

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

METOTREKSAT İLE KARACİĞER HASARI OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA KARNOZİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

HAZIRLAYAN
Dr. Doğukan GÜMÜŞCAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Fevziye Burcu ŞİRİN

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2024-9523 proje numarası ile desteklenmiştir.

ISPARTA-2025

BEYAN

"Metotreksat ile Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda Karnozinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" adlı tıpta uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi SDÜ Tıp Fakültesi Uzmanlık Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

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

Tezi Hazırlayan

Dr. Doğukan GÜMÜŞCAN

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Fevziye Burcu ŞİRİN

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyimleri ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan, tezimi hazırlama sürecinde her aşamasında bana destek olan, tezimde büyük emekleri bulunan ve mesleki gelişimimde önemli katkıları olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Fevziye Burcu ŞİRİN hocama teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık hayatım süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, manevi desteklerini her zaman hissettiren, mesleki gelişimimde büyük katkıları olan Sayın Prof. Dr. Duygu KUMBUL, Doç. Dr. İlter İLHAN ve Dr. Öğr. Üyesi Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmama katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN ve Doç. Dr. Muhammet Yusuf TEPEBAŞI hocalarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez sürecimde de varlığıyla güç veren, sevgisi ve anlayışıyla her zaman yanımda olan Dr. Ceren ALDEMİR'e en derin sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Beni büyütüp yetiştiren, yaşamım boyunca her zaman yanımda olarak manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili babam Selim GÜMÜŞCAN'a, annem Ayşe GÜMÜŞCAN'a ve abim Muhammet Şevki GÜMÜŞCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanma sürecinde bilgi, tecrübe ve yönlendirmeleriyle bana büyük destek olan Uzm. Dr. Sönmez ŞEVİK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalıştığım tüm asistan ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Doğukan GÜMÜŞCAN

ISPARTA, 2025

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BEYAN ..... **i**

TEŞEKKÜR ..... **ii**

İÇİNDEKİLER ..... **iii**

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**

RESİMLER DİZİNİ ..... **xi**

GRAFİKLER DİZİNİ ..... **xiii**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xiv**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Karaciğer 3

2.1.1. Karaciğer Hücreleri ve Fonksiyonları 3

2.1.2. İlaca Bağlı Karaciğer Hasarı 3

2.2. Metotreksat (MTX) 4

2.2.1. Tarihçe 4

2.2.2. Kimyasal Yapısı 4

2.2.3. Metotreksatın Terapötik Etki Mekanizmaları 5

2.2.4. Metotreksatın Kullanım Alanları 6

2.2.5. Metotreksatın Karaciğerde Oluşturduğu Toksisite Mekanizmaları 6

2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres Mekanizması 7

2.3.1.Serbest Radikallerin Kaynakları 8

2.3.2. Serbest Radikaller 9

2.3.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Oksidatif Stres Mekanizmaları 11

2.3.4. Antioksidan Sistem 11

2.4. NRF2/HO-1 yolağı 16

2.4.1. NRF2'nin Yapısı ve İşlevi 16

2.4.2. HO-1' in Yapısı ve İşlevi 17

2.4.3. NRF2/HO-1 Sinyalinin Antioksidan Etkisi 18

2.5. Apoptoz ve İlişkili Belirteçler (Kaspaz-3, BCL-2, BAX) 18

2.5.1. Apoptozun Mekanizmaları 19
2.5.2. Kaspaz-3 20
2.5.3. BCL-2 ve BAX Proteinleri 20
2.6. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) 21
2.7. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta-1 (TGF-β1) 21
2.8. Karnozin (CAR) 21
2.8.1. Karnozinin Kimyasal Yapısı ve Metabolizması 22
2.8.2. Karnozinin Doku Dağılımı 22
2.8.3. Karnozinin Antioksidan Özellikleri 22
2.8.4. Karnozinin Antiinflamatuar Özellikleri 23
2.8.5. Karnozinin Antiapopitotik Özellikleri 24
2.8.6. Karnozinin Dozları, Uygulama Şekli 24
3. GEREÇ ve YÖNTEM 25
3.1. Gereç 25
3.1.1. Deney Hayvanları 25
3.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler 25
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler 27
3.1.4. Kullanılan Reaktif ve Kitler 27
3.1.5. Kullanılan Çözeltiler 28
3.2. Yöntem 29
3.2.1. Deney Prosedürü 29
3.2.2. Serum Numunelerinin Elde Edilmesi 31
3.2.3. Karaciğer Dokusunun Porsiyonlanması 32
3.2.4. Serum Numunelerinin Biyokimyasal Analizi 32
3.2.5. Sıçan Karaciğer Dokularının Biyokimyasal Analizleri 33
3.2.6. Genetik Analizler (Karaciğer Dokusu BCL-2, BAX, NRF2/HO-1 Ekspresyon Düzeylerinin Tayini) 36
3.2.7. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler 42
3.2.8. İstatistiksel Analiz 45
4. BULGULAR 47
4.1. Biyokimyasal Analizler 47
4.2. Genetik Analizler 49

4.3. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler 52
4.3.1. Histopatolojik Bulgular 52
4.3.2. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal bulguları 54
5. TARTIŞMA 58
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 67
ÖZET 68
ABSTRACT 69
KAYNAKLAR 70
EKLER 77
Ek 1. Etik Kurul Onayı 77
Ek 2. Etik Kurul Onayı 78

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4-HNE : 4-hidroksinonenal
α-SMA : Alfa-düz kas aktini
ABTS : 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit]
ADA : Adenozin deaminaz
ADP : Adenozin difosfat
AGE : İleri glikasyon son ürünleri
AICAR : 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid
AKT : Protein kinaz B
ALE : İleri lipoksidasyon son ürünleri
ALP : Alkalen fosfataz
ALT : Alanin aminotransferaz
ALL : Akut lenfoblastik lösemi
APAF-1 : Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
AST : Aspartat amino transferaz
ARE : Antioksidan yanıt elementi
ATP : Adenozin trifosfat
BAK : BCL-2 antagonisti/öldürücü 1
BAX : BCL-2 ilişkili X proteini
BCL-2 : B hücreli lenfoma 2
BCL-XL : B hücreli lenfoma ekstra büyük
BID : BH3 etkileşimli domain ölüm agonisti
BVR : Biliverdin redüktaz
CAD : Kaspazla aktive olan DNaz
CAT : Katalaz
CAR : Karnozin
CARNS1 : Karnozin sentetaz 1
CCl_4 : Karbon tetraklorür
CK : Kreatin kinaz
CK-MB : Kreatin kinaz MB
CN1 : Karnozinaz 1
CN2 : Karnozinaz 2
CO : Karbon monoksit

CoQ : Koenzim Q

CRP : C-reaktif protein

Cu/Zn-SOD : Bakır-çinko içeren SOD

DAB : 3,3-diaminobenzidin

DHFR : Dihidrofolat redüktaz

DNA : Deoksiribonükleik asit

dTMP : Deoksitimidin monofosfat

dUMP : Deoksiüridin monofosfat

ECM : Hücre dışı matriks

ELISA : Enzimle ilişkili immünosorbent analizi

ER : Endoplazmik retikulum

FADD : Fas ile ilişkili ölüm domaini

FAICAR : 5-formamidoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid

Fas-L : Fas ligand

GABA : Gama-aminobütirik asit

GAPDH : Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz

GLUT : Glukoz taşıyıcı

GPx : Glutatyon peroksidaz

GR : Glutatyon redüktaz

GSH : İndirgenmiş glutatyon

GSSH : Oksitlenmiş glutatyon

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

HDL : Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HE : Hematoksilen-eozin

HO-1 : Hem oksijenaz-1

HOCl : Hipokloröz asit

HMGB1 : Yüksek hareketlilik grubu kutu 1 proteini

HMOX : Hem oksijenaz-1 geni

HSC : Hepatik stellat hücresi

HSP32 : Isı şoku proteini 32

IAP : Apoptozu inhibe eden proteinler

ICAD : Kaspaz ile aktive edilen DNaz inhibitörü

IL-1β : İnterlökin 1 beta

IL-6 : İnterlökin 6

i.p. : İntraperitoneal
iNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KEAP1 : Kelç benzeri ECH ile ilişkili protein 1
KoA : Koenzim A
LDH : Laktat dehidrogenaz
MTX : Metotreksat
MTX-PG : Metotreksat poliglutamat
MDA : Malondialdehit
MMP-2 : Matriks metalloproteinaz-2
Mn-SOD : Mangan içeren SOD
mRNA : Mesajcı ribonükleik asit
NAC : N-asetilsistein
NAD^+ : Nikotinamid adenin dinükleotit
NADH : İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit
$NADP^+$: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NADPH : İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NCBI : Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NF-κB : Nükleer faktör-kappa B
NRF2 : Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
$^1O_2$: Singlet oksijen
$O_2^{\bullet -}$: Süperoksit radikali
OH• : Hidroksil radikali
OSİ : Oksidatif stres indeksi
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K : Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PUFA : Çoklu doymamış yağ asidi
RCS : Reaktif karbonil türleri
RNA : Ribonükleik asit
RNS : Reaktif nitrojen türleri
ROOH : Hidroperoksitler
ROS : Reaktif oksijen türleri
rpm : Dakikadaki devir sayısı
SF : Serum fizyolojik
-SH : Sülfhidril

SOD : Süperoksit dismutaz

SMAC : İkinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü

TAS : Total antioksidan durum

TGF-β1 : Transforme edici büyüme faktörü beta-1

THF : Tetrahidrofolat

TNFR : TNF-α reseptörü

TNF-α : Tümör nekrozis faktör alfa

TOS : Total oksidan durum

TRADD : TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini

UV : Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Metotreksat ve Folatın karşılaştırmalı yapıları 4
Şekil 2.2. Metotreksatın adenozin metabolizması üzerindeki etkisi 6
Şekil 2.3. Temel Antioksidanlar 12
Şekil 2.4. NRF2'nin Aktivasyonu ve Nükleer Translokasyonu 17
Şekil 2.5. Stres Koşullarında NRF2/HO-1 Yolağının Aktivitesi 18
Şekil 2.6. Apoptozun Yolakları 19
Şekil 2.7. Karnozin Sentezi ve Yıkımı 22

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 3.1. Metotreksat ve Karnozinin İntraperitoneal Uygulaması 29
Resim 3.2. Anestezik Madde Uygulaması 30
Resim 3.3. Sıçanlardan Kan Alınması 30
Resim 3.4. Göğüs Kafesin Açılması 31
Resim 3.5. Sıçan Karaciğeri 31
Resim 3.6. RNA İzolasyon Çalışması 37
Resim 4.1. Kontrol Grubunda Bir Ratın Normal Görünümde Karaciğeri ve Aynı Alanın Büyütülmüş Görüntüsü, HE, Barlar: 100 µm ve 50 µm; sırasıyla yaklaşık 100× ve 200× büyütme. 52
Resim 4.2. Metotreksat (MTX) Grubunda Bir Ratın Karaciğerinde Şiddetli Hiperemi (Ok Başları), Nekrotik Hepatositler (Kalın Oklar), Kupffer Hücre Proliferasyonu (İnce Oklar) ve Aynı Alanın Büyütülmüş Görüntüsü, HE, Barlar: 100 µm ve 50 µm; sırasıyla yaklaşık 100× ve 200× büyütme. ... 53
Resim 4.3. Metotreksat+Karnozin (MTX+CAR) Grubunda Patolojik Bulgularda Belirgin Şekilde Azalma, Hafif Hiperemi (Ok) ve Aynı Alanın Büyütülmüş Görüntüsü, HE, Barlar: 100 µm ve 50 µm; sırasıyla yaklaşık 100× ve 200× büyütme..... 53
Resim 4.4. Karnozin (CAR) Grubunda Normal Karaciğer Histolojik Görünümü ve Aynı Alanın Büyütülmüş Görüntüsü, HE, Barlar: 100 µm ve 50 µm; sırasıyla yaklaşık 100× ve 200× büyütme. 54
Resim 4.5. Kontrol Grubunda Bir Ratın Karaciğerinde Negatif Kaspaz-3 Ekspresyonlarının Görünümü, Streptavidin-Biyotin Peroksidaz Metodu, Bar: 50 µm; yaklaşık 200× büyütme. 55
Resim 4.6. Metotreksat (MTX) Grubunda Bir Ratın Karaciğerinde Hepatositlerde Artmış Kaspaz-3 Ekspresyonları (Oklar), Streptavidin-Biyotin Peroksidaz Metodu, Bar: 50 µm; yaklaşık 200× büyütme. 55
Resim 4.7. Metotreksat (MTX) Grubunda Bir Başka Ratın Karaciğerinde Vena Santralis Çevresindeki Hepatositlerde Artmış Kaspaz-3 Ekspresyonları

(Oklar), Streptavidin-Biyotin Peroksidaz Metodu, Bar: 50 µm; yaklaşık 200× büyütme..... 56
Resim 4.8. Metotreksat+Karnozin (MTX+CAR) Grubunda Belirgin Şekilde Azalmış Ekspresyonlar, Streptavidin-Biyotin Peroksidaz Metodu, Bar: 50 µm; yaklaşık 200× büyütme. 56
Resim 4.9. Karnozin (CAR) grubunda bir ratta negatif ekspresyonlar, Streptavidin-Biyotin Peroksidaz metodu Bar: 50 µm; yaklaşık 200× büyütme. 57

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 4.1. Karaciğer dokusunda NRF2 ve HO-1 rölatif mRNA ekspresyon düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması 49

Grafik 4.2. Karaciğer dokusunda BCL-2 ve BAX rölatif mRNA ekspresyon düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması 50

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Reaktif Oksijen Türleri 9
Tablo 3.1. 20 µl revers transkriptaz reaksiyon karışımı 38
Tablo 3.2. Revers Transkriptaz Termal Döngü Protokolü 39
Tablo 3.3. Genler ve Genlsere Ait Spesifik Primer Dizilimleri 40
Tablo 3.4. PCR Reaksiyon Karışımı 41
Tablo 3.5. Gerçek Zamanlı PCR Döngüsü 42
Tablo 4.1. Serum AST ve ALT parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması 47
Tablo 4.2. Karaciğer dokusu TOS, TAS, OSI, TGF-β1 ve TNF-α parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması 48
Tablo 4.3. Karaciğer Dokusu NRF2, HO-1, BCL-2, BAX mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırması 51
Tablo 4.4. Gruplara göre histopatolojik ve immünohistokimyasal skorların istatistik analiz sonuçları 57

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, dünya genelinde yürütülen tarama programları ve tedavi yaklaşımlarındaki gelişmelere rağmen, hâlen önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (1). Yeni nesil antitümöral ajanlara dayalı geliştirilen tedavi yaklaşımları hastaların yaşam süresini uzatmakla birlikte, bu tedavilerin kısa ve uzun vadede toksisite riskleri bulunmaktadır.

Metotreksat (MTX), antimetabolit özellikte bir ilaç olup hücre proliferasyonunu baskılayıcı ve immünosupresif etkileri nedeniyle uzun yıllardır romatolojik, onkolojik ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (2, 3). Buna karşın, özellikle karaciğer ve böbrek gibi hayati organlarda toksisiteye yol açabileceği bilinmektedir (3, 4).

Literatürde MTX'in neden olduğu karaciğer toksisitesini azaltmaya yönelik yapılan çalışmalarda gervital, limon otu ve siyah kaküle gibi antioksidan ve antiinflamatuar etkileriyle bilinen çeşitli bitki ekstrelerinin etkinliği araştırılmıştır (5-7). Bu kapsamda, doğal antioksidan bileşiklerden biri olan karnozinde (CAR) dikkat çekmektedir.

Karnozin, ilk olarak 1900 yılında Rus bilim insanı Gulevitsch tarafından keşfedilen; memelilerde doğal olarak bulunan bir dipeptittir (8). Serbest radikalleri temizleme, metal iyonlarını şelatlama ve pH tamponlama kapasitesi gibi çeşitli biyokimyasal özellikleri aracılığıyla oksidatif stresin neden olduğu hücresel hasara karşı koruyucu etki gösterebildiği bildirilmiştir (9). Dolayısıyla, oksidatif stresin önemli rol oynadığı ilaç kaynaklı toksisite modellerinde koruyucu etki gösterebileceği düşünülmektedir.

Literatür taramasında, CAR'ın MTX'e bağlı gelişen hepatotoksisite üzerindeki etkilerini doğrudan inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum, CAR'ın MTX kaynaklı karaciğer hasarına karşı olası koruyucu etkilerinin araştırılmasını bilimsel açıdan anlamlı ve gerekli kılmaktadır.

Bu doğrultuda çalışmamızda, sıçanlara MTX uygulanarak deneysel karaciğer hasarı modeli oluşturulmuş; hepatotoksisitenin temel mekanizmaları incelenmiş ve CAR'ın bu toksisite üzerindeki olası koruyucu etkileri araştırılmıştır. Deney sonunda

elde edilen karaciğer dokularında toplam oksidan durum (TOS), toplam antioksidan durum (TAS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeyleri ile birlikte NRF2 ve HO-1 genlerinin mRNA gen ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Ayrıca karaciğer fonksiyonlarını belirlemek üzere AST ve ALT düzeyleri, karaciğer dokusundaki inflamasyonu değerlendirmek amacıyla TNF-α, fibrozis süreçlerini incelemek için ise TGF-β1 düzeyleri ölçülmüştür. Apoptozla ilişkili mekanizmaları ortaya koymak üzere BCL-2 ve BAX gen ekspresyonları analiz edilmiş, kaspaz-3 immünohistokimyasal boyaması yapılmıştır. Karaciğer doku bütünlüğü ve histopatolojik değişiklikler ise hematoksilen-eozin (H&E) boyaması ile değerlendirilmiştir.

Amaç

Metotreksata bağlı olarak gelişen hepatotoksisite, ilacın klinik kullanımını kısıtlayan önemli bir yan etki olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle MTX'in karaciğer üzerindeki toksik etkilerini azaltabilecek ajanların araştırılması, kemoterapötik tedavilerin etkinliğini artırmanın yanı sıra hastaların tedaviye uyumunu ve toleransını iyileştirme potansiyeli taşımaktadır.

Bu doğrultuda çalışmamızda MTX ile oluşturulan hepatotoksisite modelinde oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz mekanizmalarına ilişkin gen ekspresyon düzeyleri incelenmiş; CAR'ın bu patofizyolojik süreçler üzerindeki olası koruyucu etkileri değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

Karaciğer, abdominal bölgede sağ üst kadranda bulunan ve vücuttaki birçok yaşamsal işlevi yerine getiren bir organdır. Bu işlevler arasında enfeksiyonlara karşı savunma, enerji metabolizmasının düzenlenmesi ve çeşitli plazma proteinlerinin sentezi yer almaktadır. Karaciğerin temel görevlerinden biri ise detoksifikasyondur. Bu süreçte toksik bileşikler çok sayıda enzim aracılığıyla biyotransformasyona uğratılarak daha az toksik ve suda çözünebilen formlara dönüştürülür. Elde edilen metabolitler safra veya idrar yoluyla vücuttan atılır (10, 11).

2.1.1. Karaciğer Hücreleri ve Fonksiyonları

Karaciğerin histolojik yapısı, farklı morfolojik ve işlevsel özelliklere sahip çeşitli hücre tiplerinden oluşur.

Karaciğerin ana parankimal hücreleri olan hepatositler, sinüzoidal damarları çevreleyen hücre kordonları şeklinde dizilmiştir. Sentez, metabolizma, detoksifikasyon ve safra üretimi gibi temel işlevlerden sorumludurlar.

Kupffer hücreleri, sinüzoidlerin iç yüzeyinde bulunan makrofajlardır. Fagositozla patojenleri ortadan kaldırmanın yanı sıra, antijen sunumu ve çeşitli sitokinlerin üretimi yoluyla bağışıklık yanıtını düzenlerler.

Hepatik stellat hücreleri (Ito hücreleri, HSC), Disse aralığında yer alırlar. Hasar durumunda aktive olarak kollajen ve diğer matriks bileşenlerinin sentezini artırırlar. Bu süreç, fibrogenez ve siroz gelişiminde rol oynar.

Safra kanalı epitel hücreleri (kolanjiyositler), safra kanallarını döşerler ve safranın taşınmasında görev alırlar (12, 13).

2.1.2. İlaca Bağlı Karaciğer Hasarı

İlaca bağlı karaciğer hasarı tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar, bitkisel ürünler veya gıda takviyelerine bağlı olarak gelişen karaciğer hasarını tanımlayan klinik bir tablodur. Hepatotoksisite gelişimi ilacın kimyasal özellikleri, çevresel faktörler ile

bireyin genetik yapısı, yaşı, cinsiyeti ve eşlik eden hastalıkları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (14).

2.2. Metotreksat (MTX)

Metotreksat, hücre proliferasyonunu baskılayan bir folat antimetabolitidir (3). Antiinflamatuar, immünsupresif ve antineoplastik etkileri sayesinde çeşitli inflamatuar ve neoplastik hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (15).

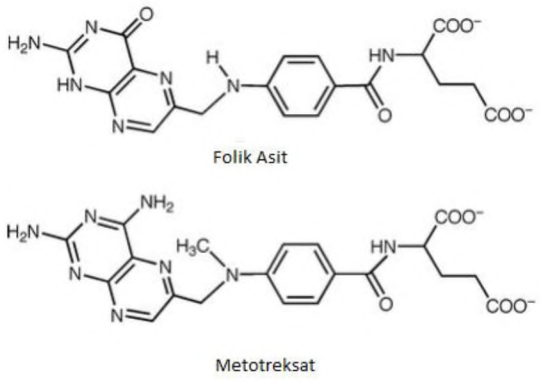
2.2.1. Tarihçe

Metotreksat, ilk kez 1948 yılında Sidney Farber tarafından akut lenfoblastik lösemi (ALL) tanılı çocukların tedavisinde kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu gelişme, MTX'in kemoterapötik ajan olarak klinik kullanımının başlangıcı olmuştur. Daha sonra psöriasis ve romatoid artrit gibi inflamatuar hastalıkların tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır (3).

2.2.2. Kimyasal Yapısı

Metotreksat, folik asidin 4-amino-N^{10}-metil türevidir (16). Şekil 2.1'de MTX ve folatın karşılaştırmalı yapısı gösterilmiştir.

Lipid çözünürlüğü düşük olduğundan hücre zarını pasif difüzyon yoluyla geçemez ve taşıyıcı proteinlere ihtiyaç duyar (17).



Şekil 2.1. Metotreksat ve Folatın karşılaştırmalı yapıları

(17) numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

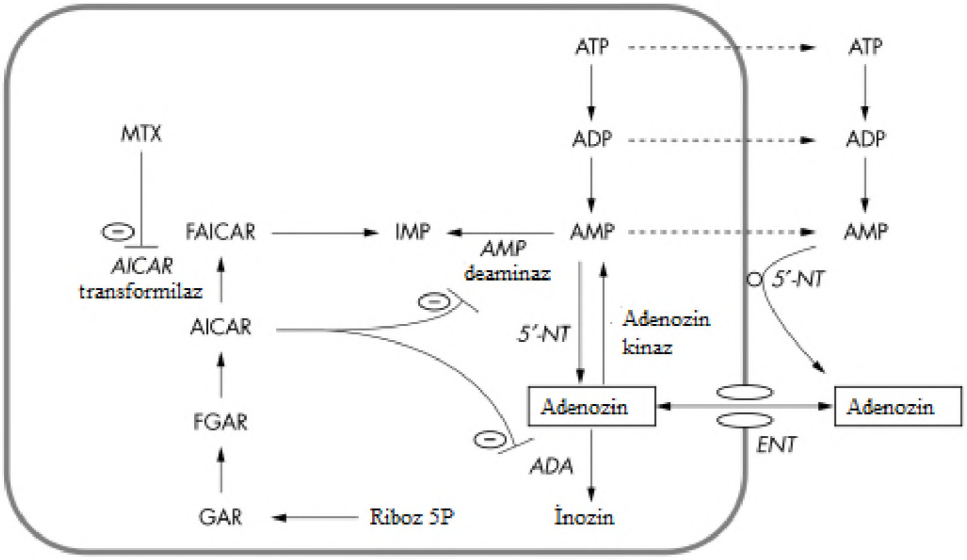
2.2.3. Metotreksatın Terapötik Etki Mekanizmaları

Metotreksatın terapötik etkisi çeşitli moleküler mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıkmakta olup, bunlardan en önemlisi dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin inhibisyonudur. Bu inhibisyon, tetrahidrofolat (THF) sentezini engeller ve tek karbon birimlerinin taşınmasını bozarak pürin nükleotidleri ile deoksitimidin monofosfat (dTMP) sentezinin azalmasına yol açar. Ayrıca MTX, timidilat sentaz enzimini de inhibe eder (17).

$$\text{5,10-metilentetrahidrofolat} + \text{dUMP} \xrightarrow{\text{timidilat sentaz}} \text{dTMP} + \text{dihidrofolat}$$

Böylece dTMP üretimi hem THF eksikliğine bağlı olarak dolaylı biçimde hem de timidilat sentaz enziminin inhibisyonu yoluyla doğrudan baskılanır. Bu metabolik yolun engellenmesi: DNA ve RNA sentezinin duraksamasına, ATP üretiminin azalmasına ve sonuç olarak hücre proliferasyonunun baskılanmasına neden olur. Bu süreç, MTX'in antineoplastik etkisinin temel mekanizmasını oluşturur (18).

