

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANA BİLİM DALI



RUTİNİN RATLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN NEFROTOKSİSİTEYE KARŞI KORUYUCU ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali Kazım TAMBAĞ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Filiz KAZAK

HATAY-2020

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANA BİLİM DALI

**RUTİNİN RATLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN
NEFROTOKSİSİTEYE KARŞI KORUYUCU ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali Kazım TAMBAĞ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Filiz KAZAK

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından “**18.YL.071**” no’lu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2020

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**RUTİNİN RATLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN
NEFROTOKSİSİTEYE KARŞI KORUYUCU ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ali Kazım TAMBAĞ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 24/06/2020 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

Jüri başkanı: Prof. Dr. Gül Fatma YARIM

Üye: Doç. Dr. Pınar PEKER AKALIN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Filiz KAZAK

Bu tez, Enstitümüz Biyokimya (VET) Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp, sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Filiz KAZAK'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca, tez çalışmama verdiği katkıları ve yardımlarından dolayı Doç. Dr. Pınar PEKER AKALIN ve Dr. Öğr. Üyesi Tuncer KUTLU hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, 18.YL.071 proje numarası ile Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	6
3.1. Hayvan Materyali	6
3.2. Biyokimyasal Analizler	7
3.2.1. Doku Homojenizasyon	7
3.2.2. Total Protein Tayini	7
3.2.3. ELİSA Analizleri.....	7
3.2.4. Malondialdehit Düzeylerinin Ölçümü	8
3.2.5. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Aktivite Ölçümü.....	8
3.2.6. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Ölçümü.....	9
3.3. Histopatolojik İncelemeler	9
3.4. İstatistiksel Analizler.....	9
4. BULGULAR	10
4.1. Biyokimyasal Bulgular	10
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	11
5. TARTIŞMA.....	15
6. SONUÇ.....	19
7. KAYNAKLAR.....	20
EKLER.....	23
ÖZGEÇMİŞ	24

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 4.1. Kontrol grubunda böbrekte normal histolojik yapı.	12
Şekil 4.2. Rutin grubunda böbreklerde histolojik yapı.	13
Şekil 4.3. Met grubunda tubul epitellerinde hidropik dejenerasyonu.....	13
Şekil 4.4. Met grubunda, küçük odaklar halinde mononükleer yangısal hücre infiltrasyon	14
Şekil 4.5. Met+Rutin grubunda, tubul epitellerinde parankim dejenerasyonu.....	14

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 4.1. Böbreklerde oksidan parametreler	10
Çizelge 4.2. Böbreklerde antioksidan parametreler	11
Çizelge 4.3. Böbreklerde gözlenen genel histopatolojik bulgular	12



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
CAT	: Katalaz
G6PD	: Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
MDA	: Malondialdehit
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAK	: Total antioksidan kapasite
tGSH	: Total glutasyon
TOK	: Total oksidan kapasite

ÖZET

Rutin Ratlarda Metotreksat İle Oluşturulan Nefrotoksisiteye Karşı Koruyucu Etkisi

Sunulan projede, rutin metotreksat kaynaklı nefrotoksisite rat modelinde böbrek dokusu üzerine olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada 24 adet, 2 aylık, erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Kontrol, Rutin, Metotreksat (Met), Metotreksat+Rutin (Met+Rutin), her bir grup için n=6 olup, 4 grup oluşturuldu. Kontrol ve Met gruplarına distile su (0,5 ml/rat), Rutin ve Met+Rutin gruplarına ise rutin 50 mg/kg/gün (0.5 ml distile suda çözülürülerek) oral gavaj yoluyla 15 gün boyunca verildi. Ayrıca, Kontrol ve Rutin gruplarına %0.9'luk serum fizyolojik (0.5 ml/rat), Met ve Met+Rutin gruplarına metotreksat 20 mg/kg tek doz i.p. olarak çalışmanın 8. gününde uygulandı. Çalışmanın 16. gününde tüm ratlar sakrifiye edilerek, böbrek dokuları çıkarıldı. Böbrek dokularında biyokimyasal olarak 8-OHdG, MDA, TOK, TAK ve tGSH düzeyleri, G6PD ve GPx aktiviteleri belirlendi. Ayrıca, böbrek dokularında histopatolojik muayene yapıldı.

Böbrek dokusunda Met+Rutin grubunda, Met grubuna göre MDA düzeylerinde önemli düzeyde artış belirlendi ($p<0,05$). Met+Rutin grubunda hem Kontrol hem de Rutin grubuna göre TOK düzeylerinde önemli düzeyde artış gözlemlendi ($p<0,05$). Met+Rutin grubunda hem Kontrol hem de Met gruplarına göre TAK düzeylerinde önemli düzeyde azalış bulundu ($p<0,05$). Rutin grubunda GPx aktivitesi, kontrol grubuna göre anlamlı azalış gösterdi ($p<0,05$). Histopatolojik incelemeler sonucunda, makroskopik olarak Met grubunda böbreklerin hafif şişkin olduğu ve normalden daha açık renkte olduğu gözlemlendi. Diğer gruplarda ise böbrekler makroskopik olarak normal görünümde olup, aralarında bir fark gözlenmedi. Met+Rutin grubunda oluşan böbrek doku hasarlarının, Met grubuna kıyasla azaldığı belirlendi. Rutin grubunda tubuller, tubul epitelleri ve glomerüller normal histolojik yapısında gözlemlendi. Met grubunda ise, tubul epitellerinde geniş alanlar halinde parankimden hidropiğe varan dejeneratif değişiklikler mevcuttu. Ayrıca, Met grubunda böbrek dokusunda küçük odaklar halinde mononükleer yagısal hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Met+Rutin grubu ratların tubul epitellerinde, Met grubunda belirlenen, parankimden hidropiğe varan dejeneratif değişikliklerin olmadığı, sadece hafif dejeneratif değişiklikler olduğu görüldü.

Sunulan çalışmada metotreksatın böbrek dokusunda hasara neden olduğu ve rutin metotreksat kaynaklı nefrotoksisiteyi koruyucu ve iyileştirici etkisi belirlendi.

Anahtar kelimeler: Rutin, metotreksat, nefrotoksisite, oksidatif stres

ABSTRACT

The Protective Effect of Rutin Against Methotrexate-Induced Nephrotoxicity in Rats

In this project, it was aimed to investigate the possible protective effects of rutin on kidney tissue in methotrexate-induced nephrotoxicity rat model.

Twenty four Wistar Albino rats (2 months old, male) were divided randomly into four groups (n = 6) as Control, Methotrexate (Met), Rutin, Methotrexate+Rutin (Met+Rutin). Control and Met groups were given distilled water (0.5 ml / rat), and the Rutin and Met+Rutin groups were given rutin 50 mg/kg/day (dissolved in 0.5 ml distilled water) by oral gavage for 15 days. Met and Met+Rutin groups were administered a single dose of methotrexate 20 mg/ kg/i.p. on the 8th day of the study. All rats were sacrificed and kidney tissues were removed on the 16th day of the study. The levels of 8-OHdG, MDA, TOS, TAS, tGSH and the activities of G6PD and GPx in kidney tissues were determined biochemically. In addition, histopathological examination was performed in kidney tissues.

MDA level increased in Met+Rutin group compared to Met group was determined ($p<0.05$). A significant increase in TOS levels was observed in Met+Rutin group compared to both Control and Rutin group ($p<0.05$). A significant decrease was found in TAS levels in Met+Rutin group compared to both Control and Met groups ($p<0.05$). The GPx activity in Rutin group decreased significantly compared to Control group ($p<0.05$). As a result of histopathological examinations, it was observed that the kidneys were macroscopically slightly swollen and its color was lighter than normal in Met group. In the other groups, the kidneys were in normal structure, macroscopically. In Met group, there were degenerative changes in the tubular epithelium, ranging from parenchyma to hydropic, in wide scope. In addition, small foci mononuclear inflammatory cell infiltration in the kidney tissue was observed in Met group. In rutin group, tubules, tubular epithelium and glomeruli were observed in normal histological structure. It was determined that kidney tissue damage determined in Met group was decreased in Met+Rutin group; there were no degenerative changes in the tubular epithelium of the Met+Rutin group, and only mild degenerative changes were observed rather than hydropic degeneration seen in Met group.

In the present study, it was determined that methotrexate caused damage in kidney tissue and rutin had protective and healing effect on methotrexate-induced nephrotoxicity.

