



**T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA METOTREKSATIN YOL AÇTIĞI
İNTESTİNAL MUKOZA HASARI VE OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE PROPOLİSİN ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Barış ESER

KAYSERİ – 2009



T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

RATLARDA METOTREKSATIN YOL AÇTIĞI
İNTESTİNAL MUKOZA HASARI VE OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE PROPOLİSİN ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Barış ESER

Danışman

Prof. Dr. Mustafa ÇETİN

KAYSERİ – 2009

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bize aktaran, tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını, değerli fikirlerini ve iyi niyetini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa ÇETİN'e;

Tezin hazırlanması süresince yardımlarını esirgemeyen Hematoloji BD'dan Sayın Dr. Leylagül KAYNAR'a, İç Hastalıkları ABD'dan Sayın Dr. İsmail KOÇYİĞİT'e, Biyokimya ABD'dan Sayın Yrd. Doç. Dr. Aysun ÇETİN'e, Sayın Dr. Recep SARAYMEN'e ve Sayın Dr. Canan KARADAĞ'a, Patoloji ABD'dan Sayın Doç. Dr. Özlem CANÖZ'e ve Sayın Dr. Arzu TAŞDEMİR'e, Biyoistatistik ABD'dan Sayın Dr. Ahmet ÖZTÜRK'e ve Sayın Dr. Ferhan ELMALI'ya, Çıkrıkçıoğlu MYO, Hayvan Sağlığı Bölümü'den Sayın Doç. Dr. Sibel SİLİCİ ve tüm DEKAM personeline;

Asistanlık eğitimim süresince disiplinli çalışmalarını örnek aldığım, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım İç Hastalıkları Anabilim Dalı ve diğer rotasyon yaptığım klinik bölümlerdeki hocalarıma;

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, özel anılarımı paylaştığım, hayat boyu sevgiyle hatırlayacağım tüm doktor arkadaşlarıma, her zaman saygı ve sevgi duyduğum hemşire ve hizmetli personele;

Ayrıca, varlıklarını hiçbir şeye değişmeyeceğim, her şart ve koşulda yanımda olan canım ailem ve sevgili eşime;

Teşekkür eder saygı ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Barış ESER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	xi
ABSTRACT	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. MUKOZİT PATOBİYOLOJİSİ	5
2.2.GASTROİNTESTİNAL MUKOZİTİN ÖNLENMESİ VE TEDAVİSİ	7
2.3. METOTREKSAT	8
2.3.1. Metotreksat ve Gastrointestinal Toksisitesi	8
2.3.2. Metotreksat ve Karaciğer Toksisitesi.....	9
2.4.SERBEST RADİKALLER	10
2.4.1. Serbest Oksijen Radikalleri.....	12
2.4.2. Lipid Peroksidasyonu.....	12
2.5. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLER	13
2.5.1. Süperoksit Dismutaz	14
2.5.2. Katalaz.....	14
2.5.3. Glutasyon Peroksidaz	14
2.6. PROPOLİS	14
2.6.1. Propolisin Kaynağı ve Kovanda Kullanımı	14

2.6.2 Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Yapısı	15
2.6.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri	17
2.6.4. Propolisin Biyotransformasyonu ve Toksisitesi.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. HAYVANLAR	20
3.2. PROPOLİSİN KAYNAĞI VE KİMYASAL ANALİZİ	20
3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI VE PROPOLİS EKSTRESİNİN İLE METATREKSATIN UYGULANMASI	22
3.4. ÖRNEKLERİN ALINIŞ ŞEKLİ VE SAKLANMASI	23
3.5. KARACİĞER DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI	23
3.6. MALONDİALDEHİT TAYİNİ.....	24
3.7. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	25
3.8. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ	27
3.9. KATALAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	28
3.10. İNTESTİNAL MUKOZA İNCELEMESİ	29
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	29
4.BULGULAR	30
4.1. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME	30
4.1.1.Villus Uzunluğu	32
4.1.2.Villus/Kript Oranı	32
4.1.3. Mukoza Kalınlığı	33
4.1.4. Semi-Kantitatif Histolojik Değerlendirme	34
4.2. OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	37
4.2.1. Karaciğer Dokusu ve Plazma MDA Değeri.....	38
4.2.2. Karaciğer Dokusu ve Plazma SOD Aktivitesi	39

4.2.3. Karaciğer Dokusu ve Plazma GSH-Px Aktivitesi.....	40
4.2.4. Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesi.....	41
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇLAR	48
KAYNAKLAR	50
KABUL ONAY SAYFASI.....	65

KISALTMALAR

°C	: Santigrat
BSTFA	: Bis-trimetilsilil trifloroasetamid
CA	: Kafeik asit
CAPE	: Kafeik asit fenilester
CuCl ₂	: Bakır diklorür
dk	: Dakika
gr	: Gram
GK-KS	: Gaz kromotografi-kitle spektrometri
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG-R	: Glutasyon redüktaz
H&E	: Hemotoksilen ve eozin
HNO ₂	: Hidrojen nitrit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HO ₂	: Hidroperoksit radikali
IL-6	: İnterlökin-6
IL-1 β	: İnterlökin-1beta
ip	: İntraperitoneal
iNOS	: İndüklenebilir nitrikoksit sentetaz
CAT	: Katalaz
Kg	: Kilogram
KT	: Kemoterapi

LD ₅₀	: Test grubundaki hayvanların %50'sini öldüren doz
M	: Mol
MAPK	: Mitojen aktive eden proteinkinaz
MDA	: Malondialdehid
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MMPs	: Matriks metalloproteinazları
MTX	: Metotreksat
NO [•]	: Nitrik oksit
NO ₂	: Nitrojen dioksit
N ₂ O ₃	: Diazot trioksit
NADP	: Nikotinamid adenzin difosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium
NF-κB	: Nükleer faktör-kappaB
NHCl	: Azothidroklorür
ng	: Nanogram
nM	: Nanomol
nm	: Nanometre
¹ O ₂	: Singlet oksijen
O ₂ ⁻	: Süper oksit radikali
OD	: Optik dansite
OH	: Hidroksil radikali
ONOOH	: Peroksinitrit
RNM	: Reaktif nitrojen metabolitleri
ROM	: Reaktif oksijen metabolitleri

RO	: Lipit alkoksi radikali
ROO [·]	: Lipit peroksit radikali
ROOH	: Lipit hidroperoksit
rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
RT	: Radyoterapi
SKHDTs	: Semi-kantitatif histlojik değerlendirme toplam skoru
SKZ	: Siklooksijenaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikali
TBA	: Tiobütirikasit
TCA	: Trikloro asetik asit
TMCS	: Trimetilklorosil
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör–alfa
Ü	: Ünite
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromol
XO	: Ksantinoksidaz

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Serbest radikal kaynakları	11
Tablo 2. Antioksidanlar	13
Tablo 3. Propolisin kimyasal yapısı	17
Tablo 4. Kayseri propolisinin etanol ekstrakt örneğinin kimyasal bileşenleri	21
Tablo 5. Araştırma gruplarının ince barsakdaki morfolometrik ve histopatolojik parametreleri	31
Tablo 6. Araştırma gruplarının karaciğer dokusu ve plazma oksidatif stres parametreleri	37

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Gastrointestinal mukoza hasarı gelişiminde beş faz modeli.....	7
Şekil 2, Mukozit patobiyolojisinde sinyal amplifikasyonu.....	7
Şekil 3. KT'nin neden olduğu mukozitin semptomları ve klinik yansıması.....	9
Şekil 4. Çalışmanın şematik olarak ifade edilmesi	22
Şekil 5. Rat duodenum dokusu villus boyu üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.....	32
Şekil 6. Rat duodenum dokusu villus/kript oranı üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.....	33
Şekil 7. Rat duodenum dokusu mukoza kalınlığı üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.....	34
Şekil 8. Ratlarda ip MTX tedavisinin neden olduğu intestinal hasar üzerine propolisin histopatolojik etkisi.....	35
Şekil 9. Rat duodenum dokusu SKHDTs üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi	36
Şekil 10. Rat karaciğer dokusu MDA değeri üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.....	38
Şekil 11. Rat plazma MDA değerleri üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi	38
Şekil 12. Rat karaciğer dokusu SOD aktivitesi üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.....	39
Şekil 13. Rat plazma SOD aktivitesi üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi	40

Şekil 14. Rat karaciğer doku GSH-Px aktivitesi üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.....	40
Şekil 15. Rat plazma GSH-Px aktivitesi üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi	41
Şekil 16: Rat karaciğer dokusu CAT aktivitesi üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.....	41

RATLARDA METOTREKSATIN YOL AÇTIĞI İNCE BARSAK HASARI VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE PROPOLİSİN ETKİSİ

ÖZET

Giriş: Metotreksat (MTX), yaygın olarak sitotoksik kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır, ancak sıklıkla neden olduğu şiddetli intestinal mukoza ve karaciğer hasarı etkinliğini sınırlandırmaktadır. Bu yan etkilerinin mekanizmasıyla ilgili çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür, bunlar arasında en muhtemel olanı oksidatif strestir. Propolis, arıların kovan yapısında kullanıldıkları temel ürünlerinden birisidir ve antioksidan oldukları bilinen polifenolik bileşiklerden zengindir. Bu deneysel çalışmada, ratlarda MTX'in yol açtığı ince barsak hasarı ve oksidatif stresi düzeltmede, propolis ekstraktının etkisinin olup olmadığını tespit etmek amaçlanmıştır.

Materyal Ve Metod: Hayvanlar 4 gruba bölündü ve her grup 12 rattan oluştu. Propolis-MTX grubu; on gün süresince oral olarak propolis ekstraktı (100mg/kg vücut ağırlığı) verildi ve sekizinci günde tek doz MTX [20 mg/kg, intraperitoneal (ip)] uygulandı. MTX grubu; on gün boyunca –plasebo- oral olarak distile su verildi ve sekizinci günde benzer protokol ile MTX uygulandı. Propolis grubu; 10 gün propolis (100mg/kg vücut ağırlığı) oral olarak verildi ve sekizinci günde MTX yerine ip serum fizyolojik uygulandı. Kontrol grubu; 10 gün oral distile su ve sekizinci günde MTX yerine ip serum fizyolojik uygulandı. Onbirinci günde, derin anestezi altında kan, duodenum ve karaciğer dokuları elde edildi. Daha sonra, duodenum doku örnekleri ışık mikroskopunda (morfometrik ve histopatolojik olarak) incelenmesi için fikse edildi. Karaciğer homojenatı ile plazmada, lipid peroksidasyonunun son ürünü malondialdehid (MDA) seviyesi ve önemli endojen antioksidanlardan süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ile karaciğer homojenatında katalaz (CAT) aktivitesi değerlendirildi.

Bulgular: MTX grubunda ışık mikroskobu ile mukozal hasar gösterildi ve bu hasar propolis uygulaması ile önemli derecede azaltıldı ($P<0.05$). MTX tedavisi karaciğer homojenatı ve plazmada, MDA seviyesinde artmaya, SOD ve GSH-Px

aktivitelerinde azalmaya ve karaciğer homojenatı CAT aktivitesinde azalmaya neden oldu ($P<0.001$), bu değişiklikler propolis ekstrakt uygulanması ile önemli ölçüde engellendi ($P<0.001$).

Sonuç: Çalışmada, MTX'in yol açtığı ince barsak hasarı ve oksidatif stresi propolis ekstraktının azalttığı gösterildi. Bu koruyucu etki, propolis ekstaktının güçlü antioksidan aktivitesine atfedilebilir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan aktivite, metotreksat, mukozal hasar, propolis.

EFFECTS OF PROPOLIS ON METHOTREXATE-INDUCED INTESTINAL MUCOSA DAMAGE AND OXIDATIVE STRESS IN RATS

ABSTRACT

Background: The efficacy of methotrexate (MTX), a widely used cytotoxic chemotherapeutic agent, is often limited by its severe intestinal mucosa and liver damage. Regarding the mechanisms of these adverse effects, several hypotheses have been put forward, among which oxidative stress is the most likely. Propolis is one of the major products of bees which is used in hive structure and is rich in polyphenolic compounds. These are known for antioxidant activities. The aim of this experimental study is to determine whether propolis extract, could ameliorate the MTX-induced small bowel injury and oxidative stress in the rats.

Material And Methods: The animals were divided into 4 groups. Each group is consisted of 12 rats. Propolis-MTX group: rats were given propolis extract (100 mg/kg body weight) orally for 10 days, and a single dose of MTX [20mg/kg, intraperitoneally (ip)] was added on the eighth day. MTX group: these received - placebo- distilled water (orally) instead of propolis extract for 10 days and the same MTX protocol applied on the eighth day. Propolis group: rats were given propolis extract (100 mg/kg body weight) orally for 10 days, physiological saline (ip) instead of MTX was administered on the eighth day. Control group: rats were given distilled water (orally) through 10 days and physiological saline (ip) instead of MTX was administered on the eighth day in a similar manner. On the 11th day, blood, duodenum and liver tissue samples were obtained under deep anaesthesia. Afterward, duodenum tissue samples were fixed for light microscopic examinations (morphometrically and histopathologically).

The level of malondialdehyde (MDA), an end product of lipid peroxidation, and the activities of süperoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), important endogenous antioxidants, were evaluated in the plasma and liver tissue

homogenates. Catalase (CAT) an other endogenous antioxidant was evaluated only in liver tissue homogenates.

Results: Light microscopy in the MTX group revealed mucosal damage, which significantly decreased with propolis administration ($P < 0.05$). MTX treatment increased the MDA level and decreased the SOD and GSH-Px activities in the plasma and liver homogenates and decreased the CAT activity in liver homogenates ($P < 0.001$) while these alterations were significantly prevented by propolis extracts administration ($P < 0.001$).

Conclusions: The present study suggests that the small bowel injury and oxidative stress induced by MTX is reduced by propolis extracts. This protective effect can be attributed to the powerful antioxidant properties of propolis extracts.

Key words: Antioxidant activity, methotrexate, mucosal damage, propolis.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Oral ve intestinal mukozit, kanser hastalarında kullanılan kemoterapi (KT) ya da radyoterapi (RT) tedavisine bağılı olarak gözlenmektedir (1,2). Mukozitin toplam sıklığı değişkendir ve hastalığın tanısı, hastanın yaşı, kullanılan ilacın tipi, dozu ve sıklığıyla ilişkilidir (3). Standart doz KT alan hastaların %40-70'inde, kök hücre ve kemik iliği transplantasyonu nedeniyle yüksek doz KT alan hastaların ise %75'inden fazlasında mukozit görülür ve mukozit gelişmiş hastaların %50'inde KT dozunun azaltılması ya da bazı vakalarda tedavinin kesilmesi gerekebilir (2,3). Mukozit gelişimi oral alım kısıtlanması, karın ağrısı, şişkinlik ve ishale neden olmakla birlikte, hastanın tedaviye devam etme isteğini engelleyebilir. Ciddi mukozit hastanın hastaneye yatırılmasını, enteral veya parenteral beslenmesini ve narkotik analjezik kullanımını gerektirebilir (2,4). Lokal olarak sekonder enfeksiyona neden olduğu gibi sistemik enfeksiyon için odak olabilir. Hastanın hastanede yatış süresini uzatabilir ve tedavi maliyetini artırabilir (2,4-6).

Gastrointestinal mukozit KT uygulamalarında en önemli doz kısıtlayıcı nedenlerden birisidir (4-6). Mukozit tedavisinin etkin bir şekilde yapılması ya da önlenmesi, tedavinin etkinliğini, morbiditeyi ve mortaliteyi olumlu yönde etkilemektedir (6). KT ve RT ile ilişkili oluşan mukozitin kesin bir tedavisi henüz bulunamamıştır ve hastalar palyatif tedavi yaklaşımları ile tedavi edilmektedir (7,8).

Mukozit gelişmesinin fizyopatolojisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte, oluşumunda sadece bazal epitelyumdaki direkt hücresel hasarın rol oynamadığı, submukozadaki hücre ve dokuların aracılık ettiği biyolojik olaylar zincirinin de katkısı olduğu düşünülmektedir. Mukoza hücrelerinde reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) oluşumu, mukozal hasara yol açan karışık olaylar zincirine öncülük etmektedir. ROM dokulardaki bilinen toksik etkilerine ilave olarak, oluşan hasarın büyümesi ve hızlandırılmasında da rol oynamaktadırlar. Örneğin, KT ve RT ajanları ile ROM, nükleer faktör-kappaB (NF- κ B) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir. Bu NF- κ B aktivasyonunun, non-hematolojik toksisitesi olan hastalarda arttığı tespit edilen proteinlerin üretimi ile birlikteliği ve mukozit oluşumu sırasında NF- κ B aktivitesi ile tümör nekrosis faktör-alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-1beta (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinlerin doku ve serum seviyelerini arttığı gösterilmiştir. Bu sinyal molekülleri doku hasarının oluşmasına ve ilerlemesine neden olmaktadır (7,9).

MTX lösemiler, diğer malignensiler ve bazı otoimmün hastalıklardaki gibi benign hastalıklarda sitotoksik kemoterapötik ajan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. MTX'in sitotoksik etkisi, kanser hücreleri için seçici olmadığından kemik iliğindeki hematopoetik hücreler ve barsak mukozasındaki aktif bölünen hücreler gibi proliferasyon hızı yüksek dokuları da etkiler (10). Bu nedenle, MTX'in etkinliği, şiddetli enterokolit ya da intestinal hasar gibi toksik sekelleri nedeniyle sıklıkla sınırlanmaktadır. MTX tedavisinin neden olduğu intestinal hasarın en çok proksimal ince barsakta olduğu ve oluşan hasar nedeniyle ishal ve malabsorpsiyon geliştiği (5), MTX'in akut lösemi tedavisinde aralıklı olarak yüksek doz kullanımı ile psöriasis tedavisinde uzun süre düşük doz kullanımının progresif hepatik fibrosis ve siroza ilerleyen karaciğer hasarına neden olabileceği bilinmektedir (11). MTX toksisitesinin, oluşan sistemik oksidatif stres, tedavi süresi ve doz şeması, hastanın risk faktörleri ve hastalığın tipi ile genetik ve moleküler apoptotik faktörler gibi birçok faktörün etkileşimiyle olduğu rapor edilmiştir (12).

Propolis bal arıları tarafından üretilen reçineli bir karışımdır. Propolisin içeriğinde reçine, mum, polen, yağ asitleri, esansiyel yağlar ile diğer organik ve mineral maddeler bulunmaktadır (13,14). Günümüzde propolisin antibakteriyel (15), antifungal (16) antioksidan (17), serbest radikal temizleyici aktivitesi (17), anti-inflamatuar (18), immünomodülatör (19) ve yara iyileştirici özelliği (20) gibi birçok biyolojik etkisi in vitro ve in vivo deneylerle ispat edilmiştir.

