

**T.C.  
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI BÖBREK HASARI  
ÜZERİNE MORİN HİDRAT'IN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SEVDA SAĞ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Ekrem DARENDELİOĞLU**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN**

**BİNGÖL-2022**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince kendileriyle çalışmaktan onur duyduğum; tez çalışmamın planlanması, yönlendirme ve hazırlanmasındaki katkıları ve bana gösterdikleri sabırlarından dolayı değerli danışman hocamlarım Doç. Dr. Ekrem DARENDELİOĞLU ve Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN'na çok teşekkür ederim.

Çalışmalarında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR, Doç. Dr. Adnan AYNA ve Araş. Gör. Gürkan AYKUTOĞLU'na ve bana yol gösterip tavsiyelerde bulunan kıymetli bölüm hocalarım ve Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarı, Veteriner Fakültesi Biyokimya Bölümü Araştırma Laboratuvarı, Bingöl Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (BÜDAM) ve Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Bingöl Üniversitesi BAP birimine desteklerinden dolayı (BAP Proje No: BAP-FEF.2021.006) çok teşekkür ederim.

Tez aşaması boyunca benden dua ve desteklerini esirgemeyen sevgili babam Abdulkadir SAĞ ve canım anneme, sevgili kardeşlerim Uğur SAĞ, Nupelda SAĞ ve tüm aile fertlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Sevda SAĞ**  
**Bingöl 2022**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vii
TABLolar LİSTESİ .....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT .....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Böbrek .....	1
1.2.Böbrek Kesiti .....	2
1.2.2. Medulla Renalis .....	3
1.3.Böbreğin Fizyolojik Yapısı .....	4
1.3.1.Nefronların Yapı ve Fonksiyonu .....	4
1.3.1.1. Glomerulus .....	4
1.3.1.2. Bowman Kapsülü .....	4
1.3.1.3. Proksimal Tübülüs.....	5
1.3.1.4. Henle Kulbu .....	5
1.3.1.5. Distal Tübül.....	5
1.3.1.6. Toplayıcı Kanallar.....	5
1.4.Kemoterapi.....	5
1.5.Antineoplastik İlaçlar .....	6
1.5.1.Bitkisel Kaynaklı Antikanserojenler.....	7
1.5.2. Antitümör Antibiyotikler .....	7
1.5.3.Hormon ve Hormon Antagonistler .....	7
1.5.4. Alkilleyici İlaçlar .....	8
1.5.5.Diğer Antineoplastik İlaçlar.....	8
1.5.6. Antimetabolitler .....	8
1.5.6.1. Pürin .....	9
1.5.6.2. Pürimidin.....	9

1.5.6.3. Folik Asit Analogları.....	9
1.6. Metotreksat.....	10
1.6.1. Metotreksat Etki Mekanizması .....	11
1.6.2. Metotreksat Yan Etkileri.....	12
1.7. Antioksidanlar .....	12
1.7.1. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar.....	13
1.7.1.1. Nonenzimatik Antioksidanlar.....	13
1.7.1.2. Enzimatik Antioksidanlar.....	15
1.7.1.3. Süperoksit Dismutaz Enzimi.....	15
1.7.1.4. Katalaz Enzimi .....	16
1.7.1.5. Glutasyon Redüktaz Enzimi .....	16
1.7.1.6. Glutasyon Peroksidaz Enzimi.....	17
1.7.2. Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar .....	17
1.8. Morin Hidrat.....	18
1.9. Apoptoz.....	19
1.9.1. Apoptozda İntrensik (Mitokondriyal) Yolak.....	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	26
3.1. Materyal .....	26
3.2. Deney Hayvanları.....	27
3.3. Yöntem.....	28
3.3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....	28
3.3.2. Deney uygulamaları .....	28
3.3.3. Numunelerin Alınması.....	29
3.3.4. Biyokimyasal Parametrelerin İncelenmesi .....	30
3.3.5. Biyokimyasal Analizlerin Aşamaları ve Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması (Serum üre ve kreatinin, MDA, GPx, GSH, SOD, KAT) ....	30
3.3.5.1. Serum Üre ve Kreatinin Tayini .....	30
3.3.5.2. MDA Tayini .....	30
3.3.5.3. GPx Tayini .....	32
3.3.5.4. GSH Tayini.....	33
3.3.5.5. SOD Tayini.....	34
3.3.5.6. KAT Tayini .....	35

3.3.6. Western Blot Analizi İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Bu Yöntem Kullanılarak Hedef Proteinlerin Analizi .....	36
3.3.7. İstatiksel Analiz .....	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. Serum Üre ve Kreatinin Düzeyleri.....	39
4.2. MTX kaynaklı Oksidatif Stres ve Lipit Peroksidasyonu Üzerine Morin Hidratın Etkileri .....	42
4.3. MTX ve Morin Hidratın Bazı Apoptozla İlişkili Protein Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi .....	49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	54
KAYNAKLAR .....	55
EKLER.....	69
ÖZGEÇMİŞ .....	71

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ATP	: Adenozin Trifosfat
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
Ca	: Kalsiyum
Cl	: Klor
CHPO	: Kumene Hidroperoxide
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
DHF	: Dihidrofolat
FA	: Folik asit
FAD	: Flavin Adenine Dinükleotid
GR	: Glutasyon Redüktaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
HCl	: Hidroklorik Asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
IL-1	: İnterlökin-1
KAT	: Katalaz
KCl	: Potasyum Klorür
K	: Potasyum
MTX	: Metotreksat
MDA	: Melondialdehit
MPO	: Miyeloperoksidaz
Mg	: Miligram
mL	: Mililitre
NBT	: Nitroblue Tetrazolyum
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NO	: Nitrik Oksit
Na	: Sodyum

P	: Fosfat
PBS	: Fosfat Tuzu Tamponu
PMSF	: Fenil Metan Sülfonil Florit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RNA	: Ribonükleik Asit
SMAC	: İkincil Mitokondri Kaynaklı Kaspaz Aktivatörü
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Tiyobarbütirik Asit
TBS-T	: Tris Tampon Tuzu-Tween 20
TCA	: Trikloroasetik Asit
THF	: Tetrahidrofolik Asit
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekroz Faktörü- $\alpha$
XO	: Ksantihine Oksidaz

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Böbreğin genel görünümü.....	2
Şekil 1.2.	Böbrek kesiti .....	3
Şekil 1.3.	Folik asit kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.4.	Metotreksat'ın kimyasal yapısı .....	11
Şekil 1.5.	Morin'in kimyasal yapısı .....	19
Şekil 1.6.	Apoptotik sinyal yolları .....	20
Şekil 3.1.	Deneyel tasarım .....	29
Şekil 3.2.	MDA analizinde kullanılan standart grafik .....	32
Şekil 3.3.	GSH analizinde kullanılan standart grafik .....	34
Şekil 4.1.	Serum üre düzeyi grafiği .....	40
Şekil 4.2.	Serum kreatinin düzeyi grafiği .....	41
Şekil 4.3.	SOD enzimi aktivitesi grafiği .....	43
Şekil 4.4.	KAT enzimi aktivitesi grafiği .....	45
Şekil 4.5.	GPx enzimi aktivitesi grafiği .....	46
Şekil 4.6.	GSH düzeyi grafiği .....	47
Şekil 4.7.	MDA düzeyi grafiği .....	48
Şekil 4.8.	Western Blot sonuç grafik ve görsel .....	51



## TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1.	Antioksidanların sınıflandırılması .....	13
Tablo 3.1.	Deney esnasında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar .....	26
Tablo 3.2.	Deney esnasında kullanılan materyaller ve kimyasallar .....	27
Tablo 3.3.	Western blot analizinde kullanılan antikorlar .....	38

# RATLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI BÖBREK HASARI ÜZERİNE MORİN HİDRAT'IN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

## ÖZET

Vücudumuzda bulunan tüm hücreler bir dizi metabolik olay gerçekleştirir ve bunun sonucunda bazı atık maddeler meydana gelmektedir. Vücudumuz atık maddeleri boşaltım sistemi ile dışarı atmakta olup, bu görevlerden birini ise böbrekler aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Böbrekler vücuttaki metabolizmanın gerçekleşmesinde önemli rol oynayan organlardır. Boşaltım sistemi vücuda alınan birçok ilacın toksik metabolitlerini vücuttan uzaklaştıracak biçimde görev alır ve vücuttaki sıvı elektrolit dengesini korumaktadır. Kemoterapi, kanser tedavisinde kullanılan bir yöntemdir. Kemoterapi de kullanılan ilaçlara kemoterapötik ilaçlar denmektedir. Kemoterapötik ilaçlar her ne kadar tedavi amaçlı kullanılmış olsalar da birçok doku hasarına sebebiyet vermektedir. Metotreksat da, kemoterapötik bir ilaç olarak kullanılır fakat ciddi nefrotoksisite, hepatotoksisite ve pulmoner infiltrasyon vb. gibi hasarlara neden olur. Antioksidanlar vücudumuzda oluşacak serbest radikaller aracılığıyla oluşabilecek oksidatif strese karşı koruma sağlayabilen doğal bileşenlerdir. Morin hidrat beyaz dut, incir vb. gibi birçok bitkiden izole edilen sekonder bir metabolit olup güçlü antioksidanlar grubunda yer almaktadır.

Bu tez çalışmasında MTX ile oluşturulan böbrek hasarına karşı morinin antiapoptotik ve antioksidan etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada 35 adet Wistar albino cinsi erkek rat kullanıldı ve her grupta 7 adet rat olacak şekilde 5 farklı deney grubu oluşturuldu. 1. Kontrol grubu; 10 gün boyunca serum fizyolojik oral olarak verildi. 2. Morin 100 grubu; 10 gün boyunca oral yoldan 100 mg/kg morin hidrat verildi. 3. MTX grubu; 5. Günde intraperitoneal şekilde 20 mg/kg MTX tek doz enjeksiyon yapıldı. 4. MTX+Morin 50 grubu; 10 gün boyunca 50 mg/kg morin hidrat oral yoldan verildi ve 5. gün tek doz intraperitoneal olarak 20 mg/kg MTX enjeksiyon yapıldı. 5. MTX+Morin 100 grubu; 10 gün boyunca 100 mg/kg morin hidrat oral yoldan verildi ve 5. gün tek doz intraperitoneal 20 mg/kg MTX enjeksiyon yapıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTX grubunda serum üre ve kreatinin düzeyleri ile birlikte doku MDA düzeyinde önemli ölçüde artış tespit edilirken, antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD, KAT, GPx) ve GSH düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. MTX'in apoptotik genler olan Bax ve CYT-C ekspresyon seviyelerini arttırdığını ve bununla birlikte Bcl-2, prokaspaz-3, prokaspaz-8 ve prokaspaz-9'un ekspresyon seviyelerinde ise önemli ölçüde azalmaya neden olduğu tespit edildi. MTX ile birlikte verilen 50 ve 100 mg/kg dozlarındaki morin hidrat'ın oksidatif stres ve apoptotik markırların seviyelerini olumlu regüle ederek, antioksidan ve anti-apoptotik etkiler seğilemiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre MTX kaynaklı oluşan böbrek hasarı üzerine morin hidrat'ın her iki dozunun da etkili olduğu kanıtlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Antineoplastik ilaçlar, apoptoz, böbrek, kemoterapi, metotreksat, morin.

# INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF MORINE HYDRATE ON METHOTREXATE-INDUCED KIDNEY DAMAGE IN RATS

## ABSTRACT

All cells in our body carry out a series of metabolic events, and as a result, some waste materials are produced. Our body throws waste materials out with the excretory system, and it performs one of these tasks through the kidneys. Kidneys are organs that play an important role in the realization of metabolism in the body. The excretory system functions to remove toxic metabolites of many drugs taken into the body and maintains the fluid and electrolyte balance in the body. Chemotherapy is a method used in the treatment of cancer. The drugs used in chemotherapy are called chemotherapeutic drugs. Although chemotherapeutic drugs are used for therapeutic purposes, they cause many tissue damage. Methotrexate is also used as a chemotherapeutic drug, but it has serious nephrotoxicity, hepatotoxicity and pulmonary infiltration etc. cause such damage. Antioxidants are natural components that can protect against oxidative stress that may occur through free radicals that will form in our body. Morine hydrate is a secondary metabolite isolated from many plants such as white mulberry and fig and is in the group of strong antioxidants.

In this thesis, it was aimed to reveal the antiapoptotic and antioxidant effects of morin against kidney damage induced by MTX. In this study, 35 Wistar albino male rats were used and 5 different experimental groups were formed, with 7 rats in each group. 1. Control group; Saline was given orally for 10 days. 2. Morin 100 group; 100 mg/kg morin hydrate was given orally for 10 days. 3. MTX group; On the 5th day, a single dose of 20 mg/kg MTX was injected intraperitoneally. 4. MTX+Morin 50 group; 50 mg/kg morin hydrate was given orally for 10 days and a single intraperitoneal injection of 20 mg/kg MTX was given on the 5th day. 5. MTX+Morin 100 group; 100 mg/kg morin hydrate was given orally for 10 days and a single intraperitoneal 20 mg/kg MTX injection was given on the 5th day. Compared to the control group, a significant increase was found in serum urea and creatinine levels, as well as tissue MDA levels, while a decrease in antioxidant enzyme activities (SOD, KAT, GPx) and GSH levels were detected in the MTX group. It was determined that MTX increased the expression levels of Bax and CYT-C, which are apoptotic genes, and also caused a significant decrease in the expression levels of Bcl-2, procaspase-3, procaspase-8 and procaspase-9. Morin hydrate at 50 and 100 mg/kg doses given with MTX positively regulated the levels of oxidative stress and apoptotic markers, and exhibited antioxidant and anti-apoptotic effects.

According to the findings obtained as a result of the study, both doses of morin hydrate were proven to be effective on kidney damage caused by MTX.

**Keywords:** Antineoplastic medicine, apoptosis, chemotherapy, kidney, methotrexate, morin.

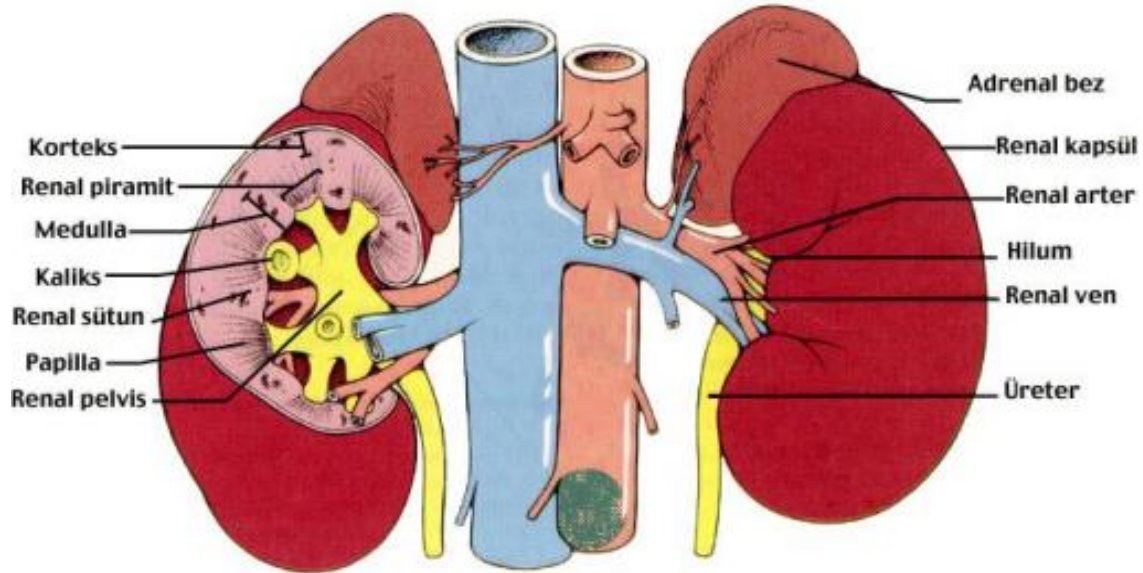
## 1. GİRİŞ

Vücudumuzda bulunan hücrelerin birçok metabolik olay gerçekleştirmesi sonucunda çeşitli atık madde oluşmaktadır. Oluşan bu atık maddeler boşaltım sistemi ile vücuttan uzaklaştırılır (Başaklar, 2008). Böbrekler, boşaltım sisteminde görev alan önemli bir organdır. Vücutta gerçekleşen metabolik olaylar sonucunda elde edilen atık maddelerin bazılarını vücut dışına atarak, bazılarını ise vücut içerisinde tutarak hücrelerin metabolik olayların gerçekleştirilebilmesi için ihtiyaç duydukları uygun koşulları (pH, mineral maddeler, organik maddeler vb.) sağlarlar (Arslan, 2020). Vücutta bulunan sıvıların ana kaynağı ağız yolu ile alınan besinler tarafından sağlansada, metabolic faaliyetler sonucu oluşan atık maddelerden de sıvı meydana gelmektedir. Vücut sıvıları için gerekli fizyolojik değerler sodyum (Na), kalsiyum (Ca), potasyum (K), su ve hidrojen gibi maddelerdir. Boşaltım sistemi birçok ilacın toksik metabolitlerini vücuttan uzaklaştırabilecek şekilde işlevde bulunmakla birlikte elektrolit sıvı dengesini de korumaktadır (Vallon et al., 2006). Birçok atık madde (ürik asit, kreatinin vb.) vücut sıvısında birikerek toksik etkiye sebep olmaktadır, bu yüzden vücuttan atılmaları gerekmektedir. Bu atık maddelerin çoğu böbrekler ile vücuttan uzaklaştırılır (Turgut ve Pandya, 2018; Yıldırım ve Gençler, 2018).

