5 gün boyunca serum fizyolojikte çözünmüş 50 mg/kg LA i.p. olarak verildi, 6. gün sakrifiye edildi.

Deney başlangıcında bir defa ve deney sonunda bir defa olacak şekilde kilo ölçümü yapılmıştır. Ötanazi işlemi sonunda biyokimyasal analizler için dalak dokusu alınmıştır. Anestezi altında sakrifiye edilen Wistar Albino sıçanlardan alınan dalak örnekleri serum fizyolojik (%0,9 g NaCl) çözeltisi altında homojenize edildi. Dalak dokusundan hazırlanan %10'luk homojenatlarda, total protein, lipid peroksidasyon, total nitrik oksit, total siyalik asit, glutatyon, süperoksit dismutaz aktivitesi ve katalaz aktivitesi tayinleri gerçekleştirildi.

5.4. Doku Örneklerinin Alınması, Homojenatın Hazırlanması ve İncelenen Parametreler

İntraperitoneal olarak verilen sodyum pentotal (50 mg/kg) ile anestezinin ardından ötanazi yapılmıştır. Bu işlemi sonunda sıçanlardan dalak dokusu çıkartıldı. Biyokimyasal analizler için dalak dokusu deney gününe kadar -20 °C 'de saklandı.

Dalak örnekleri ayrı ayrı serum fizyolojik ile yıkanıp kan ve damarlarından temizlendikten sonra bir kurutma kağıdı ile kurutularak tartılıp tartım kaydedilmiştir. Bir makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Plastik tüpe konulup ve üzerine gerekli miktarda serum fizyolojik eklenip buz dolu kap içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenizasyon süresi ve devir hızı kaydedilmiştir. Her doku homojenatı ayrı ayrı küçük kısımlara ayrılarak ependorf tüpleri içinde, gerekli bilgiler üzerlerine yazılarak -20 °C çalışılacağı güne kadar saklanmıştır. Tüm işlemler soğukta yapılmıştır. Deney günü dokular dondurucudan çıkarılmıştır, önce +4 °C de yaklaşık bir saat, sonra oda sıcaklığında buz üzerinde bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Homojenat ya direkt olarak kullanılmıştır ya da 4000 rpm'de 10 dk. soğukta santrifüj edildikten sonra süpernatantta tayin yapılmıştır. %10 gramlık doku homojenatı için gerekli olan serum fizyolojik hacmi;

$$\text{Serum fizyolojik hacmi (ml)} = \frac{\text{Nemli doku tartımı (mg)}}{100}$$

Formülü ile hesaplanır.

5.5. Biyokimyasal Parametreler

5.5.1. Total Protein tayini (Lowry ve ark., 1951)

Biyoloji biliminde merkezi konumda olan proteinlerin, çoğu biyokimyasal ve moleküler laboratuvar araştırmasının, özellikle protein ekspresyonu ve aktivitesinin karşılaştırılması için protein analizini içermesi beklenir. Bu nedenle, toplam protein konsantrasyonunun belirlenmesi, daha ileri analizlerden önce önemli bir ilk adımdır (Seevaratnam ve ark., 2009).

Prensip: Bu metotta önce proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokulur. Daha sonra fosfomolibdik-fosfotungstik asit reaktifi (folin reaktifi) ile indirgenir. Oluşan mavi rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

Gerekli Çözeltiler:

A çözeltisi: Sodyum karbonat çözeltisi (%2 g, 0,1 N NaOH'teki); 2 g sodyum karbonat hazırlanan 0,1 N NaOH çözeltisinde çözülür ve hacmi 100ml'ye 0,1 N NaOH çözeltisi ile tamamlanır.

Bakır sülfat çözeltisi (%1 g): 1 g bakır sülfat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Sodyum potasyum tartarat çözeltisi (%2 g): 2 g sodyum potasyum tartarat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

B çözeltisi: %1 g'lık bakır sülfat çözeltisi ile %2 g'lık sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanılır (taze hazırlanır).

C çözeltisi: 50 ml A çözeltisi ve 1 ml B çözeltisi karıştırılarak kullanılır (taze hazırlanır).

Folin çözeltisi: 100 g sodyum tungstat, 25 g sodyum molibdat $\times 2\text{H}_2\text{O}$, 50 ml %85 g'lık fosforik asit, 100 ml derişik HCl ve 700 ml distile su bir balona konularak 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Soğutulur. Üzerine 150 g Li_2SO_4 ilave edilip, geri soğutucu altında 15 dk daha kaynatılır. Soğuduktan sonra, 5-6 damla brom katılır. (Çözelti bozuksa renk siyahlaşır, bu durumda çözelti tekrar hazırlanır, bozuk değilse renk sarı yeşil olur). Çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır ve kullanılır. Koyu renkli şişede saklanır, uzun süre dayanır.

Serum fizyolojik (%0,9 g NaCl): 0,9 g NaCl (Sodyum klorür) biraz suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

Protein stok standart çözeltisi (%100 mg'lık albumin çözeltisi): 100 mg albumin biraz serum fizyolojikte çözöldükten sonra hacmi 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlanır.

Protein çalışma standart çözeltileri: Stok çözeltiden uygun hacimler alınarak %5, 15,25 mg albumin ihtiva edecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlanır (Deneyin yapılışına bakınız).

Deneyin Yapılışı: 5 deney tüpü alınarak numune (N), standart 1 (St1), standart 2 (St2), standart 3 (St3) ve kör (K) olmak üzere işaretleir ve aşğıdaki gibi çalışılır.

Tablo 4: Total protein tayin yöntemi

	Numune (N)	St1 %5 mg Albümin	St2 %10 mg Albümin	St3 %15 mg Albümin	Kör (K)
Albümin (%100 mg)	-	25 µl	50 µl	75 µl	-
Doku Süpernatantı	10 µl	-	-	-	-
Serum Fizyolojik	490 µl	475 µl	450 µl	425 µl	0,5 ml
Toplam Hacim	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Vorteksle karıştırılır.					
C çözeltisi	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Vortekste iyice karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.					
Folin Ayıracı	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Vortekste iyice karıştırılır, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir. 30 dakika sonunda 500 nm de köre karşı absorbanslar kaydedilir. Standart grafiğı çizilir. Doku protein miktarı hesaplanır.

5.5.2. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Tayini (Ledwozyw ve ark., 1986)

ROT tarafından lipid peroksidasyonunun, vücutta çeşitli zarar verici mekanizmasında yer aldığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyon ürünleri için bir indeks olarak en belirgin tahlil, tiyobarbitürik asit tahlilidir (TBA testi) (Garcia ve ark., 2005).

Prensip: LPO ürünü olan MDA ile TBA arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbandsı spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli Çözeltiler:

TBA çözeltisi (0,047 M): 500 mg TBA ile 6 ml 1 M'lık NaOH ile karıştırılır. Üzerine 69 ml distile su ilave edilir.

Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi (1 M): 4 g NaOH tartılır, biraz distile su da çözülür, hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1,22 M, 0,6 M HCl (Hidroklorik asit)'deki): 20 ml TCA (%100 g TCA) ile 5 ml HCl (%37 g'lık d=1,19 g/dl'lik HCl) karıştırılır ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

n-bütanol: Direkt olarak orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin Yapılışı: 2 tane deney tüpü alınarak numune ve kör olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 5: Lipid peroksidasyon tayin yöntemi

	Numune	Kör
Doku Süpernatantı	0,25 mL	-
Distile Su	-	0,25 mL
TCA	1,25 mL	1,25 mL
Vorteksle karıştırılır ve 15 dk bekletilir.		
TBA	0,75 mL	0,75 mL
Vorteksle karıştırılır ve 30 dk kaynar su banyosunda inkübe edilir		
n-bütanol	2 mL	2 mL

İlave edilir. Vortekslenir ve 10 dk 4000 rpm'de santrfüj edilir. Bütanol fazı alınarak 532 nm'de köre karşı absorbandslar kaydedilir. MDA için saptanmış ekstinksiyon katsayısı ($156105 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak doku için "nmol MDA/ mg protein" cinsinden sonuçlar hesaplanır.

5.5.3. Total nitrik oksit (NO) tayini (Miranda ve ark., 2001)

Deney prensibi: Nitrat (NO_3^-), vanadyum (III) klorür (VCl_3) ile reaksiyona girerek nitrite (NO_2^-) indirgenir. Nitrit ile sülfanilamidin (SULF) asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorür (NEDD) ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Oluşan bu

açık mavi renkli kompleksin 540 nm’de spektrofotometrik yöntem ile ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

Gerekli çözeltiler

0,3 M NaOH çözeltisi: 0,6 g NaOH tartılarak bir miktar distile suda çözülür ve 50 ml’ye distile su ile tamamlanarak hazırlanır.

%10’luk ZnSO₄: 5 g ZnSO₄ tartılarak bir miktar distile suda çözülür ve 50 ml’ye distile su ile tamamlanarak hazırlanır.

1 M HCl: Stoktan 4,20 ml HCl çekilerek 50 ml’ye distile su ile tamamlanarak hazırlanır.

Vanadyum klorür (VCl₃): 0,4 g VCl₃ tartılarak bir miktar 1 M HCl’de çözülür ve 50 ml’ye yine 1 M HCl ile tamamlanarak hazırlanır.

%5’ lik HCl: Stoktan %37’lik 2,86 ml HCl çekilerek 25 ml’ye distile su ile tamamlanarak hazırlanır.

