

**SIÇANLARDA PEMETREXED KAYNAKLI
KARACİĞER HASARINA KARŞI CHRYSİN'İN
KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Beyza ÖZDEMİR

ANATOMİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Evren KÖSE**

Yüksek Lisans Tezi – 2022

**T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA PEMETREXED KAYNAKLI KARACİĞER HASARINA KARŞI
CHRYŞİN'İN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Beyza ÖZDEMİR

**Anatomi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Evren KÖSE**

**MALATYA
2022**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Karaciğer.....	2
2.1.1. Karaciğer Anatomisi	2
2.1.2. Karaciğerin Fonksiyonları	5
2.1.3. Sıçanlarda Karaciğer Anatomisi	6
2.1.4. Karaciğer Histolojisi	6
2.2. Pemetrexed.....	7
2.2.2. Pemetrexed Yan Etkileri	8
2.3. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	9
2.2.1. Serbest Radikallerin Etkileri	10
2.3.2. Oksidatif Stres Mekanizması	11
2.3.3. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	11
2.3.4. Flavonoidler	13
2.3.5. Chrysin.....	13
2.3.6. Chrysin'in İnsan Sağlığına Etkileri.....	14
3. MATERYAL METOT	15
3.1. Çalışmanın Şekli	15
3.2. Deney Gruplarındaki Hayvan Sayısının Belirlenmesi.....	15
3.3. Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Belirlenmesi	15
3.4. Kan ve Karaciğer Dokularının Elde Edilmesi ve Analizlere Hazırlanması	16
3.5. Biyokimyasal analizler	16
3.5.1. AST ve ALT Değerlerinin Ölçülmesi.....	16
3.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	17
3.5.3. Malondialdehit (MDA) Ölçümü	17
3.5.4. Karaciğer Dokularında TAS ve TOS Ölçümü.....	17

3.6. Histolojik Analizler.....	17
3.6.1 Histopatolojik analizler.....	17
3.6.2. İmmünohistokimyasal analizler	18
3.7. İstatistiksel Analizler	18
4. BULGULAR.....	20
4.1. Kan AST ve ALT Düzeyleri	20
4.2. MDA, SOD, TAS ve TOS Düzeyleri	21
4.3. Histolojik Bulgular	24
4.3.1. Histopatolojik bulgular	24
4.3.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	25
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	33
KAYNAKLAR	34
EKLER.....	44
EK-1. Özgeçmiş.....	44
EK-2. Etik Kurul Kararı.....	45

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi, tecrübe ve desteğini benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Evren KÖSE'ye,

Bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren kıymetli hocalarım Doç. Dr. Mustafa CANBOLAT'a, Dr. Öğr. Üyesi Aymelek ÇETİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Turgay KARATAŞ'a,

Tez çalışmamın yürütülmesinde Fizyoloji Anabilim Dalı'nın olanaklarından yararlanmamı sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Süleyman SANDAL'a,

Tez çalışmamın histolojik analizlerinde desteklerinden dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Azibe YILDIZ'a, biyokimyasal analizlerdeki katkısı ve tez sürecimdeki emek ve destekleri için Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Dr. Kevser TANBEK'e,

Tez konum ile ilgili bilgi ve tecrübeleri ile bana yardımcı olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ'a,

Hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, beni teşvik edip yönlendiren, her soruma sabır ve sevgiyle yaklaşan kıymetli arkadaşım Ayşegül KISAOĞLU'na,

Tez çalışmam boyunca bana her zaman destek olan, teknik konularda yol gösteren Anabilim Dalı'mızın değerli asistanları Arş. Gör. Dr. Furkan ÇEVİRGEN ve Arş. Gör. Damla BİLGE'ye,

Ayrıca TYL-2021-2632 nolu tez projemin gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim, tüm zorlukları beraber aştığım kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Sıçanlarda Pemetrexed Kaynaklı Karaciğer Hasarına Karşı Chrysin'in Koruyucu Etkisinin İncelenmesi

Amaç: Çalışmamızın amacı pemetrexed'in karaciğer üzerindeki olası zararlı etkilerini ve chrysin'in karaciğer toksisitesine karşı koruyucu rolünü araştırmaktır.

Materyal ve Metot: Çalışmada Sprague-Dawley cinsi 50 adet sıçan kullanıldı. Grup I kontrol grubu olarak kullanıldı. Grup II'ye p.o. mısır yağı (chrysin çözücüsü) (5mg/kg/gün, 28 gün boyunca), grup III'e i.p. PMTX (1mg/kg/hafta, 4 hafta boyunca), grup IV'e p.o. chrysin (50 mg/kg/gün, 28 gün boyunca), grup V'e i.p. PMTX (1mg/kg/hafta, 4 hafta boyunca) + chrysin (50 mg/kg/gün, 28 gün boyunca) uygulandı. Tüm sıçanlar 28. günün sonunda kan ve karaciğer dokuları alındıktan sonra sakrifiye edildi. Serum örneklerinden AST ve ALT seviyeleri ölçüldü. Karaciğer dokusundan SOD, MDA, TAS ve TOS düzeyleri ölçüldü. Histolojik olarak hematoksilen-eozin, immünohistokimyasal olarak kaspaz-3 ve TNF-alfa'ya yönelik boyamalar yapıldı.

Bulgular: Grupların AST ve ALT düzeylerinin, PMTX grubunda diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.005$). MDA düzeyleri karşılaştırıldığında PMTX grubunda, kontrol, sham ve CHR gruplarına göre anlamlı düzeyde arttığı ($p<0.05$), SOD enzim aktivitesi karşılaştırıldığında ise PMTX grubunda diğer gruplara göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi ($p<0.05$). Karaciğer dokusunda TAS düzeyleri incelendiğinde, PMTX grubunda kontrol, sham ve CHR gruplarına göre anlamlı derece düşük bulundu. TOS düzeyleri PMTX grubunda diğer gruplara göre artmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı değildi. Gruplar arasında histopatolojik olarak anlamlı fark oluşmadı. Pemetrexed uygulamasının kaspaz-3 ve TNF- α immünreaktivitesini artırdığı ve bu artışın, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0.01$). PMTX+CHR grubunda hem kaspaz-3 hem de TNF- α immünreaktivitesinde belirgin bir azalma izlendi ($p<0.001$).

Sonuç: Çalışmamızda chrysin'in pemetrexed kaynaklı karaciğer toksisitesinde antioksidan etki yoluyla dokuları hasara karşı koruduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: pemetrexed, chrysin, karaciğer toksisitesi, oksidatif stres

ABSTRACT

Investigation of the Protective Effect of Chrysin Against Pemetrexed-Induced Liver Injury in Rats.

Aim: The aim of our study is to investigate the possible harmful effects of pemetrexed on rat liver and the protective role of chrysin against it.

Material and Method: In this study 50 male Spraque-Dawley rats were used. Group I was used a control group. Group II received a p.o. corn oil (chrysin solvent) (5 mg/kg/day for 28 days), group III received an i.p. PMTX (1 mg/kg/week for 4 weeks), group IV received a p.o. chrysin (50 mg/kg/day for 28 days), and group V received an i.p. PMTX (1 mg/kg/week for 4 weeks) + chrysin (50 mg/kg/day). After collecting blood and liver tissues, all rats were slaughtered at the conclusion of the 28th day. Serum samples were used to determine the levels of AST and ALT. The levels of SOD, MDA, TAS, and TOS in liver tissue were measured. Hematoxylin and eosin staining were used histologically, as well as caspase-3 and TNF-alpha immunohistochemistry.

Results: AST and ALT levels of the groups, PMTX group were detected significantly increased when compared to other groups ($p < 0.005$). When MDA levels were compared, the PMTX group increased significantly ($p < 0.005$) compared to the control, sham, and CHR groups, whereas SOD enzyme activity was found to be significantly lower in the PMTX group compared to the other groups ($p < 0.005$). TAS levels in liver tissue were examined to be considerably lower in the PMTX group than in the control, sham, and CHR groups ($p < 0.005$). Although TOS levels in the PMTX group were higher than in the other groups, the difference was not statistically significant. There was no histopathologically significant difference between the groups. Pemetrexed treatment was found to enhance caspase-3 and TNF- immunoreactivity, which was statistically significant when compared to other groups ($p < 0.01$). In the PMTX+CHR group, immunoreactivity to caspase-3 and TNF- was significantly reduced ($p < 0.001$).

Conclusion: In our study, it was determined that chrysin protects tissues against damage in pemetrexed-induced liver toxicity by acting as an antioxidant.

Keywords: pemetrexed, chrysin, liver toxicity, oxidative stress

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AICARFT	: Aminoimidazol Karboksamid Ribonükleotit Formiltransferaz
ALT	: Alanin Transaminaz
AST	: Aspartat Transaminaz
CAT	: Katalaz
CCl₄	: Karbon Tetraklorür
CHR	: Chrysin
Cu⁺	: Bakır Molekülü
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
dTMP	: Deoksitimidin Monofosfat
dUMP	: Deoksiüridin Monofosfat
Fe²⁺	: Demir Molekülü
GARFT	: Glisinamid ribonükleotid formil Transferaz
GSH- Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
KHOAK	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
MDA	: Malondialdehit
NBT	: Nitroblütetrazolium
O₂^{•-}	: Süperoksit Radikali
PMTX	: Pemetrexed
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAS	: Toplam Antioksidan Kapasite
TOS	: Toplam Oksidan Kapasite
TS	: Timidilat Sentaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Karaciğerin facies diaphragmatica'dan görünümü.....	3
Şekil 2.2. Karaciğerin facies visceralis'den görünümü	3
Şekil 2.3. Karaciğer lobülünün histolojik yapısı	7
Şekil 2.4. Pemetrexed etki mekanizması	8
Şekil 2.5. Serbest radikallerin etkileri	11
Şekil 4.1. Grupların serum örneklerinden ölçülen AST seviyesi	20
Şekil 4.2. Grupların serum örneklerinden ölçülen ALT seviyesi	21
Şekil 4.3. Grupların karaciğer dokularında MDA enzim aktivitesi.....	22
Şekil 4.4. Grupların karaciğer dokularında SOD enzim aktivitesi	23
Şekil 4.5. Grupların karaciğer dokularındaki TAS miktarı	23
Şekil 4.6. Grupların karaciğer dokularındaki TOS miktarı	24
Şekil 4.7. Histopatolojik değerlendirme sonuçları	25
Şekil 4.8. Kaspaz-3 immünreaktivitesi.....	26
Şekil 4.9. TNF- α immünreaktivitesi	27

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 4.1. Gruplara ait AST ve ALT değerleri.....	20
Tablo 4.2. Sıçan karaciğer dokularında oksidatif stres parametre bulguları.....	22
Tablo 4.3. Gruplara ait histopatolojik değerlendirme sonuçları [med (min-mak)].....	25
Tablo 4.4. Gruplara ait immünreaktivite değerlendirme sonuçları [med (min-mak)]. ..	27

1. GİRİŞ

Pemetrexed (PMTX), malign plevral mezotelyoma ve skuamöz olmayan küçük hücre dışı akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan antimetabolitler sınıfına ait bir folat analogudur. Nükleik asitlerin sentezine müdahalesi sonucu neoplastik hücrelerde sitotoksik etkiye neden olur. Pürin ve pirimidin sentezi ile ilgili çoklu enzim hedeflerini inhibe eder (1). PMTX, iyi tolere edilen bir ilaçtır. Başlıca yan etkileri miyelosupresyon, özellikle nötropeni ve trombositopenidir. Mide bulantısı, yorgunluk, dispne, kusma, kabızlık, nöropati gibi birçok yan etkisi bildirilmiştir (2). PMTX, sisplatin ile kombinasyon halinde özellikle metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde birinci basamak tedavi olarak kullanılır (3). Bu ajan, küçük hücreli olmayan akciğer, meme, kolorektal, pankreas, mide, mesane dahil olmak üzere çok çeşitli solid tümörlerde geniş antitümör aktiviteye sahiptir (2).

Flavonoidler, meyve, sebze, çay, hububat gibi bitkisel gıdalarda bol miktarda bulunan ve antioksidan etki gösteren bileşiklerdir. Chrysin (CHR) son yıllarda birçok araştırmada kullanılan bir flavonoiddir. Antikarsinojenik, antioksidan, anti-inflamatuvar, antiviral etkileri olduğu gösterilen CHR serbest radikal düzeyini azaltarak toksik etkileri engellemektedir (4-6). Literatürde birçok çalışma CHR'nin mide, pankreas, meme, kolorektal dahil olmak üzere çeşitli dokularda ilaçların ve toksik ajanların sebep olduğu hasara karşı koruyucu etkilere sahip olduğunu göstermiştir (7-10). Hayvan modelleri üzerinde yapılan önceki çalışmalarda CHR'nin oksidatif stres ve apoptozun inhibisyonu yoluyla metotreksat, asetaminofen, doksorubisin gibi ajanlardan kaynaklı hepatotoksisiteyi önlediği bildirilmiştir (11). Sıçanlarda yapılan diğer bir çalışmada CHR'nin antioksidan aktiviteyi artırmak suretiyle CCl₄'ün karaciğeri ve böbrek dokularında oluşturduğu hasarı iyileştirdiğini gösterilmiştir (12).

Literatürde PMTX'in karaciğerde oluşturduğu toksisitenin incelendiği çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada CHR'nin PMTX kaynaklı karaciğer toksisitesine karşı koruyucu etkisini incelemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

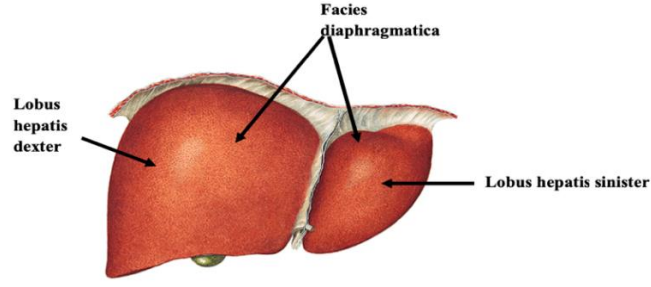
2.1. Karaciğer

2.1.1. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer; karın boşluğunda sağ-üst kısmında yer almaktadır. Diaphragma'nın alt yüzüne gevşek bağ dokusu aracılığıyla tutunur ve kostalar aracılığıyla korunur. Topografik olarak, sağ hipokondrium, epigastrium'un büyük bir bölümü ve sol hipokondriumun üst-medial kısmında bulunur. Karın boşluğunda bulunan organların ve vücuttaki bezlerin en büyüğüdür. Kırmızımtırak kahve renginde olan karaciğer gevrek ve frajil kıvamdadır. Yetişkinlerde vücut ağırlığının yaklaşık %2'si kadardır. Çocuklardaysa bu oran %4-5'i bulmaktadır. Ortalama ağırlığı yetişkinlerde 1200-1500 gr kadar olup erkeklerde kadınlardan daha ağırdır. Künt travmalar sebebiyle sık yırtılan bir organdır. Bol damarlı olması sebebiyle bu yaralanmalar neticesinde ciddi kanamalar meydana gelebilir. Karaciğeri bağ dokusundan yapılmış kuvvetli fibröz bir zar olan tunica fibrosa (Glisson kapsülü) sarar ve organın içine doğru uzantılar gönderir. Dışta ise tunica serosa (periton) sarar (13).