Key words: Rutin, methotrexate, nephrotoxicity, oxidative stress

1. GİRİŞ

Kemoterapötiklerle ilgili olarak gerek ilaç etkinliği gerekse toksisitesi üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Metotreksat, folik asit antagonistleri grubundan bir sitotoksik antineoplastik ilaç olup, günümüzde en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. Metotreksat, akut lenfoblastik lösemi, lenfom, osteosarkom, meme, baş ve boyun bölgesi kanserlerinin yanı sıra psöriyazis ve romatoid artrit gibi malign olmayan hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (Sargın ve ark. 2009). Metotreksatın böbrek (Asci ve Özer 2011), karaciğer (Asci ve Özer 2011), testisler (Nouri ve ark. 2009), bağırsak (Vardı ve ark. 2008) gibi organlarda hasarlara yol açtığı bilinmektedir. Metotreksatın önemli terapötik etkilerine rağmen, nefrotoksisite, metotreksat ile tedavinin en önemli yan etkisidir (Khoshnoud ve ark. 2017). Bu nedenle kullanımı zorunlu ve istenilmeyen yan etkileri olan metotreksatın, kemoterapide kullanımı sırasında, yapılacak değişiklikler ve eklenecek destek tedaviler hayati önem taşımaktadır (Dilek 2010). Flavonoidler, doğal polifenolik fitokimyasal maddeler olup kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde kullanılmaktadır. Rutin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukozid), disakkarit rutinoz ile birlikte flavonolik aglikon kuersetin içeren bir glikozittir. Rutin, çarkıfelek çiçeğinde, karabuğdayda, çayda ve elmada bol miktarda bulunan bir flavonoldür. Rutinin antioksidan, sitoprotektif, vazoprotektif, antikarsinojenik, nöroprotektif ve kardiyoprotektif etkileri bulunmaktadır (Ganeshpurkar ve Saluja 2017). Rutinin metotreksat kaynaklı nefrotoksisitede böbrek dokusu üzerine etkisi bilinmemektedir. Sunulan tez çalışması ile rutin metotreksat kaynaklı nefrotoksisitede böbrek dokusu üzerine olası etkileri biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler ile değerlendirildi. Rutinin metotreksat kaynaklı nefrotoksisiteyi koruyucu ve iyileştirici etkisi olabileceği belirlendi. Tez çalışmasından elde edilen bulgular, flavonoidlerin kullanımı ile özellikle kemoterapide yaygın kullanılan metotreksatın böbrek dokusunda meydana getirdiği hasara karşı koruyucu etkinliği ya da destekleyici olarak kullanımı hususunda, kanser tedavisine yönelik yapılacak bilimsel çalışmalara katkı sağlayabileceği öngörülmektedir. Ayrıca, nefrotoksisite etiyopatogenezli hastalıkların tedavisinde flavonoidlerin kullanımı konusunda yapılacak bilimsel çalışmalara da katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Kemoterapötik ilaçlar, çeşitli kanser türlerine karşı yaygın olarak kullanılmaktadır ve klinik kullanımları, birçok organ toksisitesi de dahil olmak üzere olumsuz yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu ilaçlardan biri, sedef hastalığı ve romatoid artrit gibi onkolojik ve onkolojik olmayan durumları tedavi etmek için kullanılan folat antagonisti olan metotreksattır (Sherif ve ark. 2019). Metotreksat, çeşitli kanserler (kut lösemi, Hodgkin dışı lenfoma, osteojenik sarkom, koriokarsinom, meme karsinomu, pulmoner ve epidermoid karsinom) ve otoimmün hastalıklar için (sedef hastalığı, romatoid artrit, dermatomiyozit, Wegener granülomatozu ve sarkoidoz) yaygın olarak reçete edilen antimetabolit bir ilaçtır (Bleyer ve ark. 1978, Khoshnoud ve ark. 2017). Metotreksat, terapötik etkilerinin olmasına rağmen, böbrek (Asci ve Özer 2011, Widemann ve ark. 2004), bağırsak (Vardı ve ark. 2008), karaciğer (Hemeida ve Mohafez 2008, Asci ve Özer 2011) testis (Nouri ve ark. 2009), merkezi sinir sistemi ve kemik iliği toksisitelerine neden olmaktadır (Khoshnoud ve ark. 2017). Metotreksatın %90'ından fazlası böbrekler yoluyla atılır (Widemann ve Adamson 2006). Metotreksat kaynaklı nefrotoksikasyonun, metotreksat alımı sonrası, böbreklerde metotreksat çökelmesinden, metotreksatın çözünmeyen metabolitlerinden ya da metotreksatın tübüller üzerine doğrudan toksik etkilerinden kaynaklandığı bilinmektedir (Messmann ve ark. 2001, Ulusoy ve ark. 2016, Jalili ve ark. 2020). Nefrotoksisitenin, metotreksat tedavisinin en önemli komplikasyonlarından olması, metotreksat kullanımını sınırlayan güçlü bir neden olarak kabul edilir (Bleyer ve ark. 1978, Widemann ve Adamson 2006, Sherif ve ark. 2019). Metotreksatın neden olduğu böbrek fonksiyon bozukluğu etiyolojisinin, böbrek tübülleri üzerine doğrudan toksik etkisi olduğuna inanılsa da metotreksat kaynaklı nefrotoksisitenin patogenezi henüz net değildir (Dalaklioglu ve ark. 2012, Ulusoy ve ark. 2016). Metotreksat, böbreklerde Bowman kapsül boşluğu genişlemesine, lenfositlerin infiltrasyonuna, glomerüler boyutu küçülmesine, kan hücrelerinin artmasına ve böbrek tübüllerinde kanamaya yol açmaktadır. Metotreksatın yıkıcı etkileri arasında glomerulus yapısında düzensizlik ve proksimal tübüllerde hasar bulunmaktadır (Jalili ve ark. 2020). Tübüllerin lümeninde epitelyal deskuamasyon, Bowman kapsül boşluğunun tıkanıklığı, peritübüler damarların ve renal korpüsküllerin konjesyonu ve dilatasyonu gözlenmektedir (Ulusoy ve ark. 2016). Kısacası, metotreksat kullanımı ile

oluşan böbrek yetmezliği, patolojik olarak renal tübüllerin dejenerasyonu ve dilatasyonu, glomeruler hasar gibi yapısal değişiklikler ile karakterizedir (Al-Rashidy ve ark. 2018). Dahası, azalan glomeruli parametreleri ile böbrek fonksiyonundaki azalma arasında ilişki olduğu öne sürülmektedir (Dalaklioglu ve ark. 2012, Jalili ve ark. 2020). Metotreksat kaynaklı böbrek disfonksiyonunda, biyokimyasal olarak kan üre azotu, ürik asit, kreatinin düzeyleri ile idrar N-asetil-p-d-glukozaminidaz aktivitesinin önemli düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Dalaklioglu ve ark. 2012, Asci ve ark. 2017, Al-Rashidy ve ark. 2018). Metotreksat kaynaklı nefrotoksisitede hücresel hasarın nedeni olarak nötrofil infiltrasyonu ve neticesinde ortaya çıkan oksidatif stres gösterilmektedir (Kolli ve ark. 2009, Sakalli ve ark. 2017, Jalili ve ark. 2020). Metotreksat, reaktif oksijen türleri üreterek lipid peroksidasyonuna neden olur ve mitokondriyal fonksiyonda bozulmaya yol açar (Babiak ve ark. 1998). Metotreksat uygulamasının, kan, karaciğer ve böbrekte malondialdehit (MDA) düzeylerinin, miyeloperoksidaz aktivitesinin artmasına ve glutatyon (GSH) seviyelerinin azalmasına neden olduğu bilinmektedir (Jahovic ve ark. 2003). Metotreksatın nitrik oksit üretiminde artışa neden olduğu da rapor edilmiştir. Böylece artan nitrik oksit üretimi ile hücre hasarına neden olduğu ve apoptozu indüklediği öne sürülmektedir (Jalili ve ark. 2020). Metotreksatın böbrek lipid peroksidasyon seviyesini arttırırken, süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini azalttığı da bildirilmektedir (Savran ve ark. 2017).

Metotreksat kaynaklı nefrotoksisitenin zayıflatılmasında güvenli alternatif tedaviler olarak, antioksidan aktiviteye sahip doğal ürünlerin kullanımı büyük ilgi görmektedir. Jahovic ve ark. (2003), ratlarda, metotreksatın bazı dokularda MDA ve GSH seviyelerini artırdığını, melatoninin ise bu değişiklikleri önlediğini rapor etmiştir. Ratlarda metotreksat kaynaklı böbrek hasarında, kafeik asit fenetil ester böbrekte koruyucu etkilerini, böbrek MDA düzeylerini azaltarak, SOD, CAT ve GPx aktivitelerini ise artırarak göstermiştir (Oktem ve ark. 2006). Bozkurt ve ark. (2014) karvakrolun, serum ve böbrek MDA, total oksidan kapasite (TOK) ve oksidatif stres indeksi seviyelerini azaltarak ve total antioksidan kapasite (TAK) seviyesini arttırarak metotreksatın neden olduğu böbrek hasarını kısmen hafiflettiğini ifade etmiştir. Ulusoy ve ark. (2016) propolisin, metotreksat kaynaklı böbrek hasarına karşı olası koruyucu etkilerini, histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak göstermiştir. Savran ve ark. (2017), metotreksatın böbrek dokularında lipid peroksidasyon seviyesini arttırırken, SOD, CAT ve GPx aktivitelerini azalttığını ve vitamin C

uygulamasının ise antioksidan redoks sistemini modüle ederek metotreksatın neden olduğu böbrek oksidatif stresi azalttığını ifade etmiştir. Sakalli ve ark. (2017), ökseotu özütü uygulamasının ratlarda antioksidan ve antienflamatuvar özellikleri sayesinde metotreksat kaynaklı akut oksidatif stresi ve nefrotoksisiteyi önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Asci ve ark. (2017), metotreksat kaynaklı nefrotoksisitede gallik asitin antioksidan ve antienflamatuvar aktiviteleri ile böbreği toksisiteden koruduğunu bildirmiştir. Jalili ve ark. (2020), kroinin, metotreksatın neden olduğu böbrek dokusunun lipid peroksidasyonunu azaltabildiğini ve böbrek dokusunun antioksidan kapasitesini artırabildiğini ve böylece oksidatif stres seviyelerini azaltabildiğini bildirmiştir.