Propolis ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olmakla birlikte, yapılan literatür incelemesi ışığında MTX'in neden olduğu intestinal hasarı ve oksidatif stresi önleyici etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Propolisin etkileri göz önünde bulundurularak, MTX'in neden olduğu intestinal hasar ve oksidatif stres üzerine propolisin koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. MUKOZİT PATOBİYOLOJİSİ

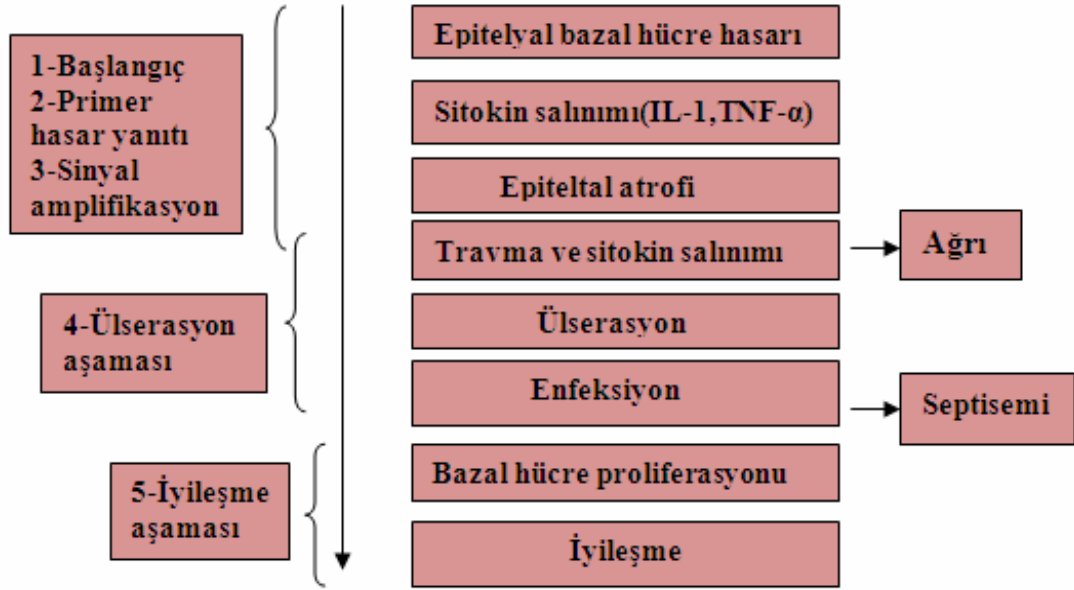
Mukozit için temel neden, KT'nin tümör hücreleri için seçici olmaksızın sağlıklı intestinal hücreleride hedefleyerek apopitozise neden olmasıdır (21). Klasik olarak gastrointestinal mukozite hem KT ilaçları tarafından bozulan ve azalan yüksek hücre proliferasyonu, hem de kript hücrelerinin direk öldürülmesi katkıda bulunur. Bununla birlikte, mukozit oluşumu için sindirim kanalı mukoziti isimli yeni bir teori ortaya atılmıştır. Sindirim kanalı mukoziti terimi, oral ve gastrointestinal mukozite ayrı patolojiler olarak bakmaktan ziyade tüm beslenme kanalında oluşan hasarı tanımlamak için kullanılmaktadır. Burada, sindirim kanalının embriyonik olarak tek bir yapıdan gelişmesi ve vücudun sindirim sisteminde oluşan hasara karşı verdiği cevapta belirli yolları kullanması gerçeğinden yola çıkılmıştır (22). Oluştığı bölgeye bakılmaksızın mukozit patobiyojisinin arkasındaki mekanizmaların benzer olması muhtemeldir. Bu nedenle, oral mukozit için tanımlanan beş faz modeli ince barsaklar içinde kabul görmüştür (7,9,21-23). Bu beş faz; 1. başlangıç, 2. primer hasar yanıtı, 3. sinyal amplifikasyonu, 4. ülserasyon ve inflamasyon ve 5. iyileşme fazından oluşur [Şekil 1].

Kısaca, KT'nin neden olduğu mukozit dokunun tabanında bulunan hücrelerde ve bazal epitelyum hücrelerinde doğrudan hasar ile başlar. DNA sarmalındaki kopmalar hücre hasarı ve ölümüne sebep olur. Mukozit DNA sarmalında hasar oluşmadan, ROM'un etkisiyle de oluşabilir. KT epitelyal, endotelyal, mezenkimal hücreler ve

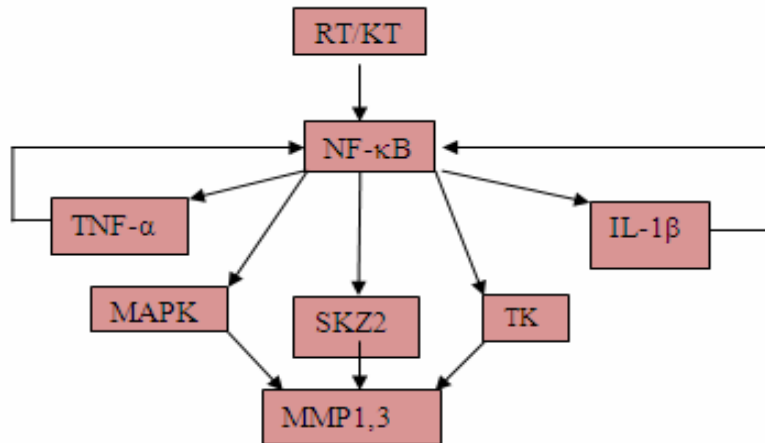
makrofajlarda NF- κ B'yi aktive eder. Bu da TNF- α , IL-6 ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimine ve genlerin upregülasyonuna neden olur. Bu sitokinler primer uyarının büyümesini ya da diğer hücrelerde de NF- κ B aktivasyonunu sağlar ki, bu da mitojen aktive eden proteinkinaz (MAPK), siklooksijenaz 2 (COX2) ve tirozinkinaz uyaran molekülleri kodlayan genlerin transkripsiyonu ile sonuçlanır. Oluşan uyarı yolağı lamina propriada ve epitelyumda doku hasarına yol açan matriks metalloproteinazları (MMPs) 1 ve 3 aktivasyonuna neden olur [Şekil 2]. Ek olarak, epitelyal kök hücrelerdeki doğrudan ve dolaylı hasar yenilenme kapasitesinde kayıp ile sonuçlanır. Bu karışık etkileşimler sonucunda epitelyum incelmeye başlar ve hastalarda mukozitin ilk semptomları ortaya çıkar. Mukotoksik KT'nin uygulanmasından yaklaşık 10 gün sonra epitelyum bütünlüğünde bozulma ve ülserasyon oluşur. Ülserasyon aşaması lamina propriadaki sinir sonlarının harabiyetinden dolayı çok ağrılıdır. Özellikle oral ülserlerde lezyona bakteriler kolonize olur ve bağ dokusuna penetre olarak diğer sitokinlerin salınımına neden olurlar. Ülserasyon aşamasında inflamatuvar infiltrasyon daha yoğundur ve makrofajlar, plazma ve mast hücrelerinden oluşur. Bakteri içeren eksudanın üzerini fibrinöz materyal kaplar ve psödomembranlar meydana gelir. Çoğu vakada KT uygulaması sonrası 3 haftaya kadar lezyonlar iyileşir. Sonuç olarak, epitelyal migrasyon, proliferasyon ve diferansiyasyon ile doku yenilenir, normal mikrobiyal flora kurulur. Bu durum, mezenkim ve endotelin de dâhil olduğu mukozanın bütün dokularında gerçekleşir (7,24).

KT'ye bağlı gelişen intestinal yüzey hasarı epitelyal kript hücre nekrozundan ziyade apoptozis ve kript hipoplazisi nedeniyle olmaktadır (25,26). Bununla birlikte, KT ve RT'ye karşı ince barsaktaki kriptler kalın barsaktaki kriptlerden daha fazla duyarlıdır. İmmunohistokimyasal incelemelerde, Bcl-2'nin kolon kriptlerinde çok fazla eksprese edildiği, ince barsak kriptlerinde ise az ya da hiç eksprese edilmediği belirlenmiştir (27). Radyasyonun etkisini inceleyen çalışmalarda, hasarın başlatıldığı apoptozise karşı ince barsağın kolona göre daha duyarlı olduğu ortaya konmuştur. Bu artmış duyarlılıkta ince barsak kriptlerinde anti-apoptotik özelliği olan Bcl-2 ekspresyonunun olmayışının katkısı gösterilmiştir (5,23,27,28). Ayrıca, KT ve RT P⁵³ bağımlı apoptozisi uyarmaktadır.

Ancak, ince barsak kriptlerinde kalın barsak kriptlerine göre P⁵³ bağımlı protein ekspresyonu belirgin olarak daha fazladır. Bu durum, KT ve RT'ye karşı ince barsak kriptlerinin daha duyarlı olmasıyla ilişkilendirilmektedir (5,23,28).



Şekil 1. Gastrointestinal mukoza hasarı gelişiminde beş faz modeli (9).



RT: Radyoterapi, KT: Kemoterapi, NF-κB: Nükleer faktör-kappa beta, TNF- α: Tümör Nekrozis Faktör alfa, IL-1β: İnterlökin-1 beta, MAPK: Mitojen aktive eden proteinkinaz, SKZ2: Siklooksijenaz 2, TK: Tirozin Kinaz, MMP1,3: Matriks metalloproteinaz 1,3.

Şekil 2. Mukozit patobiyolojisinde sinyal amplifikasyonu (7).

2.2.GASTROİNTESTİNAL MUKOZİTİN ÖNLENMESİ VE TEDAVİSİ

Yakın zamanda KT ve RT'ye bağı gelişen mukozitin önlenmesi ve tedavisiyle ilgili literatür bilgilerinin gözden geçirilmesiyle bu konuda tavsiye ve öneriler yeniden düzenlenmiştir. Buna göre gastrointestinal mukozit için temel barsak bakımı ve klinik uygulamada, yeterli hidrasyonun sağlanması ve geçici laktoz intoleransı ile patojen bakterilerin ortaya çıkışı açısından dikkatli olunması önerilmektedir. Siklofosamid, 5-flourourasil ve MTX gibi kemoterapötiklerin kullanımı sonrası oluşan epigastrik ağrının önlenmesinde ranitidin ve omeprazol gibi mide asit salgılanmasını azaltan ilaçlar tavsiye edilmektedir. Gastrointestinal mukozitin önlenmesinde sistemik glutatyonun kullanılması rutin olarak önerilmemektedir. Bununla birlikte, hematopoetik kök hücre nakliyle ilişkili yüksek doz KT ve standart doz KT'nin neden olduğu diarenin önlenmesinde loperamid yetersiz olursa, 100 µg ve üzeri dozlarda subkutan günde iki kez octreotid uygulanmasının faydalı olabileceği iddia edilmektedir (29).

Antioksidan olan folik asit, MTX'in etki mekanizmasıyla alakalı olarak ilacın yan etkilerinin azaltılması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle intestinal toksisitenin insidansını azaltmak amaçlı MTX ile folik asitin günlük kullanımı önerilmektedir (30,31). Ancak, folik asitin kullanımının MTX'in etkinliğini azaltıp azaltmadığı hala tartışmalıdır (32,33).

Yine de mukozit oluştuktan sonra her bir siklusda uygulanan KT ilaçlarının dozunu azaltmaktan başka etkili bir tedavi seçeneği yoktur, ancak bu hastanın remisyona girme şansını azaltabilir. Kemik iliği toksisitesi için kan transfüzyonu ve koloni stimule edici ajanların kullanımı gibi destek tedaviler ile müdahale edilebilirken, mukozit KT'nin etkinliğini sınırlayan çok önemli bir faktördür (24).

2.3. METOTREKSAT

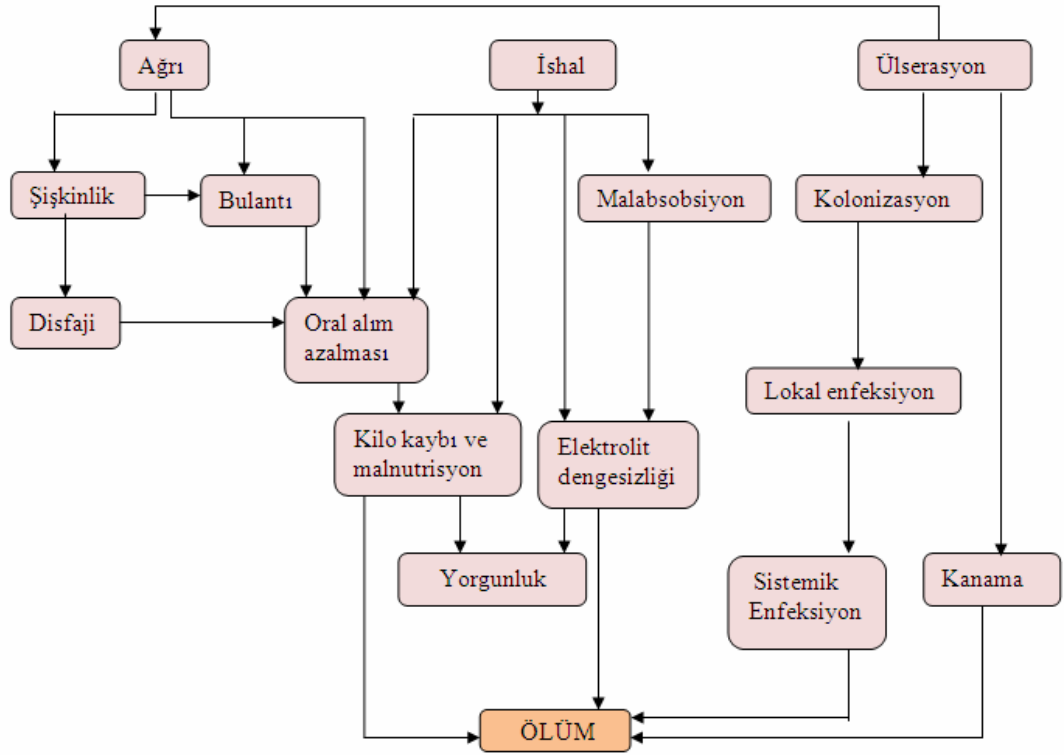
MTX lösemiler, çeşitli solid tümörler, psöriasis, romatoid artrit ve diğer bazı otoimmün hatalıkların tedavisinde 40 yıldan daha uzun süredir yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda sarkoidoz, inflamatuvar barsak hastalıkları ve vaskülitlerde de kullanılmaktadır. MTX, S fazındaki hücreleri etkileyen folat antagonisti antimetabolittir. Dihidrofolat analogu olan ilaç, hücre replikasyonunda anahtar enzim dihidrofolat redüktaz'a bağlanarak pürin ve primidin yapımı için gerekli tetrahidrofolat sentezini inhibe eder. Pürin ve primidin sentez inhibisyonu apoptozisle sonuçlanan DNA defektlerine yol açar (10,34). MTX'in aynı zamanda kaspaz aktivasyonuna bağlı mekanizma ile apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (35).

2.3.1. Metotreksat ve Gastrointestinal Toksisitesi

MTX'in sitotoksik etkisi kanser hücrelerine özelleşmiş olmadığı için gastrointestinal mukozada aktif olarak bölünen hücreler gibi, hızlı proliferasyonun olduğu normal doku hücreleri de etkilenir (10). Oluşan intestinal hasar ve enterokolit hastalarda ağrı, oral alım azalması, iştahsızlık, ishal, dehidratasyon, bunlara eşlik eden elektrolit dengesizliği, malabsorbsiyon, malnutrisyon ve kilo kaybına neden olabilir. Aynı zamanda, epitelyal proliferasyon ve enterosit fonksiyonu baskılanabilir ve mukozal bariyerin bozulmasına bağlı olarak bazen ölüme kadar ilerleyebilen barsak kaynaklı sepsis riski artabilir (5,10,21), [Şekil 3].

MTX uygulamasının gastrointestinal toksisitesinde en önemli etki kript hücre kaybı ve villus atrofi ile proksimal ince barsakta görülmektedir. MTX tedavisi apoptozisde artışa neden olmakta ve ratlarda uygulamadan 6 saat sonra pik seviyeye ulaşmaktadır. Apoptozis daha çok kriptlerde olur ve proliferatif hücre kaybı ve kript hipoplazisine neden olur (5,36).

MTX'e bağlı ince barsak hasarında oksidatif stresin, özellikle nötrofil infiltrasyonunun rol oynadığı gösterilmiştir (37). Aynı zamanda, kemirici modellerinde MTX'in neden olduğu mukozitin insanlarda görülen intestinal mukoza hasarına benzediği gösterilmiştir (38).



Şekil 3. KT'nin neden olduğu intestinal mukozitin semptomları ve klinik yansıması (29).

2.3.2. Metotreksat ve Karaciğer Toksisitesi

Akut lösemilerin tedavisindeki gibi MTX'in aralıklı yüksek doz kullanımı veya psöriazis tedavisindeki gibi uzun dönem MTX kullanımında progresif hepatik fibrosis ve siroza ilerleyebilen karaciğer hasarı oluşabilir. Düşük doz uzun dönem MTX tedavisi alan psöriasisli hastalarındaki siroz gelişme riski %7'dir. Takip edilen hastaların yaklaşık %8'de transaminazların normalin üç katı kadar yükseldiği gösterilmiştir (34). MTX'in neden olduğu toksisitenin, tedavinin süresi ve doz şeması, hastalığın tipi ve hastanın risk faktörleri ile birlikte genetik ve moleküler apoptotik faktörler gibi birçok faktörün etkileşimiyle oluştuğu düşünülmektedir (12).

Kronik MTX kullanımıyla ilgili karaciğer histolojisindeki temel yan etkiler, yağ infiltrasyonu, inflamasyon, hücrel nekroz ve sonuç olarak fibrosistir. Ancak, klinik ve biyokimyasal bulgular yıllarca sessiz kalabilir. Karaciğer toksisitesinin gösterilmesinin tek yolu karaciğer biyopsisidir ve genellikle MTX 10 yıl kullanıldıktan sonra ya da MTX toplam dozu 1,5-2,5 gramı geçtikten sonra önerilmektedir (34).

MTX'in neden olduğu hepatotoksisitenin tam mekanizması henüz açık değildir. Toksikiteyi açıklayacak birkaç mekanizma öne sürölmüştür. MTX temel metaboliti olan 7-hidroksimetotreksat'a karaciğerde dönüşmekte ve karaciğer hücrelerinde poliglutamad formunda depolanmaktadır. Uzun dönem MTX tedavisi poliglutamad formunun birikmesine ve folat seviyesinin azalmasına neden olmaktadır. Poliglutamad formunun seviyesinin artması, hepatotoksisitesinin önemli nedeni olarak düşünülmektedir. Bunun dışında, MTX sitozolik nikotinamid adenosin difosfat (NADP) dehidrojenaz ve NADP bağımlı malik enzimi inhibe etmekte ve hücre içi NADPH'ın azalmasına neden olmaktadır. NADPH, önemli bir sitozolik antioksidan madde olan indirgenmiş glutatyonun (GSH) devamlılığını sağlayan glutatyon reduktaz (GSSG-R) enzimi için gerekmektedir. MTX tedavisi nedeniyle GSH seviyesinin azalması, süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroklorik radikaller gibi reaktif oksijen radikallerine karşı hücreleri koruyan antioksidan savunma sisteminin etkinliğinin zayıflamasına neden olmaktadır (12).

2.4.SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller iyonlaşma ve eksitasyon sonucunda dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir veya daha fazla elektron bulunduran ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom veya moleküllerden meydana gelir. Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu normal metabolik olayların seyri sırasında meydana gelebildiği gibi, organizmanın KT gibi uyarılara maruz kalması ve organizmada bazı yabancı maddelerin (örneğin; ksenobiyotikler) metabolize olması sırasında da meydana gelebilir. Bu nedenle serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklı oluşabilir (39).

Tablo 1. Serbest radikal kaynakları (39).

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondriyal elektron transport zinciri	İlaç oksidasyonu (kemoteropatikler, Parasetamol, CCl ₄)
Kloroplast elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler: Ksantin oksidaz	Güneş ışığı
İndolamin dioksijenaz	X- ışınları
Triptofan dioksijenaz	UV- ışınları
Galaktoz oksidaz	Isı şoku
Siklooksijenaz	Glutasyonu okside eden maddeler
Lipooksijenaz	Ortam havası
Mono aminooksidaz	Sigara dumanı
Fagositik hücreler	Ozon
Nötrofiller	Kükürtdioksit
Monosit ve makrofajlar	Egzoz gazları
Eozinofiller	
Endotelial hücreler	
Oto-oksidasyon reaksiyonları (Fe ⁺² , epinefrin)	

Serbest radikaller son derece reaktif olduklarından diğer atom veya moleküllerle kolayca reaksiyona girerler. Çünkü eşleşmemiş elektronların, bir başka radikalın aynı durumdaki elektronu ile eşleşme veya bir elektron transferi reaksiyonu ile eşleşerek kararlı hale gelme eğilimleri vardır. Bu nedenle serbest radikaller elektron alıcı (oksitleyici) veya verici (redükleyici) özelliğe sahiptir. Serbest radikallerin oksijen molekülleri ile reaksiyona girmeleri sonucu çok hasar verici hidrojen ve önemli bazı organik moleküllerin peroksit radikalleri oluşur. Sonuçta olarak, oluşan serbest radikaller hedef DNA molekülünde oksidatif hasara yol açarlar (40).