%2’lik SULF (Sülfanilamid): 0,5 g Sülfanilamid tartılarak 25 ml %5’lik HCl içerisinde çözülerek hazırlanır.

%0,1’lik NEDD (N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür): 25 mg NEDD tartılarak bir miktar deiyonize suda çözülür ve 25 ml’ye deiyonize su ile tamamlanarak hazırlanır.

Deneyin yapılışı

Doku homojenatları 10 dk 1100 x g’de santrifüj edilerek 0,3 ml süpernatant alınır ve üzerinlerine 0,3 ml NaOH (0,3 M) ilave edilir. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 0,3 ml % 10’luk ZnSO₄ çözeltisi ilave edilerek vorteks yardımıyla karıştırılır. +4 °C’de 13000 x g’de 5 dk santrifüj edilerek üst faz alınır ve üst faz yine +4 °C’de 13000 x g’de 5 dk santrifüj edilir.

2 deney tüpü alınarak kör ve numune olarak işaretlenir ve tablo 6’daki gibi pipetleme yapılır.

Tablo 6: Nitrik oksit tayin yöntemi

	Numune	Kör
Deproteinize Sıvı	0,3 ml	-
Distile Su	-	0,6 ml
VCl₃	0,3 ml	0,3 ml
SULF	0,15 ml	-
NEDD	0,15 ml	-
30 dk 37 °C’de etüvde inkübe edilir.		

540 nm’de köre karşı absorbanslar okunarak kaydedilir. NO sonuçları ($\mu\text{mol/g}$ doku) oluşan mavi rengin 540 nm’deki ekstinksiyon katsayısı ($53000 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplaması yapılır.

5.5.4. Total siyalik asit (SA) tayini (Warren, 1959)

Deney prensibi: Siyalik asit periyodik asit ile okside olarak beta-formilpürivik asit oluşur. Bu bileşik 2 mol tiyobarbütik asit ile reaksiyona sokularak, 549 nm’de maksimum absorbans veren renkli bir bileşik oluşturur. Bu ürün stabil değildir, bu nedenle siklohegzanon fazına çekilir. Oluşan rengin şiddeti 549 nm’de maksimum absorbansa sahiptir.

Gerekli çözeltiler

0,1 N H_2SO_4 : 1 litrelik balon jojeye bir miktar distile su ilave ettikten sonra üzerine 2,71 ml derişik sülfirik asit konur ve hacim distile su ile 1000 ml’ye tamamlanır.

0,2 M sodyum meta periyodat (9 M fosforik asit içerisinde): 250 ml’lik balon jojeye belli bir miktar distile su ilave edilir. Suyun üzerine 151,7 ml fosforik asit ilave edilip karıştırılır. Bu karışımın üzerine 10,695 g sodyum-metaperiyodat ilave edilir, karıştırılarak çözünmesi sağlanır. Hacim distile su ile 250 ml’ye tamamlanır.

0,5 M sodyum sülfat (0,1 N H_2SO_4 içerisinde): 500 ml’lik bir balon jojeye 35,5 g sodyum sülfat bir miktar 0,1 N sülfirik asit içinde çözüldükten sonra hacim 500 ml ye 0,1 N sülfirik asit ile tamamlanır.

%10 g sodyum arsenit (0,1 N sülfirik asitte hazırlanan 0,5 M sodyum sülfat içerisinde): 10 g sodyum arsenit tartılır, bir miktar 0,5 M sodyum sülfat içerisinde çözülür, hacim 0,5 M sodyum sülfat ile 100 ml’ye tamamlanır.

%0,6 g TBA (0,1 N sülfirik asitte hazırlanan 0,5 M sodyum sülfat içerisinde): 0,6 g TBA tartılır, bir miktar 0,5 M sodyum sülfat içerisinde çözülür, hacim 0,5 M sodyum sülfat ile 100 ml’e tamamlanır.

Sikoloheksanon: Direkt olarak orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin Yapılışı

%10 g’lık doku homojenatı 10 dk 4000 rpm’de santrifüj edilir süpernatant ayrılır. 180 mikrolitre 0,1 N H_2SO_4 ile 20 mikrolitre süpernatant karıştırılır, tüplerin ağzı kapatılarak 1 saat 80 °C’de etüvde hidroliz edilir. Elde edilen hidrolizat numune olarak işaretlenmiş deney tüpüne konulur ve aşağıdaki tabloda yer alan adımlar takip edilerek çalışılır.

Tablo 7: Total siyalik asit tayin yöntemi

Numune	
Hidrolizat	0,2 ml
0,2 M sodyum meta periyodat	0,1 ml
20 dk oda sıcaklığında beklenir.	
%10 sodyum arsenit	1 ml
Meydana gelen sarı renk kayboluncaya kadar çalkalanır.	
%6 g TBA	3 ml
100 C°'lik su banyosunda 15 dk bekletilir. Bu süre sonunda tüpler su banyosundan alınarak buzlu su içerisinde oda ısısında soğutulur.	
Sikloheksanon	4,3 ml
Kör olarak sikloheksanon kullanılır. Organik fazın renk şiddeti 549 nm'de okunur.	

Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı ($57000/M^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak mg siyalik asit/g protein cinsinden hesaplanır.

5.5.5. Glutasyon (GSH) Tayini (Beutler, 1975)

GSH, bitkiler de dahil olmak üzere birçok organizmada üç amino asitten ve başlıca tiyolden oluşan basit bir kükürt bileşiğidir. GSH'nin işlevleri çok çeşitlidir, ancak özellikle redoks-homeostatik tamponlamayı içerir. GSH durumu, beslenme ve diğer faktörlerin yanı sıra oksidanlar tarafından modüle edilir ve tiyol-disülfid dengesindeki değişiklikler yoluyla protein yapısını ve aktivitesini etkileyebilir.

En yaygın spektrofotometrik glutasyon tahlilinde, DTNB veya Ellman reaktifi olarak bilinen 5,5'-ditiobis (2 nitrobenzoik asit) kullanır. Bu bileşik spesifik olmayan şekilde tiyol gruplarına bağlandığı için hem protein hem de protein olmayan tiyolleri ölçmek için kullanılmaktadır (Noctor ve ark., 2011).

Prensip: Ellman ayracı, 5-5' ditiyobis 1-2 nitro benzoik asit (DTNB) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli Çözeltiler:

Sodyum sitrat çözeltisi (%1 g): 1 g sodyum sitrat tartılır, biraz distile suda çözülerek hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Ellman ayracı (%40 mg DTNB): 40 mg DTNB (5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) tartılır, biraz sodyum sitrat çözeltisinde (%1 g) çözülür. Hacmi %1 g'lık sodyum sitrat çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır.

Proteinsizleştirme çözeltisi: 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu (EDTA-Na), 30 g sodyum klorür ayrı ayrı biraz distile suda çözülür. Hepsi birleştirilir ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Disodyum fosfat çözeltisi (0,3 M): 4,26 g Na_2HPO_4 veya (5,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) biraz distile suda çözülür ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 0,2 ml doku süpernatant konur. Vorteks ile karıştırılır. Üzerine 0,3 ml proteinsizleştirme çözeltisinden ilave edilir. Vorteksle karıştırılır. 5 dk oda sıcaklığında bekletilir. 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. Çökelti atılır. Süpernatant alınır. İki tane deney tüpü alınır. Numune ve kör olarak işaretlenerek aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 8: Glutatyon tayin yöntemi

	Numune	Kör
Distile Su	-	0,2 ml
Süpernatant	0,2 ml	-
Na_2HPO_4	0,8 ml	0,8 ml
Ellman Ayırıcı	0,1 ml	0,1 ml

Tüpler vortekste karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletilir. Köre karşı 412 nm'de absorbanslar kaydedilir. Sonuçlar seyreltme faktörü ve oluşan sarı renkli ürünün 412 nm'de ekstinksiyon katsayısı ($13600/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak doku için "mg GSH/mg protein cinsinden hesaplanır.

5.5.6. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini (Mylorie ve ark., 1986)

Süperoksit dismutaz oksijen radikallerini ve singlet oksijeni temizleyen ve inaktive eden bir enzimdir. Birçok biyolojik sistemde oluşan ve aerobik metabolizmanın temel bir bileşeni olduğu gösterilen oksijenin bu iki << aktif formunun >> saldırılarına karşı koruyucu bir ajan görevi görür (Fried, 1975).

SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlılaştırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon oranını artırma kabiliyeti ile ölçülmektedir (Mylroie ve ark. 1986).

Prensip: SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını artırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu O_2^- ,

ortamdaki SOD'ın etkisiyle hidrojen peroksit'e dönüşür. H_2O_2 ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu da o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli Çözeltiler:

Fosfat tamponu (50 mM, pH=7,8): 0,136 g KH_2PO_4 ve 0,697 g K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı biraz distile suda çözülür, birleştirilir ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7,8'e ayarlanır) ($2^\circ C$ de saklanır).

Fosfat tamponu + 0,1 mM'luk Na-EDTA: 0,0037 g EDTA-Na tartılır biraz 50 mM'luk fosfat tamponunda çözülür ve hacmi 50 mM'luk fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

Potasyum fosfat tamponu (10 mM , pH= 7,5): 0,041 g KH_2PO_4 ve 0,122 g K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülür, birleştirilir ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7,5'e ayarlanır) ($2^\circ C$ de saklanır).

Riboflavin (0,2 mM): 7,5 mg riboflavin 100 ml potasyum fosfat tamponunda (100 mM'luk , pH=7,5) çözülür.

o-dianisin (6 mM): 19 mg o-dianisin 10 ml distile suda çözülür.

