

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



# **RAT KARACİĞERİNDE METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRES ÜZERİNE RUTİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sueda TÜRK

**Danışman**

Dr. Öğr. Üyesi Filiz KAZAK

**HATAY-2020**

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

**RAT KARACİĞERİNDE METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN  
OKSİDATİF STRES ÜZERİNE RUTİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sueda TÜRK

**Danışman**

Dr. Öğr. Üyesi Filiz KAZAK

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından “**19.YL.067**” no’lu proje olarak desteklenmiştir.

**HATAY-2020**

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

## **RAT KARACİĞERİNDE METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRES ÜZERİNE RUTİNİN ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Sueda TÜRK

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 25/06/2020 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

### **Tez Jürisi:**

Jüri başkanı: Prof. Dr. Meryem EREN

Üye: Doç. Dr. Pınar PEKER AKALIN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Filiz KAZAK

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

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan, sabırla ve ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve bu çalışmanın planlanmasından yazım aşamasına kadar büyük özveriyle destek olan yol gösteren kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Filiz KAZAK’a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca, tez çalışmama verdiği katkıları ve yardımlarından dolayı Doç. Dr. Pınar PEKER AKALIN hocama teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, 19.YL.067 proje numarası ile Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| Kabul ve Onay .....                                                 | II   |
| TEŞEKKÜR.....                                                       | III  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                   | IV   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                               | V    |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                             | VI   |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....                                 | VII  |
| ÖZET .....                                                          | VIII |
| ABSTRACT.....                                                       | IX   |
| 1. GİRİŞ.....                                                       | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                              | 2    |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                             | 7    |
| 3.1. Hayvan Materyali.....                                          | 7    |
| 3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar .....                           | 8    |
| 3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....                             | 8    |
| 3.4. Doku Homojenizasyonu.....                                      | 9    |
| 3.2. Total Protein Düzeylerinin Belirlenmesi .....                  | 9    |
| 3.2. Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi .....                 | 10   |
| 3.2. Vitamin C Düzeylerinin Belirlenmesi.....                       | 10   |
| 3.2. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi .....                | 11   |
| 3.2. NADPH Düzeylerinin Belirlenmesi.....                           | 11   |
| 3.2. Glutasyon Peroksidaz Aktivitelerinin Belirlenmesi .....        | 12   |
| 3.2. Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz Aktivitelerinin Belirlenmesi..... | 12   |
| 3.2. İstatistiksel Analizler.....                                   | 13   |
| 4. BULGULAR .....                                                   | 14   |
| 5. TARTIŞMA.....                                                    | 18   |
| 6. SONUÇ.....                                                       | 21   |
| 7. KAYNAKLAR.....                                                   | 22   |
| EKLER.....                                                          | 25   |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                      | 26   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                         | Sayfa No |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Şekil 2.1. Metotreksatın kimyasal yapısı. ....                                          | 2        |
| Şekil 2.2. Rutin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukosit) kimyasal yapısı..... | 5        |
| Şekil 4.1. Grupların MDA düzeyleri. ....                                                | 14       |
| Şekil 4.2. Grupların Vitamin C düzeyleri.....                                           | 15       |
| Şekil 4.3. Grupların tGSH düzeyleri.....                                                | 15       |
| Şekil 4.4. Grupların NADPH düzeyleri.....                                               | 16       |
| Şekil 4.5. Grupların GPx aktiviteleri. ....                                             | 16       |
| Şekil 4.6. Grupların G6PD aktiviteleri. ....                                            | 17       |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. Karaciğer dokusu oksidan ve antioksidan parametreler ..... 14



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|               |                                         |
|---------------|-----------------------------------------|
| <b>8-OHdG</b> | : 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin          |
| <b>ALP</b>    | : Alkalen fosfataz                      |
| <b>ALT</b>    | : Alanin transaminaz                    |
| <b>AST</b>    | : Aspartat transaminaz                  |
| <b>CAT</b>    | : Katalaz                               |
| <b>G6PD</b>   | : Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz          |
| <b>GPx</b>    | : Glutatyon peroksidaz                  |
| <b>MDA</b>    | : Malondialdehit                        |
| <b>NADPH</b>  | : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat |
| <b>SOD</b>    | : Süperoksit dismutaz                   |
| <b>tGSH</b>   | : Total glutatyon                       |

## ÖZET

### **Rat Karaciğerinde Metotreksat ile Oluşturulan Oksidatif Stres Üzerine Rutinin Etkisi**

Sunulan projede, rutinin rat karaciğerinde metotreksat ile oluşturulan oksidatif stres üzerine olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada 24 adet, Wistar Albino rat (2 aylık, erkek) ile Kontrol (K), Metotreksat (M), Rutin (R), Metotreksat ve Rutin (MR) olmak üzere dört grup oluşturuldu. K ve M gruplarına distile su, R ve MR gruplarına ise rutin 50 mg/kg/gün oral gavaj yoluyla on beş gün boyunca verildi. Ayrıca, çalışmanın sekizinci gününde M ve MR gruplarına metotreksat 20 mg/kg, K ve R gruplarına serum fizyolojik (% 0,9'luk) periton içi (i.p.) uygulandı. Çalışmanın on altıncı gününde karaciğer dokuları çıkarıldı. Karaciğer dokularında malondialdehit (MDA), vitamin C, total glutatyon (tGSH), nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) düzeyleri ile glutatyon peroksidaz (GPx) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) aktiviteleri belirlendi.

M grubunda, diğer gruplara göre MDA düzeyinde artış ve vitamin C düzeylerinde azalış istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p<0,001$ ). M ve MR gruplarında tGSH düzeyinin K grubuna kıyasla düşük olduğu gözlemlendi ( $p<0,05$ ). M grubu NADPH düzeylerinde ve GPx aktivitesinde, K grubuna göre önemli düzeyde azalış olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ). R grubu NADPH düzeyi M grubuna göre yüksek, K grubuna göre düşük bulundu ( $p<0,001$ ). Ayrıca R ve MR grupları GPx aktiviteleri K ve M gruplarına kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ).

Bu çalışmada, metotreksatın karaciğer dokusunda oksidatif hasara yol açtığı ve rutinin metotreksat kaynaklı hepatik hasar üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkileri olduğu belirlendi. Sonuç olarak, rutinin kemoterapötik amaçla uygulanan metotreksatın yan etkilerini azaltmada yararlı olabileceği öngörüldü.

**Anahtar kelimeler:** Rutin, karaciğer, metotreksat, NADPH, vitamin C

## ABSTRACT

### **The Effect of Rutin on Methotrexate-Induced Oxidative Hepatic Damage in Rat**

In this project, it was aimed to investigate the possible protective effects of rutin on methotrexate-induced oxidative hepatic damage in rat.

Twenty-four Wistar Albino rats (2 months old, male) were divided randomly into four groups (n = 6) as Control (C), Methotrexate (M), Rutin (R), Methotrexate and Rutin (MR). C and M received distilled water, R and MR groups received rutin (50 mg/kg/day), orally, for fifteen days. M and MR groups were administered methotrexate (20 mg/kg) intraperitoneally (i.p.) and C and R groups were administered saline (0.9 %) i.p. on the eighth day of the study. Rats were sacrificed at the sixteenth day and liver tissues were removed. The levels of malondialdehyde (MDA), vitamin C, total glutathione (tGSH) and the activities of glutathione peroxidase (GPx) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) were determined colorimetrically.

MDA levels increased and vitamin C levels decreased in the M group compared to other groups ( $p < 0.001$ ). tGSH levels reduced in both M and MR groups compared to C group ( $p < 0.05$ ). A significant decrease in M group NADPH levels and GPx activity compared to C group ( $p < 0.001$ ) was observed. NADPH levels of R group were found to be higher than M group and lower than C group ( $p < 0.001$ ). In addition, it was determined that the activities of GPx in R and MR groups were lower than C and M groups ( $p < 0.001$ ).

In this study, it was determined that methotrexate caused oxidative damage in liver and rutin had protective and ameliorating effects on methotrexate-induced hepatic damage. Consequently, it may be suggested that rutin may be useful in reducing the side effects of methotrexate, applied for chemotherapy.

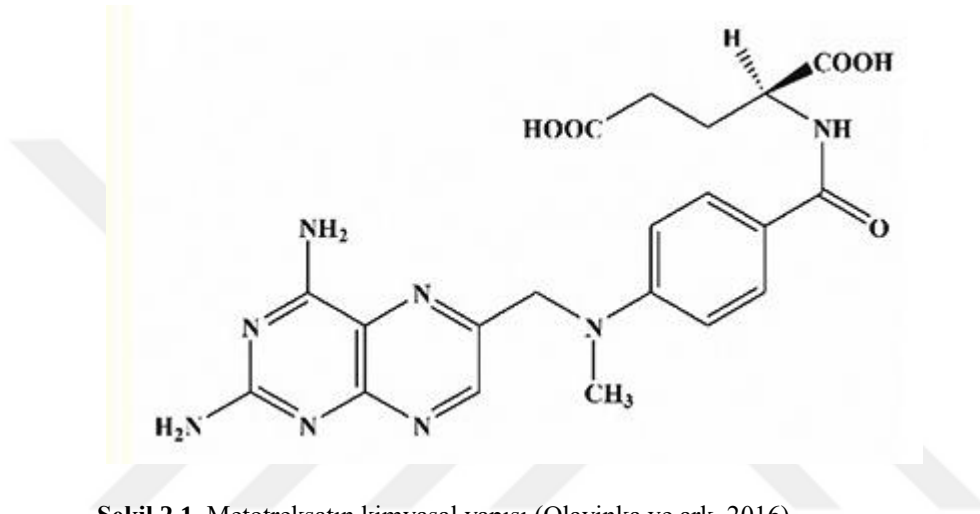
**Key words:** Rutin, liver, methotrexate, NADPH, Vitamin C