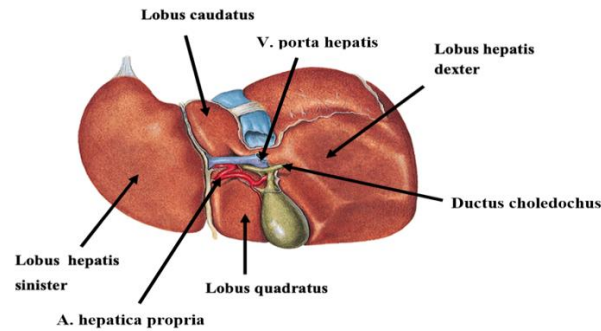
Karaciğer facies diaphragmatica ve facies visceralis olmak üzere iki yüze sahiptir.

Facies diaphragmatica: Diaphragma ile komşu olan facies diaphragmatica karaciğerin büyük olan yüzüdür. Büyük bir kısmı diaphragma ile örtülü olan bu yüz düzgün, parlak ve konvektir. Bu yüzün pars posterior'u ve lig. falciforme hepatis'in karın ön duvarına uzanan iki yaprağı arasında kalan bölge peritonsuzdur. Lig. coronarium'un yaprakları arasında kalan peritonsuz alana pars affixa (area nuda) adı verilir. Periton ile kaplı kısımlarına pars libera adı verilir. Pars superior, anterior, dextra ve posterior olmak üzere dört kısmı vardır (13, 14).



Şekil 2.1. Karaciğerin facies diaphragmatica'dan görünümü (Sobotta'dan modifiye edilmiştir).

Facies visceralis: Facies visceralis konkav alt yüzüdür ve karın organlarıyla komşudur. Bu yüzün konumu aşağı, arka ve sol tarafa doğrudur. Bu yüzün üzerinde yer alan bazı yarık ve çukurluklar peritonsuzdur. Bu yapıların dışındaki kısımlar peritonla örtülüdür. Visceral yüzün ortasında 'H' harfi şeklinde yerleşmiş yarık ve oluklar bulunur. Karaciğerin organlara bakan yüzünde karaciğerin kapısı olarak adlandırılan porta hepatis, bu yapının sol üst kısmında fissura ligamenti venosi, sol alt kısmında da fissura ligamenti teretis bulunur. Porta hepatisin sağ üst kısmında vena cava inferiorun yerleştiği sulcus v. cavae ve sağ alt tarafında ise safra kesesinin oturduğu çukurluk olan fossa vesicae fella (biliaris) bulunur (13). 'Karaciğer kapısı' da denilen porta hepatis'i çevreleyen periton yaprakları midenin küçük kurvaturundan karaciğere doğru uzanarak omentum minus'u oluşturur. Visseral yüzün karaciğerin kapısı olarak adlandırılan porta hepatis, safra kesesinin oturduğu çukur fossa vesica biliaris, vena cava inferiorun yerleştiği sulcus vena cava, fissura ligamenti teretis ve fissura ligamenti venosi dışında diğer kısımlar peritonla örtülüdür. Karaciğerin visseral yüzünde impressio colica, suprarenalis, renalis, gastrica, oesophagea ve duodenalis şeklinde kalın bağırsak, böbrek üstü bezi, böbrek, mide, yemek borusu ve ince bağırsağın oluşturduğu izler yer alır (14).



Şekil 2.2. Karaciğerin facies visceralis'den görünümü (Sobotta'dan modifiye edilmiştir).

Karaciğerin Lobları

Karaciğerin diyaframla temas halindeki yüzünden bakıldığında lobus hepatis dexter ve lobus hepatis sinister adında iki büyük lob, organlara bakan yüzünde ise lobus quadratus ve lobus caudatus adında iki küçük lob olmak üzere toplamda dört yüze sahiptir. Facies visceralisten bakıldığında; lobus hepatis dexter sulcus sagittalis dexter'in sağında kalır. Lobus hepatis sinister ise fissura sagittalis sinister'in solundadır. Oluklar arasında kalan porta hepatisin üst kısmı lobus caudatus alt kısmı lobus quadratus olarak adlandırılır. Bu küçük loblar anatomik açıdan sağ lobun parçaları sayılır (15).

Karaciğerin Segmentasyonu

Karaciğerin lobları anatomik ve fonksiyonel olarak farklı sınıflandırılır. Küçük loblar olan lobus caudatus ve lobus quadratus anatomik olarak, lobus hepatis dexter'e ait olsada fonksiyonel olarak safra drenajı ve kan kaynağı ile ilişkili olarak tanımlanır. Küçük loblar a. hepatica propria ve v. portae hepatis'in ramus sinister'leri ile beslenirken safra drenajı ductus hepaticus sinister'den sağlanır. Bundan dolayı, bu iki lob fonksiyonel olarak lobus hepatis sinister'in bir parçası şeklinde kabul edilir (14).

Arteria (a) hepatica propria, venae (v) portae ve ductus hepaticus'ların dallanması karaciğerin segmentlerine ayrılmasında yol göstericidir. Öncelikle sağ ve sol olarak ikiye dala ayrılırlar ve daha sonra karaciğerin segmentlerini oluşturmak suretiyle birçok alt dallara ayrılırlar. Bir segment içinde, v. portae hepatis, a. hepatica propria ve safra kanallarının segmenter dalları yer alır. Segmentlerin saptanmasında asıl olan bu oluşumların intrahepatik dallarının karaciğer parankimasında dağılmasıdır. V. hepaticalar bu segmental dağılımına uyum göstermemektedir (13).

Karaciğerin Ligamentleri

Karaciğer karın ön duvarına ve diaphragmanın alt yüzüne bağlar aracılığıyla tutunur. Bu bağlardan beşi (lig. coronarium hepatis, lig. falciforme hepatis, lig. hepatorenale, lig. triangulare dextrum ve sinistrum) periton tarafından oluşturulur. Area nuda'nın sağ ucunda lig. coronarium'un ön ve arka yaprakları birleşerek lig. triangulare dextrum ve sinistrum'u meydana getirirler. Lig. teres hepatis ise doğumdan sonra v. umbilicalis'in oblitere olması ile oluşmuştur. Ayrıca peritoneal yapılar olan lig. hepatogastricum aracılığıyla mideye bağlanırken lig. hepatoduodenale ile ise duodenuma bağlanır (16).

Karaciğerin Damarları

Karaciğer iki kaynaktan kan alır. Arterial kan truncus coeliacus'un bir dalı olan a. hepatica communis'in bir dalı a. hepatica propria'dan gelir. Bu dal porta hepatis'e gelince a. hepatica dextra ve sinistra olarak iki dala ayrılır. Karaciğer dokusu içinde segmentler arasında intersegmental ve loblar arasında interlobuler dallarına ayrılarak v. portae ile birlikte dağılır. Dalları arasında anastomoz yoktur. V. splenica ile v. mesenterica superior'un birleşmesiyle oluşan v. portae, besinden zengin oksijenden fakir kanı taşır ve a. hepatica propria ile beraber lig. hepatoduodenale içinde uzanarak porta hepatis'ten karaciğere girer. Karaciğerde a. hepatica propria'nın dalları ile birlikte dağılır. Beraber seyrettiği arterle birlikte v. centralis'e açılır. Karaciğerin venöz kanı v. hepatica'lar aracılığı ile karaciğerin arka kısmında v. cava inferior'a açılır (14).

Karaciğerin Sinirleri

Sempatikler nervi splanchnici'den, parasempatikler ise her iki taraf nervus vagus'tan gelerek önce plexus coeliacus'u oluşturduktan sonra plexus hepaticus adıyla karaciğere gider. Duyu lifleri, sempatik liflerle birlikte uzanarak ve medulla spinalis'in 8-11. segmentlerine gittiğinden dolayı ağrısı 10. interkostal sinirin dağılma alanında hissedilir (14,16).

2.1.2. Karaciğerin Fonksiyonları

Karaciğer yapı ve fonksiyon olarak adaptasyonu yüksek, aynı zamanda endokrin ve ekzokrin salgı yapan bir organdır. Metabolik fonksiyonların düzenlenmesinde ve homeostazın korunmasında büyük rol oynar. Karaciğerin üstlendiği birçok fonksiyon, hepatositler tarafından yerine getirilir. Karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasında anahtar role sahiptir. Kanda normal glikoz konsantrasyonunun devamlılığını sağlar. Glikojenin depo edilmesinin yanında glikoliz, galaktoz ve fruktoz'un glukoz'a dönüşümü gibi görevleri vardır. Yağ asidi oksidasyonu sağlar. Hepatositlerde plazma proteinlerinden olan albumin, protrombin, fibrinojen, lipoproteinler sentezlenir. Vücuttaki metabolik olayların devamlılığı açısından önem arzeder. Aynı zamanda aminoasitlerin ve diğer maddelerin birbirine dönüşümleri gibi görevleri vardır. Dolaşım ve sindirim sistemi arasındaki ilişkiyi sağlar. Sindirim kanalında emilen besinleri işler ve depo eder. Önemli fonksiyonlarından bir diğeri de safrayı salgılayıp ardından bağırsağa iletmektir. Safra yağların sindiriminde elzem olan safra tuzlarını içerir. Karaciğer, vücutta bazı metabolitlerin zararlı etkilerinin azaltılmasından sorumludur. Protein yıkımından sonra oluşan ve hücreler açısından toksik bir madde olan amonyağın

üreye dönüşümünü sağlayarak bunun idrarla atılmasında görev alır. Böbrekten atılamayan pek çok zararlı maddeyi, vücuttan atılması gereken ilaçları, dışarıdan alınan veya endokrin sistemde üretilen hormonların fazlasını zararsız hale getirir. Ayrıca kalsiyum gibi minerallerin fazlasının detoksifikasyonunda rol oynar (17-19).

2.1.3. Sıçanlarda Karaciğer Anatomisi

Sıçan karaciğeri karın boşluğuna yerleşmiştir. Büyük bölümü diaphragma altına yerleşmişken; mide, sağ böbrek üstü bezi ve dalak ile de komşuluğu vardır. Ortalama bir sıçanda karaciğer 10 gr ağırlığında ve 19.6 mL hacindedir. Sıçan karaciğerinde loblanma insan karaciğerine benzeyerek lobus hepatis dexter, lobus hepatis sinister, lobus hepatis quadratus ve lobus hepatis caudatus olarak dört loba ayrılır. Sol lob midenin fundus bölümünün üzerindedir. Orta lob üzerinde fissura ligamenti teretis isimli derin bir yarık bulunur. Bu yarığı lig. teres hepatis oluşturur. Sağ lob v. cava inferior'u sarmaktadır. Ayrıca sağ böbreğin üzerine oturmuştur. Dördüncü lob ise özefagusu at nalı şeklinde saran ve lobların en küçüğü olan lobus hepatis caudatus'tur. Sıçanlarda safra kesesi bulunmaz. Safra, karaciğerin bütün loblarında toplanan safra kanalları aracılığıyla boşalır. Bu kanalların birleşmesiyle oluşan hepatik kanal karaciğer hilusundan çıktıktan sonra duodenuma açılmaktadır (20).

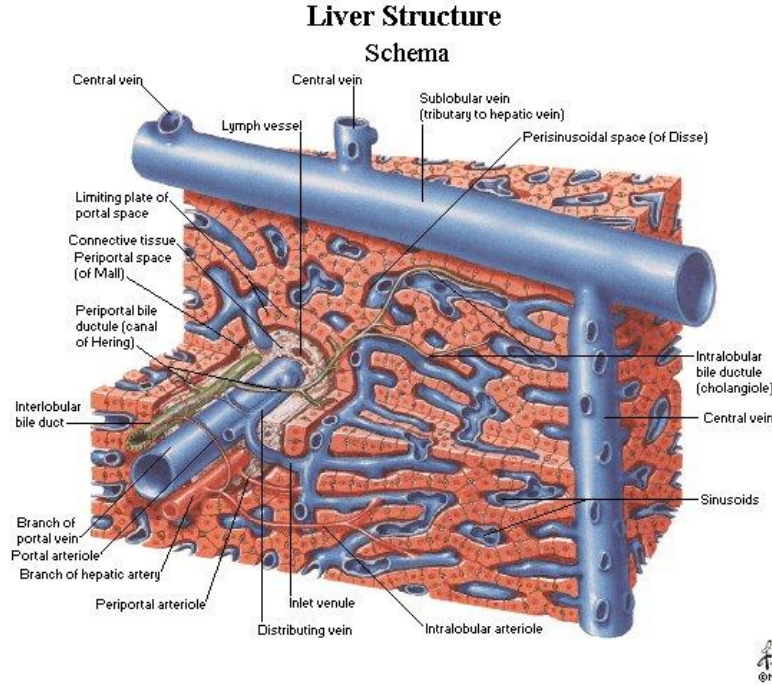
2.1.4. Karaciğer Histolojisi

Karaciğeri "tunica fibroza" veya "Glisson kapsülü" olarak adlandırılan zar sarar ve bu zar, karaciğerin küçük lobüllere ayrılmasını sağlar. Karaciğerde longitudinal yapılan kesitlerde poligonal şeklinde görülen hepaton olarak adlandırılan lobüller vardır. Lobüller karaciğerin yapısal ve fonksiyonel birimleridir. Yaklaşık olarak 2 mm yüksekliğindedir. Lobüllerin birbiri ile temas halinde bulunduğu bölgelerde üçgen şeklinde bağ dokusu alanları bulunur. Burası "glisson üçgeni", "porta mesafesi" ya da "kiernan aralığı" olarak isimlendirilir. Burada portal triadı oluşturan a. interlobularis, v. interlobularis ve ductus interlobularis birlikte seyreder.