### 1.1. Böbrek

Vücudumuzda sırt kaslarına sağ ve sol olarak yerleştirilmiş iki tane böbrek bulunmaktadır. Karın boşluğunun üst ve arka tarafında yer almakta olan böbreklerden sağ böbrek, üzerinde yer alan karaciğer dokusu sebebiyle, sol böbreğe kıyasla biraz daha aşağıda yer almaktadır. Boyut olarak böbrekler, 11 ila 12 cm boyunda olup, yaklaşık olarak her böbreğin ağırlığı 120-200 gramdır (Yıldırım ve Gençler, 2018; Uysal, 2021). Böbrekler, üzerlerinde bulunan yağ dokusu sayesinde buldukları yere tutunurlar. Yağ dokuları böbrekleri soğuk ve sığa karşı korumaktadır. Böbreklerin yüzeylerinde çok sağlam ama ince bir bağ doku bulunmakta olup kapsülle etrafı sarılı ve yapısında az miktarda elastik fibril bulunmaktadır. Bu kapsül “*capsula fibrosa*” olarak adlandırılırken,

yağ dokusunun olduğu kısım ise “*capsula adiposa*” şeklinde adlandırılır (Mclaughlin, 2014).



Şekil 1.1. Böbreğin genel görünümü (Uysal, 2021)

## 1.2. Böbrek Kesiti

Böbreklerin kesitlerine bakıldığında konveks olan *margolateralis* (dış kenar) ve daha karmaşık girintili çıkıntılı olan *margomedialis* (iç kenar)’dan oluşmaktadır. İç kenarında *hilum* adı verilen böbreğin içine giriş-çıkış yapabilen çukur bir bölge yer almaktadır. Bu çukur bölge olan *hilum*da böbrek toplar ve atar damar, üreter, böbreğin lenfatik ve sinirleri yer almaktadır. Böbrek kesiti; korteks renalis, medulla renalis, sinüs renalis olmak üzere üç farklı ana yapıdan oluşmaktadır (Başaklar, 2008; Uysal, 2021).

### 1.2.1. Korteks Renalis

Korteks renalis çok fazla kılcıl damarlardan oluştuğundan granüler görünümü vardır. Korteks renalis böbreğin dış kısmıdır ama sadece dış kısmı değil aynı zamanda medulla kısmının aralıklarını da doldurmaktadır. Bu şekilde medulla kısımlarını birbirinden ayırır. Ayrımı gerçekleştiren bu uzantılara “renal kolonlar” denir. Korteks renalis koyu bir renge

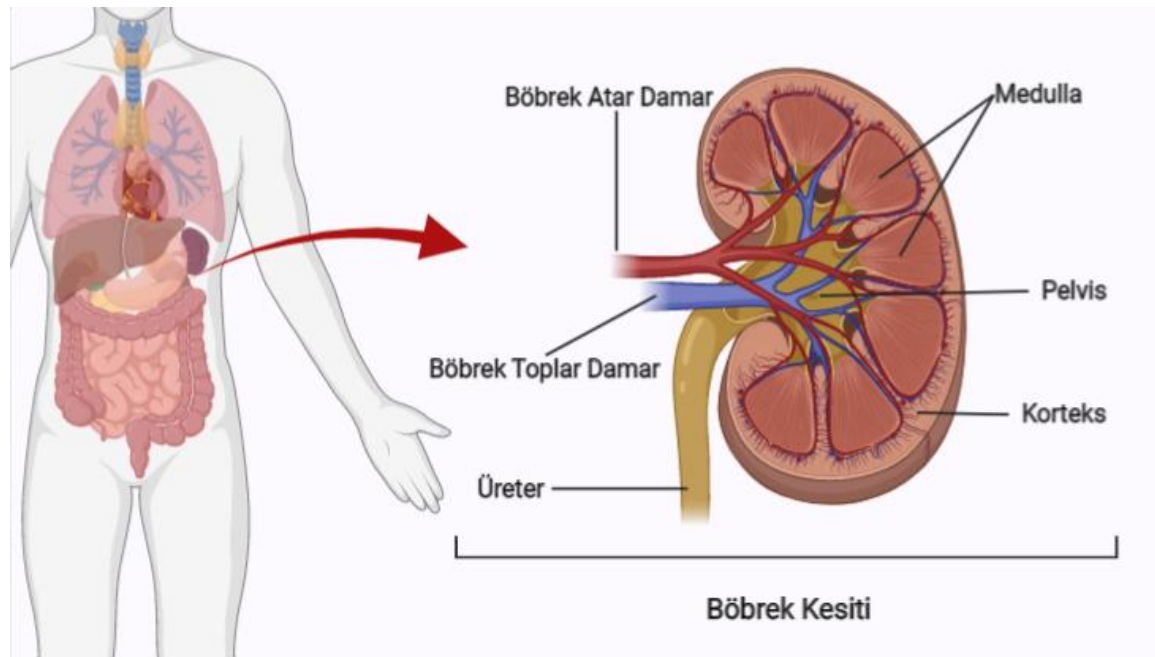
sahiptir ve etrafı bağ dokudan yapılmış korteks ile sarıdır. Korteks içerisinde süzme işlemi gerçekleştiren milyonlarca nefron bulunmaktadır (Başaklar, 2008).

### 1.2.2. Medulla Renalis

Medulla, korteks ile sinüs renalis arasında yer almaktadır. Medulla renalis'e malpigi piramidi veya renal piramid denir. Kırmızıya benzer bir renkte ve çizgili olarak görülmektedir. Çizgi görünümü olmalarını "*papilla renalis*" sağlar ve bu papilla renalisler idrarın pelvise akması için kanallar bulundurur (Keeton, 2004; Elçin vd., 2010).

### 1.2.3. Sinüs Renalis

Sinüs renalis böbreğin orta kısmında yer alan ve kaliksler yardımı ile idrarın, vücut dışına atılabilmesi için biriktiği yerdir. Kalikslerin birleşimi ile sinüs renalis ya da bir diğer ifade ile renal pelvisi meydana getirirler (McLaughlin, 2014).



Şekil 1.2. Böbrek kesiti (Başaklar, 2008)

### **1.3. Böbreğin Fizyolojik Yapısı**

#### **1.3.1. Nefronların Yapı ve Fonksiyonu**

Nefronlar böbreğin işlevsel ve yapısal birimi olarak görev alırlar. Böbreklerde bulunan nefronların miktarı yaklaşık olarak 2 ila 2,5 milyon arasındadır. Uzunlukları spesifik olarak değişse bile genel olarak 4-5 cm uzunluğundadır (Doğan, 2008). Yapısal olarak dallanmazlar fakat çok kıvrımlıdırlar (Beytur, 2019). Bir nefron, içerisinde afferent ve efferent damar, glomerulus, bowman kapsülü ve tübülüsler içermektedir. Tübüller ise distal tüp, proksimal tüp, toplayıcı kanallar ve henle kulbu gibi yapıları içermektedir. (Elçin vd., 2010; Beytur, 2019).

##### **1.3.1.1. Glomerulus**

Kalpte pompalanan kanın dörtte biri böbreklede süzülür (Arslan, 2020). Kan, glomerulus bölgesine afferent arteriollerden akmaktadır. Daha sonra afferent arteriol kılcal damarları birleşerek efferent kılcal damarlar olarak ortamdaki ayrılırlar. Glomerulusun oluşumu afferent kılcal damarların renal korbisküle girip daha sonra efferent kılcal damar olup çıkması ile gerçekleşir. Glomerulus, idrarın meydana gelmesindeki ilk aşamadır. Glomerular kılcal damarlar her kılcal damarın sahip olduğu gibi endotel hücreler arasında boşluklara sahiptir. Bu sebepten glomerulus kılcal damarları çok fazla geçirgendirler. Glomerulusu meydana getiren kılcal damarların bowman kapsülü içerisine itilmiş gibi bir görünümü vardır (Arslan, 2020).

##### **1.3.1.2. Bowman Kapsülü**

Böbreğin başlangıç kısmında yer alan fincan şeklindeki yapıdır. Aralarda bulunan boşluk ve epitel hücrelerden meydana gelmektedir. Aralarında bulunan boşluğa bowman kapsülü aralığı denmektedir. Dış kısmı (duvarı) epitel hücrelerden oluşur. Kalpten pompalanan kanın plazmasında bulunan kreatinin su, tuz, üre, ürik asit ve glukoz gibi maddelerin kapsül duvarından geçerek tubulusa ulaşır. Kalpten pompalanan kanın bir dakikada yüzde yirmi beşi bowman kapsülünden geçmektedir ve bu şekilde bir ya da iki litre kan süzülür (Cengiz, 2018).

### **1.3.1.3. Proksimal Tübülüs**

Proksimal túbülüsün düz ve kıvrımlı olarak iki kısmı vardır. Kıvrımlı kısım mikroviluslu epitel ile sarılıdır ve çoğu dar bir lümenine sahiptir. Burada bulunan mikroviluslar sayesinde meydana gelen serbest yüzeyler emilimi arttırmaktadır. Bu kısım önce bükülerek işlev görürken daha sonra düz bir yapı olarak medullaya uzanır. Düz kısımları ise medulla da bulunur ve birden daralarak henle kulbu ile birleşmektedir (Arslan, 2020).

### **1.3.1.4. Henle Kulbu**

Distal túbül ve proksimal túbül arasında bulunur ve medullada yer alır. Henle kulbunun etrafı yassı hücreler ile sarılıdır (Cengiz, 2018).

### **1.3.1.5. Distal Túbül**

Bu kısımda henle kulbundaki işlev biter, ardından distal túbül işleve girer. Distal túbül, çok az sayıda mikroviluslar ve geniş lümenleri olan epiteller ile örtülüdür. Başlangıcı glomerulusta bulunan afferent ve efferent kılcal damarlara temas haline girer ve buradaki túbül hücrelerinde histolojik değişiklikler meydana gelir. Distal túbüller kortekste bulunan toplayıcı kanallara bağlanarak medullaya giriş sağlar ve bu kısımda tekrar birleşme olur (Başaklar, 2008).

### **1.3.1.6. Toplayıcı Kanallar**

Bu kanalların tek bir görevi idrarı (üre) taşımaktır. İdrara bu kısımda herhangi bir işlem uygulanmamaktadır (Elçin, 2010).

## **1.4. Kemoterapi**

Kemoterapi kanser tedavisinde kullanılan ilaçlı bir tedavi yöntemidir. Bu yöntem tek başına uygulanabildiği gibi farklı diğer tedavi yöntemleri ile de kullanılabilir (Chu and Sartorelli, 2018). Kelime anlamı sitotoksik yani ilaçlı tedavi anlamına gelmektedir. Kemoterapi damar ve ağız yolu (kapsül) ya da krem şeklinde uygulanabilir. Bu



tedavi uygulandığında kan dolaşımına giriş yapar ve bölünme esnasında ki hücelere ciddi hasarlar verir. Bu hasarı, hücrede bölünmeyi durdurmak veya bölünmeyi engellemek şeklinde gerçekleştirir. Kemoterapideki amaç kanserli hücrenin tamamını hedef alarak yok etmektir ve tabii bunun yanı sıra yaşam kalitesini de arttırabilmektir. Fakat birçok yöntemde olduğu gibi kemoterapide de sadece hedef hücre hasara uğramaz hedef hücrenin yanında hızla çoğalan normal hücreler de etkilenip hasara uğrar (Erkut vd., 2009). Kemoterapide kullanılan ilaçlar birçok anti kanser ilaç ile birlikte kullanılabilir. Çünkü kemoterapi ilaçlarının her biri farklı etki mekanizmalarına sahiptir ve bu ilaçların ciddi yan etkileri (nefrotoksisite, hepatotoksisite, nörotoksisite, myelotoksisite) olmaktadır (Eren vd., 2012). Kemoterapi tedavisinde kullanılan ilaçlara kemoterapötik ilaçlar adı verilir. Bu ilaçlar, etki mekanizmaları ve patojen etkenlerine göre farklı gruplara ayrılır. Antineoplastik ilaçlar bu gruplardan biridir (Chu and Sartorelli, 2018).

### **1.5. Antineoplastik İlaçlar**

Antineoplastik ilaçlar kemoterapide kullanılan en etkili ilaçlardan olup kullanıldığında kanser hücrelerini ciddi anlamda etkilerler. Fakat aynı zaman da normal çoğalan ve büyüyen sağlıklı hücreleri de etkilemektedirler (Tuna, 2014). Genellikle hızlı büyüyen hücreler diğer hücelere göre antineoplastik ilaçlardan daha çok etkilenirler. Etkilenme dereceleri kullanılan ilaç türüne, dozuna ve kişiye göre farklı etkinlik gösterir (Temel, 2015). Doğru ilaçların, doğru dozlarda verilmesi her kanserli hasta için çok önem arz etmekte ve hastaların yaşam kalitelerini artırmaktadır. Antineoplastik ilaçlar nükleotit sentezini baskılamaktadır. Böylece hücrenin çoğalması ve büyümesini yavaşlatmaktadır. Antineoplastik ilaçlar yüksek miktarda kullanıldığında ciddi toksisite gösterir. Bunlar; gastrointestinal sistem, nörolojik, lenfotoksik hasar ve ciddi böbrek hasarı yani nefrotoksisiteye şeklinde sıralanabilir. Böbrekte genel olarak böbreğin üç ana kısmını hasara uğratır. İlk olarak işlevsellik gösteren glomerulus, distal ve proksimal tübüllerde fonksiyonel bozukluklara sebep olmaktadır. Glomerulustaki işlevsel bozukluk, genellikle glomerular filtrasyon hızındaki azalma ile birlikte kreatininin-serum ve idrardaki protein-kreatinin seviyelerindeki artışı ile karakterizedir (Erkut vd., 2009; Eren, 2012).

Proksimal tübüllerdeki fonksiyonel bozukluk, idrardaki sodyum miktarında artış ve kalsiyum, klor, fosfat ve magnezyum miktarlarındaki azalmaya bağlı olarak görülmektedir. Distal tübüllerdeki fonksiyonel bozukluk ise idrar pH'sı ve ozmolaritesindeki artışa bağlıdır. Bu durum, antineoplastik ilaçlara bağlı olarak özellikle kemoterapi gören hastalarda nefrotoksisite gibi ciddi yan etkileri oluşturmaktadır. Kemoterapide sıklıkla kullanılan antineoplastik ilaçlar altı alt grupta incelenmektedir (Can, 2005).

### **1.5.1. Bitkisel Kaynaklı Antikanserojenler**

Bu ilaç türleri bazı bitkilerden elde edilmekte olup kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Protein yapılı hücre iskeletini oluşturan mikrotübülleri etkilemektedir. Bitkisel kaynaklı antikanserojenler genellikle hücre döngüsünde metafaz evresini etkileyerek RNA ve protein sentezini inhibe etmektedir. Bitkisel kaynaklı ilaçların nörolojik, dermatolojik, reproduktif ve gastrointestinal hasarlar gibi yan etkileri görülmektedir. Bitkisel kaynaklı antikanserojenlerin vinkristin, vinblastin, paklitaksel gibi birçok ilaç çeşidi bulunmaktadır (Atasoy, 2016; Can, 2005).

### **1.5.2. Antitümör Antibiyotikler**

Antitümör antibiyotikler hücre döngüsüne bağlı olmadan nükleik asitlerin işlevi ve sentezi üzerinde etkilidirler. DNA ve RNA sentezini inhibe etmekte, DNA'nın fonksiyonunu bozarak ta etkisini gösteren ilaçlardır. Bu ilaçların yan etkileri gastrointestinal, hemotopoetik ve kardiyak etkilerdir. Bu ilaçlara doksorubisin, dounorubusin, bleomisin, daktinomisin örnek verilebilir (Toptancı et al., 2016).

### **1.5.3. Hormon ve Hormon Antagonistler**

Hormone ve hormon antagonistleri kanser gelişimini ve kanser büyümesini yavaşlatmak amacı ile kullanılır. Doğrudan tümörü etkiler ve vücutta kanser hücrelerinin beslenmesini sağlayan hormonları inhibe ederler. Bu ilaçlar genellikle endokrin, gastrointestinal ve reproduktif bozukluklara sebep olmaktadır. Östrojenler, progestinler, antiandrojenler, ganodotropin salgılatan hormonlar bunlara örnek verilebilir. Östrojen ve antiandrojenler

genellikle prostat kanserinde kullanılırken progestinler, meme kanseri ve metastatik renal karsinom kanserlerinde tercih edilen ilaçlardır (Yumurtacı, 2004; Atasoy, 2016).

#### **1.5.4. Alkilleyici İlaçlar**

Alkilleyici ilaçlar, hücrede büyümeyi veya fonksiyonları durdurmak gibi etkilere sahiptir (Temel, 2015). Bu etkilerini DNA çift sarmalında birden fazla yere kovalent olarak bağlanarak gerçekleştirmektedirler. Burada çift sarmalda bulunan guanin bazına alkil grupları eklenerek çift sarmal yapının olması gerektiği bağlanmayı engeller. Bağlanmanın gerçekleşmemesi sonucunda DNA çift sarmalında kırılmalar oluşmakta olup bu da kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir (Yumurtacı, 2004). Yani alkilleyici ajanlar bu yapıları ile DNA, RNA ve protein sentezini inhibe eder. Alkilleyici ilaçlara azotlu hardallar, alkil sülfonatlar, triozen ve nitrozoüre örnektir (Atasoy, 2016).

#### **1.5.5. Diğer Antineoplastik İlaçlar**

Bu ilaçlar genellikle hücre döngüsünde S fazına etki ederek protein, DNA ve RNA sentezini inhibe eder. Bu gruba giren ilaçlardan L-asparaginas çocuklarda akut lenfosit kanserlerinde kullanılan bir ilaçtır. Karboplatin ve sisplatin de bu grupta yer alan ilaçlardandır (Kanmaz, 2019).