## 1. GİRİŞ

Karaciğer, vücuttaki en önemli organlardan biridir. Ayrıca karaciğerin, karaciğer hasarına neden olabilecek ilaç ve çevre kirleticileri gibi kimyasalların detoksifikasyonuna benzer birçok görevi bulunmaktadır (Çetin ve ark. 2008). İnsan ve hayvan çalışmaları, bazı ilaçların ve kimyasal ajanların potansiyel hepatotoksik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Adikwu ve Deo 2013). İlaça bağlı karaciğer hasarı, ilaçların onaylanmaması, geri çekilmesi ve pazarlama sonrası düzenleyici faaliyetlerin en sık nedenlerinden biridir. Son on yılda, ilaca bağlı karaciğer hasarının önemli ölçüde artması, klinisyenler, akademisyenler, düzenleyici kurumlar ve ilaç şirketleri tarafından büyük ilgi görmektedir. Hepatotoksisite, binden fazla ilaca bağlanmıştır ve sessiz bir subklinik hastalık olarak mevcut olabilir veya birden fazla klinik bulgu ile ilişkilendirilebilir (Mahmoud ve ark. 2017). İlaça bağlı hepatotoksisite, hepatosellüler ölüm, inflamasyon ve akut karaciğer yetmezliği ile sonuçlanabilir (Yuan ve Kaplowitz 2013, Mahmoud ve ark. 2017). Hepatotoksisite, dünyadaki akut karaciğer hastalığının ve karaciğer transplantasyonunun en önemli nedenlerinden biridir (Malayeri ve ark. 2020). Son zamanlarda, antikanser ilaçlar ile yapılan hepatotoksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerinde durulmaktadır (Nafees ve ark. 2015, Armağan 2015, Pınar ve ark. 2018). Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan metotreksatın, karaciğerdeki metabolizması sırasında meydana gelen oksidatif reaksiyonlar nedeniyle, toksik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Chládek ve ark. 1997). Ayrıca, metotreksat kaynaklı karaciğer toksisitesinin önlenmesi ya da tedavisi için çeşitli antioksidan ve antienflamatuar maddelerin kullanımı önerilmektedir (Pınar ve ark. 2018). Rutinin, hepatotoksisiteye karşı koruyucu etkisini, reaktif oksijen türleri kaynaklı oksidatif stres ve eşzamanlı inflamasyonu hafifleterek gösterdiği de öne sürülmüştür (Nafees ve ark. 2015). Bu anlamda, sunulan çalışmada bir antikanser ilacı olan metotreksat ve antioksidan özelliklere sahip olan rutin kullanıldı. Bu çalışmada, rutinin metotreksat kaynaklı karaciğer toksisitesinde oksidatif stres üzerindeki koruyucu ve iyileştirici etkileri biyokimyasal parametreler ile değerlendirildi.

## 2. GENEL BİLGİLER

Metotreksat, dihidrofolattan tetrahidrofolat oluşumunda görev alan dihidrofolat redüktazı inhibe eden ve sonuç olarak DNA sentezini ve hücre proliferasyonunu inhibe eden bir antimetabolittir. Metotreksat, folatın 4-amino, 10-metil analogudur (Şekil 2.1) (Olayinka ve ark. 2016).



Şekil 2.1. Metotreksatın kimyasal yapısı (Olayinka ve ark. 2016).

Metotreksat, karaciğerde bir enzimatik sistem aracılığı ile başlıca metaboliti olan 7-hidroksimetotreksata dönüşür. Primer olarak böbrekler, az bir miktar safra ve dışkı ile atıldığı bildirilmektedir (Armağan 2015). Metotreksat, çeşitli romatolojik (Malik ve Ranganathan 2013), onkolojik (Ayad ve ark. 2014), dermatolojik (Sakthiswary ve Suresh 2014) ve enflamatuvar hastalıkları tedavi etmek için sıklıkla kullanılan bir dihidrofolat redüktaz inhibitörüdür. Metotreksat, romatoid artrit (Malik ve Ranganathan 2013) ve sedef hastalığının (Roenigk ve ark. 1998) tedavisinde en çok tercih edilen steroid koruyucu immünsüpresandır. Metotreksatın düşük dozda oral yolla uygulanması ile tamamına yakını gastrointestinal sistemden emilirken, yüksek dozlarda gastrointestinal sisteminden emilimi az olduğu için intravenöz olarak uygulanması tercih edilmektedir (Armağan 2015). Bununla birlikte, metotreksatın yüksek dozda ve sürekli kullanımı ile özellikle karaciğer üzerine olumsuz yan etkileri olduğu (Holmboe ve ark. 2012), ayrıca vücut ağırlığında belirgin bir azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (Mahmoud ve ark. 2017). Osteosarkom hastalarında yüksek doz metotreksat kemoterapisinin, hepatotoksisite gelişimine neden olduğu bildirilmiştir (Holmboe ve ark. 2012). van Outryve ve ark. (2002), meme kanseri olan

hastada metotreksat tedavisi sırasında, karaciğer biyopsisinde ikinci derecede toksik hepatit olgusunun şekillendiğini rapor etmiştir. Araştırmalar metotreksatın, kanser tedavisi sırasında veya sonrasında, karaciğer toksisitesi riskini arttırdığı bildirilmiştir (King ve Perry 2001, Mulder ve ark. 2019). Kısacası, metotreksat, farklı kanser türlerini tedavi etmek amacı ile kullanılan bir ilaç olup, metotreksatın kullanımı ile sık görülen bir komplikasyon olan hepatotoksiste, metotreksatın klinik kullanımını sınırlamaktadır (Ali ve ark. 2017, Mehrzadi ve ark. 2018).

Literatür taramalarına göre, deneysel çalışmalarda, metotreksat (20 mg/kg) uygulanan ratlarda, hepatik lobül, hepatositler ve sinüzoidlerin normal histolojik yapısının bozulduğu bildirilmiştir (Mahmoud ve ark. 2017). Mikroskopik incelemelerde, hepatik steatoz, mononükleer hücre infiltrasyonu, hepatositlerin hidropik dejenerasyonu ve vakuolizasyonu gibi bulguların olduğu tespit edilmiştir (Mahmoud ve ark. 2017). Metotreksatın enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu, şiddetli hepatosit dejenerasyonu, safra kanalı hiperplazisi, hiperemi, sinüzoidal dilatasyon ve nekrozu indüklediği gösterilmiştir (Erdoğan ve ark. 2015, Moghadam ve ark. 2015). Metotreksat, steatoz, kolestaz, fibroz ve siroz gibi karaciğer hepatotoksitesine neden olabilir (Vonen ve Mørland 1984).

Serum aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT) ve alkalen fosfataz (ALP) aktivitelerindeki artış, karaciğerin hasarlı yapısal bütünlüğüne bağlanmıştır, çünkü bu enzimler normal olarak sitoplazmada bulunur ve hücrel hasardan sonra dolaşıma salınır. Bu enzimlerin hepatotoksiste durumunda değerlendirilmesi, karaciğer hasarının teşhisinde kullanılmaktadır (Hyder ve ark. 2013; Malayeri ve ark. 2020). Test edilen bu enzimler, hepatoselüler hasar için duyarlı ve kantitatif belirteçlerdir. Enzimlerin dolaşım düzeylerinin ölçümü, ilaca bağlı karaciğer hasarını değerlendirmek için yararlı bir araçtır (Mahmoud ve ark. 2017). Önceki çalışmalar, metotreksat uygulamasını takiben, karaciğer hasarını gösteren ALT, AST, ALP, gama-glutamil transpeptidaz, laktat dehidrogenaz ve bilirubin gibi karaciğer fonksiyon belirteçlerinin serum seviyelerinin yüksek olması ile metotreksatın hepatotoksisteye neden olduğunu göstermiştir (Erdoğan ve ark. 2015, Mahmoud ve ark. 2017, Hoshyar ve ark. 2019, Malayeri ve ark. 2020). Serum ALT aktivitesi, karaciğerin değerlendirilmesinde AST aktivitesine göre daha spesifiktir. Ayrıca, AST aktivitesinin uzun süreli karaciğer toksisitesi için spesifik bir belirleyici olduğu düşünülmektedir (Erdoğan ve ark. 2015). Ek olarak, metotreksatın serum albümininde belirgin bir azalma ve artan toplam

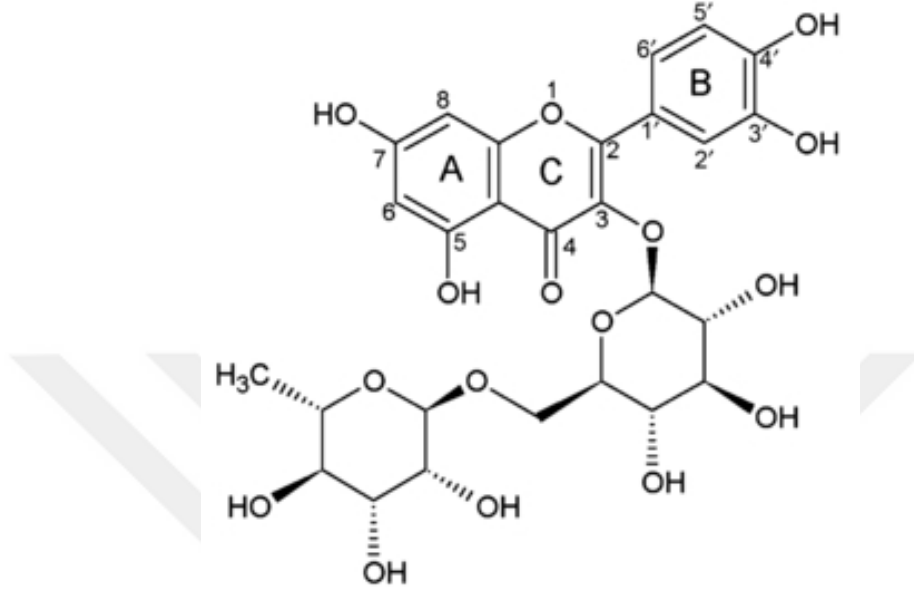
bilirubin seviyelerine eşlik eden bir durum sergilediği rapor edilmiştir (Mahmoud ve ark. 2017).