2.4.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri (SOR), hidroksil, süper oksit, nitrik oksit ve lipid peroksid radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Serbest radikal aracılı doku hasarından sorumlu olan hidroksil radikalleri ($\text{OH}\cdot$) iki ana yolla oluşur. Bunlar reaktif oksijen metabolitleri (ROM) ve reaktif nitrojen metabolitleri (RNM) üzerinden oluşan radikallerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (40).

SOR içinde en önemlileri, süper oksit radikali (O_2^-), hidroperoksid radikali ($\text{HO}_2\cdot$), hidrojen peroksid (H_2O_2), hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)'dir (21). H_2O_2 ve $^1\text{O}_2$ tanımlamada bir serbest radikal olarak sayılmazlar, fakat serbest radikal özelliği gösterirler. Biyolojik açıdan diğer önemli serbest radikaller veya onların denklemleri ise lipid hidroperoksid (ROOH), lipid peroksid radikali ($\text{ROO}\cdot$), lipid alkoksi radikali ($\text{RO}\cdot$), nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) ve nitrojen dioksit (NO_2) gibi radikal türleridir. RNM, NO_2 , peroksinitrit (ONOOH), diazot trioksit (N_2O_3) ve hidrojen nitrit (HNO_2) dir. Bu radikallerin hepsi oksidatif stresin bir parçasıdır (40).

2.4.2. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, SOR'in, hücre membranındaki doymamış yağ asitleri, fosfolipidler ve glukolipidlerin peroksidasyonuna neden olma süreci olup, bu süreç sonunda ciddi biçimde membran hasarı ve fonksiyon kaybı oluşur (38). İnsanlarda birçok hastalığın etyopatogenezinde, lipid peroksidasyonunun uyarılması ile organ ve dokularda açığa çıkan hücre membranı hasarı suçlanmaktadır. Lipid peroksidasyonuna neden olan SOR eksojen ya da endojen kaynaklı olabilir (41).

KT, RT, iskemi ve bazı ilaçlarla ortaya çıkan SOR lipid peroksidasyonuna neden olmakta ve bunun sonucunda aldehitler, hidrokarbon gazları ve malondialdehit (MDA) oluşmaktadır. Mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşik olan MDA, doku, kan komponentleri ve vücut sıvılarında ölçülerek lipid peroksidasyonunun iyi bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (41,42).

MDA, üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin SOR ile peroksidasyonu sonucunda meydana gelir ve diğer lipid peroksidasyon ürünleri ile uzak bölgelere diffüze olabilir. MDA ve diğer ürünler, hücrelerde geçirgenlik ve inflamasyon artışına, araşidonik asid salınımına ve bunun sonucu olarak organellerde şişme ve membran rüptürüne neden olmaktadır. Aynı zamanda, DNA’da bazlar ile reaksiyona girerek zincir kopmalarına yol açmaktadır (42).

2.5. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLER

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar, bu olaya da antioksidan savunma sistemleri denmektedir. Antioksidan sistemler tür, organ, yaş, cinsiyet ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Antioksidan sistemler hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır (39).

Normal şartlar altında SOR üretimi ve yıkımı arasında bir denge vardır. Organizmada oluşan oksijen radikallerine karşı koruyucu sistem olan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin radikaller lehine kayması oksidatif stres olarak adlandırılır. Hücreleri oksidatif streslere karşı koruyan antioksidan sistem enzimatik ve nonenzimatik olarak ikiye ayrılır (43). Tablo 2’de antioksidanlar gösterilmiştir.

Tablo 2. Antioksidanlar (43).

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz	Glutatyon	Albümin
Katalaz	α -Tokoferol(vitamin E)	Seruloplazmin
Glutatyon peroksidaz	Askorbat (vitamin C)	Transferrin
Fosfolipid hidroperoksit	β -Karoten	Ferritin
Glutatyon S-transferaz	Flavonoidler	Laktoferrin
Glutatyon redüktaz	Ürat	Melatonin
	Bilirubin	Sistein

2.5.1. Süperoksit Dismutaz: SOD aerobik hücrelerde oksidatif strese karşı temel savunma sistemi olarak bilinen bir metalloenzimdir. SOD, SOR'nin en önemli üyesi olan süperoksit anyonunun (O_2^-) enzimatik dismutasyonunu gerçekleştirir. Böylece O_2^- , hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşür. Bu yolla SOD oksijen toksisitesinden koruyucu sistemin en önemli ve ilk basamağında rol oynar. H_2O_2 toksik bir üründür. Oluşan H_2O_2 , CAT ve GSH-Px tarafından oksijen ve suya parçalanmaktadır (42).

2.5.2. Katalaz: CAT antioksidan sistemin üç önemli enziminden biri olup yapısında demir içeren bir tetramerdir. CAT, H_2O_2 'i doğrudan parçalayarak etki eder. CAT H_2O_2 'e karşı rölatif olarak düşük afinite gösterdiğinden, CAT aktivitesi H_2O_2 'in yüksek konsantrasyonlarında daha önemli hale gelmektedir. Düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında, metil veya etil hidroperoksitler, metanol, etanol, fenol gibi küçük moleküllü elektron vericilerini indirger. Enzimin bu iki tür aktiviteden hangisini göstereceği, başta H_2O_2 'in üretim hızı olmak üzere oluşan biyomoleküllerin tür ve miktarına bağlıdır (44).

2.5.3. Glutatyon Peroksidaz: GSH-Px, O_2^- 'un SOD tarafından giderilmesi sonucu ortaya çıkan toksik ürün H_2O_2 ve lipid hidroperoksitlerinin redükte GSH varlığında redüklenmesi reaksiyonunu katalizleyen enzimdir (38). GSH-Px, başta karaciğer olmak üzere eritrositler, kalp, akciğer, böbrek, göz ve beyin gibi dokularda bulunmaktadır. GSH-Px'in en önemli özelliklerinden birisi selenyum bağımlı olmasıdır. Aynı zamanda, GSH-Px H_2O_2 'in düşük konsantrasyonlarına daha hassastır (45).

2.6. PROPOLİS

2.6.1. Propolisin Kaynağı ve Kovanda Kullanımı

Propolis kelimesi yunanca şehrin savunulması (pro-ön, savunma, polis-şehir) anlamına gelmektedir (46). Bal arıları propolisi ağaç kabuklarındaki çatlaklar ile yaprak tomurcuklarından toplamaktadır. Reçine çiğnenmekte, tükürük enzimleri eklenmekte ve kısmen sindirilmiş materyal, balmumu ile karıştırılarak kovanda kullanılmaktadır (46,47).

Propolisin üretimi için arılar tarafından kullanılan materyal, bitkilerin yara bölgelerinden salgılanan maddeler olabildiği gibi, yapraklardaki lipofilik materyaller ile reçine, müsilaj, zambak gibi maddeler de olabilmektedir (48).

Propolisin kaynağını oluşturan bitkiler kavak (*Populus spp.*), kayın (*Fagus sylvatica*), huş (*Betula alba*), kestane (*Castanea sativa*), atkestanesi (*Aesculus hippocastanum*), akça ağaç (*Alnus glutinosa*) ve çeşitli kozalaklı ağaçlardır (46).

Bal arıları propolisi, kovanda oluşan çatlak ve yarıkların kapatılması, giriş deliğinin küçültülmesi, yavru yetiştirmek üzere hazırlanan petek hücrelerinin cilalanması, kovanda öldürülen yabancı böceklerin kokuşmasının engellenmesi ve bakteriyel kontaminasyonun önlenmesi gibi pek çok amaçla kullanılmaktadırlar (46).

2.6.2 Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Yapısı

Propolis reçineli ve yapışkan bir madde olup rengi kaynağına ve depolama süresine bağlı olarak sarı-yeşilden koyu kahverengiye kadar değişebilmektedir. Soğukta sert ve kırılgan, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan bir yapısı vardır (46).

Ham propolisin bileşimi kaynağına göre değişmekle birlikte, genellikle %50 reçine, %30 mum, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 oranında aminoasit, mineral, vitaminler içeren çeşitli maddeler ile bioflavonoidler olarak bilinen bileşiklerin yüksek aktiviteli karışımından oluşmaktadır (47).

Dünyanın değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinde 200'den fazla kimyasal bileşik tanımlanmıştır (48). Propolis; polifenoller (flavonoid aglikonlar, fenolik asitler ve onların esterleri, fenolik aldehydler, alkoller ve ketonlar), seskuiterpen kinonlar, kumarinler, steroidler, aminoasitler ve inorganik bileşikler gibi çeşitli kimyasal bileşikler içermektedir (47,48).

Propolisin yapısında pinosembren, akasetin, krisin, rutin, kateşin, naringenin, galangin, luteolin, kamferol, apigenin, mirisetin, kuarsetin gibi flavonoidlerin yanı sıra kafeik asit ve sinamik asit gibi fenolik asitler de saptanmıştır (47,48). Ayrıca propoliste magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), iyot (I), potasyum (K), sodyum (Na), bakır (Cu), çinko (Zn), manganez (Mn) ve demir (Fe) gibi mineraller ile A, B₁, B₂, B₆, C ve E vitaminleri ile çok sayıda yağ asidi tanımlanmıştır (48).

Propolis toplamak için kullanılan bitki kaynağı propolis kimyasal yapısını belirlemektedir. Propolis kimyasal bileşimi toplandığı alanın vejetasyonuna bağlıdır (47). Propolis toplanma sezonu da, aynı bölgeden toplanan propolis kimyasal yapısını etkileyebilmektedir (49). Örneğin, Akdeniz Bölgesi'nden (Sicilya ve Adriyatik kıyıları) toplanan propolis tek tip özellik gösterip, temel bileşeni diterpenik asitler (50) iken, Brezilya'da 12 farklı tipte propolis tanımlanmıştır (51). Karasal iklime sahip bölgelerden toplanan propolis (Asya, Avrupa, Kuzey Amerika vb.) başlıca kaynağının kavak bitkisi tomurcukları olduğu belirlenirken, bu propolis çeşitli flavonoidleri içeren fenolik bileşikler, aromatik asitler ve onların esterleri bakımından zengin olduğu belirlenmiştir (47). Kavak ağacı karasal bölgelerde yaygın olarak gözlenirken, tropik ve subtropik bölgelerde yetişmemektedir. Bu sebeple bu bölgelerde bal arıları başka propolis kaynaklarını tercih etmektedirler. Böylece tropik bölgelerde üretilen propolis kimyasal yapısı kavak propolisinden tümüyle farklı olmaktadır (52). Örneğin, Brezilya propolisinin ana bitki kaynağı *Baccaris dracunculifolia*'dır ve bu propolis tipinde temel kimyasal bileşik sınıfı prenillenmiş p-kumarik asit ve asetofenon türevleri olup kavak tipi propolisten tamamen farklı olarak diterpenler, lignanlar ve flavonoidler içerdiği belirlenmiştir (52). Küba propolisinin ana bileşeni ise poliizoprenillenmiş benzofenonlardır ve bu yapı Küba propolisini Avrupa ve Brezilya propolislerinden farklı kılmaktadır (52). Ayrıca, *Clusia minor*, *Clusia major* (Guttiferae), *Araucaria heterophylla* ve farklı *Baccharis* türlerinin Venezüella ve Brezilya'dan toplanan propolis önemli kaynakları olduğu bildirilmiştir. Bu bitkilerin tropikal propolislerde daha önce rapor edilen poliprenillenmiş benzofenonlar ve çeşitli diterpenler içerdiği belirlenmiştir (52-54). Benzer şekilde klerodan- ve çeşitli labdan-tipi diterpenoidler karasal iklim propolislerinde bulunamamıştır (52). Flavonoidlerin ise tropikal propolislerde de mevcut olduğu belirlenmiştir.

Tropikal bölgelerden toplanan propolis karasal iklime sahip bölgelerden toplanan propolisten farklı kimyasal yapı göstermesinin nedeni vejetasyon farklılığıdır (52). Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış propolislerin ana bileşenlerinin naringenin, galangin, krisin, pinobaksin, kuarsetin gibi flavonoidler ve kafeik asit gibi fenolik asitlerden oluştuğu gösterilmiştir (55). Genel olarak propolis kimyasal yapısı Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Propolisin kimyasal yapısı (47).

Bileşik sınıfı	Bileşen grupları	Miktarı
Reçine	Flavonoidler, fenolik asitler ve esterleri	%45-55
Mumlar ve yağ asitleri	Balmumu ve bitkisel orijin	%23-35
Esansiyel yağlar	Uçucular	%10
Polen	Proteinler (16 serbest aminoasit >%1)	%5
Diğer organik ve mineral maddeler	Çoğunlukla demir ve çinko 14'ü mineral, ketonlar, laktonlar, kinonlar, steroidler, benzoik asit, vitamin ve şekerler	%5

2.6.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri

Propolis çok eski zamanlardan beri halk tıbbında kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda propolisin su, metanol, etanol, eter ve yağ ekstraktlarının antibakteriyel, antifungal, antitümoral, antioksidan, immünomodülatör ve diğer faydalı biyolojik etkileri çok sayıda araştırmacı tarafından ispatlanmıştır (56). Araştırmalarda en çok kullanılan propolisin etanolik ekstraktının, gram pozitiflere daha belirgin olan antibakteriyel (15,16,57,58), en fazla *Candida albicans*'a olmakla birlikte *Candida* türleri ve dermatofitlere karşı antifungal (16,59-64), influenza (16), herpes simpleks ve reovirüs üzerine antiviral (66), antiinflamatuvar (18,67), lokal anestezik (68), antioksidan (16,69-72), nöroprotektif (71), radyoprotektif (73), kardioprotektif (74), hepatoprotektif (75), immünostimülatör (19,76), sitostatik (50), yara iyileşmesi (18,77) ve gastrik ülser üzerine olumlu etki gösterdiği (78) belirlenmiştir.

Farklı orijine sahip propolis örneklerinin biyolojik aktiviteleri ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Brezilya propolisinin antibakteriyel (79,80), antifungal (81), antianjiojenik (82), sitotoksik (53), antiülser (83), hepatoprotektif (84) analjezik ve antiinflamatuvar aktivitesi (85) belirlenirken, Bulgaristan propolisinin antifungal (82) ve bakterisidal (86) aktivitesi belirlenmiştir.

Günümüzde Türkiye propolisinin, antifungal (87-90), antibakteriyel (89-92), antioksidan (70, 93), antikarsinojenik (94), yara iyileşmesini hızlandırıcı (77) ve genotoksik (95) etkisi gibi bazı biyolojik aktiviteleri ortaya konmuştur.

Propolisin önemli bir bileşeni olan flavonoidlerin, antiinflamatuvar, antioksidan, serbest radikal temizleyici, antitümoral, hepatoprotektif, vasküloprotektif, antiülser, intestinal motilite ve sekresyon inhibisyonu, antiosteoprotik, antialerjik, antimikrobiyal ve immünomodülatuar özellikleri rapor edilmiştir (96).

Propolisin polifenolik birleşenlerinden kimyasal ismi 3,4 hidroksisinnamik asit olan kafeik asit (CA), hidroksisinnamatların biyolojik olarak aktif üyelerinden birisidir (43). CA'nın güçlü antibakteriyel (97), antioksidan (72,98), nöroprotektif (72), antitümöral ve immünmodulator (99,100) özellik gösterdiği, kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in ise antioksidan ve serbest radikal temizletici (101,102), anti-inflammatuvar (103,104), antikarsinojenik (103,105,106), vazodilatör (107), immünmodulator (99,100) ve nöroprotektif (108) etki gösterdiği belirlenmiştir.

Değişik ülkelerden elde edilen propolisin farklı kimyasal yapıya sahip olması, onların farklı biyolojik aktiviteye sahip olmasına neden olmaktadır. Ancak bu durum her farmakolojik özellik için aynı değildir. İlginç bir şekilde, karasal ve ekvatorial bölgeleri içine alan farklı bölgelerden toplanan ve farklı kimyasal yapıya sahip olan propolislerin benzer biyolojik aktiviteler gösterdiği bulunmuştur (44,53). Propolis kovanda infeksiyonlardan korunma amaçlı kullanılmaktadır ve değişik propolis tiplerinin hem antibakteriyel, hem de antifungal özellik göstermesi doğaldır. Bu sebeple gözlenen aktivitenin sadece belirli bir bileşik grubuna atfedilmesi doğru değildir. Nitekim propolisin antibakteriyel aktivitesinden sorumlu bileşik grupları; kavak tipi propoliste flavonlar, flavononlar, fenolik asitler ve onların esterleri iken, *Baccharis* tipi (Brezilya) propoliste prenillenmiş p-kumarik asitler ve diterpenler ve kırmızı küba propolisinde prenillenmiş benzofenonlardır (44). Bu nedenle propolisin biyolojik özellikleri konusunda yapılan çalışmalara antibakteriyel özelliği öncülük etmiştir (44).

2.6.4. Propolisin Biyotransformasyonu ve Toksisitesi

Propolisin metabolize edilmesi hakkında detaylı literatür bilgisi olmamasına karşın, içerdiği bileşiklerin bir kaçının metabolizmaları bilinmektedir. Bunlardan özellikle en iyi bilineni flavonoidlerdir. Flavonoidler barsaktan emildikten sonra büyük oranda karaciğer daha az oranda barsak duvarı ve böbrekte metabolize olurlar (96). Ham propolisin toksik etki göstermediği düşünülmeyle birlikte, kimyasal yapısının

değişken olması ve standardizasyonunun tam olarak yapılmamış olması bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (53). Arvouet-Grand ve ark. (109), propolis ekstraktının oral LD₅₀ dozunun farelerde 7340 mg/kg dan fazla olduğunu, Hrytsenko ve ark. ise farelerde oral LD₅₀ dozunun 2050mg/kg ve LD₁₀₀ dozunun ise 2750 mg/kg olduğunu bildirmişlerdir (110). Ghısalbertı ve ark. ise propolisin eter solüsyonunun farelerde 350 mg/kg dozda toksik olmadığını ve hem alkol hem de eter solüsyonunun LD₅₀ dozunun 700 mg/kg olduğunu ifade etmiştir (111). Aynı araştırmacı kedilere subkutan yolla 100 mg/kg verilen propolisin tolere edilebildiğini bildirmiştir. Dobrowolski ve ark. farelere oral olarak 700 mg/kg oranında propolis verildiğinde propolisin iyi tolere edildiğini ve 48 saatlik gözlem süresi boyunca ölüm olmadığını bildirmişlerdir (112). Propolisin önemli bileşenlerinden oluşan flavonoidlerin, 250mg ağırlığındaki ratlar için LD₅₀ dozunun 8000-40.000 mg/kg olduğu belirtilmiştir (113). Arvouet-Grand ve ark. propolis ekstraktının ve propolis merheminin tavşanları irrite etmediğini belirtmişlerdir (108). Kleinrok ve ark. BalbC fareler ve Wistar ratlarda propolisin intraperitoneal (ip) alt eşik dozunun sırasıyla 10-100 mg/kg ve 1-400 mg/kg olduğunu rapor etmiştir (114). Brezilya ve Çin propolislerinin etanolik ekstraktlarından hazırlanan süspansiyonların 5 haftalık farelere 2230-4000 mg/kg oranında verildikten iki hafta sonrası ölüm gözlenmediği, vücut ağırlıklarının arttığı ve nekroskopide anormallikler gözlenmediği bildirilmiştir (115). Hollands ve ark. Wistar ratların içme suyuna 30 gün süreyle 1875 mg/kg/gün, farelerin ise 60 gün süreyle 2470 mg/kg/gün propolis eklendiğinde, kontrol grubuna göre hayvanların klinik görünüşü, davranış, idrar çıkışı, vücut ağırlığı ve mortalite oranlarında değişikliğe yol açmadığını bildirmişlerdir (116). Ikeno ve ark. ratların içme suyuna 63 gün süresince 1 mg/ml (150 g ağırlığındaki rat için 150 mg/gün ya da 1000 mg/kg/gün) propolis eklenmesinden sonra serum glikozu ya da amilaz aktivitesi ile pankreas, parotis bezi ve karaciğer dokularında herhangi bir değişikliğe yol açmadığını bildirmişlerdir (117).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi 'inde (DEKAM) Eylül 2006 - Eylül 2007 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan deney hayvanları DEKAM tarafından üretildi. Biyokimyasal değerlendirmeler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında, histolojik değerlendirmeler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.1. HAYVANLAR

Çalışmaya Erciyes Üniversitesi hayvan üretim evinden temin edilen, 48 adet, 230-310 gr ağırlığında erkek Wistar cinsi rat alındı. Ratlar, havalandırma şartları sağlanmış, güneş ışığı alan odalarda ve her birinde dört ratın bulunduğu özel kafeslerde tutuldular. Çalışmaya başlamadan önceki yedi gün süresince ratlar oda sıcaklığında ($22\pm2^{\circ}\text{C}$), 12 saat doğal aydınlık-karanlık periyodunda barındırıldılar. Beslemek için piyasada olan standart diyet ve gerektiği kadar çeşme suyu verildi. Sular her gün değiştirildi ve kafes temizliği gün aşırı yapıldı. Standart yedi günlük alışma periyodundan sonra çalışmaya başlamadan 12 saat önce benzer metabolik durumu sağlamak için su kısıtlaması yapmaksızın yiyecek kısıtlaması yapıldı.