#### **1.5.6. Antimetabolitler**

Antimetabolitler genel olarak kemik iliğine etki eder ve kemik iliği hücrelerinin çoğalmasını baskılar. Antimetabolit ilaçlar hücre döngüsünde S fazında etkili olup DNA çift sarmalını kırar ve DNA sentezi esnasında gerekli olan enzimlerin üretimini inhibe eder. Bu antimetabolitler doğal metabolitlerin analogudur. Bunlar; folik asit, pürin ve primidin olarak üç ana kısma ayrılır (Temel, 2015; Ceyhan, 2017).

### 1.5.6.1. Pürin

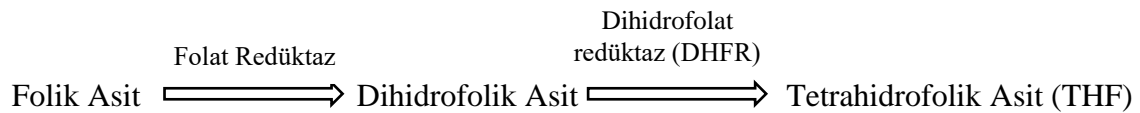
Bu gruptaki ilaçlar 6-tiogunin ve 6-merkaptopurin olarak bilinmektedir. Bu tür ilaçların etki etmeleri için hücre içerisinde pürin bazını ve pürin nükleozitleri nükleotitlere dönüştürülmelidir (Yumurtacı, 2004; Boxtel, 2007).

### 1.5.6.2. Pürimidin

5-florourasil (5-FU), sitorobin bu grup içerisinde yer alan ilaçlardır. 5-FU, DNA'da bulunan timin ve RNA'da bulunan urasil bazlarına benzerlik gösteren florlu bir primidindir. Sitorobin ise DNA ve RNA'ya katılmaktadır. Ama en fazla etkiyi DNA polimerazı baskılayarak yapmaktadır. Bu şekilde çoğalan hücreleri inhibe ederler (Boxtel, 2007; Ceyhan, 2017).

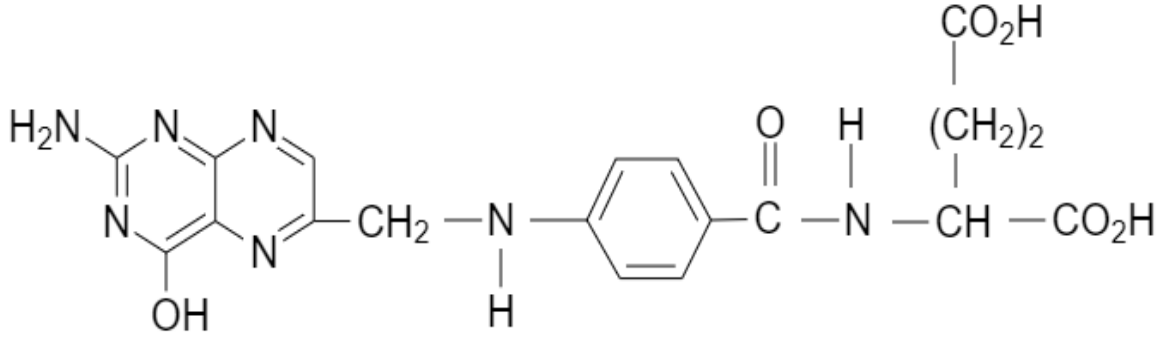
### 1.5.6.3. Folik Asit Analogları

Kanser tedavisinde malign olmayan birçok hastalıkta kullanılırlar.



Dihidrofolik asit, DHFR enziminin aktif noktasına bağlanarak THF sentezini gerçekleştirir. THF ise ATP, DNA ve RNA sentezlerinde gerekli olan pürin moleküllerinin sentezlenmesinde görev alır (Temel, 2015; Chu ve Sartorelli, 2018).

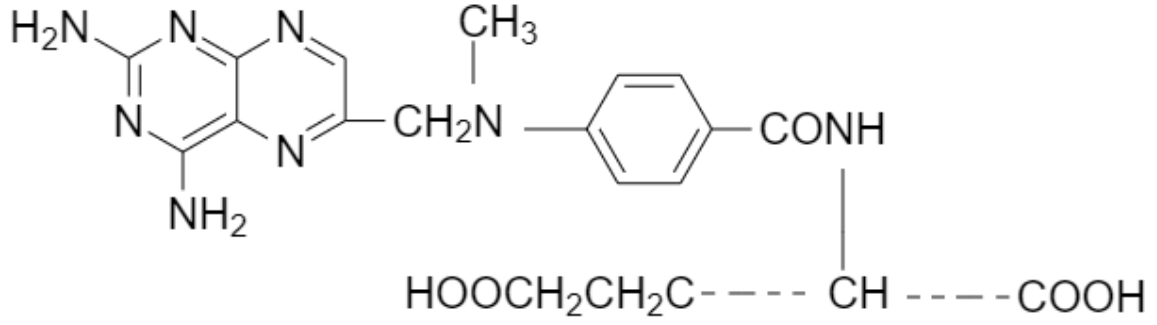
Bu ilaç türleri böbrek ve karaciğer gibi dokularda ciddi yan etkilere sahiptir. Ayrıca kemik iliği ve bağırsaklarda ülser oluşması görülen yan etkiler arasında yer almaktadır. Folik asit analoglarında kullanılan ana ilaç metotreksattır (Kavram, 2016).



Şekil 1.3. Folik asit kimyasal yapısı

### 1.6. Metotreksat

Metotreksat (MTX) kemoterapi de özellikle neoplazmda sıkça kullanılabilen folik asit anti metabolitidir. Folik asit anti metaboliti olmakla beraber yapısal olarak da folik aside benzemektedir (Çetinkaya et al., 2006). Anti metabolitlerin temel noktaları hücre siklusunda DNA, RNA ve protein sentezini durdurmaktadır (Çınar, 2013; Kavram, 2016; Günay et al., 2019). MTX’da aynı şekilde döngüde bu baskılamayı gerçekleştirmektedir. Anti metabolitlerin folik asit türevlerini ilk olarak Sydney Farber 1948’li yıllarda kemoterapi de kullanarak ortaya çıkarmıştır (Akyüz, 2015). Günümüzde birçok folik asit analogu bulunmakla beraber halen yaygın olarak MTX tercih edilmektedir (Akyüz, 2015). Folik asit antagonisti olarak bilinen MTX kimyasal açıdan 4-amino N<sup>10</sup>-metilin folik asit analogu olarak geçmektedir. Kimyasal adı ise N-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridinyl) methylamino] benzoyl]-L-glutamiktir (Kocaman, 2012). MTX folik asit yapısında yer alan dihidrofolatı (DHF), tetrahidrofolata dönüştüren DHFR enzimine etki eder. Buradaki enzimi baskılayarak DNA, RNA ve protein sentezinde yer alan pürin ve pirimidin nükleotitlerinin oluşmamasını sağlar. THF’ler pirimidin ve pürin nükleotitlerin sentezinde önemli bir alana sahip timidilatın üretimini sağlar. MTX’in sebep olduğu THF eksikliği ile pirimidin ve pürin metabolizmaları bu şekilde DNA, RNA gibi birçok metabolik yolları baskılamaktadır (Widemann and Adamson, 2006; Tian and Cronstein, 2007; Kavala vd., 2014; Armağan, 2015; Akyüz, 2015). Bu baskılamanın verdiği etki ile anti metabolit ilaç olarak kullanılan MTX, hem tedavi edici hem de toksik etkiler meydana getirmektedir.



Şekil 1.4. Metotreksatın kimyasal yapısı

### 1.6.1. Metotreksat Etki Mekanizması

Folik asit insan vücudunun ana yapılarında yer almaktadır. Fakat insan vücudu folatı sentezleyemez bundan dolayı da sürekli dışardan diyet şeklinde alınmaktadır. Folik asitin temel bileşeni THF'dir (Kocaman, 2012; Kavram, 2016). DHFR enzimi göstermiş olduğu işlev ile DHF'yi, THF'ye dönüştürmektedir. Chabner ve çalışma arkadaşları folik asit (FA) antagonisti hakkında ki 2 ana mekanizmayı önermiştir (Chabner et al., 1985). İlk olarak FA azalma teorisi açıklanmış olup bu teoriye göre hücre içerisinde FA azalması mekanizmada yer alan DHFR enziminin engellenmesine bağlı olması iken bir diğer teori ise yarışma teorisi olup DHF birikmesine bağlıdır (Chan and Cronstein, 2010). Bu teoride nükleotidlerin sentez aşamasında MTX' in baskılanması ile sağlamaktadır (Aşçı, 2010; Armağan, 2015; Kavram, 2016).

Metotreksat, hücre siklusunun da sentez fazında bulunan hücreleri etkilemektedir. Bu esnada hücre replikasyonunda rol alan DHFR enzime bağlanarak pürin ve pirimidin yapılarının oluşması için gerekli olan THF sentezini baskılamaktadır. Pürin ve pirimidin yapılarının oluşmaması hücre proliferasyonunda ve hücrelerin yaşamsal faaliyetlerinin sürekliliği açısından gerekli olan protein, DNA ve RNA sentezini baskılamaktadır. DHFR enzimini inhibe eden MTX, THF'nin azalmasına sebebiyet vermektedir (Akyüz, 2015). THF'nin azalması veya DHF'nin THF'ye dönüşümü sağlanamadığından dihidrofolat poliglutamatlar ve MTX'in poliglutamat ile zararlı metabolitler halinde birikmeye sebep olur. Poliglutamatlar hücre içerisinde biriktiğinde DHFR enzimlerine bağlanıp, DHF ile yer değiştirerek etkilerini gösterir. Poliglutamat metabolitler tarafından timidilat sentezi ve pürin sentezinde yer alan transformilaz enzimlerinin inhibisyonu yapılmaktadır.

Hücrelerde MTX'in toksik etkileri folinik asit (N5-formiltetrahidrofolat) ile antagonize edilmektedir. FA, THF'ye dönüşümü sağlanamadığından antidot olarak kullanılamazlar. Poliglutamatlar, 5-10 metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi, glisinamit ribozil 5 fosfat formil transferaz ve amino imidazole karboksi amid, ribozil 5 fosfat formil transferazları baskılamaktadır. 5-metilentetrahidrofolatın azalması homosistein ve adenozin seviyelerinde artmaya sebebiyet verirken homosistein remidasyonunda azalmaya sebep olmaktadır. Bu durum metionil transportunu ve metionin sentezini baskılamaktadır (Aşçı, 2010; Çınar, 2013; Kavala vd., 2014; Armağan, 2015; Kavram, 2016).

### **1.6.2. Metotreksat Yan Etkileri**

Metotreksatın yan etkileri oldukça fazla olup ilaç etkisinin şiddeti değişkenlik göstermektedir. Sık olarak karşılaşılan kusma, bulantı, ense sertliği, duyu kaybı, bel ağrısı, bağırsak ve mesane disfonksiyonu gibi hafif etkiler, ilaç bırakıldığı zaman yavaşça etkilerini kaybedebiliyorken, bununla birlikte kemik iliği süpresyonu, mukozitis (gastro intestinal mukoza) da oluşan hasarlar da yer almaktadır (Kocaman, 2012). MTX'in uzun süreli ve yüksek dozdaki kullanımlarında daha ciddi ve kalıcı etkilere sebep olur. Bu etkilerin başında nefrotoksisite olmak üzere hepatotoksisite, pulmoner infiltrasyon ve fibrozis takip etmektedir (Widemann and Adamson, 2006; Armağan, 2015; Famurewa et al., 2019; Ezhilarasan, 2021). Yüksek dozda kullanımında sindirim sistemi tarafından metabolize edilir ve atılımı salınır. Atılımı gerçekleştiği esnasında emilim azalır. Verilen dozun büyük çoğunluğu idrarla atılmaktadır. Bu şekilde MTX atılımı tübüler ve glomerüler filtrasyonda gerçekleşir. Bu sebeple renal kan akımının azalmasına neden olur ve nefrotoksik hasarlara sebep olur (Erkurt, 2009; Eren, 2012).

### **1.7. Antioksidanlar**

Antioksidanlar protein, DNA, lipit ve karbonhidratlar gibi okside olabilen bileşikler içeren veya oksitlenen substratlara göre düşük konsantrasyonlara sahip ve substratların oksidasyonunu engelleyen maddeler olarak adlandırılmaktadır (Birangane et al., 2011). Antioksidanlar, insan vücudunda serbest radikaller tarafından oluşabilecek oksidatif strese karşı koruma sağlayan yapılardır. Serbest radikaller hücre yapısında bulunan proteinlere, lipitlere, DNA'ya, nükleik asitlere, hücre membranına ciddi hasarlar

vermektedir. Antioksidanlar serbest radikallerin aktivasyonunu inhibe ederek hücreye verilen hasarı engellemektedir (Şenol, 2015). Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak iki farklı grupta incelenir. Eksojen ve endojen kaynaklı antioksidanlar vücudu serbest radikallerin vermiş olduğu hasarlardan korumakla beraber, serbest radikallerin etkinliğini azaltmaktadır. Endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar Tablo1.1’de gösterilmiştir (Karabulut ve Gülay, 2016).

Tablo 1.1. Antioksidanların sınıflandırılması

<b>ANTIOKSİDANLAR</b>		
<b>Endojen Kaynaklı Antioksidanlar</b>		<b>Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar</b>
<b>Nonenzimatik Antioksidanlar</b>	<b>Enzimatik Antioksidanlar</b>	<b>Vitamin Antioksidanlar</b>
Glutatyon	Süperoksit dismutaz (SOD)	Vitamin A (Beta karoten)
Melatonin		
Ürik asit	Katalaz (KAT)	Vitamin B9 (Folik asit)
Bilirubin		
Koenzim Q	Glutatyon redüktaz (GR)	Vitamin C (Askorbik asit)
Selenyum		
Lipoik asit	Glutatyon peroksidaz (GPx)	Vitamin E (Alfa tokoferol)
Transferin		

### 1.7.1. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar

#### 1.7.1.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

Melatonin N-asetil-5-metoksi triptomin olarak bilinir. Epifiz bezinden üretilip dolaşım sistemine katılmaktadır. Melatonin hücre yapısında bulunan lipit, protein ve DNA’yı serbest radikallerin vermiş olduğu hasara karşı koruma sağlamaktadır. Melatonin antioksidanı SOD, KAT ve GPx enzimlerini uyarır. Melatonin hücre membranına sağlamlık kazandırır ve bu şekilde hücre membranına verilmek istenen hasarı en aza indirir. Melatonin sadece beyinde bulunan epifiz bezinde değil ayrıca gastrointestinal



sistemde, kemik iliği hücrelerinde, safra kesesinde de salgılanabilen bir hormon çeşididir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Bilurubin kırmızı kan hücrelerinin parçalanması sonucunda meydana gelmektedir. Dolaşım sistemine karaciğer dokusundan katılmakta olup, biyotransformasyon sonucunda idrar ve safra yolları ile dışarı atılmaktadır. Bilurubin, peroksil radikallerini etkilemektedir (Karabulut ve Günay, 2016).

Yaklaşık olarak 66 KDA ağırlığına sahip olan albümin, vücutta ozmatik basıncı düzenleyen bir plazma proteindir. Albümin proteini kanın konsantrasyonunu dengede tutmaktadır. Albümin sadece kanda değil kas, deri, ter ve safrada yüksek miktarda bulunmaktadır (Karabulut ve Günay, 2016).

İnsanlarda pürin metabolizmasında son ürün olarak meydana gelen ve suda çözünebilen ürik asit plazmada urat olarak yer almaktadır. Plazma içerisinde normal konsantrasyonlarda yer alan urat süperoksit, singlet oksijeni ve hidrosili etkisiz hale getirir (Kandemir, 2019; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Koenzim Q10, ubikinon, vitamin Q10 olarak da adlandırılmaktadır. Doğal olarak sentezlenebilmekte olup yağlarda çözünebilir. Hem hayvan hem de insanlarda sentezlenebilirler. Hücre membranında ve lipoproteinlerin içerisinde yer almaktadır (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Alfa lipolik asit bir vitamin değildir. Asıl görevini Krebs döngüsünde yapmaktadır. Döngüde görev alan dehidrojenaz enzimi için kofaktör olarak çalışmaktadır. Alfa lipolik asit çok iyi bir antioksidandır. Hayvan dokularında en çok böbrek ve karaciğerde yer alırken, bitkilerde domates, ıspanak gibi sebzelerde yer almaktadır (Karabulut ve Günay, 2016).

Selenyum antioksidanına genellikle selenosistein denmektedir. Selenosisteinle amino asit sentezinde kullanılmaktadır. Vücutta birçok selenosistein proteinleri yer almaktadır. Selenosisteinler reaktif oksijen türlerinin oluşmasını inhibe ederler. Bu baskılama GPx enziminin aktivitesinde artışa neden olur (Kandemir, 2019; Karabulut ve Günay, 2016).

Transferrin antioksidanı genellikle serumda bulunur. Vücut sıvılarında da çok az miktarda bulunur. Ana görevi hücrelere demir iyonunu taşımaktır. Böylelikle hücrelerin gelişim sağlamasında önemli bir rolü vardır (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Seruloplazmin kanda bulunan bakırı taşıyan bir antioksidandır. Bunun yanı sıra seruloplazmin eritrositlerde yer alan doymamış yağ asitlerini, oksijen radikallerinin verdiği hasara karşı korumaktadır (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

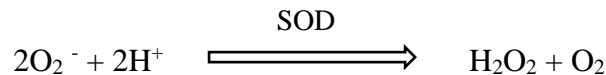
Glutatyon (GSH) karaciğer ve böbrek gibi dokularda yüksek miktarlarda bulunan tripeptit yapısına sahip suda çözünebilen bir antioksidandır. Hücrenin çekirdeğinde sentezlenen GSH genellikle sitoplazmada yer alırken, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organellerde de yer alırlar. Glutatyon molekülü bazı vitaminleri ve hücre membranında bulunan amino asitlerin taşınmasını sağlar (Karabulut ve Günay, 2016).

