

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RESVERATROLÜN METOTREKSAT UYGULANAN RATLARDA
TOTAL OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DURUMUNA ve
DNA HASARINA ETKİSİ**

Sağlık Memuru Mehmet VADİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Bahat COMBA

VAN-2017

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RESVERATROLÜN METOTREKSAT UYGULANAN RATLARDA
TOTAL OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DURUMUNA ve
DNA HASARINA ETKİSİ**

Sağlık Memuru Mehmet VADİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Bahat COMBA

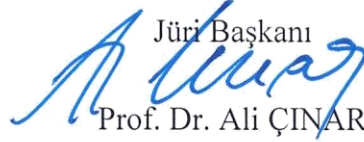
VAN-2017

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje başkanlığı tarafından 2015-SBE-YL235 nolu proje olarak desteklenmiştir.

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


RESVERATROLÜN METOTREKSAT UYGULANAN RATLARDA
TOTAL OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DURUMUNA ve DNA HASARINA ETKİSİ

Sağlık Memuru Mehmet VADİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ali ÇINAR

Üye

Doç. Dr. Devrim SARIPINAR AKSU

Üye

Yrd. Doç. Dr. Bahat COMBA

TEZ KABUL TARİHİ

23.01/2017

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sırasında yoğun çalıŐmalarına rağmen hiğbir zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, özveriyle her konuda bana destek olan ve beni yĐnlendiren Danışman Hocam Sayın Yrd. DoÇ. Dr. Bahat COMBA'ya, bilimsel desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı BaŐkanımız Sayın DoÇ. Dr. Devrim SARIPINAR AKSU'ya, Anabilim Dalımızın değerli Öğretim Üyelerine, Sayın Prof. Dr. Ali ÇINAR'a, çalıŐmama maddi destek veren Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı'na, özellikle yaşamımın her anında manevi destek ve güven veren niŐanlıma, aileme ve arkadaşlarıma teŐekkürlerimi sunmayı zevkli bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
Teşekkürler.....	III
İçindekiler.....	IV
Simgeler ve Kısaltmalar Listesi.....	VI
Tablolar Listesi.....	VIII
Şekiller Listesi.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Resveratrol(Res).....	3
2.1.1. Resveratrolün yapısı ve türevleri.....	4
2.1.2. Resveratrolün etkileri.....	5
2.2. Metotreksat (MTX).....	7
2.2.1 Yan etkileri.....	8
2.3. Lökositler.....	9
2.3.1. Granülositler.....	10
2.3.2. Agranülositler.....	11
2.4. Oksidanlar ve Antioksidanlar.....	12
2.5. DNA Hasarı (8-OHdG).....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Gereç.....	17
3.1.1. Hayvan meteryali.....	17
3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler.....	17
3.1.3. Kimyasal maddeler.....	18
3.2. Yöntem.....	19
3.2.1. Kan örneklerinin alınması.....	19
3.2.2. Yayma kan preparatı (Froti) hazırlanması ve boyanması.....	19
3.2.3. Total oksidan durum (TOS) tayini.....	20
3.2.4. Total antioksidan durum (TAS) ölçümü.....	21
3.2.5. Oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanması.....	21
3.2.6. DNA hasarı (8-OHdG) belirlenmesi.....	22

3.3. İstatistik Analizi.....	23
4. BULGULAR.....	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	30
ÖZET.....	40
SUMMARY.....	41
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	55
EK-1 Araştırma Başvuru Onay Belgesi.....	56
EK-2 Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgesi.....	57
EK-3 Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu.....	58



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Santigrad Derece
ABS	: Absorbans
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
ATP	: Adenozin 3'-trifosfat
CAR	: Karvakrol
CAT	: Katalaz
COX-1	: Siklooksijenaz-1
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DS	: Distile Su
g	: Gram
G-CSF	: Granülosit koloni stimule edici ajan
GİS	: Gastrointestinal Sistem
GSH	: Glutasyon
GSSG-R	: Glutasyon reduktaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
i.p	: İntraperitoneal
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
kg	: Kilogram
KT	: Kemoterapi
LY	: Lenfosit
M.Ö.	: Milattan Önce
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mol	: Molekül
MTX	: Metotreksat
NADP	: Nikotinamid adenin fosfat
NADPDH	: Sitozolik nikotinamid adenin fosfatdehidrojenaz
NO	: Nitrikoksit
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi

RES	: Resveratrol
RJ	: Royal Jel
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT	: Radyoterapi
SF	: Serum Fizyolojik
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAS	: Total Antioksidan Seviye
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif madde
TOS	: Total Oksidan Seviye
UV	: Ultraviyole
WBC	: Lökosit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Standart hazırlamak için pipetleme işleminin gösterilmesi.....	22
Tablo 2.	Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol gruplarındaki ratlara ait nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfosit ve monosit yüzdeleri.....	24
Tablo 3.	Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubu ratlara ait TOS, TAS, OSI ve 8-OHdG düzeyleri.....	27



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Trans-resveratrol ve cis-resveratrolün kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.	Resveratrolün piceid formu.....	5
Şekil 3.	Resveratrolün etkileri.....	6
Şekil 4.	Lökositlerin sınıflandırılması.....	10
Şekil 5.	Oksidatif stres.....	13
Şekil 6.	DNA'da meydana gelen oksidatif hasarlar.....	14
Şekil 7.	Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların nötrofil yüzdeleri.....	24
Şekil 8.	Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların eozinofil yüzdeleri.....	25
Şekil 9.	Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların bazofil yüzdeleri.....	25
Şekil 10.	Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların lenfosit yüzdeleri.....	26
Şekil 11.	Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların monosit yüzdeleri.....	26
Şekil 12.	Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların TOS düzeyleri.....	28
Şekil 13.	Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların TAS seviyeleri.....	28
Şekil 14.	Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların OSI değerleri.....	29
Şekil 15.	Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların 8-OHdG seviyeleri.....	29

1.GİRİŞ

Resveratrol; non-flavanoid olup en çok kara üzümün kabuğunda bulunur. Asmaların kökünde, sapında ve çekirdeğinde daha az oranda bulunmaktadır. Üzümü koruduğu gibi insanıda koruduğu düşünülen resveratrol, soğuk hava koşullarında yetişen üzümlerde oran olarak daha yüksektir (Anonim, 2011). Günümüze kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, tüm bitkilerden resveratrolün üretilebildiği 72 türün olduğu belirlenmiştir. Bu bitkilerin başında; asma, yaban mersini, dut, yer fıstığı ve Antep fıstığı yer almaktadır (Dong, 2003).

Resveratrol aktif formunu (trans-resveratrol) birçok yiyecek çeşidinde koruyabilmektedir. Bunu ısıya dayanıklı olmasıyla sağlamaktadır. Ağıza alındıktan sonra sidirimi ve kana karışması çok hızlıdır (Kuhnle ve ark., 2000; Bavaresco ve Vezzulli, 2006).

Sitotoksik ilaçlar, kanser hücrelerinin özellikle hücre yapılarını veya metastazik ilerleme yollarını bozarak antitümör etkilerini göstermektedirler. Metotreksat sitotoksik ilaçların antimetabolitler grubunda yer alır (Weijl ve ark., 1997; Block ve ark., 2007).

Metotreksat (MTX), antikanserojen, antiinflamatuvar, antimetabolit, antineoplastik etkileri olan bir ilaç olup; lösemi, lenfoma, akciğer ve meme kanseri ile romatoid artrit gibi bazı hastalıklarda sık olarak kullanılır. Yüksek dozda verildiğinde bilinç düzeyinde bozukluklarına neden olur. Gelişen yan etkilerin çoğunda metotreksat verilmesiyle tetiklenen oksidatif stresin rolü olduğu bildirilmektedir (Caron ve ark., 2009).

Kemoterapilerin en sık görülen yan etkisi kemik iliğinin baskılanmasıdır ve ölümcül olabilir. Kemik iliği baskılanmasıyla anemi, trombositopeni ve lökopeni tabloları ortaya çıkar. Kemoterapi sonrası baskılanan kemik iliği nedeniyle hastalarda azalan nötrofil sayısı (Nötropeni) nedeniyle oluşabilen enfeksiyon en ölümcül yan etkidir (İliçin ve ark., 1996; Şenol, 2004).

Kanserli hastalarda verilen kemoterapi oral mukozitin en sık nedenidir. Metotreksat gibi bazı sitotoksik ilaçlar ağızdan anüse kadar gastrointestinal sistemin (GİS) tamamının epitelyumunda hasar oluşturur. Bunun sonucunda ülserasyon ve devamında yangı görülebilmektedir (Akkuş ve Şanlı, 2006).

Resveratrol enflamasyonda, aterosklerozda ve kanser oluşumunu engellemede önemli görev üstlenmektedir. Onun dışında resveratrolün antioksidanların, lipid ve lipoproteinlerin metabolizmasında da düzenleyici etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Pace-Asciak ve ark., 1995; Kirimlioğlu ve ark., 2006). Uguralp ve ark, (2005) tarafından yapılan bir çalışmada sıçan testislerinde iskemi reperfüzyonu oluşturularak testiste oksidatif hasara yol açılmış, fakat resveratrol verilmesi ile hasarın gözle görülür şekilde ortadan kalktığı gözlenmiştir.

Birçok eczacılık ve tıp literatürüne göre resveratrol stresin yarattığı faktörlere karşı insanlarda koruyucu olabilmektedir. Resveratrolün başta kanser olmak üzere, koroner kalp hastalıkları, Alzheimer, Diabet gibi pek çok hastalığı iyileştirici etkisi belirlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında MTX uygulanması sonrasında resveratrolün lökosit yüzdeleri, total oksidan (TOS)-antioksidan durum (TAS) ve DNA hasarı (8-OHdG) üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışma sayısı çok azdır. Bu nedenle bu çalışma ile elde edilen veriler bilimsel platforma ve klinik kullanıma sunulacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Resveratrol (Res)

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) raporuna göre, dünyada ilaç sanayinde ve baharat niyetine sofralarda kullanılan bitkilerin sayısının 20.000'e yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu bitkilerin çoğu uçucu yağ asidi içermektedir. Bazı bitki türlerindeki uçucu yağlar, bazı mayalar ve bakterilerin gelişimlerini engelleyerek yiyecekleri doğal olarak korurlar. Çin halkı uzun zamandan beri bitkilerden yaptıkları karışımları ilaç olarak kullanmışlardır. Ülkemizde de eski devirlerde şifalı olup olmadığını bilmeden denemeler sonucunda uygun görülüp, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmış birçok bitki türü vardır. Hitit döneminde kullanılan ilaç reçetelerinde bitki adlarının kullanılması, eski dönemlerde bitkilerin önemli yer tuttuğunu göstermektedir. Bu bitkilerden ticaret amaçlı üretilenlerin 500 civarında olduğu belirtilmektedir. Türk ilaç sektörüne kayıtlı 140 bitki türü vardır. Fakat ilaç sanayisinin keşfetmediği, daha çok halk tarafından tedavi amacıyla kullanılan bitki sayısı daha fazladır (Yiğit ve Benli, 2005; Çenet ve Toroğlu, 2006).

Doğadaki en önemli antioksidanlar fenolik maddelerdir. Bunlar, polifenolik komponentler olarak bilinip, bitkilerin tüm kısımlarında bulunurlar. Bitkisel fenolik antioksidanlardan en yaygın olanları flavonoidler, kumarinler, tokoferoller, sinamik asit türevleri ve fenolik asitlerdir. Bu maddeler besinlerdeki kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir (Javonovic ve ark., 1984; Shahidi ve Naczki 1995; Moure ve ark., 2001).

Resveratrol, tıp ve eczacılık sektöründe son yıllarda çok dikkat çeken, yaşlılık karşıtı özelliği tespit edilmiş güçlü bir antioksidan polifenol bileşiktir (Baxter, 2008). Resveratrol doğal bir stilben ve nonflanoid olarak en çok bulunan biyolojik aktif fenoldür ve stilben-sentaz enzimi tarafından sentezlenmektedir (Mazza, 1995). Patojen saldırısı, ultraviyole radyasyona maruz kalma, iklim değişiklikleri, ozon, ağır metaller abiyotik stres faktörleri ve hava kirliliği resveratrol sentezini arttırmaktadır (Ather ve ark., 2007).

Resveratrol, ilkin 1940'lı yıllarda akçöplüme bitkisinden (*Veratrum grandiflorum*) izole edilmiş, daha sonra Japonya'da folklorik Kojo-kon olarak adlandırılan (*Polygonum*

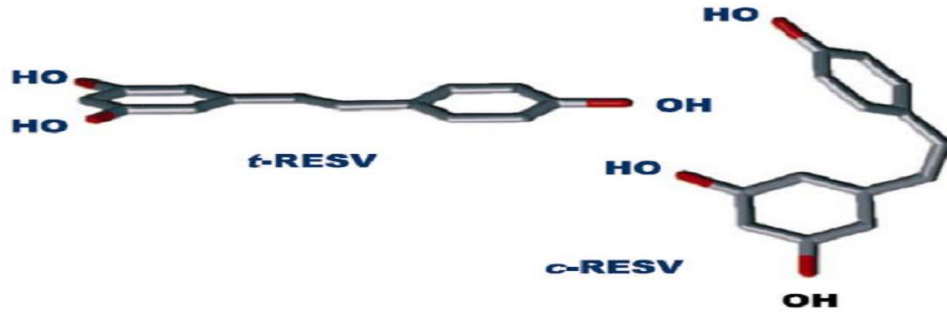
Cuspidatum) bitki kökünde ortaya çıkarılıp; supuratif dermatit, deri hastalıkları ve mantar tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır (Chachay ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada, üzümün kabuk ve dış kısmında daha çok bulunduğu tesbit edilmiş; bitkiler tarafından stres, ultraviyole ışını ve mantarlara karşı koruyucu mekanizma sırasında üretildiği tespit edilmiştir (Aggrawal ve Shishodia, 2005).

Resveratrol, üzümün yanı sıra, dut, erik, limon, kiraz, yer fıstığı, fındık gibi birçok meyve türünde, çerezlerde ve yanı sıra okaliptüs, zambak, ladin, yaban mersini ve akasya benzeri bitkilerde dâhil olmak üzere 72 türde yüksek oranda bulunur (Dong, 2003). Kökeni eski Hindistan'da yaşam bilgisi anlamına gelen Ayurveda'ya dayananan resveratrol, alternatif tıpta ve geleneksel Çin tıbbında da kullanılmıştır (Aggrawal ve Shishodia, 2005). Ayrıca Fransa'nın güneyinde doymuş yağ ve sigarayı aşırı kullananlarda kalp krizinden ölümün az olması, içilen kırmızı şaraptaki resveretrol'den kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Bu durum 'Fransız Paradoksu' olarak adlandırılmış, daha sonra tek nedenin bu olmadığı anlaşılmıştır. Bu durum resveratrolün yağların emilimini azalttığını, kanda antikoagülan etki gösterdiğini ve damarlarda vazodilatasyon sağladığını belirtmektedir (Gu ve ark., 2000; Hung ve ark., 2000).

2.1.1. Resveratrolün yapısı ve türevleri

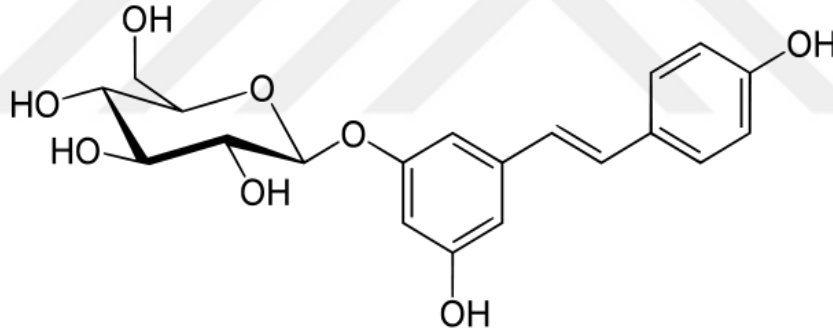
3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene kimyasal adı ile bilinen resveratrol, $C_{14}H_{12}O_3$ formülü ile gösterilir. Ağırlığı 228,25 g/mol olup; su, yağ, metanol ve asetonda kolayca çözülür. Kaynama noktası 253-255°C'dır. Hafif grimsi beyaz, katı- toz haldedir. Resveratrolün trans ve cis izomerleri vardır. Biyolojik aktivite gösteren formu trans-resveratroldür (3,5,4' trihidroksistilben) (Haneke, 2002).

Resveratrolün trans ve cis izomerlerinin (Şekil 1) yanı sıra glikolize olmuş piceid formu (Şekil 2) da vardır.



Şekil 1. Trans-resveratrol ve Cis-resveratrolün kimyasal yapısı (Haneke, 2002)

Cis-Resveratrol üzümün doğal bir bileşeni olmamasına rağmen incelemeler sonunda neredeyse bütün şaraplarda tespit edilmiştir. Bu da gösteriyor ki, orijin ve uygulanan teknolojiye bağlı olmadan, bu madde şarap üretimi sırasında trans izomerinden cis izomerine dönüşmektedir (Gerogiannaki-Christopoulou ve ark., 2006).