SOD (120 IU/ml) stok standardı (Sigma S-2515-3000 U): Liyofilize SOD standardı 120 IU/ml olacak şekilden soğuk distile su ile çözülür. Daha sonra bu stok standarttan uygun hacimler alınarak deney ortamında 3,6,9,12 ünite SOD olması sağlanır.

Deneyin Yapılışı: Doku süpernatantı alınır, gerekirse serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır. Numune, standart ve kör olmak üzere 3 deney tüpü alınır. Aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 9: Süperoksit dismutaz tayin yöntemi

	Numune	St 3U	St 6U	St 9U	St 12U	Kör
Fosfat tamponu	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
o-dianisidin	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Distile Su	-	0,075 ml	0,05 ml	0,025 ml	-	0,1 ml
Stok Standart	-	0,025 ml	0,05 ml	0,075 ml	0,1 ml	-
Süpernatant	0,1 ml	-	-	-	-	-
Her tüpe 30 sn ara ile 0,2 ml riboflavin konur, karıştırılır.460 nm'de absorbansı okunur						
Sonra tüpler oda sıcaklığında 20 W floresans lamba bulunan kutu içinde 8 dk inkübe edilir. 460 nm'de absorbansı okunur.						

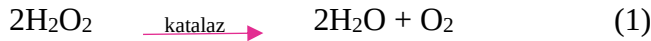
NOT: Lamba 20 dk önceden açılır ve ısınması sağlanır.

Standart grafiği yardımıyla yapılan seyreltmeler de göz önüne alınarak SOD aktivitesi doku süpernatantı için "U/mg protein dk" cinsinden hesaplanır.

5.5.7. Katalaz (KAT) aktivitesi tayini (Aebi, 1974)

Katalaz ikili bir görevi bulunmaktadır:

- (1) H₂O₂'nin H₂O ve O₂'yi vermek üzere ayrışması [katalitik aktivite].
- (2) H donörlerinin oksidasyonu, örneğin metanol, etanol, formik asit, fenoller, 1 mol peroksit tüketimi [peroksidik aktivite].



Aebi metodundaki Katalaz aktivitesinin tayini yöntemine göre: Katalaz enzimi; H₂O₂'nin, H₂O'ye dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu dönüşüm 240 nm'de absorbansın azalması katalaz aktivitesi ile ilgilidir (Aebi, 1984).

Prensip: Katalaz enzimi; H₂O₂'nin, H₂O'ya dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu dönüşüm 240 nm'de absorbansın azalması ile takip edilebilir. 1 dk'da absorbanstaki azalma katalaz aktivitesi ile ilgilidir.

Gerekli Çözeltiler:

Fosfat tamponu (50 mM, pH= 7,0): a) 6,81 g KH₂PO₄ ve b) 8,90 g Na₂HPO₄·2H₂O tartılıp ayrı ayrı biraz distile suda çözüldükten sonra hacimleri ayrı ayrı distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Kullanılacağı zaman a'dan 1 hacim b'den 1.5 hacim alınarak karıştırılır (pH=7,0 olmalı, 2°C de saklanır, fosfat tamponu bakteriyel kontaminasyon olmadığı sürece stabildir, kullanılabilir).

H₂O₂ çözeltisi (30 mM) +Fosfat tamponu: Yoğunluğu d=1.11 g/ml olan %30 g'lık H₂O₂ çözeltisinden 0,31 ml alınır ve 50 mM'lık fosfat tamponu (pH=7,0) ile 100 ml'ye seyreltilir (taze hazırlanır).

Doku homojenatı: Doku serum fizyolojik ile homojenize edilir. Gerekirse doku, serum fizyolojik ile seyreltilebilir. Ön denemelerle dokunun ne kadar seyreltileceği önceden tespit edilmelidir.

Deneyin Yapılışı: Doku süpernatantı alınır ve gerekirse serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır. Dilüsyon olduktan sonra 5-10 dk içinde mutlaka çalışılmalıdır. Numune ve kör olarak işaretlenmiş 2 ayrı deney tüpü alınır. Aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 10: Katalaz tayin yöntemi

	Numune	Kör
Distile Su	-	0,2 ml
Süpernatant	0,4 ml	0,4 ml
H₂O₂ çözeltisi + fosfat tamponu	0,2 ml	-

İlave edilir ve karıştırılır. 1 dk. sonra 240 nm de absorbansları okunarak kaydedilir. Sonuçlar bu deney için ekstinksiyon katsayısı 0,004 (0,00394) mM⁻¹/mm⁻¹ göz önüne alınarak hesaplanır.

5.6. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analiz yapmak için *Graph-Pad Prism 6.0* (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*) programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için: ikiden fazla grup ortalamasının karşılaştırılmasında ve fark bulunan değişkenlerde alt grupların arasındaki farkların yorumlanması için *One-Way ANOVA* yöntemi ve *Tukey testi*, iki grup kıyaslamasında t testi kullanıldı. Analizlerde değişkenlerin ortalamaları $\pm$ Standard deviasyon (SD) ile incelenmiş ve P<0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

Çalışmamızda 2 aylık Wistar Albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. 24 adet sıçan, eşit sayıda ayrılarak Kontrol, MTX, MTX+Que ve MTX+LA olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır.

6.1. Lipit peroksidasyon, nitrik oksit ve siyalik asit sonuçları

Dalak LPO seviyesi; MTX uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış, MTX+Que ve MTX+LA gruplarında MTX grubuna göre anlamlı seviyede azalma gözlemlenmiştir. (** $p < 0,001$, $^ap < 0,05$, $^{aaa}p < 0,001$) (Tablo 11, Şekil 18).

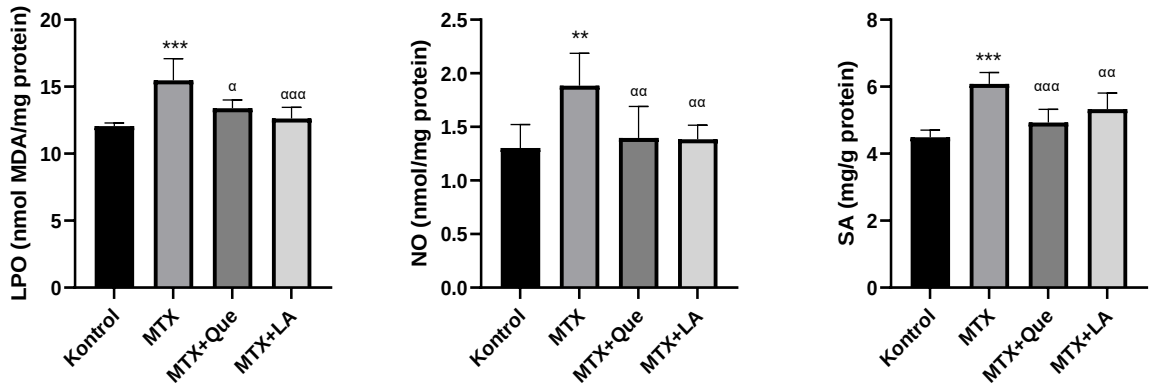
Dalak NO seviyesinde; MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gözlenmiş, MTX+Que ve MTX+LA gruplarında NO seviyesi MTX grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır (** $p < 0,01$, $^{aa}p < 0,01$, $^{aa}p < 0,01$) (Tablo 11, Şekil 18).

Dalak SA seviyesi; MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, MTX+Que ve MTX+LA gruplarında MTX grubuyla kıyaslandığında anlamlı derecede azalmıştır (** $p < 0,001$, $^{aaa}p < 0,001$, $^{aa}p < 0,01$) (Tablo 11, Şekil 18).

Tablo 11. Tüm gruplarda dalak dokusuna ait LPO, NO, SA değerleri ve karşılaştırılması

	K (n=6)	MTX (n=6)	MTX+Que (n=6)	MTX+ LA (n=6)	P(Anova)
LPO (nmol MDA/mg protein)	12,05± 0,24	15,47± 1,62 ***	13,39± 0,63 ^a	12,63± 0,84 ^{aaa}	P < 0,0001
NO (nmol/mg protein)	1,30± 0,22	1,88± 0,30 **	1,39± 0,29 ^{aa}	1,38± 1,13 ^{aa}	P = 0,0015
SA (mg/g protein)	4,49± 0,21	6,08± 0,34 ***	4,93± 0,39 ^{aaa}	5,33± 0,47 ^{aa}	P < 0,0001

K: Kontrol, MTX: Metotreksat, Que: Kuersetin, LA: Lipoik asit, Ort: Ortalama± SD: Standart sapma, LPO: Lipit Peroksidasyon, MDA: Malondialdehit, NO: Nitrik Oksit, SA: Siyalik Asit
** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ kontrol grubuna göre anlamlı, ^a $p < 0,05$, ^{aa} $p < 0,01$, ^{aaa} $p < 0,001$ MTX grubuna göre anlamlı.



Şekil 18: Dalak dokusu LPO, NO ve SA seviyesinin grafiksel gösterimi

6.2. Glutasyon, süperoksit dismutaz aktivitesi ve katalaz aktivitesi sonuçları

Dalak dokusu GSH seviyesinde; MTX verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gözlenmiş, MTX+LA ve MTX+ Que gruplarında MTX grubuna göre anlamlı derecede azalma olmuştur (* $p<0,05$, $^{\alpha}p<0,05$, $^{\alpha\alpha}p<0,05$) (Tablo 12, Şekil 19).