### 1.7.1.2. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar içerisinde yer alan SOD, KAT, GPx ve GR gibi antioksidan enzimler, çeşitli biyomolekülleri (DNA, RNA, protein vb.) serbest radikallerin oluşturabileceği oksidatif hasara karşı korur (Aslankoç vd., 2019).

### 1.7.1.3. Süperoksit Dismutaz Enzimi

Süperoksit dismutaz enzimi reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı verilen ilk savunmadır. Enzimatik bir antioksidan olan SOD süperoksit radikalini ( $O_2^-$ ) oksijen ( $O_2$ ) ve hidrojen peroksite ( $H_2O_2$ ) katalizler. Açığa çıkan hidrojen peroksit ortamdan GPx ve KAT yolu ile uzaklaşmaktadır (Çağlayan, 2018; Elias et al., 2018).



SOD'un bilinen üç farklı izoformları bulunmaktadır. Bunlar; manganez, çinko+bakır (Zn+Cu) ve Cu SOD'dur. Cu ve Zn içeren SOD izoformu lizozom ve sitoplazmada, manganez izoformu mitokondride ve Cu SOD izoformu ise plazmada yer almaktadır. Hücre yapısında en fazla Zn+Cu SOD izoform bulunur. SOD düzeylerindeki azalma

serbest radikallerin meydana gelmesinde artışa sebep olmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016).

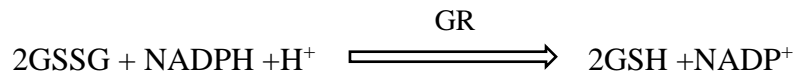
#### 1.7.1.4. Katalaz Enzimi

Katalaz enzimi dört farklı protein alt birimlerden oluşmaktadır (Anitha and Rajadurai, 2014). Bu alt birimlerin yapısında NADPH ( $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) molekülü ve hem grubu yer almaktadır. KAT genellikle aerobik hücrelerde bulunmakta olup bu özellikten dolayı karaciğer ve eritrositlerde yoğun bir biçimde yer almaktadır. Doku içerisinde peroksizom, mitokondri ve endoplazmik retikulum organellerinde görev alır. KAT enzimi, dokulardaki  $H_2O_2$  ile reaksiyon vererek bu  $H_2O_2$ 'leri su ve oksijene dönüştürür. Bu dönüşüm  $H_2O_2$ 'lerden oluşabilecek hidroksil radikallerini engellediğinden dolayı çok iyi bir antioksidan etki gösterebilmektedir (Çağlayan, 2018; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).



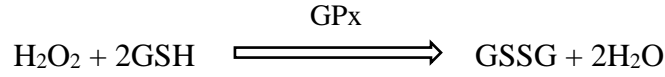
#### 1.7.1.5. Glutasyon Redüktaz Enzimi

Glutasyon redüktaz enzimi, flavoprotein cinsi bir enzim olup flavin adenin dinükleotid (FAD) içermekte ve tetramer yapıdadır. İçerisinde dört selenyum atomu bulundurmaktadır (Margis et al. 2008). GR, reaksiyonun genellikle NADPH'ı bulunan bir elektronu glutasyon disülfid (GSSG) molekülüne bağlanarak reaksiyon sonucunda tekrardan GSH'ın açığa çıkmasını sağlar. Bu sebeple serbest radikallerin oluşturduğu zararları en aza indirmek veya engelleyebilmek için NADPH'a gereksinim duyulur. Bu sayede çok etkili bir antioksidan olan GSH tutabilmektedir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016).



### 1.7.1.6. Glutasyon Peroksidaz Enzimi

Glutasyon peroksidaz enzimi hücreleri, hidrojen peroksit kaynaklı oluşan oksidatif hasara karşı korumaktadır. Bu enzim hücrenin sitoplazmasında yer almakta ve lipid peroksidasyonu kontrolünde önemli bir yeri vardır. GPx dört farklı protein alt biriminden oluşmaktadır. Her alt biriminde selenyum atomu bulunmaktadır. GPx reaksiyonu hidrojen peroksit ile elektron kaynağı olarak kullanmış olduğu GSH tepkimeye girip GSSG ve su açığa çıkmasıyla gerçekleşir. GPx enzimi selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız GPx olarak iki farklı grubu bulunmaktadır. Selenyum bağımlı GPx'in etki mekanizması hidrojen peroksit ile organik hiperoksitleri etkilerken selenyuma bağımlı olmayan GPx ise en fazla organik hiperoksitleri etkileyebilmektedir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016; Çağlayan, 2018).



### 1.7.2. Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar

Eksojen kaynaklı antioksidanlar genellikle dışardan vücuda alınan antioksidanlardır. Vitaminler E, A, C ve B9 olarak dört kısımda incelenir (Yadav et al., 2016; Aslankoç vd., 2019).

Vitamin E genellikle mısır, soya, buğday veya pamuk yağında bulunmaktadır. Yağda çözünebilen bir vitamin çeşididir. E vitamini vücuttaki lipid peroksidasyonunu engelleyerek asimetrik bir bileşik olarak bilinmektedir. Serbest radikallerin hücre membranında oluşturduğu hasarı düzenlemeye yardımcı olmaktadır (Şenol, 2015; Ateş, 2015). A vitaminleri ise provitaminler olarak bilinir ve yağda çözünen vitaminlerdir. Genellikle havuç, süt, dut, patates ve incir de bulunur (Birange et al., 2011).

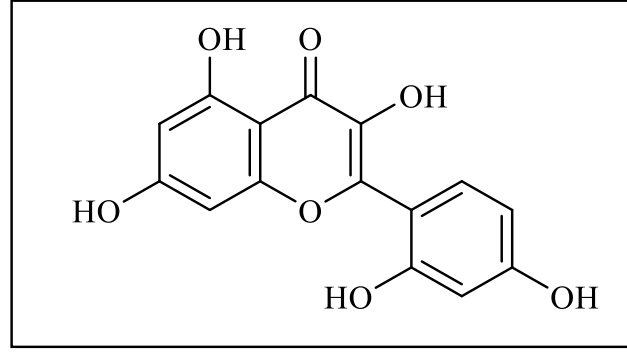
Askorbik asit (C vitamini) genellikle suda çözünmektedirler. Serbest radikallerin oluşturmuş olduğu hasarlara karşı koruma sağlamaktadır. İncir, dut, portakal, limon, domates gibi meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunur (Ateş, 2015; Kandemir, 2019).

B9 (Folik asit) vitamini suda çözünebilen bir vitamindir. Folik asit genellikle kuşkonmaz, maydanoz, turunçgiller ve brokoli gibi besinlerde yer almaktadır. Bu vitaminler tek başına veya B grubu vitaminleri ile kullanılmaktadır (Guilland and Aimone-gastin, 2013; Sobczynska-Malefora and Harrington, 2018).

### 1.8. Morin Hidrat

Yıllardır alternatif tıpta sıklıkla kullanılan bitkiler ya da bunlardan elde edilen ürünler (sebze ve meyveler) günümüzde modern tıpta da önemli bir yere sahiptirler. Bitkiler sekonder metabolitler olarak bilinen birçok biyoaktif özelliklere sahip fenolik ve flavonoid bileşiklere sahiptir. Bu bileşikler canlı organizmalarda antimikrobiyal, antikanser, antienflamatuar ve antioksidan etki sergilemektedir (Mendoza-Wilson et al., 2011; Sapmaz, 2015). Günümüzde önemli bir antioksidan bileşik olarak karşımıza çıkan Morin hidrat bileşiği incir ve dut gibi meyvelerin sahip olduğu en önemli sekonder metabolitlerinden biridir (Olonode et al., 2019).

Bir sekonder metabolit olarak karşımıza çıkan morin hidrat (3,5,7,2',4'-pentahidroksi flavon) bileşiği ilk olarak Moraceae ailesinin bir üyesi olan *Morus alba L* (Beyaz dut) olarak adlandırılan bitkiden izole edilmiştir (Subash and Subramanian, 2009; Nandhakumar, 2012; Sapmaz, 2015). Bu bileşik beyaz dut haricinde incir, badem ve çay gibi birçok bitkiden de izole edilebilmektedir (Zhang, 2021). Yapılmış olan bazı çalışmalarda Morin'in antioksidan, antiproliferatif, antienflamatuar, antineoplastik, antiapoptotik, hepatoprotektif ve antidiyabetik gibi birden fazla biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (Olonode et al., 2019; Çağlayan, 2019; Mottaghi and Abbaszadeh, 2021). Kimyasal yapısı şekil 1.5'de olan morin hidrat bileşiğinin yüksek miktarlarda da kullanıldığında toksik etkilerinin oldukça az olduğu gözlemlenmektedir. Bu özelliği bakımından diğer eksojen kaynaklı antioksidanlarla karşılaştırıldığında önemli avantaj sağlamaktadır (Sang et al., 2017; Çağlayan, 2019).



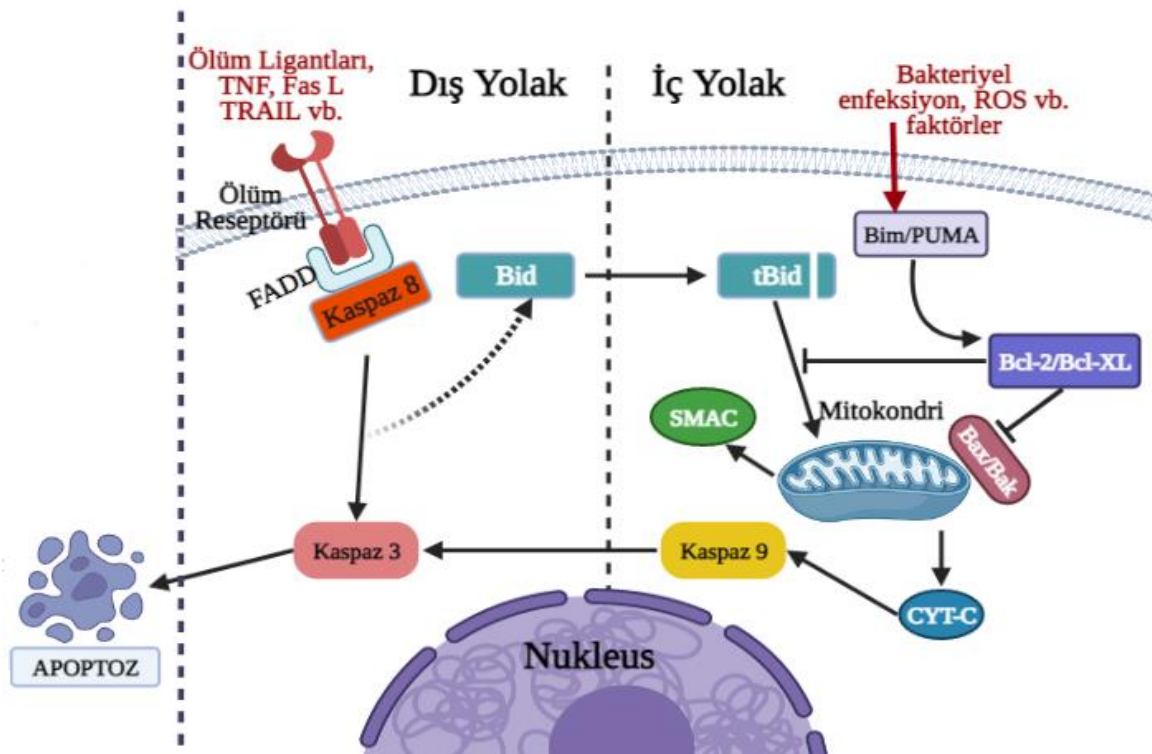
Şekil 1.5. Morinin kimyasal yapısı

### 1.9. Apoptoz

Apoptoz ilk olarak 1972’li yıllarda Kerr ve çalışma arkadaşları tarafından kullanılmış bir terimdir (Pompei et al., 2015; Kartlaşmış vd., 2016). Bu terimin kökü Apo ayrı anlamına gelirken tozis ise düşen anlamın da kullanılmaktadır (Aktuğ, 2014). Kanserde sıkça karşılaşılan bir olay olmakla beraber hücre ölümüne sebep olan bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. Apoptoz, genetik anlamda düzenlenmektedir. Bundan dolayı programlı hücre ölümü olarakta adlandırılabilir. Programlı hücre ölümü genel olarak farklı yapıda ve farklı enerjilere bağlı olarak gelişen biyokimyasal sistemler ile karakterize olmaktadır. Bir hücrenin yaşamı ya da ölümü kontrol etme yeteneğinin mükemmel teröpatik varlığı sebebi ile çok sıkı çalışmaktadır (Franklin and Mccubrey, 2000; Darendelioğlu, 2017). Apoptozda meydana gelebilecek herhangi bir terslik neticesinde insanlarda otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklar veya çeşitli kanser hastalıkları gibi birçok problem gözlemlenebilmektedir (Darendelioğlu, 2017). Yaşamsal bir bileşen olarak karşımıza çıkan Apoptoz immüno sistem gelişimi, hücre siklusu veya çeşitli kimyasal varlığı ile hasara uğramış olan hücrelerin kontrollü bir şekilde ölümüne sebebiyet vermektedir (Kartlaşmış, 2016). Apoptoz; efektör, genetik düzenleme ve başlama evreleri şeklinde 3 farklı evrede incelenebilir (Renehan, 2001). İlk evre olan başlama evresini etkileyen birçok faktör olduğu bilinmektedir. Bunlar gama ışınları, antikanser ilaçlar, ölüm reseptörleri aktivatörleri, ultraviyole ışınlar veya interlökin-1 (IL-1) gibi çeşitli faktörler sayılabilir. Bu uyarılar sırasıyla gen ekspresyonunun karakteristik modellerini oluşturmaktadırlar. Bu evrenin yanı sıra efektör ve genetik düzenleme mekanizmalarında genellikle Bcl-2 ailesine mensup proteinler görev

almaktadır. Bcl-2 ailesine mensup proteinler antiapoptotik (yaşamsal genler) ve proapoptotik (ölüm emri veren genler) olarak sınıflandırılırlar. Tümör baskılayıcı gen olan p53 iyi karakterize edilmiş bir apoptotik ajandır. Bununla birlikte başlıca efektör kaspazlardan olan kaspaz-3, kaspaz-8, ve kaspaz-9 proteaz ailesinin en önemli elemanlarıdır (Renehan, 2001; Lüleyap, 2008; Darendelioğlu, 2017).

Bazı çalışmalarda yer alan iki farklı apoptoz yolağı bulunmaktadır bunlar intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (dışsal) yolak olarak bilinmektedir. Her iki yolağında aktiviteleri birbirlerine bağlı oldukları ve bununla birlikte bir yolakta bulunan moleküllerin bir diğer yolakta bulunan molekülleri etkilediklerini kanıtlanmıştır (Ashkenazi, 2008; Ashkenazi et al., 2017; Gökhan vd., 2020).



Şekil 1.6. Apoptotik sinyal yolları (Parrino et al., 2007)

### 1.9.1. Apoptozda İntrensik (Mitokondriyal) Yolak

Mitokondriyal yolak hücre içerisinde gerçekleşen uyarılar sonucunda mitokondrinin de içeriye dahil olması ile oluşan programlı hücre ölümüne verilen addır (Ashkenazi, 2017). Hücresel stres tarafından iç yolağın aktivasyonu proapoptotik BH3 proteinleri

antiapoptotik gen olan Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-XL proteinlerini inhibe etmektedir (Akşit ve Bildik, 2008). Proapoptotik proteinlerden olan Bax ve Bak genlerinin aktive edilmesi ve bununla birlikte Bcl-2 proteinlerinin oligomerilizasyonu mitokondriyal zarın geçirgenliğinin bozulmasına sebep olmaktadır (Franklin and Mccubrey, 2000; Kartlaşmış vd., 2016). Bu olayın ardından mitokondride bulunan kaspaz uyarıcısı olan sitokrom-c (CYT-C) veya smac proteinleri stoplazma içerisinde çoğalmaya başlar. Daha sonra CYT-C, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) ile Prokaspaz 9 bir kompleks oluşturmaktadır (Gökhan vd., 2020; Darendelioğlu, 2017). Bu şekilde Prokaspaz 9'un aktifleşmesi sağlanır ve kaspaz 9 olarak adlandırılır. Kaspaz 9 ise Prokaspaz 7 ve Prokaspaz 3' ü aktifleştirir ve bu kaspazların aktifleşmesi sonucunda mitokondriyal yolağında görev alan bütün proteinler hücre ölümüne sebep olmaktadır (Ashkenazi, 2008; Ashkenazi, 2017; Gökhan vd., 2020).



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Metotreksat, folik asit antagonisti olarak bilinmektedir. Kemoterapötik bir ajan olan bu ilaç otoimmün hastalıklar, tümör ve iltihaplı hastalıklar gibi birçok hastalık türünde tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Kanser hastalığına karşı da kullanılan güçlü bir kimyasal ilaçtır. Bu ilaç hücre metabolizmasında engellere sebep olur ve tedavi amaçlı kullanılan bu antimetabolitin birçok yan etkisi de bulunmaktadır. Söz konusu yan etkiler MTX'in etki mekanizmasından kaynaklı oluşan folat eksikliği, pürin metabolizmasında farklı biyokimyasal aktiviteleri etkilemektedir (Famurewa et al., 2019; Ezhilarasan, 2021).