Kiernan aralıklarında bulunan v. interlobularisten çıkan venler lobulus içerisinde birbiriyle bağlantı kurarak v. centralis'te toplanırlar. Lobulusun venlerine karaciğer sinüzoidleri denilmektedir ve duvarlarında endotel ve kupffer hücreleri bulunmaktadır. Endotel hücreleri ile hepatositler arasındaki boşluğa "disse mesafesi" denilir.

Hücre kolonlarının içinde, canaliculus biliferi denilen görevi safra taşımak olan ince kanalcıklar bulunmaktadır. Bu kanalcıklar birleşerek ductuli biliferi adını alır ve

ductuli biliferi'ler de birleşerek Kiernan aralığında bulunan ductus interlobularis'i oluştururlar (21, 22).



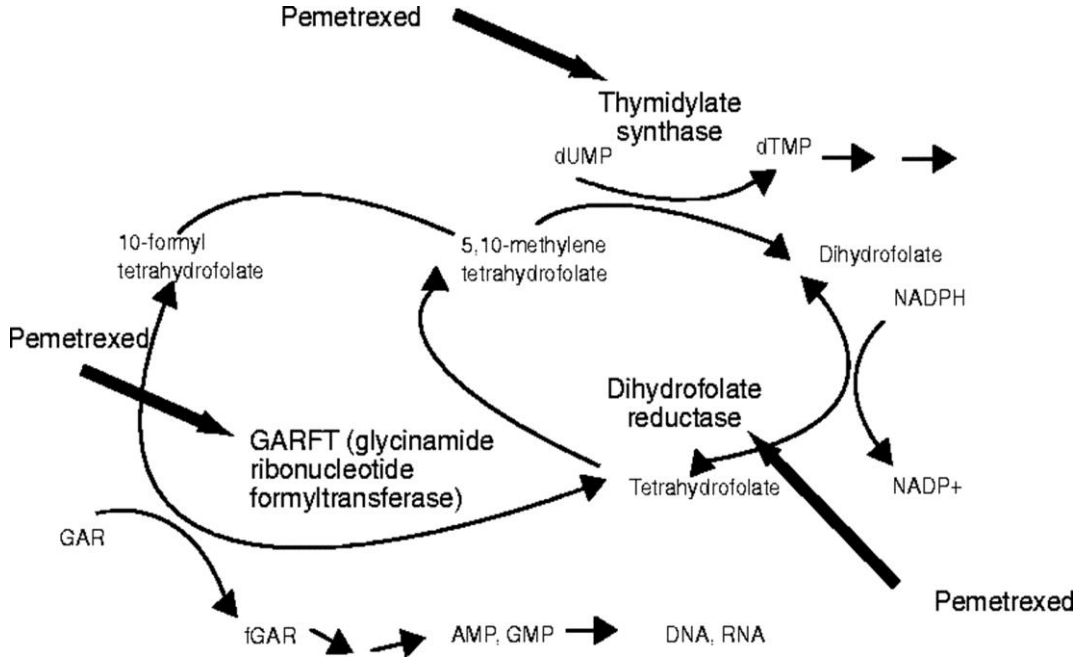
Şekil 2.3. Karaciğer lobülünün histolojik yapısı (19)

2.2. Pemetrexed

Uzun süredir antifolatların antitümör etkili ajanlar olarak geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir (23). PMTX (Alimta®, MTA, LY231514), bu bağlamda geliştirilmiş çok hedefli bir antifolat ajandır.

Antifolatlar, nükleik asitlerin sentezine müdahale ederek neoplastik hücreler üzerinde sitotoksik bir etkiye neden olur. DNA sentezini ve folat metabolizmasını engelleyerek tümör büyümesini baskılar. Pürin ve pirimidin sentezinde rol alan birçok enzimi inhibe eder (24).

Timidilat sentaz (TS) inhibisyonu PMTX'in birincil etki mekanizmasıdır. TS, deoksiüridin monofosfatın (dUMP), deoksitimidin monofosfata (dTMP) dönüşümünü katalizlemektedir. TS inhibisyonu, DNA sentezi için gerekli olan timidinde azalmaya bu da proliferasyonda düşüğe neden olur. TS, metotreksat ve glutamatlar gibi çeşitli antikanser ilaçlar için önemli bir hedefdir. PMTX TS'ye ek olarak pürin sentezinde rol oynayan folat bağımlı bir enzim olan dihidrofolat redüktaz (DHFR) ve glisinamid ribonükleotid formil transferaz (GARFT) enzimlerini inhibe eder. Daha az ölçüde de aminoimidazol karboksamid ribonükleotit formiltransferazı (AICARFT) inhibe eder (1,25).



Şekil 2.4. Pemetrexed etki mekanizması

PMTX geniş etkili bir ajandır ve birçok klinik endikasyonu vardır. PMTX, Şubat 2004'te FDA tarafından malign plevral mezotelyoma tedavisi için onaylanmıştır. Eylül 2008'de de cisplatin ile kombine olarak, metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin (KHOAK) birinci basamak tedavisinde kullanımı onaylanmıştır (26).

Gastrointestinal tümörler, meme, kolorektal, mide, serviks, mesane, baş ve boyun kanseri gibi diğer birçok neoplazmada aktivite göstermiştir (26-28). PMTX antifolat etki gösteren antikanser bir ilaçtır.

2.2.2. Pemetrexed Yan Etkileri

PMTX akciğer kanserinde bir köşe taşı olmasının yanı sıra sitotoksik bir antifolattır. Genellikle iyi tolere edilmesine rağmen hasta popülasyonunun bir kısmında toksisite yaşanır. Klinik çalışmaların çoğunda doz sınırlayıcı toksik etkisi nötropenidir (2). PMTX, trombositopeni ve anemi ile kendini gösteren kemik iliği inhibisyonu yapabilmektedir (29). PMTX kaynaklı diğer yaygın toksik etkiler arasında mide bulantısı, kusma, ishal, yorgunluk, döküntü, AST ve ALT artışı ve kreatinin klirensi azalışı belirtilmiştir (3, 28).

PMTX toksisitesinin önlenmesi ve yönetilmesi tedavinin etkinliği açısından önemlidir. PMTX toksisitesinde folat eksikliğinin rolü son zamanlarda kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir. Toksik etkilerinin azaltılmasında ve terapötik indeksinin

arttırılmasında folat takviyesinin veya folat içerikli bir diyetin önemi birçok çalışmada gösterilmiştir (28, 30).

2.3. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

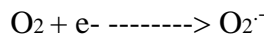
Serbest radikaller yörüngesinde tek ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran ve bundan dolayı reaktif ve toksik kimyasal bileşiklerdir. Bu eşleşmemiş elektron serbest radikallere reaktiflik kazandırarak hücrelere zarar vermektedir (31-33). Serbest radikallerin insan ve hayvan dokularında artması sebebiyle oluşan hücre hasarlarına duyarlı biyolojik materyaller; membran lipitleri, proteinler, DNA molekülleri ve nükleik asitlerdir (34).

Normal fizyolojik koşullarda, hücrelerde üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) sürekli olarak inhibe edilir. Bunu organizmadaki antioksidan savunma sistemleri gerçekleştirir. Bu denge, ROS lehine bozulduğunda organizmada muhtemel bir hasar oluşur ve buna oksidatif stres denir. Hücrede süperoksit radikallerinin birikmesi ya da endojen savunma sistemlerinin yetersiz kalması hücre için toksiktir (35,36). Bu toksisitenin yaşlanmayı hızlandırdığı ayrıca kalp-damar hastalıkları, sinir sisteminde dejeneratif hastalıkların, bağışıklık sisteminin zayıflaması, bazı kanser türlerinin oluşmasından infertiliteye kadar birçok hastalığa neden olduğu bilinmektedir (34, 37).

Organizmada endojen ve eksojen kaynaklı serbest radikaller; metabolik süreçler (mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntı) ya da çevresel oksidanlar (yabancı toksik maddeler, ilaçlar, radyasyon, alkol, yoğun fiziksel aktivite) etkisiyle devamlı olarak üretilmektedirler (38).

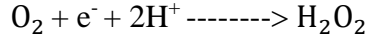
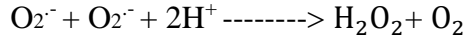
Reaktif oksijen türlerinden bazıları; süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen radikali'dir.

Süperoksit radikali kararsız bir yapıdadır ve oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelir. Bir serbest radikal olmasıyla beraber direkt zarar vermez. Süperoksitin temelde önemi hidrojen peroksitin kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (39).

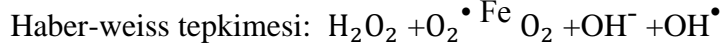


Hidrojen peroksit esasında serbest radikal olmamasına rağmen süperoksidin tersine membranları geçen, sitozole yayılan ve uzun ömüre sahip bir oksidandır. Süperoksidle reaksiyona girmesi sonucunda en reaktif ve zarar verici serbest radikal

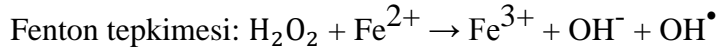
olan hidroksil radikali oluşturmak amacıyla kolay bir şekilde yıkılabilme özelliğine sahiptir (40).



Hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve süperoksit'in Haber-Weiss reaksiyonuna girmesiyle oluşur. Bilinen en reaktif ve toksik radikal olan hidroksil; proteinlere, lipitlere, DNA'ya ve organizmada birçok moleküle hasar verir (41).



Demir (Fe^{2+}) ve bakır (Cu^+) gibi ağır metallerin hidrojen peroksit'le Fenton reaksiyonu sonucunda da hidroksil oluşur (41).



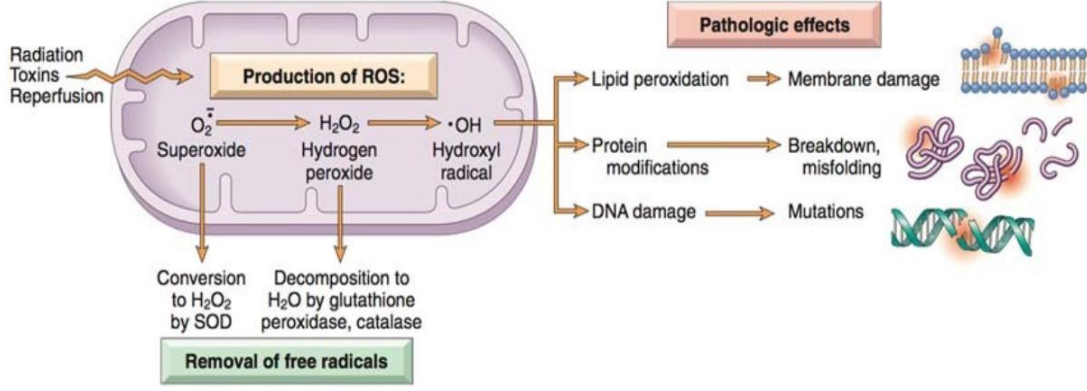
2.2.1. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller canlıda moleküler düzeyde birçok biyolojik hasara sebep olabilirler (42). Hücre membran proteinlerine, lipit, nükleik asitler, DNA ve enzimlere önemli derecede zarar verirler.

Serbest radikal hasarına en duyarlı yapı lipitlerdir. Lipit peroksidasyonu sonucu hücrenin membran yapısı ve akışkanlığı bozulur. Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonun asıl kaynağıdır. MDA düzeyinin belirlenmesi ile lipit peroksidasyonunun değerlendirilmesi yapılabilmektedir (43).

Serbest radikaller DNA üzerinde de etki gösterir. Nükleik asitler hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi radikallerle kolayca reaksiyona girebilmektedirler. Bu durum DNA'yı etkileyerek hasara, mutasyona, hücre disfonksiyonuna hatta kimi zaman da hücre ölümüne neden olmaktadır. Tekli oksijen radikali aracılığıyla yüksek elektron yoğunluğu olan guanin bazının hidroksilasyonu sonucu DNA yapısında hasar meydana gelebilir (44).

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme derecesi amino asitin içeriği ve dizilimine bağlıdır. Bunun sebebi serbest radikallerin protein molekülü içerisindeki sülfidril ve amino grupları ile reaksiyona girmesidir. Bu reaksiyonların sonucunda proteinlerde parçalanma, baz delesyonları veya zincir kırılmalar ortaya çıkar. Ayrıca enzimler de protein yapısında olduklarından enzim aktivitesinde değişimler gözlemlenebilmektedir (45).



Şekil 2.5. Serbest radikallerin etkileri (46)

2.3.2. Oksidatif Stres Mekanizması

Fizyolojik koşullarda, hücrelerde sürekli oluşan reaktif oksijen türleri ile etkileşime geçen antioksidan savunma sistemleri arasında bir uyum vardır. Mevcut olan bu dengenin bozulması hücrede reaktif oksijen türlerinin birikmesi, azalmış eliminasyonu veya antioksidatif savunmanın optimal olmayan tepkisi oksidatif stres reaksiyonunu başlatabilir (47).

Hücrede oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması hücre organelleri, membran lipitleri, DNA, nükleik asitler ve proteinler gibi moleküllerin oksidasyonuna sebep olur. Nihayetinde, oksidatif ajanların istenmeyen etkileri ortaya çıkar.

Oksidatif stres hücre hasarında temel rol oynamanın yanı sıra hipertansiyon, diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde etkin bir rol oynar (48-50).

2.3.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin vücutta oluşturduğu oksidatif hasarı azaltarak nötralize eden, serbest radikallerin fazlasını etkisizleştiren ve hastalıkların önlenmesinde katkı sağlayan bileşiklerdir (51).

Antioksidanların ilk etkisi lipid peroksidasyonuna karşı çıkmasıdır. Antioksidan mekanizmalarının etkinliği egzersiz, beslenme, yaşlılık gibi faktörlerden etkilenebilmektedir (52).

Antioksidanların Etki Mekanizması (53) ;

- 1) Reaktif oksijen türlerini etkileyip tutarak ya da daha zayıf olan değişik bir moleküle dönüştürme işlemidir. Buna toplayıcı (süpürücü) etki denir. Antioksidan enzimler bu şekilde etki açığa çıkarırlar.
- 2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşime girmek suretiyle onlara hidrojen aktarımı yaparak aktivitelerini azaltma özelliğine sahiptir. Bu antioksidanların bastırıcı (söndürme) etkisidir. Vitaminler ve flavonoidler bu şekilde bir etki gösterirler.
- 3) Serbest oksijen radikalleriyle aktivasyona girerek zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek gösterdiği etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, minareller ve seruloplazmin bu şekilde etki gösterir.
- 4) Serbest oksijen radikallerin oluşturduğu hasarın düzeltilmesi antioksidanların onarıcı etkisidir.