Metotreksatın antiinflamatuar ve immünmodülatör etkileri de bulunmaktadır. Bu etkilerini ise 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid (AICAR)'ın 5-formamidoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid (FAICAR)'a dönüşümünü inhibe ederek göstermektedir. Bu inhibisyon sonucunda AICAR birikimi meydana gelir. Biriken AICAR, adenozin deaminaz (ADA) enzimini inhibe ederek hücre içi adenozin düzeylerinin artmasına neden olur. Artan adenozin, nükleozid taşıyıcılar aracılığıyla hücre dışına taşınır ve hücrelerdeki reseptörüne bağlanır. Bu bağlanma sonucunda ise proinflamatuar sitokinlerin üretimi baskılanır ve bağışıklık hücrelerinin aktivitesi sınırlanır (17, 18). Şekil 2.2'de MTX'in adenozin metabolizması üzerindeki etkisi gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Metotreksatın adenozin metabolizması üzerindeki etkisi

(19) numaralı kaynaktan revize edilmiştir.

2.2.4. Metotreksatın Kullanım Alanları

Metotreksat, klinik pratikte osteosarkom, akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve bazı solid tümörlerin tedavisinde yüksek dozlarda kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır (20). Buna karşın romatoid artrit, psöriasis ve multipl skleroz gibi kronik inflamatuar hastalıklarda düşük dozlarda immünmodülatör amaçla kullanılmaktadır. Yeni biyolojik ajanların kullanımının yaygınlaşmasına rağmen düşük maliyeti, uzun dönem klinik deneyimi ve kanıtlanmış etkinliği nedeniyle MTX günümüzde hâlâ en sık tercih edilen tedavi ajanlarından biridir (21, 22).

2.2.5. Metotreksatın Karaciğerde Oluşturduğu Toksisite Mekanizmaları

Metotreksat, karaciğer dokusunda belirgin toksisiteye yol açabilen bir folat antagonistidir. Bu hepatotoksik etki, başta folat metabolizmasının inhibisyonu ve oksidatif stresin artışı olmak üzere birden fazla mekanizmayla ilişkilidir.

Metotreksat, DHFR enzimini inhibe ederek tetrahidrofolat (THF) sentezini azaltır. Tetrahidrofolat düzeylerindeki bu azalma, DNA sentezi ve enerji üretim süreçlerinin baskılanmasına yol açarak hepatositlerin yenilenme kapasitesini düşürür ve sonuç olarak karaciğer dokusunda hasar gelişimine zemin hazırlar (23, 24).

Buna ek olarak MTX, NAD^+ bağımlı mitokondriyal enzimleri (pirüvat dehidrojenaz, α-ketoglutarat dehidrojenaz, izositrat dehidrojenaz ve malat dehidrojenaz) inhibe ederek hücresel enerji üretimini daha da bozar. Ayrıca MTX'in $NADP^+$ bağımlı sitozolik enzimleri (malik enzim ve izositrat dehidrojenaz) inhibe etmesi, NADPH üretimini azaltarak indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeylerinin düşmesine yol açar. İndirgenmiş glutatyon (GSH), antioksidan savunmada görevli olan glutatyon peroksidazın substratı olduğundan, GSH'deki azalma antioksidan kapasitenin düşmesine ve hepatositlerin reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı duyarlılığının artmasına neden olur. Bu durum oksidatif stresin gelişmesine ve sonuç olarak hücresel hasarın şiddetlenmesine yol açar (25).

Metotreksatın neden olduğu hücresel stres, karaciğer dokusunda tümör nekroz faktörü-α (TNF-α), interlökin-1β (IL-1β) gibi proinflamatuar sitokinlerin ve akut faz reaktanlarından C-reaktif proteinin (CRP) düzeylerinde artışa yol açarak inflamatuar yanıtı tetikler. Bu süreç, hepatosit hasarını derinleştirerek MTX'e bağlı gelişen hepatotoksisitenin temel patofizyolojik mekanizmalarından birini oluşturur (7, 26).

Gelişen doku hasarı ve inflamatuar yanıt, karaciğerin yerleşik makrofajları olan Kupffer hücrelerinden transforme edici büyüme faktörü beta-1 (TGF-β1) salınımına yol açar. Salınan TGF-β1, HSC'lerin aktivasyonunu tetikleyerek bu hücrelerin miyofibroblast benzeri bir fenotipe dönüşerek aktive olmasına yol açar. Aktive olan HSC'ler, ekstrasellüler matriks (ECM) proteinleri ve tip I kollajen sentezini artırarak fibrotik dokunun birikimine ve doku yeniden yapılanmasının bozulmasına yol açar. Dolayısıyla TGF-β1, karaciğer fibrogenezinin başlatılması ve ilerlemesinde rol oynar (27).

2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres Mekanizması

Serbest radikaller, yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan; bu nedenle son derece reaktif ve kararsız özellik gösteren moleküllerdir. Biyolojik sistemlerde çoğunlukla oksijen veya azot atomları etrafında oluşurlar ve buna göre reaktif oksijen türleri (ROS) ile reaktif azot türleri (RNS) olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılırlar (28).

Reaktif oksijen türleri arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH•), singlet oksijen ($^1O_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2), lipit hidroperoksitleri ve hipokloröz asit gibi oksidanlar yer alır. Fizyolojik koşullarda bu moleküller antioksidan enzimler (örneğin süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) tarafından nötralize edilerek hücresel redoks dengesi korunur. Ancak ROS üretiminin artması veya antioksidan kapasitenin yetersiz kalması durumunda oksidan–antioksidan dengesi bozulur. Bu dengesizlik sonucu ROS hücre içi lipidler, proteinler ve DNA başta olmak üzere çeşitli biyomoleküllerle etkileşerek yapısal ve fonksiyonel bozulmalara neden olur. Bu süreç, oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır (29).

Oksidatif stresin birçok akut ve kronik hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, çeşitli kanser türleri, katarakt, astım, inflamatuar hastalıklar, ciddi yanıklar, gastrointestinal sistem hastalıkları ile iskemi-reperfüzyon hasarları oksidatif stresle ilişkilendirilen başlıca patolojiler arasında yer almaktadır (30).

2.3.1.Serbest Radikallerin Kaynakları

Reaktif oksijen türleri, endojen ya da ekzojen kaynaklı olabilirler.

Hücre içinde yüksek oksijen tüketimine sahip organeller olan mitokondri, peroksizom ve endoplazmik retikulum temel endojen ROS kaynaklarıdır. Bu yapılarda sırasıyla elektron taşıma zinciri aktivitesi, yağ asidi β-oksidasyonu ve protein katlanma süreçleri sırasında ROS üretimi meydana gelir (31).

Ekzojen kaynaklar ise çevresel etmenlere bağlı ROS oluşumunu kapsamaktadır. Örneğin ultraviyole (UV) ışınları, DNA'da ROS oluşumunu tetiklerken; iyonize radyasyon (X ve gama ışınları), su moleküllerinin parçalanması yoluyla hidroksil radikali üretimine neden olabilir. Sigara dumanı ise doğrudan serbest radikaller içermesi nedeniyle ROS yükünü artırmaktadır (32).

2.3.2. Serbest Radikaller

Reaktif oksijen türleri, radikal olanlar ve olmayanlar olarak iki gruba ayrılmaktadır. Tablo 2.1.'de ROS listelenmiştir.

Tablo 2.1. Reaktif Oksijen Türleri (33)

RADİKAL	$O_2^{\bullet -}$	Süperoksit Radikali
	OH•	Hidroksil Radikali
	NO•	Nitrik Oksit
	HOO•	Hidroperoksit
RADİKAL OLMAYAN	H_2O_2	Hidrojen Peroksit
	HOCl	Hipoklöroz Asit
	$ONOO^-$	Peroksinitrit
	$^1O_2$	Singlet Oksijen

2.3.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet -}$)

Süperoksit radikali, biyolojik sistemlerde en yaygın görülen reaktif oksijen türlerinden biridir. Süperoksit radikalinin başlıca kaynağı mitokondriyal elektron taşıma zinciridir. Bu zincirde kaçak elektronların oksijenle reaksiyona girmesi sonucunda $O_2^{\bullet -}$ oluşur. Reaktivitesi sınırlı olsa da, daha reaktif oksidan türlere (örneğin hidroksil radikali) dönüşerek hücresel hasara dolaylı yoldan katkıda bulunur (31).

2.3.2.2. Singlet Oksijen ($^1O_2$)

Singlet oksijen, moleküler oksijenin yüksek enerjili bir formudur. Yüksek oksidatif kapasitesi nedeniyle biyolojik sistemlerde toksik etkilere yol açabilmektedir (34). Özellikle nötrofiller ve eozinofiller gibi bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu

sırasında lipooksijenaz, dioksijenaz ve laktoperoksidaz gibi enzimlerin kataliziyle oluşmaktadır.

Singlet oksijen yüksek reaktivitesi nedeniyle DNA, proteinler ve membran lipidleriyle etkileşime girerek; DNA'da zincir kırıkları, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu gibi hücresel hasarlara neden olur. Bu özellikleriyle oksidatif stresle ilişkili patolojik süreçlerin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (31).

2.3.2.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, hücre içinde süperoksit dismutaz (SOD) enziminin süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot -}$) detoksifiye etmesi sonucu oluşan bir reaktif oksijen türüdür. Düşük reaktivitesine rağmen daha güçlü oksidan türlerin oluşumunda kilit bir ara bileşik olarak görev yapar.

Hidrojen peroksit fizyolojik koşullarda hücre içinde sinyal iletimi, gen ekspresyonu ve hücre proliferasyonu gibi süreçlerde düzenleyici rol oynar. Ancak, geçiş metalleri (özellikle Fe^{2+}) varlığında Fenton reaksiyonuna girerek yüksek derecede reaktif bir tür olan hidroksil radikaline (OH•) dönüşebilir (35).

2.3.2.4. Hidroksil Radikali (OH•)

Hidroksil radikali, hidroksit iyonunun radikal formu olup ROS'lar arasında en yüksek oksidatif kapasiteye sahip olan moleküldür (36). Son derece reaktif olması nedeniyle oluştuğu anda çevresindeki moleküllerle hızla etkileşime girer. DNA, proteinler, membran lipitleri ve karbonhidratları hedef alarak ciddi hücresel hasarlara yol açabilir (37).

Biyolojik sistemlerde başlıca Fenton reaksiyonu aracılığıyla oluşur. Bu reaksiyonda H_2O_2, Fe^{2+} ile etkileşerek OH• üretir:

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\bullet + OH^-$ (Fenton reaksiyonu)

Ayrıca, $O_2^{\cdot -}$ ile H_2O_2'nin tepkimeye girdiği Haber-Weiss reaksiyonu da OH• üretimine katkıda bulunur:

$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH\bullet + OH^-$ (Haber-Weiss reaksiyonu) (38).

2.3.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Oksidatif Stres Mekanizmaları

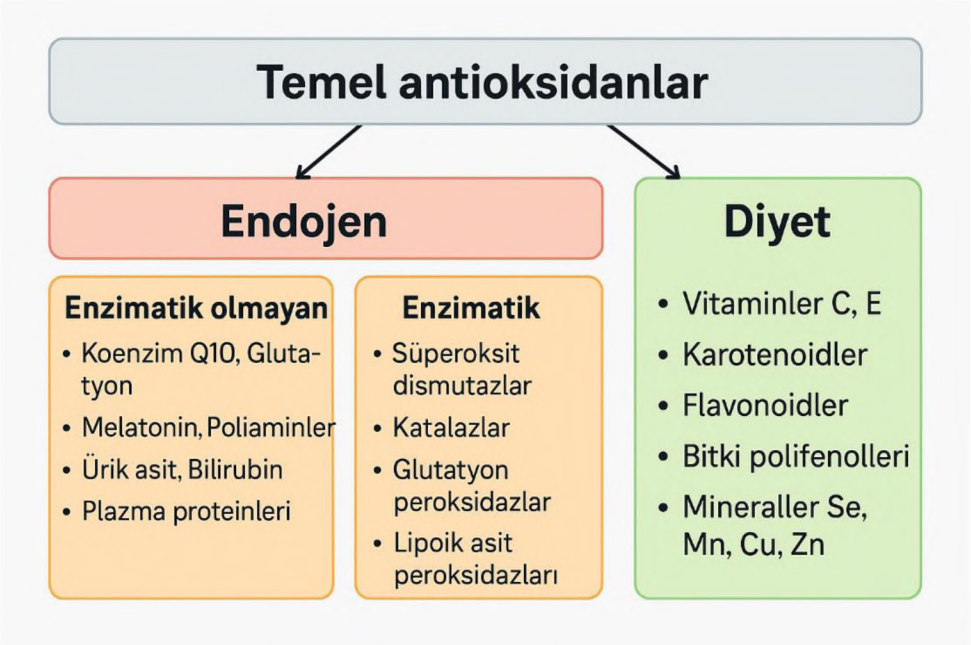
Reaktif oksijen türlerinin düzeyleri SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler tarafından kontrol edilerek hücrede oksidatif denge sürdürülür. Ancak ROS düzeyi antioksidan sistem tarafından yeterince dengelenemediğinde oksidatif stres gelişir (39).

Bu süreçte hücre zarında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), ROS'ların başlıca hedefleri arasındadır. Reaktif oksijen türleri ile etkileşimleri sonucunda membran lipidleri okside olur, bu da membran bütünlüğünün bozulmasına ve geçirgenliğin artmasına neden olarak hücresel işlevleri olumsuz etkiler. Lipid peroksidasyonunun ilerlemesiyle birlikte çeşitli reaktif aldehitler ve ikincil oksidasyon ürünleri açığa çıkar. Bu reaktif bileşikler proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek hücrede toksisiteye, yapısal bozulmalara ve fonksiyonel kayıplara yol açabilirler (40).

Oksidatif stresin şiddetlenmesi, başta mitokondriyal disfonksiyon ve endoplazmik retikulum (ER) stresini tetikleyerek enerji metabolizmasının bozulmasına yol açar (41). Bu süreçte ATP üretiminin azalması, kalsiyum homeostazının bozulması ve proapoptotik sinyallerin aktivasyonu gerçekleşir; bu değişiklikler hücrenin apoptoz veya nekroz gibi hücre ölümü yollarına yönelmesine neden olur (42).

2.3.4. Antioksidan Sistem

Hücre, ROS'un zararlı etkilerine karşı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptir. Bu sistemler, oksidatif stresin kontrolünde ve hücresel bütünlüğün korunmasında kritik rol oynar (31, 43). Şekil 2.3'te Temel Antioksidanlar gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Temel Antioksidanlar

(44) numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

2.3.4.1. Diyet Antioksidanları

2.3.4.1.1. Vitaminler ve Mineraller

Meyve ve sebzeler C vitamini, E vitamini ve provitamin A (karotenoidler) gibi antioksidan özellik gösteren vitaminler açısından zengindir. Bu moleküller hücre içi, hücre dışı ve membran düzeylerinde serbest radikallerle etkileşime girerek onları nötralize ederler ve oksidatif hasarı sınırlandırırlar.

E vitamini, yağda çözünen ve özellikle hücre zarındaki lipid peroksidasyonunu engelleyen bir antioksidandır. Bu özelliği sayesinde membran bütünlüğünü korur.

Karotenoidler, singlet oksijeni etkisiz hâle getirir ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederek antioksidan etki gösterir.

C vitamini ise hidrofilik bir antioksidan olup ROS'u doğrudan nötralize eder. Ayrıca okside olmuş E vitaminini indirgeyerek yeniden aktif forma dönüştürülmesini sağlar. Böylece lipid peroksidasyonuna karşı ek bir koruyucu etki oluşturur (44).

Minerallerin bir kısmı antioksidan enzimler için kofaktör görevi görürken, bazıları bu enzimlerin yapısal bileşenleri arasında yer alır ve bu rolleri sayesinde antioksidan savunma sistemi içerisinde önemli bir yere sahiptir.

Selenyum, glutatyon peroksidaz enziminin aktif merkezinde selenosistein formunda bulunan esansiyel bir elementtir ve hidrojen peroksitin detoksifikasyonunda kritik rol oynar (45).

Manganez mitokondriyal süperoksit dismutazın (MnSOD) kofaktörü olup, enzimin yapısal bütünlüğü ve katalitik aktivitesi için gereklidir (46).

Bakır ve çinko sitoplazmik süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) enziminin kofaktörleridir. Bu enzimde bakır katalitik merkezde görev alarak süperoksit radikalinin ($O_2^{\bullet -}$) hidrojen peroksite ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Çinko ise enzimin yapısal stabilitesini korur (47).

2.3.4.2. Endojen Antioksidanlar

Hücreler, ROS'ların zararlı etkilerine karşı korunmayı sağlayan çeşitli endojen antioksidan sistemlere sahiptir (44).

2.3.4.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar, ROS'u daha az reaktif ve zararsız moleküllere dönüştürerek hücresel redoks dengesinin sürdürülmesinde temel rol oynar (44).

2.3.4.2.1.1. Süperoksit Dismutazlar (SOD)

Süperoksit dismutazlar, aerobik organizmalarda yaygın olarak bulunan ve oksidatif stresle mücadelede merkezi bir rol üstlenen antioksidan enzimlerdir.

Bu enzimler, yüksek reaktiviteye sahip $O_2^{\cdot -}$ radikalini daha az zararlı bileşikler olan H_2O_2 ve O_2'ye dönüştürerek hücre içi oksidatif yükün azaltılmasına katkı sağlar.

SOD'un üç temel izoformu tanımlanmıştır:

SOD1 (Cu/Zn-SOD): Sitoplazmada bulunur ve aktivitesi bakır ile çinko iyonlarına bağımlıdır.

SOD2 (Mn-SOD): Mitokondride lokalizedir. Manganez bağımlı bir enzimdir ve özellikle mitokondri kaynaklı ROS'un detoksifikasyonunda temel rol oynar.

SOD3 (Ekstraselüler SOD): Hücre dışı matrikste yer alır. SOD1 gibi bakır ve çinko iyonlarına bağımlı olarak işlev görür (48).

2.3.4.2.1.2. Katalaz

Katalaz, peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında hem grubu bulunduran önemli bir antioksidan enzimdir. Temel görevi, H_2O_2 molekülünü daha az toksik bileşikler olan su ve oksijene dönüştürerek oksidatif hasarı önlemektir:

$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$

Katalaz, son derece yüksek katalitik kapasiteye sahip bir enzimdir. Tek bir katalaz molekülü, saniyeler içerisinde milyonlarca H_2O_2 molekülünü detoksifiye edebilme yeteneğine sahiptir (49).

2.3.4.2.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Glutatyon peroksidaz tıpkı katalaz gibi H_2O_2'yi suya dönüştüren önemli bir antioksidan enzimdir. Ancak GPx ile katalaz arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır: Katalaz, esas olarak peroksizomlarda lokalizedir ve genellikle hücre içi H_2O_2 düzeyi fizyolojik sınırların üzerine çıktığında aktive olur. Buna karşılık GPx, hem hücre içi hem de hücre dışı kompartmanlarda aktif olup, H_2O_2'nin fizyolojik düzeyde düzenlenmesine katkıda bulunur. Hidrojen peroksit, GPx tarafından indirgenmiş glutatyonun (GSH) kullanıldığı bir reaksiyonla detoksifiye edilir ve bu süreçte oksitlenmiş glutatyon (GSSG) oluşur:

$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow 2\ H_2O + GSSG$ (50).

2.3.4.2.2. Endojen Nonenzimatik Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar, reaktif türleri doğrudan nötralize ederek veya serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırarak oksidatif stresin azaltılmasına katkıda bulunur. Bu bileşikler, enzimatik antioksidan sistemlerle birlikte çalışarak hücresel redoks dengesinin korunmasına yardımcı olur.

Bu grupta başlıca glutatyon (GSH), N-asetilsistein (NAC), ürik asit, melatonin ve koenzim Q10 (CoQ10) gibi bileşikler yer alır. Ayrıca insan plazmasında bulunan bazı plazma proteinleri de antioksidan savunmaya önemli ölçüde katkı sağlar. Bu proteinler arasında albümin, ferritin, transferrin, haptoglobulin ve serüloplazmin ön plana çıkmaktadır (51).

2.3.4.2.2.1. N-asetilsistein (NAC)

N-asetilsistein, hem doğrudan hem de dolaylı yollarla antioksidan etki gösteren önemli bir bileşiktir. Yapısında bulunan sülfhidril (-SH) grubu, ROS ile doğrudan etkileşime girerek bu moleküllerin nötralizasyonunu sağlar. Bu etkileşim sonucunda NAC oksitlenerek disülfid formuna dönüşür.

N-asetilsistein aynı zamanda GSH sentezinde öncül bir madde olarak görev yapar. Bu özelliği sayesinde hücre içi GSH düzeylerini artırarak dolaylı yoldan antioksidan savunmaya katkı sağlar (52).

2.3.4.2.2.2. Glutatyon

Glutatyon γ-glutamil, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. Çekirdek, mitokondri ve sitoplazma dâhil olmak üzere hemen hemen tüm hücresel kompartmanlarda yüksek konsantrasyonda bulunur (53).

Glutatyon hücresel farklılaşma, yaşlanma, programlanmış hücre ölümü, ksenobiyotik detoksifikasyonu, enzim aktivitesinin düzenlenmesi ve protein ile nükleotid sentezi gibi birçok temel biyolojik süreçte rol alır. Antioksidan etkisi, büyük ölçüde GPx enzimi aracılığıyla gerçekleşir. GPx, H_2O_2 ve lipid peroksitleri GSH kullanarak indirger. Bu reaksiyon sırasında GSH, elektron kaybederek oksitlenmiş glutatyon (GSSG) formuna dönüşür. Oluşan GSSG, glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla NADPH kullanılarak yeniden GSH'ye dönüştürülür. Bu döngü, hücre içi redoks dengesinin korunmasında kritik bir rol oynar (54).

2.3.4.2.2.3. Koenzim Q (CoQ)

Koenzim Q, yapısal olarak bir benzoquinon türevi olup başta mitokondri iç zarı olmak üzere çeşitli hücresel membranlarda bulunur. En temel fizyolojik görevi, mitokondride yer alan elektron taşıma zincirinde elektronların kompleksler arasında aktarımını sağlayarak; ATP üretimine katkıda bulunmaktır.

Bunun yanı sıra lipofilik yapısı sayesinde özellikle mitokondri iç zarı, hücre membranları ve plazma lipoproteinleri gibi yapılar üzerinde etkili bir antioksidan rol üstlenerek serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı engeller (55).

2.4. NRF2/HO-1 yolağı

NRF2/HO-1 sinyal yolağı, oksidatif stres ve inflamasyona karşı hücresel savunma mekanizmalarının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar.