Metotreksat ile indüklenen hepatotoksisitenin altında yatan kesin mekanizmalar tam olarak belirlenmiş olmasa da, artan reaktif oksijen türleri ve azalan antioksidan enzim aktiviteleri sonucu oksidan antioksidan dengenin bozulmasının merkezi bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Ali ve ark. 2017, Mahmoud ve ark. 2017, Pınar ve ark. 2018, Kalantari ve ark. 2019, Malayeri ve ark. 2020). Metotreksatın karaciğer dokusunda miyeloperoksidaz (Mehrzadi ve ark. 2018, Pınar ve ark. 2018), nitrik oksit (Mahmoud ve ark. 2017, Mehrzadi ve ark. 2018, Hoshyar ve ark. 2019, Malayeri ve ark. 2020) ve malondialdehit (MDA) (Pınar ve ark. 2018, Hoshyar ve ark. 2019, Malayeri ve ark. 2020) seviyelerini arttırdığına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Antioksidan sistem ve metotreksat üzerine yapılan çalışmalar, metotreksatın karaciğer glutatyon (GSH) (Mahmoud ve ark. 2017, Mehrzadi ve ark. 2018, Malayeri ve ark. 2020) düzeyi ve süperoksit dismutaz (SOD) (Mahmoud ve ark. 2017, Hoshyar ve ark. 2019), katalaz (CAT) (Çetin ve ark. 2008, Malayeri ve ark. 2020), glutatyon peroksidaz (GPx) (Mahmoud ve ark. 2017, Malayeri ve ark. 2020) ve glutathion-s-transferaz (Olayinka ve ark. 2016, Mahmoud ve ark. 2017) enzim aktivitelerini düşürdüğü rapor edilmiştir.

Metotreksat hücrelerde sitosolik nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)'ı inhibe eder. Glutatyon redüktaz, glutatyon seviyelerini korumak için NADPH'ı kullanır. Glutatyon, önemli bir sitosolik radikal temizleyicidir. Metotreksat glutatyon seviyesinde azalmaya yol açmaktadır (Pınar ve ark. 2018). Reaktif oksijen türleri hücresel makromoleküllere zarar verebilir ve lipid peroksidasyonunu ve hücre ölümünü başlatabilir (Mahmoud ve ark. 2017). Bu nedenle, oksidatif stresin azaltılması, metotreksat kaynaklı hepatotoksisiteye karşı korunmak için etkili bir stratejiyi temsil edebilir (Mahmoud ve ark. 2017). Metotreksat kaynaklı karaciğer toksisitesinin tedavisi için çeşitli antioksidan ve antienflamatuar maddeler kullanılabilir (Pınar ve ark. 2018). Doğal ajanlar, uzun süreli oksidatif stres ve özellikle reaktif oksijen türleri ile ilişkili olan karaciğer fibrozu ve siroz gibi karaciğer hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde etkilidir (Kalantari ve ark. 2019).

Rutin rutosid, rutin trihidrat, kuersetin-3-O-rutinosid, fitomin ve sophorin olarak da adlandırılan, bir narenciye flavonoididir (Shenbagam ve Nalini 2011, Nafees ve ark. 2015). Rutin, ağırlıklı olarak karabuğday, kıvılcık, dut, narenciye meyve ve meyve kabuklarında bulunan flavonoldür (Singh ve ark. 2019). Ayrıca, çay, elma ve çarkıfelek çiçeği gibi

bitkilerde de bulunduğu bilinmektedir. Rutin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukosit) kimyasal olarak, disakkarit rutinoz ile birlikte flavonolik aglikon kuersetin içeren bir glikozittir (Şekil 2.2) (Shenbagam ve Nalini 2011).



**Şekil 2.2.** Rutin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukosit) kimyasal yapısı (Shenbagam ve Nalini 2011).

Rutin anti-oksidan, sitoprotektif, vazoprotektif, anti-karsinojenik, hepatoprotektif (Aziza ve ark. 2014, Singh ve ark. 2019), renoprotektif (Nafees ve ark. 2015) kardiyoprotektif (Lv ve ark. 2018) ve nöroprotektif (Enogieru ve ark. 2015) gibi çeşitli etkileri bulunmaktadır (Ganeshpurkar ve Saluja 2017). Rutinin yüksek metabolizma, zayıf emilim ve hızlı atılım nedeniyle düşük biyoyararlanımı, genellikle terapötik bir ajan olarak prospektif kullanımını kısıtladığı düşünülmektedir (Enogieru ve ark. 2015, Maciej ve ark. 2018). Bir kuersetin glikonu olan rutin, bağırsakta kuersetine hidrolize edilir ve kuersetin (%53) olarak emilir ve protokateşik asit, 3,4-dihidroksifenil-asetik asit, 3-hidroksifenil asetik asit-3-(3-hidroksifenil) propiyonik asit gibi kuersetinin konjuge metabolitleri şeklinde de kolonda mevcuttur (Manach ve ark. 1995).

Rutin, siklofosfamide (antikanser ajan) bağlı hepatotoksisiteye karşı koruyucu etkisini, nükleer faktör kappa B ve mitojen aktive protein kinaz sinyalizasyon yolağına müdahale ederek reaktif oksijen türleri kaynaklı oksidatif stresi ve eşzamanlı inflamasyonu hafifleterek gösterdiği öne sürülmüştür (Nafees ve ark. 2015). Singh ve ark. (2019), rutin eritrositlerin ve karaciğerin antioksidan durumunu, nükleer faktör eritroid 2 ve

indüklenebilir nitrik oksit sentaz sinyalizasyon yollarını düzenleyerek, t-bütil hidroperoksite bağlı oksidatif strese karşı koruduğunu sunmuşlardır. Çağlayan ve ark. (2019), rutin in oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozu önleyerek, civa-klorür kaynaklı hepatotoksisiteyi etkili bir şekilde baskıladığını göstermiştir. Aziza ve ark. (2014), rutin in ratlarda aşırı demir verilerek oluşturulan hepatik oksidatif strese karşı GSH düzeyi, CAT ve SOD aktivitelerini arttırarak, iyileştirici rolü olduğunu bildirmiştir. Çok değerlikli metal iyonlarını, özellikle çinko, kalsiyum ve demiri şelatlamak için güçlü bir yeteneğe sahip olan rutin in, ratlarda karbon tetraklorür kaynaklı karaciğer yaralanmalarına karşı hepatoprotektif etkisi olduğu rapor edilmiştir (Khan ve ark. 2012). Shenbagam ve Nalini (2011), ratlarda rutin in etanole bağlı hepatotoksisite üzerindeki etkisini, lipit peroksidasyonunu önleyerek, antioksidanların bileşimini optimize ederek, karaciğer fonksiyon biyobelirteç enzimlerinin aktivitelerini arttırarak, hepatoprotektif bir ajan olduğunu göstermiştir. Kadmiyum ve etanole maruz kalan ratlarda rutin in, peroksidatif hücre zarı hasarını, serum bilirubin, kolesterol seviyelerini azaltarak, karaciğer fonksiyon bozukluğu riskini azaltabildiği rapor edilmiştir (Abarikwu ve ark. 2017). Erdoğan ve ark. (2015), metotreksat kaynaklı karaciğer hasarında, rutin in karaciğer serum ALT düzeyleri ve MDA düzeylerini düşürdüğünü, SOD ve GPx aktivitelerini ise yükselttiğini bildirmiştir. Bu yüzden, rutin çeşitli klinik durumlarda tedavi amaçlı metotreksat kullanımı sırasında gözlemlenen hepatik yan etkileri azaltmak için potansiyel bir adjuvan ilaç olabilir.

Sunulan çalışma ile metotreksat kaynaklı oksidatif streste bir flavonoid olan rutin in rat karaciğer dokusu üzerine koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı. Rutin in karaciğer dokusu üzerine koruyucu etkisi, MDA, Vitamin C, tGSH, NADPH düzeyleri ile GPx ve G6PD aktivitelerinin belirlenmesi ile biyokimyasal yöntemlerle ortaya konuldu. Sunulan çalışma ile kemoterapötik olarak kanser tedavisinde kullanılan metotreksatın karaciğer dokusunda meydana getirdiği yan etkilere karşı, rutin in koruyucu ya da destekleyici etkinliği olup olmadığı belirlenerek, rutin in olası etkilerinin kanser ve kemoterapi ile ilgili yapılacak bilimsel çalışmalara katkı sağlayabileceği öngörüldü. Ayrıca projeden elde edilmesi hedeflenen bulguların karaciğerde oksidatif hasar ile oluşacak hepatotoksisite tedavisinde rutin in kullanımı konusunda yapılacak bilimsel çalışmalara da katkı sağlayabileceği düşünüldü.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hayvan Materyali

Sunulan çalışmada, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, 24 adet, 2 aylık, erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Çalışma protokolü Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (2019/07-12, 10/09/2019) ve deneysel çalışmalar etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi. Ratlar, adaptasyon amacıyla, projede öngörülen deneme planına başlanmadan 1 hafta önce temin edildi. Ratların standart polipropilen kafeslerde, 20-22°C'lik oda ısısında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlıkta barınmaları ve standart rat yemi ve su ile *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Ratlara 20 mg/kg metotreksat (Koçak, Türkiye) tek doz periton içi (i.p.) uygulandı (Mahmoud ve ark. 2017). Rutin (Rutin hydrate, Abcr, Almanya) uygulaması için, rutin 50 mg/kg/rat/gün distile suda çözeltisi hazırlandı ve oral gavaj yoluyla verildi (Kamel ve ark. 2014). Ratlardan, her grupta eşit sayıda (n=6) olacak şekilde dört grup oluşturuldu.

#### Gruplar:

**Kontrol (K) Grubu:** Ratlara 0,5 ml distile su oral gavaj yolu ile on beş gün boyunca verildi. Sekizinci gün %0.9'luk serum fizyolojik (0,5 ml/rat) bir kez periton içi uygulandı.

**Metotreksat (M) Grubu:** Ratlara, 0,5 ml distile su oral gavaj yolu ile on beş gün boyunca verildi ve sekizinci gün metotreksat 20 mg/kg dozda periton içi uygulandı.

**Rutin (R) Grubu:** Ratlara rutin 50 mg/kg/gün (0,5 ml distile suda çözündürülerek) dozunda oral gavaj yolu ile on beş gün boyunca verildi. Sekizinci gün %0.9'luk serum fizyolojik (0,5 ml/rat) bir kez periton içi uygulandı.

**Metotreksat ve Rutin (MR) Grubu:** Ratlara rutin 50 mg/kg/gün (0,5 ml distile suda çözündürülerek) dozunda oral gavaj yolu ile on beş gün boyunca verildi. Sekizinci gün metotreksat 20 mg/kg dozda periton içi uygulandı.

Çalışmanın on altıncı günü, tüm ratlar ksilazin+ketamin anestezisi altında sakrifiye edilerek, karaciğer dokuları alındı.