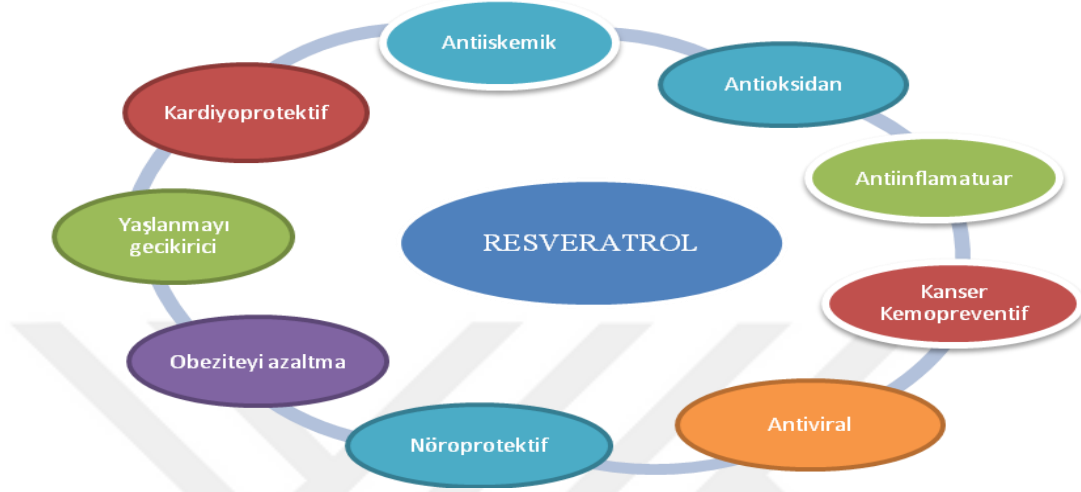


Şekil 2. Resveratrolün piceid formu (Anonymous, 2014)

Resveratrol bitkilerde çoğunlukla glikozitlenmiş (Piceid) formdadır. Resveratrol oksidatif parçalanmadan glikozitlenerek korunur (Ather ve ark., 2007). Glikolize resveratrol çok istikrarlı ve suda eriyebilir özellikte olduğundan kolayca ve yüksek oranda gastrointestinal sistemden emilir. Emildikten sonra karacigerde *trans*-resveratrol-3-*O*-glukuronit ve *trans*-resveratrol-3-*O*-sülfata metabolize olur (Signorelli ve Ghidoni, 2005).

2.1.2. Resveratrolün etkileri

Çeşitli araştırmalar sonucunda resveratrolün birçok etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Resveratrolün etki alanı çok geniş olup Şekil 3'te özetlenmiştir.



Şekil 3. Resveratrolün Etkileri (Karabulut, 2008)

Resveratrol, sirtuin (SIRT2, insan SIRT1 homoloğu) etkinleştirici olarak protein ve gen ailesinde önemli bir yer tutar (Moynihan ve ark., 2005). SIRT1 DNA tamir geni olarak bilinir. Sirtuinler metabolizmayı düzenlemede, kanseri ve yaşlanmayı engellemede ve uzun yaşamada strese bağlı sinyal transdüksiyon yollarında kritik bir bağlantıya sahip olup, sessiz ve önemli bir düzenleyici olarak görev alır (Milne ve ark., 2007). Sirtuinler DNA onarım enzimlerini deasetile ederek aktifleştirir ve DNA'yı sabitleştirir. Bunların yokluğunda ise DNA hasar görmeye yatkın hale gelir. Dolayısıyla bu mekanizmaları başlatan resveratrol sirtuinler üzerinden yaşamı uzatabilir (Kumar ve ark., 2007).

Resveratrolün ömür uzunluğunu artırıcı etkisini belirlemeye yönelik yapılan araştırmalara göre, alınan resveratrol miktarına bağlı olarak, resveratrolün; mayalarda (*Saccha romyces cerevisiae*), iplik kurtlarında (*Caenorhab ditiselegans*), meyve sineklerinde (*Drosophila melanogaster*), balıkların bazı türlerinde ve obez farelerde yaşam süresini (ömür uzunluğunu) sırası ile; %70, %29, %24, %50 ve %31'e varan oranlarda artırdığını belirlemişlerdir (Howitz ve ark., 2003; Baur ve ark., 2006).

Resveratrolun, güçlü antioksidan özelliği sayesinde serbest radikallerin yol açtığı hücre yaralanmalarını engellemeye yardımcı olmakla beraber yağların yükseltgenmesi sonucu bozulmasını ve buna bağlı hücre ölümünü engellediği bilinmektedir (Frankel ve ark., 1993; Jang ve ark., 1997; Tedesco ve ark., 2000; Mizutani ve ark., 2001; Wang ve ark., 2002) Ayrıca iyi çözünebilirlikleri sayesinde C ve E vitaminlerinden daha etkili bir koruma yapabildiği, trombosit kümeleşmesini kontrol edebildiği ve damar sertliğini engellediği de ifade edilmiştir (Weindruch, 2003).

Yapılan bir araştırmada (Weindruch, 2003), resveratrolle beslenen farelerin yaşlanmayla ilişkili genetik aktivitelerinde değişim olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmada resveratrol'ün kalp fonksiyonlarındaki yavaşlamayı büyük oranda durdurduğu anlaşılmış ve kronik kalp yetmezliği riskini azaltabileceği ifade edilmiştir. Arichi ve ark, (1982) ile Kimura ve ark, (1983) fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarda, resveratrolün karaciğerde yağlanmayı önlediğini belirlemişlerdir. Bununla birlikte resveratrolün, midede ülser, gastrit ve kanser gelişimine neden olan *Helicobacter pylori*'nin gelişimini ve meme kanseri hücrelerinin büyümesini engellediği bildirilmiştir (Mahady ve Pendland, 2000). Prostat kanseri hücrelerinde ise androjenleri bloke ettiği vurgulanmıştır (Narayanan ve ark., 2002). Ayrıca kemikteki kanser hücrelerinin metastazını bloke ettiği de bildirilmektedir (Frankel ve ark., 1993).

Son yıllarda yapılan araştırmalar resveratrolün nitrik oksit (NO) sentezini uyardığı ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Resveratrol, doza bağlı olarak plazma NO düzeylerini arttırmış ve hücre zedelenmesini de yine verilen doza bağlı olarak azaltmıştır (Ray ve ark., 1999; Naderali ve ark., 2000; Hung ve ark., 2000; Giovannini ve ark., 2001). Orta serebral arter oklüze edilerek oluşturulan yerel beyin iskemisi sonrasında da resveratrolün oluşan nekrotik alanı küçülttüğü gösterilmiştir. Bu etkiyi antioksidan, antikuagülan ve vazodilatasyon özellikleri sayesinde sağladığı ileri sürülmüştür (Huang ve ark., 2001).

2.2. Metotreksat (MTX)

Metotreksat (MTX) kemoterapötik bir ajan olup, hematolojik hastalıkların çoğunda, romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarda, meme kanseri, osteosarkom ve akciğer kanserinin tedavilerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MTX ayrıca antimetabolit

olarak sedef ve multiple skleroz gibi hastalıkların sağaltımında da kullanılmaktadır (Abolmaali ve ark., 2013). MTX hücre bölünmesini yavaşlattığından dolayı kanser sağaltımında uzun yıllardır kullanım alanı bulmuştur. Yapılan araştırmalara göre, ilacın oral ve intravenöz uygulamalarında santral sinir sistemi hariç bütün dokulara dağılabildiği görülmüştür (Işık ve ark., 1997). MTX'in hastadaki tedavi edici etkileri ile yan etkileri hastalarda değişkenlik gösterebilir (Widemann ve Adamson, 2006).

MTX, hücre replikasyonu sırasında sentez fazındaki hücreleri etkileyip dihidrofolat redüktaz enzimine bağlanarak, tetrahidrofolat enzimini inhibe eder ve bu sayede pürin ve pirimidin yapımı gerçekleşmez (Chabner ve ark., 1985), aminoasitlerin sentezinde azalmaya neden olur ve böylece NO ve protein sentezini önler (Bruton ve ark., 2009).

MTX, yüksek dozda verildiğinde bilinç düzeyinde bozukluklarına neden olmaktadır. Gelişen yan etkilerin çoğunda metotreksat verilmesiyle tetiklenen oksidatif stresin rolü olduğu bildirilmektedir (Caron ve ark., 2009).

2.2.1. Metotreksat' ın yan etkileri

Akut MTX toksisitesinde; enjeksiyondan sonraki 2-4 saat içerisinde başağrısı, ense sertliği, mide bulantısı, kusma ve ateş görülebilir. Bazen bacaklara yayılan ilerleyen bel ve bacak ağrısı, akabinde his kayıpları ve belden aşağısında felç, barsaklarda ya da idrar kesesinde fonksiyon bozukluğu ile beyinde ve omirilikte demiyelinizasyon şekillenebilir. Tranvers myelopati genellikle birkaç enjeksiyondan sonra oluşabilir, bu nedenle intratekal MTX tedavisinin nadir komplikasyonu olarak değerlendirilir (Brock ve Jennings, 2004). MTX, pürin ve pirimidin sentezini inhibe ederek DNA defektlerine de yol açabilir ve bu durum apoptozisle sonuçlanır (Uraz ve ark., 2008). Romatoid artritli hastalarda MTX tedavisi sonrası yapılan karaciğer biyopsisinde, folat azlığının yanı sıra, MTX poliglutamatlarının biriktiği de rapor edilmiştir (Kremer ve ark., 2009).

Genel olarak, kemoterapötiklerin büyük çoğunluğu mide bulantısına, kusmaya, anoreksiyaya, mukozite, kabızlık ya da diyareye neden olabilmektedir. Ayrıca kemik iliğinde miyelosupresyon, kanda; anemi, nötropeni, trombositopeni gibi etkilere de yol açar. Karaciğerde: karaciğer enzimlerinin yükselmesi, ağrı, karaciğer büyümesi gibi değişikliklere de neden olur. Böbreklerde; idrar kesesinde kanama, az idrar çıkarma, idrar

çıkarmada güçlük, kreatininde artış, hiperürisemi belirtilerini gösterir. Deride, kıl dökülmesi, kulakta eritem, hiperpigmentasyon, tırnaklarda anormallikler, ışığa duyarlılık görülen semptomlar arasındadır (Baquiran ve Gallagher, 2001).

2.3. Lökositler

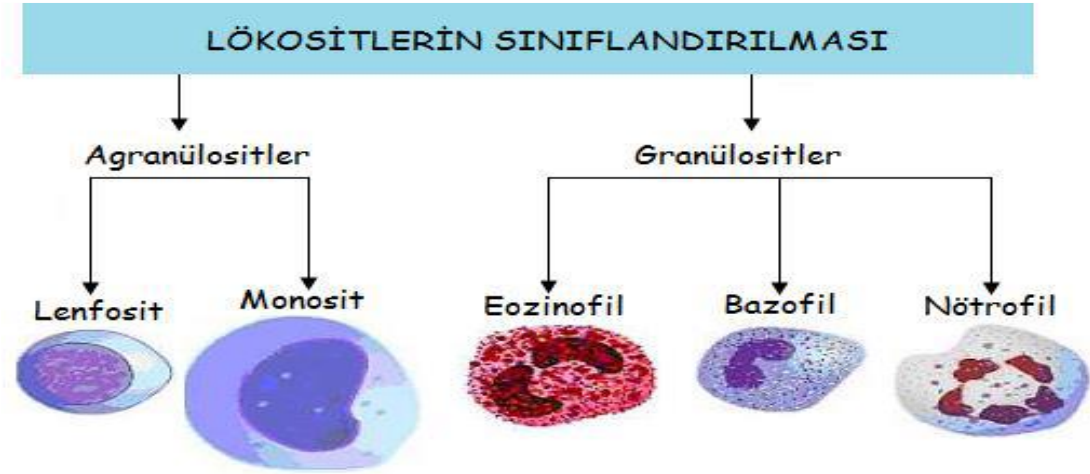
Lökositler; organizmayı yabancı etkenlere karşı koruyan ve aktif hareket edebilen kan hücrelerinden biridir. Beyaz kan hücreleri ya da akyuvar olarak da isimlendirilirler ve çekirdek içerirler. Fizyolojik olarak kanda birim hacimde (mm^3) toplam lökosit sayısı 4000- 10.000 arasında değişiklik gösterir. Klinik olarak sayıları 4000'den az olursa lökopeni, 10.000'den fazla olursa lökositoz ismini alırlar.

Lökositlerin yapım yeri, kırmızı kemik iliği, lenfoid organlar (dalak, timus, bademcik) ile ve lenf bezleridir. Lökositler ihtiyaç durumunda kana verilmek üzere kemik iliğinde depo edilirler. Akut yangılarda olduğu gibi, gerekli durumlarda, kemik iliğinde depo edilmiş lökositler dolaşım kanına verilerek sayıları hızla bir şekilde artar ve normal sayılarının birkaç katına çıkabilir.

Lökositlerin kandaki yaşam süreleri 1-2 saat (granülositler) ile 100-200 gün (lenfositler) arasında olabilir. Bununla birlikte yangı durumlarında ise 2-3 saatten birkaç güne kadar değişim gösterebileceği anlaşılmıştır.

Lökositler, fagositoz yapabilme yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle çeşitli yollarla vücuda giren mikroorganizmaları, ölü doku artıklarını ve yabancı maddeleri sindirerek vücuttan uzaklaştırabilirler (Yakar K, 2005; Özden M, 2012).

Lökositler sitoplâzmalarında granül bulundurmalarına (granülositler) ya da bulundurmamalarına (agranülositler) göre iki gruba ayrılırlar (Şekil 4).



Şekil 4. Lökositlerin sınıflandırılması (Yakar K, 2005; Özden M, 2012).

2.3.1. Granülositler

Bu lökositler sitoplâzmalarında boya alabilen granül taneciklerine sahiptirler. Üretim yerleri kırmızı kemik iliğidir. Nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller bu grupta yer alan lökositlerdir (Yakar K, 2005; Özden M, 2012).

Nötrofiller, çekirdekleri parçalı olup tüm lökositlerin nötrofiller canlılarda % 70'ini, lenfositler canlılarda %30 unu oluştururlar. Fagositoz yetenekleri en güçlü olan granülositlerdir. Fagositoz yetenekleri sayesinde organizmaya yabancı maddelere karşı savunma yapan hücrelerdir. Özellikle bakteriyel enfeksiyonlara karşı vücudun ilk savunma hattını oluştururlar. Ayrıca ölü dokuları ve artık maddeleri fagositoz yoluyla vücuttan uzaklatırırlar (Atay, 1997; Yılmaz, 2000; Schwartzberg, 2006; Dincol ve ark., 2006).

Nötropeni, genel tanımlamada periferik kandaki nötrofil sayısının normal sınırın altına düşmesidir (Akova ve ark., 2004). DSÖ'ye göre normal nötrofil sayısının $2.000/\text{mm}^3$ 'ün altına düşmesi (İliçin ve ark., 1996; Shelton, 2003) yada mutlak nötrofil sayısının $500-1000/\text{mm}^3$ 'ün arasında olmasını nötropeni olarak tanımlanır (Özdemir ve Taçyıldız, 2004).

Nötropenin en yaygın nedenleri kemoterapi, radyoterapi, ilaç zehirlenmesi ve hipersensitivitedir. Kemoterapik ajanlar: normalde vücuttaki kanserli hücreleri yok etmeleri nedeniyle yararlı iken, normal hücreleri de öldürerek zarar verebilirler. Kemoterapiden en çok etkilenen hücreler, bölünme yeteneği hızlı olanlardır. Bunlar

arasında özellikle, kemik iliği, gastrointestinal sistem, epitelyum ve saç folikül hücreleri yer alır (İliçin ve ark., 1996; Şenol, 2004).

Kemoterapilerin en sık görülen yan etkisi kemik iliğinin baskılanmasıdır ve ölümcül olabilir. Kemik iliği baskılanmasıyla anemi, trombositopeni ve lökopeni tabloları ortaya çıkar. Kemoterapi sonrası baskılanan kemik iliği nedeniyle hastalarda azalan nötrofil sayısı (Nötropeni) nedeniyle oluşabilen enfeksiyon en ölümcül yan etkidir (İliçin ve ark., 1996; Şenol, 2004).

Eozinofiller, alerjik reaksiyonlarda, deri ve paraziter hastalıklarda görev alan lökositlerdir. Çekirdekleri genellikle iki parçalıdır ve diğer granüositlere göre daha az fagozitoz yaparlar. Sayıları total lökositlerin % 2- 3'ü kadardır.

Bazofiller, yapılarında bol miktarda heparin, histamin ve serotonin taşırlar. Histamin ve serotonin kan damarları aktivitesi üzerine etkili maddelerdir. Bazofiller yalnızca alerjik reaksiyonlarda görev alırlar. Tüm lökositlerin % 0,4'ünü oluştururlar.

2.3.2. Agranüositler

Yapılarında granül bulundurmayan lökositlerdir. Monosit ve lenfosit olmak üzere iki türü vardır.

Monositler, kırmızı kemik iliğinde üretilir ve bazı durumlarda dokular arasına geçerek 'doku makrofajları' adını alırlar. Makrofajlar, güçlü fagozitoz yetenekleri sayesinde, bakteri, mantar, protezolar ile büyük virüsleri yok ederler. Tüm lökositlerin % 5,3'ü monositlerden oluşur (Yılmaz, 2000).

Lenfositler, vücudun bağışıklık sisteminde görev alan lökositlerdir. Üretim yerleri lenfoid organlardır. Fagozitoz yapamazlar. İki alt gruba sahiptirler. T lenfositler, hücrel bağışıklıkta görev alırken, B lenfositler humoral bağışıklıkta görev almaktadır (Yakar K, 2005; Özden M, 2012). Sayıları lenfosit türlerde tüm lökositlerin % 70'i, nötrofil canlılarda %30'u kadardır (Yılmaz, 2000).