Kandemir ve ark. (2020) yapmış olduğu ratlarda akrilamid kaynaklı nefrotoksisite ve hepatotoksisiteye karşı morin hidratin olası koruyucu etkileri araştırılmıştır. Yapılan araştırmada akrilamid uygulanan grupta serum kreatinin ve üre düzeylerinde ve MDA seviyelerinde artış gözlenmiştir. Aynı zamanda KAT, GPx ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde ve GSH düzeyinde azalma olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte morin ile tedavi edilen gruplarda MDA, üre ve kreatinin düzeylerinde azalma olduğu görülürken KAT, SOD, GPx ve GSH gibi antioksidan parametrelerde önemli düzeyde artış olduğunu belirtmişlerdir. Bunun sonucunda akrilamid kaynaklı oluşan nefrotoksisite ve hepatotoksisite hasarlarına karşı antioksidan etkiler göstermiştir. Ek olarak akrilamidin PI3K, mTOR ve Akt yollarının seviyelerinde bir düşüş görülürken, morin uygulamasından sonra bu yolların düzeylerinde artış gözlenmiş olup antiotofajik ve antiapoptotik etkiler sergileyip koruyuculuk gösterdiklerini rapor etmişlerdir (Kandemir et al., 2020).

Kaltalıoğlu ve çalışma arkadaşının (2016) yapmış olduğu araştırmada sisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı morin ve hesperidinin oksidatif stres üzerindeki, potansiyel koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma çalışması sonlandığında MDA, SOD, KAT, GSH, MPO (miyeloperoksidaz), NO (nitrik oksit) aktiviteleri ölçülmüştür. Sisplatine maruz kalan ratların MDA ve MPO seviyelerinde bir artış meydana geldiğini, bunlarla birlikte SOD, GSH ve KAT aktivitelerinin de düştüğü gözlenmiş olup, sisplatinin oluşturmuş olduğu bu hasara karşı morin ve hesperidin tedavisinde oksidatif stresi

önlemekle beraber NO, KAT, GSH, MDA ve MPO düzeylerinde olumlu bir şekilde etkilemiş olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak morin ve hesperedinin kombine tedavisinde, sisplatin kaynaklı oluşmuş nefrotoksisitenin korunması için önemli bir potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır (Kaltalioglu and Coskun-Cevher, 2016).

Kuzu ve ark. (2019) yapmış olduğu çalışmada doğal bir flavonoid olan morinin sıçanlarda doksorubisin kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarına karşı koruyucu etkileri biyokimyasal, immunohistokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılmıştır. Doksorubisin kullanılan grupların karaciğer ve böbrek dokularında GSH, SOD, KAT, GPx gibi aktivitelerinde azalma MDA düzeyinde ise artış ölçülmüştür. Karaciğer ve böbrek dokularındaki hasarı hem histopatolojik olarak hem de serum alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), kreatinin ve üre analizleri yapılmış olup morin ile tedavi edilen gruplarda doksorubisinin neden olduğu, oksidatif hasarın azaldığı, karaciğer ve böbrek dokularındaki belirteçlerde iyileşme görülmüştür. Histopatolojik incelemede de karaciğer ve böbrek dokularında doku hasarının önlendiği rapor edilmiştir (Kuzu et al., 2019).

KV ve ark. (2016) gerçekleştirmiş olduğu çalışmada sisplatin kaynaklı böbrek ve karaciğer hasarını önlemek için antioksidan özelliğe sahip olan morinin etkilerini incelemişlerdir. Sisplatinin karaciğer ve böbrek dokularında GSH düzeyinde ve SOD, KAT ve GPx gibi enzim aktivitelerinde azalma MDA düzeyinde ise artış olduğu belirtilmiştir. Elde ettikleri sonuçlardan sisplatin kaynaklı karaciğer ve böbrek dokusunda oluşan hasara karşı morinin koruyucu etkileri olduğu rapor edilmiştir (KV et al., 2016).

Vardi ve ark. (2013) yapmış oldukları çalışmada MTX ile indüklenen apoptotik hücre ölümü ve böbrek hasarında, kayısının koruyucu rolünü histolojik ve biyokimyasal parametrelerle değerlendirilmesi yapılmıştır. Makalede MTX'e bağlı olarak oluşan böbrek yetmezliğinde üre ve kreatinin düzeylerinde önemli derece artış olduğunu saptamışlardır. Bunun yanı sıra MTX sıçanlarda lipit peroksidasyonunu önemli ölçüde indüklediğini ve antioksidan aktivitelerini azalttığını da belirtmişlerdir. Ayrıca MTX'e maruz kalan sıçanların böbrek dokularında glomerülaskleroz ve apoptoz gibi önemli histolojik hasarlara yol açmıştır. Sonuç olarak çalışmada kayısının tedavi amaçlı

kullanımı SOD, GPx ve KAT düzeylerini arttırdığını ve MTX'in nefrotoksisiteye vermiş olduğu hasarı da en aza indirdiği rapor edilmiştir (Vardi et al., 2013).

Çetin ve ark. (2017) gerçekleştirmiş olduğu çalışmada sıçanlarda MTX ile indüklenen akut oksidatif stres ve nefrotoksisiteye ökse otu ekstraksının koruyucu etkilerine bakılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda MTX sıçanlarda renal oksidatif strese ve nefrotoksisiteye neden olmuş ve ökse otu tedavisi uygulandığında MTX grubundakilere kıyasla GSH, GPx ve SOD gibi aktivitelerin düzeylerinde iyileşme olduğu söylenmiştir. Yine aynı şekilde MTX ve ökse otu grubu, MTX grubuna göre perirenal inflamasyon, tübül distasyonu, parankimal kanama, glomeruler konjesyon ve dejenerasyon olmak üzere MTX ile indüklenen renal dejeneratif değişikliklerde iyileşme olduğu rapor edilmiştir (Çetin et al., 2017).

Ahmed ve ark. (2015) MTX'in birçok hastalık (kanser, romatoid artrit) tedavisinde kullanıldığını söylemiş ama MTX kullanımı nefrotoksisite hasarı sebebiyle kısıtlandırılmıştır. Bu yüzden bu çalışma sarımsağın MTX kaynaklı olarak oluşmuş olan nefrotoksisite hasarına karşı koruyucu etki gösterip göstermediği araştırılmıştır. Çalışma sonucunda MTX'in renal antioksidan enzim seviyelerini azalttığını ayrıca MDA ve NO seviyelerini ise arttırmış olduğunu bunun yanı sıra serum üre ve kreatinin düzeylerinde de artışa sebep olup bazı elektrolitlerde düzensizliklere yol açtığı gösterilmiştir. Sarımsak tedavisi ise antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığını ve böylelikle sarımsağın böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiğini belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra sarımsak böbrek morfolojisindeki değişiklikleri engellemiş ve böbrekteki oksidatif stresi azalttığı rapor etmişlerdir (Ahmed et al., 2015).

Morsy ve ark. (2013) gerçekleştirmiş oldukları çalışmada antikanser ve immunosupresif bir ajan olan MTX'in neden olduğu nefrotoksisiteye karşı kurkuminin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Kurkumin tedavisinde GPx ve SOD aktivitelerinde artış olduğu gözlemlenirken MDA seviyesinde ise azalma olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca kurkumin tedavisinde serum üre ve kreatinin seviyelerinde önemli bir şekilde azalma olduğunu belirtmişlerdir. Histopatolojik incelemede kurkuminin koruyucu etkileri gösterilmiştir. Sonuç olarak kurkuminin antioksidan, antienflamatuar özellikleri ile ratlarda MTX kaynaklı oluşan böbrek hasarını engellediğini ve bununla birlikte immünohistokimyasal

analizlerde de kurkuminin siklooksijenaz-2 ekspresyonu önemli düzeyde azaltmış olduğunu rapor etmişlerdir (Morsy et al., 2013).

Ek olarak Hassanein ve ark. (2019) MTX kaynaklı olarak gerçekleştirdikleri nefrotoksisiteye karşı izokinolin tipi alkaloidten elde edilen berberin bileşimini kullanmışlardır. Yapmış oldukları bu çalışmada Bax, Bcl-2, Cas-3, NF- $\kappa$ B ve P38 gibi apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda MTX'in proapoptotik genleri indüklediğini, antiapoptotik genleri ise baskılayabildiğini rapor etmişlerdir. Bu sonuçların yanı sıra biyokimyasal ve histopatolojik değişikliklerin belirgin bir şekilde olduğunu belirtmişlerdir. Berberinin MTX ile kullanımı sonucunda MTX'in sebep olduğu böbrek hasarını engelleyebildiğini rapor etmişlerdir (Hassanein et al., 2019).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Kullanılmış olan bütün cihazlar ve ekipmanlar tablo 3.1 de belirtildiği gibi tercih edilmiştir.

Tablo 3.1. Deney esnasında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar

<b>CİHAZLAR VE EKİPMANLAR</b>	<b>MENŞEİ ÜLKE</b>	<b>ŞİRKET</b>
TissueLyser II	Almanya	Qiagen
Santrifüj	Almanya	Hettich universal 320R
SpectraMax Plus 384 Mikroplaka Okuyucu	Almanya	Molecular Devices
Otoklav	Japonya	Hirayama
Derin dondurucu (-80)	İngiltere	Nuaire
Buzdolabı	Türkiye	Arçelik
Elektroforez tank sistemi	ABD	Bio-Rad
Spektrofotometre	Japonya	Shimadzu
Mikropipet seti	ABD	Eppendorf
Manyetik karıştırıcı	Almanya	İka
Saf su cihazı	ÇİN	Human
Trans blot sistemi	ABD	Bio-Rad
pH metre	ABD	Thermo
X ray cihazı	ABD	Carestream
Çalkalayıcı	Kore	Jeiotech
Buz makinesi	Japonya	Hoshizaki
Hassas terazi	Almanya	Denver instrument
Vortex	ABD	Genie II

Kullanılan materyal ve kimyasalların bir çoğu tablo 3.2 de yer alıp bütün materyal ve kimyasallar gereken sterilizasyon sağlanarak kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Deneysel esnasında kullanılan materyal ve kimyasallar

<b>MATERYAL VE KİMYASAL İSİMLER</b>	<b>MENŞEİ</b>	<b>ŞİRKET</b>
MTX	İstanbul	Koçak Farma
Morin hidrat	Amerika	Sigma Aldrich
HCl (hidroklorik asit)	Almanya	Sigma Aldrich
TBA (tiyobarbitürik asit)	Almanya	Merck KGaA
TCA (trikloro asetik asit)	Amerika	Bioscience
Dinitrobenzoic asit	Amerika	Sigma Aldrich
NaOH (sodyum hidroksit)	Almanya	Sigma Aldrich
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (amonyum sülfat)	Amerika	Sigma Aldrich
CHPO (cumene hidroperoxide)	Almanya	Merck Schuchardt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (hidrojen peroksit)	Amerika	Sigma Aldrich
Primerler (Bax, CYT-C, Cas-3, Cas-8, Cas-9, β-aktin, Bcl-2)	Amerika	Santa Cruz
Antikorlar (Bax, CYT-C, Cas-3, Cas-8, Cas-9, β-aktin, Bcl-2)	İngiltere	Abcam
Tris base	Amerika	Sigma Aldrich
Xanthine	Amerika	Sigma Aldrich
15 ml santrifüj tüpleri	Almanya	LabSolute
50 ml santrifüj tüpleri	Almanya	LabSolute
1,5 ml ependorf tüpleri	Almanya	IsoLab
0,5 ml ependorf tüpleri	Almanya	IsoLab

### 3.2. Deneysel Hayvanları

Çalışmada Bingöl Üniversitesi Deneysel Araştırmalar ve Uygulamalar Merkezin de yetiştirilmiş olan 35 adet 250-300 gr Wistar Albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Çalışmadan 7 gün önceden ratlar alınıp her grubun arasında istatistiksel fark olmayacak şekilde 5 gruba ayrılıp kafeslere konularak 24-25 °C ortam koşulunda 12 saat aydınlık 12 saat karanlık bir döngü sağlanıp, beslenme biçimleri ise su ve standart yemleri ile yapıldı.

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurul tarafında 23.09.2020 tarihli toplantı sayısı 2020/03 ve karar sayısı 03/07 olan izinle belgelendirilmiştir.

### **3.3. Yöntem**

#### **3.3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar**

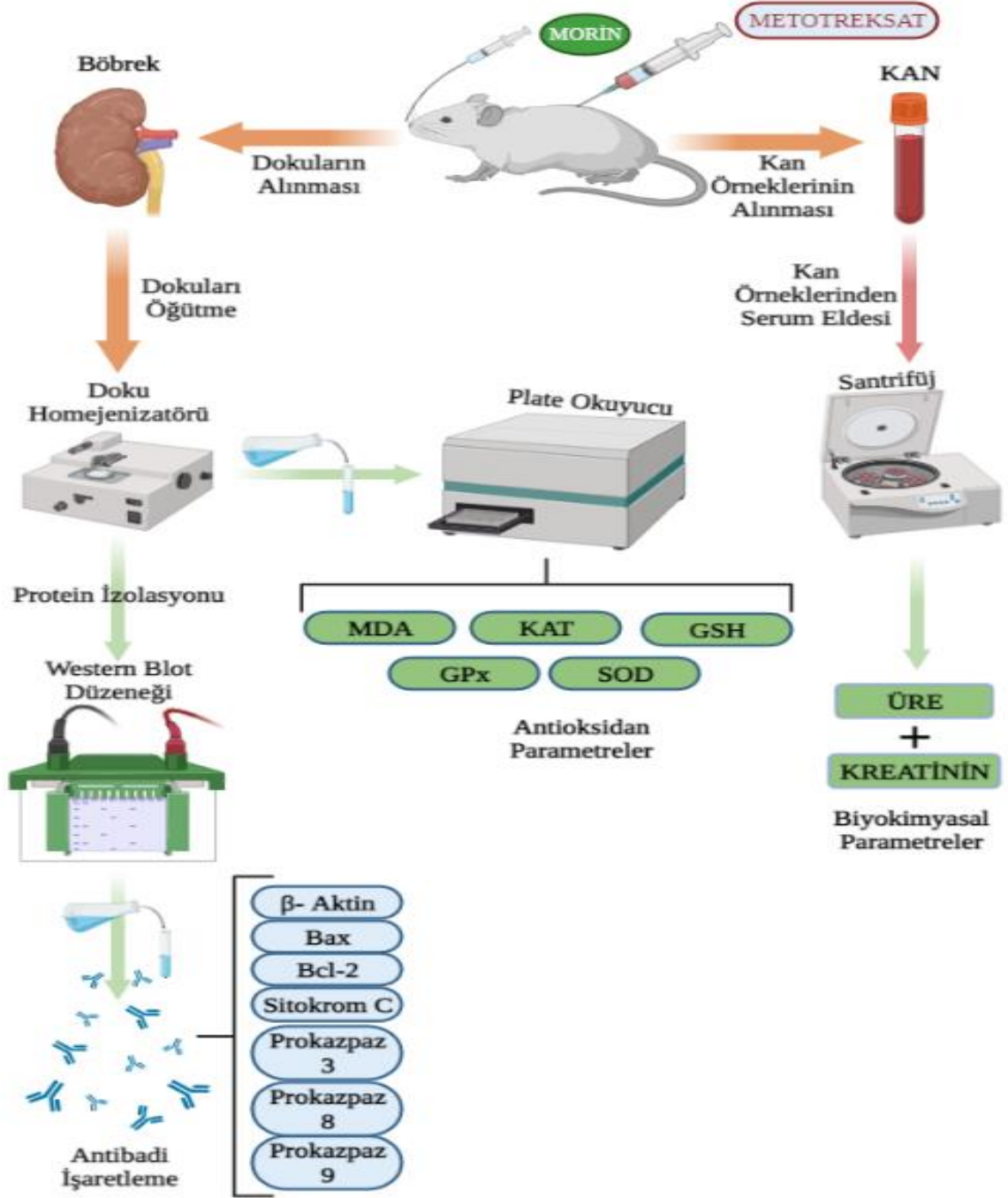
Metotreksat (50 mg/5 ml Koçak Farma / İstanbul), 20 mg/ml intraperitoneal olarak uygulandı.

Morin hidrat: %85 saflıkta (CAS Numarası: 654055-01-3, Sigma Aldrich, ABD), 50 ve 100 mg/kg dozlarında saf su ile çözdürülerek oral yolla uygulandı.

#### **3.3.2. Deney uygulamaları**

Deneyde kullanılan ratlar her gruba 7 adet gelecek şekilde 5 gruba ayrılmıştır.

- i. Kontrol grubu: Bu grupta bulunan ratlara 10 gün boyunca oral yoldan serum fizyolojik uygulandı ve deneyin 5. gününde intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.
- ii. Morin 100 grubu: Ratlara 10 gün boyunca oral yoldan 100 mg/kg morin hidrat verildi ve deneyin 5. gününde intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.
- iii. MTX grubu: Ratlara 10 gün boyunca oral yoldan serum fizyolojik uygulandı ve deneyin 5. gününde intraperitoneal yoldan tek doz 20 mg/kg MTX enjeksiyonu yapıldı.
- iv. MTX + Morin 50 grubu: Ratlara 10 gün boyunca oral yoldan 50 mg/kg morin hidrat verildi ve deneyin 5. gününde intraperitoneal yoldan tek doz 20 mg/kg MTX enjeksiyonu yapıldı.
- v. MTX + Morin 100 grubu: Ratlara 10 gün boyunca oral yoldan 100 mg/kg morin hidrat verildi ve deneyin 5. gününde intraperitoneal yoldan tek doz 20 mg/kg MTX enjeksiyonu yapıldı.