### 3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Distile su cihazı (Thermo scientific, Almanya ve Prizma, Türkiye), spektrofotometre (UV 2100 UV–VIS Recording Spectrophotometer Shimadzu, Japonya), santirifüj cihazı (Nüve NF 1200 R, Türkiye), multikanal pipet (KF10858, Isolab, Almanya), yarı otomatik pipetler (Brand, Almanya), su banyosu (WiseBath fuzzy control system, Wisd, Almanya), manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001, Almanya), pH metre (Orion 420A, Japonya), derin donduruculu buzdolabı (Ariston MTB 4011NFTK, İtalya), vorteks (Labnet, Amerika), buz makinası (Hoshizaki FM-80EE, Avrupa) hassas terazi (Pioneer Ohaus PA214C, Amerika), ultrasonik homojenizatör ve güç kaynağı (Bandelin Electronic UW 2070, Almanya), ELİSA okuyucu (BioTek MQuant, Amerika) kullanıldı.

### 3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fosfat tamponu (PBS, P4417, Sigma, Amerika), bakır sülfat beş hidrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , UN3077, Carlo Erba, İspanya), sodyum potasyum tartarat (Na-K tartarat tetrahydrate, 474117, Carlo Erba, İspanya), sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , AM1157792, Merck, Almanya), sodyum hidroksit (NaOH, B1366762706, Merck, Almanya), folin fenol belirteci (Folin-Ciocalteu's reagent, E463562, Carlo Erba, İspanya), sığır serum albümini (BSA, A2153 Sigma, Amerika) trikloroasetik asit (TCA, 807, Merck, Almanya), tiyobarbitürik asit (TBA, 1.08180.0025 Merck, Almanya), 1,1',3,3'-tetraetoksipropan (A0385302, Acros Organics, Almanya), sülfürik asit (%96  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , UN1830, Carlo Erba, İspanya), L-askorbik asit (A5960, Sigma, Amerika), tioüre (T7875, Sigma, Amerika), 2,4-dinitrofenil hidrazin (D19303, Sigma, Amerika), disodyum hidrojen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6580, Merck, Almanya), disodyum etilendiamintetraasetat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , E1644, Sigma, Amerika), redükte glutatyon (rGSH, G4251, Sigma, Amerika), sodyum azid (Na-azid, S8032, Sigma, Amerika) hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1.08600, Merck, Almanya), amonyum sülfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1216, Merck, Almanya), glutatyon redüktaz (G3664 Sigma, Amerika), NADPH (N1630, Sigma, Amerika), Tris (VWR 28811.295, Merck, Almanya), hidroklorik asit (%37 HCl, K30667014, Merck, Almanya), magnezyum klorür ( $\text{MgCl}_2$ , M2670, Sigma, Amerika) beta-NADP<sup>+</sup> sodyum tuzu (N8160, Sigma, Amerika), G-6-P monosodyum tuzu (G7879, Sigma, Amerika).

### 3.4. Doku Homojenizasyonu

Biyokimyasal analizlerde kullanılacak karaciğer doku numunelerinin homojenizasyonunu hazırlamak amacı ile 1 g karaciğer dokusu alındı ve 10 ml fosfat tamponunda ultrasonik homojenizatör ile homojenize edildi. Homojenat içeren tüpler +4°C'de, 5000 rpm'de, 30 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonrası süpernatantlar elde edildi. Süpernatantlar, total protein ve oksidan antioksidan parametrelerin analizleri yapılmaya kadar -80°C'de muhafaza edildi. Karaciğer dokusu homojenatlarında, total protein, MDA, tGSH, Vitamin C ve NADPH düzeyleri ile G6PD ve GPx aktiviteleri, kolorimetrik olarak ölçüldü.

### 3.5. Total Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Protein düzeylerinin belirlenmesinde Lowry ve ark. (1951) tarafından bildirilen yöntem ve protein standartı olarak da sığır serum albumini kullanıldı.

**Prensip:** Alkali ortamda  $\text{Cu}^{+2}$ , proteinin yapısını oluşturan peptit bağlarıyla birleşerek  $\text{Cu}^{+1}$ 'e indirgenir ve biüret kompleksini oluşturur. Daha sonra, Folin ve Ciocalteu'nun fenol reaktifi ilave edilir ve fosfotungstik ve fosfomolibdik asitlerin indirgenmesiyle molibdenyum mavisi ve tungsten mavisi renkleri meydana gelir.

**Yapılışı:** Numune ve standart tüplerine 10 µl doku homojenatı ve standart çözeltisi eklendi. Kör tüpüne 10 µl distile su eklendi. Tüplere çalışma reaktifinden (0.1 N NaOH'te % 2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 'ın çözeltisi, % 1'lik  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi, % 2'lik Na-K tartarat çözeltisi (98v/v/v)) 2,5 ml eklendi. Tüpler vortekslendi ve 25 °C sıcaklıkta 10 dakika bekletildi. Hacimsel olarak bire bir oranda distile su ile hazırlanan folin-fenol reaktifi 0,25 ml miktarında tüplere eklendi. Tüpler karıştırıldı ve 25 °C sıcaklıkta 30 dakika bekletildikten sonra, absorbanslar spektrofotometrede 700 nm'de köre karşı okundu. Sığır serum albümini, standart olarak kullanıldı. Protein düzeyleri, standart ile çizilen absorbans-konsantrasyon grafiği üzerinden hesaplandı.

### 3.6. Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi

Malondialdehit düzeylerinin belirlenmesinde Ohkawa ve ark. (1979) tarafından bildirilen yöntem ve MDA standartı için 1,1',3,3'-tetraetoksipropan kullanıldı.

**Prensip:** Doku MDA tayini; aerobik şartlar altında ve pH:3.5'te, doku homojenatının kaynar su banyosunda bir saat inkubasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile oluşturduğu pembe renkli kompleks meydana gelir.

**Yapılışı:** Analiz tüplerine 0,25 ml karaciğer homojenatı, kör tüpüne ise 0,25 ml distile su konularak, tüm tüpler üzerine 0,5 ml % 10'luk TCA, 0,5 ml % 0,67'lik TBA eklendi. Tüpler karıştırıldı ve su banyosunda 95°C'de 30 dakika inkübe edildi. Tüpler +4 °C'de 4100 rpm'de 10 dakika santrüfjü edildi. Elde edilen süpernatantların, absorbansları spektrofotometrede 535 nm'de okundu. Malondialdehit standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplandı. Dokuların MDA düzeyi nmol/g doku olarak sunuldu.

### 3.7. Vitamin C Düzeylerinin Belirlenmesi

Vitamin C düzeylerinin belirlenmesinde Haag (1985), tarafından bildirilen yöntem ve vitamin C standartı için L-askorbik asit kullanıldı.

**Prensip:** Vitamin C (askorbik asit) hafif oksitleyici etkenlerle dehidro askorbikasite dönüşür, dehidro askorbik asit hafif asit solüsyonlarda yavaş bir şekilde diketogulonikasite dönüşür. Dehidro askorbik asit ve diketogulonik asit, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile reaksiyona girerek bis 2,4-dinitrofenilhidrazonu oluşturur.

**Yapılışı:** Mikropleyt kuyucuklarına örnek, standart ve körden (distile su) 50 µl eklendi. Her kuyucuğa %6 TCA'dan 50 µl eklendi ve karıştırıldı. Her kuyucuğa 20 µl renk reaktifi (temel çözelti (50 ml 4,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisinde 1 g dinitrofenil hidrazin çözündürülür, bir gece +4°C'de bekletilip, ertesi gün süzülür), %5 tioüre ve % 0,6'lık CuSO<sub>4</sub> çözeltileri (20v/v/v))'inden eklendi ve karıştırıldı. Mikropleytin üzeri jelatin bantla sıkıca kapatıldı, karıştırıldı ve 38°C'de 4 saat inkübe edildi. Her kuyucuğa soğuk 100 µl 12 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'den eklendi. İlk 5 dakika içerisinde kuyucuklardaki optik dansite, ELISA reader cihazında 520 nm'de belirlendi.

### 3.8. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Dokularda glutasyon düzeylerinin belirlenmesi için rat tGSH kiti (Bioxytech GSH-420TM kiti, OxisResearch, Amerika) kullanıldı. Bu amaçla üretici firmanın belirttiği prosedür takip edildi. Sonuçlar, bu parametreye özgü standart eğrinin kullanılması ile hesaplandı. Dokuların tGSH düzeyi  $\mu\text{mol/g}$  protein olarak sunuldu.

**Prensip:** Yöntem, kromoforik bir tiyon oluşumuna dayanır. Reaksiyon için üç adım vardır. İlk olarak numune tamponlanır ve indirgenmiş duruma (GSH) yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG) azaltmak için indirgeyici madde, tris (2 karboksietil) fosfin (TCEP) eklenir (Burns ve ark. 1991). Kromojen, 4-kloro-1-metil-7-triflorometilkinolinyum metilsülfat, numunede bulunan tüm tiyoller ile tiyoeterler oluşturarak ilave edilir. PH değerini 13'ten daha fazla yükseltmek için baz ilave edilmesi üzerine, GSH-tiyoeter'e özgü bir b-eliminasyonu, kromoforik tiyon ile sonuçlanır.

**Yapılışı:** Mikropleyt kuyucuklarına örnek, standart ve kördan 100  $\mu\text{l}$  eklendi. Her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  buffer, 100  $\mu\text{l}$  kromojen, 100  $\mu\text{l}$  color developer (her bir ekleme işlemi sonrası karıştırma yapıldı) eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, kuyucuklardaki optik dansite, ELISA reader cihazında 420 nm'de belirlendi.

### 3.9. NADPH Düzeylerinin Belirlenmesi

Dokularda NADPH düzeylerinin belirlenmesi için NADP/NADPH Quantitation kiti (MAK038, Sigma-Aldrich, Amerika) kullanıldı. NADPH analizi için üretici firmanın belirttiği prosedür takip edildi. Sonuçlar, bu parametreye özgü standart eğrinin kullanılması ile hesaplandı. Dokuların NADPH düzeyi  $\text{nmol/g}$  doku olarak sunuldu.

**Prensip:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, birçok redoks reaksiyonunda indirgenmiş (NADPH) ve oksitlenmiş (NADP) formlar arasında değişerek yer alan enzimatik bir kofaktördür (Berríos-Rivera ve ark. 2002). NADP/NADPH Quantitation kiti, hücre içi nükleotitlerin, NADP ve NADPH'nin ve bunların oranının hassas bir şekilde saptanması için uygun bir araç sağlar. Bu ticari kit NADP ve NADPH için spesifiktir ve NAD veya NADH'yi tespit etmez. NADPt (NADP ve NADPH) veya NADPH ölçülür.