3.2. PROPOLİSİN KAYNAĞI VE KİMYASAL ANALİZİ

Propolis Kayseri'nin Bünyan ilçesinde yoğun kavak ağaçlarının bulunduğu bölgede yer alan kovanların çerçevesi üzerlerinden 2004 yılı eylül ayında toplatılarak satın alınmıştır. 30g propolis %80 etilalkol ile 3 gün boyunca ekstrak edilmiştir. Ekstrak Whatmann filtre kâğıdından süzölmüştür. İşlem 2 kez tekrar edilerek özütler

birleştirilmiştir. Elde edilen özütün alkolü vakum evaporatörde uçurularak saf propolis kullanıma hazır hale getirilmiştir. Bir mg propolis ekstraktı %1 trimetilklorosilan (TMCS) içeren beherde 50 µl pyridine + 100 µl bis-trimetilsilil trifloroasetamide (BSTFA) ile 100°C de 30 dakika reaksiyona bırakılarak gaz kromatografında incelenmek üzere hazırlanmıştır. Propolis ekstraktının bileşenlerinin kimyasal analizi Bankova ve ark. geliştirdiği metot temel alınarak yapılmıştır (118). Bir µl örnek gas kromatografi-kitle spektrometriye (GK-KS) enjekte edilerek analiz edilmiştir. Analiz Agilent Gas Kromatograf 6890, 5973 kitle spektrometre ile yapılmış olup, 30 m uzunluk, 0,25 mm i.d, 0,25µm film kalınlığında kapiller kolon kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 10 ml/dk akış hızında helyum gazı kullanılmıştır. Propolisin analizinde başlangıç kolon sıcaklığı 100°C (5dk) olup, sonra sıcaklık 150°C ye çıkarılmıştır. Daha sonra iki dakika 140°C de tutulmuştur. Son olarak ise ikişer °C artırılarak 280°C'ye çıkartılıp 60 dakika 280°C de tutulmuştur. Analiz sonuçlarında belirlenen pik değerler referans kütüphanesi ile tanımlanmıştır. Propolisin etanolik ekstrakt örneklerinin bileşenleri Tablo 4'de verilmiştir.

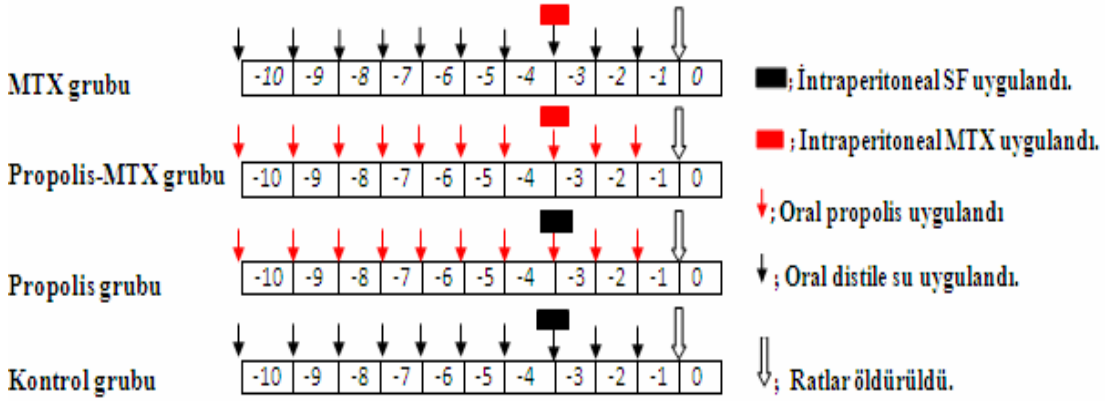
Tablo 4. Kayseri propolisinin etanol ekstrakt örneğinin kimyasal bileşenleri (119)

	TIC%	RT dak		TIC%	RT dak
Bileşikler			Bileşikler		
<i>Yağ ve aromatik asitler</i>			<i>Flavonoidler</i>		
9-Okadesenoik asid	1.46	25.22	Krisin	10.62	34.38
2-Propenoik asid	4.88	27.53	<i>Esterler</i>		
Kafeik asid	3.45	29.19	Sinnamil sinamat	3.21	30.00
<i>Alkol, keton ve terpenler</i>			<i>Diğerleri</i>		
2-Naftalenmetanol	0.9	15.24	1-Fenatrenkarboksialdehid	0.92	25.97
2-Propen-1-on	8.81	29.85	Benzenamin	1.67	26.60
4H-1-Benzopiran-4-on	6.73	31.29	Eikosan	3.88	37.15
Kumaran-5,6-diol-3-on	0.87	33.53	Heptakosan	7.97	34.32
Benzofuran-3-on	2.94	35.19	Siklotrisiloksan	0.80	35.96

TIC/%: Total iyon akışının yüzdesi, RT: Hafıza zamanı.

3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI VE PROPOLİS EKSTRESİNİN İLE METATREKSATIN UYGULANMASI

Deneysel çalışma kırk sekiz Wistar-Albino erkek rattan oluştu ve –randomize- her biri 12 hayvandan oluşan dört gruba bölündü [şekil 4].



Şekil 4. Çalışmanın şematik olarak ifade edilmesi.

MTX grubu: On gün –plasebo- distile su oral verildi ve sekizinci günde tek doz MTX (20 mg/kg, ip) uygulandı.

Propolis-MTX grubu: On gün propolis (100mg/kg vücut ağırlığı) oral olarak verildi ve sekizinci günde tek doz MTX (20 mg/kg, ip) uygulandı.

Propolis grubu: 10 gün propolis (100mg/kg vücut ağırlığı) oral olarak verildi ve sekizinci günde MTX yerine ip serum fizyolojik uygulandı.

Kontrol grubu: 10 gün plasebo ve sekizinci günde MTX yerine ip SF uygulandı.

Propolis solüsyonu ve eşit miktarda plasebo (oral distile su) çalışma süresince her gün aynı zamanda oral yolla 3 inç-16 gauge gavaj tüpü ile verildi. İlaçların dozu ve uygulama şekilleri daha önceki deneysel çalışmalar esas alınarak belirlendi (120-123).

3.4. ÖRNEKLERİN ALINIŞ ŞEKLİ VE SAKLANMASI

MTX uygulamasına bağı en şiddetli mukoza hasarının ortalama 72 saat sonra oluştuğı gösterildiğı için (124), çalışmanın 8. günü ip MTX yapıldıktan 72 saat sonra tüm ratlar genel anestezi -ip 50mg/kg ketamin- uygulaması ile öldürüldü. Öldürülmeden önce intrakardiyak 4-5cc kan örneğı alındı ve kan numuneleri 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazma, oksidatif stres belirteci MDA ve antioksidan enzimlerden GSH-Px ve SOD aktiviteleri çalışılana kadar -80°C’de saklandı.

Öldürüldükten hemen sonra ratların karaciğer ve ince barsakları çıkarıldı. İnce barsaklar buzlu izotonik saline solüsyonunda yıkandıktan sonra histolojik inceleme için formolin içine konuldu. Karaciğer dokusu, oksidatif stres belirteci MDA ve antioksidan enzimlerden GSH-Px, SOD ve CAT aktiviteleri çalışılana kadar -80°C’de saklandı.

3.5. KARACİĞER DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI

Karaciğer doku örnekleri çalışma gününe kadar -80°C’de dondurularak saklandı. Karaciğerden doku homojenatlarının hazırlanması sırasında yapılan tüm işlemler buz içerisinde ve 4°C de yürütüldü. Homojenizasyon işlemi, teflon uçlu homojenizatör ile gerçekleştirildi.

Doku homojenatlarıyla ilgili diğeri metodolojik özellikler ise şu şekilde idi:

1. Karaciğer dokusu çözdürüldükten sonra 3 kez soğuk su ile yıkandı. Hassas terazi ile 1.0 g ağırlığında tartılan yaş doku örnekleri 0.01 NHCl ile hazırlanan 5,0 ml %5’lik TCA çözeltisi ile homojenize (Jankee Kunkel IKA-Laboortechnick Ultra-Turrax T25) edildi.

Doku homojenatı (1/5; w/v), 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüje edilerek (Sığma 3K30 Laborzentrifugen GmbH, West Germany) elde edilen proteinsiz-asit süpernatant aynı gün total ve okside GSH tayininde kullanıldı (125,126).

2. Buzu çözdürülen başka bir karaciğer dokusu hassas terazi ile 1,5 g ağırlığında tartıldıktan sonra, 0.25g yaş doku/ml homojenat olacak şekilde 0.015 M PBS (pH:7,4) ile homojenize edildi (127).

3. Aynı homojenatın (1 /4; w/v) geri kalan kısmı, 0.015M PBS (pH:7,4) ile 1/10 (w/v) oranında dilüe edildi. Bu şekilde hazırlanan homojenat, 3000 rpm'de 30 dakika santrifüje edildi ve elde edilen süpernatanın bir kısmı aynı gün MDA ölçümünde kullanıldı (128).

4. Süpernatanın diğer kısmı, 13.000 rpm'de 30 dakika süre ile santrifüje edildi. Elde edilen süpernatın, SOD, GSH-Px, CAT aktivitelerinin ölçümünde kullanılmak üzere alikotlar halinde -80°C'de dondurularak saklandı (128).

3.6. MALONDİALDEHİT TAYİNİ

Lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan MDA'nın ölçümünde kullanılan spektrofotometrik metodların büyük bir kısmı, MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek, 532 nm dalga boyunda maksimum absorbanı veren pembe renkli bir kompleks oluşturması prensibine dayanmaktadır (129).

Karaciğer doku homojenatı ve plazma MDA tayininde, Ohkavva ve ark.'nın (130) geliştirdiği metot kullanıldı. Süpernatantlardan 0,1 ml alınıp kapaklı cam tüplere konuldu. Üzerlerine sırasıyla 0,1 ml sodyum dodesil sülfat (% 8,1), 0,75 ml asetik asit (%20: pH=5), % 0,8 TBA ve 0,3 ml distile su eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra ağızları sıkıca kapatılan tüpler, kaynar su banyosunda 60 dk kaynatıldı. Musluk suyu ile soğutulan tüplere, 0,5 ml distile su ve 2,5 ml n-butanol/piridin (15:1) karışımı eklenerek vorteksle iyice karıştırıldı.

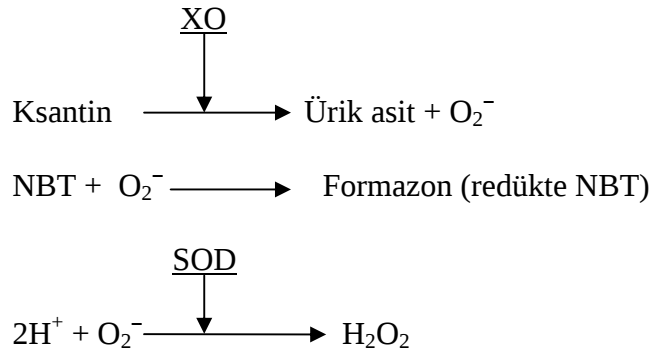
Tüplerin 4°C'de 4000 rpm'de 15 dk santrifüje edilmesi ile elde edilen pembe organik fazın absorbanı, 532 nm'de, distile su ile aynı şekilde çalışılan köre karşı ölçüldü. Değerlendirme standart eğri üzerinde yapıldı. Standart eğriden elde edilen karaciğer doku homojenatı ve plazma MDA seviyeleri Lowry yöntemine göre (131) sırasıyla nmol /mg protein ve nmol/ml olarak verildi.

3.7. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Çalışmaya alınan ratların karaciğer doku homojenatı ve plazma SOD aktivitesi tayininde Sun ve ark. (132) tarafından geliştirilen metot kullanıldı.

Metodun prensibi; ksantin oksidaz (XO) ile ksantin oksidasyonu sırasında açığa çıkan süperoksit anyonu (O_2^-), nitroblue tetrazolium (NBT) gibi boyar maddeleri redükleyerek formazonları oluşturmaktadır. O_2^- 'un H_2O_2 'e dismutasyonunu sağlayan SOD varlığında, XO reaksiyonları ile üretilen O_2^- sürekli tüketileceğinden, NBT ile reaksiyona giren O_2^- miktarı azalacak ve bu yolla formazon oluşumu önlenecektir.

SOD aktivitesi, XO'nun katalizlediği tepkimede, NBT redüksiyonunun inhibisyon derecesine bağlı olarak ölçülebilir. SOD aktivitesi yükseldikçe NBT redaksiyonu ile formazon oluşumu azalacaktır.



Çalışma: SOD aktivitesi tayin edilecek her numune için, toplam hacim 2.45 ml olacak şekilde, aşağıdaki konsantrasyonlarda bir deney karışımı hazırlandı:

0,3mM Ksantin	1,0 ml
150 μ M NBT	0,5 ml
0,4M sodyum karbonat	0,3 ml
0,6 mM EDTA	0,5 ml
<u>1gr/L BSA</u>	<u>0,15 ml</u>
Deney karışımı	2,45 ml

Deney karışımı pipetlenen numune tüplerinin üzerine, plazma ve karaciğer doku homojenatlarından elde edilen 0,5 ml dilüe süpernatant ve deney karışımı içeren kontrol tüpüne, 0,5 ml 0.01M fosfat tamponu (pH: 7,0) ilave edildi. Deney tüpleri 25°C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra, her birinin üzerine eşit zaman aralıkları ile 0.05 ml 167 U/L XO eklenerek reaksiyon başlatıldı. Tüpler 25 °C’de 20 dakika süreyle tekrar inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, yine eşit zaman aralıkları ile tüplere 1 ml 0,8 mM CuCl₂ ilavesi ile reaksiyon durduruldu. Numune ve kontrol tüplerinde, formazon oluşumundan kaynaklanan renk şiddeti, 560 nm dalga boyunda, distile su körüne karşı spektrometrede okundu. SOD içermeyen kontrol tüpünde, maksimum formazon oluşumu (Optik Dansite (OD): 0.250) gözlemlendi.

Standart serinin hazırlanması: SOD (3300 Ü/mg solid/mg protein), 0,6 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde, distile su ile çözüldü. Bu stok standart 0.01 M fosfat tamponu ile dilüe edilerek, deney ortamında sırasıyla 6.25; 12,5; 25; 50; 100 ng konsantrasyonlarında olacak şekilde, SOD çalışma standartları hazırlandı ve numune gibi çalışıldı.

Hesaplama: Standart seri ve numune tüplerinde % inhibisyon değerleri aşağıdaki formülle hesaplandı;

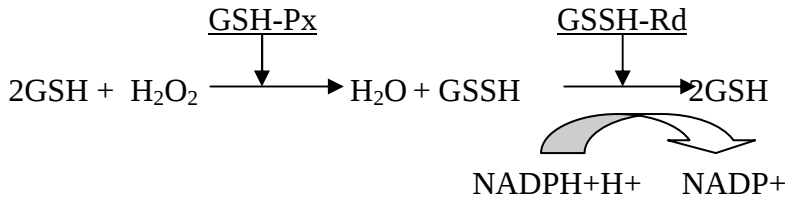
$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{kontrol OD} - \text{Numune OD}) \times 10}{\text{Kontrol OD}}$$

Standart seri için hesaplanan % inhibisyon değerlerine karşılık gelen SOD konsantrasyonları kullanılarak; SOD tarafından NBT redüksiyon hızının inhibisyon grafiği elde edildi. Grafik yardımı ile numunelere ait % inhibisyon değerlerinde ünite SOD değerleri hesaplandı. Bu değerler metodun uygulanması sırasında kullanılan dilüsyon faktörleri ile çarpılarak numunelerin gerçek SOD ünitelerine ulaşıldı. Karaciğer doku homojenatı ve plazma protein miktarları da tayin edildi (131) ve SOD aktivitesi spesifik aktivite cinsinden sırasıyla Ü/ mg protein ve Ü/L olarak verildi.

3.8. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Karaciğer doku homojenatı ve plazma GDH-Px aktivitesi, Paglia ve Valentine'nin birleşik enzimatik yöntemi kullanılarak tayin edildi (133).

Metodun prensibi; GSH'nin H_2O_2 ile oksitlenmesini katalizleyen GSH-Px reaksiyon hızının, GSSG-Rd reaksiyonu sırasında tüketilen NADPH konsantrasyonu üzerinden ölçülmesi esasına dayanmaktadır.



Birleşik enzimatik reaksiyonlarla GSH konsantrasyonu sabit tutulduğundan GSH-Px aktivitesi, UV-spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda, NADPH'ın NADP'a dönüşümü sırasında gözlenen OD düşüşü üzerinden doğrudan tayin edilebilir.

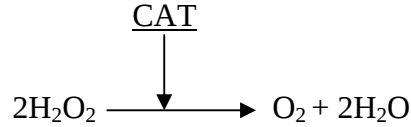
Hazırlanan deney karışımını içeren tüplerin üzerine 0.05ml numune doku süpernatanı ilave edildi ve tüpler 25 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Quartz küvetlere aktarılan inkübasyon karışımları üzerine 0,1 ml 2,2 M H_2O_2 pipetlenerek reaksiyon başlatıldı ve UV-spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda, distile su körüne karşı OD'deki düşüş 4 dakika süre ile izlendi. Ayrıca GSH'nın nonenzimatik oksidasyonunu tayin etmek için, numune yerine distile su kullanılarak (kontrol), çalışma tekrarlandı.

Hesaplama: Her numune ve kontrol tüpü için 2. ve 4. dakika değerleri kullanılarak $\Delta OD/dk$ değerleri hesaplandı. Daha sonra numune $\Delta OD/dk$ değerlerinden kontrol değerleri çıkarılarak net $\Delta OD/dk$ değerleri bulundu.

GSH-Px ünite ($\ddot{U}/ml$) değerleri, metodun uygulanması sırasında yapılan işlemlere karşılık gelen dilüsyon faktörleri ile çarpılarak gerçek GSH-Px aktiviteleri bulundu. Karaciğer dokusu ve plazma GSH-Px aktivitesi, sırasıyla $\ddot{U}/g$ protein ve $\ddot{U}/L$ olarak verildi.

3.9. KATALAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Karaciğer doku homojenatı CAT aktivitesi tayininde Toru ve ark. (134) tarafından geliştirilen metot kullanıldı. Metodun prensibi H_2O_2 'in CAT tarafından O_2 ve H_2O 'a parçalanması esnasında reaksiyon karışımındaki absorban değişiminin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.



Çözeltiler: 1. 0.05 M Fosfat Tamponu (pH = 7,0)

2. %0.18 H_2O_2 (0,05 M, pH=7.0, Fosfat tamponu içinde hazırlandı)

Çalışma: Deney tüpüne 2 ml 0,05 M, pH = 7,0 fosfat tamponu, 1 ml % 0,18 H_2O_2 pipetlendi. Ortama daha sonra 100 l/ml CAT standart solüsyonu pipetlenerek 25 °C'de 240 nm dalga boyunda deiyonize su körüne karşı spektrofotometrik olarak 10 dakika absorban değişimi izlendi. CAT aktivitesinde 4 dakikadan sonra bir değişim gözlenmediğinden, çalışmada CAT aktivitesinin 4 dakika boyunca izlenmesi uygun bulundu.