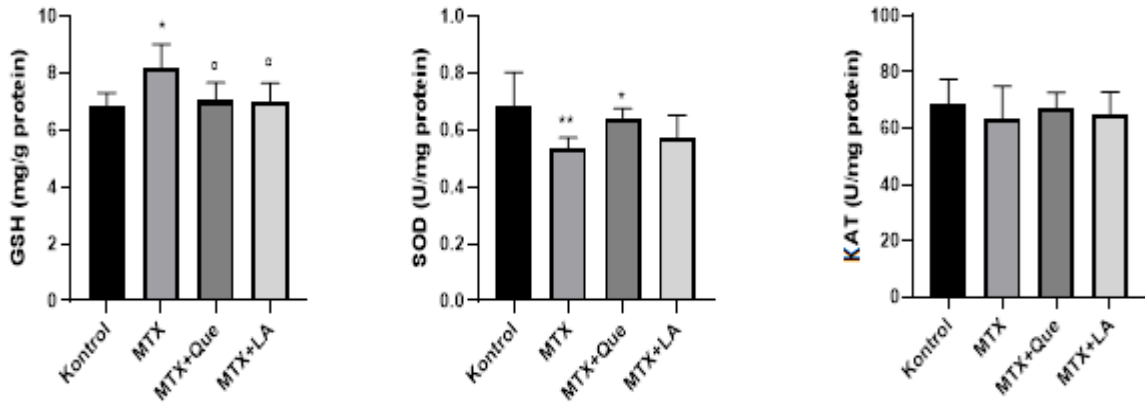
Dalak dokusu SOD aktivitesi; MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma gösterirken, MTX+Que grubunda MTX grubuna göre anlamlı bir değişme gözlemlenmemiş, MTX+LA grubunda ise MTX grubuna göre anlamlı derecede artma olmuştur (* $p<0,01$, $^{\alpha}p<0,05$) (Tablo 12, Şekil 19).

Dalak dokusu KAT aktivitesinde; gruplar arasında herhangi bir değişim olmamıştır (Tablo 12, Şekil 19).

Tablo 12: Tüm gruplarda dalak dokusuna ait GSH, SOD aktivitesi ve KAT aktivitesi değerleri ve karşılaştırılması

	K (n=6)	MTX (n=6)	MTX+Que (n=6)	MTX+LA (n=6)	P(Anova)
GSH (mg/g protein)	6,86± 0,44	8,19± 0,82 *	7,03± 0,63 ^a	6,99± 0,66 ^a	P = 0,0058
SOD (U/mg protein)	0,68± 0,12	0,53± 0,04 **	0,64± 0,03 ^a	0,057± 0,08	P = 0,0041
KAT (U/mg protein)	68,25± 9,18	63,50± 11,35	66,80± 5,91	64,71± 8,17	P = 0,8223

K: Kontrol, MTX: Metotreksat, Que: Kuersetin, LA: Lipoik asit, Ort: Ortalama± SD: Standart sapma, GSH: Glutasyon, SOD: Speroksit Dismutaz, KAT: Katalaz *p<0,05 **p<0,01 kontrol grubuna göre anlamlı, ^ap<0,05 MTX grubuna göre anlamlı



Şekil 19: Dalak dokusundaki GSH seviyesi, SOD ve KAT aktivitesinin grafiksel gösterimi

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

MTX folat antagonisti olarak immünosüpresan ve antikanser ajan olarak görev almaktadır. Çeşitli kanser türleri, beyin tümörlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılmasının yanı sıra sedef hastalığı, romatoid artrit gibi ototimmün ve enflamatuvar hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. (Cronstein ve Aune, 2020; Devrim ve ark., 2005; Karami ve ark., 2019). MTX etkisini folik asitleri tetrahidrofolata çeviren hücre içi bir enzim olan dihidrofolat redüktazın enzimine folik asitten daha büyük bir afinite ile bağlanarak dihidrofolat redüktazın enzimini inhibasyona uğratarak göstermektedir. MTX'in tetrahidrofolat oluşumunu inhibe etmesi pürin ve timidilat biyosentezini engelleyerek deoksiniükleotit havuz dengesizliği oluşturur. Aktif olarak bölünen tümör hücreleri gibi hücrelerde azalmış folat, pürin ve timin eksikliği, DNA ve RNA sentezinin tıkanması sonucunda hücre ölümüne neden olur. (Neuman ve ark., 1999; Rubino, 2001).

Fizyolojik folatların karaciğer, eritrositler ve çeşitli dokularda hücre içi olarak poliglutamil formlarına dönüştürülerek depolandığı ve bu depo poliglutamatların bazı folata bağlı enzimlere de belirgin şekilde artan afiniteye sahip olduğu bilinmektedir. (Chabner ve ark., 1985; Neuman ve ark., 1999) Aynı poliglutamasyon sürecinin folat analogu MTX'te meydana geldiği tespit edilmiş MTX poliglutamatların de novo pirimidin ve pürin sentezinde yer alan diğer folat bağımlı enzimlerin yanı sıra transmetilasyon reaksiyonları ve poliamin sentezinde yer alan enzimleri de inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Chabner ve ark., 1985; Cronstein ve Aune, 2020).

MTX'in monoglutamat ve poliglutamatdan oluşan iki formu da birçok enzimin inhibitörü olması, poliglutamatlanmış formlarının hücre içi depolarda haftalarca vücutta tutulması sonucu folat seviyelerinin düşmesi ve bu iki ilaç formunun da malign hücrelere özgüllüğünün olmaması nedeniyle vücutta toksit etki yaratmaktadır (Cronstein ve Aune, 2020; Neuman ve ark., 1999). Ayrıca MTX esas olarak böbrekler tarafından elimine edilir. MTX ve daha az çözünür metabolitleri olan 7-OH-MTX ve DAMPA idrarda çökmesine bağlı olarak renal toksisite meydana gelebilir. MTX'in ana hücre dışı metaboliti olan 7-OH-MTX'a dönüşümü karaciğerde bir enzim kompleksi tarafından gerçekleşmekte yüksek doz MTX uygulamalarında burada birikerek toksite riskinin arttırmaktadır. (Karami ve ark., 2019; Kozminski ve ark., 2020).

MTX kullanımına bağı gelişen iç organlardaki toksisite, MTX'in tümör hücresi gibi hücrelere spesifik olmamasından kaynaklı çevre dokularda oksidan molekülleri arttırarak oluşan oksidatif stres indükasyonu sorumlu tutulmaktadır (Soliman ve ark., 2020). Oksidatif hasardan etkilen organlardan biri olan dalak; immün ve hematopoetik sistemde aktif görev alan en büyük lenfoid dokulu organdır. Dalak başlıca kanın temizlenme merkezi olmasının yanı sıra kırmızı kan hücrelerinin de depo edildiği organdır. Trombositlerin ve kırmızı kan hücrelerinin yıkım merkezi olup kanı filtrelemesinin yanında, hatalı eritrositlerin ayıklanması, bakteriler gibi yabancı cisimlerin filtrasyonu gibi görevleri yerine getirerek immün sistemde aktif rol alan bir organdır. (Sills, 1987; Ulusoy ve ark., 2014).

Araştırmacılar son dönemde MTX toksitesinin ana nedeni olan artan ROT miktarına bağı oluşan oksidatif strese karşı çeşitli ek antioksidan tedavileri denemekte olup ve bu tedavilerin oksidan/antioksidan dengenin yeniden kurulmasına yardımcı olduğunu bildirmişlerdir (Karami ve ark., 2019; Kozminski ve ark., 2020; Yuksel ve ark., 2017).

Biz de yaptığımız bu çalışmada tek doz 20mg/kg MTX uygulanan sıçan dalak dokusunda meydana gelen oksidatif hasarı güçlü antioksidan özellikleri ile bilinen Que ve LA ile tedavi ederek oksidan ve antioksidan parametrelerdeki değişimleri inceledik.

Que insan vücudunda sentezlenmeyip sadece bitkisel kaynaklardan alınabilen flavonoid yapıda güçlü antioksidan özellikte bir bileşiktir. Çeşitli meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunmakla beraber en iyi bilinen kaynağı soğandır. (Deepika ve Maurya, 2022; Li ve ark., 2016 a.) Que'nin güçlü antioksidan özelliklerinin yanı sıra antiinflamatuvar, anti-proliferatif, antikanserojen, antidiyabetik ve antiviral özellikler gösterdiği çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Alizadeh ve Ebrahimzadeh, 2022; Reyes-Farias ve Carrasco-Pozo, 2019). Que'nin yapısında bulunan çift bağ ve fenolik hidroksil grupları sayesinde SR'leri oksitleyerek stabil hale getirir ve dolayısıyla doymamış yağ asidi oksidasyonunu da önler. Ayrıca H_2O_2 , O_2^- ve $H^\cdot$ radikalleri gibi birçok ROT'leri temizlemesinin yanında RNT'lerini de temizleme yeteneğine sahip güçlü antioksidan özelliktedir. (Batiha ve ark., 2020; Yuksel ve ark., 2017). Yapılan çeşitli çalışmalarla Que'nin enzimatik antioksidanlardan SOD ve KAT aktiviteleri arttırırken MDA seviyelerini azalttığı ispatlanmıştır (Batiha ve ark., 2020, Li ve ark., 2016 b.).