Bu yolak diyabet, fibrozis, nörotoksisite ve kanser gibi oksidatif stres temelli birçok hastalığın patogenezinde kilit rol oynadığı için terapötik bir hedef olarak dikkat çekmektedir (56).

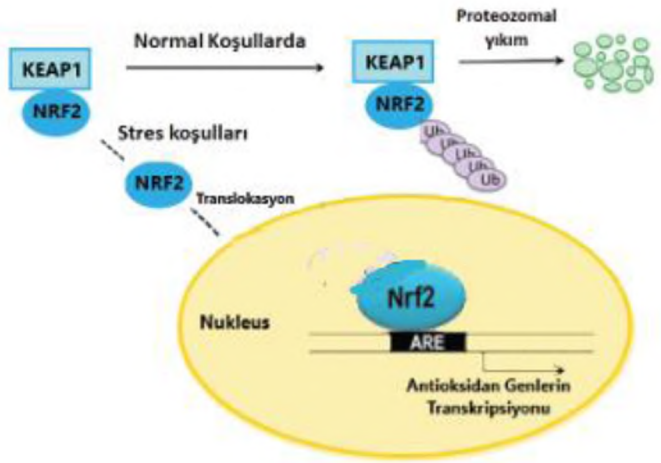
2.4.1. NRF2'nin Yapısı ve İşlevi

Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2), NFE2L2 geni tarafından kodlanan ve hücrede meydana gelen redoks dengesindeki değişimlere yanıt vererek oksidatif stres ile inflamasyona karşı savunmayı düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Başta SOD, katalaz, hem oksijenaz-1 (HO-1) olmak üzere çeşitli antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin gen ekspresyonunu düzenler.

Normal fizyolojik koşullarda NRF2, sitoplazmada Kelch-benzeri ECH ilişkili protein 1 (KEAP1) ile kompleks oluşturarak ubikuitin-proteazom sistemi aracılığıyla hızla yıkılır ve hücre içinde düşük düzeylerde tutulur.

Ancak hücre ROS, RNS veya ağır metaller gibi stres faktörlerine maruz kaldığında, KEAP1'in yapısal konformasyonu değişir ve NRF2' den ayrılır. Sitoplazmada serbest hale gelen NRF2 de kısa süre içerisinde çekirdeğe transloke olur ve hedef genlerin promotör bölgelerinde yer alan antioksidan yanıt

elementlerine (ARE) bağlanarak bu genlerin transkripsiyonunu başlatır (57, 58). Şekil 2.4'te NRF2'nin aktivasyonu ve nükleer translokasyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.4. NRF2'nin Aktivasyonu ve Nükleer Translokasyonu

(59) numaralı kaynaktan revize edilmiştir.

2.4.2. HO-1' in Yapısı ve İşlevi

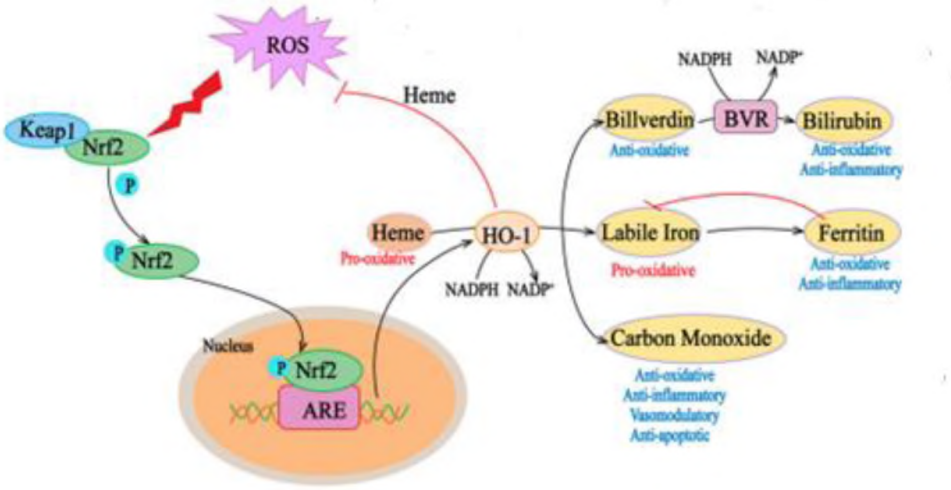
Hem oksijenaz, ilk kez 1968 yılında Tenhunen ve Schmid tarafından tanımlanmıştır. Hem oksijenaz-1 (HMOX) geni tarafından kodlanan bu enzim, hem molekülünü parçalayarak karbon monoksit (CO), serbest demir (Fe^{2+}) ve biliverdin oluşumunu sağlar (58, 60). Açığa çıkan serbest demir, ferritin sentezini uyararak güvenli biçimde depolanırken; karbon monoksit vazomodülatör, antioksidan, antiinflamatuar ve antiapoptotik etkiler gösteren bir sinyal molekülü olarak görev yapar. Biliverdin ise biliverdin redüktaz (BVR) aracılığıyla hızla bilirubine dönüştürülür. Biliverdin ve bilirubin, güçlü antioksidan ve antiinflamatuar özellikleri sayesinde hücresel savunma sistemine katkıda bulunur. Bu mekanizmalar, oksidatif stresle mücadelede önemli bir koruyucu sistem oluşturur (61).

Hem oksijenaz enziminin HO-1, HO-2 ve HO-3 olmak üzere üç izoformu tanımlanmıştır. Bu izoformlardan HO-1, ısı şok proteini 32 (HSP32) olarak da bilinen indüklenebilir bir izoformdur ve UV ışını, enfeksiyon, ağır metaller, nitrik oksit, sitokinler gibi çeşitli hücresel stres etkenlerine yanıt olarak ekspresyonu artar. Buna karşılık HO-2 ve HO-3 çoğu dokuda bazal düzeyde eksprese edilen yapısal izoformlardır (62, 63).

2.4.3. NRF2/HO-1 Sinyalinin Antioksidan Etkisi

Hem, ROS, büyüme faktörleri, proinflamatuar sitokinler (IL-6, IL-1β, TNF-α) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi çeşitli uyaranlar NRF2 aktivasyonunu tetikler. Aktivasyon sonrası sitoplazmadan nükleusa transloke olan NRF2, HMOX1 geninin transkripsiyonunu artırarak HO-1 ekspresyonunu uyarır ve böylece oksidatif stresle mücadelede önemli bir savunma mekanizması oluşturur (63).

Bu bağlamda HO-1 geni NRF2 tarafından düzenlenmekte olup, NRF2/HO-1 yolu hücresel stres koşullarında antioksidan savunmanın sürdürülmesi ve oksidatif homeostazın korunmasında görev alan en önemli sitoprotektif mekanizmalardan biri olarak öne çıkmaktadır (64). Şekil 2.5'te oksidatif stres koşullarında NRF2/HO-1 yolağının aktivitesi gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Stres Koşullarında NRF2/HO-1 Yolağının Aktivitesi

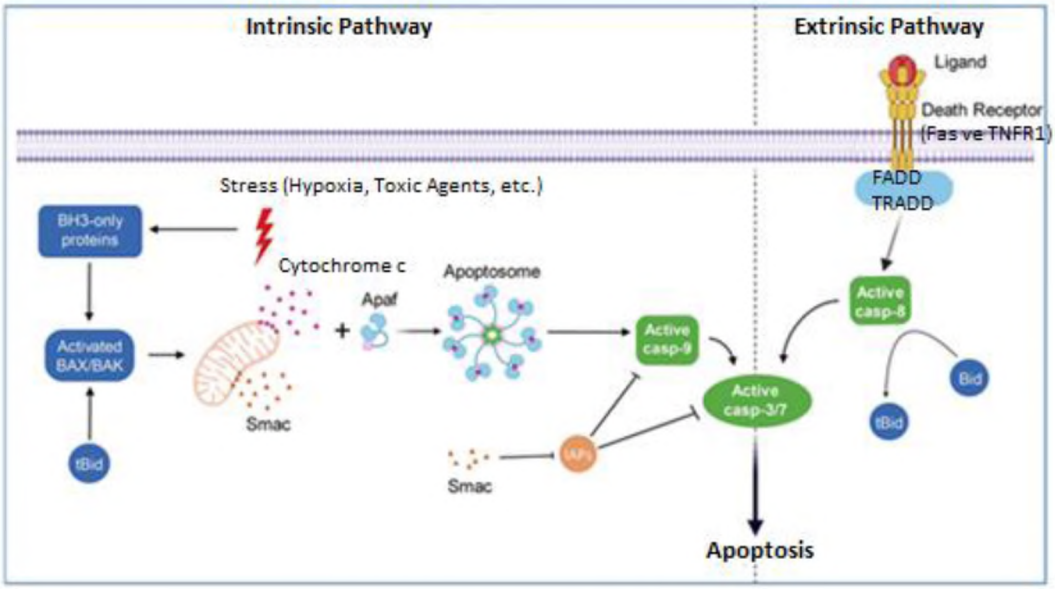
(61) numaralı kaynaktan revize edilmiştir.

2.5. Apoptoz ve İlişkili Belirteçler (Kaspaz-3, BCL-2, BAX)

Apoptoz, hücrenin genetik olarak programlanmış ölüm biçimidir. Organizmalarda doku homeostazının korunması, embriyonik gelişim ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik süreçte kritik rol oynar (65).

2.5.1. Apoptozun Mekanizmaları

Apoptoz, intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) olmak üzere iki ana yolak üzerinden gerçekleşir. Her iki yolak da hücre içi kaspaz aktivasyonu ile karakterize edilen programlanmış hücre ölüm sürecini tetikler (66). Şekil 2.6'da apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolakları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Apoptozun Yolakları

(67) numaralı kaynaktan revize edilmiştir.

İntrinsik yolak DNA hasarı, hipoksi ve toksik ajanlar gibi hücre içi stres faktörlerinin proapoptotik BCL-2 ailesi üyeleri olan BCL-2 ilişkili X proteini (BAX) ve BCL-2 antagonistini (BAK) aktive etmesiyle başlatılır. Bu aktivasyon mitokondri zarının geçirgenliğini artırarak sitoplazmaya sitokrom c ve ikinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü (SMAC) salınımına yol açar. Sitokrom c'nin apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1 (APAF-1) ile etkileşimi sonucunda apoptozom kompleksi oluşur ve bu kompleks başlatıcı kaspazlardan kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar. Aktive olan kaspaz-9 ise yürütücü kaspazlar olan kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi aktive ederek apoptozu başlatır (68, 69).

Ekstrinsik yolak, hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin (örneğin Fas ve TNFR1) özgül ligandlarıyla etkileşime girmesiyle başlar. Bu etkileşim, hücre içi adaptör proteinleri olan Fas ile ilişkili ölüm domaini (FADD) ve TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini (TRADD) aracılığıyla başlatıcı kaspazlardan kaspaz-8'in

aktivasyonuna yol açar. Aktive olan kaspaz-8, yürütücü kaspazlardan özellikle kaspaz-3'ü aktive ederek apoptoz sürecini başlatır. Ayrıca, kaspaz-8 tarafından parçalanan BH3 etkileşimli domain ölüm agonisti (BID), mitokondriyal yolu aktive ederek intrinsik ve ekstrinsik yolaklar arasında bir köprü oluşmasına aracılık eder. İkinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü (SMAC) ise apoptoz inhibitör proteinlerini (IAP) baskılayarak kaspaz aktivitesinin devamlılığını sağlar (67).

2.5.2. Kaspaz-3

Kaspaz-3, apoptoz sürecindeki en kritik yürütücü enzimlerden biri olarak kabul edilir ve başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, kaspaz-9) tarafından aktive edilir. Bu enzim, DNA parçalanmasında görev alan kaspazla aktive olan DNaz'ı (CAD) hedef alır. Proliferatif hücrelerde CAD, kaspaz ile aktive edilen DNaz inhibitörü (ICAD) ile kompleks oluşturarak inaktif hâlde bulunur. Apoptotik sinyalin ardından aktive olan kaspaz-3, ICAD'yi parçalayarak CAD'nin serbest kalmasını sağlar. Serbestleşen CAD, apoptozun karakteristik biyokimyasal bulgularından biri olan oligonükleozomal DNA fragmantasyonunu gerçekleştirir (70). Ayrıca kaspaz-3, hücre iskeleti ve nükleer yapı proteinlerini hedef alarak hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi karakteristik morfolojik değişikliklerin gelişimine aracılık eder (71).

Kaspaz-3 aktivasyonu, apoptoz sürecinde geri dönüşü olmayan kritik bir aşamayı temsil eder. Bu nedenle apoptozun en sık kullanılan biyobelirteçlerinden biridir. Kaspaz-3 düzeyleri, immünohistokimya, Western blot gibi yöntemlerle belirlenebilmektedir. (65).

2.5.3. BCL-2 ve BAX Proteinleri

Apoptoz sürecinin başlatılmasında ve düzenlenmesinde rol oynayan temel denge unsurlarından biri BCL-2 protein ailesidir. Bu protein ailesi, özellikle hücre ölümünün intrinsik yolağının kontrolünde kritik işlevler üstlenir. BCL-2 ailesi üyeleri, antiapoptotik (BCL-2, BCL-XL) ve proapoptotik (BAX, BAK) proteinler olarak iki ana gruba ayrılır. Bu iki grup arasındaki denge, mitokondriyal zar geçirgenliğinin düzenlenmesinde ve buna bağlı olarak sitokrom c salınımının

kontrolünde belirleyici rol oynar. Anti-apoptotik bir protein olan BCL-2, mitokondri dış zarında lokalize olarak zar bütünlüğünü korur ve sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımını engeller; böylece intrinsik yolağın başlatılmasını önler. Buna karşılık BAX'ın baskınlığı mitokondriyal geçirgenliği artırarak apoptozun başlatılmasını kolaylaştırır. Bu moleküler denge kanser, iskemik hasar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojik süreçte kritik öneme sahiptir (68, 69).

2.6. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α)

Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α), bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde kritik rol oynayan güçlü bir proinflamatuar sitokindir. Karaciğer dokusunda TNF-α'nın TNF-R1 reseptörü aracılığıyla aktive ettiği sinyal yolları, hepatositlerde apoptoz ve nekroz gelişimini tetikleyerek ilaca bağlı karaciğer hasarına katkıda bulunur. Bu süreçte mitokondriyal disfonksiyon, ROS artışı ve inflamatuar hücrelerin aktivasyonu yer alır. Tümör nekroz faktörü alfanın (TNF-α) bu etkileri, ilaca bağlı karaciğer hasarının patogenezinde merkezi bir rol oynamaktadır (72, 73).

2.7. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta-1 (TGF-β1)

Transforme edici büyüme faktörü beta-1 (TGF-β1) hücre büyümesi, hücre farklılaşması, apoptoz ve doku onarımı gibi çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan çok işlevli bir sitokindir. Karaciğer dokusunda TGF-β1, fibrogenez sürecinin başlıca düzenleyicisi olarak görev yapar.

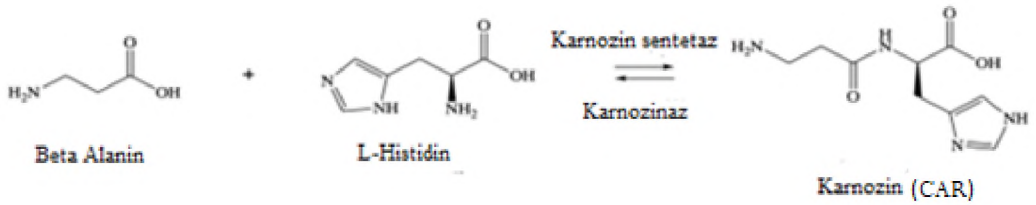
Her ne kadar TGF-β1 antiinflamatuar özelliklere sahip olsa da kronik doku hasarı durumlarında aşırı aktivasyonu, anormal doku yeniden yapılanmasına (remodeling) ve kalıcı skar oluşumuna yol açarak fibrotik sürecin ilerlemesine neden olabilir (27).

2.8. Karnozin (CAR)

Karnozin, β-alanin ve L-histidin amino asitlerinden oluşan endojen bir dipeptittir (74). İlk olarak 1900 yılında Gulewitsch ve Amiradžibi tarafından keşfedilmiştir (75).

2.8.1. Karnozinin Kimyasal Yapısı ve Metabolizması

Karnozin metabolizmasında karnozin sentetaz (CARNS1) ve karnozinaz enzimleri (CN1 ve CN2) görev alır (76). Şekil 2.7'de CAR sentezi ve yıkımı şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Karnozin Sentezi ve Yıkımı

(77) nolu kaynaktan revize edilmiştir.

Karnozin, ince bağırsak mukozasında bulunan karnozinaz-2 (CN2) enzimi tarafından hızla parçalanır (78). Sistemik dolaşımda ise CAR, plazmada bulunan karnozinaz-1 (CN1) enzimi tarafından hızla hidrolize edilmektedir. Plazma yarılanma ömrü insanda yaklaşık 1–2 dakikadır (79).

2.8.2. Karnozinin Doku Dağılımı

Karnozin ilk olarak iskelet kasında tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar bu dipeptidin yalnızca iskelet kasında değil beyin, kalp kası, pankreas, böbrek, dalak ve serebral korteks gibi çeşitli dokularda da bulunduğunu ortaya koymuştur (80, 81).

2.8.3. Karnozinin Antioksidan Özellikleri

2.8.3.1. Doğrudan Antioksidan Etki

Karnozin, yapısında bulunan imidazol halkası sayesinde hidroksil radikali (OH•), süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$) ve hipokloröz asit (HOCl) gibi ROS'ları doğrudan nötralize ederek hücresel hasarı azaltabilir (82); ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2) ile

etkileşimi sonucunda oluşan okside formu olan 2-oksokarnozinin güçlü bir antioksidan etki gösterdiği deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur (83, 84).

2.8.3.2. Metal İyon Şelasyonu

Karnozin, Fe^{2+} ve Cu^{2+} gibi geçiş metallerini şelatlayarak bu metallerin ROS üretmesini engeller (85).

2.8.3.3. Reaktif Karbonil Türlerinin (RCS) Detoksifikasyonu

Karnozin, lipid peroksidasyonu ve glikasyon süreçlerinde ortaya çıkan toksik aldehit ve keton bileşiklerini (reaktif karbonil türleri) nötralize eder. Böylece bu maddelerin neden olduğu ileri glikasyon (AGE) ve lipoksidasyon (ALE) ürünlerinin oluşumu engellenerek hücresel hasar azaltılır (86).

2.8.3.4. NRF2 Yolağının Aktivasyonu

Karnozinin, fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) / protein kinaz B (AKT) sinyal yolu üzerinden NRF2'yi aktive ederek hücresel antioksidan savunmayı güçlendirdiği ortaya konmuştur. Bu aktivasyon sonucunda, HO-1 başta olmak üzere çeşitli antioksidan savunma enzimlerinin ekspresyonu artmakta ve böylece hücre oksidatif stres koşullarında korunmaktadır (87).

2.8.4. Karnozinin Antiinflamatuar Özellikleri

Karnozin, nükleer faktör kappa B (NF-κB) sinyal yolunu inhibe ederek inflamatuar yanıtı azaltır (82).

İnterlökin-6 (IL-6) ve IL-1β gibi proinflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu azaltarak inflamatuar süreci düzenler (88).

Bunlara ek olarak CAR, merkezi sinir sisteminde astrositlerin aktivasyonunu baskılar ve inflamatuar sitokin üretimini azaltarak nöroinflamasyonun hafifletilmesine katkı sağlar (89).

2.8.5. Karnozinin Antiapopitotik Özellikleri

Karnozin, oksidatif stresi ve mitokondriyal disfonksiyonu azaltarak BAX/BCL-2 oranını düşürmektedir. Bu değişim, kaspaz-3 aktivasyonunun dolaylı olarak baskılanmasına katkıda bulunmakta ve sonuç olarak hepatositlerde apoptozun azalmasına yol açmaktadır (90).

Ayrıca CAR, merkezi sinir sisteminde ekstrasellüler glutamat düzeylerini azaltırken, inhibitör bir nörotransmitter olan gama-aminobütirik asitin (GABA) salınımını arttırır. Nörotransmitter dengesi üzerinde sağladığı bu düzenleyici etki sayesinde nöroprotektif ve antiapoptotik bir rol üstlenir (91).

2.8.6. Karnozinin Dozları, Uygulama Şekli

Preklinik çalışmalarda CAR, sıklıkla fare ve sıçan gibi hayvan modellerinde intraperitoneal (i.p.) yolla uygulanmaktadır. Deneysel karaciğer hasarı modellerinde kullanılan CAR dozları genellikle 100–250 mg/kg aralığında olup, bu dozların hem antioksidan hem de antiinflamatuar etkiler gösterdiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (92, 93).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından TTU-2024-9523 proje numarasıyla desteklenmiştir. Deneysel uygulamalar, SDÜ Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı ile Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı iş birliğiyle yürütülmüştür.

Çalışma protokolü, SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından 05.09.2024 tarihli ve 327 sayılı karar ile onaylanmış olup, deneyler etik kurallara uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, Wistar Albino cinsi toplam 32 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Deneye başlanmadan önce tüm hayvanların sağlık kontrolleri yapılmış ve canlı ağırlıkları ölçülmüştür. Deney süresince sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde, 22±2°C sıcaklıkta, yeterli miktarda standart yem ve suya erişim sağlayacak şekilde barındırılmıştır. Hayvanların vücut ağırlıkları haftalık olarak izlenmiştir.