Standart serinin hazırlanması: Standart olarak saf CAT (Bovine Liver Catalase, Sigma) kullanıldı. 2,5, 5,0, 7,5 ve 10,0 µg/ml konsantrasyonlarda KAT standart solüsyonu hazırlandı. Deney tüpüne 2 ml fosfat tamponu (0,05 M, pH = 7,0) ve 1 ml % 0,18 H_2O_2 pipetlendikten sonra ortama en son 100 µl standart eklendi. 25 °C'de 240 nm dalga boyunda 4 dakika süreyle spektrofotometrik olarak absorban değişimi izlendi. ΔOD/dk hesaplanarak bu değerlerle standart eğri çizildi, ΔOD/dk hesaplanarak CAT miktarları standart eğriden elde edildi. Karaciğer dokusu CAT aktivitesi Lowry yöntemi (131) ile protein tayini yapılarak Ü/mg protein cinsinden verildi.

3.10. İNTESTİNAL MUKOZA İNCELEMESİ

Bütün ratların duodenumları kesilerek çıkarıldı ve daha sonra 5mm'lik kesitler elde edildi. Örnekler %10'luk formalin solüsyonunda tespit edilip rutin doku takip işlemlerinden sonra parafin bloklara gömülerek saklandı. Bu dokulardan histolojik olarak değerlendirmeye en uygun bloklarından 5-6 mikron kalınlıkta kesitler alınıp hematoksilin ve eosin ile boyandıktan sonra, preparatlar ışık mikroskobunda değerlendirildi. Morfometrik olarak, hematoksilin ve eozin boyalı doku kesitleri villus uzunluğu, villus/kript oranı ve mukoza kalınlığı bakımından incelendi (135). Hücrelerdeki histopatolojik değişiklikler, daha önce Howarth ve ark. tarafından tarif edilen semi-kantitatif histolojik değerlendirme yöntemi ile değerlendirildi (136). Bu yöntem ile, villus atrofisi (küntleşme-füzyon), yüzeyel eritrosit ve brush-border harabiyeti, goblet hücre sayısında azalma, mitotik figür sayısında azalma, kript kaybı/yapısal bozulma, kript hücrelerinde harabiyet, kript apsesi, nötrofil infiltrasyonu, lenfosit infiltrasyonu, lenfatik ve kapiller dilatasyonundan oluşan 11 kriter göz önünde bulunduruldu. Bu histolojik hasar değişkenleri, her rat için 0'dan (normal) 3'e (en yüksek hasar) kadar iki patolog tarafından kör olarak ayrı ayrı derecelendirilerek toplam skorlar maksimum 33 olacak şekilde elde edildi.

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

Çalışma gruplarının villus boyu, villus boyu/kript oranı ve semi-kantitatif histolojik değerlendirme toplam skoru değerlerinin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis One Way Analizi metodu ve çoklu karşılaştırma testlerinden (Post Hoc Tests) Dunn's testi kullanıldı. Çalışma gruplarının mukoza kalınlığı, karaciğer doku homojenitesi ve plazma MDA, SOD, GSH-Px aktiviteleri ile karaciğer doku homojenitesi CAT aktivite değerlerinin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve çoklu karşılaştırma testlerinden (Post Hoc Tests) Tukey ve Dunnett t testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma ($\bar{x} \pm SS$) ve ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. İstatistik olarak $P < 0.05$ ise anlamlı kabul edildi. Bütün analizlerde, *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) bilgisayar programı 13,0 kullanıldı.

4.BULGULAR

Çalışma süresince MTX ve P-MTX grubundan ikişer rat MTX uygulamasından sonraki 48-72 saat arasında exitus oldu. Propolis ve kontrol grubunda rat ölümü gözlenmedi. MTX ve propolis-MTX grubundaki tüm ratlarda ishal gözlendi. Ancak MTX grubundaki ratlarda ishal daha erken başladı ve daha şiddetliydi. Mortalite değerlendirilmesi amaçlı istatistiksel karşılaştırma, gruplardaki rat sayısı az olduğu için uygulanmadı.

4.1. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

MTX'in neden olduğu intestinal hasar üzerine propolisin etkisini değerlendirmek için ratların duodenum dokusunun histolojik değerlendirilmesinde mukoza morfolojik ölçümleri ve semi-kantitatif histolojik değerlendirme yöntemi kullanıldı. Hematoksilen ve eozin (H&E) boyalı doku kesitlerinin morfolojik analizinde villus uzunluğu, villus/kript oranı ve mukoza kalınlığı değerlendirildi. Semi-kantitatif histolojik değerlendirme yöntemi ile villus atrofi (kütleleşme-füzyon), yüzeyel eritrosit ve brush-border harabiyeti, goblet hücre sayısında azalma, mitotik figür sayısında azalması, kript kaybı/yapısal bozulma, kript hücrelerinde harabiyet, kript absesi, nötrofil infiltrasyonu, lenfosit infiltrasyonu, lenfatik ve kapiller dilatasyonundan oluşan 11 kriter iki patoloj tarafından kör olarak değerlendirildi ve maksimum 33 olan toplam skor elde edildi. Mukoza morfolojik ve semi-kantitatif histolojik değerlendirme verileri tablo 5'te verilmiştir.

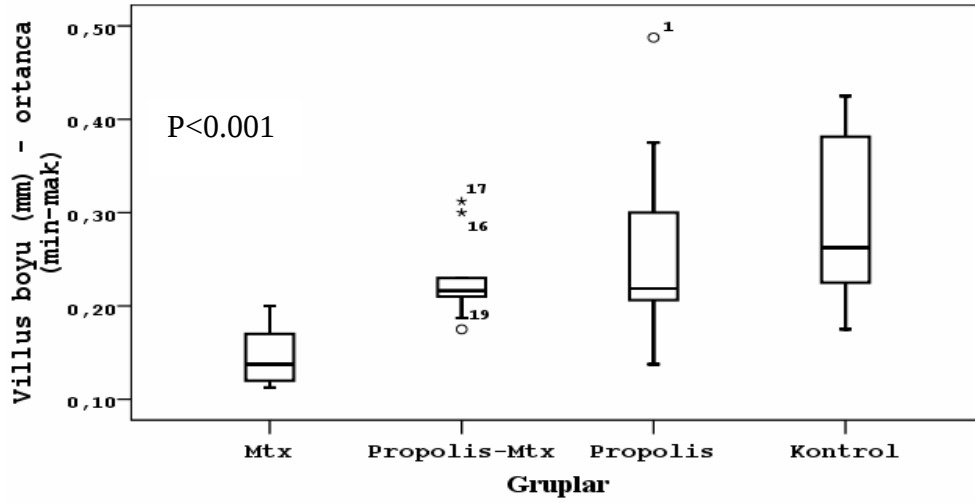
Tablo 5. Araştırma gruplarının ince barsakdaki morfometrik ve histopatolojik parametreleri

Değişkenler	MTX n=10 Ort±SS Ortc (min - max)	Propolis-MTX n=10 Ort±SS Ortc (min - max)	Propolis n=12 Ort±SS Ortc (min-max)	Kontrol n=12 Ort±SS Ortc (min-max)	P
Villus boyu (mm)	0.15 ± 0.03 ^a 0.14 (0.11 - 0.20)	0.23 ± 0.04 ^b 0.22 (0.18-0.31)	0.26 ± 0.01 ^b 0.22 (0.14 -0.49)	0.29 ± 0.09 ^b 0.26 (0.18 - 0.43)	< 0.001
Villus/kript oranı	2.19 ± 1.03 ^{ac} 1.83 (1.46 - 4.80)	3.40 ± 2.70 ^{bc} 2.89 (2.29-6.20)	3.90 ± 2.70 ^{bc} 2.88 (2.29 - 11.82)	4.00 ± 0.82 ^b 3.90 (3.00- 5.67)	< 0.001
Mk (mm)	0.32 ± 0.07 ^{ac} 0.32 (0.18-0.40)	0.39 ± 0.09 ^{bc} 0.41 (0.24-0.55)	0.46 ± 0.07 ^b 0.44 (0.35 - 0.60)	0.44 ± 0.09 ^b 0.44 (0.25-0.58)	0.002
SKHDS	23.20 ± 4.16 ^a 23.00 (17.00 - 31.00)	13.10 ± 5.53 ^{ac} 16.00 (4.00-18.00)	4.00 ± 2.26 ^{bc} 3.50 (17.00 - 31.00)	2.83 ± 1.47 ^b 2.00 (1.00- 6.00)	< 0.001

Mk; Mukoza kalınlığı, MTX; Metotreksat, Ort (min-max); ortanca (minimum-maximum), Ort±SS; ortalama±standart sapma, , SKHDS; Semi-kantitatif histolojik değerlendirme toplam skoru, Alfabetik üst simgeler; aynı harfler grupların benzer olduğunu ayrı harfler ise grupların benzer olmadığını ifade eder.

4.1.1.Villus Uzunluğu

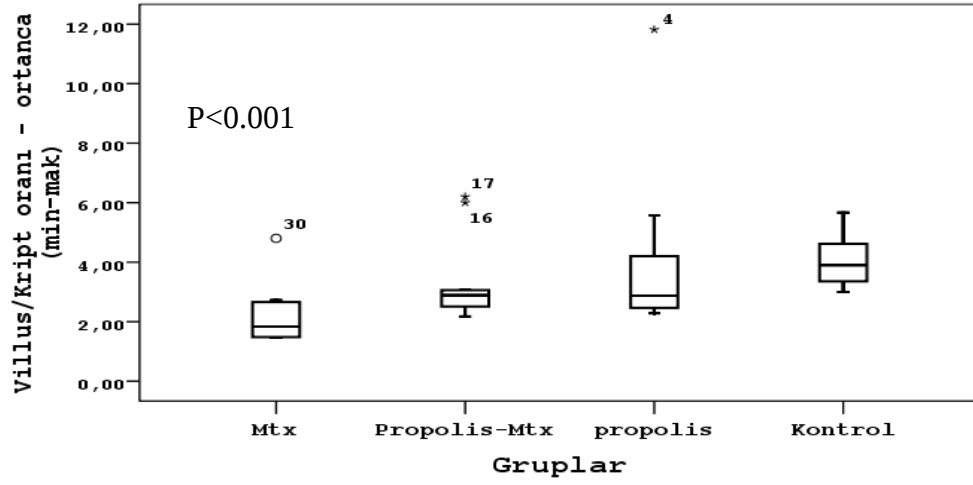
Grupların çoklu karşılaştırılmasına göre, MTX grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı düzeyde villus boyu daha kısa bulundu ($P<0,001$). Kontrol, propolis ve propolis-MTX grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi ($P>0,05$). Kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında; kontrol grubu ile propolis-MTX ve propolis grubu arasında anlamlı fark bulunmaz iken, kontrol grubuna göre MTX grubunda anlamlı olarak villus boyu kısa tespit edildi ($P<0,001$), [şekil 5].



Şekil 5. Rat duodenum dokusu villus boyu üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.

4.1.2.Villus/Kript Oranı

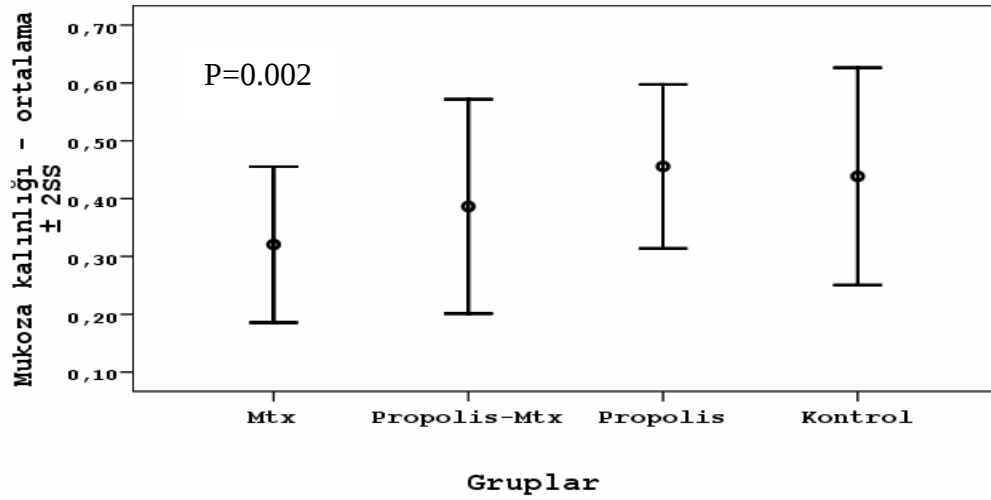
Grupların çoklu karşılaştırılmasına göre, kontrol grubuna göre MTX grubunda villus/kript oranı anlamlı olarak düşük bulunur iken ($P<0,001$), kontrol ile propolis ve propolis-MTX grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ($P>0,05$). MTX, propolis-MTX ve propolis grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi ($P>0,05$). Kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında; kontrol grubu ile propolis-MTX ve propolis grubu arasında anlamlı fark bulunmaz iken, kontrol grubuna göre MTX grubunda villus/kript oranı anlamlı olarak düşük tespit edildi ($P<0,001$). MTX grubuna göre propolis-MTX grubunda villus/kript oranı dikkate değer olarak daha yüksek olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0,05$). Bununla birlikte, kontrol grubu ile propolis-MTX grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($P>0,05$), [Şekil 6].



Şekil 6. Rat duodenum dokusu villus/kript oranı üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.

4.1.3. Mukoza Kalınlığı

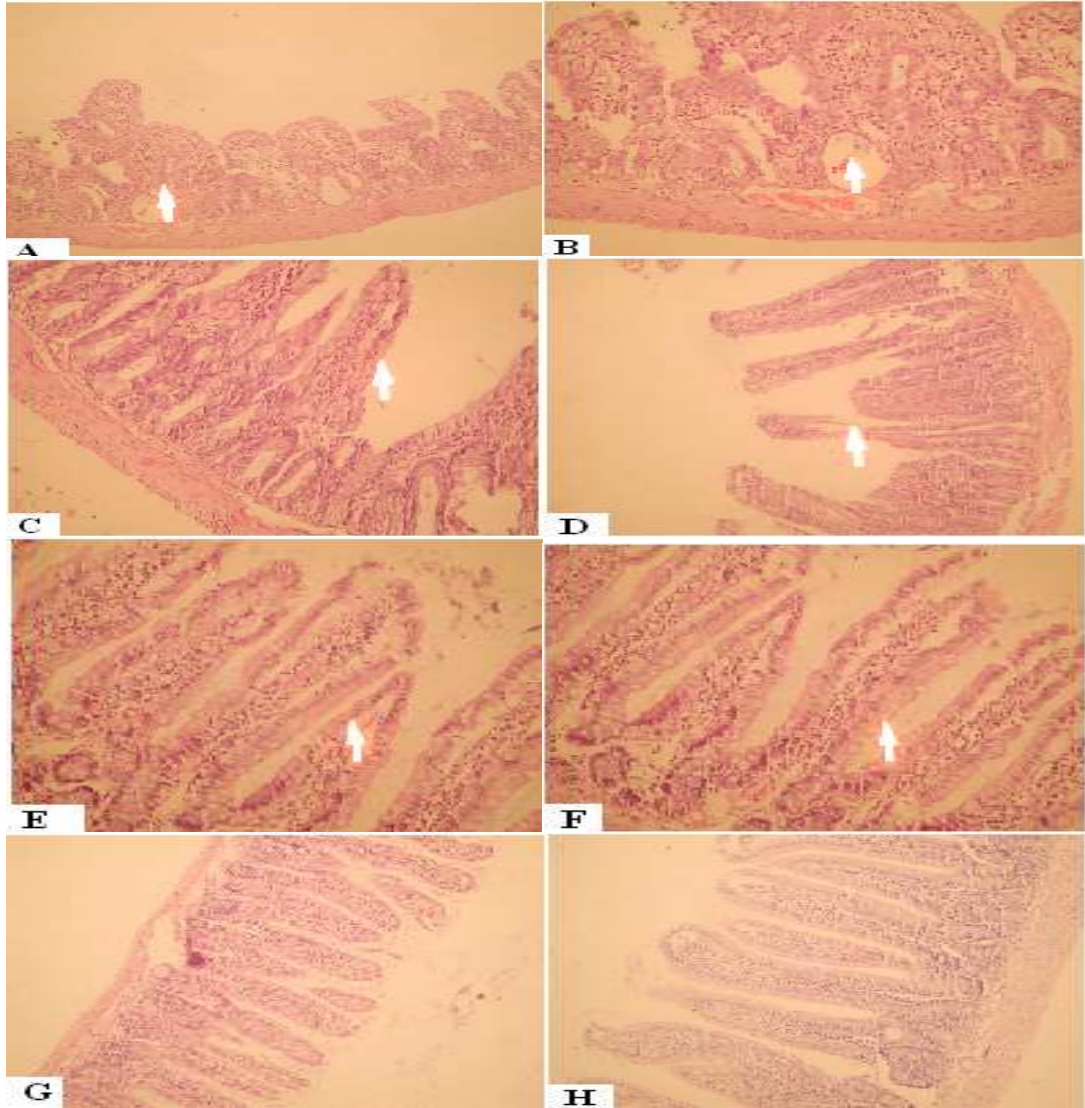
Grupların çoklu karşılaştırılmasına göre, kontrol ve propolis grubu arasında anlamlı fark bulunmaz iken, hem kontrol hemde propolis grubuna göre MTX grubunda anlamlı olarak mukoza kalınlığı düşük bulundu ($P<0,001$). Propolis-MTX grubu ile kontrol, propolis ve MTX grubu arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($P>0,05$). Kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında; kontrol grubu ile propolis-MTX ve propolis grubu arasında anlamlı fark bulunmaz iken, kontrol grubuna göre MTX grubunda mukoza kalınlığı anlamlı olarak düşük tespit edildi ($P<0,001$). MTX grubuna göre propolis-MTX grubunda mukoza kalınlığı daha yüksek olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bununla birlikte, kontrol grubu ile propolis-MTX grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($P>0,05$),[Şekil 7].



Şekil 7. Rat duodenum dokusu mukoza kalınlığı üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.

4.1.4. Semi-Kantitatif Histolojik Değerlendirme

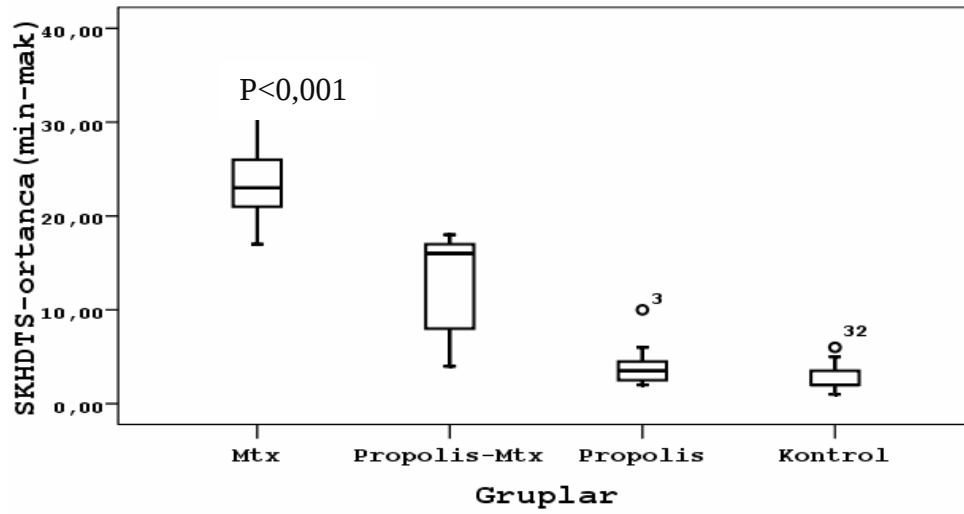
Duodenum dokularının H&E boyalı kesitlerinin ışık mikroskobu ile histolojik değerlendirilmesi yapıldı. MTX grubunda, villuslarda belirgin kısalma ve küntleşme, kriptlerde distorsiyon (dallanma), hasar ve derinleşme, kript apsesi, belirgin goblet hücre kaybı, lamina propriada nötrofil lokosit ve lenfosit infiltrasyonu ile damarsal konjesyon görüldü. Propolis-MTX grubunda, bazı villuslarda hafif kısalma ve küntleşme, goblet hücre kaybı ve lamina propriada lenfosit infiltrasyonu izlendi. Kript histolojisi normaldi ve damarsal konjesyon tespit edilmedi. Propolis grubunda, villus ve kript histolojisi normal olup goblet hücre kaybı gözlenmedi, lamina propriada hafif lenfosit infiltrasyonu ve damarsal konjesyon mevcuttu. Kontrol grubunda, villus, kript ve lamina propria normal histolojik özellikte idi [şekil 8].