Tiyotik asit olarak da bilinen LA ise, insan vücudunda doğal olarak sentezlenmesinin yanı sıra bitkisel ve hayvansal kaynaklardan diyet yoluyla alınabilen ditiol bileşiği olup güçlü antioksidan özelliğe sahiptir. Doğal formu insan mitokondrisinde disülfid yapıda bir koenzim

olarak bulunup, piruvat dehidrojenaz ve α -ketoglutarat dehidrojenaz aktivitesinde görev alır (Arpag ve ark., 2018; Tabassum ve ark., 2010). LA'nın güçlü antioksidan olmasının yanı sıra antiinflamatuvar, antikanser, antikoagüle gibi çeşitli bilinen yararları vardır. Diyet yoluyla alındığında etki mekanizması tam olarak bilinmese de bir kısmının redükte olarak DHLA'ya dönüştüğü ve LA/DHLA çiftinin çok güçlü antioksidan kapasitesi olduğu bilinmektedir (Packer ve ark., 1995). LA boyutunun çok küçük olup yüksek lipofilitesi ile kan beyin bariyerini kolayca geçerek nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de etkili bir ajan olduğu bilinmektedir (Arpag ve ark., 2018; Shay ve ark., 2009). Güçlü bir antioksidan olmasının yanı sıra metal şelasyonu ve diğer antioksidanların rejenerasyon kapasitelerini arttırma gibi fonksiyonları da vardır (Pinar ve ark., 2018).

Çalışmamızda MTX uygulanan sıçanların dalak dokusundaki oksidan parametrelerden LPO (MDA), NO ve SA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derece artma olduğunu tespit ettik. MTX'in sebep olduğu bu oksidatif stresi güçlü antioksidan özellikleri ile bilinen Que ve LA ile tedavi ederek antioksidan parametrelerden GSH seviyesi ile SOD ve KAT aktivitelerini inceledik.

Yaptığımız deneyler sonucunda LPO (MDA) düzeyinin MTX tedavisi verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken, Que ve LA ile tedavi edilen gruplarda MDA düzeyleri MTX grubuna göre anlamlı derecede azalmış olarak tespit ettik. Daha önce yapılmış hayvan çalışmalarına bakıldığında MTX ile tedavi sonrası karaciğer (Ahmad ve ark., 2021), yumurtalık (Kiremitli ve ark., 2021), böbrek (Öktem ve ark., 2006) gibi çeşitli dokularda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyesinin artmış olduğu sonucu görülmektedir. Sıçan dalak dokusunda (Soliman ve ark., 2020) yapılmış bir çalışmada da diğer dokularla uyumlu olarak MDA düzeylerinin MTX uygulaması ile arttığı bulunmuştur. Tedavi edici antioksidan ajan olarak Que (Yuksel ve ark., 2017) ve LA (Somi ve ark., 2011) ile yapılmış tedavilerin MDA seviyelerini azaltarak MTX'in yaratmış olduğu hasarı tedavi ettiği kanıtlanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada daha önce yapılmış çalışma sonuçları ile uyumlu olarak sıçan dalak dokusu MDA seviyesinin MTX uygulaması ile artmış olarak tespit etmiş olup, güçlü antioksidan özellikleri ile bilinen Que ve LA tedavisi ile bu artışı geri çevirerek, Que ve LA'nın lipid peroksidasyonunun önlemede etkili iki ajan olduğunu tespit ettik.

Çalışmamızda bir diğer oksidan parametrelerden nitrojen kaynaklı reaktif türlerden NO seviyesinin dalak dokusunda MTX uygulamasına bağlı olarak arttığını daha önce yapılmış

farklı doku çalışmalarıyla uyumlu olarak; omurilik (Uzar ve ark., 2006), serum (Ahmad ve ark., 2021), karaciğer (Elsawy ve ark., 2020; Mehrzadi ve ark., 2018), kalp (Oktay ve Caliskan 2023) ve böbrek (Uz ve ark., 2005) tespit ettik. Artan seviyede üretilen NO, hücreyi oksidatif hasardan koruyan hücre içi antioksidanlardan GSH'ın hızlı tükenmesine yol açarken ayrıca O₂-radikalleri ile reaksiyona girerek proteinlerin nitrasyonuna ve peroksinitrit radikallerinin oluşumuna neden olabilir. (Elsawy ve ark., 2020). Çalışmamızda MTX kaynaklı artan NO seviyeleri, güçlü antioksidan kapasiteleri ile bilinen Que ve LA ile tedavi edilerek, NO seviyeleri anlamlı derecede azalmış, NO'nun sebep olabileceği oksidatif hasardan dalak dokusu korunmuştur.

Oksidan parametrelerden SA seviyesini çalışmamızda; MTX uygulaması ile kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını gözlemledik. Nöronomik asidin asetillenmiş bir türevi ve tüm biyolojik membranlarda terminal uçta bulunan bir şeker olan SA oksidatif stresin belirteçlerinden biridir. SA miktarı bireyler arasında çok az değişkenlik gösterdiğinden daha doğru bir inflamasyon göstergesidir (Oktay ve Caliskan 2023; Rajappa ve ark., 2016). Yapmış olduğumuz çalışmada MTX uygulaması ile artan SA miktarı, Que ve LA tedavisinin ardından literatürle (Ak ve ark., 2023) uyumlu olarak anlamlı derecede azalmış, Que ve LA MTX'in sebep olduğu oksidatif hasardan dalak dokusunu korumuştur.

Yapmış olduğumuz çalışmada dalak dokusunda MTX kaynaklı oksidatif hasar oluştuğunu ve oksidatif hasarın lipid yoğunluklu yapıdaki hücre membranına zarar verdiğini artan MDA miktarının gösterdiği LPO seviyelerinden ve SA seviyelerinden anlaşılmaktadır. Normal koşullarda hücre membranının dış yüzeyinde bulunan SA'leri oksidan dengenin bozulması durumunda hücre membran bütünlüğünü korumak için artarak hücreyi sarıp hücre yüzeyine negatif yük kazandırır (Oktay ve Caliskan 2023; Rajappa ve ark., 2016). Çalışmamızla Que ve LA tedavilerinin uygulanması ile; artan MDA ve SA seviyelerini azalttığını güçlü antioksidan özellik göstererek hücre membran bütünlüğünün bozulmasını engelleyerek hücreyi oksidatif hasardan koruduğunu kanıtladık.

Literatürde MTX tedavisi uygulanan hayvan deneylerinin sonuçlarına bakıldığında antioksidan parametrelerde birbirinden farklı çeşitli sonuçlar olduğunu gözlemledik. Bu durum uygulanan MTX'in dozu, uygulama günü ve sıklığı, incelenen dokunun farklı olması gibi çeşitli etkenlere bağlı değişkenlik göstermektedir.

Daha önce yapılmış çalışmalardan; Dhanisha ve ark. (2021) MTX uygulanan fare modelinde akciğer ve böbrek dokusunda GSH seviyelerini anlamı derecede azalmış olarak tespit etmiş ve yine Hafez ve ark. (2015) MTX uygulanan sıçan karaciğer dokusunda GSH seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış olarak tespit etmiştir. MTX uygulamasının yarattığı GSH düşüşünü ise Que (Ak ve ark., 2023) ve LA (Tabassum ve ark.,2010) ile tedavisi uygulayarak MTX tedavisi ile düşen GSH seviyesini Que ve LA uygulaması ile arttığını tespit etmişlerdir. Khafaga ve El-sayid (2018) MTX tedavisi uyguladıkları sıçanlarla yaptıkları deneyde karaciğer dokusunda GSH seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olarak tespit etmişlerdir. Biz de çalışmamızda dalak dokusunda antioksidan parametrelerden GSH seviyelerini incelediğimizde, MTX uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir artma tespit ettik. Dalak dokusunda GSH miktarının MTX uygulaması ile artmasının sebebi; immün sistemin önemli bir parçası olan dalak da antioksidan savunma mekanizmasının aktive olarak immün yanıt geliştirdiğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. GSH seviyesi MTX+LA ve MTX+Que gruplarında MTX grubuna göre anlamlı derecede azalmış kontrol grubundaki GSH seviyelerine yaklaşmış olarak tespit ettik. Bu durumu ise deney tasarımında 1. Gün MTX verilmesi ile birlikte antioksidan tedavisine başlanması ve antioksidan tedavisinin 5 gün boyunca devam etmesi dalakta MTX kaynaklı oksidatif hasarın hafif oluştuğuna ve LA ve Que'nin dalak dokusunda GSH'ı arttırarak oksidatif hasardan koruduğunu düşünüyoruz.

Antioksidan enzimlerden SOD aktivitesi çeşitli dokularda MTX (Hafez ve ark., 2015; Khafaga ve El-sayid, 2018) ile tedavi ile kontrol grubuna göre azalırken LA (Pınar ve ark., 2018; Tabassum ve ark., 2010) ve Que (Ak ve ark., 2023) tedavisi ile anlamlı bir iyileşme gözlemlenmiştir. Biz de dalak dokusunda yaptığımız deneylerde SOD aktivitesinde MTX grubunda kontrol grubuna göre bir azalma tespit ettik. Que tedavisi ile anlamlı bir iyileşme gözlemlerken LA tedavisinin ardından bir miktar artma olsa da anlamlı bir değişim gözlemlemedik. SOD aktivitesindeki azalmanın sebebinin MTX kaynaklı artan süperoksit radikallerinin dalak dokusunda birikirken enzimatik antioksidan savunma mekanizmasından SOD enziminin tükenmesinden kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz.