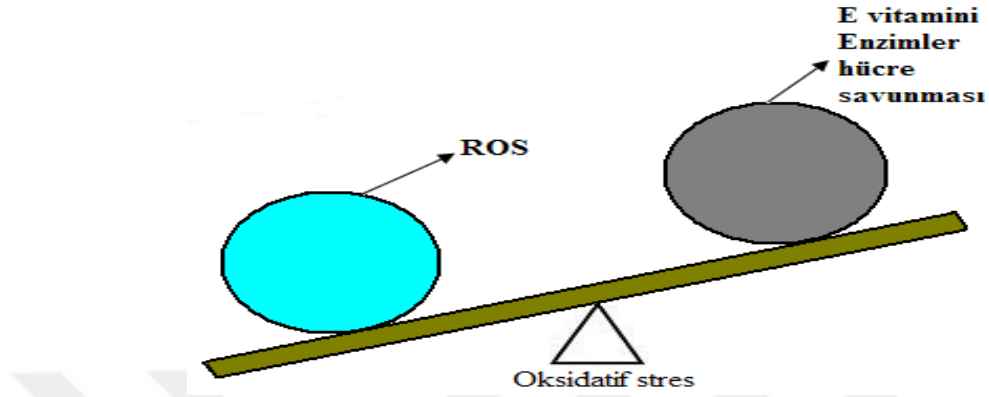
2.4. Oksidanlar ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, atomların orbital kısımlarında bulunan eşlenmemiş elektron taşıyan vücutta metabolizma sırasında oluşan son derece etkin kimyasal moleküllerdir (Halliwell, 1994; Young ve Woodside, 2001). Kararsız bir yapıları vardır ve bu nedenle diğer organik ve inorganik moleküllerle reaksiyona girebilirler. En önemli serbest radikaller, oksijen kullanılan organizmalarda fizyolojik olarak oluşan reaktif oksijen türleridir (ROS). Yapılan bazı çalışmalarla, bir çok kemoterapik ajanın hem canlı hücrede hem de yapay ortamda serbest radikal üretimine neden oldukları gösterilmiştir (Weijl ve ark., 1997; White ve ark., 2006; Simone ve ark., 2007; Crohns ve ark., 2009). Radyoterapi ve bazı sitotoksik ajanlar serbest radikal üretimine neden olarak hücre ölümüne yol açmakta, antioksidanlar ise serbest radikaller ile bunlara bağlı gelişen oksidatif reaksiyonları azaltmaktadırlar (Prasad ve ark., 2002; Simone ve ark., 2007).

ROS'ların yaşam süreleri çok kısadır ve miktarca düşük yoğunluklarda bulunurlar. Buna karşılık hücre bileşenleri ile etkileşime girebilen, çok aktif yapılı zararlı bileşiklerdir. ROS'lar proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek, yapısal ve fonksiyonel değişiklikler yaparlar. Yaptıkları bu değişikliklerle; protein sarmalında kesilmeye, oksidasyona, kromozom kırılmalarına, köprüleşmeye (protein- protein bağlantısı, proteinlipid bağlantısı), malign değişikliklere, mutasyonlara hatta hücre ölümüne neden olurlar (Schoenberg ve Beger, 1990; Sinclair ve ark.,1990).

Serbest radikaller hücrede meydana gelen enzimatik olaylar sırasında enzimlerin aktif yerinde ara ürün olarak sürekli oluşmaktadırlar. Bazen enzimlerin aktif yerinden serbest radikal sızıntısı olmakta, sızan serbest radikal molekülleri oksijenle yanlışlıkla etkileşerek ROS oluşturmaktadırlar. Hücrede oluşan ROS'lar, antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılırlar. Bazı durumlarda ise antioksidanların kaldırabileceğinden daha fazla ROS oluşabilir. Oluşan bu duruma oksidatif stres denir ve bu durum sonucunda doku hasarı meydana gelir (Akkus, 1995). Bununla birlikte plazmadaki serbest radikal reaksiyonlarında katalizör görevini üstlenen demir iyonu da oksidatif hasara neden olabilmektedir (Weijl ve ark., 1997). Resveratrolün oluşan süperoksit radikallerini ve diğer ROS'ların oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Olas ve ark., 2001).

Diğer bir deyişle oksidatif stres, biyolojide oksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin, antioksidanlar aleyhine yada oksidanlar lehine bozulması olarak ifade edilir (Şekil 5) (Bhuvaramurthy ve ark., 1996).



Şekil 5. Oksidatif Stres (Bhuvaramurthy ve ark., 1996).

Oksidan ve antioksidanları ayrı ayrı ölçebilen çeşitli yöntemler vardır (Martinez, 2002). Fakat bu moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesi zaman alıcı olması ile birlikte, pahalı ve zordur. Bu nedenle total oksidan (TOS) ve total antioksidan (TAS) ölçümü yapmak hızlı ve uygun bir yöntemdir. Bir örnekteki oksidan ve antioksidanların ayrı ayrı belirlenmesinden daha pratiktir (Asher ve ark., 1995; Bjorksten ve ark., 1998).

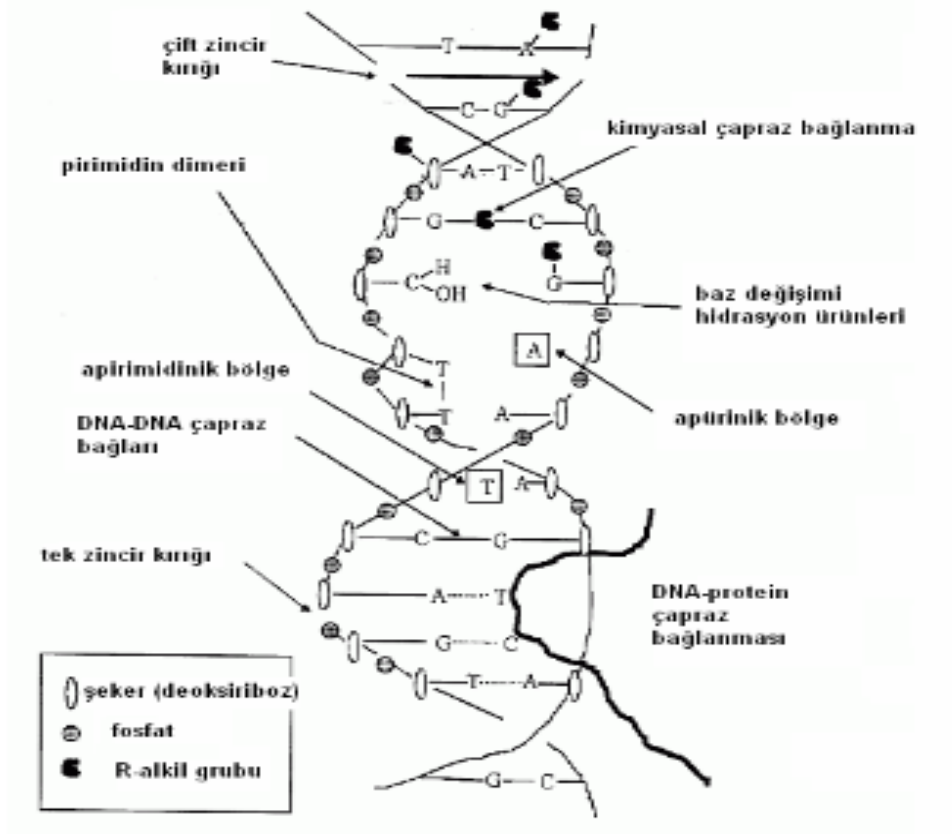
TAS ölçümü bir örnekteki antioksidanların toplamını belirler. TAS ölçümü için geliştirilen birçok metod vardır. Bu metodlarda genel prensip oluşturulan bir radikale karşı numunede varolan antioksidanların varlığının belirlenmesidir. Bunlar arasında 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (=ABTS) ölçümü en çok kullanılan kolorimetrik yöntemdir. (Asher ve ark., 1995).

Oksidatif stres indeksi (OSI), TOS değerinin TAS değerine oranı ile hesaplanır (Erel, 2004; Erel, 2005).

2.5. DNA Hasarı (8-OHdG)

Oksidatif stresin hücre hasarına lipidler, proteinler ve DNA üzerinde yaptığı değişikliklerin neden olduğu bilinmektedir (Dizdaroglu, 1994; Dandona ve ark., 1996). DNA'daki oksidatif hasara neden olan başlıca etkenler: İyonize radyasyon, yüksek oksijen

yoğunluğu, radikal zincir reaksiyonuna uğrayan kimyasallar (adrenalin, dopamin), dioksopurin oksidaz ve substratları ile TNF- α 'dır (Halliwell ve Gutteridge, 1999). ROS'lar, DNA'da farklı mekanizmalar ile oksidatif hasara neden olurlar (Şekil 6) (Valko ve ark., 2007).



Şekil 6. DNA'da meydana gelen oksidatif hasarlar (Valko ve ark., 2007)

DNA'da ROS tarafından oluşan oksidatif hasar, erken yaşlanmaya, kanserlere, kardiyovasküler sistem hastalıklarına, bağışıklık sistemin baskılanması sonucu oluşan hastalıklara, doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan dejeneratif hastalıklar gibi hastalıkların belirteci veya temel nedeni olarak görülmektedir (Dizdaroglu, 1994; Dandona ve ark., 1996). Çok düşük düzeyde de olsa, sağlıklı bireylerde de DNA hasarı ve onarımı olmaktadır (Randerath ve ark., 1997).

DNA'daki oksidatif hasarın direk göstergesi olarak kabul edilen 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ölçümü, DNA'da oluşan oksidatif hasarı belirlemede kullanılan en sık yöntemdir (Halliwell, 1999). 8-OHdG, 8-Hidroksiguanin (8-OHGua)'nin

deoksiriboza bağlanmış hali olan bir modifiye nükleozit ve ekzonükleazlar olarak adlandırılan enzimlerin okside olmuş DNA'yı onardığında ekstrakte edilen bir baz modifikasyonudur (Shigenaga ve Ames, 1991; Loft ve ark., 1992; Halliwell ve ark., 1997).

8-OHdG, ROS'lar tarafından DNA üzerinde yapılan ve en sık görülen yaklaşık 100 tane oksidatif baz hasar ürününden biridir. Mutajenitesi en iyi bilinenidir (Fraga ve ark., 1990; Loft ve Poulsen, 1999). Oksidatif DNA hasarının bir belirteci olarak Kasai ve Nishiura (1984) tarafından tespit edilmiştir. 8-OHdG, DNA onarım enzimleri tarafından kesilerek uzaklaştırılır, periferik dolaşıma geçer ve idrarla atılır. Lökosit DNA'sında bulunan 8-OHdG, serum ve idrarda bulunan 8-OHdG oksidatif stres markeri olarak değerlendirilmektedir (Halliwell, 1999; Cooke ve ark., 2003; Evans ve Cooke, 2004). ROS'lar DNA bileşenleri içerisinde guanini hedef alırlar, çünkü guanin en düşük ayrıştırma potansiyeline sahip bileşendir (Hirano ve ark., 1996).

Genetik meteryal üzerindeki çevresel etmenlerin tehtidi ile bazı hücrel olaylar (DNA Replikasyonu) DNA üzerinde değişikliklere neden olurlar. DNA'da oluşan hasar; mutasyona, kansere, yaşlanmaya ve sonuçta hücre ölümüne neden olabilen bir durumdur. Yaşam boyunca ROS'lar ve ekzojen ajanlar nedeniyle DNA'da sürekli olarak değişiklikler oluşabilmektedir. Bu değişiklikler, çok hücreli canlılarda yaşlanmaya ve gerilemeye, tek hücreli canlılarda da hücrel ölüme neden olabilir (Sancar ve ark., 2004; Rupp, 2006).

DNA'da oluşan oksidatif hasar iki hipoteze dayanır (Halliwell ve Aruoma, 1991). Her iki hipotezinde canlılar için geçerli olduğu kabul görmektedir. Oksidatif stresin sebebine ve hücrenin türüne göre mekanizmalardan biri diğerinin önüne geçmektedir. Reaksiyon hızı, mekanizması ve baz modifikasyonunun türü transisyon metal iyonlarının varlığından etkilenmektedir (Milligan ve Ward, 1994).

Fenton Kimyası hipotezinin kullanımı 1960'lardan sonrasına rastlamaktadır. Bu reaksiyon, asidik şartlar altında Fe^{+3} iyonunun ve diğer geçiş iyonlarının H_2O_2 ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Reaksiyon sonucu en reaktif ve zarar verici ROS olan hidroksil (OH^-) radikalleri oluşmaktadır (Akkuş, 1995). DNA'ya saldıran OH^- radikalleri hasar oluşturur. Fakat süperoksit (O_2^-) gibi H_2O_2 'de DNA'da direk hasar oluşturmaz. OH radikalinin DNA' da direk etki oluşturabilmesi için ya DNA'da ya da çok yakınında gerçekleşmesi zorunludur. OH radikalinin reaktivitesi çok yüksek olduğu için hücre içinde

diffüze olması ve nükleusa geçmesi ihtimali çok azdır. Fakat membranı geçebildiği durumlarda H₂O₂'nin nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyona girer (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları) ve hidroksil radikallerini oluştururlar (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Bununla birlikte oksidatif stres, nükleaz aktivasyonu reaksiyonuna göre; sitozolik Ca²⁺ iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa sebep olur. Bunun sonucunda nükleustaki Ca²⁺ bağımlı endonükleazları aktive eder, DNA'da fragmentasyon ve kimyasal değişiklikler görülür (Milligan ve Ward, 1994). Dal kırıklıkları DNA'da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyondur. DNA onarımı esnasında nükleaz aktivitesi ile oluşabilmektedir. Bu nedenle her zaman oksidatif DNA hasarının sonucu olarak görülmemektedir (Evans ve Cooke, 2004).

Zastawny ve ark (1995) doku kültür ortamında yaptıkları çalışmada oksidatif DNA baz hasarının Fe³⁺ ve Cu²⁺ iyon yoğunluğu ile pozitif ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, bakır ve demir çelatörleri (deferoksamin) kullanımının H₂O₂'ye maruz kalan hücrelerde DNA'nın oksidatif hasarını azalttığını bildirmişlerdir. Halliwell ve Gutteridge (1999) da, DNA'yı oksidatif hasardan korumak için radikal temizleyicilerinin ve demir çelatörlerinin birlikte kullanılmalarının gerekli olduğunu; Milligan ve Ward (1994) ise, Ca²⁺çelatörlerinin kullanımı ile DNA hasarının engellenebildiğini ifade etmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan materyali

Bu çalışmada kullanılan ratlar, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edildi. Toplam 40 adet, 8-9 haftalık, 250-300 g ağırlığında Wistar Albino rat kullanıldı. Ratlar deneme süresince 12 saat karanlık/aydınlık ve 22±2°C sıcaklık odalarda, önlerinde sürekli olarak taze su ve yem bulunan kafeslerde barındırıldı.

Bir haftalık adaptasyon süresinin sonunda hayvanlar her biri 10 rattan oluşan rastgele 4 gruba ayrıldı: Kontrol grubu (1.grup) , Metotreksat grubu (2.grup), Resveratrol grubu (3.grup), Metotreksat+Resveratrol grubu (4.grup).

1) Kontrol grubu (10 rat): Kontrol grubuna intraperitoneal (i.p) olarak haftada bir kez toplamda 2 doz serum fizyolojik enjekte edildi.

2) Metotreksat grubu (10 rat): Bu gruptaki ratlara haftada bir kez toplamda 2 kez 20 mg/kg dozunda Metotreksat i.p. yoldan uygulandı.

3) Resveratrol grubu (10 rat): Bu gruptaki ratlara 40 mg/kg/gün dozunda resveratrol içme sularına 14 gün boyunca ilave edildi ve i.p. olarak haftada bir kez toplamda 2 kez serum fizyolojik enjekte edildi.

4) Metotreksat+Resveratrol grubu (10 rat): Bu gruptaki ratlara haftada bir kez toplamda 2 kez 20 mg/kg dozunda Metotreksat i.p. yoldan uygulandı ve 40 mg/kg dozunda resveratrol içme sularına 14 gün boyunca ilave edildi.

14 gün süren çalışmanın son günü Metotreksat grubundan 2 ve Metotreksat+Resveratrol grubundan 1 adet olmak üzere toplam 3 rat ex oldu. Ex olan ratlar çalışmaya dâhil edilmedi.

3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler

Cerrahi makası

Çoklu pipet (Thermo)

Derin dondurucu (İndesit)

EDTA' lı tüp

ELISA okuyucu (Stat Fax 2100, USA)

ELISA yıkayıcı (Stat Fax 2600,USA)

Ependorf tüp

Etüv (Nüve EN 400)

Jelli tüp

Lam

Lamel

Mikroskop (Olympus)

Otomatik pipetler (Eppendorf)

Pens

Soğutmalı santrifuj (Hettich, Universal 320 R)

Spektrofotometre (Shimadzu)

Yazıcı (Epson, LX-300+II)

Yeşil uçlu enjektör

3.1.3. Kimyasal maddeler

DNA hasar (8-OHdG) ELISA Kit (Bioassay Technology Laboratory)

Giemsa (Sigma-Aldrich)

İmmersiyon yağı (Sigma-Aldrich)

Ketamin HCl, (Ketalar, Pfizer)

Metotreksat (Methotrexate, Koçak Farma),

My Grünwald (Sigma-Aldrich)

Resveratrol (Solgar, USA)

TAS Kit (Rel Assay),

TOS Kit (Rel Assay),

3.2. Yöntem

3.2.1. Kan örneklerinin alınması

Deneme sonunda 10mg/kg ksilazin HCl ve 75mg/kg ketamin HCl ile anestezi altındaki ratların kalplerinden enjektör yardımı ile alınan kan örnekleri antikoagülanlı ve antikoagülanlı tüplere koyuldu. Antikoagülanlı (EDTA) tüplerden lam üzerindeki alınan bir damla kan ile yayma kan preparatı hazırlandı. Antikoagülanlı tüplere alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra elde edilen plazmalar eppendorf tüplere alındı. Serumlar analizlerin yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda -20 °C'de muhafaza edildi. Tam kanda lökosit yüzdeleri klasik yöntemle; serumda TOS, TAS değerleri kolorimetrik kitlerle ve 8-OHdG değerleri ise ELISA kiti ile belirlendi.