Rutin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukozid) çarkıfelek çiçeğinde, karabuğdayda, çayda ve elmada bol miktarda bulunan bir flavonoldir. Rutin, ayrıca rutoside, kuercetin-3- rutinoside ve soforin olarak da adlandırılan bir turuncgil flavonoid ve kimyasal olarak, disakkarit rutinoz ile birlikte flavonolik aglikon kuersetin içeren bir glikozittir. Rutinin çeşitli farmakolojik aktiviteleri arasında antioksidan, sitoprotektif, vazoprotektif, antikarsinojenik, nöroprotektif ve kardiyoprotektif etkileri bulunmaktadır (Ganeshpurkar ve Saluja 2017). Rutinin, nükleer faktör kappa B (NFκB), tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α) ve kaspaz-3 ekspresyonunu azaltarak, sisplatin kaynaklı renal enflamasyonu ve apoptozu kısmen önlediği rapor edilmiştir (Arjumand ve ark. 2011). Lin ve ark. (2012), insan lösemi HL-60 hücre hattı ile yaptıkları çalışmada, rutinin antilösemik potansiyeli doğrulayan tümör boyutunda anlamlı bir azalmaya neden olduğunu; Araújo ve ark. (2011), rutin kolorektal hücre hatlarında kanser hücresi büyümesini, proliferasyonunu, anjiyogenezi ve metastazı önlediğini; Gonçalves ve ark. (2013) ise radyoiyodin terapisinde adjuvant olarak rutin kullanımının yararlı olduğunu bildirmişlerdir. Bazı çalışmalar rutin iske mi/reperfüzyon böbrek hasarı (Korkmaz ve Kolankaya 2010; 2013), ilaca bağlı nefropati (Kamel ve ark. 2014) ve diyabetik nefropatide (Kamalakkannan ve ark. 2006) böbrek koruma etkisine sahip olduğunu göstermiştir. Wang ve ark. (2016), rutin (100 mg/kg/gün, 2 hafta oral gavaj ile) uygulamasının böbrek interstisyel fibrozunu iyileştirerek, böbrek interstisyel hasarını azalttığını ve interstisyel kollajen birikintilerini baskıladığını bulmuştur. Ayrıca rutin uzun süre (15 ve 45 mg/kg/gün, 20 hafta) uygulanmasının 5/6-nefrektomize edilmiş ratlarda proteinüri ve renal oksidatif stresi iyileştirerek, glomerüloskleroz ve tubulointerstisyel yaralanmaları azalttığı rapor edilmiştir (Han ve ark. 2015). Ratlarda civa klorürün neden olduğu böbrek toksisitesine karşı rutin (50 mg/kg ve 100 mg/kg) anti-oksidan,

antiapoptotik ve anti-enflamatuar etkileri ile böbreği koruduğu bildirilmiştir. Rutinin civa klorür indüklü böbrek hasarında, antioksidan savunma sistemini (CAT, SOD ve GPx aktiviteleri ve GSH seviyesi) arttırarak lipid peroksidasyon ürünü (MDA) seviyesini etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Caglayan ve ark. 2019). Birçok alışma, rutinin kurşun asetat (Ansar ve ark. 2016) ve potasyum bromat (Khan ve ark. 2012) gibi toksik ajanların neden olduğu nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkileri olduğunu bildirmiştir.

Yapılan literatür taramalarında, metotreksat kaynaklı böbrek yetmezliğinde rutinin olası iyileştirici etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Sunulan alışma ile ratlarda, özellikle kanser tedavisinde bir kemoterapötik olarak yaygın kullanılan metotreksatın, böbrek dokusunda meydana getirdiği yan etkileri üzerine, rutinin olası iyileştirici etkilerinin biyokimyasal analizlerle ve histopatolojik incelemelerle araştırılması planlandı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Sunulan çalışmada, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, 2 aylık, 24 adet, erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Çalışma protokolü Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (2018/7-2, 26/07/2018) ve deneysel çalışmalar etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi.

Ratların temini, adaptasyon amacıyla, çalışmada öngörülen deneme planına başlanmadan 1 hafta önce gerçekleştirildi. Ratların standart plastik kafeslerde, 20-22°C'lik oda ısısında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlıkta barınmaları ve *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Nefrotoksisite oluşturmak amacı ile, ratlara 20 mg/kg metotreksat (Koçak, Türkiye) tek doz intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı (Asci ve ark. 2017; Hafez ve ark. 2015). Rutinin (Rutin hydrate, abcr, Almanya) 50 mg/kg dozunda distile suda çözeltisi hazırlandı ve oral gavaj yoluyla verildi (Taşlı ve ark. 2018; Kamel ve ark. 2014).

Gruplar:

Kontrol Grubu (n=6) : Ratlara 0,5 ml distile su oral gavaj yoluyla 15 gün boyunca verildi ve 8. günde %0.9'luk serum fizyolojik (0,5 ml/rat) bir kez i.p. olarak uygulandı.

Metotreksat (Met) Grubu (n=6): Ratlara 0,5 ml distile su oral gavaj yoluyla 15 gün boyunca verildi ve 8. günde metotreksat 20 mg/kg i.p. olarak uygulandı.

Rutin Grubu (n=6): Ratlara rutin 50 mg/kg/gün (0,5 ml distile suda çözündürülerek) dozunda oral gavaj yoluyla 15 gün boyunca verildi ve 8. günde %0.9'luk serum fizyolojik (0,5 ml/rat) bir kez i.p. olarak uygulandı.

Metotreksat+Rutin (Met+Rutin) Grubu (n=6): Ratlara rutin 50 mg/kg/gün (0,5 ml distile suda çözündürülerek) dozunda oral gavaj yoluyla 15 gün boyunca verilecek ve 8. günde metotreksat 20 mg/kg dozda i.p. olarak uygulandı.

Denemenin 16. gününde tüm ratlar ksilazin ve ketamin anestezisi altında kurban edilerek nekropsileri yapıldı ve böbrek dokuları çıkarıldı. Böbrek dokusunda biyokimyasal analizler ve histopatolojik incelemeler gerçekleştirildi.

3.2. Biyokimyasal Analizler

3.2.1. Doku Homojenizasyonu

Biyokimyasal analizlerde kullanılan böbrek doku numunelerinin homojenizasyonu amacıyla yaklaşık 100 mg doku numunesi alındı ve 1 ml fosfat tamponda ultrasonik homojenizatör (Bandelin Electronic UW 2070, Almanya) kullanılarak homojenize edildi. Homojenat içeren tüpler 18.000 rpm'de, 4°C'de, 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen supernatantlar analizleri yapılncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Total Protein Tayini

Lowry ve ark. (1951) tarafından bildirilen yöntem, böbrek homojenatlarının total protein konsantrasyonunun ölçülmesinde kullanıldı. Bu amaçla, numune ve standart tüplerine 0,01 ml böbrek homojenatı ve standart çözeltiler, kör tüpüne de 0,01 ml distile su konuldu. Tüplere çalışma reaktifinden (0.1 N NaOH'te % 2'lik Na₂CO₃'ın çözeltisi, % 1'lik CuSO₄ çözeltisi, % 2'lik Na-K tartarat çözeltisi (98v/v/v)) 2,5 ml eklendi. Tüpler vortekslendi ve 25 °C sıcaklıkta 10 dakika bekletildi. Hacimsel olarak bire bir oranda distile su ile hazırlanan folin-fenol reaktifi 0,25 ml miktarında tüplere eklendi. Tüpler karıştırıldı ve 25 °C sıcaklıkta 30 dakika bekletildikten sonra, absorbanslar spektrofotometrede 700 nm'de köre karşı okundu. Total protein konsantrasyonu, standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.

3.2.3. ELISA Analizleri

Böbrek dokusu homojenatlarında TAK ve TOK düzeyleri, TAK ve TOK kitleri (Rel Assay Diagnostics, Türkiye), 8-OHdG düzeyleri 8-OHdG kiti (SunRed, Shanghai) ve tGSH düzeyleri Bioxytech GSH-420TM kiti (OxisResearch, Amerika) kullanılarak belirlendi. Ticari ELISA test kitlerinin kullanıldığı analizlerde üretici firmanın belirttiği prosedür takip edildi. Tüm ELISA analizler için mikropleytlerde oluşan rengin absorbansları, TOK analizi

için 530 nm’de, TAK analizi için 660 nm’de, 8-OHdG analizi için 450 nm’de ve tGSH analizi için 420 nm’de mikropleyt okuyucuda kaydedildi. Sonuçlar her bir parametreye özgü standart eğrinin kullanılması ile hesaplandı. Dokuların TOK düzeyi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$, TAK düzeyi $\mu\text{mol trolox Equiv./L}$, 8-OHdG düzeyi ng/g doku ve tGSH düzeyi $\mu\text{mol/g protein}$ olarak sunuldu.

3.2.4. Malondialdehit Düzeyinin Ölçümü

Ohkawa ve ark. (1979) tarafından bildirilen yöntem, böbrek homojenatlarında MDA düzeyinin ölçülmesinde kullanıldı. Bu amaçla, analiz tüplerine 0,25 ml böbrek homejenatı, kör tüpüne ise 0,25 ml distile su konularak, tüm tüpler üzerine 0,5 ml % 10’luk trikloroasetik asit, 0,5 ml % 0,67’lik tiyobarbitürik asit eklendi. Tüpler karıştırıldı ve su banyosunda 95°C’de 30 dakika inkübe edildi. Tüpler +4 °C’de 4100 rpm’de 10 dakika santrüfjü edildi. Elde edilen süpernatantların, absorbansları spektrofotometrede 532 nm’de okundu. MDA düzeyi standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplandı. Dokuların MDA düzeyi nmol/g doku olarak sunuldu.