Şekil 8. Ratlarda ip MTX tedavisinin neden olduğu intestinal hasar üzerine propolisin histopatolojik etkisi. A ve B (MTX grubu), A' da okla kripteki distorsiyon ve derinleşme, B' de okla kript apsesi belirtilmiştir. C ve D (propolis-MTX grubu); C ve D' de okla hafif kısalmış ve küntleşmiş villuslar gösterilmiştir. E ve F (propolis grubu); E ve F' de okla goblet hücreleri gösterilmiştir. G ve H (Kontrol grubu); normal histolojik bulgular görülmektedir (A ve G 10 x H&E diğerleri 20 x H&E).

Grupların SKHDTs'nın çoklu karşılaştırmasına göre, kontrol ve propolis grubu arasında anlamlı fark bulunmaz iken, hem kontrol hemde propolis grubunda MTX grubuna göre anlamlı düzeyde toplam skor yüksek bulundu ($P<0,001$). Propolis-MTX grubu ile propolis ve MTX grupları arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($P>0,05$), propolis-MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak toplam

skor yüksek tespit edildi ($P<0,001$). Kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında; kontrol ile propolis grubu arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($P>0,05$), kontrol grubuna göre propolis-MTX ve MTX grubunda toplam skor anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($P<0,001$). MTX grubuna göre propolis-MTX grubunda SKHDTs'u dikkate değer olarak daha düşük olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0,05$) [Şekil 9].



Şekil 9. Rat duodenum dokusu SKHDTs üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.

4.2. OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

MTX'in neden olduğu oksidatif stres üzerine propolisin etkisinin değerlendirilmesinde, karaciğer dokusu ve plazma oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA düzeyleri ve endojen antioksidanlardan CAT, GSH-Px, ve SOD aktiviteleri ölçüldü. MDA seviyeleri ve CAT, GSH-Px, SOD aktiviteleri ile ilgili veriler tablo 6' da verilmiştir.

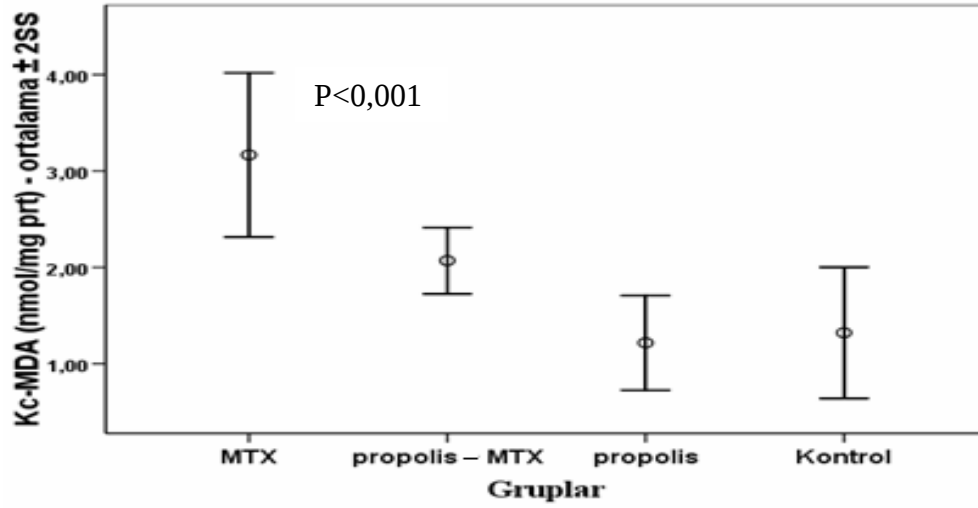
Tablo 6. Araştırma gruplarının karaciğer dokusu ve plazma oksidatif stres parametreleri

Değişkenler	MTX n=10 Ort±SS Ortc (min - max)	Propolis-MTX n=10 Ort±SS Ortc (min - max)	Propolis n=12 Ort±SS Ortc (min-max)	Kontrol n=12 Ort±SS Ortc (min-max)	P
MDA					
Kc-(nmol/mg prt)	3.17±0.43 ^a 3,05(2,74-4,09)	2.07±0.17 ^b 2,10(1,83-2,38)	1.21±0.25 ^c 1,22(0,87-1,61)	1.32±0.34 ^c 1,30(0,89-2,11)	< 0.001
Pl-(nmol/ml)	5.36±0.90 ^a 5,16(3,67-6,72)	4.21±0.41 ^b 4,04(3,76-5,11)	2.42±0.53 ^c 2,57(1,47-3,1)	2.2±0.42 ^c 2,16(1,49-3,11)	< 0.001
SOD					
Kc-(Ü/mg. prt)	5.28±0.69 ^a 5,11(4,87-7,12)	6.54±0.73 ^a 6,56(5,01-7,60)	11.50±1.95 ^b 11,68(8,11-14,20)	11.88±1.49 ^b 11,64(9,8-14,2)	< 0.001
Pl-(U/L)	15.11±1.25 ^a 14,82(13,77-16,4)	18.81±1.74 ^b 18,31(16,30-22,0)	29.74±4.30 ^c 29,45(23,2-37,0)	26.83±3.09 ^c 25,8(22,9-32,38)	< 0.001
GSH-Px					
Kc-(U/g prt)	13.88±2.00 ^a 13,95(11,48-16,18)	17.78±1.17 ^b 17,71(16,45-20,01)	28.60±2.12 ^c 29,26(25,65-31,60)	24.88±1.94 ^d 24,88(22,60-27,64)	< 0.001
Pl-(Ü/L)	298.77±63.98 ^a 314,06(181,9-402,11)	392.00±70.48 ^b 391,26(238,87-484,5)	699.39±41.71 ^c 698,92(641,13-797,95)	534.56±74.39 ^c 533,01(411,26-650,1)	< 0.001
CAT					
Kc- (Ü/mg prt)	0.42±0.13 ^a 0,41(0,21-0,62)	0.58±0.12 ^a 0,57(0,41-0,81)	1.06±0.21 ^b 0,99(0,75-1,44)	0.97±0.14 ^b 0,96(0,74-1,32)	< 0.001

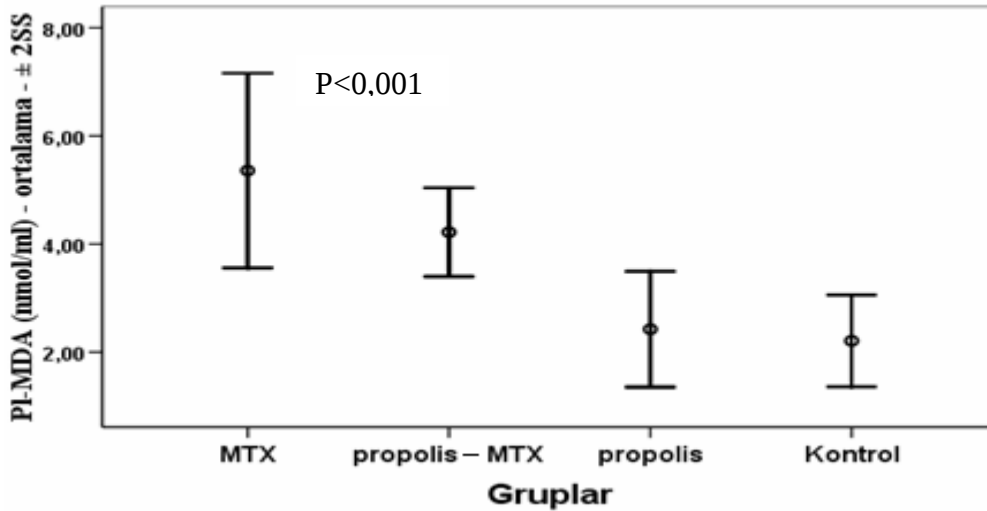
MTX; Metotreksat, Ortc (min-max); ortanca (minimum-maximum), Ort±SS; ortalama±standart sapma, MDA; Malondialehid, SOD; Süperoksid dismutaz, GSH-Px; Glutasyon peroksidaz, Kc; Karaciğer, CAT; Katalaz, Pl; Plazma, Prt; Protein, Alfabetik üst simgeler; aynı harfler grupların benzer olduğunu aynı olmayan harfler ise grupların benzer olmadığını ifade eder.

4.2.1. Karaciğer Dokusu ve Plazma MDA Değeri

Grupların karaciğer dokusu ve plazma MDA değerlerinin çoklu karşılaştırılmasına göre, MTX grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak MDA değerleri yüksek tespit edildi ($P<0.001$). Kontrol ve propolis grubu arasında anlamlı bir fark bulunmaz iken ($P>0.05$), kontrol ve propolis gruplarına göre MTX ve propolis-MTX gruplarında MDA değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($P<0.001$). Kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında; kontrol ve propolis grubu arasında fark bulunmaz iken ($P>0.05$), kontrol grubuna göre propolis-MTX ve MTX grubunda anlamlı olarak MDA değerleri yüksek bulundu ($P<0.001$), [Şekil 10, 11].



Şekil10. Rat karaciğer dokusu MDA değeri üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.

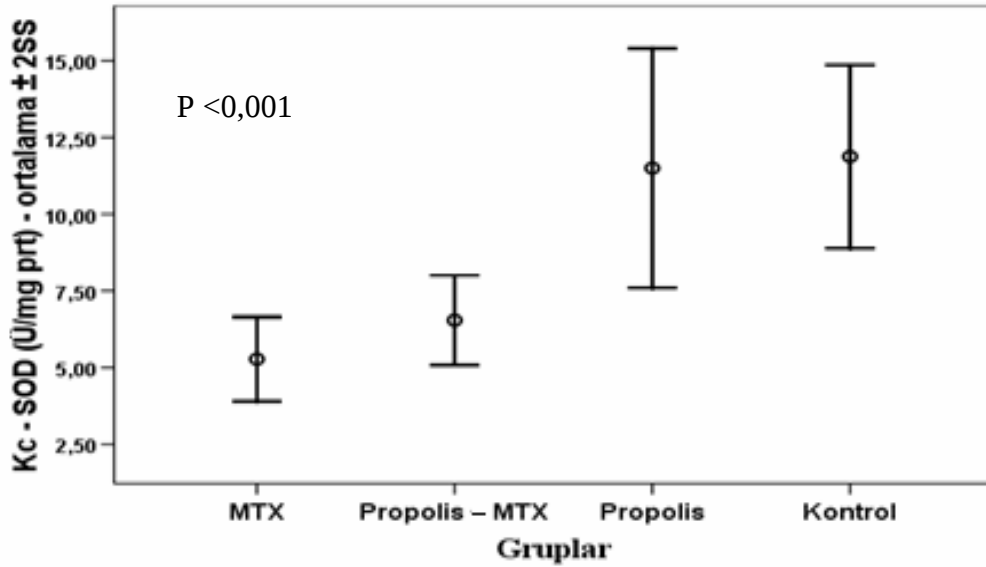


Şekil 11. Rat plazma MDA değerleri üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.

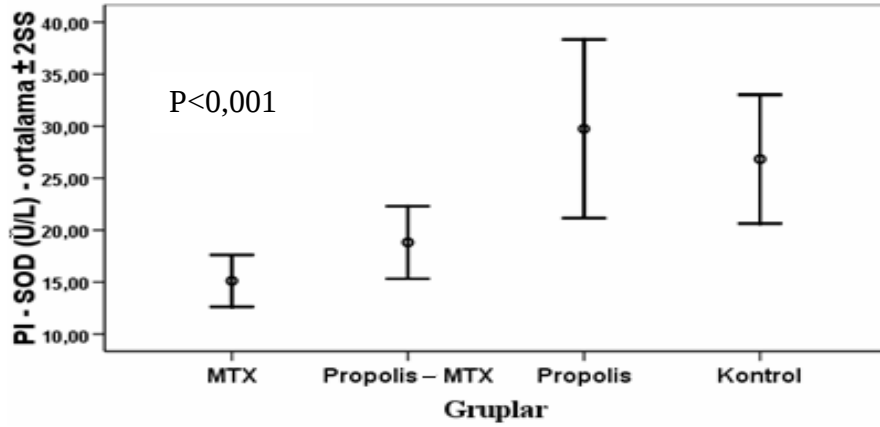
4.2.2. Karaciğer Dokusu ve Plazma SOD Aktivitesi

Grupların karaciğer dokusu SOD aktivitesinin çoklu karşılaştırılmasına göre, kontrol ile propolis grubu arasında ve MTX ile propolis-MTX grubu arasında anlamlı bir fark bulunmaz iken ($P>0,05$), kontrol ve propolis grubuna göre MTX ve propolis-MTX grubunda SOD aktivitesi anlamlı olarak düşük tespit edildi ($P<0.001$). Kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında; kontrol ve propolis grubu arasında fark bulunmaz iken ($P>0,05$), kontrol grubuna göre propolis-MTX ve MTX grubunda anlamlı olarak SOD aktivitesi düşük bulundu ($P<0.001$), [Şekil 12].

Grupların plazma SOD aktivitesinin çoklu karşılaştırılmasına göre, MTX grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak SOD değerleri düşük tespit edildi ($P<0.001$). Kontrol ve propolis grubu arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($P>0,05$), kontrol ve propolis grubuna göre MTX ve propolis-MTX grubunda SOD aktivitesi anlamlı olarak düşük bulundu ($P<0.001$). Kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında; kontrol ve propolis grubu arasında fark bulunmaz iken ($P>0,05$), kontrol grubuna göre propolis-MTX ve MTX grubunda anlamlı olarak SOD aktivitesi düşük tespit edildi ($P<0.001$), [Şekil 13].



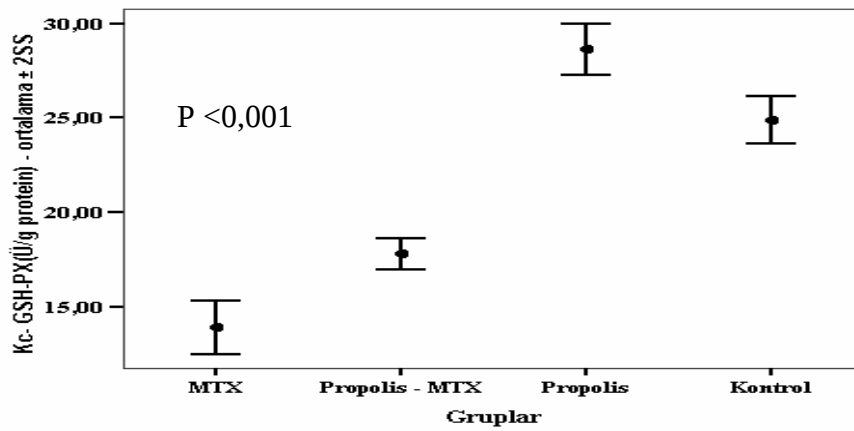
Şekil 12. Rat karaciğer dokusu SOD aktivitesi üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.



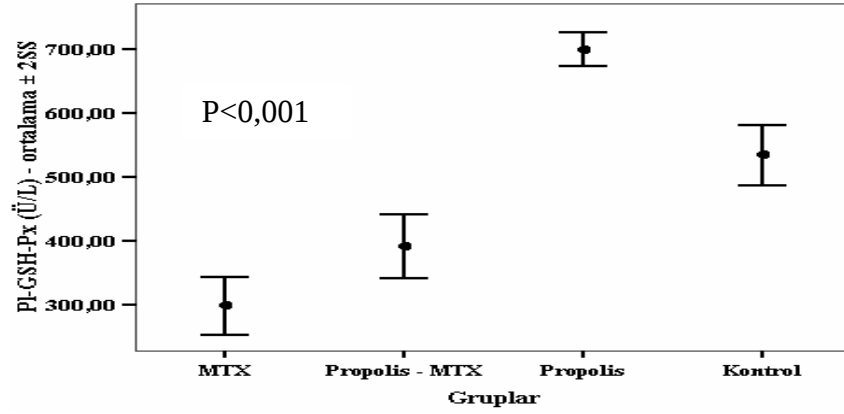
Şekil 13. Rat plazma SOD aktivitesi üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.

4.2.3. Karaciğer Dokusu ve Plazma GSH-Px Aktivitesi

Grupların karaciğer dokusu ve plazma GSH-Px aktivitesinin çoklu karşılaştırılmasına göre, MTX grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak GSH-Px aktivitesi düşük tespit edildi ($P<0.001$). Kontrol grubuna göre propolis grubunda anlamlı olarak GSH-Px aktivitesi yüksek bulunur iken, kontrol grubuna göre MTX ve propolis-MTX gruplarında GSH-Px aktivitesi anlamlı olarak düşük bulundu ($P<0.001$). Kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında; kontrol grubuna göre propolis grubunda anlamlı olarak GSH-Px aktivitesi yüksek tespit edilirken, kontrol grubuna göre propolis-MTX ve MTX grubunda anlamlı olarak GSH-Px aktivitesi düşük bulundu ($P<0.001$), [Şekil 14,15].



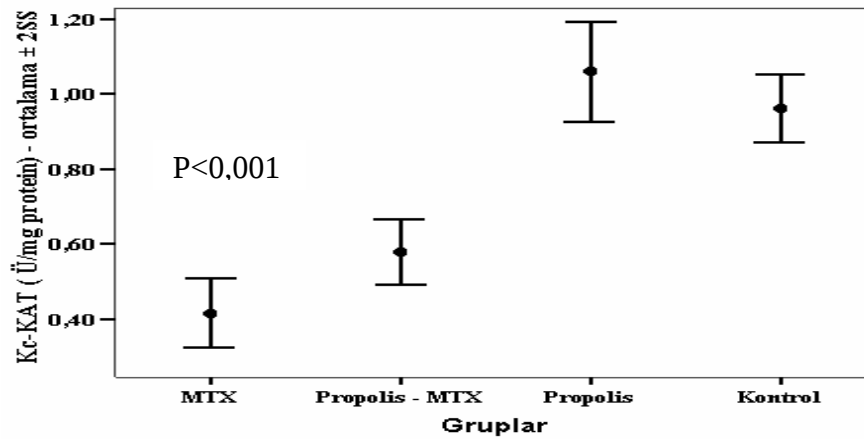
Şekil 14. Rat karaciğer doku GSH-Px aktivitesi üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.



Şekil 15. Rat plazma GSH-Px aktivitesi üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.

4.2.4. Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesi

Grupların çoklu karşılaştırılmasına göre, kontrol ve propolis grubu arasında anlamlı fark bulunmaz iken, hem kontrol hemde propolis grubuna göre MTX ve propolis-MTX grubunda anlamlı olarak CAT aktivitesi düşük bulundu ($P<0,001$). MTX grubuna göre propolis-MTX grubunda CAT aktivitesi daha fazla olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0,05$). Kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında; kontrol grubu ile propolis grubu arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($P>0,05$), kontrol grubuna göre propolis-MTX ve MTX grubunda CAT aktivitesi anlamlı olarak düşük tespit edildi ($P<0,001$), [Şekil 16].



Şekil 16. Rat karaciğer dokusu CAT aktivitesi üzerine MTX, propolis-MTX ve propolisin etkisi.