Çalışmada kullanılan sıçanlar genç erişkin döneminde olup 10–12 haftalık ve 200–300 gram ağırlığındaydı. Kontrol (K, n=8), Metotreksat (MTX, n=8), Metotreksat+Karnozin (MTX+CAR, n=8) ve Karnozin (CAR, n=8), olacak şekilde rastgele dört gruba ayrılmışlardır. Her grup ayrı bir kafeste olacak şekilde toplam da 4 kafes içerisinde tutulmuştur.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Soğutmalı santrifüj (Eppendorf 5415 R, Almanya)
2. Soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200 R, Türkiye)
3. Santrifüj (Hettich Rotanta 460, Almanya)

4. Mikro Santrifüj (Weightlab WN-CMv6000, Türkiye)

5. Derin dondurucu (-80°C) (Kirsch Bosch, Almanya)

6. Derin dondurucu (-80°C) ((New Brunswick Scientific – U535, ABD)

7. Buzdolabı (2-8°C) (Kirsch Bosch, Almanya)

8. Hassas terazi (Scaltec SPB 32, İsviçre)

9. Vorteks (Nüve NM 100, Türkiye)

10. Vorteks (VELP Scientifica, İtalya)

11. Otomatik pipet (Eppendorf, Almanya)

12. Otomatik pipet (Gilson, Fransa)

13. pH metre (Hanna Instruments, Portekiz)

14. Manyetik karıştırıcı (Nüve MK 481, Türkiye)

15. Biyokimya analizörü (Beckman Coulter AU5800, ABD)

16. Homojenizatör (Janke & Kunkel Ultraturrax T-25 Basic Labortechnic, Almanya)

17. Ultrasonik homojenizatör (Bandelin SONOPULS HD2070, Almanya)

18. ELISA plate yıkayıcı (Biotek ELx 50, ABD)

19. ELISA okuyucu (Biotek ELx 800, ABD)

20. Spektrofotometre (UV-1601 Shimadzu, Japonya)

21. Etüv (Şimşek Laborteknik ET-055, Türkiye)

22. Distile su cihazı (Ekoloji EKO 100 PROF, Türkiye)

23. Jelli, pıhtı aktivatörlü, 5 ml hacimli kan alma tüpleri (Vacusera, Türkiye)

24. 15 ml hacimli idrar santrifüj tüpü (Isolab, Almanya)

25. 1,5 ml hacimli kilitli kapaklı tüp (Isolab, Almanya)

26. Ependorf tüpü (Isolab, Almanya)

27. NanoDrop 2000 cihazı (Thermo Scientific, Türkiye)

28. Gerçek zamanlı PCR cihazı (Biorad CFX, ABD)

29. Mikrospektrofotometre (ALLSHENG Nano-400a, Çin)

30. Etüv (MİKROLAB Mls, Türkiye)

31. cDNA Cihazı (BİONEER MyGenie 96 Thermal Block, Güney Kore)

32. Termal döngü cihazı (Thermo Scientific, ABD)

33. Işık mikroskobu (Olympus CX21, Japonya)

34. Dijital kamera (Olympus DP26, Japonya)

35. Entellan (Merck, Almanya)

36. Doku takip cihazı (Leica ASP300S, Almanya)

37. Doku Gömme Ünitesi (Leica Histocore, Almanya)

38. Mikrotom (Leica 2155, Almanya)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Karnozin (Sigma-Aldrich, ABD)

2. Metotreksat (Koçak Farma, Türkiye)

3. Fosfat buffer salin tablet (pH 7,4; P4417) (Sigma Aldrich, ABD)

4. Ketamin hidroklorür %10 (Ketasol, 100 mg/ml) (Richter Pharma, Avusturya)

5. Ksilazin hidroklorür %2 (Rompun, enjeksiyonluk çözelti) (Bayer, Almanya)

6. Formaldehit %10 (tamponlu, pH :6,9-7,1) (Tekkim, Türkiye)

3.1.4. Kullanılan Reaktif ve Kitler

1. Rat TNF-α ELISA kiti (Cusabio, Katalog no: CSB-E11987r, Çin)

2. Rat TGF- β1 ELISA kiti (Elabscience, Katalog no: E-El-R0084, Çin)

3. Total Antioksidan Status (TAS) kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye)

4. Total Oksidan Status (TOS) kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye)

5. A.B.T.™ SYBR Green Master Mix (Atlas Biotechnology, Türkiye)

6. cDNA Sentez Kiti (Nucleogene, Türkiye)

7. Tri Reagent (Nucleogene, Türkiye)

8. Urinary/CSF Protein kiti (Beckman Coulter, REF No: OSR6170)

9. AST reaktifi (Beckman Coulter, REF No: OSR6209)

10. ALT reaktifi (Beckman Coulter, REF No: OSR6107)

11. AST, ALT ve Urinary/CSF Protein testleri için kullanılan kalibratörler ve kontrol solüsyonları (Beckman Coulter, System Calibrator, Urine/CSF Protein Calibrator, System Control 1, Control 2)

12. RNA izolasyon kiti (GeneALL Ribospin, Kore)

13. RiboExT^{M} solüsyonu (GeneAll, Seul/Kore)

14. Hematoksilen ve Eozin Solüsyonları (Merck, Almanya)

15. Kaspaz-3 antikoru (Abcam ab184787, İngiltere)

16. İmmünohistokimya (IHK/IHC) boyama kiti (EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (ab80436), İngiltere)

17. 3,3-diaminobenzidin (DAB) (Abcam, İngiltere)

18. %3 lük H_2O_2 (Merck, Almanya)

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler

Fosfat tamponu: Sigma-Aldrich firmasına ait fosfat buffer salin tablet (pH 7,4; ürün Kodu: P4417) kullanılarak hazırlanmıştır. Bir tablet 200 ml distile su içerisinde çözdürülerek çözelti elde edilmiştir. Çalışma süresince kullanılmak üzere toplam 1000 ml PBS hazırlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Prosedürü

1. Kontrol Grubu (K, n=8): 24 gün boyunca her gün CAR uygulanan grupla aynı miktarda (yaklaşık 0,5-1 mL) serum fizyolojik (SF) i.p. olarak uygulanmıştır.

2. Metotreksat Grubu (MTX, n=8): 21. günde tek doz 20 mg/kg MTX i.p. (7) olarak uygulanmıştır.

3. Metotreksat+Karnozin Grubu (MTX+CAR, n=8): 21. günde tek doz 20 mg/kg MTX i.p. olarak uygulanmış; ek olarak 24 gün boyunca 100 mg/kg/gün dozunda CAR i.p. olarak uygulanmıştır.

4. Karnozin Grubu (CAR, n=8): 24 gün boyunca 100 mg/kg/gün dozunda CAR i.p. (93) olarak uygulanmıştır.



Resim 3.1. Metotreksat ve Karnozinin İntraperitoneal Uygulaması

Tüm gruplardaki sıçanlara son ilaç uygulamasından 24 saat sonra 80–90 mg/kg ketamin ve 8–10 mg/kg ksilazin i.p. olarak uygulanarak derin anestezi sağlanmış, ardından abdominal insizyon yapılmış ve cerrahi egsanguinasyon yöntemi ile hayvanlar sakrifiye edilmiştir.



Resim 3.2. Anestezik Madde Uygulaması



Resim 3.3. Sıçanlardan Kan Alınması



Resim 3.4. Göğüs Kafesin Açılması



Resim 3.5. Sıçan Karaciğeri

3.2.2. Serum Numunelerinin Elde Edilmesi

Jelli, pıhtı aktivatörlü, 5 ml hacimli tüplere (Vacusera, Türkiye) alınan kan örnekleri pıhtı oluşumu için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Ardından 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrılmıştır. Elde edilen serum örnekleri, AST ve ALT düzeylerinin belirlenmesi amacıyla biyokimya otoanalizöründe analiz edilmiştir.

3.2.3. Karaciğer Dokusunun Porsiyonlanması

Sıçanlara ait karaciğer dokuları histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için %10'luk nötral formalin içerisine, biyokimyasal analizler için fosfat tamponuna, genetik analizler için ise steril Eppendorf tüplerine alınmıştır. Formalin içerisine alınan doku örnekleri histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemelerde kullanılırken; genetik ve biyokimyasal analizler için ayrılan tüm doku örnekleri analiz gününe kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.4. Serum Numunelerinin Biyokimyasal Analizi

3.2.4.1. AST Ölçüm Yöntemi

Aspartat aminotransferaz (AST) aktivitesi, IFCC tarafından önerilen yöntemin modifiye edilmiş bir versiyonu kullanılarak Beckman Coulter AU5800 otoanalizöründe belirlenmiştir. Bu yöntemde AST, L-aspartat'taki amino grubunu α-oksoglutarata transfer ederek transaminasyon reaksiyonunu katalize eder. Bu reaksiyon sonucunda L-glutamat ve oksaloasetat oluşur. Oluşan oksaloasetat malat dehidrogenaz enzimi aracılığıyla L-malata indirgenirken eşzamanlı olarak NADH NAD^+'a oksitlenir. NADH'ın tüketimine bağlı olarak 340 nm dalga boyunda ölçülen absorbans azalması örnekteki AST aktivitesi ile doğru orantılıdır.

3.2.4.2. ALT Ölçüm Yöntemi

Alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesi, IFCC tarafından önerilen yöntemin modifiye edilmiş bir versiyonu kullanılarak Beckman Coulter AU5800 otoanalizöründe belirlenmiştir. Bu yöntemde ALT, L-alanin'deki amino grubunu α-oksoglutarata transfer ederek transaminasyon reaksiyonunu katalize eder. Bu reaksiyon sonucunda glutamat ve pirüvat oluşur. Oluşan pirüvat, laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi aracılığıyla laktata indirgenirken eşzamanlı olarak NADH NAD^+'a oksitlenir. NADH'ın tüketimine bağlı olarak 340 nm dalga boyunda ölçülen absorbans azalması örnekteki ALT aktivitesi ile doğru orantılıdır.

3.2.5. Sıçan Karaciğer Dokularının Biyokimyasal Analizleri

Karaciğer dokuları hassas terazi ile tartıldıktan sonra, her 1 birim dokuya 9 birim fosfat tamponu eklenerek doku süspansiyonu hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyonlar, homojenizatör ve sonikatör kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenatlar, porsiyonlara ayrılarak 10.000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar, biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere ayrılmıştır. Biyokimyasal parametreler (TOS, TAS) ve enzimle ilişkili immünosorbent analizi (ELISA) yöntemiyle ölçülen sitokin düzeylerinin (TNF-α, TGF-β1) karşılaştırılabilir ve standardize edilebilir olması amacıyla doku homojenatlarının protein içerikleri, üriner protein kiti kullanılarak ölçülmüş ve ölçüm sonuçları protein miktarına normalize edilmiştir.

3.2.5.1. Doku Protein İçeriğinin Belirlenmesi (Üriner Protein Kiti ile)

Karaciğer doku homojenatlarının toplam protein düzeyi, Beckman Coulter AU5800 otoanalizöründe çalışılan üriner protein kiti kullanılarak piragallol kırmızısı–molibdat boya bağlama prensibine dayanan yöntemle belirlenmiştir. Bu yöntemde piragallol kırmızısının proteinlerle etkileşmesi sonucu 600 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösteren mavi-mor renkli bir kompleks oluşur. Oluşan bu kompleksin absorbans değeri, örnekteki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

3.2.5.2. TNF-α Ölçüm Yöntemi

Karaciğer dokusu süpernatantlarındaki TNF-α düzeyleri, ticari olarak temin edilen ELISA kiti ile kantitatif olarak belirlenmiştir (Rat TNF-α ELISA Kit, Katalog No: CSB-E11987r, Wuhan, Çin). Kitin ölçüm aralığı 6,25–400 pg/ml, duyarlılığı ise 1,56 pg/ml olarak bildirilmiştir. Tüm analiz süreci üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde yürütülmüştür.

Kite ait 400 pg/ml konsantrasyonundaki standart çözelti, standart dilüent kullanılarak sırasıyla 200, 100, 50, 25, 12,5 ve 6,25 pg/ml olacak şekilde dilüe edilmiştir. Kör (blank) olarak standart dilüent (0 pg/ml) kullanılmıştır. Tüm standart çözeltiler çift örnek (duplike) hâlinde çalışılmıştır.

Sıçan karaciğer dokusu süpernatantları, kit prosedürüne uygun olarak 1:200 oranında dilüe edilmiştir. Analiz sonunda standartlara ve numunelere ait optik dansite (OD) değerleri elde edilmiş, standartlara ait OD değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve bu eğri yardımıyla doku süpernatantlarındaki TNF-α konsantrasyonları hesaplanmıştır.

Elde edilen değerler, uygulanan dilüsyon faktörü (×200) ile çarpılarak düzeltilmiş; sonuçlar doku protein miktarına oranlanarak ng/g protein birimiyle ifade edilmiştir.

3.2.5.3. TGF- β1 Ölçüm Yöntemi

Karaciğer dokusu süpernatantlarında TGF-β1 düzeyleri, ticari olarak temin edilen ELISA kiti ile kantitatif olarak belirlenmiştir (Rat TGF-β1 ELISA Kit, Katalog No: E-EL-R0084, Wuhan, Çin). Kitin ölçüm aralığı 31,25–2000 pg/ml, duyarlılığı ise 18,75 pg/ml olarak bildirilmiştir. Tüm analiz süreci üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde yürütülmüştür.

Kite ait 2000 pg/ml konsantrasyonundaki standart çözelti, standart dilüent kullanılarak sırasıyla 1000, 500, 250, 125, 62,5 ve 31,25 pg/ml olacak şekilde dilüe edilmiştir. Kör (blank) olarak standart dilüent (0 pg/ml) kullanılmıştır. Tüm standart çözeltiler çift örnek (duplike) hâlinde çalışılmıştır.

Sıçan karaciğer dokusu süpernatantları, herhangi bir seyreltme yapılmaksızın doğrudan analiz edilmiştir. Analiz sonunda standartlara ve numunelere ait optik dansite (OD) değerleri elde edilmiş, standartlara ait OD değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve bu eğri yardımıyla doku örneklerinin TGF-β1 konsantrasyonları hesaplanmıştır. Sonuçlar doku protein miktarına oranlanarak ng/g protein birimiyle ifade edilmiştir.

3.2.5.4. Total Oksidan Durum (TOS) ve Total Antioksidan Durum (TAS) Ölçüm Yöntemi

Karaciğer doku süpernatantlarında TOS ve TAS düzeyleri, Rel Assay Diagnostics'e ait ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Rel Assay Diagnostics, Türkiye). Kitlerin Beckman Coulter AU5800 otoanalizörüne

aplikasyonu yapılmış olup ölçüm sonuçları doku protein miktarlarına göre normalize edilerek sunulmuştur.

3.2.5.4.1. TOS Ölçüm Yöntemi:

Numune içerisindeki oksidan maddeler, kitte bulunan ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyon haline okside etmiştir. Oluşan ferrik iyonlar asidik ortamda kromojen ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks meydana getirmiştir. Bu kompleksin renk yoğunluğu, numunedeki toplam oksidan madde miktarıyla doğru orantılı olup, spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve böylece TOS değeri belirlenmiştir. Yöntemin kalibrasyonu hidrojen peroksit kullanılarak gerçekleştirilmiştir (94).

3.2.5.4.2. TAS Ölçüm Yöntemi:

Numune içerisindeki antioksidan maddeler, kitte bulunan koyu mavi-yeşil renkli 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit] (ABTS) radikal solüsyonunu renksiz forma indirgemiştir. Bu indirgenme sonucunda meydana gelen absorbans değişimi 660 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değişimi, numunedeki TAS miktarı ile doğru orantılıdır. Yöntemin kalibrasyonu, E vitamini analoğu olan Trolox standardı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (95).

3.2.5.4.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSI):

Elde edilen TOS (μmol H_2O_2/g protein) ve TAS (mmol Trolox Eq/g protein) değerleri kullanılarak oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanmıştır. OSI, TOS değerinin TAS değerine oranının yüzde cinsinden ifade edilmesiyle belirlenmiştir. Hesaplama aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır:

$$OSI\ (\%) = (TOS / TAS) \times 100 \quad (96)$$

3.2.6. Genetik Analizler (Karaciğer Dokusu BCL-2, BAX, NRF2/HO-1 Ekspresyon Düzeylerinin Tayini)

3.2.6.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.2.6.1.1. RNA İzolasyonu

Elde edilen karaciğer doku örnekleri DNaz/RNaz ve pirojen içermeyen, önceden etiketlenmiş eppendorf tüplerine alınarak analiz gününe kadar -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Çalışma gününde oda ısısına getirilen doku örnekleri üzerine 1000 µl Geneall RiboExT^{M} solüsyonu (Seul/Kore) eklenmiş ve sonikatör kullanılarak düşük hızda homojenize edilmiştir. RNA izolasyonu GeneAll Ribospin RNA izolasyon kiti (Seul/Kore) ile aşağıdaki protokole uygun olarak yapılmıştır.

1. Homojenize edilen örnekler oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiş ve üzerine 200 µl kloroform ilave edilerek 15 saniye boyunca vortekslenmiştir.

2. Süpernatantın üzerine 1:1 oranında % 70'lik etanol eklenmiş ve pipetle karıştırılmıştır.

3. Karışım 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek üç faz oluşumu sağlanmıştır:

-Alt faz (Renkli)

-Orta faz (İnce Beyaz Opak)

-Üst faz (Renksiz Şeffaf)

4. Yaklaşık 450 µl'lik üst şeffaf faz dikkatlice alınarak EzPure Filtresine (Sarı Renkli) aktarılmış ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

5. Filtrasyon sonrası elde edilen lizat+RBI karışımı, mavi renkli Type W spin kolona aktarılmıştır.

6. 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilerek sıvı uzaklaştırılmıştır.

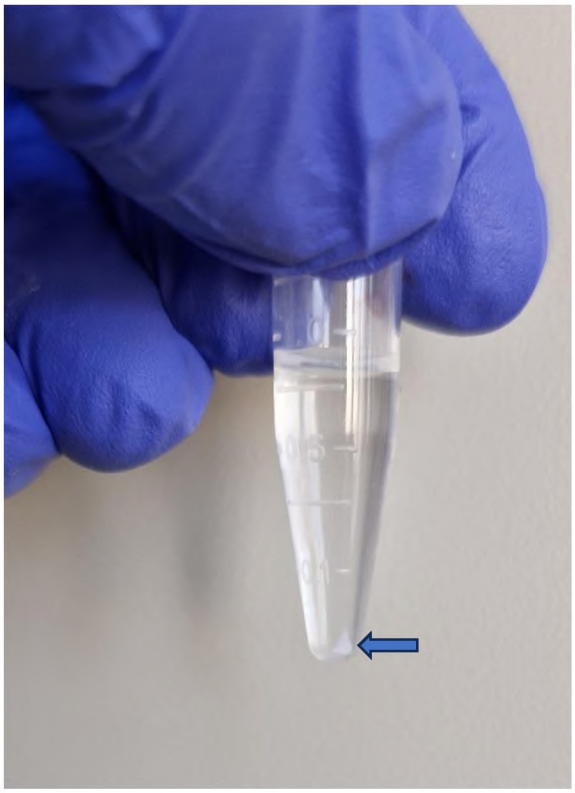
7. Kolon üzerine 500 µl RBW çözeltisi eklenmiş ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilerek geçiş sıvısı atılmıştır.

8. Ardından kolon üzerine 500 µl RBN çözeltisi eklenmiş ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

9. Kolonda kalan alkolün uzaklaşması amacıyla 11.000 g'de 3 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır.

10. Spin kolon yeni bir 1,5 ml'lik DNaz/RNaz ve pirojen içermeyen eppendorf tüpe aktarılmış ve üzerine 30 µl RNAase-free su eklenmiştir.

11. Kolon 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilerek RNA örnekleri elde edilmiştir.



Resim 3.6. RNA İzolasyon Çalışması (Ok İşareti RNA Peletini Göstermektedir)

Elde edilen RNA örneklerinin cDNA sentezinde kullanılmak üzere nanodrop cihazı ile miktar ve saflık tayini yapılmıştır. 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen ölçümlerin birbirine oranı (260 nm/280 nm) RNA saflığını göstermektedir. Saflığı 1,8-2,0 arasında olan RNA numunelerinin miktar tayinleri cDNA sentezinde kullanılmak üzere not edilmiş, saflığı bu oranlar dışında olan örneklerin RNA'ları tekrar izole edilmiştir. İzole edilen her bir RNA örneğinin konsantrasyonu 1000

ng/µl'de standardize edilmiş ve cDNA sentez aşamasında kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.6.1.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, A.B.T.™ cDNA Sentez Kit (Atlas Biyoteknoloji, Türkiye) protokolüne göre termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. Her örnek için total reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde 0,2 ml'lik PCR tüplerine buz üzerinde aşağıdaki konsantrasyonlarda karışım hazırlanmıştır. Tablo 3.1'de 20 µl revers transkriptaz reaksiyon karışımı gösterilmiştir.

Tablo 3.1. 20 µl revers transkriptaz reaksiyon karışımı

10X reaksiyon tamponu	2 µl
dNTP karşımı (2.5 mM)	1 µl
Random hekzamer (50 µM)	2 µl
Revers Transkriptaz (200 U/µl)	1 µl
RNaz inhinitör	0.5 µl
RNaz içermeyen su	3.5 µl
RNA örneği	10 µl

Hazırlanan karışım termal döngü cihazına (Thermo Scientific, ABD) yerleştirilmiş ve aşağıdaki kit protokolü kullanılmıştır. Tablo 3.2'de Revers transkriptaz termal döngü protokolü gösterilmiştir. Elde edilen cDNA'lar -20 °C buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.2. Revers Transkriptaz Termal Döngü Protokolü

RT basamakları	Sıcaklık °C	Süre	Siklus
1. Basamak	25	10 dak	1
2. Basamak	37	120 dak	1
3. Basamak	85	5 dak	1
4. Basamak	4	∞	1

3.2.6.1.3. Primer tasarımı ve hazırlanması

Primer tasarımları, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) internet sitesi kullanılarak spesifik mRNA dizilimlerinin saptanması ve olası primer dizilimlerinin denenmesi ile yapılmıştır. Ekspresyon aşamasında kullanılan genler ve spesifik primer dizilimleri Tablo 3.3.'te verilmiştir.

Dizaynı yapılan primerler ticari olarak sentezlettirilmiş, liyofilize olarak temin edilmiş, DNaz/RNaz ve pirojen içermeyen, ticari olarak satılan hazır steril su ile stok 100 µM olacak şekilde sulandırılmıştır. Daha sonra stok primer solüsyonu kantitatif gerçek zamanlı PCR prosedüründe kit üreticisi firmanın talimatlarına göre son hacimde 500 nM olacak şekilde tekrar sulandırılmıştır.

Tablo 3.3. Genler ve Genlere Ait Spesifik Primer Dizilimleri

Gen	Spesifik Primer Dizilimi Forward (F)-Revers (R)	Ürün Uzunluğu	Erişim Nosu
NRF2	F: GCCTTCCTCTGCTGCCATTAGTC	126 bp	NM_001399173.1
	R: TCATTGAACTCCACCGTGCCTTC		
HO-1	F: AGCCTGGTTCAAGATACTACCTC	240 bp	XM_039097470.1
	R: AGGCCCAAGAAAAGAGAGCC		
BCL-2	F: CATCTCATGCCAAGGGGGAA	284 bp	NM_016993.2
	R: TATCCCACTCGTAGCCCCTC		
BAX	F. CACGTCTGCGGGGAGTCAC	419 bp	NM_017059.2
	R: TAGAAAAGGGCAACCACCCG		
GAPDH (HouseKeeping)	F: AGTGCCAGCCTCGTCTCATA	248 bp	NM_017008.4
	R: GATGGTGATGGGTTTCCCGT		

3.2.6.1.4. Ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi

Ekspresyon seviyeleri A.B.T.™ cDNA Synthesis Kit with RNase (Atlas Biyoteknoloji, Türkiye) kitleri kullanılarak Biorad CFX96 (California/USA) gerçek zamanlı PCR cihazında ölçülmüştür. cDNA sentezi yapılan örnekler çalışmadan 10 dakika önce +4°C'deki blok üzerine alınarak bir süre bekletilmiştir. Çalışmada GAPDH geni housekeeping gen olarak kullanılmış ve normalizasyon için bu genin Ct değerleri kullanılmıştır. Cihazda 0,1 ml'lik PCR tüpleri kullanılmış, reaksiyonun son hacmi 20 µl olarak ayarlanmıştır. Reaksiyon karışımı üretici protokolüne göre

aşağıdaki gibi hazırlanmıştır. Tablo 3.4.'te PCR reaksiyon karışımı gösterilmiştir. Reaksiyonun cihaza yüklemeden başlamasını engellemek için prosedür buz üzerinde sürdürülmüştür.

Tablo 3.4. PCR Reaksiyon Karışımı

	Hacim	**Final konsantrasyon**
A.B.T.™ 2X qPCR SYBR- Green MasterMix (without ROX)	10 µl	1X
Forward Primer (10 µM)	1 µl	1 µM
Reverse Primer (10 µM)	1 µl	1 µM
cDNA	2 µl	2 µl
DNaz/RNaz içermeyen su	6 µl	6 µl

Elde edilen reaksiyon karışımı kit üreticisinin protokolüne göre belirlenen termal döngü ile gerçek zamanlı qPCR cihazına yerleştirilmiş ve her bir örnek üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Tablo 3.5.'te gerçek zamanlı PCR döngüsü gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Gerçek Zamanlı PCR Döngüsü

PCR basamakları	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Siklus**
Başlangıç denaturasyonu	95	300 sn	1
Denaturasyon	95	15 sn	40
Primer bağlanması /Uzama	60-65	30 sn	
Melt-Curve Analizi	65-95	2-5 sn/basamak	1

Elde edilen Ct değerleri ekspresyon seviyesinin değerlendirilmesi için her bir örnek ve grup için ayrı ayrı not edilmiştir. Normalize edilen örneklerin verilerine $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü uygulanmış ve elde edilen ham veriler kullanılacak olan istatistik çalışmasına uygun hale getirilmiştir.

3.2.7. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler

3.2.7.1. Histopatolojik Analizler

Nekropsi sırasında sıçanların karaciğerleri makroskobik olarak incelenmiştir. Alınan doku örnekleri % 10'luk nötr tamponlu formaldehit solüsyonuna yerleştirilerek fiksasyon amacıyla 48 saat boyunca bekletilmiştir.