3.2.5. Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz Aktivite Ölçümü

Beutler (1971) tarafından bildirilen yöntem, böbrek homojenatlarında G6PD aktivitesinin ölçülmesinde kullanıldı. Bu amaçla, analiz tüplerine 0,2 ml böbrek homejenatı, konuldu. Tüpler üzerine 0,1 ml Tris-HCl Tamponu (1 M), 0,1 ml MgCl_2 (0,1 M) eklendi. Tüpler karıştırıldı ve 37 °C’de 10 dakika bekletildi. Tüplere 0,1 ml G-6-P (6 mmol/L) ve 0,1 ml NADP (2 mmol/L) eklendi. Aktivite tayini, 25°C’deki NADP^{+} ’nin 340 nm’deki absorbans değişimi ölçülerek belirlendi. Dokuların G6PD aktivitesi U/g protein olarak hesaplandı.

3.2.6. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Ölçümü

Beutler (1975) tarafından bildirilen yöntem, böbrek homojenatlarında GPx'in ölçülmesinde kullanıldı. Bu amaçla, analiz tüplerine 0,02 ml böbrek homejenatı konuldu. Tüm tüplere, 2,65 ml EDTA'lı fosfat tamponu (50 mM) 0,1 ml redükte GSH (150 mM), 0,1 ml NADPH (2 mM), 0,01 ml GSH-Redüktaz, 0,01 ml Na-azid eklendi. Oda ısısında 30 dk inkübe edildi. Her bir numuneye 0,10 ml H₂O₂ çözeltisi eklendi. Aktivite tayini, NADPH'ın NADP⁺'ya çevrilmesi ile optik dansitede meydana gelen absorbans farkının 340 nm'de ölçülmesi ile hesaplandı. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi U/g protein olarak hesaplandı.

3.3. Histopatolojik incelemeler

Nekropside alınan böbrek dokuları %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonuna alınarak 72 saat süreyle tespit edildi. Rutin takip işlemi kapsamında; doku örnekleri alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyonları; ksilol serilerinden geçirilerek şeffaflandırılmaları sağlandı ve daha sonra parafinde bloklandı. Bu bloklardan mikrotomda 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, hematoksilin eozin (H&E) boyama tekniği ile boyandı. Işık mikroskop altında (Olympus CX31) incelendikten sonra mikrofotografı (Olympus DP12) alındı.

3.4. İstatistiksel Analizler

Projeden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için SPSS 22.0 paket programından yararlanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata (Ort±SH) şeklinde sunuldu. Çoklu grupların karşılaştırılması varyans analizi (ANOVA) yapılarak, post-hoc Duncan testi ile belirlendi. p<0,05 önem düzeyi istatistiki olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Böbrek dokusunda 8OHdG, MDA, TOK düzeylerine ilişkin veriler Çizelge 4.1’de sunuldu. Met+Rutin grubunda Met grubuna göre MDA düzeylerinde önemli düzeyde artış gözlemlendi ($p<0,05$). MDA düzeyleri açısından Met+Rutin grubu hariç diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Met+Rutin grubunda hem Kontrol hem de Rutin grubuna göre TOS düzeylerinde önemli düzeyde artış gözlemlendi ($p<0,05$). 8-OHdG düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir değişim gözlemlenmedi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Böbrek dokusunda oksidan parametreler (Ort $\pm$ SH)

Gruplar	8-OHdG	MDA	TOK
	ng/g doku	nmol/g doku	$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L
Kontrol	24,33 $\pm$ 1,35	154,06 $\pm$ 8,10 ^{ab}	12,10 $\pm$ 0,55 ^b
Met	25,30 $\pm$ 0,74	142,40 $\pm$ 5,74 ^b	15,40 $\pm$ 2,75 ^{ab}
Rutin	23,85 $\pm$ 0,86	162,43 $\pm$ 10,68 ^{ab}	14,67 $\pm$ 1,15 ^b
Met+Rutin	25,45 $\pm$ 1,14	175,40 $\pm$ 6,87 ^a	21,68 $\pm$ 3,41 ^a
P	$p>0,05$	$p<0,05$	$p<0,05$

^{a-b} Oneway Anova Post Hoc Duncan testine göre aynı sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir.

Böbrek dokusunda TAK, tGSH düzeyleri ile G6PD ve GPx aktiviteleri çizelge 4.2’de sunuldu. Met+Rutin grubunda hem Kontrol hem de Met gruplarına göre TAS düzeylerinde önemli düzeyde azalış gözlemlendi ($p<0,05$). Rutin grubunda GPx aktivitesi, Kontrol grubuna göre anlamlı azalış gösterdi ($p<0,05$). tGSH düzeyleri ve G6PD aktivitesinde, gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir değişim gözlemlenmedi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Böbrek dokusunda antioksidan parametreler (Ort±SH)

	TAK	tGSH	G6PD	GPx
Gruplar	μmol trolox Equiv./L	μmol/g protein	U/g protein	U/g protein
Kontrol	1,22±0,08 ^a	72,82±1,14	3,32±0,52	441,78±35,55 ^a
Met	1,22±0,09 ^a	79,15±3,60	3,38±0,23	410,22±27,17 ^{ab}
Rutin	1,03±0,08 ^{ab}	73,61±2,97	2,51±0,43	333,73±36,46 ^b
Met+Rutin	0,96±0,07 ^b	75,61±2,44	3,14±0,22	375,22±34,15 ^{ab}
P	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05

^{a-b} Oneway Anova Post Hoc Duncan testine göre aynı sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir.

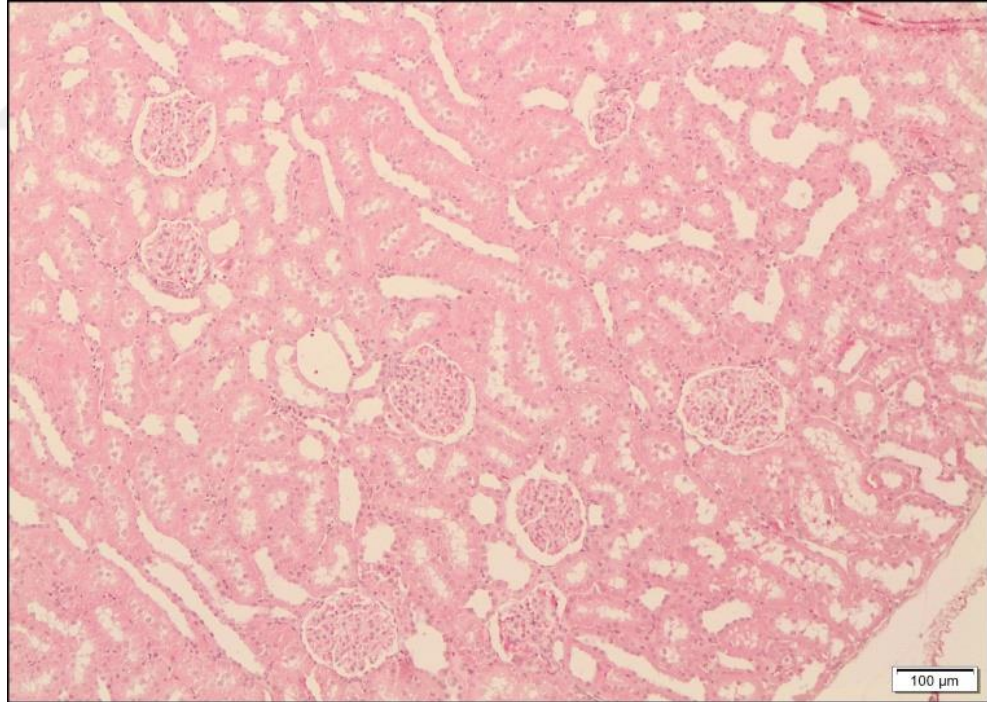
4.2. Histopatolojik Bulgular

Makroskopik olarak Met grubunda böbreklerin hafif şişkin olduğu ve normalden daha açık renkte olduğu gözlemlendi. Diğer gruplarda ise böbrekler makroskopik olarak normal görünümde olup, aralarında bir fark gözlenmedi. Tüm gruplarda gözlenen mikroskopik bulgular Çizelge 3’te özetlendi. Met+Rutin grubunda oluşan böbrek doku hasarlarının, Met grubuna kıyasla azaldığı belirlendi (Çizelge 4.3, Şekil 4.3 ve Şekil 4.5). Kontrol grubu (Şekil 4.1) ve Rutin grubunda (Şekil 4.2) tubuller, tubul epitelleri ve glomerüller normal histolojik yapısında gözlemlendi. Met grubunda ise, tubul epitellerinde geniş alanlar halinde parankimden hidropiğe varan dejeneratif değişiklikler mevcuttu (Şekil 4.3). Ayrıca, Met grubunda böbrek dokusunda küçük odaklar halinde mononükleer yangısal hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil 4.4). Met+Rutin grubunda bir kısım tubul epitellerinde çekirdek, tül perde arkasından görünüyormuş gibi belirsizdi ve parankim dejenerasyonu olarak değerlendirildi (Şekil 4.5).