Kaynaklarına göre antioksidanlar endojen ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki grup altında toplanabilirler.

Endojen antioksidanlar

Vücutta sentezlenebilen antioksidanlardır. Oksidatif hasara karşı etkili enzim yapısındaki antioksidanlara örnek olarak; Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz,(CAT), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon Redüktaz verilebilir (54, 55).

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Serbest radikallere karşı primer savunma SOD tarafından gerçekleştirilir. Süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder. Tepkime sonucunda oluşan H_2O_2 'nin uzaklaştırılması için Katalaz ve Glutasyon Peroksidaz ile birlikte çalışır (56).

Katalaz (CAT)

Esas olarak peroksizomlar başta olmak üzere özellikle hücre içi organellerde ya da mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur. Hidrojen peroksitin H_2O_2 ve O_2 'ye dönüşümünü katalize eder (57).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Lipit hidroperoksitlerinin etkisizleştirilmesinde önemli rol oynar. Ayrıca hidrojen peroksitin indirgenmesini katalize ederek hidrojen peroksitin neden olduğu oksidatif hasara karşı hücreleri korur (56).

Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz, Glutasyon Peroksidaz'ın hidroperoksitleri yıkımı sonucu oluşan okside glutasyonu (GSSG) devamlı indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüştür (57).

Eksojen antioksidanlar

Vücutta sentezlenemeyip dışarıdan hazır olarak alınan antioksidanlara eksojen antioksidanlar denir. Bunlar vitamin veya ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir (54).

2.3.4. Flavonoidler

Güçlü antioksidan etkilere sahip olan flavonoidler bunun yanında antiinflamatuvar, antiviral, antialerjik ve antikanserojenik etkilere sahiptir. Literatürde flavonoidlerin genellikle bitkisel kaynaklı olduğu, insanlar tarafından üretilemedikleri ve kanser gibi hastalıkların engellemesinde rol oynadıkları bulunmuştur. Bu sebep son yıllarda flavonoidlerin araştırılmasının temel odağı olmuştur. Günümüze kadar 8000'nin üzerinde flavonoid karakterize edilmiştir. Flavonoidler 4 ana grupta incelenmektedir. Bunlar; flavononlar, kateşinler, flavonlar ve antosiyaninlerdir (58).

2.3.5. Chrysin

CHR, birçok bitkide bulunan ve güçlü antiinflamatuvar, antikanser ve antioksidan özelliklere sahip doğal, biyolojik olarak aktif bir bileşiktir. G.F. Jaubert tarafından 1926 yılında, propolisin içeriğinde mevcut olan flavonoidlerden birisi olarak keşfedilen CHR Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC-International Union of Pure and Applied Chemistry) tarafından $C_{15}H_{10}O_4$ olarak formüle edilmiştir (59).

Günümüzde araştırmacıların büyük ilgisini çekmektedir. Flavonlar grubunda yer almaktadır. CHR'in başlıca doğal kaynaklarından birkaçı çarkıfelek meyvesi (*Passiflora Caerulea*), propolis ve baldır. Bunların dışında kereviz, üzüm, kıvılcık, marul, maydanoz, kekik ve brokoli gibi birçok besinde CHR bulunmaktadır (60).

Hidrojen atomu transferi ve tek elektron transferi ile güçlü bir antioksidan özelliği sağlar. Kendi yapısal özellikleri sitokinleri inhibe edici özellik gösterir. Proinflamatuvar sitokinlerin herhangi birini inhibe edebilme özelliği CHR'nin 2. ve 3. karbonları arasında mevcut olan hidrojen grubu ve bunun yanı sıra karbon atomları arasında çift bağ bulunmasından kaynaklanır (61,62).

2.3.6. Chrysin'in İnsan Sağlığına Etkileri

CHR'nin etkileri üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Serbest radikal miktarını azaltarak toksik etkileri engeller. Antiviral ve antiinflamatuvar aktiviteleri nedeniyle birçok farmakolojik etki göstermektedir (5, 63). CHR'nin karaciğer ve böbrek koruyucu etkileri vardır (64,65). Son yıllarda CHR'nin antitümör aktivitesi araştırılmış ve kanser hücrelerinin proliferasyonu ve istilası üzerinde CHR'nin inhibitör etkisi bulunmuştur. CHR kemoterapötik ajanların antitümör aktivitesini artırır ve ilaç direncini baskılamada etkindir. Kanser tedavisinde çeşitli moleküler yolakları ve mekanizmaları etkiler. Apoptozun içsel ve dışsal yolları CHR tarafından indüklenir. Kanser tedavisinde CHR tarafından aktive edilen diğer bir programlanmış hücre ölümü otofajidir (66, 67). CHR'nin terapötik etkilerine rağmen hızlı şekilde metabolize olmalı, zayıf emilim ve hızlı sistemik atılım sebebiyle biyoyararlanımı zayıftır (68).

3. MATERYAL METOT

3.1. Çalışmanın Şekli

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan izin (Protokol no: 2021/12-2) ile gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullanılan sıçanlar İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışma boyunca deney hayvanlarına uygulanan tüm işlemler ve bakımlar İNÜ- DEHÜM'de yapıldı.

3.2. Deney Gruplarındaki Hayvan Sayısının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak olan hayvan adeti yapılan güç analizi ile belirlendi. Buna analizin sonucuna göre, I. Tip hata miktarı (alfa) 0.05, testin gücü (1-beta) 0.8 ve etki büyüklüğü 0.61 iken bu test kullanılarak anlamlı bir fark bulunabilmesi için gerekli olan minimum örneklem büyüklüğü her bir grup için 10 olmak üzere toplam 50 olarak belirlendi (69, 70). Verilen maddenin toksik etkisinden kaynaklanabilecek ölümler de göz önünde bulundurulduğunda her grupta 10 olmak üzere toplam 50 hayvan çalışmaya dahil edildi.

3.3. Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Belirlenmesi

Bu çalışmada Sprague-Dawley ırkı, ortalama 250-300 gr ağırlığında 50 adet erkek sıçan kullanıldı. Hayvanların hepsi tartıldı ve ağırlıklar açısından istatistiksel olarak fark olmayacak şekilde 5 gruba (n=10) ayrıldı. Hayvanlar deney boyunca $21\pm 1^{\circ}$ C sıcaklık ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsüne uyan bir ortamda tutuldu, normal içme suyu ve standart özelliğe sahip sıçan yemi ile ad libitum şeklinde beslendi.

Grup I (Kontrol grubu): Hiçbir işlem yapılmadı.

Grup II (Sham grubu): Bu gruptaki hayvanlara 28 gün boyunca mısır yağı (CHR çözücüsü) (5mg/kg/gün) gavaj ile verildi.

Grup III (PMTX): Bu grupta bulunan sıçanlara 4 hafta boyunca haftada 1 kez intraperitoneal PMTX (1mg/kg/hafta) yapıldı.

Grup IV (CHR): Bu grupta bulunan sıçanlara 28 gün boyunca CHR (50 mg/kg/gün) gavaj ile verildi.

Grup V (PMTX + CHR): Bu grupta bulunan sıçanlara 4 hafta boyunca haftada 1 kez intraperitoneal PMTX (1mg/kg/hafta) ve 28 gün boyunca CHR (50 mg/kg/gün) gavaj ile verildi.

3.4. Kan ve Karaciğer Dokularının Elde Edilmesi ve Analizlere Hazırlanması

Çalışmanın 28. gününde bütün hayvanlara 12 mg/kg xylazine ile 80 mg/kg ketamin kokteyli intraperitoneal enjeksiyonla genel anestezi altında sıçanların karın derisi bistüri kullanılarak açıldı. Duodenum üst uçtan asılarak abdominal vena kava inferior görünür hale getirildi. Heparinle yıkanmış enjektörlerle sıçanların kanları alındı. Plazma tüplerine aktarılacak olan bu kan örnekleri 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Alınan serum örneklerinden AST ve ALT çalışana kadar -80 C° derecede saklandı. Sonrasında %10'luk formaldehit içerisinde fikse edilip saklanacak karaciğer dokuları histolojik analizler için sıçanlardan alındı. Diğer parçası ise ikiye ayrılarak hemen alüminyum folyoya paketleyip grup numarası verilerek plastik kaplara alındı. Ardından elde edilen bütün numuneler dokularadan SOD, MDA, TAS ve TOS analizleri yapılmaya kadar -80 C° dereceye ayarlı derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.5. Biyokimyasal analizler

Deneyden bir gün önce biyokimyasal analizler için -80° C'ye kaldırılan doku örnekleri çıkarıldı ve buzlarının çözülmesi amacıyla +4° C'ye alındı. Dokular analizin yapılacağı gün tartıldı ve vidalı viyallere alındı. Her bir doku için yaş doku ağırlığının 10 katı kadar soğuk Tris-HCl tamponu (pH=7.4) tüplere eklendi. Bilyeli homojenizatörde dokular homojenize edildi. Homojenat vortekslenildi ve ependorf tüplere alındı. Elde edilen homojenatlardan protein tayini ve MDA ölçümleri yapılırken bir bölümü de 1 saat boyunca +4° C soğutmalı santrifüj kullanılarak 2200 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda ayrılan süpernatantlardan SOD, TAS ve TOS ölçümleri yapıldı.

3.5.1. AST ve ALT Değerlerinin Ölçülmesi

Sıçanların kan örneklerinden sağlanan serumlarda AST ve ALT değerleri ticari olarak satın alınan Elisa kitlerinin (SunRed Biotechnology, China) protokolüne uygun olarak ve Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate reader kullanılarak ölçüldü.

3.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD enzim aktivitesinin analizinde Sun ve arkadaşlarının tanımladığı metot kullanıldı (71). Bu yöntemde göre, ksantin/ksantin oksidaz ile oluşturulan süperoksit radikalleri nitroblütetrazolium'u indirgeyerek renk değişimi meydana getirmektedir. Reaksiyon sonucu oluşan bu renk değişimi 560 nm'de spektrofotometrede okutuldu ve elde edilen sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

3.5.3. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

MDA ölçümü lipit peroksidasyon tayin etmek için yaygın olarak kullanılan Esterbauer ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (72). Örnekler 15 dk kaynatıldıktan sonra hızlı bir şekilde soğutuldu ve absorbans değerleri 532 nm'de spektrofotometrede okundu. Sonuçlar µmol/g doku olarak verildi.

3.5.4. Karaciğer Dokularında TAS ve TOS Ölçümü

Deney gruplarının karaciğer dokularında toplam antioksan kapasite (TAS) ve toplam oksidan kapasite (TOS) ölçümü ticari olarak satın alınan ELISA kitlerinin (SunRed Biotechnology, China) protokolüne uygun olarak ve Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate reader kullanılarak yapıldı.

3.6. Histolojik Analizler

3.6.1 Histopatolojik analizler

Deney sonunda alınan karaciğer dokuları %10'luk formaldehit içerisinde muhafaza edildi. Tespit sonunda dokular çeşme suyunda yıkandı. Ardından dehidrasyon ve parlatma işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilen kesitlere hematoksilin-eozin (H-E) boyama metodu uygulandı. Boyanan preparatlar Leica DFC-280 araştırma mikroskobu ile incelendi.

Histopatolojik değerlendirmeler, hepatosit dejenerasyonu (hipereozinofilik sitoplazmalı ve piknotik nükleuslu hepatositler), infiltrasyon, sinüzoidal konjesyon ve dilatasyon yönünden her kesitte rastgele 10 alan incelenerek yapıldı. Her alan değişikliklerin şiddetine göre; 0 (değişiklik yok), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (şiddetli) olacak şekilde skorlanarak rastgele seçilen 10 alan değerlendirildi (73). Analizler, Leica DFC-

280 araştırma mikroskopu ile Leica Q Win Image Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd.,Cambridge, UK) kullanılarak yapıldı.

3.6.2. İmmünohistokimyasal analizler

Deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilen kesitler düdüklü tencereye alınmasıyla immünohistokimyasal analizler için 0.01 M sitrat (pH 6.0) içinde 15-20 dk kaynatıldı. Endojen peroksidaz enzim aktivitesini durdurmak amacıyla %3'lük hidrojen peroksit uygulaması 12 dk. süreyle her bir kesite yapıldı. PBS ile yıkanan kesitlere 5 dk. süresince protein blok uygulandı. Daha sonra kesitler 37°C'de 60 dk. primer antikorla (kaspaz-3, TNF- α) inkübe edildi. PBS ile yıkanan dokulara 37°C'de 10 dk. boyunca biyotinli sekonder antikor uygulandı. Bu işlem sonrasında kesitler 37°C'de 10 dk. streptavidin peroksidazla inkübe edildi. Ardından kromojen uygulaması yapılan kesitler hematoksilinle boyanarak su bazlı kapatıcıyla kapatıldı.

Kaspaz-3 ve TNF- α uygulamasıyla hepatositlerde immünreaktiviteye bağlı olarak kahverengimsi boyanma izlendi. Hepatositlerde izlenen boyanma; immünreaktivitenin yaygınlığı (0: yok, 1: 1-%25, 2: %26-50, 3: %51-75, 4: %76-100) ve şiddeti (0: yok, +1: hafif, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak semikantitatif olarak skorlandı. Toplam boyanma skoru; *yaygınlık x şiddet* hesaplanarak elde edildi (74). Analizler, Leica DFC-280 araştırma mikroskopu ile Leica Q Win Image Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd.,Cambridge, UK) kullanılarak yapıldı.