Fiksasyon işlemi tamamlanan karaciğer örnekleri ertesi gün uygun şekilde kesilerek (trimleme) doku takip kasetlerine yerleştirilmiştir. Kasetler, tam otomatik bir doku takip cihazına (Leica ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) yerleştirilmiştir ve cihazın gece programında vakumlu program seçilerek cihaz içinde solüsyonların dokuya etkin şekilde nüfuz etmesi sağlanmıştır. Takip işlemi sırasında

örnekler artan konsantrasyonlarda (% 70'ten % 100'e kadar) etanol serilerinden geçirilerek dehidratasyon sağlanmıştır. Ardından dokulardaki lipitlerin uzaklaştırılması için iki kez ksilolden geçirilmiştir ve sıcak parafin banyolarında işlem görerek parafin infiltrasyonu gerçekleştirilmiştir.

Ertesi sabah cihazdan çıkarılan örnekler, sıcak parafinle bloklanmak üzere bir doku gömme ünitesine (Leica Histocore Arcadia H; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) aktarılmıştır. Karaciğer dokuları düzgün bir şekilde metal gömme kalıplarına yerleştirilmiştir ve parafinle sabitlenerek bloklar oluşturulmuştur. Oluşan bloklar soğutma platformuna alınarak yaklaşık bir saat bekletilmiştir ve tam olarak donmaları sağlanmıştır. Donan bloklar, metal kalıplardan ayrılarak kesit alma işlemine kadar uygun koşullarda buzdolabında saklanmıştır.

Her bir parafin bloktan, histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme için otomatik rotary mikrotom (Leica 2155; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) yardımıyla 4–5 µm kalınlığında seri kesitler hazırlanmıştır. Kesitlerin biri rutin hematoksilen-eozin (HE), diğeri kaspaz-3 immünohistokimyasal ekspresyonunun değerlendirilmesi için lamlar üzerine yerleştirilmiştir. Lamlar bir gece oda sıcaklığında bekletilerek kesitlerin iyice yapışması sağlanmıştır.

Ertesi gün HE boyama için ayrılan kesitler, boyama köprülerine yerleştirilmeden önce 60°C'deki etüvde 1,5 saat bekletilerek parafinin erimesi sağlanmıştır. Daha sonra boyama işlemi öncesinde parafinin tamamen uzaklaştırılması için kesitler sırasıyla üç kez 30 dakika boyunca ksilolden geçirilmiştir. Rehidrasyon amacıyla %100, %90 ve %80 etanol serilerinden geçirildikten sonra saf suya alınmıştır. Ardından kesitler 15 dakika Harris hematoksilen ve 3 dakika eozin solüsyonlarında boyanmıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra kesitler yeniden artan konsantrasyonlarda alkol serileriyle dehidrate edilmiştir ve ksilol ile şeffaflaştırılmıştır. Üzerlerine Entellan (Merck, Almanya) damlatılarak lamel kapatılmıştır. Hazırlanan lamlar bir gece oda sıcaklığında kurutularak mikroskobik incelemeye hazır hale getirilmiştir.

Tüm kesitler Olympus CX21 ışık mikroskobu ile incelenmiştir ve görüntüler Olympus DP26 model dijital kamera ile kaydedilerek bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Mikroskobik değişiklikler kör olarak değerlendirilmiştir. Her bir

karaciğer kesitinde gözlemlenen dejeneratif hücre sayısına göre puanlama yapılmıştır: Hiç dejeneratif hücre yoksa 0 puan; 1–3 hücre için 1 puan; 4–7 hücre için 2 puan; sekizden fazla dejeneratif hücre varlığında ise 3 puan verilmiştir. Her sıçana ait histopatolojik değişiklikler on farklı alanda değerlendirilerek puanlanmıştır. Morfometrik analizler ve mikrofotografi işlemleri, Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Co., Tokyo, Japan) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.2. İmmünohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal analizler için karaciğer doku örnekleri polilizinli lamlara alınarak, streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemine göre boyanmıştır. kaspaz-3 (Anti-Caspase-3 antibody [EPR18297], ab184787), (Abcam, Cambridge, İngiltere) antikoru ile immünohistokimyasal boyama yapılmıştır ve antikor 1:100 dilüsyon oranında kullanılmıştır. Boyama işlemi için sekonder kit olarak EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (ab80436) ve kromojen olarak 3,3-diaminobenzidine (DAB) (Abcam, UK) kullanılmıştır.

Boyama prosedürü, histopatolojik boyama yöntemlerinde verilen ayrıntılara göre yapılmıştır. İlk olarak kesitler üç ayrı ksilol serisinden geçirilerek deparafinize edilmiştir. Ardından dereceli alkol serileriyle rehidre edilmiştir. Sonrasında kesitler 10 dakika boyunca distile suyla yıkanmıştır. Boyama işleminin tüm aşamaları nemli kamaralarda gerçekleştirilmiştir.

İlk adım olarak endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla, kesitler %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi içinde 10 dakika bekletilmiştir. Bu aşamanın ardından kesitler 10 dakika süreyle tamponlu fosfat solüsyonu (PBS, pH 7,2) içinde iki kez yıkanmıştır. Ardından sitrat tampon solüsyonunda 2 defa 5'er dakika mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Non spesifik antijenik bağlanmaları engellemek için 20 dakika süreyle blokaj serumu ile inkübe edilmiştir.

Sonraki adımda fazla serum atılmıştır ve yıkama işlemi yapılmadan primer antikor kesitlere eklenmiştir. Primer antikor kesitler üzerinde bir gece boyunca +4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün kesitler aynı şekilde PBS ile yıkanmıştır. Bunun ardından kesitler 30 dakika boyunca streptavidin ile inkübe edilmiştir ve iki

kez PBS ile 10'ar dakika süreyle yıkanmıştır. Ardından kesitler 20 dakika boyunca biotinli serumla inkübe edilmiştir ve aynı prosedürle PBS kullanılarak yıkanmıştır.

Boyama işlemi yeni hazırlanmış 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) substratı ile 5-10 dakika inkübasyona bırakılarak tamamlanmıştır. Zemin boyaması için Harris hematoksilen kullanılmıştır. Son olarak kesitler artan alkol serileriyle dehidre edilip ksilol ile şeffaflaştırılmıştır. Entellan (Merck, Almanya) ile lamel kapatılmıştır ve ışık mikroskobu (Olympus CX41) ile incelenmiştir.

Negatif kontroller için primer antikorların yerine antikor sulandırma sıvıları kullanılarak aynı prosedürler tekrarlanmıştır. Mikrofotografi ve morfometrik analizler Database Manual CellSens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İmmunohistokimyasal boyanma şiddeti 0 ile 3 arasında semikantitatif olarak değerlendirilmiştir: 0 = negatif; 1 = hafif ekspresyon; 2 = orta ekspresyon; 3 = şiddetli ekspresyon.

İstatistiksel analizler gruplar arasındaki farkları değerlendirmek için yapılmıştır. İmmunohistokimyasal skorlamalar için ImageJ 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda MD) programı kullanılmıştır.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizleri IBM SPSS Statistics 30.0 (ABD) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Grafiksel gösterimler GraphPad Prism 8 (ABD) programı kullanılarak hazırlanmıştır.

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro–Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren değişkenler için varyans homojenliği Levene testi ile kontrol edilmiştir. Normal dağılım ve homojen varyans koşullarını karşılayan verilere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Tek yönlü varyans analizi sonucunda anlamlı farklılık saptanan durumlarda Tukey post-hoc testi ile çoklu karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir.

Normal dağılım göstermeyen ve/veya varyans homojenliği sağlamayan veriler Kruskal–Wallis testi ile analiz edilmiştir. Kruskal–Wallis testinde anlamlı

farklılık belirlenen değişkenlerde ikili karşılaştırmalar Dunn post-hoc testi ile yapılmış ve sonuçlara Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır.

Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Analizler

Serum AST ve ALT parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Serum AST ve ALT parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması

	Kontrol	**MTX**	**MTX+CAR**	**CAR**
AST(U/L)	87,17±7,87	103,35±12,08*	88,64±8,21†	85,78±10,90†
ALT (U/L)	48,57±8,97	62,69±11,78*	49,92±5,96†	46,30±7,29†

* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0,05$). † MTX grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0,05$). Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Serum AST ve ALT düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır (sırasıyla $p=0,005$ ve $p=0,004$).

Gruplar arası karşılaştırmalarda MTX grubunun AST düzeyleri kontrol ve CAR gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0,015$, $p=0,007$). Buna karşılık MTX+CAR grubunun AST düzeyleri MTX grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p=0,030$).

ALT düzeyleri açısından da benzer bir eğilim gözlenmiş, MTX grubunda kontrol ve CAR gruplarına kıyasla anlamlı artış izlenirken (sırasıyla $p=0,016$, $p=0,004$); MTX+CAR grubunda bu artış anlamlı şekilde baskılanmıştır ($p=0,033$).

Karaciğer dokusu TOS, TAS, OSI, TGF-β1 ve TNF-α parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Karaciğer dokusu TOS, TAS, OSI, TGF-β1 ve TNF-α parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması

	Kontrol	**MTX**	**MTX+CAR**	**CAR**
TOS **(µmol H_2O_2/g protein)**	1,67±0,29	2,14±0,28*	1,75±0,18†	1,58±0,34†
TAS **(mmol Trolox Eq/g protein)**	0,126±0,005	0,095±0,019*	0,113±0,009†	0,131±0,015†
OSI **(Arbitrary Unit)**	1,33±0,22	2,38±0,74*	1,55±0,13†	1,23±0,38†
TGF-β1 **(ng/g protein)**	33,07±5,58	30,97±9,72	26,84±11,08	36,27±13,30
TNF-α **(ng/g protein)**	2443(2330-3400)	6266(3510-7586)*	3269(2118-4539)†	3100(2429-3682)†

* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0,05$). † MTX grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0,05$). Değerler, normal dağılım gösteren parametreler için ortalama±standart sapma; normal dağılım göstermeyen TNF-α parametresi için medyan(25–75. persentil) olarak verilmiştir.

Karaciğer dokusu TOS, TAS, OSİ ve TNF-α düzeyleri açısından yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır (sırasıyla p=0,002, p=0,001, p=0,001, p=0,009).

Gruplar arası karşılaştırmalarda MTX grubunun TOS düzeyleri kontrol ve CAR gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuş (sırasıyla p=0,011, p=0,002), MTX+CAR grubunda ise TOS düzeyleri MTX grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır (p=0,043).

TAS düzeyleri değerlendirildiğinde, MTX grubunda kontrol ve CAR gruplarına kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuş (her iki karşılaştırma için

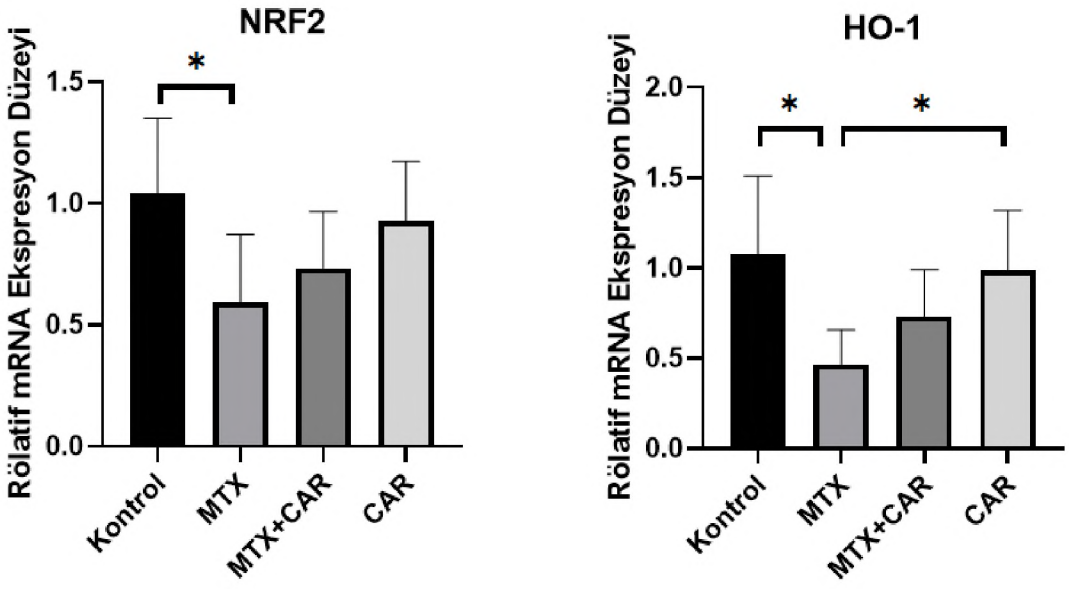
p=0,001), MTX+CAR grubunda ise TAS düzeyleri MTX grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (p=0,044).

OSİ değerleri incelendiğinde, MTX grubunda kontrol ve CAR gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş (her iki karşılaştırma için p=0,001), MTX+CAR grubunda ise OSİ düzeyleri MTX grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük saptanmıştır (p=0,003).

TGF-β1 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0,337). Buna karşılık, TNF-α düzeyleri MTX grubunda hem kontrol hem de CAR gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuş (sırasıyla p=0,002, p=0,012), MTX+CAR grubunda ise TNF-α düzeyleri MTX grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptanmıştır (p=0,014).

4.2. Genetik Analizler

Karaciğer dokusunda çalışılan NRF2, HO-1 rölatif mRNA ekspresyon düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması Grafik 4.1'de gösterilmiştir.



Grafik 4.1. Karaciğer dokusunda NRF2 ve HO-1 rölatif mRNA ekspresyon düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması

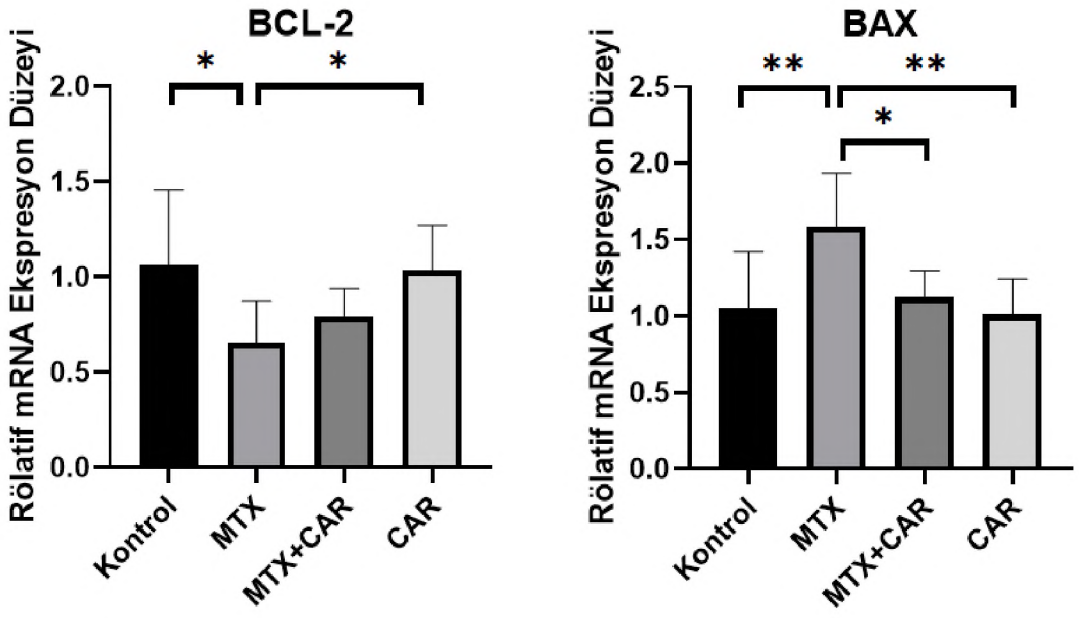
* p<0,05 olduğunu ifade etmektedir. Değerler ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir.

Karaciğer dokusunda NRF2 ve HO-1'e ait rölatif mRNA ekspresyon düzeylerinin istatistiksel analizinde her iki parametre için gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla p=0,012, p=0,001).

Yapılan gruplar arası karşılaştırmalarda, MTX grubunun NRF2 ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p=0,013). MTX+CAR grubunda NRF2 düzeyleri MTX grubuna göre daha yüksek saptanmış olmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,729).

HO-1 ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, MTX grubunda kontrol ve CAR gruplarına göre anlamlı şekilde daha düşük saptanmıştır (sırasıyla p=0,004, p=0,005). MTX+CAR grubunda ise HO-1 düzeyleri MTX grubuna kıyasla daha yüksek bulunmasına rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,373).

Karaciğer dokusunda çalışılan BCL-2 ve BAX rölatif mRNA ekspresyon düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması Grafik 4.2'de gösterilmiştir.



Grafik 4.2. Karaciğer dokusunda BCL-2 ve BAX rölatif mRNA ekspresyon düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması

* p<0,05, ** p<0,01 olduğunu ifade etmektedir. Değerler ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir.

Karaciğer dokusunda BCL-2 ve BAX genlerine ait rölatif mRNA ekspresyon düzeylerinin istatistiksel analizinde her iki parametre için de gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla p=0,013, p=0,002).

Gruplar arası karşılaştırmalarda MTX grubunun BCL-2 ekspresyon düzeylerinin kontrol ve CAR gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir (sırasıyla p=0,023, p=0,039). MTX+CAR grubunda BCL-2 düzeyleri MTX grubuna göre daha yüksek saptanmış olmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,719).

BAX ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, MTX grubunda kontrol ve CAR gruplarına göre anlamlı şekilde daha yüksek saptanmış olup (sırasıyla p=0,007, p=0,003); MTX+CAR grubunda ise BAX düzeyleri MTX grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük saptanmıştır (p=0,021).

Tablo 4.3'te genetik analizlerin sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Karaciğer Dokusu NRF2, HO-1, BCL-2, BAX mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırması

	Kontrol	**MTX**	**MTX+CAR**	**CAR**
NRF2	1,039±0,311	0,5931±0,2791*	0,7327±0,2326	0,9257±0,2460
HO-1	0,92 (0,68-1,54)	0,48 (0,33-0,55)*	0,67 (0,55-0,95)	0,94 (0,80-1,02)†
BCL-2	1,06±0,39	0,65±0,21*	0,79±0,14	1,03±0,23†
BAX	1,05±0,36	1,58±0,35*	1,12±0,17†	1,01±0,23†

* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (p<0,05). † MTX grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (p<0,05). Değerler, normal dağılım gösteren parametreler için ortalama±standart sapma; normal dağılım göstermeyen HO-1 parametresi için medyan(25–75. persentil) olarak verilmiştir.

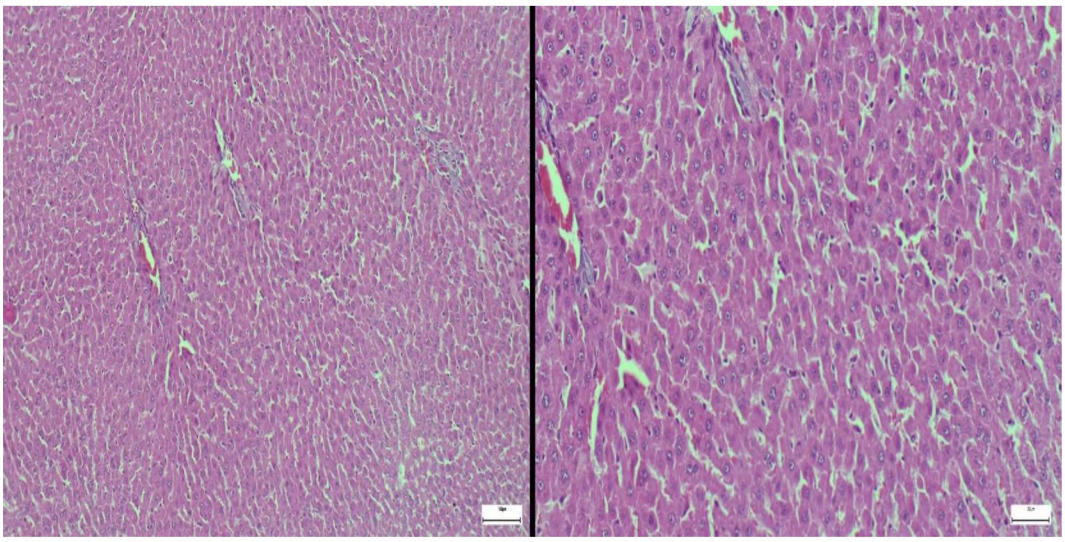
4.3. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler

4.3.1. Histopatolojik Bulgular

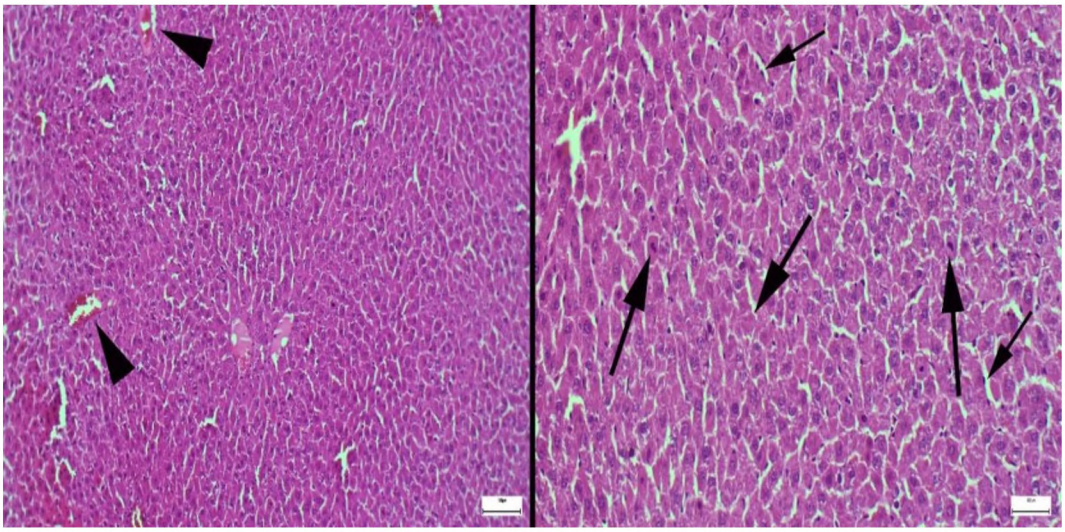
Kontrol ve CAR grubundaki sıçanların karaciğer dokularında normal histolojik yapı korunmuştur (Resim 4.1. ve Resim 4.4.).

Metotreksat (MTX) grubunda ise diğer gruplara kıyasla belirgin hiperemi, hepatositlerde şişme, vakuolizasyon, nekrozlar, sinüzoidlerde genişleme, Kupffer hücre proliferasyonları ve inflamatuar hücre infiltrasyonları gibi patolojik değişiklikler dikkat çekmiştir ($p<0,001$; Resim 4.2).

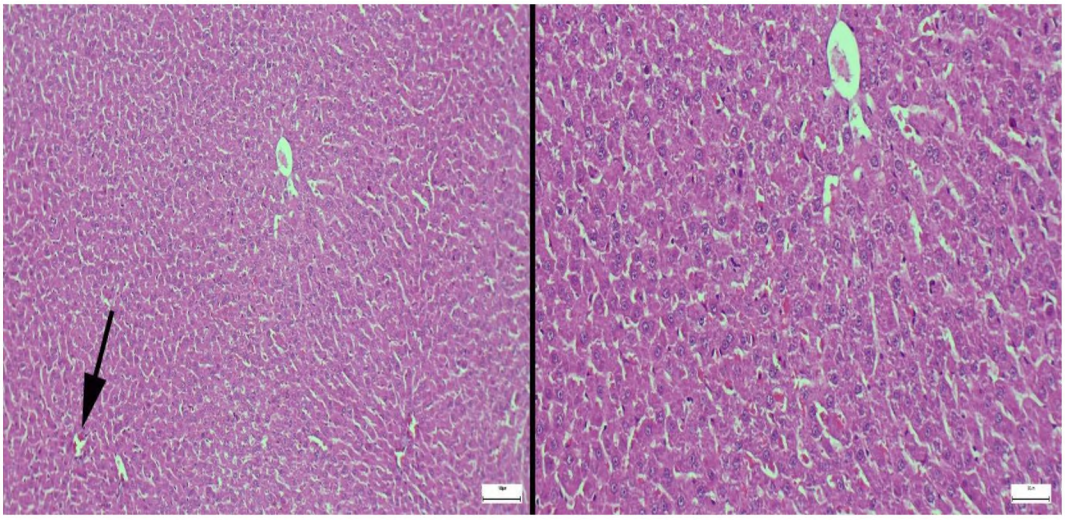
Metotreksat+Karnozin (MTX+CAR) grubunda ise bu patolojik bulguların, MTX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlenmiştir ($p<0,001$; Resim 4.3).