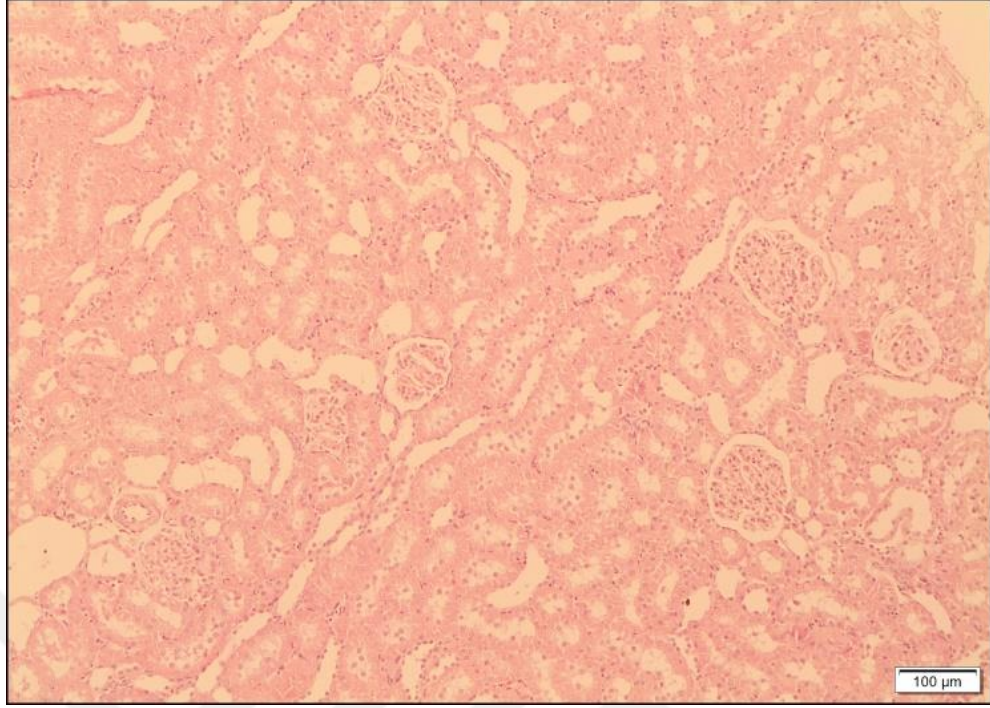
Çizelge 4.3. Böbreklerde gözlenen genel histopatolojik bulgular

Gruplar	Mononükleer		
	hücre infiltrasyonu	Parankim dejenerasyonu	Hidropik dejenerasyon
Kontrol	0	0	0
Met	1	2	2
Rutin	0	0	0
Met+Rutin	0	1	1

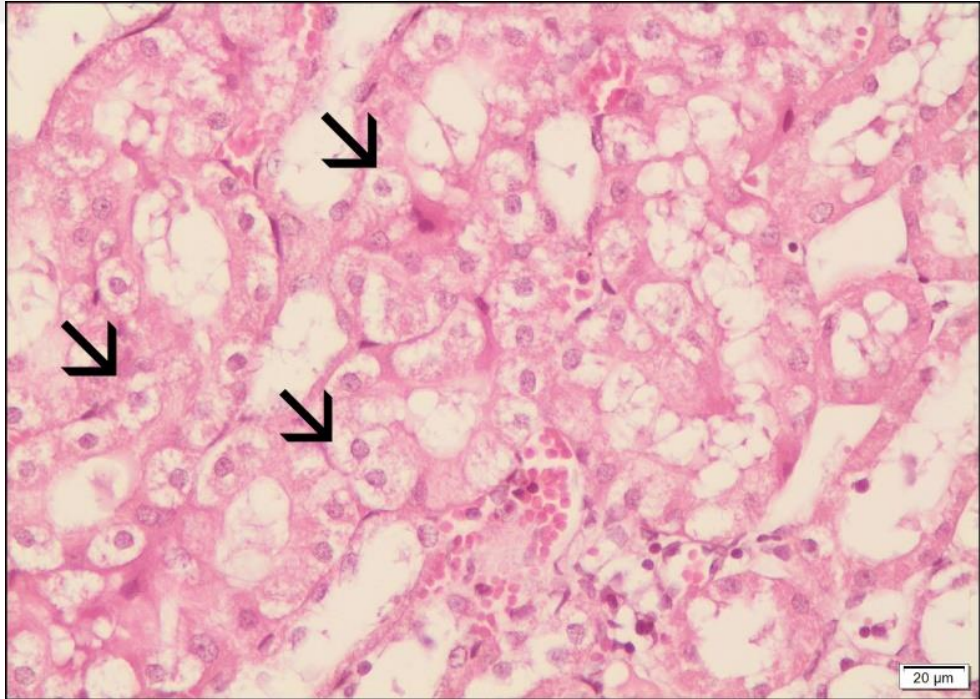
0: Histopatolojik değişiklik % 5'in altında; 1: Tüm alanın %5 ile %33'ü arasında meydana gelen hafif histopatolojik değişiklikler; 2: Tüm alanın %33 ile %66'sı arasındaki alanda meydana gelen orta derecede histopatolojik değişiklikler.



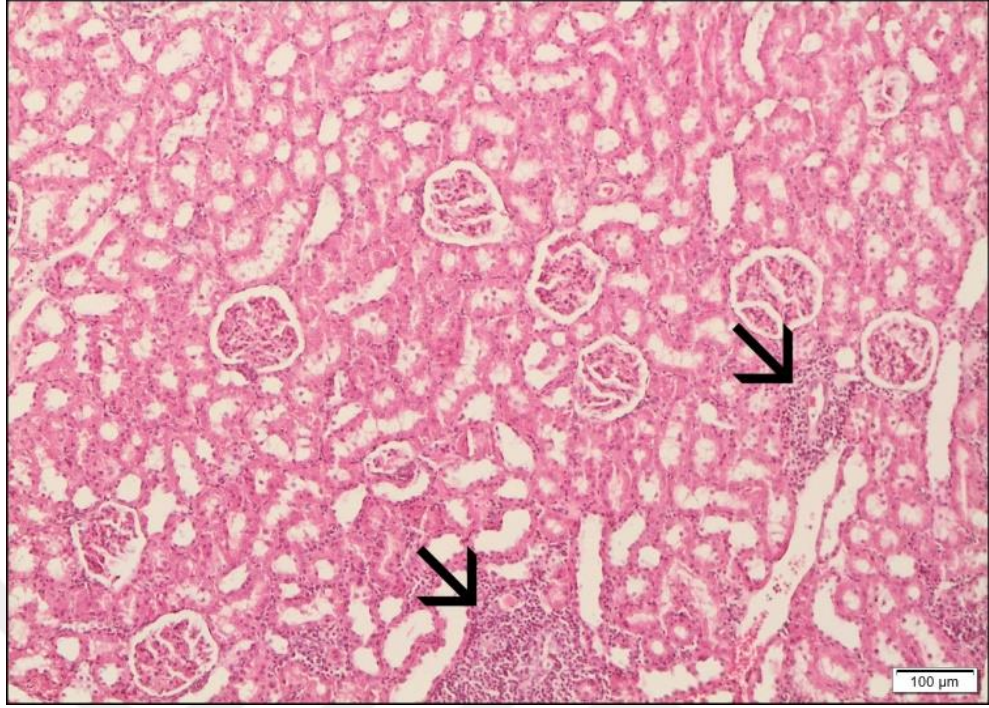
Şekil 4.1. Kontrol grubunda böbrekte normal histolojik yapı, H&E.



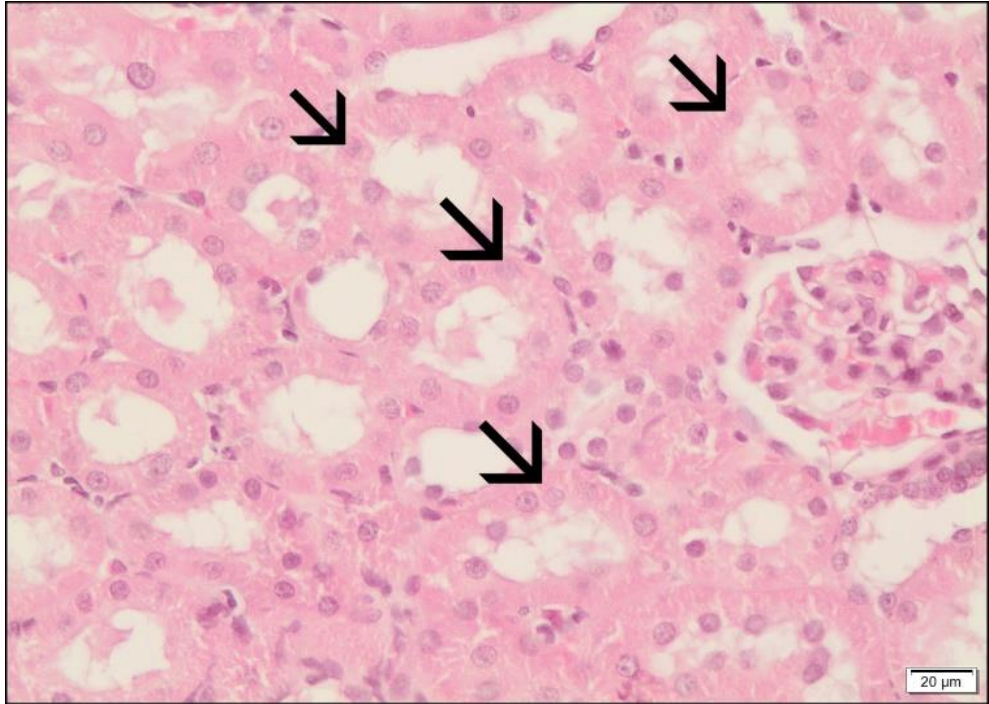
Şekil 4.2: Rutin grubunda böbreklerde histolojik yapı, H&E.