3.2.2. Yayma kan preparatı (Froti) hazırlanması ve boyanması

- Antikoagülanlı tüplerden alınan bir damla kan, lamın kenarına koyuldu. Lam sol elin baş ve işaret parmakları arasında yatay bir şekilde tutuldu.
- Sağ elin baş ve işaret parmakları arasına alınan lamel kan damlasının ön kısmına 45° lik açı yapacak şekilde koyuldu. Lamel geriye doğru çekilip, kanın lamelin kenarı boyunca yayılması için beklendikten sonra aynı açı ile ileri doğru hareket ettirerek kan ince bir tabaka hâlinde yayıldı.
- Kan hücrelerini tespit etmek için preparatların üzerlerini kaplayacak kadar May Grünwald boyası damlalık yardımı ile döküldü ve 3-5 dakika beklenildi.
- Lamın kenarından tutarak üzerindeki May Grünwald boyasının dökülmesi sağlandı ve distile su ile yıkandı.

- Preparatların üzerini örtecek şekilde 1/5 oranında distile su ile sulandırılan Giemsa boyası döküldü ve 25-30 dakika beklendi.
- Preparatın kenarından tutularak Giemsa boyası döküldü, distile su ile yıkandı. Kuruması için beklendi.
- Işık mikroskopunda 100 lük objektifte immersiyon yağı kullanılarak incelendi (Yılmaz, 2000).

3.2.3. Total oksidan durum (TOS) tayini

Serum TOS düzeyleri spektrofotometre (Shimadzu) de total oksidan status test kiti (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak tayin edildi.

Prensip: Örnekte bulunan oksidan varlığı, ferrus (Fe^{2+}) iyon şelat komplekslerini ferrik (Fe^{3+}) iyona okside eder. Oksidasyon reaksiyonu ortamda kendiliğinden bulunan arttırıcı moleküller (gliserol) tarafından uzatılır. Fe^{3+} iyonu asit ortamda ksilenol (kromajen) ile renkli bir bileşik oluşturur. Bu rengin yoğunluğu örnekteki oksidan moleküllerin miktarı ile orantılıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçüm sonucu $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalent/L olarak ifade edilebilir ve H_2O_2 ile kalibre edilebilir (Erel, 2005).

Testin yapılışı:

- 75 μl örnek ya da standart farklı küvvetlere koyuldu.
- Örnek ya da standartın üzerine 500 μl Reaktif 1 eklendi ve karıştırıldı.
- 37 °C'de 30 sn inkübe edildi, 530 nm de okutuldu ve ABS değeri A1 olarak yazıldı.
- 25 μl Reaktif 2 eklendi, karıştırıldı,
- 37 °C 5 dk inkübe edildi, 530 nm de okutuldu ve ABS değeri A2 olarak yazıldı.

Hesaplama: $A2-A1=ABS$

Sonuç: $(ABS \text{ örnek}/ABS \text{ standart}) \times 10 \mu\text{l}$ (standart konsantrasyonu)

Normal değerler: 4-6 $\mu\text{mol/L}$

AMR Linearity: 0-37.5 µmol H₂O₂ ekivalent/L

3.2.4. Total antioksidan durum (TAS) ölçümü

Serum TAS düzeyleri spektrofotometre (Shimadzu) de total antioksidan status test kiti (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü.

Prensip: örnekteki antioksidanlar koyu mavi teşil renkli ABTS radikallerini renksiz ABTS formuna dönüştürür. 660 nm deki ABS değişimleri örneklerin total antioksidan seviyeleri ile ilişkilendirilir. Ölçüm bir Vitamin E analogu olan Trolox Ekivalent olarak isimlendirilen sabit standart antioksidan ile kalibre edilebilir. Ölçüm sonuçları mmol Trolox ekivalent/L olarak ifade edilir (Erel, 2004).

Testin Yapılışı:

- 30 µl örnek, standart ve su farklı küvetlere koyuldu.
- Üzerlerine 500 µl Reaktif 1 eklendi ve karıştırıldı.
- 37 °C 30 sn inkübe edildi, 530 nm de okutuldu ve ABS değeri A1 olarak yazıldı.
- 75 µl Reaktif 2 eklendi, karıştırıldı,
- 37 °C' de 5 dk. inkübe edildi, 660 nm de okutuldu ve ABS değeri A2 olarak yazıldı.

Hesaplama: A2-A1=ABS

Sonuç: [(ABS H₂O-ABS örnek)]/[(ABS H₂O-ABS standart)]

Normal değerler: 1.20-1.50 mmol/L

AMR Linearity: 0-2.75 mmol Trolox Equivalent/L

3.2.5. Oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanması

Oksidatif stres indeksi = (TOS/TAS)×0.1 formülü ile hesaplandı ve IU olarak ifade edildi (Erel, 2005).

3.2.6. DNA hasarı (8-OHdG) belirlenmesi

Serumda 8-OHdG düzeyi ELISA kiti (Bioassay Technology Laboratory) kullanılarak belirlendi. Kit, ELISA cihazında (Awareness Stat Fax 2100, USA) çalışıldı.

Testin prensibi: Bu kit rat 8-OHdG yi ölçmek için biotin kaplı antikor sandwich teknolojisini temel alan ELISA yı kullanır.

Analiz Aralığı:0.05ng/ml-20 ng/ml

Duyarlılık:0.027 ng/ml

Testin Yapılışı:

Reaktifler, numuneler ve standart üreticinin talimatına göre hazırlandı.

1. Standart solusyonun dilüsyonu: S1 den S5 e kadar eppendorf tüpler numaralandırıldı ve 120 µl standart sulandırıcı koyuldu. Standart stok solusyonundan 120 µl S5 tüpüne, S5' den S4' e, S4' den S3' e, S3' den S2' ye, S2' den S1' e koyuldu. Her transfer sonrası tüpler iyice karıştırıldı ve Tablo 1' deki son standart oranları elde edildi.

	Standart	S5	S4	S3	S2	S1
ng/ml	24	12	6	3	1.5	0.75

Tablo 1. Standart solusyonun dilüsyonu

2. Örnekler ve test için kullanılacak kuyucuklar belirlendi.
3. Standart ve örneklerin koyulması:
 - Standart solusyon kuyucukları: 50 µl standart ve 50 µl streptavidin –HRP.
 - Örnek kuyucukları: 40 µl örnek ve 10 µl 8-OHdG antikorları, 50 µl streptavidin-HRP eklendi.
 - 37°C' de 60 dakika inkübe edildi.
4. Yıkama solusyonun hazırlanması: Yıkama solusyonu (30X) distile su ile sulandırıldı.

5. Yıkama: Elisa yıkayıcı ile plate deki sıvı uzaklaştırıldı, her kuyucuk yıkama solusyonu ile dolduruldu. 30 saniye bekledikten sonra sıvı uzaklaştırıldı. Bu prosedür 5 kez tekrar edildi.
6. Renk değişimi: Her kuyucuğa önce 50 µl kromojen A, sonra 50 µl kromojen B solusyonu eklendi. Yavaş bir şekilde karıştırıldı. Işıktan koruyarak 37°C’de 10 dakika inkübe edildi.
7. Durdurma: Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 50 µl Stop solusyonu eklendi.
8. Analiz: Stop solusyonunu ekledikten sonra 10 dk. içinde, kör kuyucuk sıfır olarak alınarak her kuyucuğun 450 nm dalga boyundaki absorbansı (ABS) ölçüldü.
 - Kör kuyucuk: Sadece kromojen solusyon A, B ve stop solusyonu eklendi.

Sonucun hesaplanması:

Standart konsantrasyonları ve ABS değerlerine ile örneklerin ABS değerlerine göre konsantrasyonları hesaplandı.

3.3. İstatistik Analizi

Üzerinde durulan özellikler için tamamlayıcı istatistikler: Ortalama ve Standart Sapma olarak ifade edildi, her bir ölçülen değişken için tek yönlü Varyans Analizi (ANOVA) sonuçları verildi. Dört grup arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunduğunda, hangi grubun farklı olduğunu belirlemek için ‘Duncan’ çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Hesaplamalar SAS istatistik programında yapıldı.

4. BULGULAR

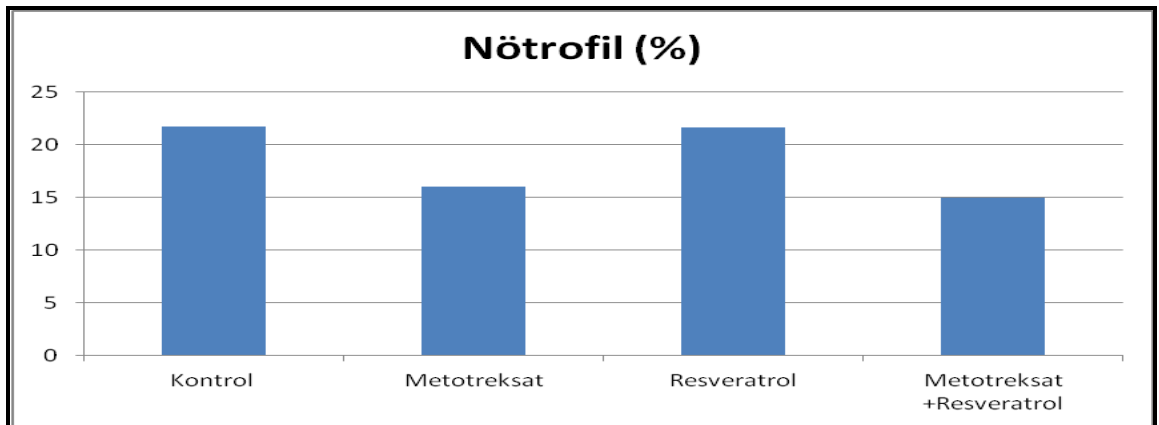
Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol gruplarındaki ratlara ait nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfosit ve monosit yüzdeleri Tablo 2'de gösterildi. Ayrıca tüm gruplardak incelenen parametreler grafikler eşliğinde yorumlandı.

Tablo 2. Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol gruplarındaki ratlara ait nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfosit ve monosit yüzdeleri

Parametreler	Kontrol grubu (n=10)	Metotreksat grubu (n=8)	Resveratrol grubu (n=10)	Metotreksat +Resveratrol grubu (n=9)	P
	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	
Nötrofil (%)	21.70±1.10 ^a	16.00±1.40 ^b	21.60±1.25 ^a	15.00±1.10 ^b	≤0.05
Eozinofil (%)	6.50±1.60	5.50±1.60	6.50±1.55	5.40±1.40	≥0.05
Bazofil (%)	1.40±0.50	1.20±0.30	1.50±0.40	1.40±0.50	≥0.05
Lenfosit (%)	66.00±7.10	75.00±8.10	65.50±6.10	76.50±7.40	≥0.05
Monosit (%)	4.40±0.60 ^a	2.30±0.40 ^b	4.90±0.80 ^a	1.70±0.50 ^b	≤0.01

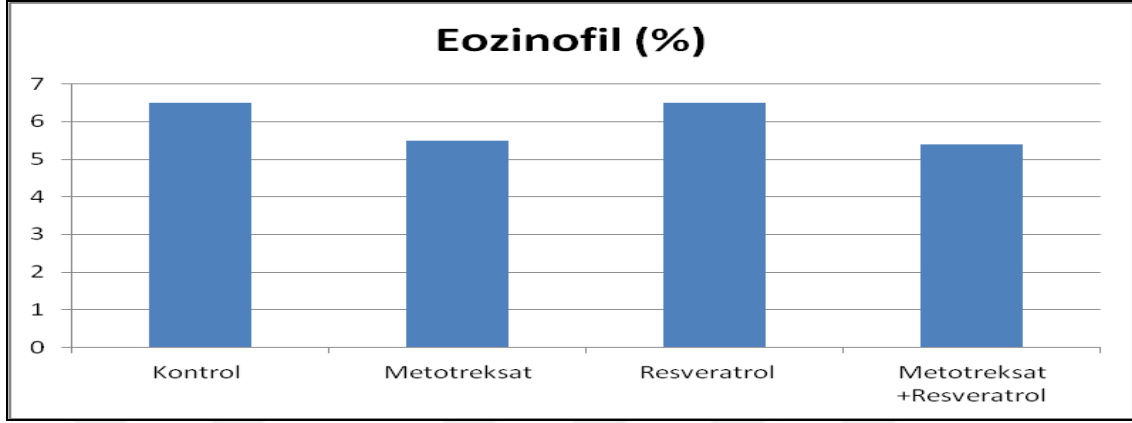
a,b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

Metotreksat (16.00±1.40) ve metotreksat+resveratrol (15.00±1.10) gruplarında nötrofil yüzdeleri, kontrol (21.70±1.10) ve resveratrol (21.60±1.25) gruplarına göre daha düşük olduğu belirlendi ve p≤0.05 düzeyinde istatistiksel önem tespit edildi (Şekil 7).



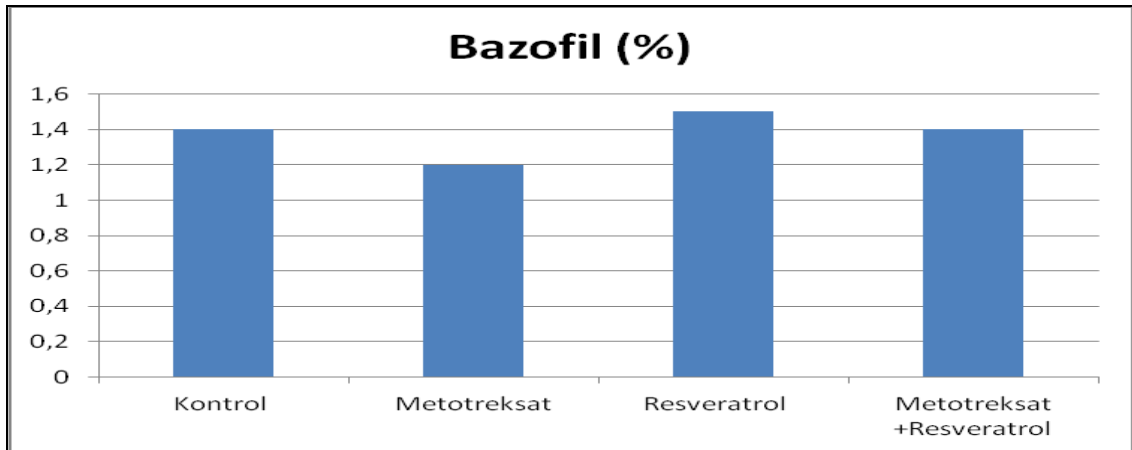
Şekil 7. Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların nötrofil yüzdeleri

Eozinofil yüzdeleri kontrol, metotroksat, resveratrol ve metotroksat+resveratrol gruplarında sırasıyla; 6.50 ± 1.60 , 5.50 ± 1.60 , 6.50 ± 1.55 , 5.40 ± 1.40 olarak belirlendi ($p \geq 0.05$) ve gruplar arasında istatistiksel önem saptanmadı (Şekil 8).



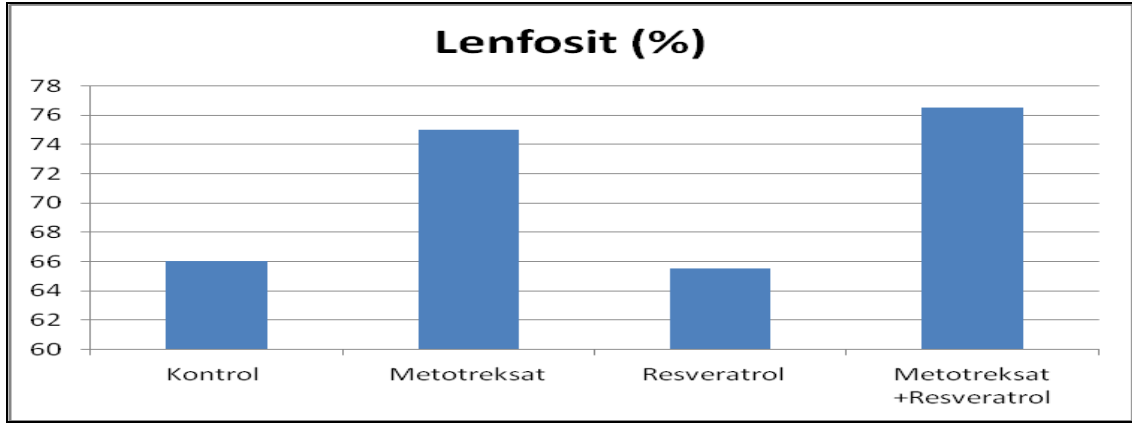
Şekil 8. Kontrol, metotroksat, resveratrol ve metotroksat+resveratrol grubundaki ratların eozinofil yüzdeleri

Bazofil yüzdeleri kontrol grubunda 1.40 ± 0.50 , metotroksat grubunda 1.20 ± 0.30 , resveratrol grubunda 1.50 ± 0.40 metotroksat+resveratrol grubunda 1.40 ± 0.50 tespit edildi ($p \geq 0.05$). Bazofil yüzdeleri için gruplar arasında istatistiksel önem bulunamadı (Şekil 9).



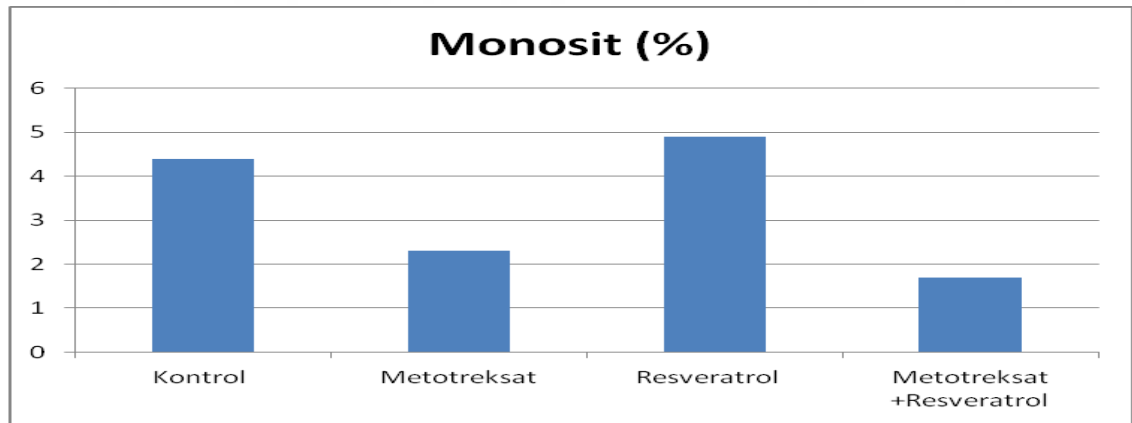
Şekil 9. Kontrol, metotroksat, resveratrol ve metotroksat+resveratrol grubundaki ratların bazofil yüzdeleri

Lenfosit yüzdeleri, kontrol (66.00 ± 7.10), metotreksat (75.00 ± 8.10), resveratrol (65.50 ± 6.10) ve metotreksat+resveratrol (76.50 ± 7.40) grupları arasında istatistiksel önemde değildi ($p \geq 0.05$) (Şekil 10).