3.7. İstatistiksel Analizler

Biyokimyasal verilerin tüm istatistiksel analizleri IBM SPSS Statistics 22.0 programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile yapıldı. Normal dağılım gösteren değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmaları tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilirken çoklu karşılaştırılmalarında ise varyansların homojen olduğu durumlarda Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde verildi. Mann-Whitney U testi normal dağılım göstermeyen değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmalarında kullanılırken, çoklu karşılaştırılmalarda Conover testi kullanıldı. Veriler ortanca (mininum-maksimum) şeklinde verildi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Histolojik analizler için istatistiksel analizler, SPSS istatistiksel yazılım programıyla (SPSS for Windows version 26) yapıldı. Çalışmada yer alan tüm

gruplardaki ölçülebilir değişkenlerin normallik testlerine göre normal dağılım göstermediği saptandı ($p>0.05$). Nonparametrik istatistik testlerinden Kruskal Wallis varyans analizi, bütün değişkenler açısından grupların genel olarak karşılaştırılmasında kullanıldı. Bonferroni düzeltmesi yardımıyla yapılarak Mann-Whitney-U testiyle gruplar arası karşılaştırma yapıldı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler dağılıma bağlı olarak medyan (minimum-maksimum) [Med (Min-Mak)] olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kan AST ve ALT Düzeyleri

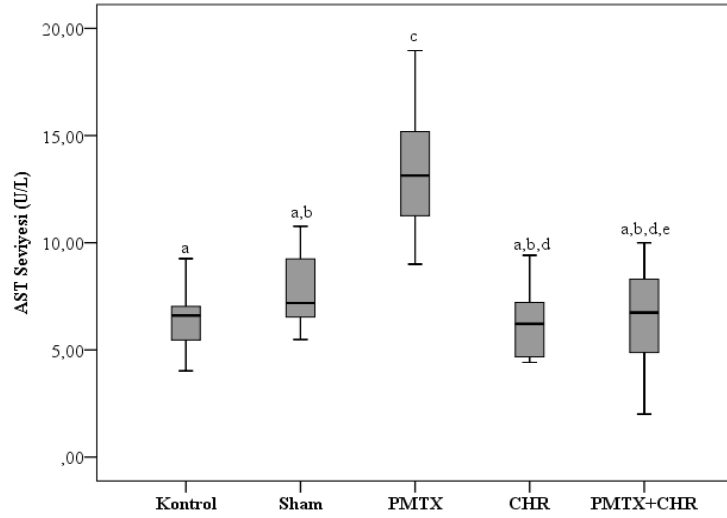
Grupların AST ve ALT düzeyleri incelendiğinde, PMTX grubunda diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 4.1.) (Şekil 4.1.) (Şekil 4.2.).

Tablo 4.1. Gruplara ait AST ve ALT değerleri

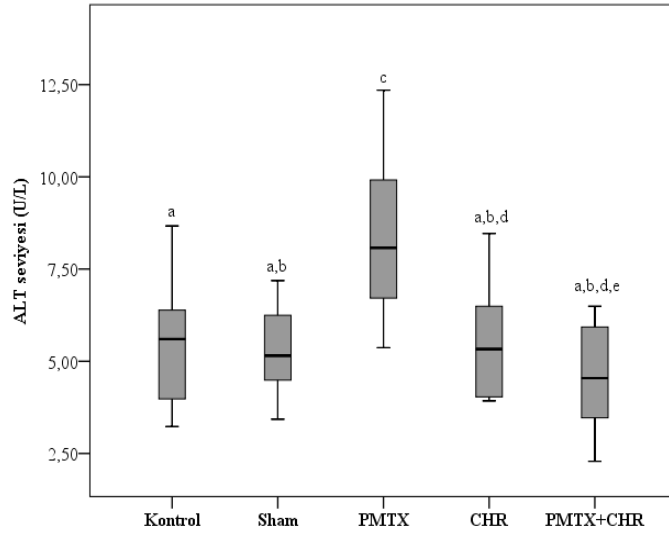
Gruplar					
Parametreler					
	Kontrol	Sham	PMTX	CHR	PMTX+CHR
AST	6.60 (4.02-9.26)	7.66 (5.49-10.77)	13.51 (9.00-18.97) ^a	6.33 (4.42-9.42)	6.38 (2.01-10.00)
ALT	5.60 (3.23-8.67)	5.26 (3.43-7.19)	8.56 (5.37- 12.35) ^a	5.55 (3.93-8.46)	4.44 (2.29-6.49)

Değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Çoklu karşılaştırmalarda ise Conover testi kullanıldı. Veriler ortanca (Minimum-maksimum) şeklinde verildi. Gruplar arasındaki farklılıklar harfler ile gösterildi.

^aDiğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı artış ($p < 0.05$)



Şekil 4.1. Grupların serum örneklerinden ölçülen AST seviyesi



Şekil 4.2. Grupların serum örneklerinden ölçülen ALT seviyesi

4.2. MDA, SOD, TAS ve TOS Düzeyleri

Grupların MDA enzim aktivitesi karşılaştırıldığında PMTX grubunda, kontrol, sham ve CHR gruplarına göre anlamlı düzeyde arttığı ($p < 0.05$), SOD enzim aktivitesi karşılaştırıldığında PMTX grubunda diğer gruplara göre anlamlı seviyede azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$). Gruplar arasında karaciğer dokusunda TAS düzeyleri incelendiğinde, PMTX grubunda kontrol, sham ve CHR gruplarına göre anlamlı derece düşük iken PMTX grubunda TOS düzeyleri diğer gruplara göre artmakla beraber istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde değildi (Tablo 4.2.) (Şekil 4.3.) (Şekil 4.4.) (Şekil 4.5.) (Şekil 4.6.).

Tablo 4.2. Sıçan karaciğer dokularında oksidatif stres parametre bulguları

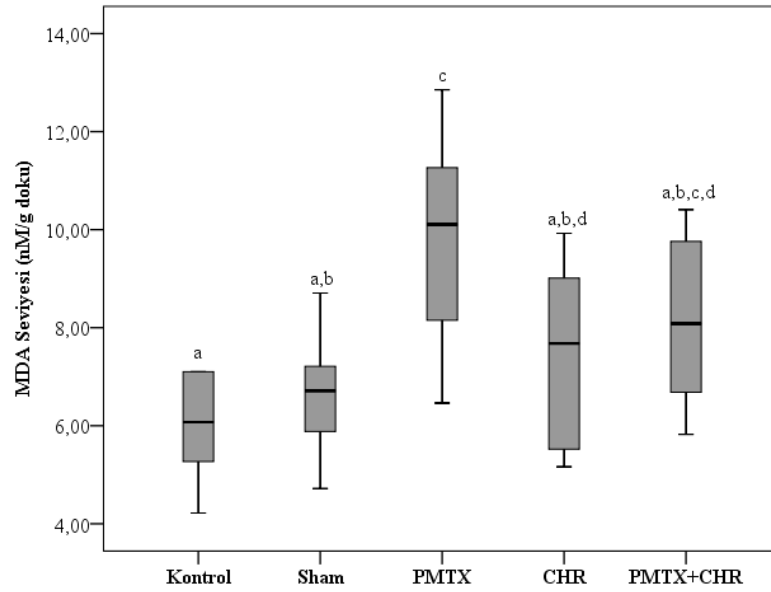
Gruplar					
Parametreler	Kontrol	Sham	PMTX	CHR	PMTX+CHR
MDA	6.80±2.26	6.54±1.14	9.82±1.88 ^a	7.55±1.75	8.10±1.548
SOD	0.45 (0.35-0.58)	0.45 (0.35-0.58)	0.23 (0.05-0.38) ^b	0.43 (0.26-0.65)	0.39 (0.32-0.48)
TAS	2.12±0.53	2.08±0.56	0.88±0.52 ^c	1.65±0.48	1.48±0.491
TOS	9.65±2.82	8.96±1.30	10.47±2.78	7.59±1.96	10.39±2.48

SOD değerinin gruplar arası karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Çoklu karşılaştırılmalarda ise Conover testi kullanıldı. Veriler ortanca (Minimum-maksimum) şeklinde verildi. MDA, TAS, TOS değişkenlerinin gruplar arası karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Çoklu karşılaştırılmalarda Tukey testi kullanıldı. Veriler ort±SS şeklinde verildi. Gruplar arasındaki farklılıklar harfler ile gösterildi.

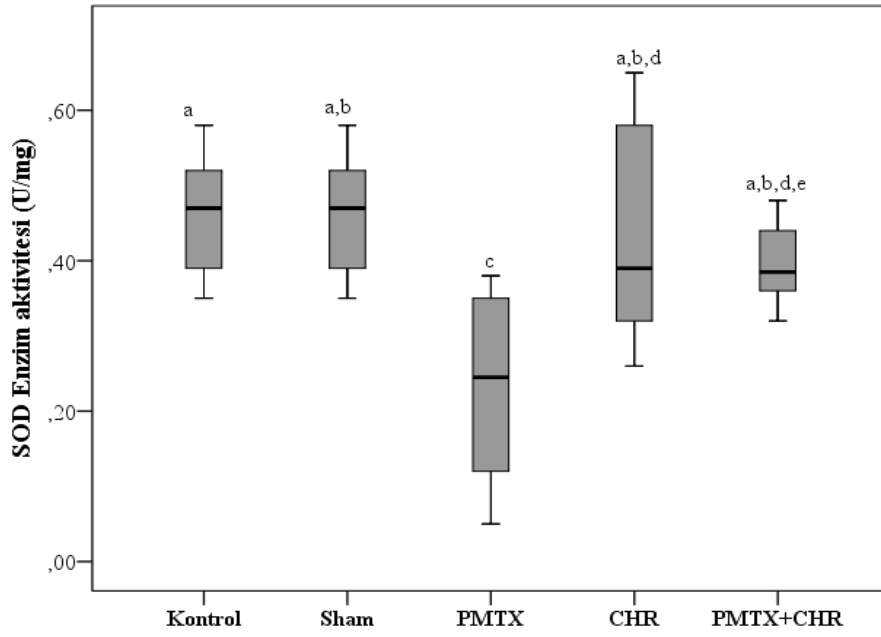
^aKontrol, sham, CHR gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı artış (p<0.05)

^bDiğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı azalış (p<0.05)

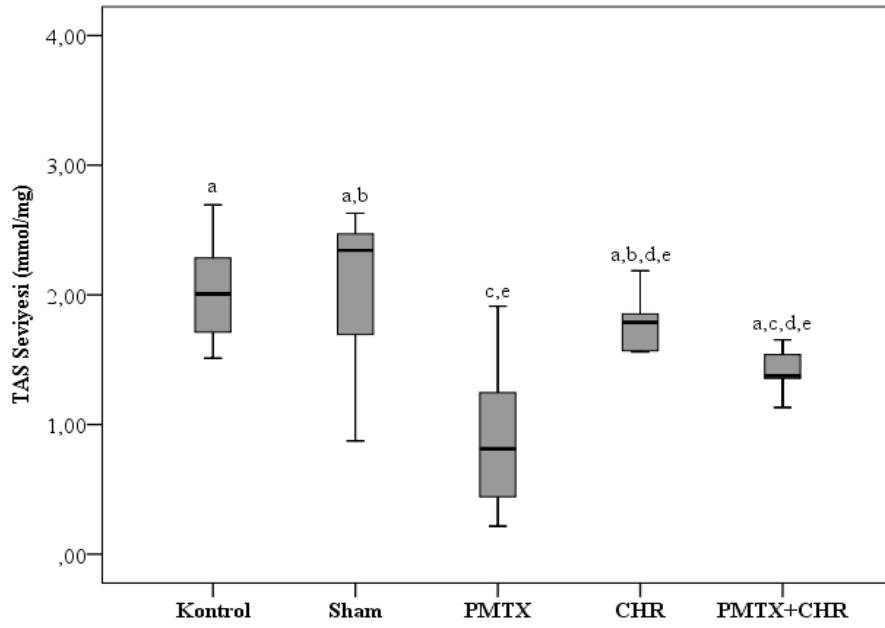
^cKontrol, sham, CHR gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı azalış (p<0.05)



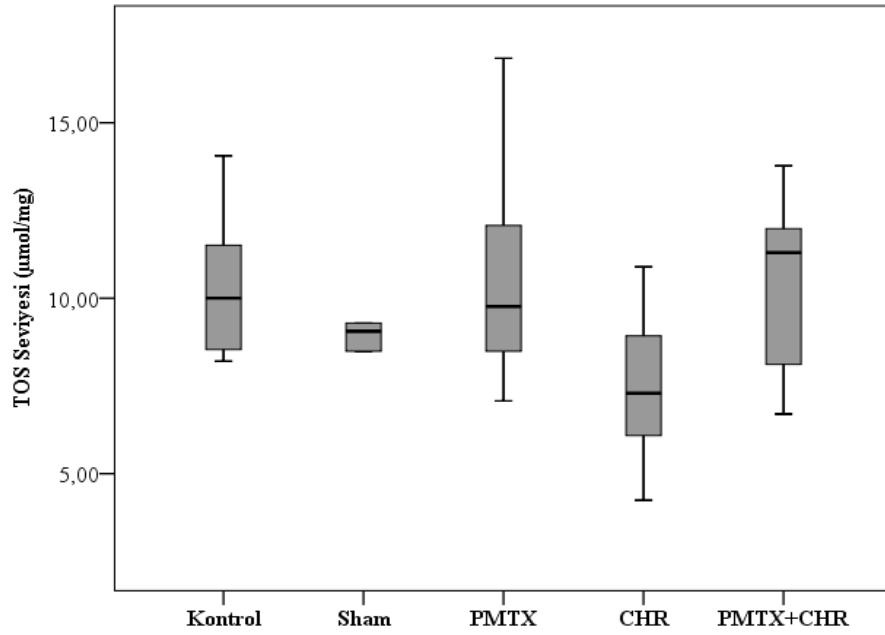
Şekil 4.3. Grupların karaciğer dokularında MDA enzim aktivitesi