**Yapılışı:** Mikropleyt kuyucuklarına örnek, standart ve körden (distile su) 60 µl eklendi. Her kuyucuğa 50 µl extraction bufferdan eklendi. Mikropleytin üzeri jelatin bantla sıkıca kapatıldı, karıştırıldı ve 60°C’de 30 dakika inkübe edildi, daha sonra buz üzerinde soğutuldu. Her kuyucuğa 50 µl master reaction mix eklendi. Mikropleytin üzeri jelatin bantla sıkıca kapatıldı, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Her kuyucuğa 10 µl NADPH developer eklendi. Mikropleytin üzeri jelatin bantla sıkıca kapatıldı, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Her kuyucuğa 10 µl stop solution eklendi. Absorbanslar, ELISA reader cihazında 450 nm’de belirlendi.

### 3.10. Glutasyon Peroksidaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Glutasyon peroksidaz, redükte glutasyonu kullanarak  $H_2O_2$ ’nin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Dokularda GPx aktivitelerinin belirlenmesinde Beutler (1975), tarafından bildirilen yöntem kullanıldı.

**Prensip:** Glutasyon peroksidaz,  $H_2O_2$  varlığında GSH’yi okside glutasyon (GSSG)’a dönüşmesini katalize eder.  $H_2O_2$ ’nin bulunduğu ortamda GPx’in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımıyla tekrar GSH’a dönüştürülür. GPx aktivitesi, deney ortamındaki NADPH’ın  $NADP^{+}$ ’ya çevrilmesi ile optik dansitede meydana gelen absorbans farkının 340 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hesaplanır. Glutasyon peroksidaz aktivitesi U/g protein olarak sunuldu.

**Yapılışı:** Türlerle örnek ve kör (distile su) 20 µl konuldu. Tüm tüplere, 2650 µl EDTA’lı fosfat tamponu (50 mM) 100 µl rGSH (150 mM), 100 µl NADPH (2 mM), 10 µl glutasyon redüktaz, 0,01 ml Na-azid eklendi. Tüpler karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Her bir tüpe 100 µl  $H_2O_2$  çözeltisi eklendi. Absorbanslar, spektrofotometre cihazında 340 nm’de belirlendi.

### 3.11. Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz aktivitesinin belirlenmesinde Beutler (1971), tarafından bildirilen yöntem kullanıldı.

**Prensip:** NADP<sup>+</sup> indirgenmesinden dolayı oluşan NADPH'nin absorbans vermesi esasına dayanır. Aktivite tayini, 25°C'deki NADP<sup>+</sup>'nin 340 nm'deki absorbans değişimi spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hesaplanır. Dokuların G6PD aktivitesi U/g protein olarak sunuldu.



**Yapılışı:** Tüplerden örnek tüpüne 200 µl örnek+400 µl distile su; kör tüpüne ise 600 µl distile su konuldu. Daha sonra, tüpler üzerine 100 µl Tris-HCl tamponu (1 M), 100 µl MgCl<sub>2</sub> (0,1 M) eklendi. Tüpler karıştırıldı ve 37°C'de 10 dakika bekletildi. Tüplere 100 µl G-6-P (6 mmol/L) ve 100 µl NADP (2 mmol/L) eklendi. Spektrofotometre cihazında 340 nm'de absorbanslar, 2 dakika boyunca absorbans takip edilerek belirlendi.

### 3.12. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler SPSS 22.0 bilgisayar programında istatistiki olarak değerlendirildi. Normalite ve varyans analizleri sonrası, çoklu grupların karşılaştırılması One way ANOVA ve post-hoc Duncan testi ile belirlendi. p<0,05 önem düzeyi istatistiki olarak önemli kabul edildi.

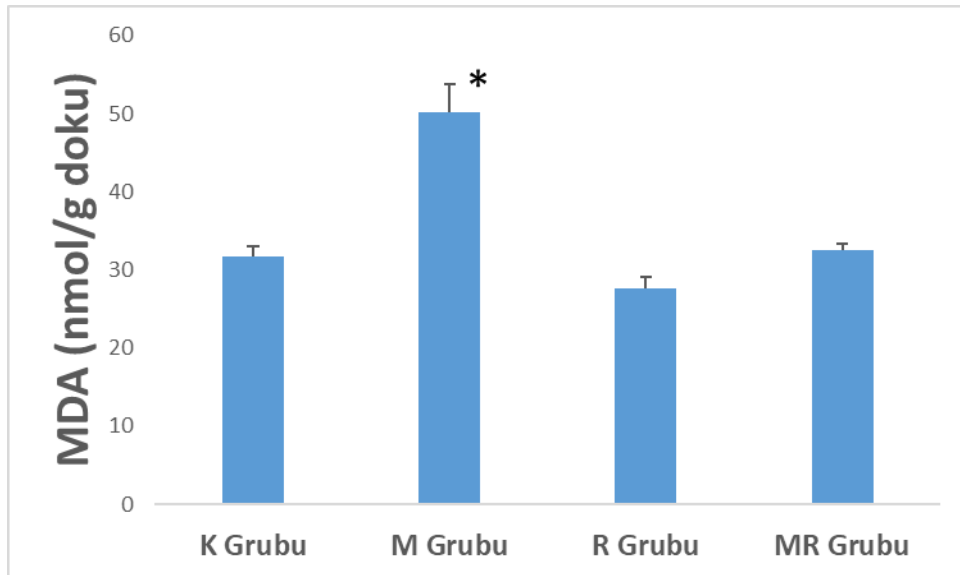
#### 4. BULGULAR

Karaciğer dokusunda MDA, Vitamin C, tGSH, NADPH düzeyleri ile GPx ve G6PD aktivitelerine ilişkin veriler Çizelge 4.1’de sunuldu.

Çizelge 4.1. Karaciğer dokusu oksidan ve antioksidan parametreler ( $\bar{x} \pm Sh$ )

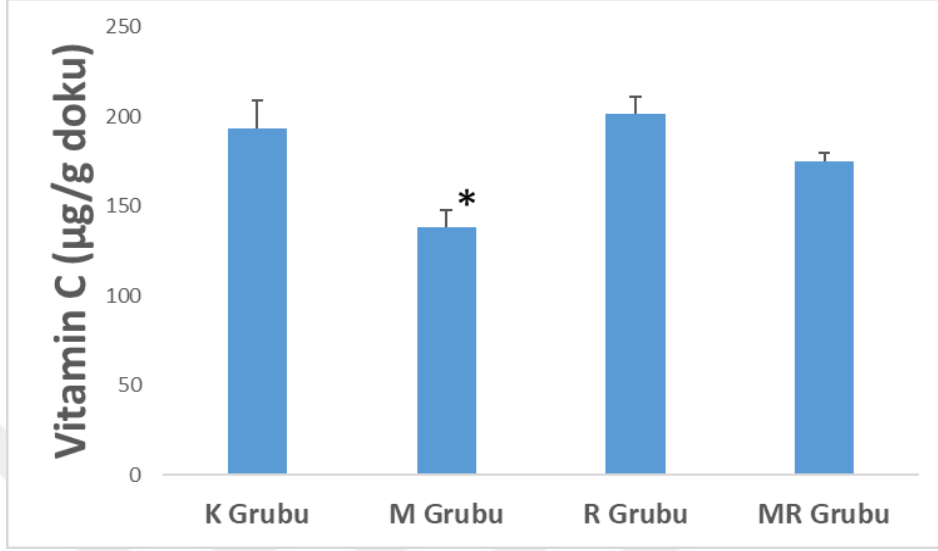
| Gruplar | MDA                           | Vitamin C                       | tGSH                           | NADPH                           | GPx                           | G6PD            |
|---------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------|
|         | nmol/g doku                   | $\mu\text{g/g doku}$            | $\mu\text{mol/g protein}$      | nmol/g doku                     | U/g protein                   | U/g protein     |
| K       | 31,78 $\pm$ 1,17 <sup>b</sup> | 193,29 $\pm$ 15,46 <sup>a</sup> | 42,46 $\pm$ 3,13 <sup>a</sup>  | 250,95 $\pm$ 2,92 <sup>a</sup>  | 87,61 $\pm$ 8,04 <sup>a</sup> | 2,55 $\pm$ 0,56 |
| M       | 50,12 $\pm$ 3,60 <sup>a</sup> | 138,23 $\pm$ 9,51 <sup>b</sup>  | 33,88 $\pm$ 2,27 <sup>b</sup>  | 201,69 $\pm$ 9,87 <sup>c</sup>  | 59,40 $\pm$ 6,75 <sup>b</sup> | 2,82 $\pm$ 0,25 |
| R       | 27,55 $\pm$ 1,48 <sup>b</sup> | 201,52 $\pm$ 9,87 <sup>a</sup>  | 37,47 $\pm$ 0,97 <sup>ab</sup> | 228,95 $\pm$ 1,78 <sup>b</sup>  | 33,23 $\pm$ 6,02 <sup>c</sup> | 2,35 $\pm$ 0,17 |
| MR      | 32,47 $\pm$ 0,94 <sup>b</sup> | 174,94 $\pm$ 5,06 <sup>a</sup>  | 35,19 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>  | 235,71 $\pm$ 3,75 <sup>ab</sup> | 29,36 $\pm$ 2,93 <sup>c</sup> | 2,96 $\pm$ 0,28 |
| p       | <0,001                        | <0,01                           | <0,05                          | <0,001                          | <0,01                         | >0,05           |

<sup>a-b</sup> Oneway Anova Post Hoc Duncan testine göre aynı sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir.



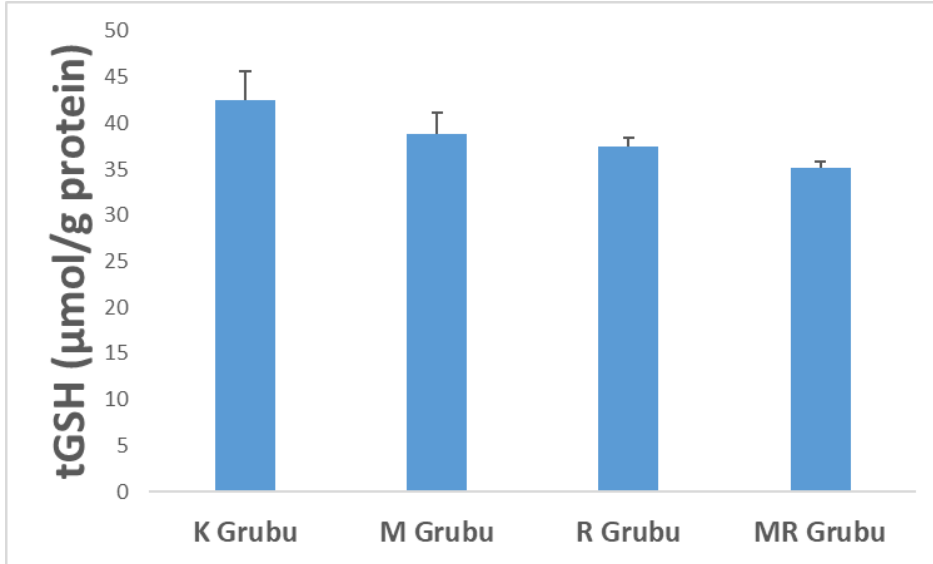
Şekil 4.1. Grupların MDA düzeyleri.