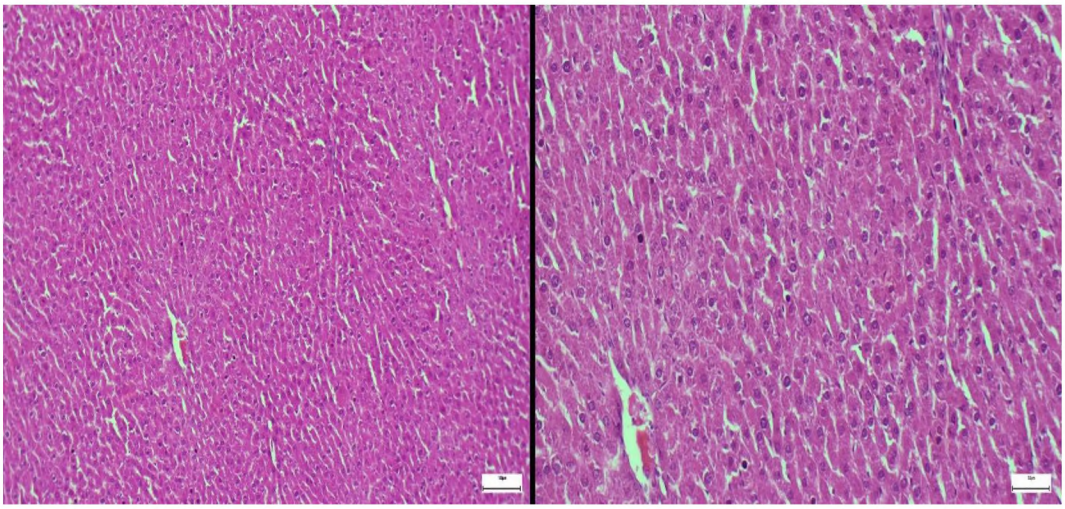
Resim 4.1. Kontrol Grubunda Bir Ratın Normal Görünümde Karaciğeri ve Aynı Alanın Büyütülmüş Görüntüsü, HE, Barlar: 100 µm ve 50 µm; sırasıyla yaklaşık 100× ve 200× büyütme.



Resim 4.2. Metotreksat (MTX) Grubunda Bir Ratın Karaciğerinde Şiddetli Hiperemi (Ok Başları), Nekrotik Hepatositler (Kalın Oklar), Kupffer Hücre Proliferasyonu (İnce Oklar) ve Aynı Alanın Büyütülmüş Görüntüsü, HE, Barlar: 100 µm ve 50 µm; sırasıyla yaklaşık 100× ve 200× büyütme.



Resim 4.3. Metotreksat+Karnozin (MTX+CAR) Grubunda Patolojik Bulgularda Belirgin Şekilde Azalma, Hafif Hiperemi (Ok) ve Aynı Alanın Büyütülmüş Görüntüsü, HE, Barlar: 100 µm ve 50 µm; sırasıyla yaklaşık 100× ve 200× büyütme.

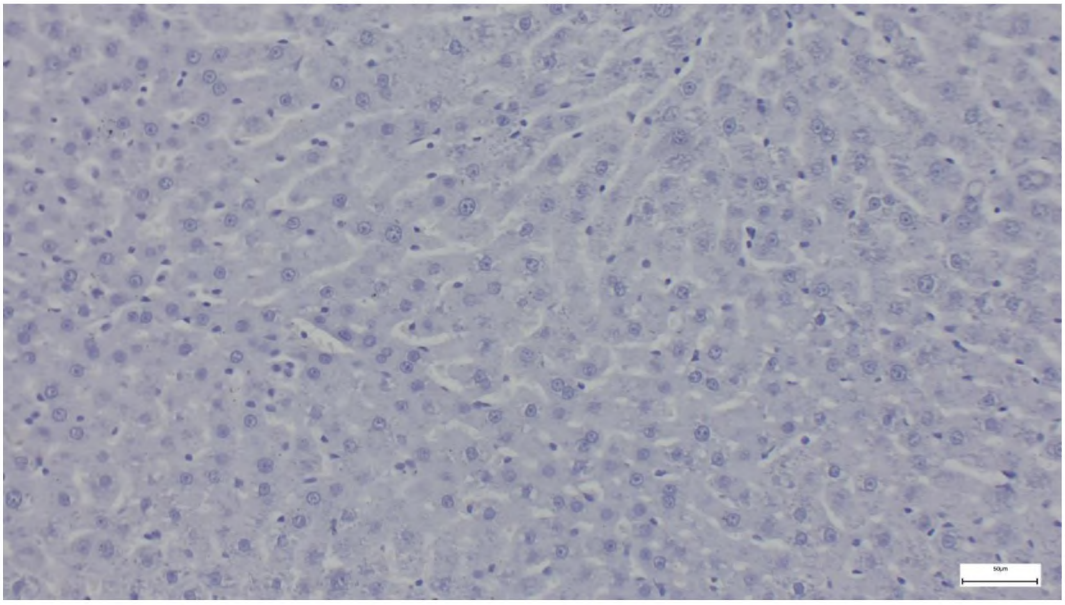


Resim 4.4. Karnozin (CAR) Grubunda Normal Karaciğer Histolojik Görünümü ve Aynı Alanın Büyütülmüş Görüntüsü, HE, Barlar: 100 µm ve 50 µm; sırasıyla yaklaşık 100× ve 200× büyütme.

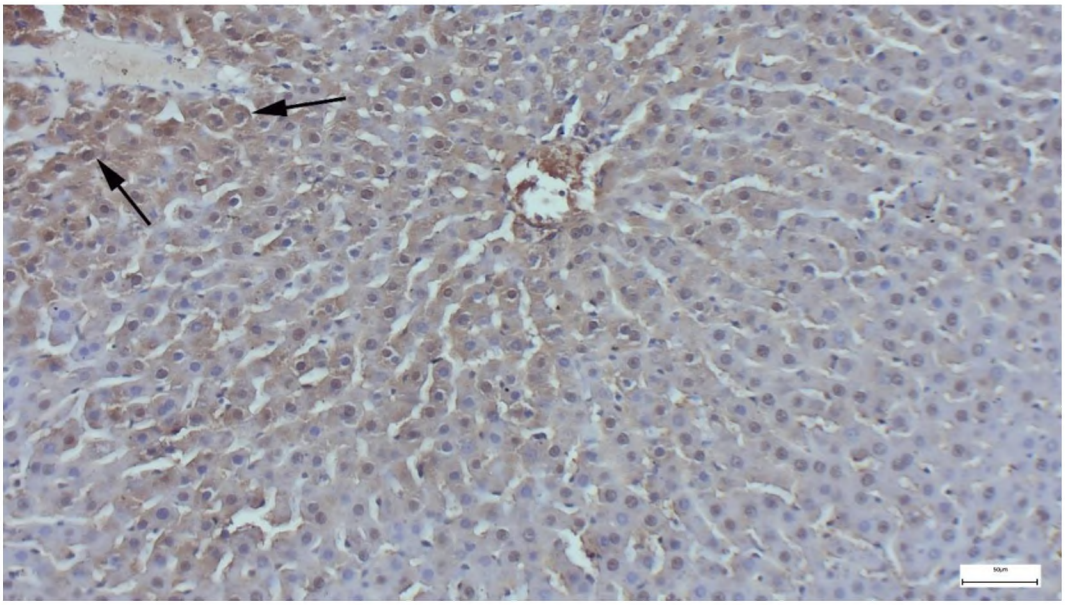
4.3.2. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal bulguları

Gruplar arasında karaciğer dokularındaki kaspaz-3 immünohistokimyasal ekspresyonları değerlendirildiğinde kontrol grubunda ekspresyonlar negatif ya da çok hafif düzeyde izlenirken, MTX grubunda bu ekspresyonların belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir ($p<0,001$; Resim 4.5-4.7). Metotreksat+Karnozin (MTX+CAR) grubunda, CAR uygulaması ile birlikte kaspaz-3 ekspresyonlarında anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,001$; Resim 4.8). Karnozin (CAR) grubunda ise ekspresyonlar kontrol grubuna benzer şekilde negatif ya da minimal düzeyde kalmıştır ($p<0,001$; Resim 4.9).

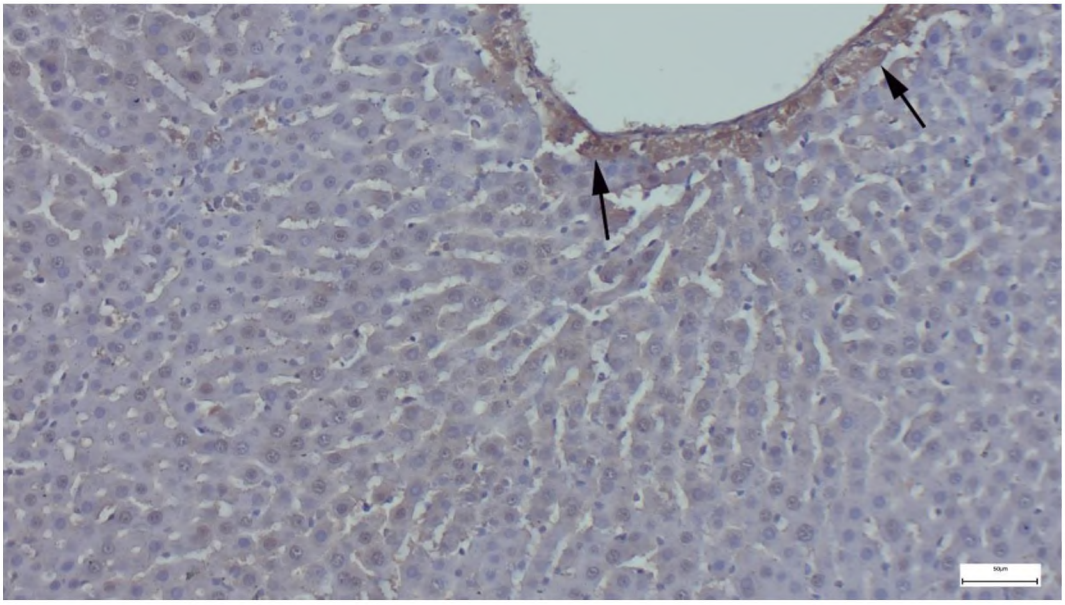
Ekspresyonlar özellikle vena santralis çevresinde yoğunlaşmış olup intrasitoplazmik yerleşimli olarak değerlendirilmiştir.



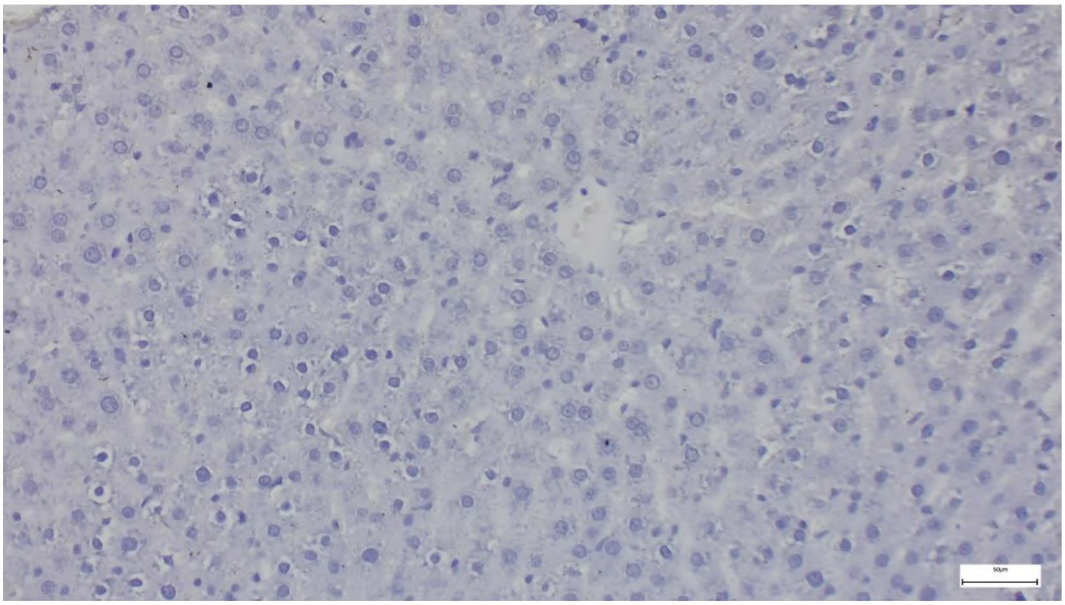
Resim 4.5. Kontrol Grubunda Bir Ratın Karaciğerinde Negatif Kaspaz-3 Ekspresyonlarının Görünümü, Streptavidin-Biyotin Peroksidaz Metodu, Bar: 50 µm; yaklaşık 200× büyütme.



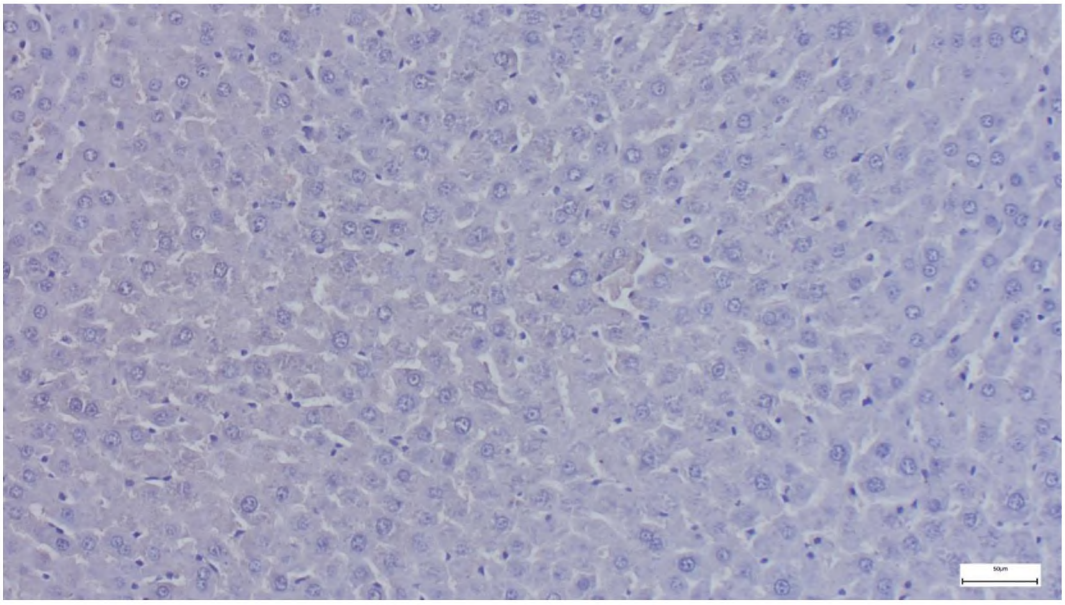
Resim 4.6. Metotreksat (MTX) Grubunda Bir Ratın Karaciğerinde Hepatositlerde Artmış Kaspaz-3 Ekspresyonları (Oklar), Streptavidin-Biyotin Peroksidaz Metodu, Bar: 50 µm; yaklaşık 200× büyütme.



Resim 4.7. Metotreksat (MTX) Grubunda Bir Başka Ratın Karaciğerinde Vena Santralis Çevresindeki Hepatositlerde Artmış Kaspaz-3 Ekspresyonları (Oklar), Streptavidin-Biyotin Peroksidaz Metodu, Bar: 50 µm; yaklaşık 200× büyütme.



Resim 4.8. Metotreksat+Karnozin (MTX+CAR) Grubunda Belirgin Şekilde Azalmış Ekspresyonlar, Streptavidin-Biyotin Peroksidaz Metodu, Bar: 50 µm; yaklaşık 200× büyütme.



Resim 4.9. Karnozin (CAR) grubunda bir ratta negatif ekspresyonlar, Streptavidin-Biyotin Peroksidaz metodu Bar: 50 µm; yaklaşık 200× büyütme.

Histopatolojik ve immünohistokimyasal analiz sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılması Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Gruplara göre histopatolojik ve immünohistokimyasal skorların istatistik analiz sonuçları

	Kontrol	**MTX**	**MTX+CAR**	**CAR**
Dejeneratif değişiklikler	0.25±0.16	2.87±0.12*	1.25±0.16*†	0.12±0.12*†
Nekrotik değişiklikler	0.00±0.00	0.75±0.25*	0.37±0.18	0.00±0.00†
Kaspaz-3	0.12±0.12	2.37±0.18*	0.62±0.18*†	0.00±0.00†

* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (Dejeneratif değişiklikler, Kaspaz-3 için $p<0,001$; Nekrotik değişiklikler için $p<0,01$). † MTX grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (Dejeneratif değişiklikler, Kaspaz-3 için $p<0,001$; Nekrotik değişiklikler için $p<0,01$). Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Metotreksat antiinflamatuar, immünsupresif ve antineoplastik özellikleri nedeniyle çeşitli inflamatuar ve neoplastik hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ajandır (18, 97). Her ne kadar klinik uygulamalarda MTX'e bağlı hepatotoksisite genellikle uzun süreli ve yüksek doz tedaviyle ilişkilendirilse de, deneysel çalışmalarda akut tek doz uygulamalar sonrasında da toksik etkilerin ortaya çıkabileceği gösterilmiştir. Metotreksata bağlı gelişen hepatotoksisitede başta oksidatif stres olmak üzere bir dizi patofizyolojik mekanizmanın rol oynadığı belirtilmektedir (23, 24).

Karnozin serbest radikal temizleme, metal iyonlarının şelatlama yeteneği ve pH tamponlama kapasitesi gibi çeşitli biyokimyasal özellikleri aracılığıyla oksidatif stresin neden olduğu hücresel hasara karşı koruyucu etki gösteren bir dipeptittir (9).

Çalışmamızda, MTX grubundaki sıçanlara 21. günde tek doz 20 mg/kg MTX i.p. yolla uygulanırken (7), CAR grubundaki sıçanlara 24 gün boyunca 100 mg/kg/gün dozunda CAR i.p. yolla verilmiştir (93). 25. günde elde edilen serum ve karaciğer doku örneklerinde MTX'in oksidatif stres, apoptoz ve inflamasyon üzerindeki etkileri ile CAR'ın bu süreçler üzerindeki olası koruyucu etkileri değerlendirilmiştir.

Serum biyokimyasal parametrelerinden AST ve ALT düzeyleri MTX grubunda kontrol ve CAR gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuş (AST için sırasıyla p=0,015, p=0,007; ALT için sırasıyla p=0,016, p=0,004), CAR uygulaması bu artışı anlamlı derecede azaltmıştır. (AST için p=0,030, ALT için p=0,033)

Oksidatif stres parametrelerinden TOS ve TAS düzeyleri karaciğer dokusunda ölçülerek OSI değerleri hesaplanmıştır. Metotreksat grubunda TOS düzeyleri kontrol ve CAR gruplarına kıyasla anlamlı şekilde yüksek (sırasıyla p=0,011, p=0,002), TAS düzeyleri ise anlamlı derecede düşük saptanmıştır (her iki karşılaştırma içinde p=0,001). Metotreksat+Karnozin grubunda bu değişiklikler tersine dönmüş, TOS anlamlı olarak azalırken (p=0,043); TAS anlamlı düzeyde artmıştır (p=0,044). Oksidatif Stres İndeksi değerleri de MTX grubunda anlamlı

biçimde artarken (her iki karşılaştırma içinde p=0,001), CAR tedavisi bu artışı anlamlı düzeyde baskılamıştır (p=0,003).

Transforme edici büyüme faktörü beta-1 (TGF-β1) düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p=0,337).

Proinflamatuar bir sitokin olan TNF-α düzeyi, MTX grubunda kontrol ve CAR gruplarına kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuş (sırasıyla p=0,002, p=0,012); CAR uygulanması bu artışı anlamlı biçimde baskılamıştır (p=0,014).

Antioksidan yanıtla ilişkili gen ekspresyonlarının analizinde, MTX grubunda NRF2 ekspresyonunun anlamlı biçimde azaldığı saptanmıştır (p=0,013). Karnozin uygulaması NRF2 düzeylerinde artış eğilimi göstermiş olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,729). Benzer şekilde, HO-1 ekspresyonun MTX grubunda anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir (p=0,004). CAR uygulaması ise HO-1 düzeylerinde tekrar artış sağlamış olmakla birlikte, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,3725).

Apoptoz ile ilişkili belirteçlerden BCL-2, MTX grubunda hem kontrol hem de CAR gruplarına kıyasla anlamlı şekilde düşük saptanmıştır (sırasıyla p=0,023, p=0,039). Metotreksat ile birlikte CAR uygulanması BCL-2 ekspresyonunu artırmış; ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,719). BAX düzeyleri ise MTX grubunda hem kontrol hem de CAR gruplarına göre anlamlı şekilde yükselmiş (sırasıyla p=0,007, p=0,003), CAR tedavisi bu artışı anlamlı düzeyde baskılamıştır (p=0,021). Ayrıca kaspaz-3'ün immünohistokimyasal değerlendirmesinde MTX grubunda belirgin pozitif boyanma saptanırken, diğer gruplarda ekspresyon minimal düzeyde kalmıştır.

Histopatolojik incelemelerde MTX grubuna ait karaciğer kesitlerinde belirgin hiperemi, yaygın hepatosit nekrozu ve belirgin Kupffer hücre proliferasyonu izlenmiştir. Buna karşılık kontrol ve CAR gruplarında hepatik doku mimarisinin korunduğu görülmüştür. Metotreksat+Karnozin grubunda ise MTX grubunda gözlenen hiperemi ve hepatosit nekrozunun belirgin şekilde azaldığı, Kupffer hücre proliferasyonunun gerilediği ve inflamatuar hücre infiltrasyonunun minimal düzeyde olduğu dikkati çekmiştir.

Metotreksat ile oluşturulan deneysel hepatotoksisite modellerinde literatürde farklı doz ve uygulama süreleri bildirilmiştir. En sık kullanılan protokol tek doz 20 mg/kg i.p. yolla uygulama olup, bazı çalışmalarda ise daha düşük dozların tekrarlı enjeksiyonları tercih edilmiştir (5-7, 24, 98).

Ali ve arkadaşları, MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) ile oluşturdukları karaciğer hasarında klorojenik asidin (CGA) hepatoprotektif etkilerini araştırmış ve MTX grubunda anlamlı düzeyde artan serum AST ve ALT düzeylerinin CGA ön tedavisiyle azaldığını göstermiştir (99). Benzer şekilde amomum subulatumun (MEAS) hepatoprotektif etkisinin araştırıldığı bir çalışmada da MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) uygulamasıyla AST, ALT, alkalen fosfataz (ALP) ve bilirubin düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı; MEAS uygulamasının bu artışı azalttığı bildirilmiştir (7). Çalışmamızda da benzer şekilde MTX grubunda serum AST ve ALT düzeyleri diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Mevcut literatürde CAR'ın karaciğer hasarını önlemedeki rolünü araştıran yayınlar bulunmaktadır. Yan ve arkadaşları, asetaminofen ile oluşturdukları deneysel karaciğer hasarı modelinde 4 hafta boyunca 1 ve 2 g/kg dozlarında içme suyuna karıştırılarak uygulanan CAR'ın, asetaminofene bağlı olarak artan serum AST ve ALT düzeylerini anlamlı şekilde azalttığını bildirmiştir (100). Alsheblak ve arkadaşları, karbon tetraklorür (CCl_4) ile hepatotoksisite oluşturulan sıçanlarda serum AST ve ALT düzeylerinin belirgin şekilde yükseldiğini; ancak 6 hafta boyunca günlük 250 mg/kg/gün dozunda i.p. olarak CAR uygulaması sonrasında bu enzim düzeylerinin anlamlı derecede azalarak, kontrol grubuna yakın değerlere gerilediğini bildirmiştir (92). Bizim çalışmamızda da MTX+CAR grubunun AST ve ALT düzeyleri, MTX grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptanmıştır.