Çeşitli dokularda daha önce yapılmış hayvan deneylerinde, antioksidan enzimlerden bir diğeri olan KAT aktivitesi MTX (Cellat ve Kutlu, 2021; Dhanisha ve ark. 2021; Öktem ve ark., 2006) uygulaması ile azalırken, Que (Erboga ve ark., 2015) ve LA (Pınar ve ark., 2018) antioksidanları ile tedavinin ardından iyileşme gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda KAT aktivitesini ölçtüğümüz deneylerde ise MTX uygulanması ile KAT aktivitesinde bir miktar

azalma gözlenmiş antioksidan tedavisi ile küçük bir oranda MTX grubuna kıyasla artma olsa da bu değişimler hiçbir grupta anlamlı derecede değildir. Bunun sebebinin SOD aktivitesinin de azalması sonucu ortamda oluşan hidrojen peroksitin sınırlı olmasından kaynaklı olabileceğini ayrıca deney tasarımında uygulanan tek doz 20 mg/kg MTX'i hayvanlar immün yanıt geliştirerek MTX'in yarattığı oksidatif hasarı tolere edebildiğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Literatürde SOD ve KAT aktiviteleri MTX uygulaması ile azalma olduğu görüldüğü kadar farklı sonuçların bulunduğu çalışmalar da mevcuttur. Armağan ve ark. (2015) tek doz 20mg/kg MTX uyguladıkları sıçanların karaciğer ve böbrek dokuları ile çalışmış, karaciğer dokusunda antioksidan parametrelerden SOD ve KAT aktivitesini kontrole göre artan seviyelerde tespit etmiş, LA tedavisi uyguladıklarında ise SOD ve KAT aktivitelerinin kontrol grubu seviyelerine anlamlı olmayan azalma tespit etmişlerdir. Böbrek dokusunda SOD aktivite seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olmayan seviyede azalma gözlemlenirken, KAT aktivite seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olmayan seviyede artma gözlemlenmiştir. LA tedavisi ile SOD ve KAT aktivite seviyeleri kontrol grubu seviyelerine ulaşmış olsa da değişimler anlamlı derecede değildir. Uzar ve ark. (2006) sıçan beyincik dokusunda yaptıkları çalışmada sıçanlara tez doz 20 mg/kg MTX uygulamış, deneylerinin sonucunda MTX uyguladıkları grupta SOD ve KAT aktivite sonuçlarını kontrol grubuna göre anlamlı seviyede artmış olarak tespit etmişlerdir. Devrim ve ark. (2005) yaptıkları deneyde sıçanlara 7 hafta boyunca 60 mg/m² vücut yüzey alanı MTX uygulamış ve böbrek dokusunda SOD ve KAT aktiviteleri seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan artış ölçmüşlerdir. Soylu Karapınar ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada sıçan yumurtalık dokusunda MTX uygulaması ile KAT aktivitesi seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma ölçülmüş, LA tedavisi ile MTX+LA grubunda MTX grubuna göre bir miktar artma olsa da anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.

Yaptığımız çalışma sonucunda MTX tedavisinin dalak dokusunda oksidan parametreleri arttırarak oksidatif strese yol açtığını, artan bu oksidan moleküller ise Que ve LA ile antioksidan tedavisi ile iyileşebildiğini kanıtladık. Antioksidan parametreler ile yaptığımız deneyler sonucu literatürdeki birçok çalışmadan farklı olarak MTX tedavisinin sıçan dalak dokusunda GSH seviyesinde artmaya neden olması antioksidan enzimlerden SOD ve KAT aktivitesi değerlerinde anlamlı değişime neden olmamasını immün sistem organlarından dalağın immün yanıt geliştirerek buradaki hasarı elimine etmesi olarak yorumladık.

8. KAYNAKLAR

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Aebi, H. (1974). Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis Academic*. Ed: Bergmeyer HV Eds, Academic Press Inc., New York, 2nd ed., 673-684. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
- Ahmad, A., Alkharfy, K. M., Bin Jordan, Y. A., Shahid, M., Ansari, M. A., Alqahtani, S., Jan, B. L., Al-Jenoobi, F. I., & Raish, M. (2021). Sinapic acid mitigates methotrexate-induced hepatic injuries in rats through modulation of Nrf-2/HO-1 signaling. *Environmental Toxicology*, 36(7), 1261–1268. <https://doi.org/10.1002/tox.23123>
- Ak, E., Muhan, A., Çalışkan, S., & Oktay S. (2023). Comparison of the Protective Effect of Alpha Lipoic Acid and Quercetin in Methotrexate- Induced Lung Damage. *Bagcilar Med Bull*, 8(1): 82-87 DOI: 10.4274/BMB.galenos.2023.2023-01-011
- Alizadeh, S. R., & Ebrahimzadeh, M. A. (2022). Quercetin derivatives: Drug design, development, and biological activities, a review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 229, 114068. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.114068>
- Andres, S., Pevny, S., Ziegenhagen, R., Bakhiya, N., Schäfer, B., Hirsch-ERNTt, K. I., & Lampen, A. (2018). Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(1), 1-15. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700447>
- Arazi, H., Eghbali, E., & Suzuki, K. (2021). Creatine supplementation, physical exercise and oxidative stress markers: A review of the mechanisms and effectiveness. *Nutrients*, 13(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu13030869>

- Armagan, I., Bayram, D., Candan, I. A., Yigit, A., Celik, E., Armagan, H. H., & Uğuz, A. C. (2015). Effects of pentoxifylline and alpha lipoic acid on methotrexate-induced damage in liver and kidney of rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(3), 1122–1131. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.003>
- Arpag, H., Gül, M., Aydemir, Y., Atilla, N., Yiğitcan, B., Cakir, T., Polat, C., Behirli, Ö., & Sayan, M. (2018). Protective Effects of Alpha-Lipoic Acid on Methotrexate-Induced Oxidative Lung Injury in Rats. *Journal of Investigative Surgery*, 31(2), 107–113. <https://doi.org/10.1080/08941939.2017.1296513>
- Aslankoc, R., Ozmen, O., & Ellidag, H. Y. (2020). Ameliorating effects of agomelatine on testicular and epididymal damage induced by methotrexate in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34(3), e22445. <https://doi.org/10.1002/jbt.22445>
- Bae, E. H., Lee, J., Ma, S. K., Kim, I. J., Frøkiaer, J., Nielsen, S., Kim, S. Y., & Kim, S. W. (2009). alpha-Lipoic acid prevents cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 24(9), 2692–2700. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp176>
- Batiha, G. E., Beshbishy, A. M., Ikram, M., Mulla, Z. S., El-Hack, M. E. A., Taha, A.E., Algammal, A. M., & Elewa, Y. H. A. (2020). The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. *Foods*, (3):374. <https://doi.org/10.3390/foods9030374>
- Beutler, E. (1975) *Reduced Glutathione (GSH)*. In: Bergmeyer, H.V., Ed., *Red Blood Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, 2nd Edition, Grune and Stratton, New York, 112-114.
- Cellat, M., & Kutlu, T. (2021) Effects of Esculetin on the Methotrexate Induced Liver and Kidney Damage in Rats. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.*, 35(3): 151-157.

https://www.researchgate.net/publication/356379555_Effects_of_Esculetin_on_the_Methotrexate_Induced_Liver_and_Kidney_Damage_in_Rats

Chabner, B. A., Allegra, C. J., Curt, G. A., Clendeninn, N. J., Baram, J., Koizumi, S., Drake, J. C., & Jolivet, J. (1985). Perspectives polyglutamation of methotrexate is methotrexate a prodrug? *The Journal of Clinical Investigation*, 76,907-912. <https://doi.org/10.1172/JCI112088>.

Cronstein, B. N., & Aune, T. M. (2020). Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 16(3), 145–154. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0373-9>

Custer, R. P., Freeman-Narro, M., & Narro, S. A. (1977). Hepatotoxicity in Wistar rats following chronic methotrexate administration: a model of human reaction. *Journal of the National Cancer Institute*, 58(4), 1011–1017. <https://doi.org/10.1093/jnci/58.4.1011>

Çakır, T., Baştürk, A., Polat, C., Aslaner, A., Durgut, H., Şehirli, A. Ö., Gül, M., Ögünç, A. V., Gül, S., Sabuncuoğlu, M. Z., & Oruç, M. T. (2015). Does alfa lipoic acid prevent liver from methotrexate induced oxidative injury in rats? *Acta Cirurgica Brasileira*, 30(4), 247–254. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150040000003>

Çetinel, N. (2022). *Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattında kuersetin ve Bevacizumab'ın kombine etkisinin araştırılması*, (Tez No.774764) [Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi), Ulusal Tez Merkezi.