Şekil 3.1. Deneysel tasarım

### 3.3.3. Numunelerin Alınması

Son MTX ve morin uygulamasından 24 saat sonra sıçanlara hafif sevofluran (Sevorane %100 liquid, Abbott Laboratories, İstanbul, Türkiye) anestezi uygulanarak ötenazi yapıldı. Çalışma için gerekli olan böbrek dokuları alınıp biyokimyasal analizleri



yapılıncaya kadar buzdolabında -20 °C saklandı. Laboratuvar analizlerinden önce dokular çıkartılıp sıvı azot yardımı ile TissueLyser II cihazı kullanılarak 5 mikron boyutuna kadar öğütülüp analizler için gereken miktarlar tartıldı ve uygun tamponlar ile sulandırılarak tekrardan TissueLyser II cihazı kullanılıp homojenizasyon işlemi yapıldı.

### **3.3.4. Biyokimyasal Parametrelerin İncelenmesi**

Protein analizleri için böbrek dokuları TissueLyser II cihazı kullanılarak toz haline getirildi. Daha sonra MDA, GSH, GPx analizleri için %1,15 KCI eklenerek sulandırılıp homojenizasyon sağlandı. Sulandırılan örnekler MDA için 3500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenirken, GSH ve GPx için 11000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Analizler için süpernatant kısım ayrıldı. SOD tayini için böbrek dokuları Tris-HCl (pH:7,4) tamponu ile sulandırılıp 7000 rpm'de 60 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısım alındı. KAT tayini için dokular Triton-X100 ile sulandırılıp homojenize edilir. Homojenize edilen dokular 3500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenip süpernatant kısım ayrılır böylece analiz yapılması için uygun hale getirildi.

### **3.3.5. Biyokimyasal Analizlerin Aşamaları ve Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması (Serum üre ve kreatinin, MDA, GPx, GSH, SOD, KAT)**

#### **3.3.5.1. Serum Üre ve Kreatinin Tayini**

Ratlardan alınan kanlar sarı kapaklı serum tüplerine aktarıldı ve 4000 rpm'de +4 °C 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Mindray Perfect Plus 400 cihazı vasıtasıyla serum üre ve kreatinin seviyeleri analiz edildi.

#### **3.3.5.2. MDA Tayini**

Homojenize edilen örneklerin MDA tayini için Placer ve arkadaşlarının uygulamış olduğu metottan yararlanılmıştır (Placer et al. 1966). Metod da MDA, lipid peroksidasyonunun bir aldehit ürünü olarak geçmekte olup, yöntemde kullanılan TBA'nın analiz esnasında pembe renkli bir yapı oluştuğu gözlemlenir. Analiz için

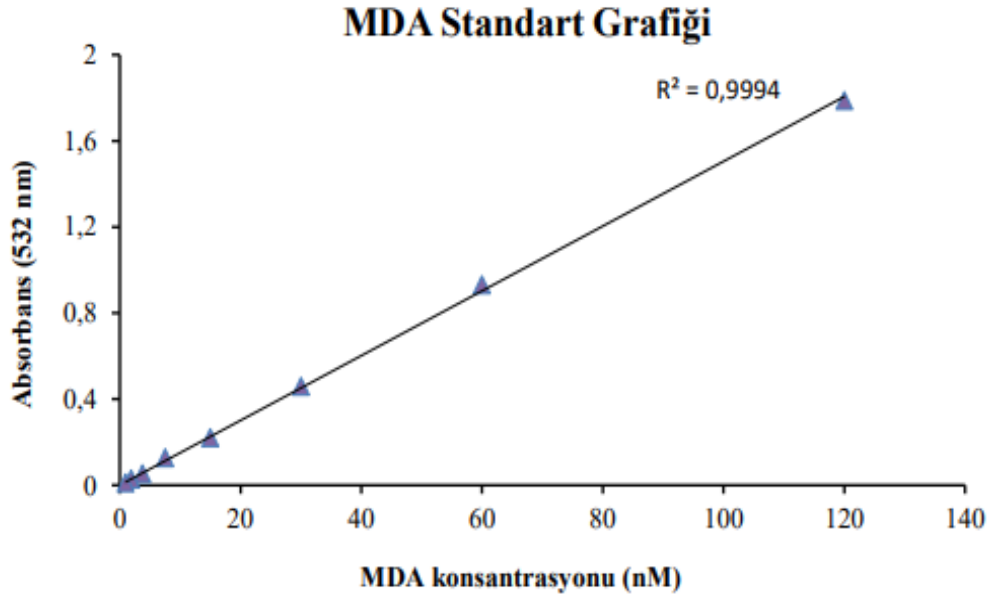
kullanılan maddelerden sonra ölçümler ELİSA cihazında 532 nm dalga boyunda ölçüm alınıp hesaplamalar için standart grafik kullanıldı.

MDA Analizinde kullanılan ayraçlar;

1. TBA çözeltisi: tiyobarbütirik asitten 0.67 gr tartıldı. Daha sonra %10'luk perklorik asitten 80 ml eklenip çözünmesi sağlandı ve üzeri 100 ml' ye tamamlayacak şekilde saf su eklendi.
2. TCA çözeltisi: %10'luk TCA çözeltisi için 10 gr trikloroasetik asit tartılıp 100 ml saf suda çözdürüldü. Bu çözelti hazırlandıktan sonra kahverengi ışık almayan cam şişelere katıldı ve +4 °C saklandı.
3. Renk ayracı: hazırlanan TBA ve TCA çözeltilerinden elde edilen bir ayraçtır. Hazırlanması için 3 birim TCA dan 1 birim de TBA dan alındı. Renk ayracı deney yapılmadan hemen önce taze hazırlandı.

MDA Analiz metodu;

1. 5 grup için ayrı tüplere doku homojenatından 125 µL katıldı. 1 tüpte kör olacak şekilde ayarlandı. (Kör'e homojenat yüklenmedi.)
2. 1120 µL renk ayracından katıldı.
3. Kör'e 125 µL distile su ve 1120 µL renk ayracı katıldı.
4. 100 °C su banyosunda 20 dakika hazırlanan solüsyon kaynatıldı.
5. Kaynamadan sonra soğutup 3500 rpm'de 7 dakika santrifüj yapıldı.
6. 532 nm'de ELİSA okutucuda ölçülüp hesaplaması 1,1,3,3-tetraethoxypropane kullanıldıktan hazırlanan aşağıda ki standart grafik ile yapıldı.



Şekil 3.2. MDA analizi için kullanılan standart grafik

### 3.3.5.3. GPx Tayini

Hazırlanmış olan homojenatların GPx tayinleri Matkovics ve arkadaşlarının yapmış olduğu yöntemle yapıldı (Matkovics, 1988).

GPx Analizinde kullanılan ayraçlar;

1. Tampon I: tris (hidroksimetil) aminometandan 6,057 gr ve Na<sub>2</sub> EDTA'dan 0.372 gr tartılıp 1 L de çözdürüldü (pH:7,6).
2. Tampon II: 48,46 gr Tris tartıldı hacmi 1 L saf suya ayarlandı (pH: 8,9) .
3. Red GSH çözeltisi: 6 mg red glutasyon tartıldı tampon I ile 10 ml tamamlandı. (deney esnasında taze hazırlandı)
4. CHPO (cumene hidroperoxide) çözeltisi: 5 µL CHPO alındı ve tampon I ile 10 ml tamamlandı.
5. DTNB çözeltisi: 0.099 gr DTNB tartıldı ve hacmi 25 ml metanol ile tamamlandı.
6. TCA çözeltisi: %10'luk hazırlandı.

GPx Analiz metodu;

1. Homojenatlardan 125 µL katıldı ve üzerlerine 75 µL tampon I'den eklendi.
2. Sadece örnek içeren tüplere 25 µL cumen katıldı sonra kör dahil hepsine 25 µL red GSH çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
3. Tüplere 250 µL TCA katılıp tekrar 5 dakika bekletildi ve 3500 rpm de 10 dakika santrifüj yapıldı.
4. Süpernatanttan 250 µL alındı ve 500 µL tampon II, 25 µL DTNB katıldı.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletip 412 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Hesaplamaları “[Absorbans (kontrol) - Absorbans (örnek)] \* 0,76989 / g protein” formülüne göre yapıldı.

#### 3.3.5.4. GSH Tayini

Homojenize edilen örneklerin GSH tayini Sedlak ve Lindsay yapmış olduğu metoda göre yapılmıştır (Sedlak and Lindsay, 1968). Bildirilen bu metod da göre 5.5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik) asitin (DTNB), sülfidril grupları ile indirgendiği ve bu indirgenme sonucunda çözeltide sarı renk meydana gelmektedir. Oluşan sarı renk 412 nm de ölçümü alındı.

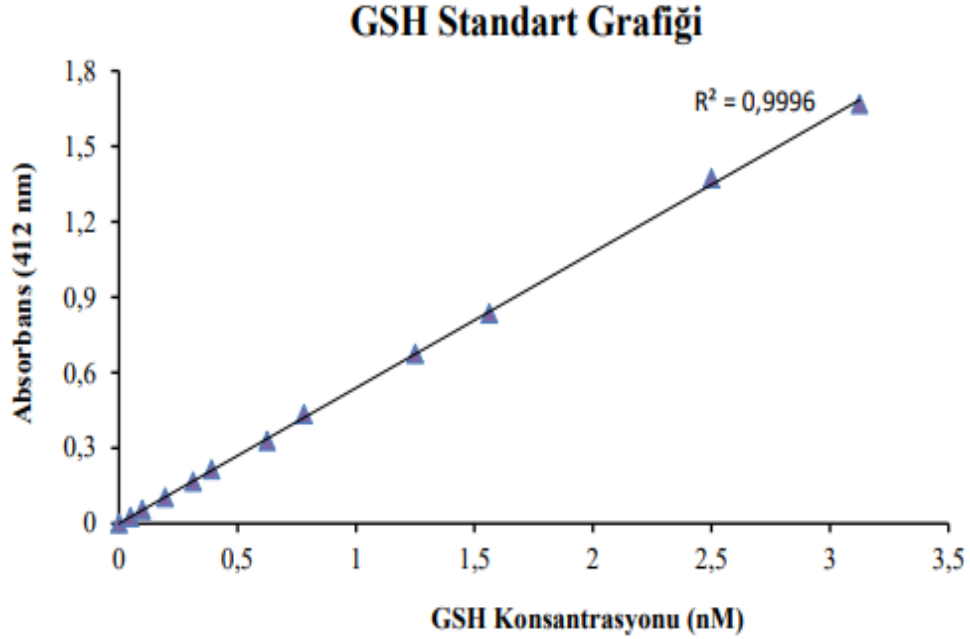
GSH Analizinde kullanılan ayraçlar;

1. Tris (hidroksimetil) aminometan: 4,8 gr hidroksimetil aminometan tartıldı 50 ml saf suda çözdürüldü pH HCl ile 8,9'a ayarlandı. Daha sonra üzeri 100 ml saf suya tamamlandı.
2. DTNB çözeltisi: 0,099 gr DTNB tartılır ve 25 ml methanol de çözdürüldü. Bu çözelti kullanılmadan hemen önce hazırlandı ve her zaman taze kullanıldı.
3. %10'luk TCA çözeltisi hazırlandı.

GSH Analiz metodu ;

1. 500 µL hazırlanan homojenattan alındı. 2 ml TCA üzerlerine eklendi ve vortekslendi.
2. 2500 rpm de 5 dakika santrifüj yapıldı ve elde edilen süpernatanttan 125 µL alındı.

3. 500  $\mu$ L tris tamponundan eklendi.
4. 25  $\mu$ L DNTB eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
5. 412 nm de ELİSA okutucuda ölçüm alındı ve sonuçlar standart grafiğe göre hesaplandı.



Şekil 3.3. GSH analizi için kullanılan standart grafik

### 3.3.5.5. SOD Tayini

Hazırlanmış olan homojenatlardan SOD tayini Sun ve arkadaşlarının sunmuş oldukları yöntemle yapıldı (Sun et al., 1988). SOD ölçümünün olduğu bu deneyde ksantin-ksantin oksidazın, serbest radikallerin NBT ile indirgenmesi ile oluşur ve bunun sonucunda oluşan renkli çözeltinin ölçümü 560 nm dalga boyunda alındı. Çözeltide oluşan renk mavi olup bu oluşan formazon, ölçülen absorbans değerinde maksimum ölçüm verir. SOD'un olduğu ortamda enzim, süperoksiti hidrojen perokside dönüştürüp NBT nin indirgenmesini azaltır. Enzim konsantrasyonu ile oluşan renk birbirleri ile ters orantılı olup oluşan formazonun verdiği absorbans ile hesaplama yapılmaktadır.

SOD Analizinde kullanılan ayraçlar ;

1. SOD ölçüm karışımı:

- 0,3 mM xantihine için 0,0037 gr xantihine 80 mL saf su ile çözdürüldü.
- 0,6 mM EDTA için 0,0070 gr EDTA tartılıp 40 mL saf suda çözdürüldü.
- 150 mM Nitroblue tetrazolyum (NBT) için 0,0049 gr NBT tartıldı ve 40 ml saf suda çözdürüldü.
- 0,4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> için 1,0176 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tartıldı ve 24 mL saf suda çözdürüldü.
- BSA çözeltisi için 0,012 gr BSA tartıldı ve 12 ml su ile tamamlandı.

2. Xantihine oksidaz (XO) çözeltisi için:

- 0,502 gr (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> tartıldı ve 1,9 ml saf suda çözdürüldü. Hazır bekleyen bu karışımı kullanmadan önce 0,101 µL XO çözeltisi eklendi.

3. Tampon I:

- 0,2 mM Tris – HCl için 0,0037 gr Tris tartıldı ve 100 mL çözdürüldükten sonra pH:7,4'e ayarlandı. Son hacmi 150 mL tamamlandı.

4. CuCl<sub>2</sub> çözeltisi için:

- 0,0080 gr CuCl<sub>2</sub> tartıldı ve 60 ml saf suda çözdürüldü.

SOD Analiz metodu;

1. Ölçüm karışımında 980 µL katıldı ve örnek katılacaklara 200 µL örnek kör tüpe ise 200 µL tampon I katıldı.
2. Tüplere 20 µL XO katıldı.
3. 20 dakika 25 °C inkübe edip tüplere 400 µL CuCl<sub>2</sub> katıldı. 560 nm de okuma yapıldı.

SOD aktivitesinin hesaplaması U/g proteinler şeklinde dokuda spesifik olarak aktiviteleri "EU/g protein =  $\Delta Akör - \Delta Anumune / \Delta Akör$ " formülü ile hesaplandı.

### 3.3.5.6. KAT Tayini

Böbrek dokusundaki KAT aktivitesi için Aebi'nin yapmış olduğu yöntem kullanılmıştır (Aebi, 1983). KAT aktivitesinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yıkma hızı ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in ışığı 240 nm dalga boyunda absorbe etmesi ile spektrofotometre de ölçüm yapılmaktadır.

KAT Analizinde kullanılan ayraçlar;

1. 50 mM'lık pH: 7,0 olan fosfat tamponu hazırlandı.
2. 30 mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için 0,34 µL %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 ml fosfat tamponu ile karıştırıldı.

KAT Analiz metodu;

1. Köre 20 ml örneklerden ve 10 ml fosfat tamponundan eklendi.
2. Diğer tüplere 20 ml örneklerden yüklendi ve ölçüm alınmadan hemen önce 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenip ölçüm alındı. 1. ölçümden 30 saniye sonra 2. ölçüm alındı ve iki ölçüm arasındaki farkla KAT aktivitesi hesaplandı. KAT aktivitesinin hesaplaması aşağıdaki formüle göre yapıldı. Veriler k/g proteinler şeklinde dokuda spesifik olarak aktiviteleri " $k = (2.3/30) \times (\log A1/A2) \times \text{Dilüsyon faktörü}$ " olarak hesaplandı.

### 3.3.6. Western Blot Analizi İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Bu Yöntem Kullanılarak Hedef Proteinlerin Analizi

Western blot analizi için kullanılan çözeltilerin hazırlanışı aşağıda yer alan basamaklarda olduğu gibi gerçekleştirildi. İlk iki basamakta deneyde pH ayarlamak için kullanılan 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl hazırlanışı bulunmaktadır.

- 100 ml NaOH çözeltisi için; 4 gr NaOH tartıldı bir miktar suda manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürülüp 100 ml saf su ile üzeri tamamlandı.
- 100 ml HCl çözeltisi için; %36'lık HCl asitten 8,5 ml alınıp üzeri 100 ml saf su ile tamamlandı.
- 1 L PBS çözeltisi için; 8 gr NaCl + 0,2 gr KCl + 1,44 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> kimyasalları hassas terazi de tartılıp 1 L saf suda çözdürülerek, pH 7,4'e ayarlandı.
- 10X'lik TBS çözeltisi için; 80 gr NaCl + 2 gr KCl + 30 gr tris base kimyasalları tartılıp 1 L saf suda çözdürülerek, pH 7,4'e ayarlandı.
- 10X'lik yürütme tamponu için; 30 gr tris base + 144 gr glisin + 10 gr SDS kimyasalları tartılıp 1 L saf suda çözdürülerek, pH 8,3 ayarlandı.
- 10 ml yükleme tamponu için; 0.5ml/10ml %5'lik gliserol + 0,5 M Tris-CI pH:6,8 olacak + %10'luk SDS alındı ve sonra %0,05 Bromofenol mavisi ve %25 Merkaptotanol katılarak 10 ml saf su ile çözeltinin üzeri tamamlandı.

Hedef proteinlerin analiz işlemi aşağıda yer alan protokole göre takip edildi.