Şekil 10. Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların lenfosit yüzdeleri

Metotreksat (2.30 ± 0.40) ve metotreksat+resveratrol (1.70 ± 0.50) gruplarındaki ratların monosit yüzdeleri, kontrol (4.40 ± 0.60) ve resveratrol (4.90 ± 0.80) gruplarındakilerden istatistiksel önemde ($p \leq 0.05$) düşük olarak belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların monosit yüzdeleri

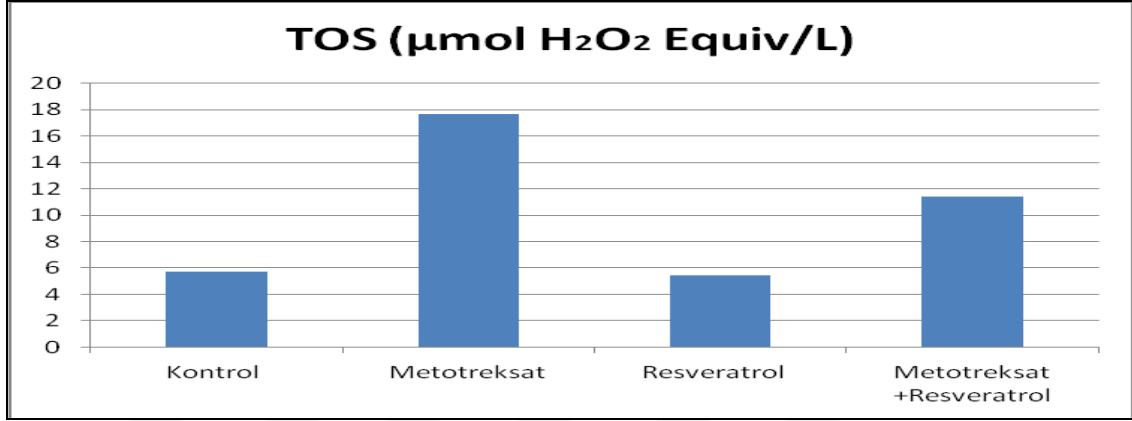
Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubu ratlara ait TOS, TAS, OSI ve DNA hasarı düzeyleri tablo 3’de verildi. Ayrıca tüm gruplarda incelenen parametreler grafik ile gösterildi ve yorumlandı.

Tablo 3. Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubu ratlara ait TOS, TAS, OSI ve 8-OHdG düzeyleri

Parametreler	Kontrol grubu (n=10)	Metotreksat grubu (n=8)	Resveratrol grubu (n=10)	Metotreksat +Resveratrol grubu (n=9)	P
	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)	5.74±0.62 ^c	17.65±1.66 ^a	5.44±1.39 ^c	11.38±0.42 ^b	≤0.001
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	1.77±0.10 ^a	1.48±0.09 ^b	1.75±0.21 ^a	1.71±0.07 ^a	≤0.05
OSI (Arbitrary Unit)	0.33±0.06 ^c	1.18±0.24 ^a	0.32±0.09 ^c	0.67±0.04 ^b	≤0.001
8-OHdG (ng/mL)	4.05±0.34	4.71±0.34	3.97±0.30	4.04±0.25	≥0.05

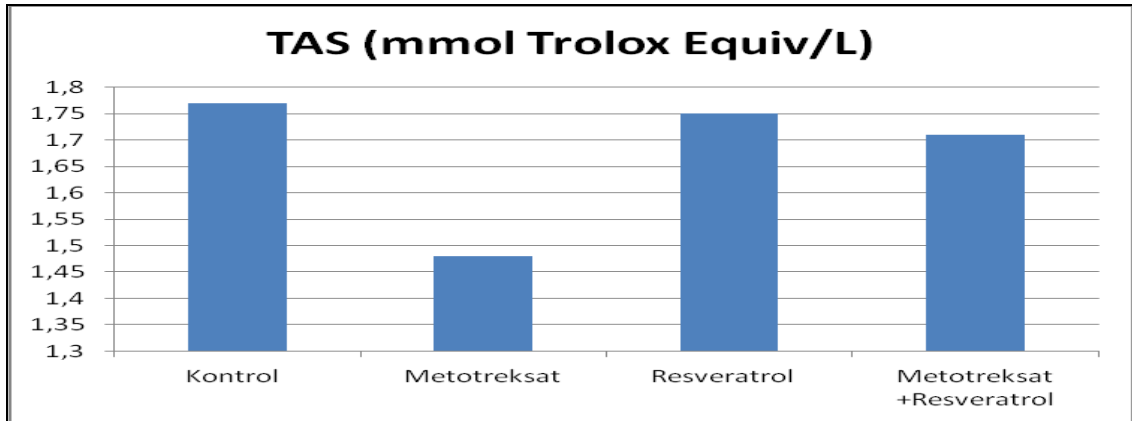
a,b,c: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

TOS düzeyi metotreksat+resveratrol grubunda ($11.38 \pm 0.42 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$), metotreksat grubuna ($17.65 \pm 1.66 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$) göre istatistiksel önemde düşük, kontrol ($5.74 \pm 0.62 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$) ve resveratrol ($5.44 \pm 1.39 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$) gruplarına göre istatistiksel önemde ($p \leq 0.001$) yüksek tespit edildi (Şekil 12).



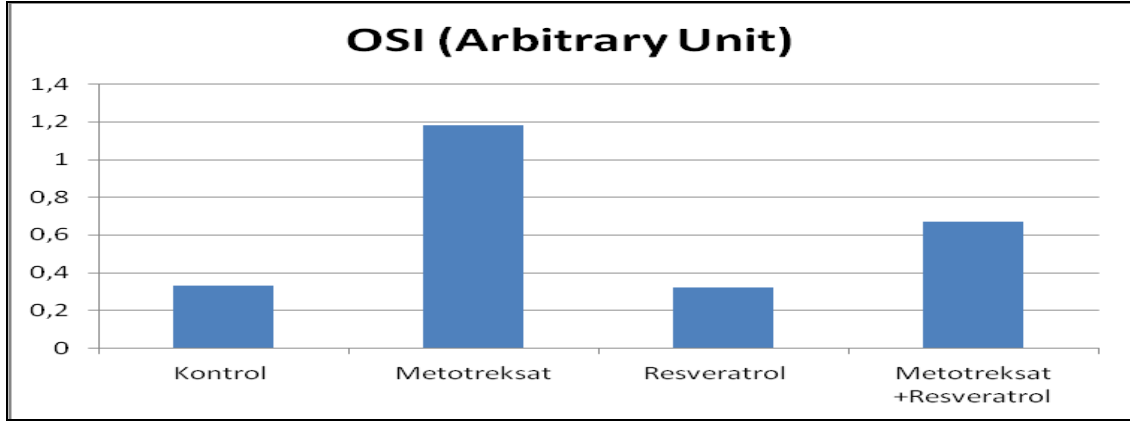
Şekil 12. Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların TOS düzeyleri

Metotreksat grubundaki TAS seviyesi ($1.48 \text{ mmol Trolox Equiv/L}$), kontrol ($1.77 \pm 0.10 \text{ mmol Trolox Equiv/L}$), resveratrol ($1.75 \pm 0.21 \text{ mmol Trolox Equiv/L}$) ve metotreksat+resveratrol ($1.71 \pm 0.07 \text{ mmol Trolox Equiv/L}$) grubundakilere göre $p \leq 0.05$ önemde düşük bulundu (Şekil 13).



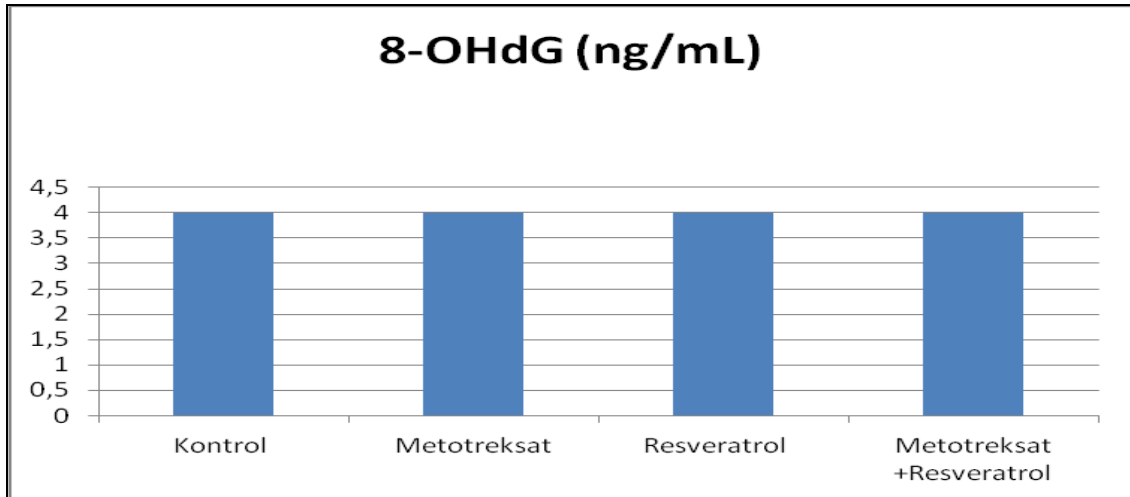
Şekil 13. Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların TAS seviyeleri

OSI oranı kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol gruplarında sırasıyla 0.33 ± 0.06 , 1.18 ± 0.24 , 0.32 ± 0.09 , 0.67 ± 0.04 Arbitrary Unit olarak belirlendi. Metotreksat+resveratrol grubundaki OSI oranı kontrol ve resveratrol gruplarına göre önemli derecede yüksek, metotreksat ve grubuna göre önemli derecede düşük bulundu ($p\leq 0.001$) (Şekil 14).



Şekil 14. Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların OSI değerleri

Kontrol (4.05 ng/mL), metotreksat (4.71 ng/mL), resveratrol (4.04 ng/mL) ve metotreksat+resveratrol (3.97 ng/mL) gruplarındaki 8-OHdG seviyesi birbirine yakındı ve gruplar arasında istatistiksel önem ($p\geq 0.05$) tespit edilmedi (Şekil 15).



Şekil 15. Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubundaki ratların 8-OHdG seviyeleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Resveratrol, doğal bir fitoaleksindir ve başta üzüm olmak üzere farklı birçok bitkide bulunur. Fitoaleksinler, bitkilerde enfeksiyonlara, fiziksel hasara ve ultra viole ışımına karşı oluşurlar (Aribal-Kocatürk ve ark., 2007) ve üzümde başka kırmızı şarap, yer fıstığı, asma yaprağı, keçiboynuzu ve yaban mersininde bulunan polifenolik bir bileşiktir (Signorelli ve Ghidoni, 2005).

Resveratrol üzerine yapılan çalışmalardan sonra, yaşamı uzatan ilaç olarak tanımlanmış ve farklı doku ve organlarda etkili olduğu belirlenmiştir. Resveratrolün antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser aktivitenin yanısıra, platelet agregasyonunu inhibe edici, kalbi koruyucu ve damar gevşetici etkilerinin de olduğu belirtilmiştir. (Bertelli ve ark., 1999; Hung ve ark., 2000). Birçok laboratuvar çalışmasında; resveratrolün, bazı inflamatuvar enzimlerin aktivitesini engelleyici etkisinin olduğu belirlenmiştir (Kimura ve ark., 1985).

Bununla birlikte resveratrol ile ilgili araştırmaların en çok kanser üzerine yoğunlaştığı bildirilmektedir. Kanser üzerine yapılan bir çalışmada (Fontacave ve ark., 1998) 100 µg/mL resveratrolün tümör ilerleme aktivitesini azalttığı bildirilmiştir. Bu etkisini siklooksijenaz-1 (COX-1) enzimini büyük oranda inhibe ederek göstermektedir. Bu enzim arazişonik asit üzerine etki ederek prostaglandin sentezini gerçekleştiren ve tümör gelişimini uyaran bir enzimdir. Jang ve ark, (1997) farelerde tümör oluşturup ve 1, 5, 10 ve ya 25 µM dozunda 18 hafta boyunca resveratrol 2 kez verdikleri çalışmada, tümör sayısının kontrole göre %88 lere varan oranda bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca Carbo ve ark, (1999) ise, resveratrolün kanserli farelerin derilerinde tümör oluşumunu ve lezyon gelişimini azalttığını tespit etmişlerdir.

Resveratrolün hücresel düzeyde etkilerini incelemek üzere yapılan çalışmalarda, hücre siklusunda S fazını durdurduğu bildirilmiştir. Bunu akut promyelositik lösemi hücrelerinde S-G2 transisyonunu bloke ederek yaptığı ortaya koyulmuştur (Ragione ve ark., 1998; Joe ve ark., 2002). Bunun yanı sıra lenfoma hücrelerine resveratrol verilmesi hücre siklusunun G1 fazında yavaşlamaya ve apoptozise (Faber ve Chiles, 2006), p53 tümör baskılayıcı geninin ekspresyonunun da artışa neden olduğu ifade edilmiştir (Phan ve Dalla-Favera, 2004).

Metotreksat (MTX), lenfoma, lösemi, osteosarkom, akciğer ve meme kanserleri, baş ve boyun tümörleri, sedef, sarkoidoz, dermatomiyozit, ve romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde yoğun bir şekilde kullanılan, antiinflamatuvar antikanserojen ve antimetabolit etkili bir ilaçtır (Cetinkaya ve ark., 2006)

Folik asit antagonisti olan MTX pirin ve pirimidinlerin sentezini inhibe etmek için klinikte kullanılır (Tian ve Cronstein, 2007). Aynı zamanda MTX akut lenfoblastik lösemi ve malignant gestasyonel trofoblastik hastalıkların primer tedavisinde de kullanılmaktadır (Yarris ve ark., 2003). Fakat sitotoksik ve diğer yan etkileri bir antinflamatuvar olarak MTX in kullanımını sınırlandırır. MTX' in önemli yan etkileri birkaç organda tanımlanmıştır (Hempel ve ark., 2003).

MTX kemoterapotik bir ajandır ve şiddetli mukozite sebep olması muhtemel yan etkilerden birisidir (Chabner ve ark., 2007). İntestinal sistemde kemoterapi (KT) ve radyoterapi (RT) tarafından oluşturulan hasar mukozit olarak isimlendirilir (Sonis, 2007), mukoz membranın ağırlı enflamasyonu ve ülserasyonu şeklinde görülür (Glenny ve ark., 2004). Mukozitin derecesi şiddetli inflamasyondan derin ülserasyonlara kadar ilerler (Blijlevens ve ark., 2000). Işın tedavisi alan baş-boyun tümörlü hastaların %80'inde, kök hücre nakli olan hastaların %75-100'ünde ve kanserli çocukların %65-90'ında gözlenmektedir (Dağdemir, 2009). Kemoterapik ajan olarak MTX kullanımı ile en sık görülen gastrointestinal yan etkiler bulantı-kusma, kabızlık, anoreksi, stomatit, özofajit, diyare kilo kaybı ve farenjitir (Can, 2003).

Mukozit gelişiminin ilk adımı oksidatif stres gibi reaktif oksijen türleri (ROS) şekillenmesidir. Dahası inflamasyon ve bakteriyel kolonizasyon mukozitin gelişmesinde önemli bir rol oynar (Blijlevens ve Sonis, 2007). KT ve RT alan hastalarda ROS' un uzaklaştırılması mukozitin gelişmesini azaltır (Culy ve Spencer, 2001).

Yapılan bir çalışmada (Kaynar ve ark., 2012) MTX (20mg/kg) terapisi yapılan ratlarda diyare olduğu gözlenmiş ve royal jelin 50 ve 100 mg/kg dozlarının diyareye koruyucu etkisi tespit edilememiştir.

Bu çalışmada MTX grubunda 2, MTX+RES grubunda 1 ratın ex nedenin mukozitten kaynaklanan diyare sonucunda aşırı sıvı kaybı ile şekillenmiş olabileceği gibi

nötropeniye bağı olarak şekillenen bir enfeksiyon neticesinde olabileceğini düşünmekteyiz.

Kemoterapik ajanların kullanımı sonucu en ölümcül olan ve en sık görülen yan etkisi kemik iliği baskılanmasıdır. Bunun en önemli sonuçları ise lökopeni, trombositopeni ve anemidir. Bunlar arasında nötrofil sayısında azalma (Nötropeni) sonucu görülen enfeksiyon en yaygın ölüm nedenlerinden birisidir (Şenol, 2004).

Antineoplastik ilaçların kemik iliğini baskılaması sonucunda 7-14 gün kadar hızlı bir şekilde nötrofillerin sayılarında azalması ile nötropeni görülebilir. Bunun sonucunda hastanın enfeksiyona yakalanma riski artar. Bu nedenle antineoplastik ajanların uygulanmadan önce ve sonra lökosit değerlerinin takip edilmesi oldukça önem arz etmektedir (Can, 2003).