Şekil 4.3: Met grubunda tubul epitellerinde hidropik dejenerasyonu (oklar), H&E.



Şekil 4.4. Met grubunda, küçük odaklar halinde mononükleer yangısal hücre infiltrasyonu (oklar), H&E.



Şekil 4.5. Met+Rutin grubunda, tubul epitllerinde parankim dejenerasyonu (ok başları), H&E.

5. TARTIŞMA

Metotreksatın böbrek dışında farklı dokularda yapısal ve fonksiyonel hasara neden olduğu birçok makalede belirtilmiştir. Literatür araştırmasına göre, şimdiye kadar, rutin ratların metotreksat kaynaklı böbrek doku hasarı üzerindeki etkileri üzerine bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, sunulan çalışma ile ratlarda rutin metotreksat kaynaklı böbrek hasarı üzerine herhangi bir koruyucu/iyileştirici etkisi olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı. Sunulan çalışma, rutin, rat böbreğinde akut metotreksat toksisitesine karşı koruyucu/iyileştirici etkileri olduğunu kısmen göstermiştir.

Metotreksat, genellikle DNA sentezini önleyen ve kanser hücresi ölümüne yol açan sitotoksik kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, metotreksatın kanser hücreleri dışında vücuttaki sağlıklı hücreler üzerine de sitotoksik etkisinin olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (Khoshnoud ve ark. 2017). DNA hasarının bir biyobelirteci olarak kullanılan 8-OHdG, 2'-deoksiguanozinin C-8 pozisyonunun oksidasyonu ile oluşturulan önemli oksidatif DNA lezyonlarından biridir. DNA'da 8-OHdG oluşumunun artması, nörodejenerasyon ve kanser dahil olmak üzere, vücutta çeşitli patolojik olayların gerçekleşmesine neden olabilmektedir. Aynı zamanda 8-OHdG, vücutta oluşan patolojik durumlar için erken teşhis konulmasında potansiyel bir biyobelirteçtir. Bu nedenle, biyolojik öneme sahip olan 8-OHdG'nin seviyelerindeki değişiklikler çeşitli hastalıklarda araştırılmıştır (Korkmaz ve ark. 2018): Tip 1 diyabetli bireylerde artmış böbrek hastalığı riski ile yüksek plazma 8-OHdG düzeylerinin ilişkili olduğu ve 8-OHdG'nin diyabetik böbrek hastalığının ilerlemesini değerlendirmek için kullanılabileceği öne sürülmüştür (Sanchez ve ark. 2018). Renal tübüllerde 8-OHdG'nin sitozol ekspresyonunun yoğunluğunun, renal fibrozun şiddeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Tsai ve ark. 2011). Karbontetraklorür (Akkoyun, 2019), kurşun (Liu ve ark. 2010) gibi çeşitli kimyasallarla deneysel böbrek hasarı oluşturulan hayvanlarda ilgili maddelerin böbrek 8-OHdG düzeyinin artışına neden olabileceği rapor edilmiştir. Sisplatin kaynaklı akut böbrek yetmezliğinde, böbreklerde sisplatinin rat distal tübüller hücrelerinde 8-OHdG ekspresyonunda artışa neden olduğu bildirilmiştir (Minamiyama ve ark. 2002, Zhou ve ark. 2006). Bir başka çalışmada, 8-OHdG-pozitif tübül hücre sayısının sisplatin uygulamasını takiben beşinci günde arttığı daha sonra ise yavaş yavaş azaldığı tespit edilmiştir (Zhou ve ark. 2006). Yapılan literatür

taramalarında metotreksat ve rutin böbrek 8-OHdG  zerine etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmadı. Sunulan çalışmada, metotreksatın böbrek 8-OHdG düzeyleri üzerine etkisinin istatistiki olarak önemli olmadığı anlaşıldı.

Birçok  alışma metotreksatın oksidatif strese neden olduğunu ve bunun nefrotoksisitede rol oynadığını bildirmektedir. Metotreksatın reaktif oksijen türleri üreterek lipid peroksidasyonuna neden olduğu açıklanmaktadır. Çalışmalarda, ratlarda metotreksat (tek doz 20 mg/kg i.p.) uygulanmasının lipid peroksidasyon belirteçlerinden biri olan MDA'yı böbrek dokusunda arttırdığı rapor edilmiştir (Abd El-Twab ve ark. 2016, Savran ve ark. 2017, Mahmoud ve ark. 2018, Jalili ve ark. 2020). Yapılan çalışmaların aksine sunulan çalışmada, Met grubu MDA düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla değişiklik olmadığı belirlendi. Rutinin ratlarda, böbrek MDA düzeylerinde anlamlı bir değişime neden olmadığı rapor edilmiştir (Kandemir ve ark. 2015, Caglayan ve ark. 2019).  alışmalara benzer şekilde sunulan çalışmada da, rutin uygulamasının kontrol grubuna göre böbrek MDA düzeylerini değiştirmedeği tespit edildi. Ayrıca, Met+Rutin uygulanan grupta MDA düzeyleri Met grubuna göre yüksek olarak belirlendi. Metotreksatın ratlarda böbrek dokusu TOK ve OSI düzeylerini arttırdığı ve TAK düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (Bozkurt ve ark. 2014, Asci ve ark. 2017). Sunulan çalışmada, metotreksatın böbrek TOK ve TAK düzeylerini değiştirmedeği tespit edildi. Rutinin böbrek TOK ve TAK düzeylerine etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmadı. Bu  alışmada, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, metateraksat ile birlikte rutin uygulanan grubun TOK düzeylerinde artış, TAK düzeylerinde ise azalış belirlendi. Ayrıca Met+Rutin grubu TOK düzeyleri, Rutin grubu TOK düzeylerinden yüksek olarak belirlendi. MDA ve TOK bulguları birlikte değerlendirildiğinde, rutin ile metotreksat birlikte uygulandığında rutin pro-oksidatif etki gösterdiği düşünülebilir (Kessler ve ark. 2003).

Metotreksat tarafından teşvik edilen GSH seviyelerindeki anlamlı azalmanın, hücreleri reaktif oksijen türlerine duyarlı hale getirerek, antioksidan savunma sisteminin etkinliğinin azalmasına yol açtığı  ne sürülmektedir (Babiak ve ark. 1998). GSH ve metotreksatın zararlı etkileri arasındaki ilişki göz önüne alındığında, antioksidan görevi gören ve GSH sentezini uyarabilen bileşiklere odaklanılmıştır (Jahovic ve ark. 2003).  alışmalar, metotreksat uygulanan ratların böbrek redükte glutatyon (rGSH) (Jahovic ve ark. 2003, Chauhan ve ark. 2018) ve tGSH (Mahmoud ve ark. 2018) düzeylerinde belirgin bir azalma olduğunu bildirmiştir. Sunulan çalışmada ise metotreksatın böbrek tGSH

düzeylerinde değişime neden olmadığı gözlemlendi. Rutinin, böbrek GSH düzeylerine etkileri ile ilgili çalışmalarda, GSH düzeylerinin rutin uygulamaları ile değişmediği bildirilmiştir (Kandemir ve ark. 2015, Ansar ve ark. 2016, Caglayan ve ark. 2019). Çalışmalara benzer şekilde, sunulan çalışmada da, rutinin böbrek tGSH düzeylerine önemli etkisi olmadığı belirlendi.

Pentoz fosfat yolunun hız sınırlayıcı enzimi olan G6PD, temel hücrel indirgeyici NADPH'nin ana kaynağı olarak normal hücre büyümesi ve hücrenin hayatta kalması için kritik öneme sahiptir (Spencer ve Stanton, 2017). Akut böbrek hasarında, hiperaldosteronizmde ve böbrek kanseri ile G6PD aktivitesinin değiştiği bildirilmiştir (Xu ve ark. 2005; 2010, Pessôa ve ark. 2012). Artan G6PD aktivitesinin, böbrek kanseri dahil tüm kanserlerle ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Spencer ve Stanton 2017). Babiak ve ark. (1998), HeLa hücrelerinde, metotreksatın, G6PD ve 6-fosfoglukonat dehidrojenaz aktivitelerini inhibe ettiğini bildirmiştir. Yapılan literatür taramalarında ratlarda, metotreksat ve rutinin, böbrek G6PD aktivitesi üzerine etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmadı. Sunulan çalışmada, metotreksat ve rutinin böbrek G6PD aktivitesini değiştirmediği belirlendi.