Şekil 4.4. Grupların karaciğer dokularında SOD enzim aktivitesi



Şekil 4.5. Grupların karaciğer dokularındaki TAS miktarı

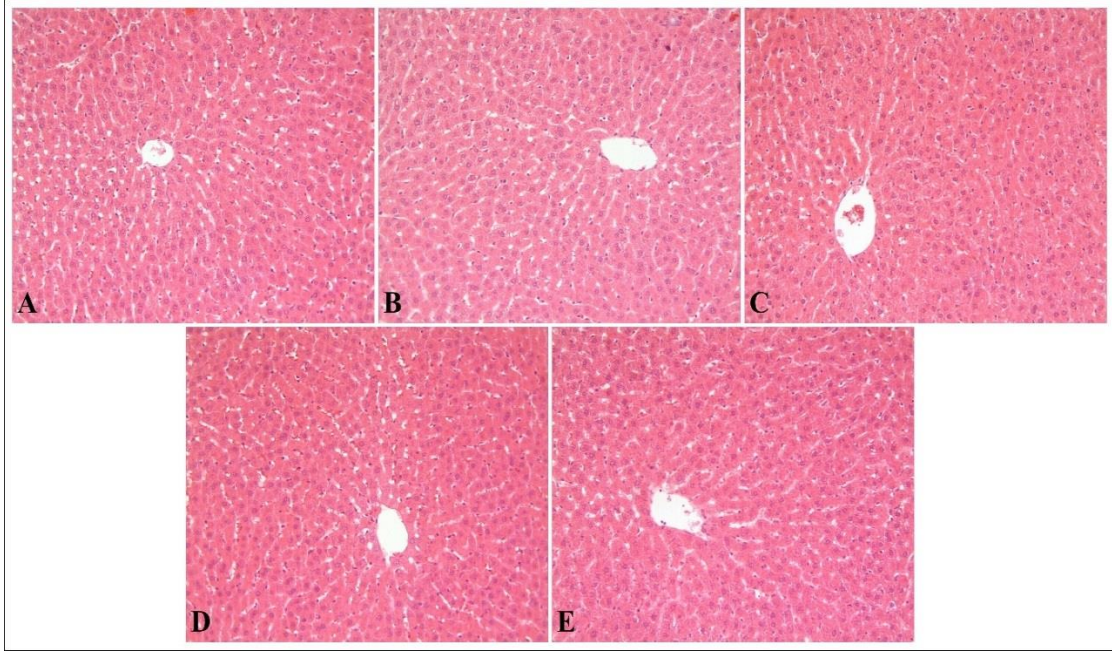


Şekil 4.6. Grupların karaciğer dokularındaki TOS miktarı

4.3. Histolojik Bulgular

4.3.1. Histopatolojik bulgular

H-E boyama metodunun uygulandığı kesitlerde, kontrol, sham ve CHR gruplarında karaciğer, hafif düzeydeki değişiklikler dışında, normal histopatolojik görünümdeydi (Şekil 4.7. A, B ve C). Bu gruplarda, hepatosit kordonları santral ven etrafında düzenli ve ışımsal bir yerleşimdeydi. Hepatosit kordonları arasında bulunan sinüzoidler açık görünümdeydi. Karaciğer lobüllerinin periferinde yer alan portal bölgelerde arter, ven ve safra kanalikül oluşumları düzenliydi. Hepatositler eozinofilik sitoplazmaları, yuvarlak ve ökromatik nükleuslarının varlığıyla dikkat çekti (Şekil 4.7. A). PMTX ve PMTX+CHR gruplarında, kontrol grubundan farklı herhangi bir değişiklik izlenmedi (Şekil 4.7. D ve E). İncelenen tüm parametreler yönünden PMTX ve PMTX+CHR gruplarının istatistiksel olarak da kontrol grubuna benzer olduğu belirlendi.



Şekil 4.7. Histopatolojik değerlendirme sonuçları

Kontrol (A), Sham (B), CHR (C), PMTX (D) ve PMTX+CHR (E) gruplarında karaciğer dokularının benzer histolojik görünümde olduğu izlenmekte, H-E; x200.

Tablo 4.3. Gruplara ait histopatolojik değerlendirme sonuçları [med (min-mak)].

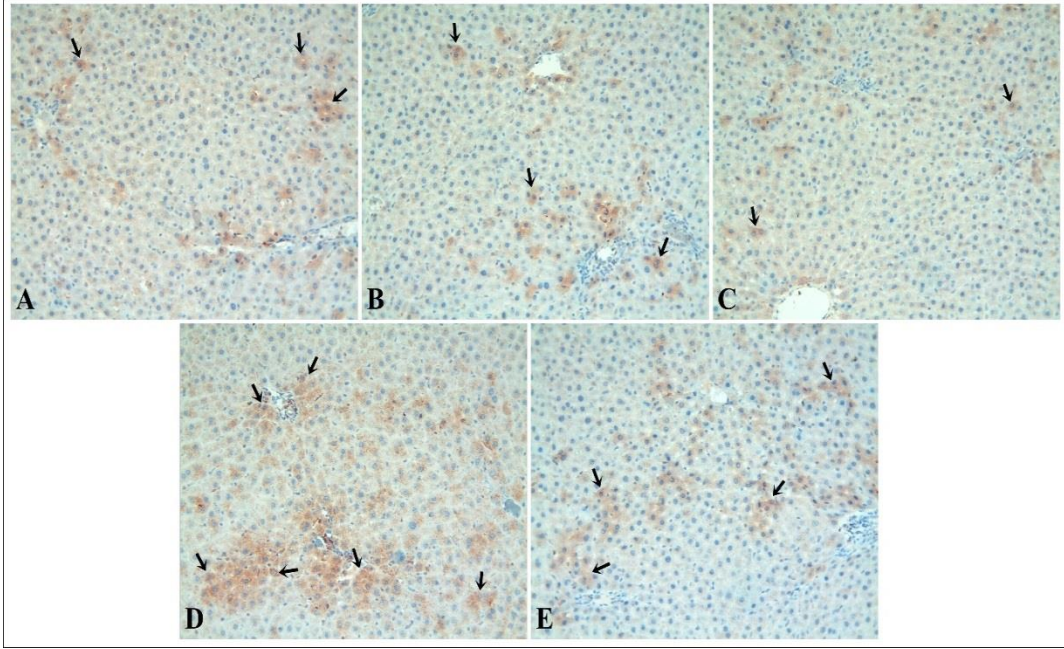
Gruplar	Hepatosit dejenerasyonu	İnfiltrasyon	Sinüzoidal konjesyon	Sinüzoidal dilatasyon
Kontrol	1 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-2)
Sham	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)
CHR	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)
PMTX	1 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)
PMTX+CHR	1 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-2)

4.3.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

Kaspaz-3 ve TNF- α immünreaktivitesi hepatosit sitoplazmalarındaki kahverengimsi boyanma ile ayırt edildi (Şekil 4.8., 4.9.). Buna göre, kontrol, sham ve CHR gruplarına ait kesitlerde kaspaz-3 ve TNF- α immünreaktivitesinin düşük seviyede olduğu gözlemlendi. PMTX uygulamasının hepatositlerde kaspaz-3 ve TNF- α immünreaktivitesini artırdığı ve bu artışın, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.01$). PMTX+CHR grubunda hem kaspaz-3 hem de TNF- α immünreaktivitesinde belirgin bir azalma izlendi. Kaspaz-3 ve

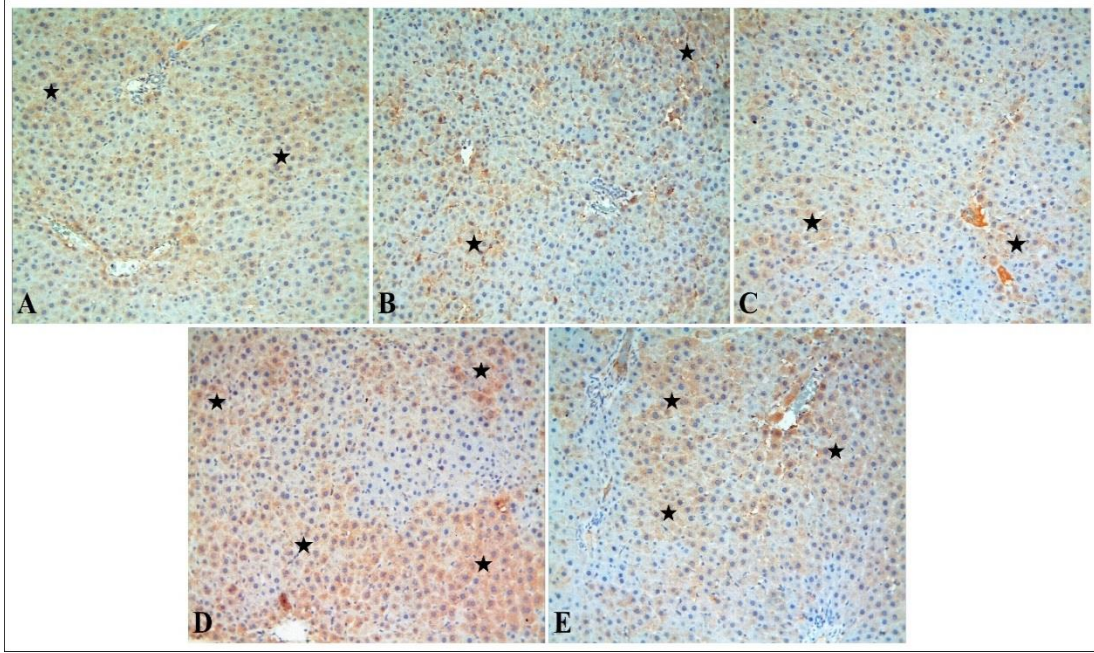
TNF- α immünreaktivitesi yönünden PMTX ve PMTX+CHR grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.001$).

Grupların kaspaz-3 ve TNF- α immünreaktivite değerlendirme sonuçları Tablo 4.4.'de verildi.



Şekil 4.8. Kaspaz-3 immünreaktivitesi

Kontrol (A), Sham (B), CHR (C), PMTX (D) ve PMTX+CHR (E) gruplarında hepatositlerdeki kaspaz-3 immünreaktivitesi (ok). İmmünreaktivite yaygınlığının ve şiddetinin PMTX grubunda yüksek olduğu, PMTX+CHR grubunda ise PMTX grubuna göre bariz şekilde düştüğü dikkati çekmekte. Kaspaz-3 immün boyama; x200.



Şekil 4.9. TNF- α immünreaktivitesi

Kontrol (A), Sham (B), CHR (C), PMTX (D) ve PMTX+CHR (E) gruplarında hepatositlerdeki TNF- α immünreaktivitesi (yıldız). İmmünreaktivite yaygınlığının ve şiddetinin PMTX grubunda yüksek olduğu, PMTX+CHR grubunda ise PMTX grubuna göre bariz şekilde düştüğü fark edilmekte. TNF- α immün boyama; x200.

Tablo 4.4. Gruplara ait immünreaktivite değerlendirme sonuçları [med (min-mak)].

Gruplar	Caspase-3	TNF- α
Kontrol	2 (0-6)	3 (0-6)
Sham	1 (0-6)	3 (0-6)
CHR	2 (0-6)	2 (0-6)
PMTX	4 (0-8) ^a	4 (1-9) ^a
PMTX+CHR	2 (0-6) ^b	2 (0-6) ^b

^aKontrol, Sham ve CHR gruplarına göre anlamlı artış (p<0.01)

^bPMTX grubuna göre anlamlı azalış (p<0.0001)

5. TARTIŞMA

Pürin ve pirimidin sentezlerinde gerekli olan folat bağımlı biyosentez döngülerini engelleyerek etki gösteren PMTX, folik asit analogu yeni nesil kemoterapötiktir. Hücre içerisinde folat metabolizmasının inhibisyonu yoluyla, hücre büyümesinin engellenmesine yol açar. Kemoterapötik ajanlar tümör hücrelerinde etkinlik gösterse de, sağlıklı çoğalan hücreler üzerindeki etkisi de kaçınılmazdır (28).

PMTX'in genel toksisite profili hafif olarak kabul edilse de tedaviyi sınırlayıcı toksisiteler yaşayan hastalar mevcuttur. Bu da hastalarda tedavinin kesilmesine neden olabilmektedir. PMTX kaynaklı hepatotoksitenin mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte benzer antifolat ilaçlarla yapılan çalışmalarda oksidatif stres üzerinde durulmuştur (75, 76). Bu çalışmada PMTX'in karaciğer üzerindeki olası zararlı etkileri ile CHR'nin buna karşı muhtemel koruyucu özellikleri incelendi.

Aminotransferazlar; AST ve ALT karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için kullanılan enzimlerdir ve hücre hasarının belirteçleridir. Oluşan karaciğer hasarı sonucunda bu enzimlerin dolaşıma salınımı tetiklenir. Dolayısıyla serum AST ve ALT konsantrasyonunda artış görülür (77). Klinik incelemelerde, artan AST ve ALT düzeyleri karaciğer fonksiyonlarının azaldığını gösterir (78). Bu sebepten ötürü karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla AST ve ALT düzeyleri çalışmamızda ölçüldü. PMTX grubundaki hayvanların AST ALT düzeylerinin diğer gruplar ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu, bu yüksekliğin sıçanların karaciğer dokularındaki fonksiyon bozukluğundan kaynaklandığı tespit edildi. PMTX ile beraber CHR verilen hayvanların serum AST ALT seviyelerinin normale yaklaşması CHR'nin karaciğer fonksiyonlarını korumada etkili olduğunu gösterdi. Literatürde PMTX'in karaciğer toksisitesi yaptığına dair sınırlı sayıda çalışmalar bulunmaktadır (79, 80). Yaptığımız deneysel çalışmada literatürle uyumlu olarak PMTX uygulamasının karaciğer hasarı oluşturduğu gözlemlendi. Yapılan çeşitli çalışmalarda CHR'nin artmış AST ve ALT düzeyini anlamlı seviyede azalttığı gösterilmiştir (12, 81, 82). Ali ve arkadaşları (83) bir folik asit antagonisti olan metotreksatin karaciğerde oluşturduğu oksidatif stres ve apoptoza karşı CHR'nin koruyucu etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada metotreksatin AST ve ALT düzeylerini anlamlı ölçüde artırdığı ve CHR'nin bu artışı kontrol altına aldığı bildirilmiştir. Rashid ve arkadaşları (64) yaptıkları çalışmada doksorubisin kaynaklı hepatotoksositeye karşı CHR'nin serum AST

ve ALT düzeylerini anlamlı olarak azalttığını göstermişlerdir. Rehman ve arkadaşlarının (84) yaptığı deneysel çalışmada sisplatin ile tedavi edilen grupta AST ve ALT seviyelerinde anlamlı artış olduğu, CHR uygulamasının ise yüksek dozlarda belirgin olmak üzere bu artışı normale yaklaştırdığını bildirilmişlerdir. Bu çalışmalarda bildirildiği gibi CHR karaciğer dokusundaki oksidatif hasar üzerinde antioksidan etki ile olumlu sonuçlar göstermiştir. Bizim çalışmamızda da CHR uygulaması aynı mekanizmayla AST ve ALT seviyelerinde olumlu etkiler ortaya çıkmasına sebep olmuştur.