Nötropeni mortalite oranı yüksek ve acil müdahale gerektiren bir durumdur ve kemoterapi, radyoterapi, ilaç zehirlenmesi ve hipersensitivitenin en önemli yan etkisidir. Kemoterapik ajanlar, vücudun büyük bir kısmına yayıldıkları için sadece kanser hücrelerine değil aynı zamanda normal hücrelere de etki ederek zarar verebilirler. Kemoterapiden daha fazla etkilenen hücreler, bölünme hızı yüksek olan ve hızlı çoğalan hücrelerdir. Bunlar arasında özellikle gastrointestinal sistem, kemik iliği, saç folikül ve epitelium hücreleri yer alır (İliçin ve ark., 1996; Şenol, 2004).

MTX, tümörlerin gelişimini durdurmak için yüksek dozları yaygın bir şekilde inflamasyon lökositlerinin proliferasyonunu inhibe etmek için kullanılır (Widemann ve Adamson, 2006) Düşük doz MTX'e bağlı pansitopeni gelişsede bu durum nadir görülen, yaşamı tehdit eden bir komplikasyondur, hastaların sadece % 1.4'ünde meydana gelir (Ohasone ve ark., 1997). MTX toksisitesi, inflamasyon yanıtın aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimindeki önemli artışı ile karakterizedir (Uzar ve ark., 2006).

Romatoid artrit tanısı koyulan bir hasta sabah akşam 2 tablet MTX tedavisinden bir hafta sonra ağız yaraları, halsizlik ve yutma güçlüğü görülmüş. Ağız mukozasının muayenesinde plak şeklinde beyaz renkli ülserler tespit edilmiştir. Laboratuvar bulgularında ise lökopeni ve nötropeni belirlenmiştir (Duman ve ark., 2014). Nötropeni 1

haftadan kısa süreli olduğunda % 30 oranında enfeksiyon gelişirken, 1 haftadan uzun süren nötropenilerin tamamında enfeksiyon gelişmektedir (Çelebi, 2003).

Yapılan bir çalışmada (Çetin ve ark., 2008), üzüm çekirdeği ekstratı 100mg/kg dozunda 15 gün süre ile oral olarak ratlara verilip, çalışmanın 10. Gününde 20mg/kg dozunda MTX i.p. yolla uygulanmıştır. Çalışma sonunda lökosit (WBC), lenfosit (LY) sayısında MTX ve MTX+RES grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel önemde bir azalma tespit etmişlerdir ($p<0.001$). % LY değerindeki azalmanın ise istatistiksel önemde olmadığını ifade etmişlerdir. Başka bir çalışmada da (Comba ve ark., 2016) aynı dozda üzüm çekirdeği ekstraktının diyabetli ratlarda azalan % LY ve artan % MO ve NE değerlerini değiştirmedeği bildirilmiştir.

Emilia-Juan ve ark, (2002) yaptıkları çalışmada ratlarda trans-resveratrolün 20 mg/kg dozunda 28 gün boyunca kullanıldığında lökosit yüzdeleri ve total lökosit sayısında herhangi bir değişiklik olmadığını, dolayısıyla herhangi bir yan etkisinin bulunmadığını ifade etmişlerdir.

Haftada 3 gün 5mg/kg dozunda ve uzun süre MTX alınması ile oluşan pansitopeni durumunda granülosit koloni stimule edici ajan (G-CSF) ve folik asit uygulaması, dehidratasyon nedeniyle hidrasyon uygulaması sonucunda kısa sürede hematolojik parametrelerin düzeleceği bildirilmiştir. Bu nedenle eğer hastalar düzenli bir şekilde takiplere gelemeyecekse, MTX kontrollü bir şekilde verilmeli yada farklı bir ajan tedavi seçeneği olarak kullanılmalıdır (Yoon ve Ng, 2001; Teke ve Özen, 2014).

Yapılan bu çalışmada, MTX ve MTX+RES grubunda, kontrol ve RES gruplarına göre lenfosit yüzdesinde artış, eozinofil ve bazofil yüzdelerinde azalma tespit edildi fakat gruplar arasında istatistiksel önem tespit edilmedi. Nötrofil ($p<0.05$) ve monosit ($p\leq 0.01$) yüzdesinde azalmanın ise istatistiksel önemde olduğu belirlendi. MTX'in neden olduğu nötropeni ve monositopeni durumlarında resveratrol etkili olmadığı tespit edildi.

MTX immunsupresif etkisini lenfosit proliferasyonunda azalma, IL-1 aktivitesinde azalma, monositlerden IL-1 yapımında azalma, LTB-4 düzeylerinde azalmaya yoluyla yapar. Ön planda antiinflamatuvar, ikinci planda ise immunsupresif etki oluşturur. MTX tedavisi ile birlikte folik asit verilmesi mukozal ülserasyonları GİS belirtileri ve sitopenik

yan etkileri azaltır. MTX in yan etkileri bulantı hazımsızlık karın ağrısı ishal hepatoksisite hipersensivite pnömonisi akciğerlerde fibröz ağrıtışı düşükler ve malformasyonlar şekillenebilir (Dilek, 2002). Bununla birlikte resveratrol DNA sentezinde iki anahtar enzim olan ribonükleotid redüktaz ve DNA polimeraz aktivitesini (Fontacave ve ark.,1998) ve ağız kas hücre kültürlerinde DNA sentezlenmesini inhibe edebilir (Zou ve Houten, 1999).

Normal şartlar altında, reaktif oksijen türleri (ROS) nin yapımında ve yıkımında bir denge vardır. Oksidatif stres koruyucu antioksidan savunma sistemi ile oksijen radikalleri arasında bir dengenin değişimi olarak belirlenir (Akkuş, 1995). RT ve KT tedavi sırasında ROS un oluşmasına sebep olur. ROS, DNA' ya, hücre membranına, dokuya hasar verir makrofaj uyarır, kritik biyolojik mekanizmaları, molekülleri ve yolları tetikler (Sonis, 2007).

Reaktif oksijen türleri, MTX' in patogeneğinde önemlidir. MTX serbest oksijen radikalleri üretir ve lipit peroksidasyonun yükselmesi ile sonuçlanır. Bu serbest radikaller mitokondrinin fonksiyon bozukluğuna ve apoptozise sebep olur (Miyazono ve ark., 2004; Barbier ve ark., 2010). MTX uygulaması malondialdehit (MDA) üretimini arttırır ve glutayon (GSH) seviyelerini azaltır (Jahovic ve ark., 2003).

Metotreksat birçok organda oksidatif stresi arttırır ve antioksidatif sistemi baskılar (Babiak ve ark., 1998). MTX, folik asidin dihidroksifolat redüktaz enzimi ile reaksiyona girmesinin engeller, böylece DNA ve RNA sentezi için gerekli timidilat oluşamaz (Dilek, 2002).

MTX, hücre içinde sitozolik nikotinamid adenin fosfatdehidrojenaz (NADPH)'nın azalmasına neden olur. Bu etkisini NADPDH ve NADP bağımlı malik enzimi inhibe ederek gösterir. NADPDH, glutatyon redüktaz (GSSG-R) enzimi için gerekmektedir. Bu enzim sitozolik antioksidan olan indirgenmiş GSH'nin devamlılığını sağlar. MTX tedavisi, GSH seviyesinin ve ROS' lara karşı hücreleri koruyan antioksidan savunma sisteminin etkinliğinin azalması ile sonuçlanmaktadır (Cetinkaya ve ark.,2006). Bu durum hepatosit hasarına neden olmaktadır (Uraz ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada (Jahovic ve ark., 2003) MTX uygulanan sıçanların kan, karaciğer, böbrek ve ince barsak dokularında GSH seviyelerinin azaldığını, myeloperoksidaz aktivitesinin ve MDA seviyelerinin ise arttığını bildirmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada 8 hafta boyunca 0.25 mg/kg/gün intra musküler MTX enjeksiyonu yapılan tavşanların karaciğer SGOT, SGPT, ALP ve bilirubin seviyelerinin ve MDA'nın anlamlı derecede arttığı, total serum proteinin ise azaldığı bildirilmiştir (Hadi ve ark., 2012).

MTX'in karaciğer ve böbrek başta olmak üzere birçok doku ve organda oluşturduğu hasarda oksidatif stresin rolü bulunmaktadır. Bu nedenle MTX toksisitesini azaltabilmek için bazı antioksidan maddeler ile birlikte kullanması gerekmektedir (Armağan, 2015). Bu amaçla yapılan çalışmalarda ratlarda, MTX' in neden olduğu karaciğer dokularında MDA ve miyeloperoksidaz (MPO) düzeylerinde artışı thiamin pirofosfat (Demiryılmaz ve ark., 2012) ve montelukast (Köse ve ark., 2012) kullanılmasıyla azaltılabileceği ifade edilmiştir. Bununla birlikte kurkimin (Hemeida ve Mohafez, 2008) karoten (Vardi ve ark., 2010) pentoksifilin (Asvadi ve ark., 2011) nin karaciğer dokusunda; kafeik asit fenetil ester (Oktem ve ark., 2006) N-asetilsistein (NAC) (Cetinkaya ve ark., 2007) lipoik asit (Tabassum ve ark., 2010)' in ise böbrek dokusunda, MTX' in neden olduğu oksidatif hasarın biyokimyasal olarak iyileştirebildiği gösterilmiştir.

Tunalı-Akbay ve ark, (2010) yaptıkları çalışmada, 20 mg/kg dozunda metotreksat tek doz olarak i.p. yolla uygulamışlar ve 5 gün boyunca 10mg/kg dozunda resveratrolü oral yolla vermişler. Sonuçta kemoterapik bir ajan olan MTX in yan etkilerini azaltmak için resveratrolün kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Mokni ve ark, (2007) yaptıkları çalışmada resveratrolün antioksidan enzimler üzerine optimal etkisinin 12.5 mg/kg dozunda olduğunu tespit etmiştir. Yapılan başka bir çalışmada (Çetin ve ark., 2008) ise, MTX'in MDA seviyesini yükselttiği, SOD ve CAT seviyelerini düşürdüğünü, üzüm çekirdeği ekstresi tedavisinin bu değerleri iyileştirdiği bildirilmiştir.

Son zamanlarda yapılan benzer bir çalışmada (Dalaklıoğlu ve ark., 2013) metotreksatın neden olduğu karaciğer hasarında, lipid peroksidasyon tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) ve hepatik antioksidan enzim olan katalaz (CAT) aktivitesi ve

glutasyon-S-transferaz (GST) ürünleri araştırılmıştır. Çalışmada 20mg/kg dozunda resveratrol oral yolla 6 gün verilmiş ve son 3 gün boyunca 7mg/kg/gün dozunda metotreksat i.p. yolla uygulanmış. Sonuçta, metotreksatın karaciğerde TBARS, CAT, and GST seviyelerinin anlamlı derecede artırdığını bildirmişlerdir. Resveratrolün ise tedavi grubunda oksidatif stresi inhibe ederek bu parametreleri azalttığını ve karaciğerde koruyucu etki gösterdiğini vurgulamışlardır.

Resveratrolün bu parametreler üzerine etkileri onun yapısındaki polifenolik bileşikler ile ilişkilendirilebilir (Kolouchova-Hanzlikova ve ark., 2004). Antioksidan olarak hareket etmek için polifenolik bileşiklerin kabiliyeti onların fenolik hidroksil gruplarının redoks özelliklerine ve elektron için kimyasal yapılarındaki delokalizasyon potansiyeline bağlıdır (Ignatowicz ve Bear-Dubowska, 2001). Bununla birlikte resveratrolün yüksek hidrofilik ve lipofilik içeriği Vitamin C ve E gibi diğer antioksidanların karşılaştırılmasında önemli bir rol oynar (Kasdallah-Grissa ve ark., 2007). Yapılan bir çalışmada (İrak, 2014) 100 mg/kg dozundaki üzüm çekirdeği ekstraktının diyabetli ratlarda azalan vitamin C seviyesini arttırdığı bildirilmiştir. Resveratrolün antioksidan etkisi 3 mekanizma ile ilişkilendirilebilir; 1, serbest oksijen türlerinin oksidatif zincir reaksiyonlarının azalması ile 2, mitokondrideki süperoksit radikallerinin nötralize edilmesi, 3, fenton reaksiyon ürünleri ile lipid peroksidasyonun korunması (Zini, 1999).

Kocaman ve Çolakoğlu (2013) ise çalışmalarında ratlara 1. ve 5. günlerde 15 mg/kg dozunda i.p. tekrarlayan 2 metotreksat uygulaması sonucunda 8. gün karaciğer hasarını histopatolojik olarak incelemişlerdir. Sonuçta, MTX' in kliniklerde kullanılırken doz ve süre ayarlamasının çok iyi yapılmasının gerektiği ifade edilmiştir. Aksi durumda MTX' in karaciğerde yapısal ve fizyolojik anlamda ciddi bozukluklar meydana getirebileceği sonucuna varmışlardır.

Kaynar ve ark, (2012) yaptıkları çalışmada, ratlarda MTX in sebep olduğu mukozitis ve oksidatif strese karşı Royal Jel (RJ) in koruyucu etkisini araştırmışlar. Bu amaçla her grupta 12 rat olacak şekilde 6 grup oluşturmuşlar. 1. gruba 10 gün per oral distile su, 7.gün tek doz MTX (20mg/kg) i.p; 2. gruba 10 gün RJ (50 mg/kg), 7. Gün serum fizyolojik (SF); 3. gruba 10 gün RJ (50 mg/kg), 7. Gün MTX; 4. gruba 10 gün RJ (100mg/kg), 7. Gün SF; 5. Gruba 10 gün RJ (100mg/kg), 7. Gün MTX; 6. gruba 10 gün DS, 7. Gün SF uygulamışlar. Çalışma sonunda MTX uygulaması ile antioksidan

parametrelerinde azalma ve MDA seviyelerinde bir artış belirlemişler. RJ verilen gruplarda antioksidan (GSH-Px, ve SOD) seviyelerinde bir iyileşme ve MDA seviyesinde dikkat çekici bir azalma tespit etmişler. Bu sonuçlar RJ'nin MTX in neden olduğu sistemik oksidatif hasarda lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu etkiye sahip olabileceğini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bozkurt ve ark, (2014) ile Daggulli ve ark, (2014) yaptıkları benzer çalışmada MTX enjeksiyonunda karvakrol (CAR)' un koruyucu etkisi üzerine çalışmışlar. Her grupta 8 rat olacak şekilde 3 grup oluşturmuşlar. Gruplar, 1. grup kontrol, 2. grup MTX, 3. grup MTX+CAR grubu şeklinde planlanmış ve 3. gruptaki ratlara çalışmanın 1. günü CAR (73 mg/kg) i.p., 2. günü 2. ve 3. gruplara (20 mg/kg) MTX i.p uygulanmıştır. 8.gün kanda ve böbrek dokularında MDA, TOS, TAS durumları ve OSI değerleri ölçülmüştür. Kontrol grubuna göre, MTX grubunda MDA, TOS and OSI değerleri önemli derecede yüksek, TAS düzeyi önemli derecede düşük olarak belirlenmiştir. CAR uygulaması MTX in neden olduğu oksidatif hasarı iyileştirmiş ve MDA, TOS and OSI değerlerini düşürdüğü, TAS değerini ise yükselttiği tespit edilmiştir.

Oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması nedeniyle, oksidan hasara duyarlı karbonhidrat, protein, lipit yapısındaki moleküller ve DNA zarar görebilir. Organizmanın her hücresinde DNA'nın bir günde 1000 kez oksidatif hasara maruz kaldığı bildirilmiştir (Gutteridge, 1994; Halliwell ve Gutteridge, 1999; Berger, 2005; Zadak ve ark., 2009; Wildburger ve ark., 2009).

Serbest oksijen radikallerinin DNA hasarı yaptığı bilinsede resveratrolün bu radikaller üzerindeki etkisi net değildir. Resveratrolün potent hidroksil radikal süpürücü etkisi ile DNA kırılmalarını azalttığını bildiren çalışmalar olduğu gibi (Burkitt ve Duncan, 2000), bu etkisinin anlamlı olmadığını bildiren çalışmalar (Murcia ve Martinez-Tome, 2001) da vardır.

Abdel-Wahaba ve Abdel-Wahab (2016) resveratrolün 5 ve 10 mg/kg dozlarını 6 haftalık anksiyete üzerine etkilerini incelemişler. Uyku apnesinin karakteristik durumu olan intermitten hipoksinin GSH seviyesinde, GSH-Px aktivitesinde ve 8-OHdG seviyesinde artışa neden olduğunu; resveratrolün her iki dozunda bu parametreleri antagonize ettiğini ve bu amaçla yakın gelecekte kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Alturfan ve ark, (2011) ratlarda akrilamidin sebep olduğu oksidatif stresi azaltmak için resveratrolün etkisini farklı dokularda incelemişler. Bu amaçlarda ratlarda dört grup oluşturmuşlar. Gruplar kontrol, resveratrol (30 mg/kg), akrilamid (40 mg/kg), ve RES+ACR şeklinde planlanmış. 10 gün sonra oksidatif DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG seviyesinin ve MDA, MPO aktivitesinin nın ACR grubunda istatistiksel önemde arttığını, GSH nin önemli derecede azaldığını tedavi grubunda ise bu durumun önemli derecede geri dönüştüğünü bildirmişlerdir.

Atmaca ve ark, (2014) ratlarda 21 günlük çalışmalarında su ile verilen sodyum florid (100 ppm) toksikasyonunda, 12,5 mg/kg resvetratrolün i.p. oksidatif stresi koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Florid verilen grupta plazma TOS ve 8-OHdG seviyeleri artarken, TAS seviyesi azalmıştır. Florid ile birlikte resveratrol verilen grupta ise TOS, 8-OHdG ve TAS değerleri kontrol grubuna yakın olduğu belirtilmiştir ve resveratrolün florid intoksikasyonunda oksidatif stresi önlemede faydalı olabileceği sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde in vivo (Guo ve ark., 2007; Tatlıdede ve ark., 2009) ve in vitro (Yan ve ark., 2012) çalışmalarda resveratrolün oksidatif DNA hasarının korunmasında önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir.