1. TissueLyser II cihazı kullanılarak toz haline getirilmiş olan dokulardan 20 mg hassas terazi de tartılıp PBS çözeltisi ile yıkama işlemi yapıldı. PBS çözeltisi içinde pipetaj yapıp yıkandıktan sonra santrifüjlenip protein izolasyonu işlemi için hazır hale getirildi.
2. Santrifüjden sonra dokular buz içerisinde bekletilerek üzerine fenil metan sülfonil florit (PMSF) ve proteaz inhibitör kokteyli (PIC) eklenip proteaz aktivitelerinin bozulması engellendi.
3. Oluşan homojenat +4 °C 1400 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra oluşan fazdan süpernatant kısım alınıp örnekler ependorf tüplere aktarıldı. Protein miktarlarının ölçülmesi için Bradford yöntemi ile ölçüm alındı.
4. Yapılan ölçüm sonrasında örnekler -80 °C dolapta western blot analizi yapılana kadar saklandı.
5. Daha sonra örnekler dolaptan alınıp yükleme tamponu eklenerek 95 °C sıcaklıkta denatürasyon işlemi yapıldı.
6. Denatürasyon işleminden sonra SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez) yöntemi ile %12'lik jel hazırlanıp örnekler yüklendi. Örnekler yürütme tamponu varlığıyla yürütüldü.
7. Daha sonra Bax, CYT-C, Cas-3, Cas-8, Cas-9, Bcl-2 genleri ve housekeeping gen olarakta  $\beta$ -aktin için yürütme işlemi yapıldıktan sonra polivinilidenflorit (PVDF) membrana aktarması gerçekleştirildi.
8. Membrana aktarılan proteinler %5'lik BSA ile 1 saat boyunca blotlanması yapıldı.
9. Blotlanma işleminden sonra membranda sabitlenmiş olan proteinleri her bir gen için ayrı olacak şekilde primer antikora katıldı ve 6 saat inkübe edildi.
10. Devamında membranlar primer antikorundan çıkarıldı ve 5 defa 5'er dakika olarak %0,1 TBS-T (Tris tampon tuzu-tween 20) varlığında yıkandı.
11. Yıkanan membranlar uygun sekondere alınarak 2 saat boyunca inkübe edildi.
12. Sekonderden alınan membranlar tekrardan 5 defa 5'er dakika olarak %0,1 TBS-T ile yıkandı.
13. Yıkamadan alınan membranlar ECL çözeltisi ile 10 saniye inkübe edildi ve X-Ray görüntüleme cihazı kullanılarak membran da işaretlenerek oluşan protein bantları filmlere aktarıldı.



14. Sonuç olarak alınan bu bantlar image lab yazılım programı ile sentezlenme oranları hesaplandı.
15. Hesaplanan bu oranlar kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi yapıldı ve housekeeping gen olarak kullanılan  $\beta$ -aktin'e göre de normalize edilerek gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. Western blot analizinde kullanılan antikolar

<b>Antikorların Adı</b>	<b>Antikorların Marka / Özellikleri</b>
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-7382; Mouse monoclonal
CYT-C	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-13156; Mouse monoclonal
Cas-8	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-70501; Mouse monoclonal
Cas-9	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-70505; Mouse monoclonal
Cas-3	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-65496; Mouse monoclonal
$\beta$ -aktin	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-47778; Mouse monoclonal
Bax	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-20067; Mouse monoclonal
Sekonder	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:1000, sc-2005; Anti-Mouse HRP

### 3.3.7. İstatiksel Analiz

Elde edilen tüm sonuçlar en az üç kez tekrarlandı. İstatistiksel analizler Graphpad Prism 5.01 programı ile yapıldı ve deneylerde karşılaştırılabilir veri gruplarının istatistiksel farklılıkları ve önem seviyeleri One-way Analysis of Variance (ANOVA) Newman-Keuls Post-Hoc testi ile değerlendirildi ve veriler  $p < 0,05$  seviyesinde anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

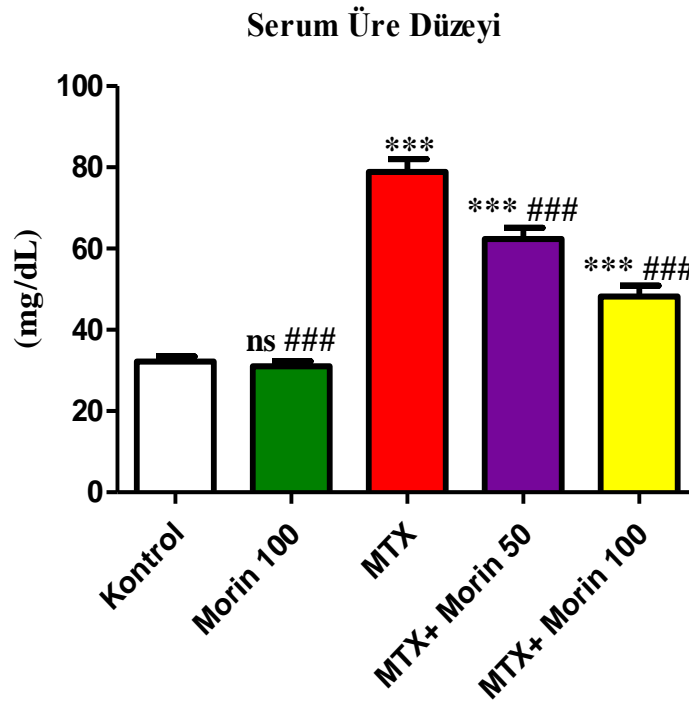
### 4.1. Serum Üre ve Kreatinin Düzeyleri

Yapılan çalışmada, ratlarda MTX ile indüklenen böbrek toksisitesi üzerine morin hidratin etkileri biyokimyasal ve moleküler yönden araştırılmıştır. Deneysel sonuçlarda morin ile tedavinin oksidatif stresi ve apoptozu azaltarak MTX'in neden olduğu böbrek hasarını azalttığı tespit edilmiştir.

Böbrekler, organizmalarda birçok işlevi olan önemli organlardır. Genel anlamda böbreklerin işlevi asit-baz dengesini, kan basıncını, hücre dışı sıvı hacmini ve elektrolit dengesini düzenlemektedir (Kandemir et al., 2017). Ayrıca böbrekler çeşitli ilaçlar ve toksinleri, gıda katkı maddeleri ve bazı metabolik atıkların idrar yolu ile vücuttan dışarı atılması görevini gerçekleştirir. Vücudumuza giren birçok yabancı maddenin atılması sırasında böbrek hasarı meydana gelebilir. Örneğin; düşük miktarlardaki pestisitler, ağır metaller, çeşitli toksik ajanlar ve steroid olmayan ağrı kesiciler ve kemoterapötik ilaçlar farklı yollar ile vücuda alınarak böbrek hasarına neden olabilmektedir (Singh et al., 2014). Böbrek hasarının belirlenmesinde önemli biyomarkırlar olarak üre ve kreatinin seviyelerine bakılmaktadır. Serum kreatinin ve üre seviyelerindeki artış böbrek hasarında önemli testler olarak kabul edilir ve sıklıkla böbrek fonksiyon testlerinde kullanılmaktadır (Yousef et al., 2010). Vücutta proteinlerin yıkılması ile ortaya çıkan amonyak, öncelikle karaciğerde üreye dönüştürülmektedir. Daha sonra kana geçen üre, idrar yoluyla dışarı atılmaktadır. Üre değerleri; glomerulonefrit ve diyabetik nefropati gibi böbrek rahatsızlıklarında, aminoglikozidler ve kortikosteroidler gibi çeşitli ilaçlar da, dehidrasyon, gastrointestinal kanamalar gibi farklı durumlarda yükselmektedir. Kreatinin, kaslar için enerji deposu olarak görev yapan kreatinin fosfatın yıkımıyla meydana gelen bir üründür. Kreatinin, organik anyon taşıyıcı 2 (OAT 2), organik katyon taşıyıcı 2 ve 3 (OKT 2 ve 3), toksin ekstrüzyon proteini 1 ve 2 (TEP 1 ve 2) gibi ilaç taşıyıcıları yolu ile glomerüler filtrasyon ve renal tübüler sekresyon yoluyla idrarla atılır (Nakada et al., 2019).

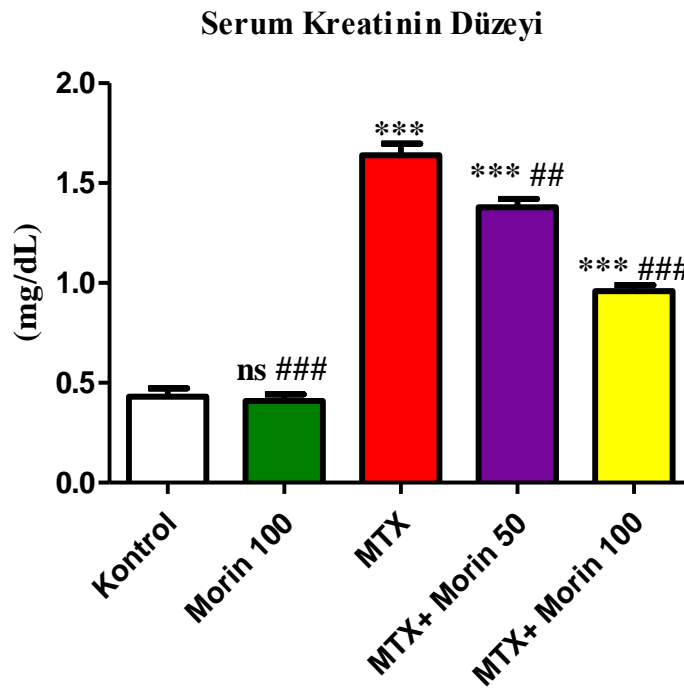
Metotreksat, antineoplastik bir ilaç olup romatiroit artrit ve deri hastalıkları gibi birçok rahatsızlıkta antimetabolit bir ajan olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu antineoplastik ilaç RNA, protein, timidilat ve DNA sentezini inhibe etmektedir. MTX, hücrenin antioksidan metabolizmasını azaltır ve ROS'a olan duyarlılığı artırmaktadır (Nedelcu et al., 2019; Yu and Zhou, 2020; Frohman et al., 2020). MTX kullanımı ile birçok yan etki oluşmaktadır (Bangert and Costner, 2007; Nedelcu et al., 2019). Bunların başında böbrek hasarı gelmektedir. Böbrek hasarı, MTX atılımı glomerüler filtrasyon ve tübüler kısımda gerçekleşir ve bu esnada renal kan akışının yavaşlaması gibi problemlere neden olmaktadır.

Birçok çalışmada ratlar da MTX ile nefrotoksisite indüklenmiş ve serumda üre ve kreatinin seviyelerinde önemli derecede artış olduğu saptanmıştır (Armagan et al., 2015; Asci et al., 2017; Kandemir et al., 2017).



Şekil 4.1. Böbrek dokusunda MTX ve morinin serum üre düzeyi üzerindeki etkileri. MTX, MTX+Morin 50 ve MTX+Morin 100 grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $p<0,001$ ). MTX+Morin 50 ve MTX+Morin 100 grupları MTX grubu ile kıyaslandığında ise üre düzeyinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ( $p<0,001$ ). Veriler ortalama  $\pm$  SEM ile hesaplanmıştır (Kontrol vs diğer gruplar \*\*\* $p<0,001$ ; MTX vs diğer gruplar ### $p<0,001$ )

Arab ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada MTX kullanılarak oluşan nefrotoksisiteye karşı deve sütü kullanılarak böbrek hasarı üzerindeki iyileştirici etkilerine bakmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre MTX serum üre ve kreatinin düzeylerinde artışa neden olmuştur. (Arab et al., 2018). Yapılan benzer bir çalışmada ratlarda MTX kullanılarak böbrek toksisitesi indüklenmiş ve elde ettikleri sonuçlara göre MTX'in serum üre ve kreatinin düzeylerinde artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir (Jalili et al., 2020).



Şekil 4.2. Böbrek dokusunda MTX ve morinin serum kreatinin düzeyi üzerindeki etkileri MTX, MTX+Morin 50 ve MTX+Morin 100 grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $p < 0,001$ ). MTX+Morin100 grubunun MTX grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ( $p < 0,001$ ). Veriler ortalama  $\pm$  SEM ile hesaplanmıştır (Kontrol vs diğer gruplar \*\*\* $p < 0,001$ ; MTX vs diğer gruplar ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$ )

Moodi ve arkadaşlarının yapmış oldukları araştırmada karaciğer ve böbrek hasarını incelemişlerdir. Araştırma da böbrek fonksiyonu testlerindeki sonuçlarda üre ve kreatinin düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde artış tespit etmişlerdir (Moodi et al., 2020).

Yapılan birçok çalışmada morin hidrat'ın, kemoterapötiklerden kaynaklanan böbrek hasarlarında koruyucu etkiler sergileyerek böbrek fonksiyon testlerinin en önemli parametrelerinden olan serum üre ve kreatinin düzeylerini toksik gruba göre önemli

düzyeyde iyileştirdiği belirtilmektedir (Kuzu et al., 2019; Kandemir et al., 2020; Gao et al., 2021; omaklı et al.,2022).

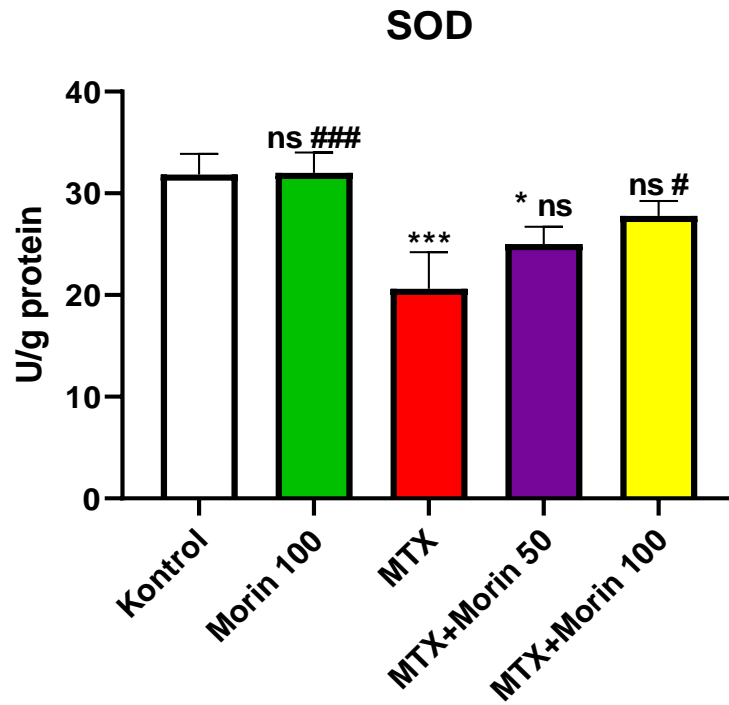
Bu tez çalışmasında serum üre ve kreatinin düzeylerine (şekil 4.1 ve şekil 4.2) bakıldı. Kontrol ve morin 100 grubu arasında istatistiksel olarak bir fark tespit edilmedi. MTX uygulanan grupta serum üre ve kreatinin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu (p<0.001) belirlendi. MTX kaynaklı oluşan hasarı en aza indirmek amacıyla uygulanan MTX+Morin 50 ve MTX+Morin 100 tedavi gruplarında ise serum üre ve kreatinin düzeylerinde azalma tespit edildi. Serum üre ve kreatinin düzeylerinde gerçekleşen azalma MTX+Morin 100 grubunda uygulanan dozun MTX+Morin 50 grubuna kıyasla daha etkili olduğu istatistiksel olarak gözlemlendi. MTX uygulanan ratlarda serum üre ve kreatinin düzeylerinde meydana gelen artış daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile uyum göstermektedir (Arab et al., 2018; Jalili et al., 2020; Moodi et al., 2020).

#### **4.2. MTX kaynaklı Oksidatif Stres ve Lipit Peroksidasyonu Üzerine Morin Hidratın Etkileri**

Bazı alışmalarda MTX'in testis, plasenta, beyin, karaciğer ve böbrek gibi dokular da serbest radikal oluşumunu arttırmış ve buna paralel olarak MDA seviyesinde de artış meydana gelmiştir, böylelikle toksikasyonlara sebep olduğu belirtilmiştir (Welbat et al., 2020; Pınar et al., 2018; Hafez et al., 2012; Ekinci-Akdemir et al., 2018; Elmansy et al., 2021). Biyolojik sistemlerde bulunan serbest radikallerin birçoğu ROS olarak bilinmektedir. Serbest radikaller, hidroksil radikalleri, süperoksit anyon radikalleri, lipit radikalleri ve NO gibi moleküllerdir (Zulaikhah, 2017). Vücutta serbest radikallerin artışı oksidatif hasara sebep olabilmektedir. Oksidatif hasar sonucunda DNA, karbonhidratlar, proteinler ve lipitler gibi makro moleküllerin yapılarını bozar (Kandemir et al., 2017). Ayrıca MTX hücre içerisinde bulunan bazı antioksidanların (SOD, KAT, GSH, GPx) işlevini olumsuz şekilde etkilemektedir. Böylelikle hücre içerisinde oksidatif stresin artmasını hızlandırarak çeşitli hücrenel hasara yol açmaktadır (Ekinci-Akdemir et al., 2018; Elmansy et al., 2021).