M grubunda, diğer gruplara göre MDA düzeylerinde artış ( $p<0,001$ ) istatistiksel olarak önemli bulundu (Şekil 4.1).



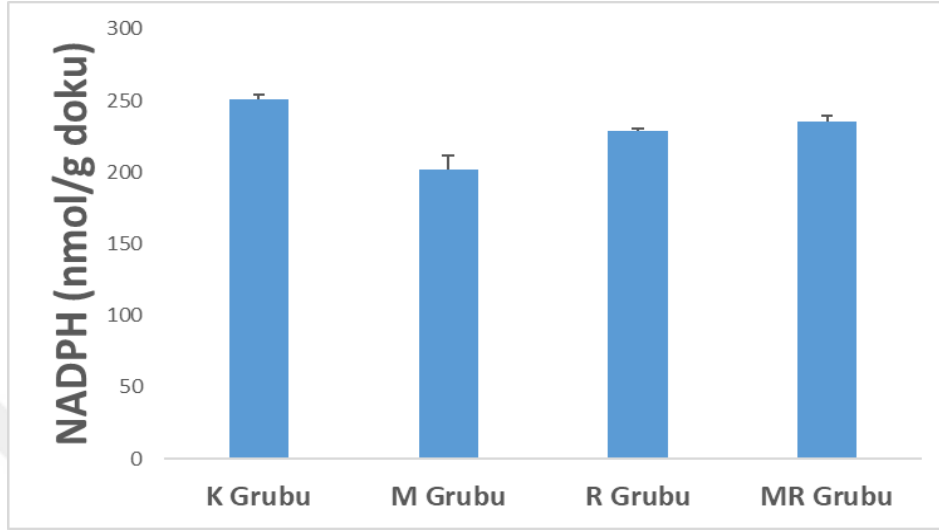
Şekil 4.2. Grupların Vitamin C düzeyleri.

M grubunda, diğer gruplara göre Vitamin C düzeylerinde azalış ( $p<0,01$ ) istatistiksel olarak önemli bulundu (Şekil 4.2).



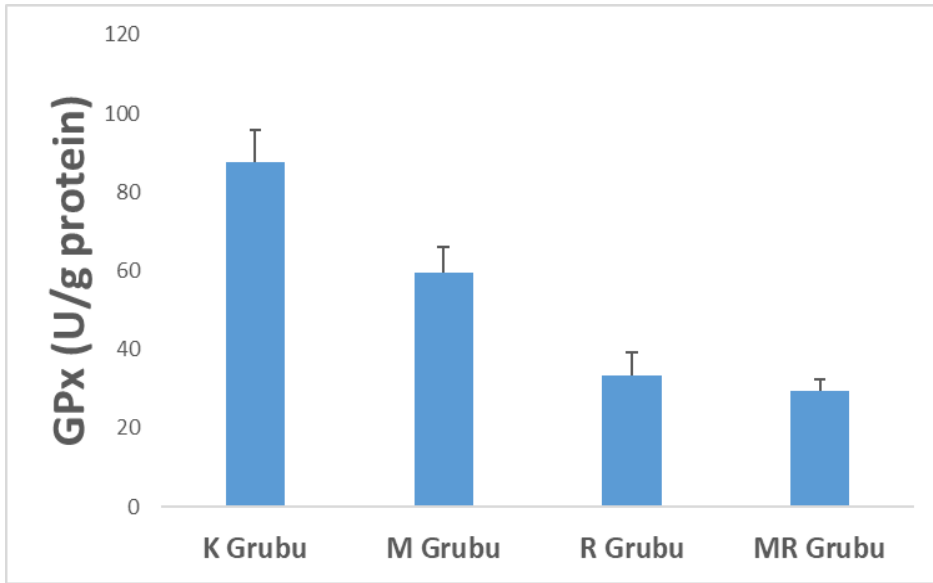
Şekil 4.3. Grupların tGSH düzeyleri.

M ve MR gruplarında tGSH düzeylerinin K grubuna kıyasla düşük olduğu belirlendi ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.3).



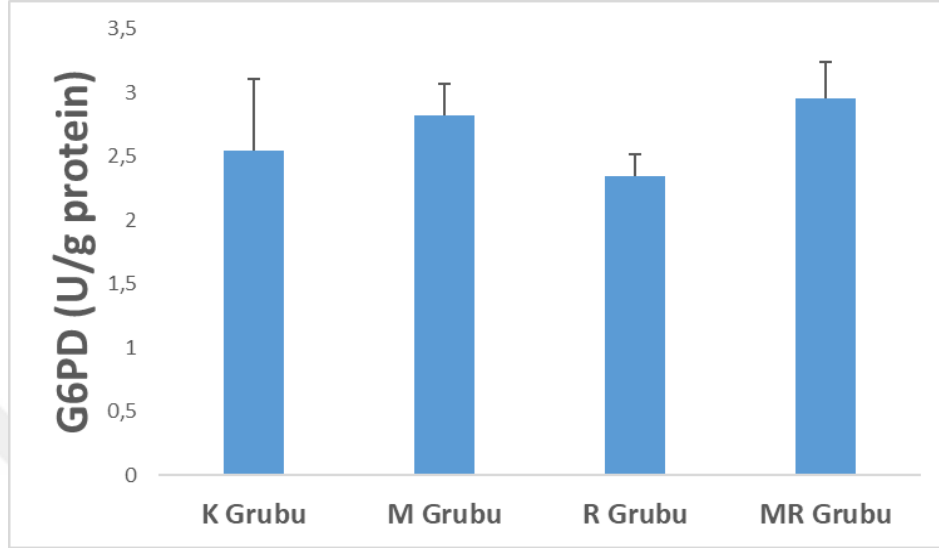
Şekil 4.4. Grupların NADPH düzeyleri.

M grubu NADPH ( $p<0,001$ ) düzeyleri ile GPx ( $p<0,01$ ) aktivitelerinde K grubuna göre önemli düzeyde azalış olduğu belirlendi. R grubu NADPH düzeyleri M grubuna göre yüksek, K grubuna göre düşük bulundu ( $p<0,001$ ) (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. Grupların GPx aktiviteleri.

Ayrıca R ve MR grupları GPx aktivitelerinin, K ve M gruplarına kıyasla önemli derecede düşük olduğu belirlendi ( $p<0,01$ ) (Şekil 4.5).



Şekil 4.6. Grupların G6PD aktiviteleri.

G6PD aktiviteleri bakımından gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.6).

## 5. TARTIŞMA

Metotreksat ile indüklenen hepatotoksisitenin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır, ancak hem serbest radikallerin hem de enflamatuvar sitokinlerin hepatotoksisiteye neden olduğu öne sürülmektedir (Ali ve ark. 2017, Malayeri ve ark. 2020). Daha önce yapılan çalışmalar, metotreksat kaynaklı karaciğer hasarında serbest radikallerin aşırı üretimi ile lipid peroksidasyonun artmasının ve enzimatik ya da enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerinin tükenmesinin rol oynadığını bildirmektedir (Moghadam ve ark. 2015, Kalantari ve ark. 2019, Malayeri ve ark. 2020).

Lipid peroksidasyonu, yağ asitlerinin yapısında bulunan karbon-karbon çift bağlarının oksidatif bozunması olarak tanımlanabilir. Lipid peroksidasyonu, hücre zarının hasar görmesine neden olur ve hücrenin fizyolojik işlevini değiştirir (Erdoğan ve ark. 2015). Malondialdehit, lipid peroksidasyonun bir metabolitidir ve hücrelerde oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılır (Pınar ve ark. 2018, Malayeri ve ark. 2020). Önceki çalışmalar ratlarda metotreksatın (20 mg/kg tek doz i.p.) karaciğer MDA üretimini tetikleyerek, toksisiteye yol açtığını bildirmiştir (Erdoğan ve ark. 2015, Mahmoud ve ark. 2017, Malayeri ve ark. 2020). Literatüre uyumlu olarak, sunulan çalışmada da metotreksatın (20 mg/kg tek doz i.p.), MDA düzeylerini önemli düzeyde arttırarak, oksidatif karaciğer hasarına neden olduğu belirlendi. Erdoğan ve ark. (2015) metotreksat sonrası rutin uygulamasının, karaciğer MDA düzeylerinde azalmaya neden olduğunu ve bunun da lipid peroksidasyonunda bir azalmaya işaret ettiğini bildirmiştir. Benzer şekilde, sunulan çalışmada metotreksat öncesi ve sonrasında rutin uygulamasının MDA düzeylerini azalttığı belirlendi. Bu sonuçlara göre rutinin hepatotoksisite üzerine koruyucu rolünün olduğu söylenebilir.