Oksidatif stresin değerlendirilmesinde TAS, TOS ve OSI gibi parametreler yaygın olarak kullanılmaktadır (94). Özgöçmen ve arkadaşlarının MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) ile oluşturulan hepatotoksisiteye karşı ramelteon uygulamasının koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, MTX'in karaciğer dokusunda TOS ve OSI düzeylerini artırdığını buna karşılık TAS düzeylerini azalttığını bildirilmiştir (101). Gürler ve arkadaşları dexpanthenolün MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisini incelemiş, MTX grubunda TOS ve OSİ düzeylerinin arttığını; TAS düzeylerinin ise azaldığını bildirmişlerdir (102). İlhan ve

arkadaşları MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) uygulamasının karaciğer dokusunda TOS ve OSI düzeylerini yükselttiğini, TAS düzeylerini azalttığını ve böylece oksidatif dengenin bozulduğunu bildirmişlerdir (103). Mahmoud ve arkadaşları ise MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) uygulamasının lipid peroksidasyon belirteci olan Malondialdehit (MDA) düzeylerini artırdığını, antioksidan savunma sisteminin temel bileşenleri olan GSH düzeylerini ve SOD aktivitesini azalttığını göstermiştir (104). Çalışmamızda da bu bulgularla uyumlu olarak MTX grubunda TOS ve OSİ düzeylerinde anlamlı artış, TAS düzeylerinde ise anlamlı azalma saptanmıştır. Bu değişiklikler, MTX'in karaciğer dokusunda oksidatif stresi artırdığını göstermektedir. Ayrıca, CAR uygulaması TOS ve OSİ düzeylerini anlamlı şekilde azaltırken, TAS düzeylerini anlamlı biçimde artırmıştır. Bu bulgular, CAR'ın oksidatif stres üzerindeki etkisini araştıran diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Şahin ve arkadaşları, iskemi/reperfüzyona bağlı karaciğer hasarı modelinde, CAR (iskemi öncesi, 100 mg/kg, i.p.) uygulamasının MDA düzeylerini anlamlı şekilde azalttığını ve GSH düzeyleri ile katalaz aktivitesini artırdığını bildirmiştir (93). Benzer şekilde, karaciğer dışı dokularda gerçekleştirilen bazı deneysel çalışmalarda da CAR'ın antioksidatif etkileri gösterilmiştir. Örneğin, Milewski ve arkadaşları tiyoasetamid ile hepatik ensefalopati modeli oluşturdukları çalışmalarında, CAR (tiyoasetamid enjeksiyonundan 2 saat önce, 100 mg/kg, i.p.) uygulamasının beyin dokusunda reaktif oksijen türlerinin üretimini anlamlı şekilde azalttığı, GSSG/GSH oranını normale yaklaştırdığı ve tiyoredoksin redüktaz aktivitesindeki artışı baskılayarak redoks dengesini yeniden sağladığı bildirilmiştir (105). Ayrıca adjuvan artrit modeli oluşturulan sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada, CAR uygulamasının (28 gün, 150 mg/kg/gün, oral gavaj) beyin dokusunda MDA, 4-hidroksinonenal (4-HNE) düzeylerini ve protein oksidasyonunu azaltığı rapor edilmiştir (106).

Oksidatif stres karşısında hücrenin hayatta kalmasını sağlayan en önemli savunma mekanizmalarından biri NRF2/HO-1 sinyal yoludur. Bu yol artan reaktif oksijen türlerine yanıt olarak NRF2'nin aktive olması ile birlikte, HO-1 gibi antioksidan enzimlerin üretimini düzenleyen genlerin ekspresyonunu artırarak hücre içi redoks dengesinin korunmasına katkıda bulunur (39).

Fayez ve arkadaşları MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) ile oluşturulan karaciğer hasarında α-lipoik asidin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, MTX

uygulanan sıçanların karaciğer dokularında NRF2 gen ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı, HO-1 düzeylerinde ise anlamlı olmamakla birlikte düşüş eğilimi bulunduğu bildirilmiştir (107). Benzer şekilde Azadian ve arkadaşları, astaksantin tedavisinin MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında, MTX grubunda NRF2 ve HO-1 ekspresyonlarının anlamlı düzeyde azaldığını bildirmişlerdir (108). Çalışmamızda elde edilen bulgular da literatürle benzerlik göstermektedir. Metotreksat uygulaması karaciğer dokusunda NRF2/HO-1 sinyal yolunun baskılanmasına neden olmuş, bu durum antioksidan kapasitenin azaldığını ve redoks dengesinin bozulduğunu düşündürmektedir. Aynı zamanda TAS düzeylerindeki azalma ile NRF2/HO-1 gen ekspresyonundaki baskılanma arasında bir paralellik olması antioksidan yanıtın hem biyokimyasal hem de moleküler düzeyde zayıfladığını düşündürmektedir. Öte yandan, CAR uygulaması NRF2 ve HO-1 gen ekspresyonlarında artış sağlamış olsa da, bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bir düzeye ulaşmamıştır. Literatürde CAR'ın genellikle 100–250 mg/kg aralığında kullanıldığı dikkate alındığında, çalışmamızda tercih edilen 100 mg/kg dozunun istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşan bir yanıt oluşturmak için yeterli olmamış olabileceği düşünülmektedir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, CAR'ın MTX'in NRF2/HO-1 yolağı üzerindeki baskılayıcı etkisini kısmen azaltabileceği ve hücre içi redoks dengesinin korunmasına katkı sağlayabileceği görülmektedir. Ayrıca literatürde de benzer şekilde, farklı oksidatif stres modellerinde CAR'ın NRF2/HO-1 sinyal yoluna etkilerini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır (92, 109, 110). Karbon tetraklorür (CCl_4) ile oluşturulan karaciğer hasarı modelinde CAR uygulamasının (6 hafta, 250 mg/kg/gün, i.p.) karaciğer dokusunda NRF2 gen ekspresyonunu anlamlı biçimde artırdığı rapor edilmiştir; ancak bu çalışmada HO-1 ekspresyonu değerlendirilmemiştir (92). Ayrıca deksametazon ile oluşturulan oksidatif stres altında osteoblast hücreleri ve kemik dokusunda, CAR'ın (in vivo, 0.5–7.5 μmol; in vitro, 0.01–5 mM) NRF2/HO-1 yolunu aktive ederek oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (109). Bir başka çalışmada ise tiyoasetamid ile oluşturulan karaciğer hasarı modelinde CAR içeren tedavi protokolünün (6 hafta, 200 mg/kg/gün, oral gavaj) karaciğerde NRF2 ve HO-1 ekspresyonlarını yükselttiği rapor edilmiştir (110).

Oksidatif stres ve inflamasyon patofizyolojik süreçler içerisinde karşılıklı etkileşim içinde yer alan iki temel mekanizmadır. Artan reaktif oksijen türleri inflamatuar yanıtı başlatabilirken, aktive olan inflamatuar süreçler de oksidatif dengenin bozulmasına neden olarak bu döngünün sürdürülmesine katkıda bulunur (111).

Metotreksat uygulamasının inflamatuar yanıtı uyardığı da birçok çalışmada gösterilmiştir (98, 104, 112, 113). Montasser ve arkadaşlarının MTX (1 ay, 13,4 mg/kg/hafta, i.p.) ile oluşturulan karaciğer toksisitesinde balanites aegyptiaca ekstresi, melatonin ve ursodeoksikolik asidin hepatoprotektif etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, MTX'in karaciğer dokusunda ölçülen TNF-α düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artırdığını ve bu artışın, MTX'in reaktif oksijen türleri oluşturarak nötrofil infiltrasyonunu ve proinflamatuar sitokin salınımını tetiklemesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir (98). Mahmoud ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise sıçanlara MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) uygulanarak hepatotoksisite modeli oluşturulmuştur. Çalışmada karaciğer dokusunda TNF-α, IL-1β ve IL-6 düzeylerinin ölçüldüğü ve bu sitokinlerin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir. Bu artışın MTX'in oluşturduğu oksidatif stres sonucu gelişen inflamatuar yanıtı yansıttığı, uygulanan nitazoksanid tedavisinin ise bu inflamatuar yanıtı belirgin şekilde azalttığı belirtilmiştir (104). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde karaciğer dokusundaki TNF-α düzeylerinin, MTX grubunda anlamlı şekilde arttığı ve CAR uygulamasının bu artışı belirgin biçimde azalttığı saptanmıştır. Bu bulgu, CAR'ın doku düzeyinde ortaya çıkan MTX kaynaklı inflamatuar yanıta karşı hepatoprotektif bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca literatürde de CAR'ın antiinflamatuar etkilerini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (92, 114-116). Örneğin, Fouad ve arkadaşları trikoloroasetik asit (TCA) uygulaması ile hepatoselüler kanser oluşturulan sıçan modelinde, CAR uygulamasının (2 hafta, 10 mg/kg/gün, i.p.) karaciğer dokusundaki TNF-α ve NF-κB düzeylerini anlamlı şekilde azalttığını bildirmiştir (115). Benzer şekilde Alsheblak ve arkadaşları, CCl_4 ile indüklenen hepatik hasar modelinde uygulanan CAR'ın (6 hafta, 250 mg/kg/gün, i.p.) karaciğer dokusunda TNF-α ve nitrik oksit (NO) düzeylerini anlamlı biçimde azalttığını, buna karşılık antiinflamatuar bir sitokin olan IL-10 düzeyini artırdığını bildirmiştir (92).

Oksidatif stresle ilişkili sinyal yollarındaki bozulmalar hücre içi apoptotik süreçleri tetikleyebilir. Bu süreçte BCL-2 ailesi proteinleri ve kaspazlar önemli rol oynamaktadır (65). Literatürde Ali ve arkadaşları klorojenik asidin MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) ile oluşturulan hepatotoksisiteye karşı koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, MTX uygulanan sıçanlarda kaspaz-3 düzeylerinin anlamlı şekilde arttığını bildirmişlerdir (99). Benzer şekilde, Fayez ve arkadaşları da alfa lipoik asidin hepatoprotektif etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) grubunda kaspaz-3 düzeylerinde belirgin bir artış saptamışlardır (107). Bir diğer çalışmada ise morin uygulamasının MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisi, yalnızca kaspaz-3 düzeyi ile değil aynı zamanda BCL-2 ve BAX düzeyleri üzerinden de değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre MTX grubunda BAX ve kaspaz-3 düzeyleri anlamlı şekilde artarken, BCL-2 düzeyleri azalmıştır. Morin uygulaması bu artışı baskılamış, BCL-2 düzeylerini ise arttırarak apoptozun önlenmesine katkı sağlamıştır (117). Benzer şekilde çalışmamızda da MTX grubunda BAX ve kaspaz-3 düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık, CAR uygulaması bu artışı belirgin şekilde baskılamış; ayrıca MTX grubunda azalan BCL-2 düzeylerinin CAR tedavisi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde de CAR'ın antiapoptotik etkilerini gösteren çalışmalar sınırlı da olsa mevcuttur (118). Örneğin Baykara ve arkadaşlarının etanol ile indüklenmiş karaciğer hasarı modelinde CAR'ın (etanol uygulamasından 1 saat önce, 100 mg/kg, oral gavaj) karaciğer dokusunda BAX, BCL-2 ve kaspaz-3 düzeyleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Etanol uygulanan grupta BAX ve kaspaz-3 düzeylerinin artığı, BCL-2 düzeylerinin ise azaldığı rapor edilmiştir. Karnozin uygulaması bu değişiklikleri tersine çevirerek BAX ve kaspaz-3 düzeylerini düşürmüş, BCL-2 düzeyini ise artırmıştır (118). Bu bulgular, CAR'ın MTX ile indüklenen hepatik apoptozu azaltarak hücre ölümünü sınırlayabileceğini ve antiapoptotik bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Apoptoz dışında MTX'in hepatotoksisitesinde rol oynayan bir diğer önemli mekanizma da fibrozis sürecinde etkili olan TGF-β1 yanıtıdır. Literatürde, MTX uygulamasını takiben TGF-β1 düzeylerindeki artışın ilacın uygulanmasının hemen ardından değil, deney hayvanlarının belirli bir süre boyunca gözlemlendiği ve

sakrifikasyonun bu sürenin sonunda gerçekleştirildiği modellerde ortaya çıktığı bildirilmiştir (119, 120). Örneğin Dibekoğlu ve arkadaşlarının çalışmasında, deneyin 1. gününde sıçanlara tek doz 20 mg/kg MTX i.p. yolla uygulanmış, hayvanlar 10. günde sakrifiye edilerek karaciğer dokuları incelenmiş ve TGF-β1 düzeylerinin belirgin şekilde arttığı rapor edilmiştir (119). Bir başka çalışmada ise sıçanlara MTX 4 hafta boyunca haftada iki kez 0,5 mg/kg dozunda i.p. yolla uygulanmış, bu sürenin sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek karaciğer dokuları değerlendirilmiş ve TGF-β1 düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir (120). Bizim çalışmamızda ise MTX uygulamasını takiben 4. günde sakrifikasyon uygulanmıştır ve yapılan ölçümlerde, TGF-β1 düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bu durum, MTX uygulamasını takiben oksidatif stres ve proinflamatuar belirteçlerin erken dönemde hızla yükselmesine karşın, TGF-β1 düzeylerindeki artışın daha geç ortaya çıkmasıyla ilişkili olabilir.

Literatürde MTX'in karaciğer dokusunda yapısal bozulmalara yol açarak histopatolojik düzeyde hasar oluşturduğu gösterilmiştir (7, 98). Sudarsanan ve arkadaşlarının çalışmalarında MTX'in karaciğer üzerindeki zararlı etkileri ve bu etkilere karşı amomum subulatum uygulamasının potansiyel koruyucu rolü araştırılmıştır. Histopatolojik analizler sonucunda MTX (tek doz, 20 mg/kg, i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde sinüzoidal dilatasyon, sitoplazmik vakuolizasyon, hepatosit binükleasyonu, periportal inflamasyon, safra kanalı hiperplazisi ve lobüler yapının bozulması gibi değişiklikler gözlemlendiği bildirilmiştir (7). Benzer şekilde Montasser ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada ise MTX (1 ay, 13,4 mg/kg/hafta, i.p.) grubuna ait karaciğer kesitlerinde hepatositlerde sitoplazmik vakuolizasyon, portal triadta fibrotik doku oluşumu; ayrıca hepatositlerde steatoz ve nekroz bildirilmiştir (98). Çalışmamızda da literatürle uyumlu şekilde, MTX grubunda diğer gruplara kıyasla belirgin hiperemi, hepatositlerde şişme, vakuolizasyon, nekroz, sinüzoidlerde genişleme, Kupffer hücre proliferasyonları ve inflamatuar hücre infiltrasyonları gibi patolojik değişiklikler izlenmiştir. Karnozin uygulaması ise bu doku hasarını ve yapısal bozulmaları hafifletmiş, MTX kaynaklı histopatolojik hasarın azalmasına katkıda bulunmuştur. Bu bulgular, CAR'ın hepatoprotektif etkilerini gösteren diğer çalışmalarla da örtüşmektedir (93, 118, 121).

Çalışmamızın başlıca kısıtlamalarından biri, MTX uygulamasının tek doz olarak gerçekleştirilmiş olmasıdır; dolayısıyla MTX'in kronik maruziyetine bu çalışmada yer verilmemiştir.

Karnozin uygulaması ise 100 mg/kg dozunda yapılmıştır. Literatürde CAR'ın 250 mg/kg'a kadar ulaşan daha yüksek dozlarda kullanıldığı çalışmalar bulunmasına rağmen,, bu dozların tercih edilmesi çalışma maliyetini belirgin biçimde artıracağından uygulanamamıştır.

Moleküler analizlerde, oksidatif stres ve apoptozla ilişkili temel göstergeler arasından NRF2, HO-1, BAX ve BCL-2 genlerinin mRNA ekspresyonları değerlendirilmiştir. MTX'in etkilediği bilinen NF-κB, PI3K/Akt ve ER stresiyle ilişkili PERK, CHOP gibi diğer sinyal yolakları ile ilgili transkripsiyon faktörleri mevcut kaynakların sınırlılığı nedeniyle bu çalışmada incelenememiştir.

Ayrıca mRNA ekspresyonları değerlendirilen bu genlere (NRF2, HO-1, BAX, BCL-2) ait protein düzeylerinin ölçülmemiş olması da ayrı bir kısıtlılıktır. Bütçe, cihaz erişimi ve laboratuvar altyapısındaki yetersizlikler nedeniyle protein analizleri gerçekleştirilememiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda MTX'in karaciğer dokusunda oluşturduğu patolojik değişiklikler ve CAR'ın bu hasara karşı koruyucu etkileri değerlendirilmiştir.

Karaciğer dokusunda MTX'e bağlı oluşan oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz süreçleri yapılan biyokimyasal, genetik ve immünohistokimyasal analizlerle değerlendirilmiştir. Metotreksat grubunda, TOS ve OSİ düzeylerinin artışı, MTX'in karaciğerde oksidatif stres gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca karaciğer dokusunda artmış TNF-α düzeyleri de oksidatif stresle yakından ilişkili olan inflamasyon sürecinin, MTX uygulaması ile tetiklendiğini göstermektedir. TAS düzeyleri ile NRF2, HO-1 mRNA ekspresyon düzeylerindeki azalışın da antioksidan sistemin baskılandığını göstermektedir. Ek olarak MTX, apoptoz belirteçleri olan BAX ekspresyonunu ve kaspaz-3 immünreaktivitesini arttırırken; BCL-2 ekspresyonunu azaltmıştır. Bu sonuçlar MTX'e bağlı oluşan oksidatif stresin apoptozun mitokondriyal yolağını aktive ettiğini düşündürmektedir. Karnozin uygulaması ile oksitadatif stres, inflamasyon ve apoptozun azaldığı saptanmıştır.

Karaciğer hasarının belirteci olarak kullanılan serum AST ve ALT düzeylerinin, MTX grubunda diğer gruplardan daha yüksek olduğu saptanmıştır. Histopatolojik analizlerin sonuçları elde edilen diğer bulguları desteklemektedir.

Bu sonuçlar CAR'ın antiapoptotik, antioksidan, antiinflamatuar etkiler göstererek MTX kaynaklı hepatotoksisiteye karşı potansiyel koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak CAR'ın hangi doz ve sürede kullanılacağı ve MTX kaynaklı diğer dokularda oluşan hasarlar üzerindeki potansiyel koruyucu etkilerinin, ileride yapılacak kapsamlı çalışmalar ile ortaya konulması faydalı olacaktır.

ÖZET

Metotreksat İle Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda Karnozinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Metotreksat (MTX), klinikte yaygın olarak kullanılan bir antimetabolit olup karaciğer üzerinde toksik etkiler oluşturabilmektedir. Literatürde MTX'in oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz süreçlerini tetikleyerek hepatotoksisiteye neden olabildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada MTX'e bağlı gelişen karaciğer hasarında karnozinin (CAR) olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 32 adet Wistar Albino türü erkek sıçan Kontrol, MTX, MTX+CAR ve CAR olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. MTX+CAR ve CAR grubundaki sıçanlara 24 gün boyunca 100 mg/kg/gün dozunda CAR intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmıştır. Deneyin 21. gününde MTX ve MTX+CAR grubundaki sıçanlara 20 mg/kg dozunda MTX i.p. olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise CAR uygulanan grupla aynı miktarda SF i.p. olarak uygulanmıştır.

Sıçan serumlarının biyokimyasal analizleri sonucunda, MTX uygulamasının serum AST ve ALT düzeylerini anlamlı şekilde artırdığı belirlenmiştir. Karaciğer dokusunda TNF-α düzeylerinde de benzer biçimde artış saptanmıştır. Gen ekspresyon analizleri, MTX'in karaciğer dokusunda BAX mRNA ekspresyonunu artırdığını; NRF2, HO-1 ve BCL-2 ekspresyon düzeylerini ise azalttığını göstermiştir. İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde kaspaz-3 immünreaktivitesinin MTX grubunda belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Oksidatif stres parametrelerinden TOS ve OSİ düzeyleri MTX grubunda artarken, antioksidan kapasite göstergesi olan TAS düzeyi ise azalmıştır. Karnozin uygulaması, MTX'in oluşturduğu bu değişiklikleri büyük ölçüde tersine çevirmiştir. Uygulama sonucunda serum AST, ALT ve TNF-α düzeyleri ile BAX, kaspaz-3, TOS ve OSİ düzeyleri azalırken; BCL-2, NRF2, HO-1 ekspresyonları artmıştır. Histopatolojik incelemelerde elde edilen bulgular da bu biyokimyasal ve moleküler sonuçları destekler niteliktedir.

Çalışmamızın sonuçları dikkate alındığında, CAR'ın antiapoptotik, antioksidan ve antiinflamatuar etkileri aracılığıyla MTX kaynaklı hepatotoksisiteye karşı potansiyel bir koruyucu ajan olabileceğini öngörmekteyiz. Ancak CAR'ın koruyucu etkilerinin doz, uygulama süresi ve moleküler etki mekanizmaları açısından daha ayrıntılı biçimde ortaya konabilmesi için ileri düzey, kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Hepatotoksisite, İnflamasyon, Karnozin, Metotreksat, Oksidatif Stres

ABSTRACT

Investigation of the Protective Effects of Carnosine in Methotrexate-Induced Liver Injury in Rats

Methotrexate (MTX) is an antimetabolite widely used in clinical practice and is known to exert toxic effects on the liver. Previous studies have reported that MTX may induce hepatotoxicity by triggering oxidative stress, inflammation, and apoptosis. This study aimed to investigate the potential protective effects of carnosine (CAR) against MTX-induced liver injury.

In our study, 32 male Wistar albino rats were divided into four groups: Control, MTX, MTX+CAR, and CAR. Rats in the MTX+CAR and CAR groups received carnosine (CAR) intraperitoneally at a dose of 100 mg/kg/day for 24 days. On day 21 of the experiment, rats in the MTX and MTX+CAR groups were administered methotrexate (MTX) intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg. The Control group received an equivalent volume of saline intraperitoneally, similar to the CAR-treated groups.

Biochemical analysis of rat serum samples revealed that MTX administration significantly increased serum AST and ALT levels. A similar increase was observed in TNF-α levels in liver tissue. Gene expression analysis demonstrated that MTX elevated BAX mRNA expression while reducing NRF2, HO-1, and BCL-2 expression levels in liver tissue. Immunohistochemical evaluation showed a marked increase in Caspase-3 immunoreactivity in the MTX group. Among oxidative stress parameters, TOS and OSI levels were elevated in the MTX group, whereas TAS, an indicator of antioxidant capacity, was decreased. Carnosine (CAR) administration largely reversed these MTX-induced alterations. Following CAR treatment, serum AST, ALT, and TNF-α levels as well as BAX, Caspase-3, TOS, and OSI levels decreased, while BCL-2, NRF2, and HO-1 expression levels increased. Histopathological findings were consistent with and supported the biochemical and molecular results.

Considering the results of our study, we suggest that CAR may serve as a potential protective agent against MTX-induced hepatotoxicity through its anti-apoptotic, antioxidant, and anti-inflammatory effects. However, further advanced and comprehensive studies are required to clarify the optimal dose, duration of administration, and detailed molecular mechanisms underlying the protective effects of CAR.