Fizyolojik koşullarda canlıda antioksidan savunma sistemleri ile serbest radikaller arasında bir uyum vardır. Bu uyumun serbest radikaller lehine bozulmasıyla hücre organelleri ve membranda lipid, protein, DNA ve nükleik asitlerin yapısı bozulur. Literatürde CHR, doku hasarının gelişmesinde rol oynayan serbest radikaller aracılı etkiye karşı koyma ve antioksidan seviyelerini arttırmada potansiyel olarak yararlı bulunmuştur (85). Çalışmamızda antioksidan özelliğe sahip CHR'nin karaciğerde oluşan oksidatif hasardaki etkileri değerlendirildi. Oksidatif stres parametrelerinden SOD, MDA, TAS ve TOS seviyeleri ölçüldü.

Literatürde SOD aktivitesinin azalmasının hücre fonksiyon kaybı ve hücre zararının bütünlüğünün bozulması gibi zararlı etkilere yol açan yüksek serbest radikal birikmesiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (86). Buna ek olarak lipid peroksidasyonu, hücrenin normal fonksiyonlarını engelleyerek doku hasarı oluşturur (76). Lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA'dır. SOD aktivitesinin azalması ve MDA aktivitesinin artması oksidatif hasarın ortaya çıktığının belirteçidir (87). Çalışmamızdaki sonuçlara göre SOD aktivitesi PMTX grubunda diğer gruplara göre anlamlı düzeyde düşükken MDA düzeyinin ise kontrol, sham ve CHR gruplarına göre anlamlı derecede yüksekti. PMTX+CHR grubunda PMTX grubuna göre MDA düzeylerinde azalma varken istatistiksel olarak anlamlı değildi. Antikanser ajanlarla yapılan son çalışmalarda oksidatif stres mekanizması vurgulanmaktadır. PMTX'in de benzer folat antagonisti ilaçlar gibi hepatotoksisite oluşturmasından, reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan oksidatif hasarın neden olduğu saptanmıştır (88,89). Baykalır ve arkadaşları (12) CCI4'ün karaciğer ve böbrek dokularında SOD seviyesini düşürdüğünü, CHR uygulamasının ise SOD aktivitesini anlamlı derecede arttırdığını tespit etmişlerdir. Özbolat ve arkadaşlarının (90) yaptıkları çalışmada CHR'nin apoptoz ve oksidatif stres yoluyla diclofenac tarafından indüklenen HT-29 hücre ölümünü baskıladığı ve dokuları oksidatif hasara karşı koruduğu bildirilmiştir. Çuğlan ve arkadaşları (91) yaptıkları

çalışmada, koruyucu etkisi olduğunu düşündükleri CHR'nin formaldehite (FA) maruz bırakılan gebe sıçanlarda fetus karaciğerinin gelişimindeki zararlarını incelemiştir. Bu çalışmada 0,1 mg/kg FA verilen grupta hücrel kompenzasyon mekanizmasının gelişmesiyle FA toksisitesine cevap olarak fetal karaciğer dokularında SOD aktivitesi artmıştır. Bununla beraber 1 mg/kg FA uygulanan grupta dengeleme mekanizması gelişmediğinden SOD aktivitesi kontrol grubuna göre azalmıştır. Koruyucu amaçla verilen CHR'nin, antioksidan etkisiyle FA- 0,1 grubundaki artışı ve FA-1 grubundaki azalışı normalize ettiği görülmüştür. Ancak SOD düzeyindeki bu normalizasyonu histopatolojik sonuçlar desteklememiştir. Çünkü CHR uygulaması karaciğer hücrelerinde meydana gelen megakaryosit düşüşünü tam olarak geri çevirememiştir. Eldutar ve arkadaşları (92) yaptıkları deneysel çalışmada sıçanlarda parasetamol kaynaklı karaciğer hasarında CHR'nin iki farklı dozda koruyucu etkilerini incelemiştir. Çalışmada parasetamol uygulamasının karaciğer MDA düzeylerini kontrol ve CHR-50 gruplarına göre anlamlı derecede artırdığını, parasetamolle birlikte CHR uygulamasının her iki dozda da artmış olan bu düzeyi düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Uygulanan CHR-25 dozunun MDA düzeyini daha çok azalttığını belirtmişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada, antioksidan savunma sistemlerinden SOD aktivitesindeki düşüş ile MDA düzeyindeki artış mevcut çalışmalarla uyumlu olup, PMTX'in antioksidan etkiyi zayıflattığı şeklinde yorumlanabilir.

Oksidatif stres ve antioksidan durumu değerlendirmede birçok farklı yöntem ve belirteç kullanılmaktadır. Farklı antioksidan/oksidan türlerinin serum konsantrasyonları laboratuvarlarda ayrı ayrı ölçülebilir ancak hem zaman hem de masraf açısından dezavantaj oluşturmaktadır (93). Bu nedenle oksidatif stresin tespitinde TAS ve TOS düzeylerinin ölçümü yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda karaciğer dokusundaki TAS düzeyleri karşılaştırıldığında PMTX grubunda kontrol, sham ve CHR gruplarına göre anlamlı derece düşük olduğu belirlendi. Ayrıca PMTX+CHR grubunda TAS seviyesinin PMTX grubuna göre arttığı fakat bu artışın anlamlı olmadığı görüldü. Karaciğer dokusundaki TOS düzeyi ise PMTX grubunda diğer gruplara göre fazlaydı ve PMTX+CHR uygulanan grupta oksidan seviyesinde düşüş meydana geldi. Ancak bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde değildi. CHR'nin ROS üretiminde rol alan enzimlerin etkilerini inhibe ettiği bilinmektedir (94). Bu bilgiler ışığında yürüttüğümüz çalışmada TOS değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmaması yukarıdaki bilgiyle çelişiyor olarak yorumlanabilir ancak antioksidan ve oksidan sistem oldukça karışık bir mekanizmaya sahiptir. Ayrıca TOS düzeyi farklı oksidan türlerinin

aditif özelliklerinden faydalanarak numunelerin toplam serum oksidan kapasitesini temsil eder. Oysa serbest radikaller protein, DNA, lipitler ve karbonhidratlar gibi çeşitli biyolojik molekülleri okside ederek yapılarını bozarlar. Bu nedenle spesifik etkiler araştırılırken bu tür hasarların ayrı ayrı incelenmesi daha faydalı bilgiler sunacaktır. Kaldı ki bu çalışma da oksidatif stres belirteçlerinden sadece TAS ve TOS düzeyi değil SOD ve MDA düzeyi de değerlendirilmiştir. Ve oksidatif markerlerden SOD ve MDA'nın anlamlı seviyede değişiklik oluşturduğu tespit edildi. Fei ve arkadaşları (95) PMTX tarafından indüklenen aşırı serbest radikal üretiminin, karaciğer toksisitesini tetiklediği belirtmişlerdir. Bu çalışmada hepatositlerde PMTX kaynaklı sitotoksistide montelukast'ın koruyucu etkisinin olduğu bulunmuştur. Çalışır ve arkadaşları (96) yaptıkları çalışmada akut pankreatit oluşturulan sıçanlarda CHR'nin koruyucu etkisini incelemişlerdir. Akut pankreatitte TOS seviyesinin anlamlı derecede arttığı ve CHR uygulanan grupta TAS seviyesinin arttığı bulunmuştur. Ancak CHR uygulamasının akut pankreatitte artan TOS değerini azaltmadığı tespit edilmiştir.

Tümör oluşmasında hücre ölümü ve hücre çoğalması arasındaki dengenin bozulması önemli bir mekanizmadır. Dengenin korunmasında apoptoz, otofaji ve nekroz gibi mekanizmalar görev almaktadır (97). Literatürde, ROS'un DNA'ya zarar verdiği ve bunun da apoptoza yol açtığı bildirilmiştir (87). Literatürde kaspaz-3'ün apoptozun yürütücüsü olarak önemli bir rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (98, 99). Bu çalışmada apoptoz için biyobelirteç olarak kaspaz-3 kullanıldı. PMTX uygulamasının hepatositlerde kaspaz-3 immünreaktivitesini artırdığı ve bu artışın, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olduğu saptandı. Ayrıca PMTX+CHR grubunda kaspaz-3 aktivitesinde belirgin bir azalma izlendi. Ali ve arkadaşlarının (83) yaptıkları deneysel çalışmada folat antagonisti olan metotreksat uygulanan grupta kaspaz-3 immünreaktivitesinin arttığını ve CHR'nin ön uygulaması ile bu artışın azaldığı bulunmuştur. Eldutar ve arkadaşları (92) tarafından akut parasetamol kaynaklı hepatotoksistide CHR ön tedavisinin artmış kaspaz-3 aktivitesini düzenlemek suretiyle apoptotik belirteçler üzerine restoratif etkisinin olduğu vurgulandı.

Önemli bir inflamatuvar sitokin olarak bilinen TNF- α , kuppfer hücrelerinden salgılanır. Karaciğer hasarında rol oynar ve hücre ölümü yol açabilir (100). Toksikitede inflamasyonun rol oynadığı ve inflamatuvar bir sitokin olan TNF- α 'nın bu süreçte önemli rol oynayan bir mediyatör olduğu bilinmektedir (101). CHR'nin bazı sitokinler, prostaglandin E, nitrik oksit ve siklooksijenaz-2 seviyelerini düşürerek anti-

inflamatuvar etkisi olduğu gösterilmiştir (102). Akbay ve arkadaşları (103) yaptıkları deneysel çalışmada metotreksat uygulamasının serum TNF- α seviyesinin artmasıyla sonuçlandığını bildirmişlerdir. Küçükler ve arkadaşları (104) alışmalarında kurşun asetatın oksidatif stres ile ilişkili inflamasyon nedeniyle böbreklerde toksisiteye yol açtığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada kurşun asetat uygulanan grupta TNF- α 'nın gl bir şekilde eksprese edildiği ve CHR uygulamasının TNF- α ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir. Çalışmamızdaki immünohistokimyasal değerlendirme sonuçları, PMTX kaynaklı hepatotoksistide meydana gelen inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunda CHR'nin etki etme potansiyelini doğruladı. PMTX uygulamasının hepatositlerde TNF- α immünreaktivitesini diğer gruplara göre anlamlı seviyede arttırdığı saptandı.

Bu verilerin ışıkında PMTX'in karaciğerde meydana getirdiği hasara bağlı olarak karaciğer fonksiyon değerlerinin arttığı, serbest radikallerin artarak lipid peroksidasyonun meydana geldiği, apoptoz belirteci olan kaspaz-3 immünreaktivitesinin ve inflamasyon marker'ı olan TNF- α 'nın arttığı çalışmamızda tespit edildi. CHR'nin ise antioksidan etki ile karaciğer hasarını engellediği söylenbilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda CHR maddesinin PMTX kaynaklı karaciğer hasarı üzerine olan antioksidan etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu etkilerin ortaya koyulmasıyla klinikte PMTX kullanımının; tedavi maliyetini düşüreceği ve hastalığın ortaya çıkarabileceği hepatotoksisitenin azalmasını mümkün kılacağını düşünmekteyiz. Çalışmamızın sonucunda PMTX uygulamasının oksidatif strese neden olarak antioksidan parametreleri olumsuz etkilediğini, apoptoz ve inflamasyonu tetiklediğini bunun yanı sıra CHR'nin antioksidan özelliği ile hepatoksisiteyi iyileştirdiğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda histopatolojik kesitlerde herhangi bir farklılık gözlenmedi.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçların, ileride bu konuda yapılabilecek klinik araştırmalarda yol gösterici olacağını düşünmekteyiz. Ancak farklı doz ve uygulama sürelerinde PMTX verilen sıçanlarda CHR verilerek ileri deneysel çalışmalar yapılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Schultz RM, Patel VF, Worzalla JF, Shih C. Role of thymidylate synthase in the antitumor activity of the multitargeted antifolate, LY231514. *Anticancer Res* 1999, 19: 437-43.
2. Hanauske AR, Chen V, Paoletti P, Niyikiza C. Pemetrexed disodium: a novel antifolate clinically active against multiple solid tumors. *The oncologist* 2001, 6: 363-73.
3. Rossi G, Alama A, Genova C, Rijavec E, Tagliamento M, Biello F, Coco S, Bello MGD, Boccardo S, Grossi F. The evolving role of pemetrexed disodium for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2018, 19: 1969-76.
4. Cho H, Yun CW, Park WK, Kong JY, Kim KS, Park Y, Lee S, Kim BK. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacol Res* 2004, 49: 37-43.
5. Ciftci O, Ozdemir I, Aydin M, Beytur A. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia* 2012, 44: 181-86.
6. Knowles LM, Zigrossi DA, Tauber RA, Hightower C, Milner JA. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. *Nutr Cancer* 2000, 38:116-22.
7. Chen L, Li Q, Jiang Z, Li C, Hu H, Wang T, Gao Y, Wang D. Chrysin induced cell apoptosis through H19/let-7a/COPB2 axis in gastric cancer cells and inhibited tumor growth. *Front Oncol* 2021, 11.
8. Zhou L, Yang C, Zhong W, Wang Q, Zhang D, Zhang J, Xie S, Xu M. Chrysin induces autophagy-dependent ferroptosis to increase chemosensitivity to gemcitabine by targeting CBR1 in pancreatic cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2021, 193: 114813.
9. Geng A, Xu S, Yao Y, Qian Z, Wang X, Sun J, Zhang J, Shi F, Chen Z, Zhang W, Mao Z, Lu W, Jiang Y. Chrysin impairs genomic stability by suppressing DNA double-strand break repair in breast cancer cells. *Cell Cycle* 2022, 21: 379-91.

10. Salama AA, Allam RM. Promising targets of chrysin and daidzein in colorectal cancer: Amphiregulin, CXCL1, and MMP-9. *Eur J Pharmacol* 2021, 892: 173763.
11. Temel Y, Kucukler S, Yıldırım S, Caglayan C, Kandemir FM. Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2020, 393: 325-37.
12. Baykalir BG, Arslan AS, Mutlu SI, Ak TP, Seven I, Seven PT, Yaman M, Gül HF. The protective effect of chrysin against carbon tetrachloride-induced kidney and liver tissue damage in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 2020, 91: 427-38.
13. Arifoğlu Y. *Her Yönüyle Anatomi*. 2. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2019. 394-400
14. Sancak B, Cumhuriyet M. *Fonksiyonel Anatomi*. 8. Baskı. Ankara, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayınları, 2014. 226-31.
15. Özbağ D. *“İnsan” Anatomi*. 1. Baskı. İstanbul, İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık, 2020. 256.
16. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. 5. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2014. 265-71.
17. Netter FH, Cumhuriyet M. *İnsan Anatomisi Atlası*. 6. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2015: 531.
18. Barman SM. *Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi*. 2015.
19. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. 9. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1996: 1104.
20. Bayramiçli M. *Deneysel Mikrocerrahi*. İstanbul, Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık, 2005. 808.
21. Moore KL, Persaud TVN, Dalçık H, Yıldırım M. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009. 523.
22. Wang H, Liang X, Gravot G, Thorling CA, Crawford DH, Xu ZP, Liu X, Roberts MS. Visualizing liver anatomy, physiology and pharmacology using multiphoton microscopy. *J Biophotonics*. 2017, 10: 46-60.