C vitamininin anti-oksidatif (Savran ve ark. 2017) ve antikanser (Lee 2009, Yiang ve ark. 2014) etkileri olduğu bilinmektedir. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar, C vitamini ve yaygın kullanılan antikanser ilaçlarla kombine tedavinin, antikanser aktivitelerini arttırdığını göstermiştir (Vetvicka ve Vetvickova 2012, Yiang ve ark. 2014). Klinik kanser tedavisinde, C vitamini takviyelerinin hastalarda plazma A, C, E vitaminlerinin düzeylerini arttırdığı (Tokarski ve ark. 2013), mortalite ve hastalık nüksünü azalttığı (Nechuta ve ark. 2011) bildirilmiştir. Araştırmalar, C vitamininin ilaçlar, ağır metaller, organofosfat insektisitler ve bazı kimyasal maddelerden kaynaklanan hepatotoksisite üzerine olumlu etkilerinin

olduğunu göstermiştir (Adikwu ve ark. 2013). Vitamin C'nin karaciğer fonksiyonlarının ve karaciğer antioksidan durumunun düzenlenmesinde rol oynayabileceği öne sürülmektedir (Traber ve ark. 2019). C vitaminin, ratlarda karaciğerde metotreksat kaynaklı oksidatif stresi antioksidan redoks sistemini modüle ederek azalttığı ve karaciğer hasarını önlemede olumlu, etkili bir rolü olabileceği bildirilmiştir (Savran ve ark. 2017, Jamali ve ark. 2018). Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardan biri olan vitamin C (Olayinka ve ark. 2016), GSH ve E vitamini ile birlikte oksidasyon hasarlarına karşı ilk savunma hattı olup, hücrel redoks dengesinde önemli bir rol oynamaktadır (Traber ve ark. 2019). Kronik hepatit hastalarında plazma C vitamini seviyesinde önemli bir azalma olduğu bildirilmiştir (Yamamoto ve ark. 1998). Olayinka ve ark. (2016), metotreksatın karaciğer vitamin C düzeyini azalttığını bildirmiştir. Literatüre uyumlu olarak, sunulan çalışmada metotreksatın karaciğer vitamin C düzeyini azalttığı belirlendi. Shenbagam ve Nalini (2011), rutin (100 mg/kg, 30 gün) verilen ratlarda karaciğer vitamin C düzeyini değiştirmedığını bildirmiştir. Bu çalışmaya uyumlu olarak rutin (50 mg/kg, 15 gün) karaciğer vitamin C düzeylerine etkisinin olmadığı belirlendi. Nègre-Salvayre ve ark. (1991), rutin E ve C vitaminlerinin serbest radikal temizleme kapasitesini arttırdığını bildirmiştir. Shenbagam ve Nalini (2011) etanol ile birlikte rutin uygulanan ratlarda etanolün azalttığı karaciğer vitamin C düzeylerini, rutin arttırdığını rapor etmiştir. Benzer şekilde, sunulan çalışmada metotreksat ile birlikte rutin uygulamasının metotreksatın neden olduğu vitamin C düşüşünü engellediği gözlemlendi.

NADPH, okside glutatyonun redüklenmesinde glutatyon redüktaz (GR) tarafından kosubstrat olarak kullanılan bir moleküldür (Malayeri ve ark. 2020). Metotreksat tarafından, NAD(P)-bağımlı dehidrojenaz ve NADP malik enzimlerinin inhibe edildiği ve bilinmeyen bir mekanizma ile metotreksatın hücrede NADPH varlığını azaltabileceği öne sürülmüştür (Caetano ve ark. 1997, Uraz ve ark. 2008, Pınar ve ark. 2018, Kalantari ve ark. 2019, Malayeri ve ark. 2020). Literatüre uyumlu olarak, sunulan çalışmada metotreksatın karaciğer NADPH düzeyini azalttığı belirlendi. Diğer yandan rutin uygulaması da NADPH düzeylerinde düşüşe neden oldu. Rutinin karaciğerde NADPH düzeylerine etkileri ile ilgili bir literatüre rastlanılmadı. Metotreksat ile rutin birlikte uygulandığı grubun NADPH düzeylerinin metotreksat uygulanan gruba göre yüksek olduğunun belirlenmesi, rutin oksidatif stres varlığında karaciğeri koruyucu etkinliğinin olduğunu düşündürdü.

Glutatyon redüktaz tarafından kullanılan hücrel NADPH'nin azalması ile GSH düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Glutatyon, önemli bir sitosolik radikal temizleyicidir

(Pınar ve ark. 2018). Çalışmalar metotreksatın, karaciğer GSH düzeyinde azalmaya yol açtığını bildirmektedir (Olayinka ve ark 2016, Mahmoud ve ark. 2017, Malayeri ve ark. 2020). Önceki çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da, metotreksatın tGSH düzeylerini azalttığı belirlendi. Aynı zamanda, metotreksat ile birlikte rutin, azalan NADPH düzeylerini arttırdığı, tGSH düzeylerini azalttığı bulundu. Shenbagam ve Nalini (2011), rutin (100 mg/kg, 30 gün) ratlarda karaciğer GSH düzeyini değiştirmedığını bildirmiştir. Bu çalışma ile uyumlu olarak sunulan çalışmada da rutin karaciğer tGSH düzeyini değiştirmedığı belirlendi. Çağlayan ve ark. (2019), civa-klorid ile birlikte rutin (50 mg/kg) uygulamasının kontrol grubuna göre GSH düzeylerini düşürdüğünü rapor etmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada rutin metotreksat ile kullanımının tGSH düzeyini, kontrol grubuna kıyasla düşürdüğü belirlendi.

Sunulan çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olarak, önceki çalışmalar da, metotreksatın karaciğer GPx aktivitesinde azalmaya neden olduğunu rapor etmiştir (Erdoğan ve ark. 2015, Mahmoud ve ark. 2017, Pınar ve ark. 2018, Malayeri ve ark. 2020). Shenbagam ve Nalini (2011), rutin (100 mg/kg, 30 gün) karaciğer GPx aktivitesini değiştirmedığını bildirmesine rağmen sunulan çalışmada rutin karaciğer GPx aktivitesini anlamlı derecede düşürdüğü belirlendi. Çağlayan ve ark. (2019), civa-klorid ile birlikte rutin (50 mg/kg) uygulamasının kontrol grubuna göre GPx aktivitesini azalttığını rapor etmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada da rutin metotreksat ile kullanımının GPx aktivitesini, kontrol grubuna kıyasla düşürdüğü belirlendi. Erdoğan ve ark. (2015) metotreksat ile rutin birlikte GPx aktivitesini, metotreksata kıyasla yükselttiğini bildirmiştir. Aksine, sunulan çalışmada ise rutin metotreksat ile kullanımının GPx aktivitesini, metotreksat gruplarına kıyasla düşürdüğü belirlendi.

Jahovic ve ark. (2003), metotreksatın G6PD aktivitesini inhibe ederek, NADPH'nin azalmasına, glutatyon redüktaz aktivitesinin inhibisyonuna ve son olarak GSH döngüsünün inhibisyonuna katkıda bulunduğunu öne sürmektedir. Sunulan çalışmada metotreksatın ve rutin G6PD aktivitesini değiştirmedığı belirlendi.

## 6. SONUÇ

Sunulan çalışmada metotreksatın MDA düzeylerini arttırarak ve antioksidan (Vit C, tGSH, NADPH, GPx) düzeylerini azaltarak karaciğer dokusunda oksidatif strese neden olduğu belirlendi. Rutinin, artan MDA düzeyini azaltarak, bilhassa vitamin C ve NADPH düzeylerini arttırarak, metotreksat kaynaklı oksidatif stresi önlediği gözlemlendi. Sonuç olarak, bu çalışma, rutinin metotreksat kaynaklı oksidatif hepatik hasar üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, rutinin kemoterapinin yan etkilerini azaltmada yararlı olabileceği öngörülmekte olup, kemoterapide metotreksat ile klinik uygulamalarda potansiyel ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. İleriki çalışmalarda, rutinin hepatoprotektif potansiyelinin altında yatan kesin mekanizmaları belirlemek için daha fazla araştırma yapılması önerilmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Abarikwu SO, Njoku RC, Lawrence CJ, Charles IA, Ikewuchi JC.** Rutin ameliorates oxidative stress and preserves hepatic and renal functions following exposure to cadmium and ethanol. *Pharm Biol*, **2017**, s. 55(1):2161-2169.
2. **Adikwu E, Deo O.** Hepatoprotective Effect of Vitamin C (Ascorbic Acid). *Pharmacology & Pharmacy*, **2013**, s. 4(1):84-92.
3. **Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Shahid A, ve ark.** Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. *Chem Biol Interact*, **2017**, s. 272:80-91.
4. **Armağan İ.** The role of oxidative stress in methotrexate-induced damage in liver and kidney of rats. *Med J SDU*, **2015**, s. 22(4):151-155.
5. **Ayad MW, El Nagggar AA, El Nagggar M.** MTHFR C677T polymorphism: association with lymphoid neoplasm and effect on methotrexate therapy. *Eur J Haematol*, **2014**, s. 93(1):63-69.
6. **Aziza SA, Azab Mel-S, El-Shall SK.** Ameliorating role of rutin on oxidative stress induced by iron overload in hepatic tissue of rats. *Pak J Biol Sci*, **2014**, s. 17(8):964-977.
7. **Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San KY.** The effect of increasing NADH availability on the redistribution of metabolic fluxes in Escherichia coli chemostat cultures. *Metab Eng*, **2002**, s. 4(3):230-7.
8. **Beutler E.** Red cell metabolism manual of biochemical methods. London:Academic Press, **1971**, s. 68-70.
9. **Beutler E.** Red cell metabolism. In: A Manual of Biochemical Methods. New York: Grune Strottan, **1975**, s. 67-69.
10. **Burns JA, Butler JC, Moran J, Whitesides GM.** Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J Org Chem*, **1991**, s. 56(8):2648-2650.
11. **Caetano NN, Campello AP, Carnieri EG, Kluppel ML, Oliveira MB.** Effect of methotrexate (MTX) on NAD(P)<sup>+</sup> dehydrogenases of HeLa cells: malic enzyme, 2-oxoglutarate and isocitrate dehydrogenases. *Cell Biochem Funct*, **1997**, s. 15(4):259-264.
12. **Chládek J, Martínková J, Sispara L.** An in vitro study on methotrexate hydroxylation in rat and human liver. *Physiol Res*, **1997**, s. 46(5):371-379.
13. **Çağlayan C, Kandemir FM, Darendelioğlu E, Yıldırım S, Küçükler S, ve ark.** Rutin ameliorates mercuric chloride-induced hepatotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis. *J Trace Elem Med Biol*, **2019**, s. 56:60-68.
14. **Çetin A, Kaynar L, Koçyiğit I, Hacıoğlu SK, Saraymen R, ve ark.** Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. *Am J Chin Med*, **2008**, s. 36(5):861-872.
15. **Enogieru AB, Haylett W, Hiss DC, Bardien S, Ekpo OE.** Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxid Med Cell Longev*, **2018**, s. 2018:6241017.
16. **Erdoğan E, Ilgaz Y, Gürgör PN, Öztaş Y, Topal T, ve ark.** Rutin ameliorates methotrexate induced hepatic injury in rats. *Acta Cir Bras*, **2015**, s. 30(11):778-784.
17. **Ganeshpurkar A, Saluja AK.** The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J*, **2017**, s. 25(2):149-164.
18. **Haag W.** Zur methodik und praktischen Bedeutung der Vitamin C - Bestimmung bei im Rind in Vergangenheit und Gegenwart. Inaugural Dissertation. Justus Liebig Universität, Giessen, **1985**.
19. **Holmboe L, Andersen AM, Mørkrid L, Slørdal L, Hall KS.** High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. *Br J Clin Pharmacol*, **2012**, s. 73(1):106-114.
20. **Hoshyar R, Sebzari A, Balforoush M, Valavi M, Hosseini M.** The impact of Crocus sativus stigma against methotrexate-induced liver toxicity in rats. *J Complement Integr Med*, **2019**. pii: /j/jcim.ahead-of-print/jcim-2019-0201/jcim-2019-0201.xml.
21. **Hyder MA, Hasan M, Mohiudein AH.** Comparative levels of ALT, AST, ALP and GGT in liver associated diseases. *Eur J Exp Biol*, **2013**, s. 3(2):280-284.
22. **Jahovic N, Çevik H, Şehirli AO, Yeğen BC, Şener G.** Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res*, **2003**, s. 34(4):282-287.
23. **Jamali B, Jamali S, Kalehsar NS.** Effect of vitamin C on liver injury after taking methotrexate in rats. *Medical Sciences*, **2018**, s. 28(1):44-49.
24. **Kalantari H, Asadmasjedi N, Abyaz MR, Mahdavinia M, Mohammadtaghvaei N.** Protective effect of inulin on methotrexate- induced liver toxicity in mice. *Biomed Pharmacother*, **2019**, s. 110:943-950.