Keywords: Carnosine, Hepatotoxicity, Inflammation, Methotrexate, Oxidative Stress

KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA: a cancer journal for clinicians. 2018;68(1):7-30.
2. Hagner N, Joerger M. Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis. Cancer Management And Research. 2010:293-301.
3. Bath RK, Brar NK, Forouhar FA, Wu GY. A review of methotrexate-associated hepatotoxicity. Journal Of Digestive Diseases. 2014;15(10):517-24.
4. Asci H, Ozmen O, Ellidag HY, Aydin B, Bas E, Yilmaz N. The impact of gallic acid on the methotrexate-induced kidney damage in rats. Journal Of Food And Drug Analysis. 2017;25(4):890-7.
5. Abdul-Hamid M, Abdel-Reheim ES, Hegazy W, Allam A, Othman SI, Alwaele MA, et al. Effect of gervital in attenuating hepatotoxicity caused by methotrexate or azathioprine in adult albino rats. Environmental Science and Pollution Research. 2022;29(31):46788-801.
6. Shahani S, Mehraban N, Talebpour Amiri F, Abedi SM, Noaparast Z, Mohammadinia S, et al. Aqueous extract pretreatment decreases methotrexate-induced hepatotoxicity at lower dose and increases 99mTc-phytate liver uptake, as a probe of liver toxicity assessment, in rats. Annals of Nuclear Medicine. 2023;37(3):166-75.
7. Drishya S, Dhanisha SS, Guruvayoorappan C. Antioxidant-rich fraction of Amomum subulatum fruits mitigates experimental methotrexate-induced oxidative stress by regulating TNF-α, IL-1β, and IL-6 proinflammatory cytokines. Journal of Food Biochemistry. 2022;46(4):e13855.
8. Gulewitsch W, Amiradzibi S. Carnosine, a new organic base of meat extracts. Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft. 1900;33:1902-3.
9. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. Physiological reviews. 2013.
10. Baran B, Karasu Z. Karaciğer sirozu ve komplikasyonlari. 2019.
11. Çebi A, Dıraman E, Sezgin FG, editors. Karaciğerde detoksifikasyon. International Conference on Design; 2021.
12. Juza RM, Pauli EM. Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. Clinical Anatomy. 2014;27(5):764-9.
13. Wang H, Liang X, Gravot G, Thorling CA, Crawford DH, Xu ZP, et al. Visualizing liver anatomy, physiology and pharmacology using multiphoton microscopy. Journal of Biophotonics. 2017;10(1):46-60.
14. Göktaş HG, Bacanlı M, Başaran N. İlaçların Neden Olduğu Karaciğer Hasarı ve Hasarın Belirlenmesinde Kullanılan Biyogöstergeler. Journal of Literature Pharmacy Sciences. 2014;3(1):17-26.
15. Cronstein BN, Aune TM. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. Nature Reviews Rheumatology. 2020;16(3):145-54.
16. Savran M. Ratlarda metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında C vitamininin koruyucu etkisinin araştırılması: SDÜ Tıp Fakültesi; 2011.
17. Pile KDvG, G. G. Methotrexate. Compendium of Inflammatory Diseases. 2016:187–8.
18. Uygur AG, Şingirik E, Yücel AH. Metotreksat kaynaklı hasarlarda alfa lipoik asit'in koruyucu etkisi. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2019;28(3):227-36.
19. Riksen NP, Barrera P, van den Broek PH, Van Riel P, Smits P, Rongen G. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans in vivo. Annals of the Rheumatic Diseases. 2006;65(4):465-70.

20. Howard SC, McCormick J, Pui C-H, Buddington RK, Harvey RD. Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate. The Oncologist. 2016;21(12):1471-82.

21. Goodkin DE, Rudick RA, Medendorp SV, Daughtry MM, Schwetz KM, Fischer J, et al. Low-dose (7.5 mg) oral methotrexate reduces the rate of progression in chronic progressive multiple sclerosis. Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society. 1995;37(1):30-40.

22. Perrotta FM, Ambrosino P, Lubrano E. Long-Term Survival of Methotrexate as First-Line Therapy in Rheumatoid Arthritis, Psoriatic Arthritis and Undifferentiated Arthritis. Journal of Clinical Medicine. 2024;13(24):7540.

23. Ahmed ZSO, Hussein S, Ghandour RA, Azouz AA, El-Sakhawy MA. Evaluation of the effect of methotrexate on the hippocampus, cerebellum, liver, and kidneys of adult male albino rat: Histopathological, immunohistochemical and biochemical studies. Acta Histochemica. 2021;123(2):151682.

24. Kalantari H, Asadmasjedi N, reza Abyaz M, Mahdavinia M, Mohammadtaghvaei N. Protective effect of inulin on methotrexate-induced liver toxicity in mice. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019;110:943-50.

25. Armağan İ. Metotreksat'ın karaciğer ve böbrekte neden olduğu hasarda oksidatif stresin rolü. Medical Journal of Süleyman Demirel University. 2015;22(4).

26. Sahindokuyucu-Kocasari F, Akyol Y, Ozmen O, Erdemli-Kose S, Garli S. Apigenin alleviates methotrexate-induced liver and kidney injury in mice. Human & Experimental Toxicology. 2021;40(10):1721-31.

27. Dooley S, Ten Dijke P. TGF-β in progression of liver disease. Cell and tissue research. 2012;347(1):245-56.

28. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2015;30(1):11-26.

29. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine: Oxford university press; 2015.

30. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. Clinical İnterventions in Aging. 2018:757-72.

31. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2015;30:11-26.

32. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. Archives of Toxicology. 2023;97(10):2499-574.

33. Ghosh A, Shcherbik N. Effects of oxidative stress on protein translation: Implications for cardiovascular diseases. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(8):2661.

34. Hojo Y, Okado A, Kawazoe S, Mizutani T. In vivo singlet-oxygen generation in blood of chromium (VI)-treated mice: an electron spin resonance spin-trapping study. Biological Trace Element Research. 2000;76:85-93.

35. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. FEBS letters. 2000;486(1):10-3.

36. Bedwell S, Dean R, Jessup W. The action of defined oxygen-centred free radicals on human low-density lipoprotein. Biochemical Journal. 1989;262(3):707-12.

37. Halliwell B. Oxidants and human disease: Some new concepts 1. The FASEB Journal. 1987;1(5):358-64.

38. Fenton HJH. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. Journal of the Chemical Society, Transactions. 1894;65:899-910.

39. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2013;53(1):401-26.

40. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1999;424(1-2):83-95.

41. Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. Pharmacology & Therapeutics. 2010;125(3):376-93.

42. Thimmulappa RK, Chattopadhyay I, Rajasekaran S. Oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of environmental lung diseases. Oxidative Stress in Lung Diseases: Volume 2. 2020:103-37.

43. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The İnternational Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2007;39(1):44-84.

44. Janciauskiene S. The beneficial effects of antioxidants in health and diseases. Chronic Obstructive Pulmonary Diseases: Journal of the COPD Foundation. 2020;7(3):182.

45. de Vega RG, Fernández-Sánchez ML, Fernández JC, Menéndez FVÁ, Sanz-Medel A. Selenium levels and glutathione peroxidase activity in the plasma of patients with type II diabetes mellitus. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2016;37:44-9.

46. Li L, Yang X. The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: links and interactions. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018;2018(1):7580707.

47. Hitchler MJ, Domann FE. Regulation of CuZnSOD and its redox signaling potential: implications for amyotrophic lateral sclerosis. Antioxidants & Redox Signaling. 2014;20(10):1590-8.

48. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. Journal of Cell Biology. 2018;217(6):1915-28.

49. Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. Annals of the new York Academy of Sciences. 2010;1203(1):120-5.

50. Rhee SG, Yang K-S, Kang SW, Woo HA, Chang T-S. Controlled elimination of intracellular H2O2: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. Antioxidants & Redox Signaling. 2005;7(5-6):619-26.

51. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. Advances in Medical Sciences. 2018;63(1):68-78.

52. Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. Respiration. 1986;50(Suppl 1):31-42.

53. Vázquez-Meza H, Vilchis-Landeros MM, Vázquez-Carrada M, Uribe-Ramírez D, Matuz-Mares D. Cellular compartmentalization, glutathione transport and its relevance in some pathologies. Antioxidants. 2023;12(4):834.

54. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. Frontiers in Pharmacology. 2014;5:196.

55. López-Lluch G, Rodríguez-Aguilera JC, Santos-Ocaña C, Navas P. Is coenzyme Q a key factor in aging? Mechanisms of Ageing and Development. 2010;131(4):225-35.

56. Thiruvengadam M, Venkidasamy B, Subramanian U, Samynathan R, Ali Shariati M, Rebezov M, et al. Bioactive compounds in oxidative stress-mediated diseases: targeting the NRF2/ARE signaling pathway and epigenetic regulation. Antioxidants. 2021;10(12):1859.

57. Liu X-F, Zhou D-D, Xie T, Malik TH, Lu C-B, Li H-J, et al. Nrf2, a potential therapeutic target against oxidative stress in corneal diseases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2017;2017(1):2326178.

58. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. Cellular and Molecular Life Sciences. 2016;73:3221-47.

59. Panieri E, Buha A, Telkoparan-Akillilar P, Cevik D, Kouretas D, Veskoukis A, et al. Potential applications of NRF2 modulators in cancer therapy. Antioxidants. 2020;9(3):193.

60. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1968;61(2):748-55.

61. Yuan L, Wang Y, Li N, Yang X, Sun X, Tian He, et al. Mechanism of action and therapeutic implications of Nrf2/HO-1 in inflammatory bowel disease. Antioxidants. 2024;13(8):1012.

62. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. The FASEB journal. 1988;2(10):2557-68.

63. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. Physiological Reviews. 2006;86(2):583-650.

64. Wang H, Cheng Q, Bao L, Li M, Chang K, Yi X. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 in cancer chemoresistance: focus on antioxidant, antiapoptotic, and pro-autophagy properties. Antioxidants. 2023;12(6):1217.

65. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic Pathology. 2007;35(4):495-516.

66. FH I. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer. 2002;2:277-88.

67. Ghorbani N, Yaghubi R, Davoodi J, Pahlavan S. How does caspases regulation play role in cell decisions? apoptosis and beyond. Molecular and Cellular Biochemistry. 2024;479(7):1599-613.

68. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nature Reviews Cancer. 2002;2(9):647-56.

69. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2008;9(1):47-59.

70. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature. 1998;391(6662):43-50.

71. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 2001;276(10):7320-6.

72. Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-α-induced apoptosis in liver injury. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2004;8(4):445-54.

73. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of liver injury. I. TNF-α-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2006;290(4):G583-G9.

74. Bonaccorso A, Privitera A, Grasso M, Salamone S, Carbone C, Pignatello R, et al. The therapeutic potential of novel carnosine formulations: perspectives for drug development. Pharmaceuticals. 2023;16(6):778.

75. Gulewitsch W, Amiradžibi S. Ueber das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextractes. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. 1900;33(2):1902-3.

76. Bellia F, Vecchio G, Rizzarelli E. Carnosinases, their substrates and diseases. Molecules. 2014;19(2):2299-329.

77. Creighton JV, de Souza Gonçalves L, Artioli GG, Tan D, Elliott-Sale KJ, Turner MD, et al. Physiological roles of carnosine in myocardial function and health. Advances in Nutrition. 2022;13(5):1914-29.

78. Cesak O, Vostalova J, Vidlar A, Bastlova P, Student Jr V. Carnosine and beta-alanine supplementation in human medicine: narrative review and critical assessment. Nutrients. 2023;15(7):1770.

79. de Jager S, Vermeulen A, De Baere S, Van der Stede T, Lievens E, Croubels S, et al. Acute balenine supplementation in humans as a natural carnosinase-resistant alternative to carnosine. Scientific Reports. 2023;13(1):6484.

80. Artioli GG, Sale C, Jones RL. Carnosine in health and disease. European Journal of Sport Science. 2019;19(1):30-9.

81. Tanaka K-I, Kawahara M. Carnosine and lung disease. Current Medicinal Chemistry. 2020;27(11):1714-25.

82. Solana-Manrique C, Sanz FJ, Martínez-Carrión G, Paricio N. Antioxidant and neuroprotective effects of carnosine: therapeutic implications in neurodegenerative diseases. Antioxidants. 2022;11(5):848.

83. Aldini G, de Courten B, Regazzoni L, Gilardoni E, Ferrario G, Baron G, et al. Understanding the antioxidant and carbonyl sequestering activity of carnosine: direct and indirect mechanisms. Free Radical Research. 2021;55(4):321-30.

84. Ihara H, Kakihana Y, Yamakage A, Kai K, Shibata T, Nishida M, et al. 2-Oxo-histidine–containing dipeptides are functional oxidation products. Journal of Biological Chemistry. 2019;294(4):1279-89.

85. Hipkiss AR. Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? The İnternational Journal of Biochemistry & Cell biology. 1998;30(8):863-8.

86. Aldini G, Facino RM, Beretta G, Carini M. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. Biofactors. 2005;24(1-4):77-87.

87. Zhao K, Li Y, Wang Z, Han N, Wang Y. Carnosine protects mouse podocytes from high glucose induced apoptosis through PI3K/AKT and Nrf2 pathways. BioMed Research International. 2019;2019(1):4348973.

88. Fresta CG, Fidilio A, Lazzarino G, Musso N, Grasso M, Merlo S, et al. Modulation of pro-oxidant and pro-inflammatory activities of m1 macrophages by the natural dipeptide carnosine. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(3):776.

89. Caruso G, Di Pietro L, Cardaci V, Maugeri S, Caraci F. The therapeutic potential of carnosine: Focus on cellular and molecular mechanisms. Current Research in Pharmacology and Drug Discovery. 2023;4:100153.

90. Wang Q, Sadati S, Kabthymer RH, Gadanec LK, Lawton A, Tripodi N, et al. The impact of carnosine on biological ageing–A geroscience approach. Maturitas. 2024:108091.

91. Neelakandan A, Bae O-N, Majid A, Burak CA, Rajanikant G. Neuroprotective potential of carnosine in cerebrovascular diseases. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2022;28(1):29.

92. Alsheblak MM, Elsherbiny NM, El-Karef A, El-Shishtawy MM. Protective effects of L-carnosine on CCl4-induced hepatic injury in rats. European Cytokine Network. 2016;27(1):6-15.

93. Sahin S, Uylaş U, Sahinturk V, Alatas O. Protective effect of carnosine on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Osmangazi Tıp Dergisi. 2018;42(3):269-76.

94. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clinical Biochemistry. 2005;38(12):1103-11.

95. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clinical Biochemistry. 2004;37(2):112-9.

96. Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. Rheumatology İnternational. 2008;28:317-21.

97. Chen C, Liu Y-h, Cheng S-B, Wu S-l, Zhai X-j. The hepatoprotective effects of XCHD and MgIG against methotrexate-induced liver injury and inflammation in rats through suppressing the activation of AIM2 inflammasomes. Pathology-Research and Practice. 2020;216(4):152875.

98. Montasser AOS, Saleh H, Ahmed-Farid OA, Saad A, Marie M-AS. Protective effects of Balanites aegyptiaca extract, Melatonin and Ursodeoxycholic acid against hepatotoxicity induced by Methotrexate in male rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2017;10(6):557-65.

99. Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Shahid A, Majed F, et al. Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. Chemico-Biological İnteractions. 2017;272:80-91.

100. Yan Sl, Wu St, Yin Mc, Chen Ht, Chen Hc. Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. Journal of Food Science. 2009;74(8):H259-H65.

101. Özgöçmen M, Aşcı H, Doğan HK, İlhan İ, Pekgöz Ş, Mustafaoğlu A. A study on Wistar Albino rats: investigating protective role of ramelteon on liver damage caused by methotrexate. Drug and Chemical Toxicology. 2022;45(6):2678-85.

102. Gürler M, Selcuk EB, Özerol BG, Tanbek K, Taşlıdere E, Yıldız A, et al. Protective effect of dexpanthenol against methotrexate-induced liver oxidative toxicity in rats. Drug and Chemical Toxicology. 2023;46(4):708-16.

103. Ilhan I, Asci H, Candan IA, Savran M, Imeci OB, Sevuk MA. Cannabidiol mitigates methotrexate-induced hepatic injury via SIRT-1/p53 signaling and mitochondrial pathways: Reduces oxidative stress and inflammation. Drug and Chemical Toxicology. 2025;48(1):210-8.

104. Mahmoud NM, Elshazly SM, El-Shaarawy F, Zaitone SA, Aldahish AA, Ahmed GA, et al. Nitazoxanide mitigates methotrexate hepatotoxicity in rats: role in inhibiting apoptosis and regulating endoplasmic reticulum stress. Frontiers in Pharmacology. 2024;15:1491249.

105. Milewski K, Hilgier W, Fręśko I, Polowy R, Podsiadłowska A, Zołocińska E, et al. Carnosine reduces oxidative stress and reverses attenuation of righting and postural reflexes in rats with thioacetamide-induced liver failure. Neurochemical Research. 2016;41(1):376-84.

106. Poništ S, Slovák L, Kuncírová V, Fedorova T, Logvinenko A, Muzychuk O, et al. Inhibition of oxidative stress in brain during rat adjuvant arthritis by carnosine, trolox and novel trolox-carnosine. Physiological Research. 2015;64.

107. Fayez AM, Zakaria S, Moustafa D. Alpha lipoic acid exerts antioxidant effect via Nrf2/HO-1 pathway activation and suppresses hepatic stellate cells activation induced by methotrexate in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018;105:428-33.

108. Azadian R, Mohammadalipour A, Memarzadeh MR, Hashemnia M, Aarabi MH. Examining hepatoprotective effects of astaxanthin against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats through modulation of Nrf2/HO-1 pathway genes. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2024;397(1):371-80.

109. Li Xy, Gu Xy, Li Xm, Yan Jg, Mao Xl, Yu Q, et al. Supplementation with carnosine, a food-derived bioactive dipeptide, alleviates dexamethasone-induced oxidative stress and bone impairment via the NRF2 signaling pathway. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2025;105(2):1091-104.

110. Afifi NA, Ramadan A, Erian EY, Sedik AA, Amin MM, Hassan A, et al. Synergistic effect of aminoguanidine and l-carnosine against thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats: behavioral, biochemical, and ultrastructural evidence. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2021;99(3):332-47.

111. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016;2016(1):5698931.

112. Elsawy H, Algefare AI, Alfwuaires M, Khalil M, Elmenshawy OM, Sedky A, et al. Naringin alleviates methotrexate-induced liver injury in male albino rats and enhances its antitumor efficacy in HepG2 cells. Bioscience Reports. 2020;40(6).

113. Cure E, Kirbas A, Tumkaya L, Cure MC, Kalkan Y, Yilmaz A, et al. Protective effect of infliximab on methotrexate-induced liver injury in rats: unexpected drug interaction. Journal of Cancer Research and Therapeutics. 2015;11(1):164-9.

114. Chen M, Luo J, Ji H, Song W, Zhang D, Su W, et al. Carnosine reduces serum uric acid in hyperuricemia rats via restoring hepatorenal dysfunction and enhancing uric acid excretion by inhibiting inflammation. Journal of Functional Foods. 2023;110:105863.

115. Fouad AA, Qutub HO, Al Rashed AS, Al-Melhim WN. Therapeutic effect of carnosine in rat model of experimental liver carcinogenesis. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2017;56:10-4.

116. Fleisher-Berkovich S, Abramovitch-Dahan C, Ben-Shabat S, Apte R, Beit-Yannai E. Inhibitory effect of carnosine and N-acetyl carnosine on LPS-induced microglial oxidative stress and inflammation. Peptides. 2009;30(7):1306-12.

117. Kızıl HE, Caglayan C, Darendelioğlu E, Ayna A, Gür C, Kandemir FM, et al. Morin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity via targeting Nrf2/HO-1 and Bax/Bcl2/Caspase-3 signaling pathways. Molecular Biology Reports. 2023;50(4):3479-88.

118. Baykara B, Mıcılı SC, Tugyan K, Tekmen I, Bagriyanik H, Sonmez U, et al. The protective effects of carnosine in alcohol-induced hepatic injury in rats. Toxicology and İndustrial Health. 2014;30(1):25-32.

119. Dibekoğlu C, Kemertaş K, Aygun H, Erbaş O. Ivermectin Attenuates Methotrexate-Induced Liver Fibrosis by Reducing TGF-β and Syndecan-1 Expression. Medicina. 2025;61(6):1036.

120. Abbas NA, El-Sayed SS, Abd El-Fatah SS, Sarhan WM, Sarhan O, Abdelghany E, et al. Losartan prevents methotrexate-induced liver and lung injury in rats via targeting PPAR-γ/TGF-β1/SMAD3 and Nrf2/redox signaling. Zagazig University Medical Journal. 2023;29(1):135-48.

121. Grandini NA, Costa MR, Gregolin CS, Siqueira JS, Vieira TA, Ferron AJT, et al. Effects of carnosine supplementation on markers for the pathophysiological development of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease in a diet-induced model. Molecular and Cellular Endocrinology. 2024;582:112138.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KARAR

Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
05.09.2024	10	327

SDÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05.09.2024 tarihinde saat-10:00'da toplanarak aşağıdaki kararlar alınmıştır;

Karar:327
Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Fevziye Burcu Şirin (Süleyman Demirel Üniversitesi Tıbbi Biyokimya A.D) Yürütücülüğünde,
Yardımcı Araştırmacılar: Dr.Doğukan GÜMÜŞCAN ve Doç.Dr Muhammet Yusuf TEPEBAŞI'ın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı **"Metotreksat ile Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda Karnozinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması"** başlıklı SDÜ bilimsel araştırma projesi etik kurulumuzca oy birliği **UYGUNLUĞUNA** karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kanat GÜLLE Başkan	Prof. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR Başkan Yardımcısı	KATILMADI Prof. Dr. Duygu KUMBUL ÜYE
Doç. Dr. Müge ÇINA ÜYE	Prof. Dr. Ömer ÇELİK ÜYE	KATILMADI Dr.Öğr. Üyesi Mustafa Soner ÖZCAN ÜYE
Dr. Öğr. Uyesi Gülşah USTA SOFU ÜYE	Projede Doç.Dr. Muhammet Yusuf TEPEBAŞI ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Mesut ERGAN ÜYE
Öğr. Gör. Dr. İbrahim ONARAN (HUDAL Sorumlu Veteriner Hekimi) ÜYE	KATILMADI Vet. Hekim Ayşegül AVŞAR SİVİL ÜYE	Nursan BECEREN SİVİL ÜYE

Ek 2. Etik Kurul Onayı

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KARAR

Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
06.11.2025	11	665

SDÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06.11.2025 tarihinde saat-10:00'da toplanarak aşağıdaki kararlar alınmıştır;

Karar:665
Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Fevziye Burcu Şirin (Süleyman Demirel Üniversitesi Tıbbi Biyokimya A.D) Yürütücülüğünde,
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzca 05.09.2024 tarih 10/327 Karar ile Onaylanan
Yardımcı Araştırmacılar: Dr.Doğukan GÜMÜŞCAN ve Doç.Dr Muhammet Yusuf TEPEBAŞI'ın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı **"Metotreksat ile Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda Karnozinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması"** başlıklı çalışmada (Beyin-Böbrek-Kalp-Akciğer-Testis) dokularını kullanılması ve **Kc dokusunda Nrf2/HO-1, Bcl-2, Bax gen ekspresyon düzeyleri incelemesi** etik kurulumuzca oybirliği ile **UYGUNLUĞUNA** karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kadat GULLE Başkan	Prof. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR Başkan Yardımcısı	KATILMADI Prof. Dr. Duygu KUMBUL ÜYE
KATILMADI Prof. Dr. Müge ÇINA ÜYE	Prof. Dr. Ömer ÇELİK ÜYE	Doç.Dr. Mustafa Soner ÖZCAN ÜYE
Doç.Dr. Gülşah ŞTA SOFU ÜYE	Projede Doç. Dr. Muhammet Yusuf TEPEBAŞI ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Mesut ERGAN ÜYE
Öğr. Gör. Dr. İbrahim ONARAN (HÜDAL Sorumlu Veteriner Hekimi) ÜYE	KATILMADI Vet. Hek. Dr. Ayşegül AVŞAR SİVİL ÜYE	Nursan BECİREN SİVİL ÜYE