5. TARTIŞMA

Yüksek doz KT uygulamalarının tedavi edici etkinliklerinin önemiyle ilgili kanıtlar klinik olarak her geçen gün artmaktadır. Ancak, KT rejimlerinden en etkin şekilde yararlanılması normal vücut dokularına verdikleri hasar nedeniyle sınırlanmaktadır (2,3). MTX, romatolojik ve dermatolojik hastalıkların çeşitli formları ile solid organ ve lösemiler gibi malign hastalıkların tedavisinde başarılı olarak uzun yıllardır kullanılan bir ilaçtır. Antimetabolit ve folik asit antagonisti olan MTX, önemli klinik sorunlara neden olan, önceden tahmin edilemeyen ciddi yan etkilere yol açabilmektedir (10,34). Yan etkilerin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır, ancak en muhtemel nedenin, ilacın karaciğerdeki metabolizması sırasında oluşan oksidatif süreçle alakalı olduğu, bunun dışında alerjik, sitotoksik ve immünolojik reaksiyonlara bağlı olarak da oluşabileceği iddia edilmektedir (37). Diğer KT ilaçları ve RT'e benzer şekilde, MTX malign hücrelere karşı özelleşmiş olmadığından, gastrointestinal yolaktaki hücreler ve kemik iliği hematopoetik hücreleri gibi proliferasyon hızı yüksek olan normal dokularda hasara neden olmaktadır (10). Epitelyal hücre çoğalması, farklılaşması ve hücre ölümü arasındaki dengesizlik, bölünmekte olan epitelyal hücrelerinin erken ölümü, mukozal bariyer hasarı ve şiddetli enterokolite yol açmaktadır (5,10,21). Aynı zamanda, MTX karaciğer yağlanması, kolestaz, fibrozis ve uzun dönemde siroza kadar ilerleyebilen karaciğer hasarına neden olabilmektedir (34).

Antioksidan özelliği olan folik asitin, MTX'in yan etkilerinden özellikle intestinal ve karaciğer toksisitesinin oluşumunun azaltılması amaçlı MTX ile birlikte günlük kullanımı yaygın olarak önerilmektedir (30,31). Ancak, folik asit kullanımının MTX'in etkinliğini azaltıp azaltmadığı hala tartışmalıdır (32,33). Bu nedenle, yeni antioksidan ajanlar MTX'in sistemik oksidatif hasarına karşı deneysel olarak kullanılmıştır. Bu antioksidan maddelerden n-asetilsistein (12) ve glutaminin (121) MTX'in ince barsak ile karaciğerde yaptığı oksidatif hasara karşı faydalı etkileri gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar L-karnitin (12), taurin (137) ve melatoninin (138,139) MTX'in sistemik oksidatif hasarına karşı ince barsak, karaciğer ve böbrek üzerine olumlu etkilerinin yanı sıra, üzüm çekirdeği (140), sarımsak (122) ve ursodeoksikolik asidin (34) antioksidan özellikleri sayesinde MTX'in yol açtığı karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, antioksidan özelliği iyi bilinen propolisin, MTX'in ince barsakta yaptığı histopatolojik değişiklikler ve karaciğer dokusu ile plazma oksidatif stres parametreleri üzerine olumlu etkilerinin olup olmadığı araştırıldı. Aynı zamanda, yapılan deneysel çalışma MTX'in neden olduğu oksidatif hasar üzerine propolisin etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Propolis, çeşitli bitkilerden bal arıları tarafından toplanan materyallerin reçinesidir. Materyal toplandıktan sonra arıların tükürük salgısı ve enzimatik sekresyonlar ile zenginleştirilir (46,47). Propolis, arılar tarafından kovanın duvarlarının örtülmesi, çatlak ve boşlukların doldurulması ve kovana girdikten sonra öldürülen yabancı böceklerin mumyalanarak kokuşmasının önlenmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır (46). Dünyanın değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinde 200'den fazla kimyasal bileşik tanımlanmıştır. Propolis içeriğinde çeşitli flavonoidler, fenoller, alkoller, terpenler, steroller, vitaminler, mineraller ve aminoasitler bulunmaktadır (48). Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış propolisin ana bileşenlerinin naringenin, galangin, krisin, pinobaksin, kuarsetin gibi flavonoidler ve CA gibi fenolik asitlerden oluştuğu tespit edilmiştir (55). Bu çalışmada kullanılan Kayseri kavak propolisinde ise flavonoidlerden krisin ve fenolik asitlerden CA'nın bulunduğu gösterilmiştir (119).

Propolisin ekstraktlarıyla yapılan çok sayıda çalışmada antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antitümoral, immünomodülatör ve diğer faydalı biyolojik etkileri ispatlanmıştır (56). Aynı zamanda, propolisin çok önemli farmakolojik aktif bileşenleri olan flavonoidler ve CA/CAPE gibi çeşitli fenoliklerin, antioksidan özelliklerine bağlı olarak nöroprotektif (71), radyoprotektif (73), kardiyoprotektif (74), gastroprotektif (78), hepatoprotektif (84) ve nefroprotektif (102) etkileri tespit edilmiştir. Propolisin antioksidan etkinliği, özellikle onun yüksek flavonoid içeriğiyle alakalıdır ve propolis ekstraktının kuru ağırlığının %25-30'unu flavonoidler oluşturmaktadır. Pinosembrin, akasetin, krisin, rutin, kateşin, naringenin, galangin, luteolin, kamferol, apigenin, mirisetin ve kuarsetin önemli flavonoid bileşikler olarak bilinmektedir (47,48). Yapılan çalışmada kullanılan propolisin en önemli flavonoid bileşiği olan krisinin antioksidan etkinliği tespit edilmiştir (141).

İnce barsak epitelyum hücrelerinin proliferasyonu kriptlerde oluşmaktadır. Ratlar ve insanlarda, normal fizyolojik koşullarda çok hızlı yenilenebilen kript hücreleri, villus uçlarına göç ederek yaklaşık 2-3 gün içinde intestinal epitelyumun tamamen yenilemesini sağlamaktadır. MTX uygulaması sonrası ince barsaktaki histopatolojik değişikliklerin kript hücrelerindeki hasar nedeniyle başladığı, en sık proksimal ince barsakta olduğu ve en şiddetli mukoza hasarının ortalama 72 saat sonra izlendiği gösterilmiştir (5,33,124). Bu nedenle, yapılan çalışmadaki ince barsak hasarının histopatolojik değerlendirilmesinde, tek doz ip MTX uygulandıktan 72 saat sonra derin anestezi altında elde edilen duodenum dokusu kullanıldı.

MTX serbest radikaller aracılı toksisiteye neden olduğu için oksidatif stresle ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır. Bununla birlikte, MTX yüksek doz uygulandığında gastrointestinal ve kemik iliği toksisitesi gibi şiddetli sistemik yan etkilere bağlı olarak hayvanların erken ölümlerine neden olmaktadır. Daha önce yapılmış deneysel çalışmalara benzer şekilde (120-123), çalışmada MTX 20mg/kg vücut ağırlığı dozunda uygulandı. Bu doz, MTX toksisitesine rağmen hayvanların sağ kalmasına ve oluşan sistemik oksidatif hasar ile bu hasara karşı propolis koruyucu etkisini olup olmadığının histolojik ve biyokimyasal parametreler üzerinden araştırılmasına olanak sağladı.

MTX'in en önemli doz kısıtlayıcı yan etkilerinden birisinin gastrointestinal toksisite olduğu ve yaygın olarak intestinal mukozada yapısal ve fonksiyonel hasara yol açtığı bilinmektedir (5). Ratlarda MTX tedavisinin barsaktan glikoz emilimini baskıladığı ve intestinal lezyonlarda nötrofil infiltrasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir (121). MTX'e bağlı intestinal mukozit modeli histolojik olarak kript kaybı, villus füzyonu/atrofisi, belirgin kapiller dilatasyon, mix hücresele infiltrasyon ve hızlı iyileşme ile karakterizedir (5,36). Bu çalışmada önceki çalışma sonuçlarına benzer şekilde (120-123), ip 20mg/kg tek doz MTX'in yol açtığı şiddetli ince barsak hasarı, morfometrik ve semi-kantitatif histolojik değerlendirme yöntemi ile gösterildi.

Ratlarda oral propolis uygulanmasının, mikrovasküler permabilite, myeloperoksidaz aktivite ve ülser indeksini azaltarak indometazinin yol açtığı mide hasarına, obstrüktif sarılık çalışmasında oluşan ince barsak villus atrofisine ve intestinal dokuda oluşan iskemi/reperfüzyon hasarına karşı histopatolojik olarak faydalı etkileri gösterilmiştir (78,123,142). Bununla birlikte, tekrarlayan aftöz stomatitli insanlarda 500 mg/gün oral propolis ile yapılan randomize, çift-kör, plesebo-kontrolü pilot çalışmada, propolis alan grupta belirgin olarak aftöz stomatit tekrarlanmasında azalma ve yaşam kalitesinde düzelme gözlenmiştir, bu etkinin propolisin antioksidan ve anti-inflamatuar etkisiyle alakalı olduğu iddia edilmiştir (143). Yapılan çalışmadaki morfometrik (villus boyu, villus/kript oranı, mukoza kalınlığı) ve histopatolojik bulgular, MTX'in neden olduğu mukoza harabiyeti üzerine propolisin koruyucu etkisinin olduğu ve intestinal epitelyum morfolojisinin korunmasını desteklediğini düşündürmüştür. Ancak bu olumlu etki, SKHDTs bakımından, MTX grubunda P-MTX grubuna göre dikkate değer olarak daha yüksek olmasına karşın (sırasıyla, ortalama±SS, 23.20±4.16, 13.10±5.53) istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Organ yetersizliklerinin patogeneğinde ve bazı ksenobiyotiklerin böbrek ve karaciğer toksisitesinin oluşmasında reaktif oksijen radikallerinin rolü kanıtlanmıştır (144). MDA seviyesindeki artış, hücre membran harabiyeti ve amino asit yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonunun önemli bir nedeni olduğuna inanılan, serbest oksijen radikalleri aracılı lipid peroksidasyonunun iyi bir göstergesidir (41,42). MTX'in ince barsak, karaciğer ve böbrek dokusu üzerine olan etkilerinin araştırıldığı deneysel çalışmalarda, MTX'in doku MDA seviyelerini belirgin şekilde artırdığı, bu artışın

antioksidan özellikleri olan L-karnitin (12), melatonin (138,139) ve taurin (145) ile baskılandığı gösterilmiştir. Bundan dolayı, MTX'in neden olduğu barsak, karaciğer ve böbrek toksisitesinde serbest radikallerin rol oynadığı iddia edilebilir. Yapılan çalışmada, kontrol grubuna göre MTX grubunda karaciğer dokusu ve plazma MDA seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu sonuç, MTX tedavisinin karaciğer dokusu ile plazmada oksidatif hasara ve lipid peroksidasyonuna neden olduğunu göstermektedir. MDA seviyesi MTX grubuna göre propolis-MTX grubunda anlamlı olarak daha düşük tespit edildi. Bulgular, propolisin MTX'in neden olduğu sistemik oksidatif hasarda lipid peroksidasyona karşı koruyucu etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Bu etki propolisin polifenolik bileşikleri ve onların antioksidan özellikleri ile alakalı olabilir. Propolisin en önemli polifenolik bileşiklerden flavonoidlerin sahip oldukları antioksidan aktivitenin temelini, doğrudan serbest radikalleri temizleme yetenekleri ile radikallerin reaktif bileşenleriyle tepkimeye girerek ROM'un stabilizasyonunu sağlamaları oluşturmaktadır (96). Diğer polifenolik bileşiklerden CA ve CAPE'nin NF- κ B'nin baskılanması üzerinden transkripsiyon seviyesinde ROM'un üretimini engelleyerek antioksidan etkinlik gösterdiği iddia edilmektedir (98,101).

Aerobik organizmaların yaşayan hücrelerinde endojen ve ekzojen oksidatif stres nedenleri ile mücadele etmek için karmaşık antioksidan sistemler (enzimatik ve nonenzimatik) bulunmaktadır. Yaşayan organizmaların antioksidan savunma sistemleri, SOD, CAT, GSH-Px gibi enzimatik ve vitamin C, E, ürat, retinil esterler, β -karoten ve glutatyon gibi nonenzimatik sistemlerden oluşmaktadır (43). Propolis ile polifenolik bileşiklerinin enzimatik antioksidanlardan GSH-Px, GSSG-R, SOD, CAT, XO, iNOS aktivitelerini artırdığı, enzimatik olmayan antioksidan sistemde ise GSH seviyesini artırdığı, hidrojen peroksit, tekli oksijen molekülü ve lipid peroksid radikallerini temizlediği, hidrate elektron atağından DNA'yı koruduğu gösterilmiştir (96). Aynı zamanda, bazı araştırmacılar tarafından propolis ve ilişkili flavonoidlerin DNA tamir enzimleri (DNA polimeraz beta gibi), hemeoksijenaz-1 ve mitokondriyal süperoksid dismutaz üzerinden antioksidan etkinliği artırdığını rapor edilmiştir (73).

Propolis ile yapılmış çeşitli deneysel çalışmalarda; selenitin neden olduğu katarak formasyonu ve oksidatif stres üzerine koruyucu etki gösterdiği (69), oksidatif stresin neden olduğu retinal hasara karşı lipid peroksidasyonu inhibe ederek nöroprotektif etki gösterdiği (71), karbon tetraklorürün neden olduğu oksidatif stresi ve oluşan karaciğer hasarını önlediği (146), *Escheriechia coli*'nin neden olduğu pyelonefritte oluşan oksidatif stresi azalttığı (102), alkolün neden olduğu oksidatif stresle oluşan lipid değişiklikleri ve karaciğer hasarı (93) ile deneysel obstrüktif sarılık modelinde oksidatif stres üzerinden oluşan karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu (75), doksorubisin ve vinblastinin yol açtığı mitokondriyal strese karşı ortaya çıkan karaciğer ve kalp toksisitesine karşı olumlu etki gösterdiği (74) bildirilmiştir. Sağlıklı insanlarda yapılan in vivo bir çalışmada, oral propolis verilmesiyle kan antioksidan aktivitesinde artış tespit edilmiştir (69). Propolis ile ilgili yapılan in-vivo ve in-vitro çalışmalarda, antioksidan etkinliğinin doz bağımlı ve yüksek polifenolik içerikleriyle ilgili olduğu gösterilmiştir (71,83,147,148). Bununla birlikte, farelerde yapılan deneysel bir çalışmada propolisın oral 100mg/kg dozunun antioksidan, oral 300mg/kg dozunun pro-oksidan etki gösterdiği öne sürülmüştür (149). Bu nedenle, ileriki çalışmalarda MTX'in oksidatif toksisitesine karşı propolisın farklı dozlarının etkisinin araştırılması gerekmektedir.

Önceki çalışmalarla uyumlu olarak bu çalışmada, kontrol grubuyla MTX grubu karşılaştırıldığında, karaciğer dokusu ve plazma GSH-Px, SOD ile doku CAT aktivitelerinin azaldığı, bu azalmanın MTX tedavisi öncesi propolis uygulanması ile engellendiği tespit edildi. Aynı zamanda, kontrol grubuna göre propolis grubunda karaciğer dokusu ve plazma GSH-Px aktivitesinin anlamlı olarak daha yüksek bulunması, propolisın endojen antioksidan enzim aktivitesini artırdığını göstermektedir. Ancak bu olumlu etki, karaciğer dokusu SOD ve CAT aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bu çalışmanın verileri, MTX sitotoksitesinin mekanizmalarından birinin oksidatif stres olduğunu, propolisın histopatolojik olarak duodenum dokusunda ve biyokimyasal olarak karaciğer dokusu ile plazmada gösterilen koruyucu etkisinin muhtemel mekanizmasının reaktif oksijen radikallerinin temizlenmesi sonucu lipid peroksidasyonunun ve/veya antioksidan tüketiminin engellenmesi ile olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR

Ratlarda tek doz ip 20mg/kg vücut ağırlığında MTX uygulaması ile ince barsak hasarı oluşturuldu. Bu hasar histopatolojik olarak, villus boyu, villus/kript oranı ve mukoza kalınlığının kontrol grubuna göre MTX grubunda düşük olması ve SKHDTS'ları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre MTX grubunda yüksek olması ile belirlendi. MTX grubu ile propolis-MTX grubu karşılaştırıldığında propolis uygulamasının bu hasarı azaltıcı yönde etki gösterdiği tespit edildi. Ancak bu olumlu etki, SKHDTS bakımından MTX grubunda propolis-MTX grubuna göre dikkate değer olarak daha yüksek olmasına karşın (sırasıyla, ortalama $\pm$ SS, 23.20 $\pm$ 4.16, 13.10 $\pm$ 5.53), istatistiksel olarak anlamlı değildi. Çalışmanın verileri, MTX'in neden olduğu ince barsak hasarının kript hücre kaybı ve villus atrofisine bağlı olduğunu, propolisin mukoza harabiyeti üzerine olumlu etkisini intestinal epitelyum morfolojisini koruyarak sağladığını düşündürmüştür. Bu koruyucu etkinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte propolisin antioksidan özelliğine atfedilebilir.

Çalışmada MTX tedavisinin sistemik oksidatif hasara ve lipid peroksidasyonuna yol açtığı belirlendi. Bu durum, hücre membran harabiyetinin önemli bir nedeni olduğuna inanılan, serbest oksijen radikal aracılı lipid peroksidasyonunun göstergesi MDA seviyesinin, karaciğer homojenatı ve plazma örneklerinde, kontrol grubuna göre MTX grubunda anlamlı olarak yüksek bulunması ile gösterildi. MDA seviyesi, MTX grubuna göre propolis-MTX grubunda anlamlı olarak daha düşük tespit edildi.

Bu bulgular, MTX'in neden olduğu sistemik oksidatif hasarda lipid peroksidasyona karşı propolisin koruyucu etkisinin olduğunu düşündürmüştür. Propolisin bu etkisi, yüksek oranda içerdđi polifenolik bileşikler ve onların antioksidan özellikleriyle alakalı olabilir.

MTX tedavisinin endojen antioksidan enzim aktivitesini azalttığı tespit edildi. Bu durum, kontrol grubuna göre MTX grubunda, karaciğer homojenatı ve plazma GSH-Px, SOD aktivitelerinin ve karaciğer homojenatı CAT aktivitesinin daha düşük ölçülmesiyle belirlendi. Enzim aktivitelerindeki azalmanın, MTX grubu ile propolis-MTX grubu karşılaştırıldığında, propolis uygulanmasıyla engellendiği belirlendi. Aynı zamanda, kontrol grubuna göre propolis grubunda karaciğer homojenatı ve plazma GSH-Px aktivitesinin anlamlı olarak daha yüksek bulunması propolisin endojen antioksidan enzim aktivitesini artırdığını gösterdi. Ancak bu olumlu etki, karaciğer homojenatı SOD ve CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Sonuç olarak bu çalışmanın verileri, MTX sitotoksitesinin mekanizmalarından birinin oksidatif stres olduğunu, propolisin histopatolojik olarak duodenum dokusunda ve biyokimyasal olarak karaciğer dokusu ile plazmada gösterilen koruyucu etkisinin muhtemel mekanizmasının, reaktif oksijen radikallerinin temizlenmesi sonucu lipid peroksidasyonunun ve/veya antioksidan tüketiminin engellenmesi ile olabileceğini düşündürmektedir.

Antioksidan etkinliği gösterilen propolisin, MTX'in neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu olarak kullanılması çalışmanın verilerinden hareketle önerilebilir. Ancak, bu deneysel çalışma MTX'in sistemik oksidatif hasarına karşı propolisin etkisinin değerdendirildiği ilk çalışma olduğundan, etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, doz ve tolerabilite konularının tamamen açıklığa kavuşturulması için preklinik ve klinik çalışmalara gereksinim vardır. Çalışmanın gelecekte yapılacak iyi tasarlanmış araştırmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Sonis ST, Fey EG. Oral Complications of Cancer Therapy. *Oncology* 2002; 16: 680-86.
2. Pico J, Avila-Garavito A, Naccache P. Mucositis: Its Occurrence, Consequences and Treatment in The Oncology setting. *Oncologist* 1998; 3: 446-51.
3. Scully C, Epstein J, Sonis ST. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: Part 1, Pathogenesis and Prophylaxis of Mucositis. *Head Neck* 2003; 25: 1057-70.
4. Bensadoun R, Magne N, Marcy P, Demard F. Chemotherapy and radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancer patients: new trends in pathophysiology, prevention and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258: 481-87.
5. Bowen JM, Gibson RJ, Cummins AG, Keefe DM. Intestinal mucositis: the role of the bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Support care cancer* 2006; 2: 1-19.
6. Yanez JA, Teng XW, Kathryn A, et al. Chemotherapy induced gastrointestinal toxicity in rats: involvement of mitochondrial DNA, gastrointestinal permeability and cyclooxygenase -2. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2003; 6: 308-14.
7. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*, 2004; 4: 277-84.
8. Donnelly JP, Verhagen BN. Can anything be done about oral mucositis? *Ann Oncol* 2003; 14: 505-07.
9. Scully C, Epstein J, Sonis ST. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: Part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. *Head Neck* 2003; 25: 1057-70.