25. **Kamel KM, Abd El-Raouf OM, Metwally SA, Abd El-Latif HA, El-sayed ME.** Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol*, **2014**, s. 28(7):312-319.
26. **Khan RA, Khan MR, Sahreen S.** CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat. *BMC Complement Altern Med*, **2012**, s. 12:178.
27. **King PD, Perry MC.** Hepatotoxicity of chemotherapy. *Oncologist*, **2001**, s. 6(2):162-176.
28. **Lee WJ.** The prospects of vitamin C in cancer therapy. *Immune Netw*, **2009**, 9(5):147-152.
29. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **1951**, s. 193:265-275.
30. **Lv L, Yao Y, Zhao G, Zhu G.** Rutin inhibits coronary heart disease through ERK1/2 and Akt signaling in a porcine model. *Exp Ther Med*, **2018**, s. 15(1):506-512.
31. **Maciej J, Schäff CT, Kanitz E, Tuchscherer A, Bruckmaier RM, ve ark.** Bioavailability of the flavonol quercetin in neonatal calves after oral administration of quercetin aglycone or rutin. *J Dairy Sci*, **2015**, s. 98(6):3906-3917.
32. **Mahmoud AM, Hozayen WG, Ramadan SM.** Berberine ameliorates methotrexate-induced liver injury by activating Nrf2/HO-1 pathway and PPAR $\gamma$ , and suppressing oxidative stress and apoptosis in rats. *Biomed Pharmacother*, **2017**, s. 94:280-291.
33. **Malayeri A, Badparva R, Mombeini MA, Khorsandi L, Goudarzi M.** Naringenin: a potential natural remedy against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol*, **2020**, s. 28:1-8.
34. **Malik F, Ranganathan P.** Methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis: a status report. *Pharmacogenomics*, **2013**, s. 14(3):305-314.
35. **Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, ve ark.** Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr*, **1995** s. 125(7):1911-1922.
36. **Mehrzadi S, Fatemi I, Esmailizadeh M, Ghaznavi H, Kalantar H, ve ark.** Hepatoprotective effect of berberine against methotrexate induced liver toxicity in rats. *Biomed Pharmacother*, **2018**, s. 97:233-239.
37. **Moghadam AR, Tutunchi S, Namvaran-Abbas-Abad A, Yazdi M, Bonyadi F, ve ark.** Pre-administration of turmeric prevents methotrexate-induced liver toxicity and oxidative stress. *BMC Complement Altern Med*, **2015**, s. 15:246.
38. **Mulder RL, Bresters D, Van den Hof M, Koot BG, Castellino SM, ve ark.** Hepatic late adverse effects after antineoplastic treatment for childhood cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, **2019**, s. 4:CD008205.
39. **Nafees S, Rashid S, Ali N, Hasan SK, Sultana S.** Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NF $\kappa$ B/MAPK pathway. *Chem Biol Interact*, **2015**, s. 231:98-107.
40. **Nechuta S, Lu W, Chen Z, Zheng Y, Gu K, ve ark.** Vitamin supplement use during breast cancer treatment and survival: A prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2011**, s. 20:262-271.
41. **Nègre-Salvayre A, Affany A, Hariton C, Salvayre R.** Additional antilipoperoxidant activities of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid on membrane-like systems are potentiated by rutin. *Pharmacology*, **1991**, s. 42(5):262-272.
42. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, **1979**, s. 95:351-358.
43. **Olayinka ET, Ore A, Adeyemo OA, Ola OS.** Ameliorative Effect of Gallic Acid on Methotrexate-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Rat. *J Xenobiot*, **2016**, s. 6(1):6092.
44. **Pinar N, Kaplan M, Özgür T, Özcan O.** Ameliorating effects of tempol on methotrexate-induced liver injury in rats. *Biomed Pharmacother*, **2018**, s. 102:758-764.
45. **Roenigk HH Jr, Auerbach R, Maibach H, Weinstein G, Lebwohl M.** Methotrexate in psoriasis: consensus conference. *J Am Acad Dermatol*, **1998**, s. 38(3):478-485.
46. **Sakthiswary R, Suresh E.** Methotrexate in systemic lupus erythematosus: a systematic review of its efficacy. *Lupus*, **2014**, s. 23(3):225-235.
47. **Savran M, Çiçek E, Doğuç DK, Aşçı H, Yeşilot S, ve ark.** Vitamin C attenuates methotrexate-induced oxidative stress in kidney and liver of rats. *Physiol Int*, **2017**, s. 1-11.
48. **Shenbagam M, Nalini N.** Dose response effect of rutin a dietary antioxidant on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance - a histopathologic study. *Fundam Clin Pharmacol*, **2011**, s. 25(4):493-502.
49. **Singh S, Singh DK, Meena A, Dubey V, Masood N, ve ark.** Rutin protects t-butyl hydroperoxide-induced oxidative impairment via modulating the Nrf2 and iNOS activity. *Phytomedicine*, **2019**, s. 55:92-104.

50. **Tokarski S, Rutkowski M, Godala M, Mejer A, Kowalski J.** The impact of ascorbic acid on the concentrations of antioxidative vitamins in the plasma of patients with non-small cell lung cancer undergoing first-line chemotherapy. *Pol Merkur Lekarski*, **2013**, s. 35:136-140.
51. **Traber MG, Buettner GR, Bruno RS.** The relationship between vitamin C status, the gut-liver axis, and metabolic syndrome. *Redox Biol*, **2019**, s. 21:101091.
52. **Uraz S, Tahan V, Aygün C, Eren F, Ünlügüzel G, ve ark.** Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci*, **2008**, s. 53(4):1071-1077.
53. **Van Outryve S, Schrijvers D, van den Brande J, Wilmes P, Bogers J, ve ark.** Methotrexate-associated liver toxicity in a patient with breast cancer: case report and literature review. *Neth J Med*, **2002**, s. 60(5):216-222.
54. **Vetvicka V, Vetvickova J.** Combination of glucan, resveratrol and vitamin C demonstrates strong anti-tumor potential. *Anticancer Res*, **2012**, s. 32:81–87.
55. **Vonen B, Mørland J.** Isolated rat hepatocytes in suspension: potential hepatotoxic effects of six different drugs. *Arch Toxicol*, **1984**, s. 56(1):33-37.
56. **Yamamoto Y, Yamashita S, Fujisawa A, Kokura S, Yoshikawa T.** Oxidative stress in patients with hepatitis, cirrhosis, and hepatoma evaluated by plasma antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun*, **1998**, s. 247(1):166-170.
57. **Yiang GT, Chou PL, Hung YT, Chen JN, Chang WJ, ve ark.** Vitamin C enhances anticancer activity in methotrexate-treated Hep3B hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*, **2014**, s. 32:1057-1063.
58. **Yuan L, Kaplowitz N.** Mechanisms of drug-induced liver injury. *Clin Liver Dis*, **2013**, s. 17(4):507-518.

EK

Evrak Tarih ve Sayısı: 11/09/2019-E.51910

GİZLİ



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

Sayı :40595970-020-  
Konu :Dr. Öğretim Üyesi Filiz  
KAZAK

SAYIN DR. ÖĞR. ÜYESİ FILİZ KAZAK  
ÖĞRETİM ÜYESİ

İlgi : 24/07/2019 tarihli 93409276-020-42099 sayılı yazı.

Kurulunuzun 10/09/2019 tarihli toplantısında alınmış olduğu 2019/07-12 numaralı karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. İlker YAVAŞ  
Kurul Başkanı

**KARAR 2019/7-12** Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Filiz KAZAK'ın (Biyokimya AD) yürütücüsü olduğu ve Yüksek Lisans Öğrencisi Sueda TÜRK'ün ortak çalışmaları "*Rat Karaciğerinde Metotreksat ile Oluşturulan Oksidatif Stres Üzerine Rutinin Etkisi*" adlı proje Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun bulunarak onaylanmasına oybirliğiyle karar verilmiştir.

GİZLİ

T: F:  
E-Posta : Web:  
İletişim: HGAİnet ArdiB (Dahil: 3262455045)



## ÖZGEÇMİŞ

Sueda TÜRK Ankara’da 01.09.1989 tarihinde doğdu. İlk ve orta öğrenimimi Şinasi İlköğretim Okulu’nda okudu. Liseyi Fatih Sultan Mehmet Lisesi’nde tamamladı. Çankırı Karatekin Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu’nda Hemşirelik Bölümü’ne 2007 yılında başladı ve 2011 yılında mezun oldu. Ankara Bayındır Hastanesi’nde 2011-2012, Ankara Medicana Hastanesi’nde 2012-2013 yılları arasında hemşire olarak çalıştı. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi’ne 2013 mayıs ayında hemşire olarak atandı ve halen görev yapmakta.