Deepika, & Maurya, P. K. (2022). Health benefits of quercetin in age-related diseases. *Molecules*, 27(8), 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules27082498>

Devrim, E., Cetin, R., Kılıçoğlu, B., Erguder, B. I., Avcı, A. & Durak I. (2005). Methotrexate Causes Oxidative Stress in Rat Kidney Tissues, *Renal Failure*, 27(6): 771-773. DOI:10.1080/08860220500244823

- Dhanisha, S., Drishya, S., Rary, M. & Guruvayoorappan, C. (2021). Polyphenolic-rich fraction of *Pithecellobium dulce* attenuates methotrexate-induced oxidative stress and associated tissue injury by regulating the TNF- α , IL-1 β and IL-6 pro-inflammatory cytokines. *International Journal of Functional Nutrition*, 2:7. DOI: 10.3892/ijfn.2021.17
- Dündar, Y. & Aslan, R. (1999). Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller – antioksidanlar. *Cerrahi Tıp Bilim. Derg*, 2(2), 134-142. https://www.researchgate.net/publication/291829224_Hucre_Molekuler_Statusunun_Anlasilmasi_ve_Fizyolojik_Onem_Acisindan_Radikaller_-Antioksidanlar
- Dündar, Y. & Aslan, R. (1999). Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 9, 1-2: 32-39. https://www.researchgate.net/publication/291945332_Oksidanantioksidan_Denge_ve_Korunmasinda_Vitaminlerin_Rolu
- Eichner, E. R., & City, O. (1979). Splenic Function: Normal, Too Much and Too Little. *The American Journal of Medicine*, 66, 311-320. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(79\)90554-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(79)90554-0)
- Elsawy, H., Algefare, A. I., Alfwuaires, M., Khalil, M., Elmenshawy, O. M., Sedky, A., & Abdel-Moneim, A. M. (2020). Naringin alleviates methotrexate-induced liver injury in male albino rats and enhances its antitumor efficacy in HepG2 cells. *Bioscience Reports*, 40(6), BSR20193686. <https://doi.org/10.1042/BSR20193686>
- Erboğa, M., Aktaş, C., Erboğa, Z. F., Dönmez, Y. B., & Gürel, A. (2015). Quercetin ameliorates methotrexate-induced renal damage, apoptosis and oxidative stress in rats. *Renal Failure*, 37(9), 1492–1497. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1074521>
- Feketeová, L., Jančová, P., Moravcová, P., Janegová, A., Bauerová, K., Poništ, S., Mihalová, D., Janega, P., & Babál, P. (2012). Effect of methotrexate on inflammatory cells redistribution in experimental adjuvant arthritis. *Rheumatology International*, 32(11), 3517–3523. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-2177-3>

- Filomeni, G., de Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 377–388. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>
- Fried, R. (1975). Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase. *Biochimie*, 57(5), 657–660. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(75\)80147-7](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(75)80147-7)
- Garcia, Y. J., Rodríguez-Malaver, A. J., & Peñaloza, N. (2005). Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *Journal of Neuroscience Methods*, 144(1), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.10.018>
- Güdek, A. M. (2020). *Sağlıklı bireylerde karaciğer ve dalak hacimlerinin ilişkisinin bilgisayarlı tomografi görüntüleri üzerinden cavalieri prensibi ile incelenmesi*, (Tez No.648918) [doktora tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi], Ulusal Tez Merkezi.
- Gündoğdu, R., Erkan, M., Aydın, M., Sönmez, M. F., Vural, A., Kökoğlu, K., Karabulut, D., & Şahin, M. İ. (2019). Assessment of the Effectiveness of Quercetin on Cisplatin-Induced Ototoxicity in Rats. *The Journal of International Advanced Otology*, 15(2), 229–236. <https://doi.org/10.5152/iao.2019.5902>
- Hafez, H. M., Ibrahim, M. A., Ibrahim, S. A., Amin, E. F., Goma, W., & Abdelrahman, A. M. (2015). Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *European Journal of Pharmacology*, 768, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.047>
- Harman D., (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11(3), 298-300. Doi: 10.1093/geronj/11.3.298
- Hosseini, A., Razavi, B. M., Banach, M., & Hosseinzadeh, H. (2021). Quercetin and metabolic syndrome: A review. *Phytotherapy Research*, 35(10), 5352–5364. <https://doi.org/10.1002/ptr.7144>

- Huffman, D. H., Han Wan, S., Azarnoff, D. L., Hoogstraten, B., & City, K. (1973). Pharmacokinetics of methotrexate. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 14(4), 572-579.
- Inoue, K., & Yuasa, H. (2014). Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 29(1), 12–19. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-13-RV-119>
- İleritürk, M., Doğan, T., & Kandemir, Ö. (2020). Investigation of the Effect of Berberine with Arginase Activity and Oxidant-Antioxidant Parameters on Bortezomib-Induced Spleen Injury in Rats. *Kocatepe Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.30607/kvj.809079>
- İrgil, C. (1994). *Dalak yaralanmaları ve splenotamili olgularda splenozis (dalak dokusunun ototransplantasyonu)*, (tez No. 40608) [uzmanlık tezi, Uludağ Üniversitesi], Ulusal Tez Merkezi.
- Kahraman, A., Serteser M. & Köken, T. (2002). Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 3(1), 1-8. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/kocatepetip/issue/17433/182601>
- Karabulut, H., & Ş Gülay, M.Ş. (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 65-76. DOI: 10.24880/maeuvsd.260790
- Karami, F., Ranjbar, S., Ghasemi, Y., & Negahdaripour, M. (2019). Analytical methodologies for determination of methotrexate and its metabolites in pharmaceutical, biological and environmental samples. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(6), 373–391. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.06.001>
- Kazancı, N. Ö., Özer, S., Yılmaz, R., & Karaaslan, E. (2013). Çocukluk Çağında Splenomegali. *Pediatric Practice and Research*, 1(1), 10-16. https://dergipark.org.tr/tr/pub/pprjournal/issue/20568/219186#article_cite

- Khafaga, A. F., & El-Sayed, Y. S. (2018). Spirulina ameliorates methotrexate hepatotoxicity via antioxidant, immune stimulation, and proinflammatory cytokines and apoptotic proteins modulation. *Life Sciences*, 196, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.010>
- Kılıç, M.Ç. (2018). *Sebebi bilinen splenomegali değerlendirmesinde shear wave ultrason elastografinin ayırıcı tanıdaki rolü*, (Tez No.522564) [uzmanlık tezi, Fırat Üniversitesi], Ulusal Tez Merkezi.
- Kiremitli, T., Kiremitli, S., Akselim, B., Yilmaz, B., Mammadov, R., Tor, I. H., Yazici, G. N., & Gulaboglu, M. (2021). Protective effect of Coenzyme Q10 on oxidative ovarian and uterine damage induced by methotrexate in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 40(9), 1537–1544. <https://doi.org/10.1177/09603271211002891>
- Kızır, D. (2022). *Sıçanlarda doksorubisin ile indüklenen dalak hasarı üzerine tannik asidin olası koruyucu etkisinin araştırılması*, (Tez No.738428) [yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi], Ulusal Tez Merkezi.
- Kocaman, N. (2012). *Metotreksat ile karaciğer hasarı oluşturulmuş sıçanlarda silmarinin koruyucu etkilerinin araştırılması*, (Tez No. 353930) [Uzmanlık tezi, Fırat Üniversitesi], Ulusal Tez Merkezi.
- Koźmiński, P., Halik, P. K., Chesori, R., & Gniazdowska, E. (2020). Overview of dual-acting drug methotrexate in different neurological diseases, autoimmune pathologies and cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/ijms21103483>
- Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepień, A., & Kadziołka, A. (1986). The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 155(3), 275–283. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(86\)90247-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(86)90247-0)

- Li, B., Yang, M., Liu, J. W., & Yin, G. T. (2016). Protective mechanism of quercetin on acute myocardial infarction in rats. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 15(1), 15017117. (b) <https://doi.org/10.4238/gmr.15017117>
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H., & Yin, Y. (2016). Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*, 8(3), 1-14. (a) <https://doi.org/10.3390/nu8030167>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275
- Lucas, C. J., Dimmitt, S. B., & Martin, J. H. (2019). Optimising low-dose methotrexate for rheumatoid arthritis-A review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 85, (10), 2228–2234. <https://doi.org/10.1111/bcp.14057>
- Matherly, L. H., & Goldman, I. D. (2003). Membrane transport of folates. *Vitamins and Hormones*, 66,403-456. DOI: 10.1016/s0083-6729(03)01012-4
- Mehrzadi, S., Fatemi, I., Esmaeilizadeh, M., Ghaznavi, H., Kalantar, H., & Goudarzi, M. (2018). Hepatoprotective effect of berberine against methotrexate induced liver toxicity in rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 97, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.113>
- Mercantepe, T., Tümkaya, L., & Mercantepe, F. (2019). Effects of Infliximab against Methotrexate Toxicity in Splenic Tissue via the Regulation of CD3, CD68, and C200R in Rats. *Cells Tissues Organs*, 206(6), 308–316. <https://doi.org/10.1159/000500905>
- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D.A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide- Biology and Chemistry*, 5(1): 62–71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>

- Morris, T. W., Reed, E., & Cronan, J. E. (1995). Lipoic Acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lplA* and *lipB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *Journal of Bacteriology*, 177(1), 1-10. <https://journals.asm.org/journal/jb>. doi: 10.1128/jb.177.1.1-10.1995
- Myloie, A. A., Collins, H., Umbles, C., & Kyle, J. (1986). Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82(3), 512–520. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(86\)90286-3](https://doi.org/10.1016/0041-008x(86)90286-3)
- Neuman, M. G., Cameron, R. G., Haber, J. A., Katz, G. G., Malkiewicz, I. M., & Shear, N. H. (1999). Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatocytotoxicity. *Clinical Biochemistry*, 32(7), 519–536. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(99\)00052-1](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(99)00052-1)
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., & Foyer, C. H. (2011). *The Arabidopsis Book*, 9(06), 1–32. <https://doi.org/10.1199/tab.0142>
- Oktay, S., & Çalışkan, S. (2023). Potential therapeutic effect of lipoic acid on methotrexate-induced oxidative stress in rat heart. *Eur J Biol.*, 82(2): 306-310. doi:10.26650/EurJBiol.2023.1306497
- Öktem, F., Yilmaz, H. R., Ozguner, F., Olgar, S., Ayata, A., Uzare, E., & Uz, E. (2006). Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology and Industrial Health*, 22(6), 241–247. <https://doi.org/10.1191/0748233706th265oa>
- Packer, L., Witt, E. H., & Tritschler, H. J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, 19(2), 227-250. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00017-r](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00017-r)
- Pekgöz, Ş. (2020). *Metotreksat'ın neden olduğu karaciğer doku hasarında Nebivolol'un etkisi*, (Tez No.630215) [yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi], Ulusal Tez Merkezi.