10. Chabner B, Wilson W, Supko J. Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs. Editorial: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kipps TJ, Kaushansky K. In Williams Hematology. 7th Edition. Mc Graw Hill Company, United States. 2007 ; 249-51.
11. Sener G, Ekşioğlulu-Demiralp E, Çetiner M, et al. L-carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *Cell Biology And Toxicology* 2006; 22: 47–60.
12. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, et al. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit* 2006; 12: 274-78.
13. Ghisalberti E, Propolis: a review, *Bee World* 1979; 60: 59-84.
14. Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31: 3-15.
15. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal Of Ethnopharmacology* 1999; 64: 235-40.
16. Moreno MIN, Isla MI, Cudmani NG, et al. Screening of antibacterial activity of amaiche del valle (tucuman, argentina) propolis. *Journal Of Ethnopharmacology* 1999; 68: 97-102.
17. Volpert R, Elstner F. Biochemical activities of propolis extracts. II. Photodynamic activities. *Zeitschrift Für Naturforschung* 1993; 48: 858-62.
18. Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, et al. Evaluation of propolis. I. Evaluation of brazilian and chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1997; 20: 496-501.
19. Fischer G, Leite FP, Conceicao FR, et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with suhv-1. *Vaccine* 2007; 25: 1250-56.

20. Han MC, Durmus AS, Karabulut E, et al. Effects of turkish propolis and silver sulfadiazine on burn wound healing in rats. *Revue De Medecine Veterinaire* 2005; 156: 624-27.
21. Decker-Baumann C, Buhl K, Frohmuller S, et al. Reduction of Chemotherapy-Induced side-Effects by Parenteral Glutamine Supplementation In Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35: 202–07.
22. Keefe DM. Gastrointestinal Mucositis: a new biological model. *Support Care Cancer* 2004; 12: 6–9.
23. Keefe DM, Gibson RJ, Hauer-Jensen M. Gastrointestinal mucositis. *Semin Oncol Nurs* 2004; 20: 38–47.
24. Sonis ST. Pathobiology of mucositis. *Semin Oncol Nurs* 2004; 20: 11–15.
25. Anilkumar T, Sarraf C, Hunt T, Alison M. The nature of cytotoxic drug-induced cell death in murine intestinal crypts. *Br J Cancer* 1992; 65: 552–58.
26. Keefe DM, Brealey J, Goland GJ, et al. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut* 2000; 47: 632–37.
27. Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, et al. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and P53-deficient mice. *Cancer Res* 1994; 54: 614–17.
28. Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ, et al. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 1995; 108: 2261–71.
29. Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, et al. Mucositis study section of the multinational association of supportive in cancer and the international society for oral oncology updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer* 2007;109: 820-31.

30. Van Ede AE, Laan RF, Rood MJ, et al: Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: a forty-eight-week, multicenter, randomized, doubleblind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1515–24.
31. Ortiz Z, Shea B, Suarez-Almazor M, et al: The efficacy of folic acid and folinic acid in reducing methotrexate gastrointestinal toxicity in rheumatoid arthritis: a metaanalysis of randomized controlled trials. *J Rheumatol* 1998; 25: 36–43.
32. Morgan SL, Baggott JE, Vaughn WH, et al: Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: a doubleblind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1994; 121: 833–41.
33. Khanna D, Park GS, Paulus HE, et al: Reduction of the efficacy of methotrexate by the use of folic acid: post hoc analysis from two randomized controlled studies. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3030–38.
34. Uraz S, Tahan V, Aygun C, et al. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1071–77.
35. Papaconstantinou HT, Xie C, Zhang W, et al. The role of caspases In Methotrexate-induced gastrointestinal toxicity. *Surgery* 2001; 130: 859–65.
36. Gibson RJ, Keefe DM, Thompson FM, et al. Effect of interleukin-11 on ameliorating intestinal damage after methotrexate treatment of breast cancer in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2751–57.
37. Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *J Gastroenterol* 2004; 1119-27.
38. Taminiau JA, Gall DG, Hamilton JR. Response of the rat small-intestine-epithelium to methotrexate. *Gut* 1980; 21; 486-92
39. Kurutaş EB, Güler Fİ, Kılınç M. Serbest radikaller arşiv. 2004;13: 120-32.
40. Burçak G, Gülnur A. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004; 35: 159-69.
41. Köse K, Doğan P. Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi* 1992; Prof. Dr. Ahmet Bilge Ek Sayısı: 340-50.

42. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994; 52: 253-65.
43. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Basın Yayın Dağıtım. Konya 1995; 32-42.
44. Jenkins RR, Teng J. Catalase activity in skeletal muscle of varying fiber types. *Experimentia* 1981; 37: 67-68.
45. Tanırgan G, Koldaş M, Uras F. Serbest radikaller: an introduction to free radical biochemistry. *Haseki Tıp Bülteni* 1994; 32: 304-08.
46. Ghisalberti E. Propolis: a review, *Bee World* 1979; 60: 59-84.
47. Marcucci MC. propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie* 1995; 25: 83.
48. Walker P, Crane E. Constituents of propolis, *Apidologie* 1987; 18: 327-34.
49. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Popov S. Seasonal variations in essential oil from brazilian propolis, *Journal of essential oil. Research (J Essent Oil Res)*, 1998; 10: 693-96.
50. Trusehva B, Popova M, Bankova V, et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis, *evidence based complementary. Alternative Medicine* 2006; 3: 249-54.
51. Park YK, Alencar SM, et al. Botanical origin and chemical composition of brazilian propolis. *Journal of Agricultural And Food Chemistry* 2002; 50: 2502-06.
52. Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC, et al. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31: 3-15.
53. Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, et al. Chemical constituents of brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Product* 1998; 61: 896-00.
54. Tomas-Barberan FA, Garcia-Viguera C, Vlt-Olivier P. et al. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis. *Phytochemistry* 1993; 34: 191-96.

55. Koru O, Toksoy F, Acikel CH, et al. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe* 2007;13: 140–45.
56. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food And Chemical Toxicology* 1998; 36: 347–63.
57. Sforcin JM, Fernandes JA, Lopes CAM, et al. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 73: 243–49.
58. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, et al. Effects of compounds found in propolis on streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1302–09.
59. Cafarchia C, De Laurenthis N, Millilo MA, et al. Antifungal activity of apulia region propolis. *Parassitologia* 1999; 4: 587–90.
60. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, et al. Antifungal activity of propolis on different species of candida. *Mycoses* 2001; 44: 375–78.
61. Sawaya ACHF, Palma AM, Caetano FM, et al. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of candida. *Letters In Applied Microbiology* 2002; 35: 203–07.
62. D'auria FD, Tecca M, Scazzocchio F, et al. Effect of propolis on virulence factors of candida albicans. *Journal of Chemotherapy* 2003; 15: 454–60.
63. Murad JM, Calvi SA, Effects of propolis from brazil and bulgaria on fungicidal activity of macrophages against paracoccidioides brasiliensis. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 79: 331–34.
64. Koc AN, Silici S, Ayangil D, et al. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. Mentagrophytes* by using a microdilution assay. Blackwell Publishing Ltd. *Mycoses* 2005; 48: 205–10.

65. Amoros M, Simoes CMO, Girre L, et al. Comparison of the anti herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-butyl -2-enyl caffeate. *Journal of Natural Products* 1994; 57: 644–47.
66. Hady FK, Hegazi AG. Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east Nile delta propolis. *Z Naturforsch* 2002; 57: 386–94.
67. Naito Y, Yasumuro M, Kondou K, et al. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. *Pytother Res* 2007; 21: 452–56.
68. Paintz M, Metzner Y. On the lokal anaesthetic action of propolis and some of its constituents. *Pharmazie* 1979; 34: 839–41.
69. Orhan H, Marol S, Hepsen IF, et al. Effects of some probable antioxidants on selenite-induced cataract formation and oxidative stress-related parameters in rats. *Toxicology* 1999; 139: 219–32.
70. Jasprica I, Mornar A, Debeljak Z, et al. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 110: 548–54.
71. Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, et al. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sciences* 2007; 80: 370–77.
72. Russo AA, Troncoso B, Sanchez F, et al. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. *Life Sciences* 2006; 78: 1401 – 06.
73. Benkovi V, Orsolı N, Knezevic A, et al. Evaluation of the Radioprotective Effects of Propolis and Flavonoids in Gamma-Irradiated Mice: The Alkaline Comet Assay Study. *Biol. Pharm, Bull* 2008; 31: 167–72.
74. Benguedouar L, Boussenane HN, Wided K, et al. Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian J Exp Biol* 2008; 46: 112–19.

75. Kismet K, Sabuncuoglu MZ, Kilicoglu SS, et al. Effect of Propolis on Oxidative Stress and Histomorphology of Liver Tissue in Experimental Obstructive Jaundice. *Eur Surg Res* 2008; 41: 231-37.
76. Fischer G, Cleff MB, Dummer LA, et al. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 116: 79-84.
77. Gregory SR, Piccolo N, Piccolo MT, et al. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *J Altern Complement* 2002; 8: 77-83.
78. Gabbianelli R, Falcioni G, et al. Antioxidative and gastroprotective activities of anti-inflammatory formulations derived from chestnut honey in rats. *Nutrition Research* 2006; 26: 130– 37.
79. Koo H, Rosalen PL, Cury J, A. et al. Effects of compounds found in propolis on streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1302-09.
80. Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, et al. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. *Z Naturforsch* 1995; 50: 167-72.
81. Murad JM, Calvi SA, Soares AMVC, et al. Effect of propolis from brazil and bulgaria on fungicidal activity of macrophage against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal Of Ethnopharmacology* 2002; 79: 331-34.
82. Ahn MR, Kunimasa K, Ohta T, et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by brazilian propolis: major component artepillin c inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer lett* 2007.
83. De Barros MP, Sousa JP, Bastos JK. Effect Of Brazilian Green Propolis On Experimental Gastric Ulcers In Rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 110: 567-71.
84. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, et al. Hepatoprotective and anti-helicobacter pylori activities of constituents from brazilian propolis. *PHYtomedicine* 2001; 8: 16-23.

85. Paulino N, Teixeira C, Martins R, et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a brazilian green propolis. *Planta Med* 2006; 72: 899-06.
86. Bayankova L, Derejian S, Koumanova R, et al. Inhibition of helicobacter pylori growth in vitro by bulgarian propolis: preliminary report. *Journal Of Medical Microbiology* 2003; 52: 417-19.
87. Ozcan M, Uver A, Ceylan DA, et al. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. *Nahrung/Food* 2004; 48: 188-94.
88. Koc AN, Silici S, Ayangil D, et al. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. Mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Mycoses* 2005; 48: 205-10.
89. Velikova M, Bankova V, Sorkun K, et al. Propolis from the mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Z Naturforsch* 2000; 55: 790-93.
90. Uzel A, Sorkun K, Oncag O, et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 2005; 160: 189-95.
91. Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, et al. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* 2005; 12: 221-28.
92. Keskin N, Hazır S, Basaer KH, et al. Antibacterial activity and chemical composition of turkish propolis. *Z Naturforsch* 2001; 5: 1112-15.
93. Kolankaya D, Selmanoglu G, Sorkun K, et al. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry* 2002; 78: 213-17.
94. Ozkul Y, Silici S, Eroglu E. The Anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine* 2005; 12: 742-47.

95. Ozkul Y, Eroglu HE, Ok E. Genotoxic potential of Turkish propolis in peripheral blood lymphocytes. *Pharmazie* 2006; 61: 638-40.
96. Giulia DC, Mascolo N, Angelo AL, et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 1999; 65: 337-53.
97. Fernandez MA, Garcia MD, Saenz MT. Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *S.sambucifolia*, *Journal Of Ethnopharmacology* 1996; 53: 11-14.
98. Neradil J, Veselska R, Slanina J. Uvc-protective effect of caffeic acid on normal and trasformed human skin cells in vitro, *Folia Biologica* 2003; 49: 197-202.
99. Orsolic N, Sver L, Terzic S, Basic I. Peroral application of water-soluble derivative of propolis (wsdp) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity. *Vet Res Commun* 2005 Oct; 29: 575-93.
100. Orsolic N, Saranovic AB, Basic I. Direct and indirect mechanisms of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Vet Res Commun* 2005; 29: 575-93.
101. Sud'ma GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, et al. Caffeic acid phenethylester as a lipxygenase inhibitor with antioxidant properties. *Febs Letter* 1993; 329: 21-24.
102. Celik S, Gorur S, Aslantas O. Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in escherichia coli-induced pyelonephritis in rats. *Mol cell Biochem* 2007; 297: 131-38.
103. Frenkel K, Wei H, Bhimani R, et al. Inhibition of tumor promoter- mediated processes in mouse skin and bovine lens by cafeic acid phenethyl ester. *Cancer Research* 1993; 53: 1255-61.
104. Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Esent fatty Acids* 1996; 55: 441-49.

105. Huang MT, Ma W, Yen P, et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. *Carcinogenesis* 1996; 17: 761-65.
106. Rao CV, Desai D, Simi B, Kulkarni N. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res* 1993; 53: 4182-88.
107. Cicala C, Morello S, Iorio C, Capasso R. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 2003; 73: 73-80.
108. Noelker C, Bacher M, Gocke P. The flavanoid caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett* 2005; 383: 39-43.
109. Arvouet-Grand A, Lejeune B, Bastide P, et al. Propolis extract. Part 6. Subacute toxicity and cutaneous primary irritation index. *Journal De Pharmacie De Belgique* 1993; 48: 165-70.
110. Hrytsenko VI, Tykhonov OI, Pryakhin OR. Study of the polysaccharide preparation propolis. *Farmatsevtichnyi Zhurnal* 1977; 32: 92-93.
111. Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World* 1979; 60: 59-84.
112. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, et al. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal Of Ethnopharmacology* 1991; 35: 77-82.
113. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology* 1983; 32: 1141-48.
114. Kleinrok Z, Borzecki Z, Scheller S, et al. Biological properties and clinical application of propolis. X. Preliminary pharmacological evaluation of ethanol extract of propolis (EEP). *Arzneimittel Forschung* 1978; 28: 291-92.
115. Kaneeda J, Nishina T. Safety of propolis. Acute toxicity. *Honeybee Science* 1994; 15: 29-33.

116. Hollands I, Vidal A, Gra B, Sotolongo M. Evaluation of the sub-chronic toxicity of cuban propolis. *Revista Cubana De Ciencias Veterinarias* 1991; 22: 91-100.
117. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects Of Propolis On Dental Caries In Rats. *Caries Research* 1991; 25: 347-51.
118. Bankova VS, Prytzyk E, Dantas AP, et al. Flavonoids and trypanocidal activity of bulgarian propolis. *Journal Of Ethnopharmacology* 2003; 88: 189–93.
119. Koc AN, Silici S, Mutlu-Sariguzel F, Sagdic O. Antifungal Activity of Propolis in Four Different Fruit Juices. *Food Technol. Biotechnol* 2007; 45: 57–61.
120. Rubio IT, Cao Y, Hutchins LF, et al. Effect of glutamine on methotrexate efficacy and toxicity. *Ann Surg* 1998; 227: 772-78.
121. Ciralik H, Bulbuloglu E, Cetinkaya A, et al. Effects of n-acetylcysteine on methotrexate-induced small intestinal damage in rats. *Mt Sinai Med* 2006; 73: 1086-92.
122. Yüncü M, Eralp A, Celik A. Effect of aged garlic extract against methotrexate-induced damage to the small intestine in rats. *Phytother Res* 2006; 20: 504-10.
123. Sabuncuoglu MZ, Kismet K, Kilicoglu SS, et al. Propolis reduces bacterial translocation and intestinal villus atrophy in experimental obstructive jaundice. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5226-31.
124. Clarke JM, Pelton NC, Bajka BH, et al. Use of the ¹³c-sucrose breath test to assess chemotherapy-induced small intestinal mucositis in the rat. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 34-8.
125. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. In: Colowick Sp, Kaplan No (Eds). *Methods Enzymol Volume 77*. Academic Press. Inc. New York, San Fransisico, London, 1981; 548-55.

126. Tietze F. Enzymie method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 1969; 27: 502-22.
127. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. In: Colowick Sp, Kaplan No (Eds). *Methods Enzymol Volume 52*. Academic Press, Inc. New York. San Fransisico. London, 1978; 302-10.
128. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, et al. Oxiative damage in the liver induced by ischemia reperfusion: protection by melatonin. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 898-05.
129. Yagi K. Assay for blood plasma or serum, In: Colowick Sp, Kaplan No (Eds). *Methods Enzymol Volume 105*. Academic Press, Inc. New York. San Fransisico, London, 1984; 328-31.
130. Ohkawa W, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-58.
131. Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
132. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A Simple Method For Clinical Assay Of Süperoxide Dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-00.
133. Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitative and qunlitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
134. Toru KK, Hayaski S, Nakamoto H, et al. Propenies of aspergillus niger catalase. *J Biochem* 1982; 92: 1449-56.
135. Carneiro-Filho BA, Lima IPF, Araujo DH, et al. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. *Digestive Diseases And Sciences* January 2004; 49: 65–72.
136. Howarth GS, Geoffrey L, et al. Milk Growth Factors Enriched from Cheese Whey Ameliorate Intestinal Damage by Methotrexate When Administered Orally to Rats. *Human and Clinical Nutrition* 1996; 2519-30.

137. Cetiner M, Sener G, Sehirli Ö. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 209: 39 – 50.
138. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AÖ, et al. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J. Pineal Res* 2003; 34: 282–87.
139. Jahovic N, Sener G, Cevik H, et al. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct* 2004; 22: 169–78.
140. Cetin A, Kaynar L, Kocyigit I, et al. Role of Grape Seed Extract on Methotrexate Induced Oxidative Stress in Rat Liver. *The American Journal of Chinese Medicine* 2008; 36: 1–12.
141. Villar IC, Jiménez R, Galisteo M. Effects of chronic chrysin treatment in spontaneously hypertensive rats. *Plant Med* 2002; 68: 847-50.
142. Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, et al. Protective effect of propolis on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 1458.
143. Samet N, Srinivas CL, Susarla M, Samet-Rubinstein N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study *Clin Oral Invest* 2007; 11: 143–47.
144. Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM, Mayo JC, Lopez-Burillo S. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 1299–321.
144. Cetiner M, Sener G, Sehirli Ö, et al. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 209: 39 – 50.
146. Bhadauria M, Nirala SK, Shukla S .Propolis protects CYP 2E1 enzymatic activity and oxidative stress induced by carbon tetrachloride. *Mol cell Biochem* 2007 Apr 5; [Epub ahead of print].
147. A. Russoa R, Longo A. V. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002; 73: 21–29.

148. Isla MI, Nieva Moreno MI, Sampietro AR, et al. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 76: 165–70.
149. Sobocanec S, Sverko V, Balog T, et al. Oxidant/antioxidant properties of Croatian native propolis. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 8018-26.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Prof. Dr. Mustafa ÇETİN danışmanlığında hazırlanan Dr. Barış ESER'e ait "Ratlarda metotraksatin yol açtığı intestinal mukoza hasarı ve oksidatif stres üzerine propolisin etkisi" adlı çalışma, İç hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir

Tarih: 14/01/ 2009

İmza: 

Başkan: Prof. Dr. Muhammet Coşkun İmza: 

Üye : Prof. Dr. Mustafa Çetin İmza: M. Çetin

Üye : Doç. Dr. Sebnem Güneş İmza: 

Üye : Doç. Dr. Orhan Yıldız İmza: 

Üye : Prof. Dr. Fehri Baycan İmza: 