Yapılan çalışmalarda metatoraksatın (20 mg/kg tek dozda i.p) rat böbrek GPx aktivitesi üzerine etkileri birbirinden farklı olarak rapor edilmiştir; metatreksatın böbrek GPx aktivitesinin düşürdüğünü bildiren çalışmaların (Abd El-Twab ve ark. 2016, Savran ve ark. 2017) yanı sıra değiştirmediğini bildiren bir çalışma (Armagan ve ark. 2015) da mevcuttur. Sunulan çalışmada, Armagan ve ark. (2015)'nın sonuçları ile uyumlu olarak metotreksat uygulamasının böbrek GPx aktivitesini, kontrol grubuna kıyasla değiştirmediği gözlemlendi. Rutinin böbrek GPx aktivitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, 50 mg/kg/gün-7 gün (Ansar ve ark. 2016) ve 100 mg/kg/gün-7 gün (Caglayan ve ark. 2019), rutin uygulamasının böbrek GPx aktivitesini değiştirmediği, 150 mg/kg/gün-14 gün, (Kandemir ve ark. 2015) rutin uygulamasının ise GPx aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ise rutin (50 mg/kg/gün-15 gün) böbrek GPx aktivitesinde bir düşmeye neden oldu. Bu durumun, rutinin doz ve uygulama süresinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bilimsel çalışmalar, nefrotoksisitenin yaklaşık % 20'sinin ilaçlar tarafından indüklendiğini göstermiştir. Nefrotoksik ilaçlar, genellikle glomerulus, proksimal tübüller ve çevresindeki hücrel matrikste hasara neden olur (Jahovic ve ark. 2003, Abd El-Twab

ve ark. 2016, Khoshnoud ve ark. 2017). Ratlara metotreksat uygulamasının, böbrek hasarını indüklediği ve hasara ilişkin histopatolojik değişikliklere neden olduğu ortaya konulmuştur (Khoshnoud ve ark. 2017, Yuksel ve ark. 2017, Sherif ve ark. 2019). Metotreksat kaynaklı böbrek hasarı, metotreksatın metabolitiyle birlikte böbrek tübüllerindeki çökelmesine atfedilebilir (Widemann ve Adamson 2006, Sherif ve ark. 2019). Sherif ve ark. (2019), metotreksat kaynaklı nefrotoksisitede, tübüler dejenerasyon ve dilatasyonlu konjuge glomerüller, tıkanmış interstisyel kan damarları, küçülmüş glomerüler yumak, artmış kapsüler boşluklar ve interstisyel ve perivasküler ödem gözlemlendiğini rapor etmiştir. Yuksel ve ark. (2017), metotreksatın böbrek dokularında apoptotik indeks ve kaspaz-3 ekspresyonunu arttırarak, nefrotoksik doku hasarına neden olduğunu bildirmiştir. Mahmoud ve ark. (2018), metotreksatın böbrek dokularında lökosit infiltrasyonu, interstisyel kanama ve tübüler epitel hücrelerinin dejeneratif değişiklikleri gibi çeşitli histopatolojik değişikliklere neden olduğunu ortaya koymuştur. Sakalli ve ark. (2017), metotreksatın tübül distansiyonu, interstisyel inflamasyon, prerenal inflamasyon, glomerüler konjesyon, glomerüler dejenerasyon ve parankimal kanama gibi renal dejeneratif değişikliklerini gözlemlemiştir. Histopatolojik açıdan, çalışmalarla uyumlu olarak, bu çalışmada da, metotreksatın böbrek dokularında makroskobik ve mikroskobik değişikliklere neden olduğu tespit edildi; makroskobik olarak metotreksat uygulanan ratların böbrekleri normalden daha açık renkte ve hafif şişkindi. Mikroskobik olarak, böbrek dokularında geniş alanlar halinde tubul epitellerinde parankimden hidropiğe varan dejeneratif değişiklikler mevcuttu. Ayrıca, küçük odaklar halinde mononükleer yagısal hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Bu histopatolojik bulgular, metotreksat kaynaklı böbrek hasarının esas olarak histopatolojik düzeyde meydana geldiğini gösterdi. Rutinin böbrekler üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, böbreğin histolojik olarak glomerulus, tübül hücreleri ve genel yapısında olumsuz herhangi bir etki göstermediği bildirilmiştir (Arjumand ve ark., 2011; Ansar ve ark., 2016). Çalışmalara benzer şekilde, sunulan çalışmada da rutin uygulanan grubun böbrek dokularında makro ve mikro düzeyde bir patolojik bulguya rastlanılmadı. Met+Rutin grubu ratların tubul epitellerinde, Met grubunda belirlenen, parankimden hidropiğe varan dejeneratif değişikliklerin olmadığı, sadece hafif dejeneratif değişiklikler olduğu görüldü. Bu da metotreksat nefrotoksisitesine karşı rutinin koruyucu/iyileştirici etkileri olduğunu düşündürdü.

6. SONUÇ

Sunulan çalışmada metotreksatın böbrek dokusunda hasara neden olduğu ve rutinın metotreksat kaynaklı nefrotoksisiteyi koruyucu ve iyileştirici etkisi olabileceği belirlendi. Metotreksat kemoterapisi ile birlikte, rutin, metotreksat kaynaklı nefrotoksisiteyi hafifletmek için umut verici olabilir. Rutinin, metotreksat kaynaklı nefrotoksisite üzerine olası koruyucu ve tedavi edici etkilerinin, farklı doz ve zaman aralıklarında araştırılmasının daha ileri çalışmalar ile ortaya konulması önerilir.



7. KAYNAKLAR

1. **Abd El-Twab SM, Hozayen WG, Hussein OE, Mahmoud AM.** 18 β -Glycyrrhetic acid protects against methotrexate-induced kidney injury by up-regulating the Nrf2/ARE/HO-1 pathway and endogenous antioxidants. *Ren Fail*, **2016**, s. 38(9):1516-1527.
2. **Akkoyun HT.** The Protective Effect of Quercetin Against to Renal Tissue Damage Induced Carbontetrachloride in Rat. *JIST*, **2019**, s. 9(2):708-716.
3. **Al-Rashidy AH, Salem RR, Alhosary AA, Wahdan MH, Elnemr GM, ve ark.** Role of erythropoietin in methotrexate-induced nephrotoxicity in adult male albino rats. *J. Nephropharmacol*, **2018**, s. 7:156-163.
4. **Ansar S, Hamed S, AlGhosoon H, AlSaedan R, Iqbal M.** The protective effect of rutin against renal toxicity induced by lead acetate. *Toxin Rev*, **2016**, s. 35(1-2):58-62.
5. **Araújo JR, Gonçalves P, Martel F.** Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr Res*, **2011**, s. 31(2):77-87.
6. **Arjumand W, Seth A, Sultana S.** Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NF κ B, TNF- α and caspase-3 expression in wistar rats. *Food Chem Toxicol*, **2011**, s. 49(9):2013-2021.
7. **Armagan I, Bayram D, Candan IA, Yigit A, Celik E, ve ark.** Effects of pentoxifylline and alpha lipoic acid on methotrexate-induced damage in liver and kidney of rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, **2015**, s. 39(3):1122-1131.
8. **Asci H ve Özer MK.** Metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında misoprostolün koruyucu etkisi, *SDÜ Sağlık Bil Enst Derg*, **2011**, s. 2(2):125-126.
9. **Asci H, Ozmen O, Ellidag HY, Aydın B, Bas E, ve ark.** The impact of gallic acid on the methotrexate-induced kidney damage in rats. *J Food Drug Anal*, **2017**, s. 25(4):890-897.
10. **Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB.** Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct*, **1998**, s. 16(4):283-93.
11. **Beutler E.** *Red cell metabolism manual of biochemical methods*. London:Academic Press, **1971**, s. 68-70
12. **Beutler E.** *Red cell metabolism. In: A Manual of Biochemical Methods*. New York: Grune Strottan, **1975**, s. 67-69.
13. **Bleyer WA.** The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug. *Cancer*, **1978**, s. 41(1):36-51.
14. **Bozkurt M, Em S, Oktayoglu P, Turkcu G, Yuksel H, ve ark.** Carvacrol prevents methotrexate-induced renal oxidative injury and renal damage in rats. *Clin Invest Med*, **2014**, s. 37(1):19-25.
15. **Caglayan C, Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S, Eser G.** Rutin protects mercuric chloride-induced nephrotoxicity via targeting of aquaporin 1 level, oxidative stress, apoptosis and inflammation in rats. *J Trace Elem Med Biol*, **2019**, s. 4:69-78.
16. **Chauhan P, Sharma H, Singh S, Gupta YK, Kumar U.** Attenuation of methotrexate-induced hepatorenal damage by Terminalia bellerica fruit extract in experimental rats. *Pharmacogn. Res.*, **2018**, s. 10(3):301-308.
17. **Dalaklioglu S, Sahin P, Ordueri EG, Celik-Ozenci C, Tasatargil A.** Potential role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in methotrexate-induced nephrotoxicity and tubular apoptosis. *Int J Toxicol*, **2012**, s. 31(5):430-440.
18. **Dilek İ.** Kemoterapötide toksisite değerlendirmesi. XXZVI Hematoloji Kongresi, 3-7 Kasım **2010**, Antalya.
19. **Ganeshpurkar A, Saluja AK.** The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J*, **2017**, s. 25(2):149-164.
20. **Gonçalves CF, Santos MC, Ginabreda MG, Fortunato RS, Carvalho DP, ve ark.** Flavonoid rutin increases thyroid iodide uptake in rats. *PLoS One*, **2013**, s. 8(9):73908.
21. **Hafez HM, Ibrahim MA, Ibrahim SA, Amin EF, Goma W, ve ark.** Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol*, **2015**, s. 5(768):1-12.
22. **Han Y, Lu JS, Xu Y, Zhang L, Hong BF.** Rutin ameliorates renal fibrosis and proteinuria in 5/6-nephrectomized rats by anti-oxidation and inhibiting activation of TGF β 1-smad signaling. *Int J Clin Exp Pathol*, **2015**, s. 8(5):4725-34.
23. **Hemeida RA, Mohafez OM.** Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats, *J Egypt Natl Canc Inst*, **2008**, s. 20(2)141-8.