- Perrone, S., Tataranno, M. L., Stazzoni, G., & Buonocore, G. (2012). Oxidative stress and free radicals related diseases of the newborn. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(07), 1043–1050. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.327127>
- Pınar, N., Çakırca, G., Özgür, T., & Kaplan, M. (2018). The protective effects of alpha lipoic acid on methotrexate induced testis injury in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97, 1486–1492. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.078>
- Pınarlı, Ç. (2023). E, A ve C Vitaminlerinin Antioksidan Olarak İmmün Sistem Üzerine Etkileri. *Journal of Kocaeli Health and Technology University*, 1(1), 39-47. https://dergipark.org.tr/tr/pub/jokohtu/issue/79450/1288694#article_cite
- Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. M. T., & Shekhar, H. U. (2012). Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(07), 997–1019. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.327123>
- Rajappa, M., Shanmugam, R., Munisamy, M., Chandrashekar, L., Rajendiran, K. S., & Thappa, D. M. (2016). Effect of antipsoriatic therapy on oxidative stress index and sialic acid levels in patients with psoriasis. *International Journal of Dermatology*, 55(8), e422–e430. <https://doi.org/10.1111/ijd.13196>
- Reed, L. J., DeBusk, B.G., Gunsalus, I. C. & Hornberger C.S. Jr, (1951). Crystalline a-Lipoic Acid: A Catalytic Agent associated with Pyruvate dehydrogenase. *Science*, 114(2952), 93-4. DOI: 10.1126/science.114.2952.93
- Reyes-Farias, M., & Carrasco-Pozo, C. (2019). The anti-cancer effect of quercetin: Molecular implications in cancer metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms20123177>
- Rubino, F. M. (2001). Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *Journal of chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 764(1-2), 217–254. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(01\)00402-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(01)00402-9)

- Seevaratnam, R., Patel, B. P., & Hamadeh, M. J. (2009). Comparison of total protein concentration in skeletal muscle as measured by the Bradford and Lowry assays. *Journal of Biochemistry*, 145(6), 791–797. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp037>
- Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., & Hagen, T. M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1790(10), 1149–1160. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.026>
- Shen, D. D., & Azarnoff, D. L. (1978). Clinical Pharmacokinetics of Methotrexate. *Clinical Pharmacokinetics*, 3(1), 1-13. DOI: 10.2165/00003088-197803010-00001
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Sies, H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie*, 25(12), 1058-1071. <https://doi.org/10.1002/anie.198610581>
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4(1), 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Sills, R.H. (1987). Splenic function: physiology and splenic hypofunction, *CRC Critical Reviews in Onkology-Hematology* 7(1), 1-36. DOI: 10.1016/s1040-8428(87)80012-4
- Soliman, M. M., Al-Osaimi, S. H., Hassanmohamed, E., Aldhahrani, A., Alkhedaide, A., Althobaiti, F., & Mohamed, W. A. (2020). Protective Impacts of Moringa oleifera Leaf Extract against Methotrexate-Induced Oxidative Stress and Apoptosis on Mouse Spleen.

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 29;2020:6738474.
<https://doi.org/10.1155/2020/6738474>

- Somi, M. H., Hajipour, B., Abad, G. D., Hemmati, M. R., Ghabili, K., Khodadadi, A., Vatankhah, A. M. (2011). Protective role of lipoic acid on methotrexate induced intestinal damage in rabbit model. *Indian Journal of Gastroenterology : Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology*, 2011; 30(1): 38–40. <https://doi.org/10.1007/s12664-011-0090-z>
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., & Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, 28(4). <https://doi.org/10.1088/0967-3334/28/4/R01>
- Soylu Karapinar, O., Pinar, N., Ozcan, O., Ozgur, T., & Dolapcioglu, K. (2017) Protective effect of alpha-lipoic acid in methotrexate-induced ovarian oxidative injury and decreased ovarian reserve in rats, *Gynecological Endocrinology*, 33(8): 653-659. doi: 10.1080/09513590.2017.1306847
- Şenyüz O. F. (2010). Cerrahi dalak hastalıkları. *Türk Pediatri Arşivi Dergisi*, 45(11), 53-54. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/tpedar/issue/13187/159327>
- Tabassum, H., Parvez, S., Pasha, S. T., Banerjee, B. D., & Raisuddin, S. (2010). Protective effect of lipoic acid against methotrexate-induced oxidative stress in liver mitochondria. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7), 1973–1979. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.047>
- Toklu, E. (2017). *Çocuklarda, abdominal solid organların us ölçümlerinin bt veya mr organ hacimleri ile korelasyonu ve gözlemciler arası uyumu*, (Tez No. 453945) [uzmanlık tezi, Uludağ Üniversitesi], Ulusal Tez Merkezi.
- Toklu, H. Z., Hakan, T., Celik, H., Biber, N., Erzik, C., Ogunc, A. V., Akakin, D., Cikler, E., Cetinel, S., Ersahin, M., & Sener, G. (2010). Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury in rats. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 33(4), 401–409. <https://doi.org/10.1080/10790268.2010.11689>

- Toprak, K., & Ayaz, A. (2019). Koenzim Q10: Biyolojik Aktivitesi ve Sağlık Üzerine Etkisine Güncel Bakış. *Hacettepe University Faculty of Health Sciences Journal*, 6(2), 95-111. <https://doi.org/10.21020/husbfd.450217>
- Ulusoy, H. B., Öztürk, İ., & Sönmez, M. F. (2016). Protective effect of propolis on methotrexate-induced kidney injury in the rat. *Renal Failure*, 38(5), 744–750. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2016.1158070>
- Ulusoy, M., Acar, M., & Zararsız, İ. (2014). Lenfatik Sistem ve Klinik Önemi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 15(3), 365-370. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/kocatepetip/issue/17401/182196>
- Uygur, A.G., Şingirik, E. & Yücel, A.H., (2019). Metotreksat Kaynaklı Hasarlarda Alfa Lipoik Asit'in Koruyucu Etkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 28(3), 227-236. <https://doi.org/10.17827/aktd.433748>
- Uz, E., Oktem, F., Yilmaz, H. R., Uzar, E., & Özgüner, F. (2005). The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 277(1-2), 165–170. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-5875-x>
- Uzar, E., Sahin, O., Koyuncuoglu, H. R., Uz, E., Bas, O., Kilbas, S., Yilmaz, H. R., Yurekli, V. A., Kucuker, H., & Songur, A. (2006). The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats; protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology*, 218(2-3), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.10.014>
- Van der Valk, P., Van der Loo, E. M., Jansen, J., Daha, M. R., & Meijer, C. J. (1984). Analysis of lymphoid and dendritic cells in human lymph node, tonsil and spleen. A study using monoclonal and heterologous antibodies. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 45(2), 169–185. <https://doi.org/10.1007/BF02889863>

- Warren, L. (1959). The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 234(8), 1971–1975.
- Yapar, S. B., & Eskiocak, S. (2014). Alfa lipoik asidin rat karaciğer homojenatlarında hidrojen peroksit ile indüklenmiş lipid peroksidasyonuna etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39(3), 317–327. <https://doi.org/10.5505/tjb.2014.71501>
- Yuksel, Y., Yuksel, R., Yagmurca, M., Haltas, H., Erdamar, H., Toktas, M., & Ozcan, O. (2017). Effects of quercetin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 36(1), 51–61. <https://doi.org/10.1177/0960327116637414>
- Yürük, A.A. & Ayaz, A., (2014). Alfa lipoik asidin sağlık üzerine etkileri. Hacettepe Üniversitesi *Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 1(1), 10-23. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/husbfd/issue/7892/103820>
- Zhang, H., Davies, K. J. A., & Forman, H. J. (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 88(Part B), 314–336. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036>

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı		Soyadı	
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu		Tel	
E-mail			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans		
Lisans		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1		

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*

Yabancı Dil Sınav Notu #

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

10. BİLİMSEL FAALİYETLER

Makale

Ayşe Akdoğan, Şehkar Oktay. Protective Benefits of Quercetin and Lipoic Acid on Methotrexate-Induced Oxidative Stress in Rat Spleen. ACTA Pharmaceutica Scientia (Acta Pharm Sci) (in press)

Bildiri (Poster veya Sözel)

Ayşe Akdoğan, Şehkar Oktay. The Effect of Quercetin and Lipoic Acid on Tissue Factor Activity in Methotrexate-Given Rats (Kuersetin ve Lipoik Asitin Metotreksat Verilen Sıçanlarda Doku Faktörü Aktivitesi Üzerine Etkisi. 4th International Symposium of Scientific Research and Innovative Studies. 13-16 Mart 2024, Bandırma, Türkiye. Özet kitapçığı sf 575-576.

Proje

Ayşe Akdoğan, Şehkar Oktay. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TYL-2022-10429), 2022-2023.

11.EKLER

Ek 1: Etik kurul onayı