23. Pierard-Franchimont C, Lesuisse M, Humbert P, Delvenne P, E Pierard G. Toxic epidermal necrolysis and antifolate drugs in cancer chemotherapy. *Curr Drug Saf.* 2012, 7: 357-60.
24. Shih C, Gosset L, Gates S. LY231514 and its polyglutamates exhibit potent inhibition against both human dihydrofolate reductase (DHFR) and thymidylate synthase (TS): multiple folate enzyme inhibition. *Ann Oncol.* 1996, 7:85.
25. Curtin NJ, Hughes AN. Pemetrexed disodium, a novel antifolate with multiple targets. *Lancet Oncol.* 2001, 2: 298-306.
26. Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, vd. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol.* 2003, 21:2636-44.
27. Urba S, Van Herpen CM, Sahoo TP, Shin DM, Licitra L, Mezei K, Reuter C, Hitt R, Russo F, Chang SC, Hossain AM, Frimodt-Moller B, Koustenis A, Hong RL. Pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin monotherapy in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer: Final results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Cancer* 2012, 118: 4694-705.
28. Adjei AA. Pemetrexed (Alimta®): a novel multitargeted antifolate agent. *Expert Rev Anticancer Ther. Expert Review of Anticancer Therapy* 2003, 3: 145-56.
29. Niyikiza C, Baker SD, Seitz DE, Walling JM, Nelson K, Rusthoven JJ, vd. Homocysteine and methylmalonic acid: markers to predict and avoid toxicity from Pemetrexed therapy 1 supported by Eli Lilly and company. *Mol Cancer Ther.* 2002, 1: 545-52.
30. Eli Lilly Limited Şirketi Alimta 100mg powder for concentrate for solution for infusion. <https://www.medicines.org.uk/emc/product/3862/smpe> Son Erişim Tarihi 1 Ocak 2021.
31. Akkuş İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. 1. Baskı. Konya, Mimoza Yayıncılık, 1995. 57-63.
32. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992, 119: 598-620.

33. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 2005, 88: 2017-26.
34. Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. *Vet J Mehmet Akif Ersoy Univ.* 2016, 1: 65-76.
35. Toshima N, Yonezawa T. Bimetallic nanoparticles—novel materials for chemical and physical applications. *New J Chem.* 1998, 22: 1179-201.
36. Diplock A. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Eur Concise Monogr Ser* 1998, 59.
37. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2010, 3: 91-100.
38. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004, 266: 37-56.
39. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals In Biology and Medicine.* 4. Baskı. USA, Oxford university press, 2007.
40. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2015, 6: 456.
41. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 1997, 22: 885-8.
42. De Bono DP. Free radicals and antioxidants in vascular biology: the roles of reaction kinetics, environment and substrate turnover. *QJM Int J Med* 1994, 87: 445-53.
43. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med* 2008, 44: 153-9.
44. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003, 27: 277.
45. Mccord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993, 26: 351-7.

46. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins basic pathology e-book. *Elsevier Health Sciences* 2017.
47. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985, 311: 617-31.
48. Guxens M, Fitó M, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Vinyoles E, Fiol M, Corella D, Aros F, Gomez-Gracia E, Ruiz-Gutierrez V, Lapetra J, Ros E, Vila J, Covas MI. Hypertensive status and lipoprotein oxidation in an elderly population at high cardiovascular risk. *Am J Hypertens* 2009, 22: 68-73.
49. Cini M, Moretti A. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol Aging* 1995, 16: 53-7.
50. Pinzón-Díaz CE, Calderón-Salinas JV, Rosas-Flores MM, Hernández G, López-Betancourt A, Quintanar-Escorza MA. Eryptosis and oxidative damage in hypertensive and dyslipidemic patients. *Mol Cell Biochem* 2018, 440: 105-13.
51. Dündar Y, Aslan R. Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller, antioksidanlar. *İnsizyon Cerrahi Tıp Bil Derg* 1999, 2:134-42.
52. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 1999, 13: 347-52.
53. Cunningham JJ, Ellis SL, McVeigh KL, Levine RE, Calles-Escandon J. Reduced mononuclear leukocyte ascorbic acid content in adults with insulin-dependent diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. *Metabolism* 1991, 40: 146-49.
54. Aydemir B, Sarı EK. Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Vet J* 2009, 2: 56-60.
55. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. In: Andreescu S, Hepel M (Ed). *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy*. 2nded. New York, ACS Publications: 2011: 1-37.
56. Akdoğan M, Akkuş S, Akkuş F, Koyu A. Romatoid artrit ve osteoartrozlu hastalarda eritrosit süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzim düzeyleri. *Van Tıp Derg* 1998, 5: 66-71.

57. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999, 4: 339-45.
58. Rufino AT, Costa VM, Carvalho F, Fernandes E. Flavonoids as antiobesity agents: A review. *Med Res Rev* 2021, 41: 556-85.
59. Gambelunghe C, Rossi R, Somnavilla M, Ferranti C, Rossi R, Ciculi C, vd. Effects of chrysin on urinary testosterone levels in human males. *J Med Food* 2003, 6:387-90.
60. Bae Y, Lee S, Kim SH. Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ B. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011, 254:56-64.
61. Sirovina D, Oršolić N, Končić MZ, Kovačević G, Benković V, Gregorović G. Quercetin vs chrysin: effect on liver histopathology in diabetic mice. *Hum Exp Toxicol* 2013, 32:1058-66.
62. Ali BH, Al Za M, Adham SA, Yasin J, Nemmar A, Schupp N. Therapeutic effect of chrysin on adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Cell Physiol Biochem* 2016, 38:248-57.
63. Pingili RB, Pawar AK, Challa SR, Kodali T, Koppula S, Toleti V. A comprehensive review on hepatoprotective and nephroprotective activities of chrysin against various drugs and toxic agents. *Chem Biol Interact* 2019, 308: 51-60.
64. Rashid S, Ali N, Nafees S, Ahmad ST, Arjumand W, Hasan SK, vd. Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. *Toxicol Mech Methods* 2013, 23: 337-45.
65. Sultana S, Verma K, Khan R. Nephroprotective efficacy of chrysin against cisplatin-induced toxicity via attenuation of oxidative stress. *J Pharm Pharmacol* 2012, 64: 872-81.
66. Sherif IO, Al-Mutabagani LA, Sabry D, Elsherbiny NM. Antineoplastic activity of chrysin against human hepatocellular carcinoma: New insight on GPC3/SULF2 axis and lncRNA-AF085935 expression. *Int J Mol Sci* 2020, 21:7642.

67. Zhang L, Liu X, Song L, Zhai H, Chang C. MAP7 promotes migration and invasion and progression of human cervical cancer through modulating the autophagy. *Cancer Cell Int* 2020, 20:1-8.
68. Galijatovic A, Otake Y, Walle UK, Walle T. Extensive metabolism of the flavonoid chrysin by human Caco-2 and Hep G2 cells. *Xenobiotica* 1999, 29:1241-56.
69. Belhan S, Yıldırım S, Karasu A, Kömüroğlu AU, Özdek U. Investigation of the protective role of chrysin within the framework of oxidative and inflammatory markers in experimental testicular ischaemia/reperfusion injury in rats. *Andrologia* 2020, 52: e13714.
70. Arslan AK, Yaşar Ş, Çolak C, Yoloğlu S. WSSPAS: an interactive web application for sample size and power analysis with R using shiny. *Türkiye Klin Biyoistatistik* 2018,10: 224-46.
71. Sun YI, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988, 34: 497-500.
72. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In: Marsh E (Ed). *Methods in enzymology*. Elsevier 1990: 407-21.
73. Taslidere E, Dogan Z, Elbe H, Vardi N, Cetin A, Turkoz Y. Quercetin protection against ciprofloxacin induced liver damage in rats. *Biotech Histochem* 2016, 91: 116-21.
74. Parlakpınar H, Özhan O, Ermis N, Vardi N, Cigremis Y, Tanriverdi LH. Acute and subacute effects of low versus high doses of standardized panax ginseng extract on the heart: an experimental study. *Cardiovasc Toxicol* 2019, 19: 306-20.
75. Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M, Senturk O, Avsar E, Haklar G, Hulagu S, Tozun N. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci* 2008, 53:1071-7.
76. Şener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Şirvancı S, Gedik N, Yeğen BC. L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *Cell Biol Toxicol* 2006, 22: 47-60.

77. Robles-Diaz M, Garcia-Cortes M, Medina-Caliz I, Gonzalez-Jimenez A, Gonzalez-Grande R, Navarro JM, Castiella A, Zapata EM, Robero-Gomez M, Blanco S, Soriano G, Hidalgo R, Ortegga-Torres M, Clavijo E, Bermudez-Ruiz PM, Lucena MI, Andrade RJ. The value of serum aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transpeptidase as biomarkers in hepatotoxicity. *Liver Int* 2015, 35: 2474-82.
78. Savaş N. Karaciğer Fonksiyon Testi Bozukluğuna Yaklaşım. *J Turk Fam Physician* 2014, 5:1-7.
79. Smit EF, Mattson K, Von Pawel J, Manegold C, Clarke S, Postmus PE. ALIMTA®(pemetrexed disodium) as second-line treatment of non-small-cell lung cancer: a phase II study. *Ann Oncol* 2003, 14: 455-60.
80. Sakamori Y, Kim YH, Yoshida H, Nakaoku T, Nagai H, Yagi Y, Ozasa H, Mishima M. Effect of liver toxicity on clinical outcome of patients with non-small-cell lung cancer treated with pemetrexed. *Mol Clin Oncol* 2015, 3: 334-40.
81. Hermenean A, Mariasiu T, Navarro-González I, Vegara-Meseguer J, Miutescu E, Chakraborty S, Perez-Sánchez H. Hepatoprotective activity of chrysin is mediated through TNF- α in chemically-induced acute liver damage: An in vivo study and molecular modeling. *Exp Ther Med* 2017, 13: 1671-80.
82. Pai SA, Munshi RP, Panchal FH, Gaur IS, Juvekar AR. Chrysin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2019, 392: 1617-28.
83. Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Sultana S. Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2014, 385: 215-23.
84. Rehman MU, Ali N, Rashid S, Jain T, Nafees S, Tahir M, Khan AQ, Lateef A, Khan R, Hamiza OO, Kazim S, Qamar W, Sultana S. Alleviation of hepatic injury by chrysin in cisplatin administered rats: probable role of oxidative and inflammatory markers. *Pharmacol Rep* 2014, 66: 1050-59.
85. Anand KV, Anandhi R, Pakkiyaraj M, Geraldine P. Protective effect of chrysin on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced tissue injury in male Wistar rats. *Toxicol Ind Health* 2011, 27: 923-33.

86. Pulla Reddy AC, Lokesh BR. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* 1992, 111: 117-24.
87. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci Lek Wars Pol* 2004, 57:453-55.
88. Armağan İ. Metotreksat'ın karaciğer ve böbrekte neden olduğu hasarda oksidatif stresin rolü. *SDÜ Tıp Fakültesi Derg* 2015, 22.
89. Jahovic N, Cevik H, Şehirli AÖ, Yeğen BÇ, Şener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 2003, 34: 282-87.
90. Özbolat SN, Ayna A. Chrysin suppresses HT-29 cell death induced by diclofenac through apoptosis and oxidative damage. *Nutr Cancer* 2021, 73: 1419-28.
91. Çuğlan S. Gebe ratlarda formaldehit maruziyetinin fetusların morfolojik yapıları ile karaciğer dokusunun gelişimi üzerine zararlı etkilerinin araştırılması; chrysin'in muhtemel koruyucu rolünün incelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi; 2012.
92. Eldutar E, Kandemir FM, Kucukler S, Caglayan C. Restorative effects of Chrysin pretreatment on oxidant-antioxidant status, inflammatory cytokine production, and apoptotic and autophagic markers in acute paracetamol-induced hepatotoxicity in rats: An experimental and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol* 2017, 31: e21960.
93. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 2004, 286: 431-44.
94. Mantawy EM, El-Bakly WM, Esmat A, Badr AM, El-Demerdash E. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2014, 728:107-18.
95. Fei Z, Zhang L, Wang L, Jiang H, Peng A. Montelukast ameliorated pemetrexed-induced cytotoxicity in hepatocytes by mitigating endoplasmic reticulum (ER) stress and nucleotide oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) activation. *Bioengineered* 2022, 13: 7894-903.

96. Çalışır A. Ratlarda cerulein ile oluşturulan akut pankreatitte chrysin'in pankreatoprotektif ve antioksidan etkileri. Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya: Selçuk, 2016.
97. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 1991, 281: 9-19.
98. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995, 267:1445-9.
99. Chen YC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 1998, 177: 324-33.
100. Gandhi A, Guo T, Ghose R. Role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in regulating tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) mediated increase of acetaminophen (APAP) and chlorpromazine (CPZ) toxicity in murine hepatocytes. *J Toxicol Sci* 2010, 35:163-73.
101. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006, 43: 31-44.
102. Zheng X, Meng WD, Xu YY, Cao JG, Qing FL. Synthesis and anticancer effect of chrysin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2003, 3:881-4.
103. Tunalı-Akbay T, Sehirli O, Ercan F, Sener G. Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. *J Pharm Pharm Sci* 2010,13: 303-10.
104. Kucukler S, Benzer F, Yildirim S, Gur C, Kandemir FM, Bengu AS, Ayna A, Caglayan C, Dortbudak MB. Protective effects of chrysin against oxidative stress and inflammation induced by lead acetate in rat kidneys: a biochemical and histopathological approach. *Biol Trace Elem Res* 2021, 199: 1501-14.

EKLER

EK-1. Özgeçmiş

EK-2. Etik Kurul Kararı