24. **Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yeğen BC, Sener G.** Melatonin prevents methotrexate induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res*, **2003**, s. 34(4):282-287.
25. **Jalili C, Ghanbari A, Roshankhah S, Salahshoor MR.** Toxic Effects of Methotrexate on Rat Kidney Recovered by Crocin as a Consequence of Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation Prevention. *Iran Biomed J*, **2020**, s. 24(1):39-46.
26. **Kamalakkannan N, Stanely Mainzen Prince P.** Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem*, **2006**, s. 293:211–219.
27. **Kamel KM, Abd El-Raouf OM, Metwally SA, Abd El-Latif HA, El-sayed ME.** Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol*, **2014**, s. 28(7):312-319.
28. **Kandemir FM, Ozkaraca M, Yildirim BA, Hanedan B, Kirbas A, ve ark.** Rutin attenuates gentamicin-induced renal damage by reducing oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in rats. *Ren Fail*, **2015**, s. 37(3):518-25.
29. **Kessler M, Ubeaud G, Jung L.** Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol*, **2003**, s. 55(1):131-42.
30. **Khan RA, Khan MR, Sahreen S.** Protective effects of rutin against potassium bromate induced nephrotoxicity in rats. *BMC Complement Altern Med*, **2012**, s. 12:204.
31. **Khoshnoud S, Mohseni Kouchesfahani H, Nabuini M.** Evaluation of The Protective Effect of Hydro-Alcoholic Extract of Raspberry Fruit on Aquaporin1 Expression in Rats Kidney Treated by Methotrexate. *Cell J*, **2017**, s. 19(2):306-313.
32. **Kolli VK, Abraham P, Isaac B, Selvakumar D.** Neutrophil infiltration and oxidative stress may play a critical role in methotrexate-induced renal damage. *Chemotherapy*, **2009**, s. 55(2):83-90.
33. **Korkmaz A, Kolankaya D.** Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Can J Surg*, **2013**, s. 56:6-14.
34. **Korkmaz A, Kolankaya D.** Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney. *J Surg Res*, **2010**, s. 164:309-315.
35. **Korkmaz KS, Butuner BD, Roggenbuck D.** Detection of 8-OHdG as a diagnostic biomarker. *J Lab Precis Med*, **2018**, s. 3:95.
36. **Lin JP, Yang JS, Lin JJ, Lai KC, Lu HF, ve ark.** Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. *Environ Toxicol*, **2012**, s. 27(8):480-4.
37. **Liu CM, Ma JQ, Sun YZ.** Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Environ Toxicol Pharmacol*, **2010**, s. 30(3):264-71.
38. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with pholin phenol reagent. *J Biol Chem*, **1951**, s. 193:265-275.
39. **Mahmoud AM, Germoush MO, Al-Anazi KM, Mahmoud AH, Farah MA, ve ark.** Commiphora molmol protects against methotrexate-induced nephrotoxicity by up-regulating Nrf2/ARE/HO-1 signaling. *Biomed Pharmacother*, **2018**, s. 106:499-509.
40. **Messmann R, Allegra C.** Antifolates. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, **2001**, s. 139-184.
41. **Minamiyama Y, Takemura S, Toyokuni S, Nishino Y, Yamasaki K, ve ark.** Amelioration of cisplatin toxicity by a fermented grain food product. *Biofactors*, **2002**, s. 16(3-4):105-15.
42. **Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M.** Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats, *Andrologia*, **2009**, s. 41:105-110.
43. **Oktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, ve ark.** Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health*, **2006**, s. 22(6):241-247.
44. **Pessôa BS, Peixoto EB, Papadimitriou A, Lopes de Faria JM, Lopes de Faria JB.** Spironolactone improves nephropathy by enhancing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and reducing oxidative stress in diabetic hypertensive rat. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, **2012**, s. 13(1):56-66.
45. **Sakalli ÇE, Tetiker H, İlhan Çelik Ö, Yılmaz N, Cığerci İH.** Methotrexate-Induced Nephrotoxicity in Rats: Protective Effect of Mistletoe (*Viscum album* L.) Extract. *Complement Med Res*, **2017**, s. 24(6):364-370.
46. **Sanchez M, Roussel R, Hadjadj S, Moutairou A, Marre M, ve ark.** Plasma concentrations of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and risk of kidney disease and death in individuals with type 1 diabetes. *Diabetologia*, **2018**, s. 61(4):977-984.
47. **Sargın AK, Emin EO, Can B, Saran Y.** Fare böbreğinde metotreksatın oluşturduğu morfolojik değişiklikler. *Anadolu Üniv J of Sci and Techn*. **2009**, s. 10(1):197-203.

48. **Savran M, Cicek E, Doguc DK, Asci H, Yesilot S, ve ark.** Vitamin C attenuates methotrexate-induced oxidative stress in kidney and liver of rats. *Physiol Int*, **2017**, s. 1-11.
49. **Sherif IO, Al-Shaalan NH, Sabry D.** Ginkgo Biloba Extract Alleviates Methotrexate-Induced Renal Injury: New Impact on PI3K/Akt/mTOR Signaling and MALAT1 Expression. *Biomolecules*, **2019**, s. 9(11).
50. **Spencer NY, Stanton RC.** Glucose 6-phosphate dehydrogenase and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **2017**, s. 26(1):43-49.
51. **Taşlı NG, Uçak T, Karakurt Y, Keskin Çimen F, Özbek Bilgin A, ve ark.** The effects of rutin on cisplatin induced oxidative retinal and optic nerve injury: an experimental study. *Cutan Ocul Toxicol*, **2018**, s. 1-6.
52. **Tsai JP, Liou JH, Yeh KT, Tai HC, Cheng YW, ve ark.** Intensity of cytosol expression of 8-OHdG in normal renal tubules is associated with the severity of renal fibrosis. *Swiss Med Wkly*, **2011**, s. 141:13268.
53. **Ulusoy HB, Öztürk İ, Sönmez MF.** Protective effect of propolis on methotrexate-induced kidney injury in the rat. *Ren Fail*, **2016**, s. 38(5):744-50.
54. **Vardı N, Parlakpınar H, Ozturk F, Ates B, Gul M, ve ark.** Potent protective effect of apricot and b-carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats, *Food Chem Toxicol*, **2008**, s. 46:3015-3022.
55. **Wang X, Zhao X, Feng T, Jin G, Li Z.** Rutin Prevents High Glucose-Induced Renal Glomerular Endothelial Hyperpermeability by Inhibiting the ROS/Rhoa/ROCK Signaling Pathway. *Planta Med*, **2016**, s. 82(14):1252-1257.
56. **Widemann BC, Adamson PC.** Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*, **2006**, s. 11(6):694-703.
57. **Widemann BC, Balis FM, Kempf-Bielack B, Bielack S, Pratt CB, ve ark.** High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma: incidence, treatment, and outcome, *Cancer*, **2004**, s. 100:2222-2232.
58. **Xu Y, Osborne BW, Stanton RC.** Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2005**, s. 289(5):1040-1047.
59. **Xu Y, Zhang Z, Hu J, Stillman IE, Leopold JA, ve ark.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mice have increased renal oxidative stress and increased albuminuria. *FASEB J*, **2010**, s. 24(2):609-616.
60. **Yuksel Y, Yuksel R, Yagmurca M, Haltas H, Erdamar H, ve ark.** Effects of quercetin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol*, **2017**, s. 36(1):51-61.
61. **Zhou H, Kato A, Miyaji T, Yasuda H, Fujigaki Y, ve ark.** Urinary marker for oxidative stress in kidneys in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant*, **2006**, s. 21(3):616-623.

EK

Evrak Tarih ve Sayısı: 27/07/2018-E.42776

GİZLİ



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı :40595970-050.99-
Konu :Dr. Öğretim Üyesi Filiz
KAZAK

SAYIN DR. ÖĞR. ÜYESİ FİLİZ KAZAK
ÖĞRETİM ÜYESİ

İlgi : 02/07/2018 tarihli 93409276--1003 sayılı yazı.

Kurulumuzun 26/07/2018 tarihli toplantısında almış olduğu 2018/7-2 numaralı karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. Muhammed Enes ALTUĞ
Başkan

KARAR 2018/7-2 Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Dr. Öğretim Üyesi Filiz KAZAK'ın (Biyokimya AD) yürütücüsü olduğu, Yüksek Lisans Öğrencisi Ali Kazım TAMBAĞ (Biyokimya AD) ve Dr. Arş. Gör. Tuncer KUTLU'nun (Patoloji AD) ortak çalışmaları "*Rutin ratlarda metotreksat ile oluşturulan nefrotoksiteye karşı koruyucu etkisi*" adlı proje Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun bulunarak onaylanmasına oybirliğiyle karar verilmiştir.

Mevcut Elektronik İmzalar

MUHAMMED ENES ALTUĞ (Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu - Başkan) 27/07/2018 14:51

GİZLİ

T: F:
E-Posta : Web:
İletişim: Hükümet Ardılı (Dahili: 3262455845)



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Antakya’da 21.07.1992 yılında doğdu. İlk ve orta öğrenimimi İnönü İlköğretim Okulu’nda okudu. Liseyi Antakya Dr. Mustafa Gençay Lisesi’nde tamamladı. Kastamonu Üniversitesi Fazıl Boyner Sağlık Yüksekokulu’nda Hemşirelik Bölümü’ne 2010 yılında başladı ve 2014 yılında mezun oldu. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Hastanesi’nde acil hemşiresi olarak 2014 yılının temmuz ayında çalışmaya başladı. Hatay İl Sağlık Müdürlüğü’ne 2016 yılının nisan ayında hemşire olarak atandı ve halen Hatay İl Sağlık Müdürlüğü’ne bağlı hemşire olarak görev yapmakta.