Mevcut çalışmada ise, MTX grubundaki, TOS ve OSI seviyelerinde anlamlı bir artış ($p<0.001$), TAS seviyesinde anlamlı bir azalma ($p<0.05$) tespit edildi. MTX+RES grubundaki ratlarda ise bu parametrelerin istatistiksel önemde iyileştiği belirlendi. RES ve kontrol gruplarındaki değerler birbirine yakın bulundu. Bununla birlikte 8-OHdG seviyesi en yüksek MTX grubunda bulunsa da diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel önemde değildi. Bunun nedeni, düşük seviyelerdeki oksidatif DNA hasarı minimal risk faktörü ile etkili bir şekilde onarılabildiğinden yada, O_2 gibi H_2O_2 de DNA' da direk hasar oluşturmadığından kaynaklanmış olabilir. Nitekim, OH radikallerinin DNA üzerine etkisini gösterebilmesi için ya DNA'da yada onun çok yakınında şekillenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, klinikte antiinflamatuvar ve immunsupresif özelliğinden dolayı oldukça yoğun bir şekilde kullanılan ve kemoterapik bir ajan olan MTX' in dozu iyi ayarlanmalı ve yan etkileri en az düzeye indirilmelidir. Bu çalışma ile haftada 1, toplamda 2 kez kullanılan 20 mg/kg dozunda MTX in neden olduğu nötropeni ve monositopeninin iyileştirilmesinde 40 mg/kg/gün dozunda 14 gün boyunca RES' in etkili olmadığı sonucuna varıldı. Bununla birlikte, MTX in DNA hasarı oluşturmadığı, fakat oksidatif stres

oluşturduğu belirlendi. Bu amaçla MTX'in neden olduğu oksidatif stresi azaltmak için antioksidan özelliğinden dolayı resveratrolün kullanılabileceği kanısındaız.



ÖZET

Vadi M, Resveratrolün Metotreksat Uygulanan Ratlarda Total Oksidan-Antioksidan Durumuna ve DNA Hasarına Etkisi, Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2017. Bu çalışmada resveratrolün (RES) metotreksat (MTX) uygulanan ratlarda lökosit yüzdelerine, total oksidan (TOS)-antioksidan durumuna (TAS) ve DNA hasarına (8-OHdG) etkisi araştırıldı. Çalışmada kullanılan ratlar rastgele her biri 10 rattan oluşan 4 gruba ayrıldı. Gruplar, kontrol grubu, MTX grubu (20 mg/kg i.p., haftada 1 kez, iki hafta), RES grubu (40 mg/kg/gün oral, 14 gün) MTX+RES grubu (20 mg/kg i.p, haftada 1 kez, iki hafta ve 40 mg/kg/gün oral, 14 gün) olarak oluşturuldu. Deneme sonunda ratların kalplerinden kan örnekleri alındı, lökosit (nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfosit, monosit) yüzdelerine klasik yöntemlerle, TOS, TAS, değerlerine kolorimetrik kitlerle, 8-OHdG seviyesine ELISA kiti ile bakıldı. MTX ve MTX+RES gruplarındaki nötrofil ($p \leq 0.05$) ve monosit ($p \leq 0.01$) yüzdeleri kontrol ve RES grubuna göre istatistiksel önemde daha düşük olduğu belirlendi. Ayrıca, MTX grubundaki, TOS ve OSI seviyelerinde anlamlı bir artış ($p < 0.001$), TAS seviyesinde anlamlı bir azalma ($p < 0.05$) bulundu. MTX+RES grubundaki ratlarda ise bu parametrelerin istatistiksel önemde iyileştiği belirlendi. Eozinofil, bazofil, lenfosit yüzdelerindeki değişimler istatistiksel olarak önemsizdi. Sonuç olarak, MTX in neden olduğu nötropeni ve monositopeninin iyileştirilmesinde RES' in etkili olamayacağını fakat oksidatif stresi azaltmada etkili olabileceğini söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Metotraksat, resveratrol, TOS, TAS, DNA hasarı, rat, nötropeni.

SUMMARY

Vadi M. The Effect of Resveratrol on Total Oxidative-Antioxidative Status and DNA Damage in Rats Induced Methotrexate, Yuzuncu Yil University, Health Sciences Institute, Department of Physiology, MSci Thesis, Van, 2017. In this study, the effects of resveratrol (RES) on leukocyte percentages, total oxidant (TOS) -antioxidan status (TAS) and DNA damage (8-OHDG) were investigated in rats induced by methotrexate (MTX). The rats used in the study were randomly divided into 4 groups each consisting of 10 rats. Control group , MTX group (20 mg / kg ip, once a week, for two weeks) ,RES group (40 mg / kg / day orally, for two weeks), MTX + RES group (20 mg / kg ip, once a week and 40 mg / kg / day orally for 2 weeks)At the end of the experiment, blood samples were taken from the hearts of the rats and the percentage of leukocyte (neutrophil, eosinophil, basophil, lymphocyte, monocyte) was examined by classical methods. The levels of TOS and TAS were measured by colorimetric kits and 8-OHDG level by ELISA kit. Neutrophil ($p \leq 0.05$) and monocyte ($p \leq 0.01$) percentages of MTX and MTX + RES groups were found to be statistically lower than control and RES groups. There was also a significant increase in TOS and OSI levels ($p < 0.001$) and a significant decrease in TAS level ($p < 0.05$) in the MTX group. In the MTX + RES group, the positive statistical significance of these parameters was determined. Changes in eosinophil, basophil, lymphocyte percentages were statistically insignificant. In conclusion, it can be said that the RES treatment for neutropenia and monocytopenia caused by MTX can not be effective but may be effective in reducing oxidative stress.

Key words: Metotraksat, resveratrol, TOS, TAS, DNA damage, rat, neutropenia.

KAYNAKLAR

Abdel-Wahaba BA, Abdel-Wahab MM (2016). Protective effect of resveratrol against chronic intermittent hypoxia-induced spatial memory deficits, hippocampal oxidative DNA damage and increased p47Phox NADPH oxidase expression in young rats. *Behav Brain Res*, 305, 65–75.

Abolmaali SS, Tamaddon AM, Dinarvand R (2013). A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71, 1115-1130.

Aggrawal B, Shishodia S (2005). Resveratrol: A polyphenol for all season. Resveratrol in Health and Disease. University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, CRC Press, Taylor and Francis group, 1, 70, 1-16.

Akkuş İ (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimoza Yayınları*, 32-42.

Akkuş Ö, Şanlı K (2006). Kanserli çocuklarda hemşirelik bakımı ve desteğinin önemi. Uyar M, Uslu R, Yıldırım YK, editör. Kanser ve palyatif bakım. *Meta Basım Matbaacılık*, 309-319.

Akova M, Akan H, Akova M, Arıkan S, Arslan H, Aydın K (2004). Febril nötropenik hastada tanı ve tedavi kılavuzu. *Flora*, 9, 1, 5–28.

Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Sehirli AO, Demiralp E, Sener G, Omurtag GZ (2011). Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep*, 39, 4, 4589-4596.

Anonim, D (2011). <http://www.devasepeti.com/main/enoantsiyahuzumekstresi250mlpmu1339.html>. Erişim tarihi: Mart 2011.

Anonymous (2014). <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Piceid.svg>. Erişim tarihi: Nisan 2014.

Aribal-Kocatürk P, Kavas GÖ, Büyükkağmıcı Dİ (2007). Pretreatment effect of resveratrol on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biol Trace Elem Res*, 118, 3, 244–249.

Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S (1982). Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. On lipid metabolism. *Chem Pharm Bull*, 30, 5, 1766-1770.

Armağan İ (2015). Metotreksat'ın karaciğer ve böbrekte neden olduğu hasarda oksidatif stresin rolü. *SDÜ Tıp Fak Derg*, 22, 4, 151-155.

Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, Mitchell EA (1995). International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC), rationale and methods. *Eur Respir J*, 8, 3, 483-491.

- Asvadi I, Hajipour B, Asvadi A, Asl NA, Roshangar L, Khodadadi A (2011). Protective effect of pentoxifylline in renal toxicity after methotrexate administration. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 15, 9, 1003-1009.
- Atay S (1997). Kemoterapi sonrası nütropenik ateş ya da nütropenik sepsis gelişen çocukların evdeki bakımlarının incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Hemşirelik programı. Yayınlanmamış bilim uzmanlığı tezi.
- Ather M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol*, 224, 274-283.
- Atmaca N, Atmaca HT, Kanici A, Antepioğlu (2014). Protective effect of resveratrol on sodium fluoride-induced oxidative stress, hepatotoxicity and neurotoxicity in rats *Food Chem Toxicol*, 70, 191–197.
- Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB (1998). Methotrexate: Pentose Cycle And Oxidative Stres. *Cell Biochem Funct*, 6, 283-293.
- Baquiran DC, Gallagher J (2001). Lippincott's Cancer Chemotherapy Handbook. Saunders Company, 373, 295-304.
- Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity, *Chem Biol Interact*, 188, 319–333.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a highcalorie diet. *Nature*, 444, 7117, 337-342.
- Bavaresco L, Vezzulli S (2006). Stilben phytoalexin physiology in grapevine (*Vitis* spp) as affected by viticultural factors. In: Govil JN, Singh VK, Arunachalam C eds. Recent progress in medicinal Plants. Drug development from new molecules. *Studium Press*, 389-410.
- Baxter RA (2008). Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *J Cosmet Dermatol*, 7, 2-7.
- Bertelli AA, Ferrara F, Diana G, Fulgenzi A, Corsi M, Ponti W (1999). Resveratrol, a natural stilbene in grapes and wine, enhances intraphagocytosis in human promonocytes: a cofactor in antiinflammatory and anticancer chemopreventive activity. *Int J Tissue React*, 21, 4, 93-104.
- Bhuvarahamurthy V, Balasubramanian N, Govindasamy S (1996). Effect of radiotherapy and chemoradiotherapy on circulating antioxidant system of human uterine cervical carcinoma. *Mol Cell Biochem*, 158, 1, 17-23.
- Bjorksten B, Dumitrascu D, Foucard T, Khetsuriani N, Khaitov R (1998). Prevalence of childhood asthma, rhinitis and eczema in scandinavia and eastern Europe. *Eur Respir J*, 12, 2, 432-437.

- Blijlevens N, Sonis S (2007). Palifermin (Recombinant Keratinocyte Growth Factor-1): A pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis. *Ann Oncol*, 18, 817-826.
- Blijlevens NMA, Donnelly JP, De Pauw BE (2000). Mucosal barrier injury. Biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy. An overview. *Bone Mar Transplant*, 25, 1269-1278.
- Block KI, Koch AC, Mead MN, Tothy PK, Newman RA, Gyllenhaal C (2007). Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Cancer Treat Rev*, 33, 5, 407-418.
- Bozkurt M, Em S, Oktayoglu P, Turkcu G, Yuksel H, Sarıyıldız MA, Caglayan M, Batmaz İ, Nas K, Bozkurt Y, Kuyumcu M (2014). Carvacrol prevents methotrexate-induced renal oxidative injury and renal damage in rats. *Clin Invest Med*, 37, 1, 19-25.
- Brock S, Jennings HR (2004). Fatal acute encephalomyelitis after a single dose of intrathecal methotrexate. *Pharmacotherapy*, 24, 673-676.
- Bruton LL, Lazo JS, Parker KL (2009). Goodman & Gilman's tedavinin farmakolojik temeli. *Nobel*.
- Burkitt MJ, Duncan J (2000). Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxylradical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glu-tathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys*, 15, 381, 2, 253-263.
- Can G (2003). Kanser Kemoterapi Rehberi ve Uygulamaya Yönelik Öneriler. Editörler; Durna Z, Aydın A, *Nobel tıp Kitapevleri*.
- Carbo N, Costelli P, Baccino FM, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM (1999). Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. *Biochem Biophys Res Commun*, 254, 3, 739-743.
- Caron JE, Krull KR, Hockenberry M, Jain N, Kaemingk K, Moore IM (2009). Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 53, 4, 551-556.
- Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B (2006). N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit*, 12, 274-278.
- Cetinkaya A, Kurutas EB, Bulbuloglu E, Kantarceken B (2007). The effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced oxidative renal damage in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 22, 1, 284-285.
- Chabner B, Wilson W, Supko J (2007). Chapter 16 Pharmacology and Toxicity of Antineoplastic Drugs. Editorial: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kipps TJ, Kaushansky K, In Williams Hematology, United States. 16, 249-251.

Chabner BA, Allegra A, Curt C (1985). Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest*, 76, 907-912.

Chachay VS, Kirkpatrick CM, Hickman IJ, Ferguson M, Prins JB, Martin JH (2011). Resveratrol--pills to replace a healthy diet? *Br J Clin Pharmacol*, 72, 1, 27-38.

Comba B, Irak K, Mert N, Comba A, Mert H(2016). The effects of grape seed extract on total oxidant-antioxidant status, DNA damage and hematological parameters in rats with streptozotocin-induced Diabetes, International Congress on Applied Biological Sciences, 2, 27-31.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003). Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, 17, 1195-1214.

Crohns M, Liippo K, Erhola M, Kankaanranta H, Moilanen E, Alho H, Kellokumpu-Lehtinen P (2009). Concurrent decline of several antioxidants and markers of oxidative stress during combination chemotherapy for small cell lung cancer. *Clin Biochem*, 42, 12, 1236-1245.

Culy C, Spencer C (2001). Amifostine: An update on its clinical status as a cytoprotectant in patients with cancer receiving chemotherapy or radiotherapy and its potential therapeutic application. *Drugs*, 61, 641-684.

Çelebi S (2003). Çocuklarda Febril Nötropeni, *UÜ Tıp Fak Derg*; 29, 2, 35-41.

Çenet M, Toroğlu S (2006). Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ Fen ve Müh Derg*, 9, 2, 12-20.

Çetin A, Kaynar L, Kocyyigit İ, Kabukcu-Hacıoğlu S, Saraymen R, Oztürk A, Sarı İ, Sağdic O (2008). Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. *Am J Chin Med*, 36, 861.

Daggulli M, Dede O, Utangac MM, Bodakci MN, Hatipoğlu NK, Penbegül N, Sancaktutar AA, Bozkurt Y, Türkçü G, Yüksel H (2014). Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. *Int J Clin Exp Med*, 7, 12, 5511-5516.

Dağdemir A (2009). Ağız Bakımı. In İlhan I & Kutluk T (Eds.), *Pediyatrik Onkoloji El Kitabı*. Güneş Tıp Kitabevleri, 59-68.

Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcıt F, Gumuslu S (2013). Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol*, 32, 662-667.

Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B (1996). Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet Oncol*, 347, 444-445.

Demiryılmaz I, Sener E, Cetin N, Altuner D, Suleyman B, Albayrak F (2012). Biochemically and histopathologically comparative review of thiamine's and thiamine

pyrophosphate's oxidative stress effects generated with methotrexate in rat liver. *Med Sci Monit*, 18, 12, 475-481.

Dilek K (2002). Günümüzde en sık kullanılan antiproliferatif ajanların özellikleri. *Ankem Derg*, 16, 3, 199-202.

Dincol G, Pekcelen Y, Atamer T, Sargin D, Nalcacı M, Aktan M (2006). Klinik Hematoloji. *Nobel Tıp Kitabevleri*, 11-20.

Dizdaroglu M (1994). Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Enzymol*, 234, 3-16.

Dong Z (2003). Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res*, 523-524, 145-150.

Duman TT, Üstün C, Şavlı H (2014). Hatalı Metotreksat Kullanımı Sonucu Gelişen Nötropenik Ateş. *Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, Bodrum. Ankem Derg*, 28 (Ek 1).

Emilia-Juan M, Pilar-Vinardell M, Joana M (2002). The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *Departament de Fisiologia-Divisio IV, Facultat de Farma'cia, Universitat de Barcelona, J Nutr*, 132, 257-260.

Erel O (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*, 37, 112-119.

Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J Clin Biochem*, 47, 119-129.

Evans MD, Cooke MS (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays*, 26, 533-542.

Faber AC, Chiles TC (2006). Resveratrol induces apoptosis in transformed follicular lymphoma OCI-LY8 Cells: evidence for a novel mechanism involving inhibition of BCL6 signalling. *Int J Oncol*, 29, 6, 1561-1566.

Fontacave M, Lepoivre M, Elleilgant E, Gerez C, Guittet O (1998). Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase, *FEBS Lett*, 421, 277-279.

Fraga C, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN (1990). Oxidative damage to DNA during aging; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci*, 87, 4533-4537.

Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*, 341, 8852, 1103-1104.

Gerogiannaki-Christopoulou M, Athanasopoulos P, Kyriakidis N, Gerogiannaki IA, Spanos M (2006). "Trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties". *Food Control*, 17, 9, 700-706.

Giovannini L, Migliori M, Longoni BM, Das DK, Bertelli AA, Panichi V, Filippi C, Bertelli A (2001). Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys, *J Cardiovasc Pharmacol*, 37, 262-270.

Glenny AM, Gibson F, Auld E, Coulson S, Clarkson JE, Craig JV, Eden OB, et al (2004). A survey of current practice with regard to oral care for children being treated for cancer. *Eur J Cancer*, 40, 8, 1217-1224.

Gu X, Chu Q, Dwyer M, Zeece M (2000). Analysis of resveratrol in wine by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 881, 471-481.

Guo L, Wang LH, Sun BS, Zhao YQ, Dong YX, Wu CF (2007). Direct in vivo evidence of protective effects of grape seed procyanidin fractions and other antioxidants against ethanol-induced oxidative DNA damage in Mouse brain cells. *Agric. Food Chem*, 55, 5881-5891.

Gutteridge JMC (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*, 91, 133-140, 1994.

Hadi NR, Al-Amran FG, Swadi A (2012). Metformin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Pharmacother*, 3, 248-253.

Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 52, 8-1, 253-265.

Halliwell B (1999). Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: Measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res*, 443, 37-52.

Halliwell B, Aruoma OI (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 281, 9-19.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press. Inc.

Halliwell B, Zentella A, Erika OG (1997). Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutr Rev*, 55, 44-54.

Haneke KE (2002). Review of Toxicological Literature, Trans-Resveratrol (501-36-0). Integrated Laboratory Systems. Research Triangle Park.

Hemeida RA, Mohafez OM (2008). Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats. *J Egypt Natl Canc Inst*, 20, 2, 141-148.

Hempel L, Misselwitz J, Fleck C, Kentouche K, Leder C, Appenroth D (2003). Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. *Med Pediatr Oncol*, 40, 6, 348-354.

- Hirano T, Yamaguchi R, Asami S, Iwamoto N, Kasai H (1996), 8- Hydroxyguanine levels in nuclear DNA and its repair activity in rat organs associated with age. *J Gerontology*, 51, 303-308.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425, 191-196.
- Huang SS, Tsai MC, Chih CL, Hung LM, Tsai SK (2001). Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci*, 20, 69, 9, 1057-1065.
- Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res*, 47, 549-555.
- Ignatowicz E, Bear-Dubowska W (2001). Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Pol J Pharmacol*, 53, 557-569.
- Irak K (2014). Diyabetli Ratlarda Üzüm Çekirdeği Ekstraktının Bazı Enzim ve Metabolitler Üzerine Etkisi. YYÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, Van.
- Işık A, Işılay L, Erdemli EA, Akbay C, Anafarta K (1997). Sıçan testisinde metotreksat'ın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. *Ankara Ü Tıp Fak Mec*, 50, 125-129.
- İliçin G, Ünal S, Biberöglü K, Akalın S, Süleymanlar G (1996). Temel iç hastalıkları. Cilt 1. Güneş Kitabevi. Ankara.
- Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G (2003). Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res*, 34, 4, 282-287.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220.
- Javonovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG (1984). *J Am Chem Soc*. 116, 4846.
- Joe AK, Liu H, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein IB (2002). Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 8, 893-903.
- Karabulut AB (2008). Resveratrol ve etkileri, Türkiye Klinikleri, *J Med Sci*, 28, 166-169.
- Kasai H, Nishiura S (1984). Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res*, 12, 2137-2145.
- Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, El May M, Gharbi N, Kamoun A, El-Fazaa S (2007). Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci*, 80, 1033-1039.

Kaynar L, Çetin A, Hacıoğlu KS, Eser B, Koçyiğit S, Canöz Ö, Taşdemir A, Karadağ C, Kurnaz F, Saraymen R and Sılıcı S (2012). Efficacy of royal jelly on Methotrexate-Induced systemic Oxidative Stress and Damage to small intestine rats, *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 9, 3, 412-417.

Kimura Y, Ohminami H, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S (1983). Effects of stilbene components of roots of *Polygonum* ssp. On liver in jury in peroxidized oil-fed rats. *Planta Med*, 49, 1, 51-54.

Kimura Y, Okuda H, Arichi S (1985). Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim Biophys Acta*, 834, 2, 275-278.

Kirimlioğlu V, Ara C, Yılmaz M, Ozgor D, Isik B, Sogutlu G (2006). Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, protects gastric tissue against the oxidative stress in cholestatic rats. *Dig Dis Sci*, 51, 298-302.

Kocaman N, Çolakoğlu N (2013). Tekrarlayan dozlarda metotreksat uygulamasının sıçan karaciğer dokusu üzerine etkileri, *Fırat Tıp Derg*, 18, 3, 141-145.

Kolouchova-Hanzlikova I, Melzoch K, Filip V, Smidrkal J (2004). Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Che*. 87, 151–158.

Köse E, Sapmaz HI, Sarihan E, Vardi N, Turkoz Y, Ekinçi N (2012). Beneficial effects of montelukast against methotrexate-induced liver toxicity: a biochemical and histological study. *Scientific World Journal*, doi:10.1100/2012/987508, 1-6.

Kremer JM, Maini RN, Romain PL (2009). Major side effects of low-dose methotrexate. *Uptodate*, 53, 17-21.

Kuhnle G, Spencer JP, Chowrimootoo G, Schroeter H, Debnam ES, Srai SK, et al (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochem Biophys Res Commun*, 272, 1, 212-217.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN (2007). Robbins Temel Patoloji, 8.baskı, Saunders Elseviers, 28.

Loft S, Poulsen HE (1999). Markers of oxidative damage to DNA: Antioxidants and molecular damage. *Methods Enzymol*, 300, 167-184.

Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjønneland A, Overvad K, Poulsen HE (1992). Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis*, 13, 12, 2241-2247.

Mahady GB, Pendland SL (2000). Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am J Gastroenterol*, 95, 7, 1849.

Martinez FD (2002). Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics*, 109, 362-367.

- Mazza G (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 35, 341-371.
- Milligan JR, Ward JF (1994). Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals. *Radiat Res*, 137, 295-299.
- Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ (2007). Small molecule activators of SIRT 1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, 450, 712-716.
- Miyazono Y, Gao F, Horie T (2004). Oxidative stress contributes to, *Scand J Gastroenterol*, 39, 11, 1119-1127.
- Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y (2001). Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28, 1-2, 55-59.
- Mokni M, Elkahoui S, Limam F, Amri M, Aouani E (2007). Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. *Neurochem Res*, 32, 981-987.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez M, Sineiro J, Dominguez H, Nunez MJ, Parajo JC (2001). Natural antioxidants from residual sources, *Food Chem*, 72, 145.
- Moynihan KA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Méneur C, Permutt MA, Imai S (2005). Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice, 2, 2, 105-117.
- Murcia MA, Martinez-Tome M (2001). Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives. *J Food Prot*, 64, 3, 379-384.
- Naderali EK, Doyle PJ, Williams G (2000). Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. *Clin Sci*, 98, 5, 537-543.
- Narayanan BA, Narayanan NK, Stoner GD, Bullock BP (2002). Interactive gene expression pattern in prostate cancer cells exposed to phenolic antioxidants. *Life Sci*, 70, 15, 1821-1839.
- Ohasone Y, Okano Y, Kameda H, Hama N, Matsumura M, Nojima T (1997). Toxicity of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis –clinical characteristics in patients with MTX-induced pancytopenia and interstitial pneumonitis. *Ryumachi*, 37, 1, 16-23.
- Oktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzare E (2006). Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health*, 22, 6, 241-247.
- Olas B, Wachowicz B, Szewczuk J, Saluk-Juszczak J, Kaca W (2001). The effect of resveratrol on the platelet secretory process induced by endotoxin and thrombin. *Microbios*, 105, 410, 7-13.

Özdemir H, Taçyıldız N (2004). Çocukluk çağında febril nötropeniye yaklaşım. *Klinik Pediatri* 2003; 3: 1001–111. 8. Akova M, Akan H, Akova M, Arıkan S, Arslan H, Aydın K ve ark. Febril nötropenik hastada tanı ve tedavi kılavuzu. *Flora*, 9, 1, 5–28.

Özden M (2012). *Anatomi ve Fizyoloji Ders Kitabı*, Ayrıntı Basımevi, Ankara.

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*, 235, 207-219.

Phan RT ve Dalla-Favera R (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre. *B cells*, 432, 635-639.

Prasad KN, Cole WC, Kumar B, Che Prasad K (2002). Pros and cons of antioxidant use during radiation therapy. *Cancer Treat Rev*, 28, 2, 79-91.

Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Racioppi L, Soldati G, Manna C, Galletti P, Zappia V (1998). Resveratrol arrest the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Commun*, 250, 53-58.

Randerath K, Zhou GD, Monk SA, Randerath E (1997). Enhanced levels in neonatal rat liver of 7, 8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidative DNA lesion. *Carcinogenesis*, 18, 1419-1421.

Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AA, Bertelli A, Das DK (1999). The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury, *Free Radic Biol Med*, 27, 160-169.

Rupp DW (2006). Molecular mechanism of DNA damage, Web erişim: http://radonc.yale.edu/training/pdf/molecular_mechanisms.pdf Erişim Tarihi: 10 Mart 2008.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73, 39-85.

Schoenberg MH, Beger HG (1990). Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *J Biol Chem*, 76, 141-161.

Schwartzberg LS (2006). Neutropenia: Etiology and pathogenesis. *Clin Cornerstone*, 8, 5, 5-11.

Shahidi F, Nacz M (1995). *Food phenolics sources chemistry effects applications*, Technomic Publication, 235-277.

Shelton B (2003). Evidence-Based care for the neutropenic patient with leukemia. *Semin Oncol Nurs*, 19, 2, 133-141.

Shigenaga MK, Ames BN (1991), Assay for 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine; A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med*, 10, 211-216.

Signorelli P, Ghidoni R (2005). Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem*, 16, 449-466.

Simone CB, Simone NL, Simone V, Simone CB (2007). Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, *Altern Ther Health Med*, 13, 1, 22-28.

Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J (1990). Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med*, 43, 5, 334-344.

Sonis ST (2007). Pathobiology Of Oral Mucositis: Novel Insights And Opportunities. *J Support Oncol*, 5, 3-11.

Şenol E (2004). Son bir yılda febril nötropenide ne oldu? etkenler epidemiyoloji (literatür değerlendirilmesi). 3. Febril Nötropeni Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, 27–29.

Tabassum H, Parvez S, Pasha ST, Banerjee BD, Raisuddin S (2010). Protective effect of lipoic acid against methotrexate-induced oxidative stress in liver mitochondria. *Food Chem Toxicol*, 48, 7, 1973-1979.

Tatlidede E, Sehirli O, Velioglu-Ogunc A, Cetinel S, Yegen BC, Yarat A, Süleymanoglu S, Sener G (2009). Resveratrol treatment protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage, *Free Rad Res*, 43, 195–205.

Tedesco I, Russo M, Russo P, Iacomino G, Russo GL, Carraturo A (2000). Anti oxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *J Nutr Biochem*, 11, 2, 114-119.

Teke HÜ, Özen M (2014). Romatoid Artritli Hastalarda Düşük Doz Metotreksata Bağlı Pansitopeni; Risk Faktörleri Yol Gösterici midir? *Türk Fiz Tıp Rehab Derg*, 60, 54-57.

Tian H, Cronstein BN (2007). Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull Hosp Jt Dis*, 65, 3, 168-173.

Tunalı-Akbay T, Sehirli O, Ercan F, Sener G (2010). Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 13, 303–310.

Uguralp S, Usta U, Mizrak B (2005). Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg*, 15, 333-336.

Uraz S, Tahan V, Aygun C (2008). Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci*, 53, 1071-1077.

Uzar E, Koyuncuoglu HR, Uz E, Yilmaz HR, Kutluhan S, Kilbas S (2006). E activities of antioxidant enzymes and the level of malondialdehyde in cerebellum of rats subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem*, 291, 1-2, 63-68.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 1, 44-84.

- Vardi N, Parlakpınar H, Cetin A, Erdogan A, Cetin Ozturk I (2010). Protective effect of beta-carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol Pathol*, 38, 4, 592-597.
- Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, Sun AY (2002). Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res*, 27, 958, 2, 439-447.
- Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S (1997). Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Rev*, 23, 4, 209-240.
- Weindruch R (2003). Caloric restriction gene expression and aging. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2, 58-59.
- White AC, Sousa AM, Blumberg J, Ryan HF, Fanburg BL, Kayyali US (2006). Plasma antioxidants in subjects before hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 38, 513-520.
- Widemann BC, Adamson PC (2006). Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*, 11, 694-703.
- Wildburger R, Mrakovcic L, Stroser M, Andrisic L, Borovic Sunjic S, Zarkovic K, Zarkovic N (2009). Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence? Review Citation. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Derg*, 29, 1, 189-193.
- Yakar K (2005). Fizyoloji kitabı, Nobel Yayınevi, 144-160.
- Yan Y, Yang JY, Mou YH, Wang LH, Zhou YN, Wu CF (2012). Differences in the activities of resveratrol and ascorbic acid in protection of ethanol-induced oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Food Chem Toxicol*, 50, 168-174.
- Yarris JP, Hunter AJ. Roy Hertz (2003). M.D. (1909-2002): the cure of choriocarcinoma and its impact on the development of chemotherapy for cancer. *Gynecol Oncol*, 89, 2, 193-198.
- Yılmaz B (2000). Kan Fizyolojisi, Feryal Matbaacılık, Ankara.
- Yiğit N, Benli M (2005). Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Derg*, Erişim Tarihi:19.12.2010 www.mikrobiyoloji.org/pdf/702050801, 3, 8, 1-8.
- Yoon KH, Ng SC (2001). Early onset methotrexate-induced pancytopenia and response to GCSF: areport of two cases. *J Clin Rheumatol*, 7, 17-20.
- Young IS, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54, 176-186.
- Zadak Z, Hyspler R, Tichá A, Hronek M, Fikrová P, Rathouská J, Hrnčiariková D, Stetina R (2009). Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol Res*, 58, 13-17.

Zastawny TH, Altman SA, Randers-Eichhom L, Madurawe R, Lumpkin JA, Dizdaroglu M, Rao G (1995). DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions. *Free Radic Biol Med*, 18, 1013-1022.

Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA, Tillement JP (1999). Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Clin Exp Res*, 25, 87-97.

Zou Y, Houten BV (1999). Strand opening by the UvrA₂B complex allows dynamic recognition of DNA damage, *EMBO J*, 18, 4889-4901.



ÖZGEÇMİŞ

Van'da 1985 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladı. 2004 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Yüksek Okulu Sağlık Memurluğu bölümünü kazandı. 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Çeşitli nedenlerle ara verdiği yüksek lisansa af kapsamında dönerek devam etmektedir. 2007-2008 yıllarında YYÜ Araştırma Hastanesinde taşeron firmaya bağlı hemşire olarak çalıştı. 2008 yılında 4 ay özel bir hastanede hemşire olarak çalıştı. 2009 yılında Şanlıurfa Devlet Hastanesine Hemşire olarak atandı. 7 ay çalıştıktan sonra, aynı yıl içinde İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Araştırma Hastanesine Hemşire olarak atandı ve halen burada görev yapmaktadır.

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAY BELGESİ

Araştırmanın Adı	Resveratrolün Metotreksat Uygulanan Ratlarda Tokal Oksidan-Antioksidan Durumuna ve DNA Hasarına Etkisi
Araştırmanın Yürütücüsü	Yrd. Doç. Dr. Bahat COMBA
Yardımcı Araştırmacılar	Sağlık Mem. Mehmet VADİ
Kurumu	Veteriner Fakültesi
Araştırmanın Tahmini Süresi	12 Ay
Kullanılacak Hayvan Türü ve Sayısı	Sıçan 40 Adet
Destekleyecek Kuruluş (lar)	YYÜ. Bilimsel Araştırmalar Proje Başkanlığı
Başvuru Tarihi	24.03.2015

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2015/06-06	Tarih:30.04.2015
	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi/elemanı Yrd. Doç. Dr. Bahat COMBA sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak ilgi başvuru belgeleri incelendi. Çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna, projenin aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve proje yürütücüsüne iletilmesine oy birliği /oy çokluğu ile karar verildi.	
	<ol style="list-style-type: none">1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması.2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılar da değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması.3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihlerinin bildirilmesi.4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması.5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.	

ETİK KURUL ÜYELERİ

BASKAN
Prof. Dr. Semiha DEDE

ÜYELER

Prof. Dr. Duran BOLAT

Doç. Dr. Fatma İLHAN

Doç. Dr. Atilla DURMUŞ

Doç. Dr. Barış Atalay USLU

Vet. Hek. Yrd. Doç. Dr. Yıldray BAŞBUĞAN

Prof. Dr. Sıddık KESKİN

Doç. Dr. Fazıl ŞEN

Doç. Dr. M. Fatih GARÇA

Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU

*Bu form YÜHADYEK tarafından doldurulacaktır.



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ

YUZUNCU YIL UNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı	Resveratrolün Metotreksat Uygulanan Ratlarda Total OksidanAntioksidan Durumuna Ve DNA Hasarına Etkisi	
Title of the Research	The Effect of Resveratrol on Total Oxidative-Antioxidative Status and DNA Damage in Rat Induced Methotrexate	
Araştırmacı(lar) Investigator(s)	Yürütücü / Chief investigator : Yrd. Doç. Dr. Bahat COMBA Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Mehmet VADİ	
Araştırmanın Başlama Tarihi / Research Starting Date:	01.12.2015	
Araştırmanın Bitiş Tarihi / Research Completion Date:	01.12.2016	
Proje Süresi / Total Time of Project:	1 yıl/1 year	
Proje No / Project Number:	2015-SBE-YL235	
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / Funding institution(s) (if available):	YYÜBAP	
Destek Şekli ve Miktarı / Type and amount of funding:	10000 (TL)	
Karar:	Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun 24 / 11 / 2016 tarih ve 2016/11 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 24 / 11 / 2016 (decision number 2016/11).	
	BAŞKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE	ÜYE	ÜYE
Prof. Dr. Fazıl ŞEN	Prof. Dr. Sıddık KESKİN	Prof. Dr. Suphi DENİZ
ÜYE	ÜYE	ÜYE
 Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	 Doç. Dr. Atilla DÜRMÜŞ	 Doç. Dr. Abdülbaki AKSAKAL
ÜYE	ÜYE	ÜYE
 Doç. Dr. Nalan ÖZDAL	Yrd. Doç. Dr. Özer ALKAN	Yrd. Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ
ÜYE	ÜYE	ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Canser Yılmaz DEMİR	Yrd. Doç. Dr. Yıldray BAŞBUĞAN	Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU
ÜYE		
 Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET		

**YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU**

Tarih: 29/12./2016

Tez Başlığı / Konusu: **VADİ M (2017). Resveratrolün metotreksat uygulanan ratlarda total oksidan-antioksidan durumuna ve DNA hasarına etkisi**

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 67 sayfalık kısmına ilişkin, 29/12/2016 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNITIN COM intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı (% 7) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

29.12.2016

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Mehmet VADİ

Öğrenci No:

Anabilim Dalı: Fizyoloji

Programı: Veteriner

Statüsü: Y.Lisans

**DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR**


Yrd. Doç. Bahat COMBA

**ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR**

(Unvan, Ad Soyad, İmza)