SOD, KAT, GSH ve GPx hücrede antioksidan savunmada görev alan önemli parametrelerdir. Önemli enzimatik antioksidanlardan biri olan SOD hücre içerisinde

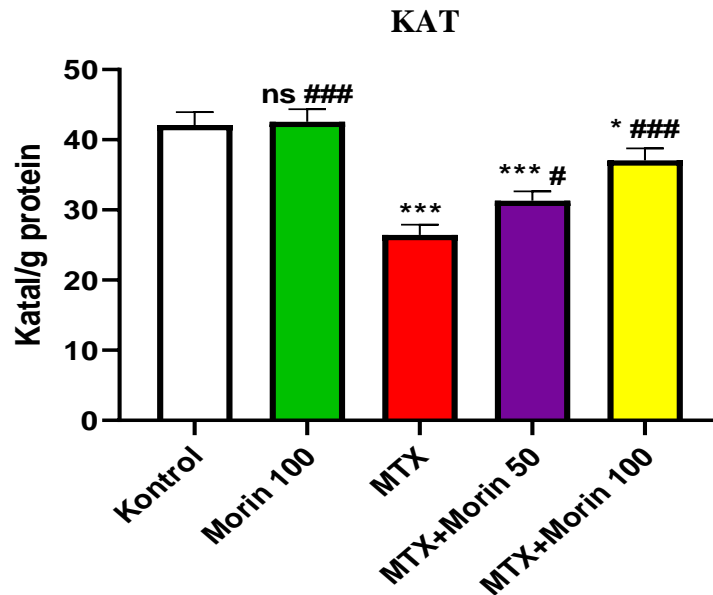
serbest radikal olarak bulunan  $O_2^-$ 'nu suya dönüştürerek vücut için zararsız hale getirmektedir. KAT ise hücreler için potansiyel tehlike arz eden  $H_2O_2$ 'yi  $H_2O$ 'ya dönüştürmektedir (Wafa et al., 2011). Bu yüzden SOD ve KAT antioksidanları birlikte çalışarak oksidatif hasarı önleyebilmek için ilk savunma mekanizmasını oluşturmaktadır ve hücreyi zararlı aktif oksijenlere karşı korumaktadır (Boujbiha et al., 2009; Kalender et al., 2013; Çağlayan, 2018). GPx hücre de sitoplazma içerisinde bulunan bir enzimatik antioksidandır. Bu antioksidan substrat olarak GSH'ı kullanmaktadır. GPx'in asıl işlevi çözünebilen alkil peroksidazlar ve  $H_2O_2$  azaltmaktır. GPx oksitlenen GSH varlığında  $H_2O_2$  suya dönüştürebilmektedir (Bebe and Panemangalore, 2003; Demir et al., 2011; Kalender et al., 2013). GSH, serbest radikallerin ve elektrofilik moleküllerin ürünlerini bir araya getiren bir antioksidandır. Ayrıca, organizmada hücreyi ağır metaller ve serbest radikallerin oluşturduğu toksik etkilere karşı koruma sağlamaktadır (Joshi et al., 2014).



Şekil 4.3. MTX ve morinin böbrek dokusu SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri. MTX grubunun kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ( $p < 0,001$ ). MTX+Morin50 grubunun kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ), MTX grubu ile kıyaslandığında ise önemli bir fark görülmemiştir. MTX+Morin100 ile MTX grubuna bakıldığında SOD aktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Veriler ortalama  $\pm$  SEM ile hesaplanmıştır. (kontrol vs diğer gruplar \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$ ; MTX vs diğer gruplar ### $p < 0,001$ ; # $p < 0,05$ )

Samdanci ve arkadaşlarının (2019) yapmış olduğu çalışmada MTX'in karaciğer dokusunda ki hasarını indirgeyebilmek için molsidomin antioksidanı kullanılarak koruyucu etkileri araştırılmıştır. Elde ettikleri bulgulara göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan bazılarının (SOD, KAT ve GPx-GSH) seviyelerinde MTX gruplarında azalma gözlemlenir iken molsidomin tedavi uygulanan gruplar da antioksidan parametrelerin aktivitelerini koruduğunu hatta MTX grubuna kıyasla önemli derecede artış olduğu belirtilmiştir (Samdanci et al., 2019).

Kandemir ve arkadaşları (2017) gerçekleştirdikleri çalışmada MTX kaynaklı oluşan böbrek hasarına karşı eksojen kaynaklı antioksidanlardan silimarin ve naringin maddelerinin doku üzerindeki iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda MTX grubunda kontrol ile karşılaştırıldığında ciddi azalma meydana geldiği belirtilmiş olup MTX ile birlikte tedavi amacı ile kullanılan silimarin ve naringin gruplarında ise enzimatik ve nonenzimatik parametrelerde MTX grubuna göre artış oluşturduğu belirtilmiştir (Kandemir et al., 2017).



Şekil 4.4. MTX ve morinin böbrek dokusu KAT enzim aktivitesi üzerine etkileri. MTX ve MTX+Morin 50 grubu kontrol grubu karşılaştırıldığında MTX ve MTX+Morin 50 grubunda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ( $p<0.001$ ). MTX+Morin 50 grubu MTX grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark gözlemlenmiştir ( $p<0,05$ ). MTX+Morin 100 grubu kontrol ile kıyaslandığında da anlamlı fark olduğu ve MTX grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $p<0,05$  ve  $p<0.001$ ). Veriler ortalama  $\pm$  SEM ile hesaplanmıştır. (kontrol vs diğer gruplar \*\*\* $p<0,001$ ; \* $p<0,05$ ; MTX vs diğer gruplar ### $p<0,001$ ; # $p<0,05$ )

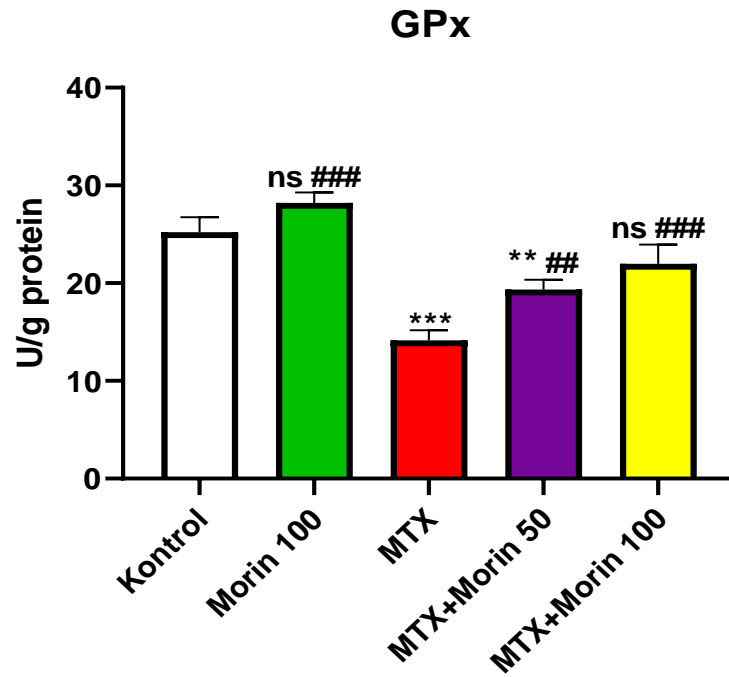
Elsawy ve arkadaşları (2021), yaptıkları çalışmada MTX kaynaklı oluşan nefrotoksisiteye karşı narenciye meyvelerinden elde edilen naringin antioksidanını tedavi amacıyla kullanıp doku hasarını en aza indirmeyi amaçlamışlardır. Araştırma bulgularında enzimatik olmayan GSH yanında SOD, KAT ve GPx aktivitelerinin seviyelerinde MTX uygulanan gruba kıyasla anlamlı bir artış gösterirken, MTX grubunun ise kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde azalma gerçekleştiğini tespit etmişlerdir (Elsawy et al., 2021).

Morin çeşitli organizmalarda farklı kemoterapötik ajanlar kullanılarak deneysel olarak oluşturulmuş böbrek hasarların da oksidatif stresi azaltarak nefroprotektif etkiler sergilemiştir (Kandemir et al., 2020; Gao et al., 2021).

Kandemir ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada sıçanlarda akrilamid kaynaklı nefrotoksisite karşın morin hidratin koruyucu etkilerini araştırılmışlardır. Çalışma bulgularında dokuda antioksidan enzim aktivitelerinde önemli ölçüde akrilamid grubuna göre artırarak hasara uğrayan dokuyu koruduğu belirlenmiştir (Kandemir et al., 2020).

Gao ve arkadaşları (2021) morin bileşimini civcivler üzerinde aflatoksin B1 kaynaklı oluşan böbrek hasarını minimum düzeye indirgeyebilmeyi amaçlamışlardır. Çalışmada aflatoksin B1 maddesi dokularda ciddi etkiler oluşturduğu gözlemlenmiş olup enzim (SOD, KAT, GPx) aktivitelerinin ve GSH düzeylerinde morin gruplarında artış olduğu belirtilmiştir (Gao et al., 2021).

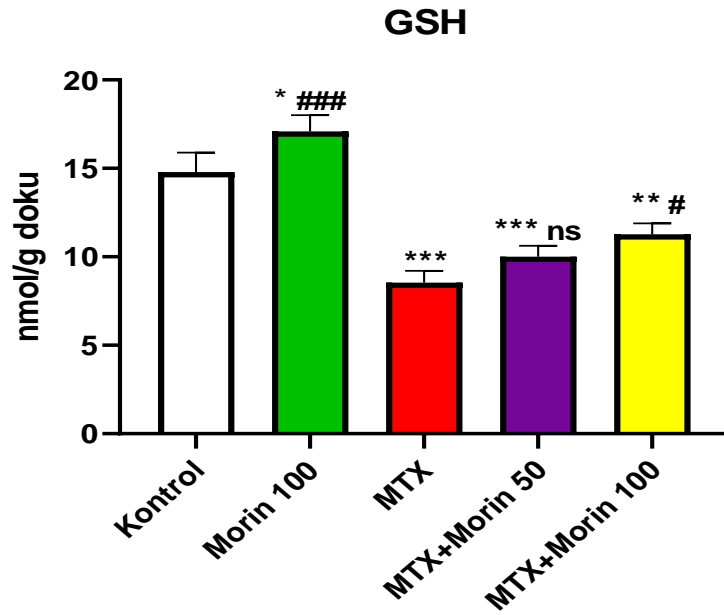




Şekil 4.5. MTX ve morinin böbrek dokusu GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri. MTX ve kontrol grubu karşılaştırıldığında MTX grubunda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ( $p < 0.001$ ). Buna karşın MTX+Morin 50 grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma ( $p < 0,01$ ), MTX grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $p < 0,01$ ). MTX+ Morin 100 grubu MTX grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $p < 0,001$ ). Veriler ortalama  $\pm$  SEM ile hesaplanmıştır (kontrol vs diğer gruplar \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; MTX vs diğer gruplar ### $p < 0,001$ ; ## $p < 0,01$  )

Kuzu ve arkadaşları (2019) sıçanlarda doksorubisin kaynaklı hepatorenal toksisite üzerinde morinin koruyucu etkilerini incelemiştir. Çalışmada birçok parametre bakılmasının yanı sıra böbrek dokusu için belirgin fonksiyonlara (üre ve kreatinin) ve enzimatik parametrelerde bakılmıştır. Enzimatik parametrelerden SOD, GPx, KAT aktivitelerinde doksorubisin oluşturmuş olduğu etkiyi azalttığı ve bu parametrelerde ki seviyelerde artış olduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra nonenzimatik parametrelerden GSH seviyelerinde de artış olduğu gösterilmiştir (Kuzu et al., 2019).

Abdel-daim ve arkadaşları (2017) diosmin kullanarak MTX'in neden olduğu hepatorenal toksisiteyi azaltmayı amaçlamışlardır. Çalışmaların bulgularında diosminin GSH seviyelerinde artış meydana getirdiğini ve MTX kaynaklı oksidatif stresi azalttığını göstermişlerdir. Bunun yanında yine çalışmada SOD, KAT ve GPx enzimlerinin aktivitelerinde de artış gözlemlendiğini bildirmişlerdir (Abdel-daim et al., 2017).



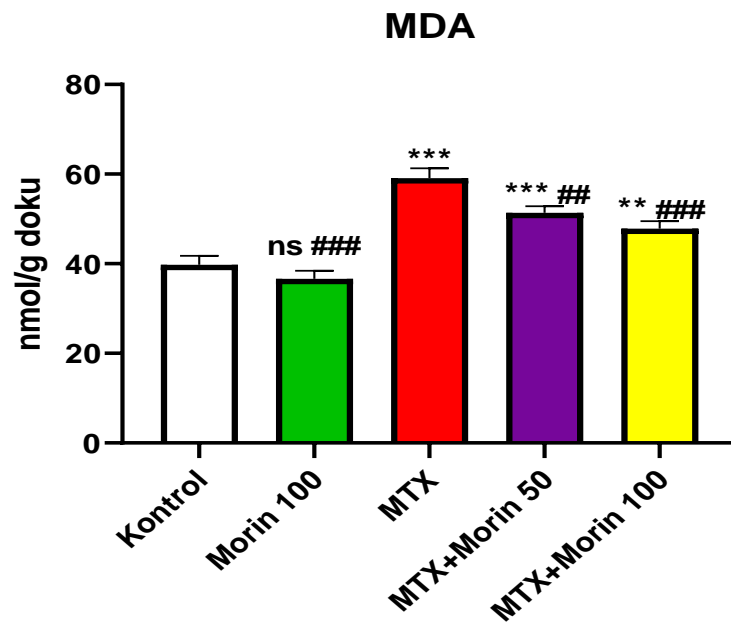
Şekil 4.6. Böbrek dokusunda MTX ve morinin GSH düzeyi üzerindeki etkileri. MTX ve MTX+ Morin 50 grubu kontrol grubu karşılaştırıldığında MTX ve MTX+ Morin 50 grubunda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ( $p < 0.001$ ). MTX+ Morin 50 grubu MTX grubu ile kıyaslandığında ise anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. MTX+ Morin 100 grubu MTX grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak bir artış gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Veriler ortalama  $\pm$  SEM ile hesaplanmıştır (kontrol vs diğer gruplar \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; MTX vs diğer gruplar ### $p < 0,001$ ; # $p < 0,05$  )

Bir dizi araştırma sonucunda MTX'in SOD, KAT ve GPx gibi antioksidanların aktivitelerini önemli bir şekilde inhibe edildiği bildirilmiştir (Safaei et al., 2018; Mehrzadi et al., 2018; Akacha et al., 2020; Roghani et al., 2020; Goudarzi et al., 2021; Elsayy et al., 2021). Bunun yanı sıra tedavi edici olarak kullanılan morin de böbrek karaciğer, beyin ve testis gibi dokularda oksidatif stresin azaltılmasında oldukça etkili olduğu belirtilmiştir (Kuzu et al., 2019; Olayinka et al., 2019; Çelik et al., 2020; Olayinka et al., 2021; Kuzu et al., 2018).

Bu tez çalışmasında ki amaç MTX kaynaklı oluşan böbrek toksisitesini morin hidrat maddesinin belirlenmiş dozlarda her iki madde kombine bir şekilde kullanarak oluşan oksidatif stresi minimum seviyeye çekmektir. Deney sonunda alınan böbrek dokuların da bazı enzim (SOD, KAT, GPx) ve enzim olmayan (GSH) antioksidanların aktiviteleri ölçüldü. Alınan sonuçlara göre SOD, KAT, GPx enzimlerinde ve GSH değerlerinde gruplara göre artışlar ve azalmalar gözlemlenmiştir. MTX grubu kontrol ile karşılaştırıldığında antioksidan parametrelerde önemli düzeyde azalma meydana gelmiş ve ciddi anlamda doku hasarına sebebiyet vermiştir. MTX'in meydana getirdiği hasara

karşı iki farklı morin dozu uygulanmış (50-100 mg/kg dozları) elde edilen sonuçlarda morinin yüksek dozu olan 100 mg/kg dozu daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen veriler literatür ile tam bir uyum sağlamıştır.

Ayrıca antioksidan parametrelerin baskılanması sonucunda oluşan oksidatif stres artışı ile hücrede lipit peroksidasyonunun düzeyinde artış olmaktadır. Lipit peroksidasyonunun (LPO) yaygın olarak kullanılan göstergelerden biri MDA seviyesidir. MDA, doymamış yağ asitlerinin ROS tarafından gerçekleştirilen peroksidasyonu sonucunda oluşan son üründür. MDA seviyesi dolaylı olarak doku ve hücre hasarını da temsil etmektedir (Su et al., 2008).



Şekil 4.7. Böbrek dokusunda MTX ve morinin MDA düzeyi üzerindeki etkisi. MTX ve MTX+ Morin 50 grubu kontrol grubu karşılaştırıldığında MTX ve MTX+ Morin 50 grubu grubunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $p<0.001$ ). MTX+ Morin 100 grubu ile MTX grubu kıyaslandığında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ( $p<0,001$ ). Veriler ortalama  $\pm$  SEM ile hesaplanmıştır. (kontrol vs diğer gruplar \*\*\* $p<0,001$ ; \*\* $p<0,01$ ; MTX vs diğer gruplar ### $p<0,001$ ; ## $p<0,01$ )

Yapılan birçok çalışmada MTX'in serbest radikallerin oluşumunu tetikleyerek hücrede LPO seviyesinde ciddi artışlara sebep olduğu bildirilmiştir (Abdelraheem and Khedr, 2014; Owumi et al., 2019; Abd El-Twab et al., 2019; Sahindokuyucu-Kocasari et al., 2021). Yapılan çalışmada elde edilen verilere göre MTX'in böbrek dokusunda ki MDA düzeyi kontrol grubuyla kıyaslandığında yüksek derecede arttığı, bununla birlikte MTX ile beraber verilen morin-50 ve morin-100 gruplarında ise MDA düzeyleri kontrol

grubunun seviyesine yaklaştırdığı görülmüştür, bilhassa morin-100 uygulanan grupta MDA düzeyini daha fazla azalttığı tespit edilmiştir (şekil 4.7). Yapılan birçok çalışmada kemoterapötik ilaçların böbrek toksisitesini azaltmak amacıyla morin'in LPO oluşumunu azalttığını bunun beraberinde MDA seviyesinde de azalma olduğu belirtilmiştir (Ijaz et al., 2021; Kandemir et al., 2020; Çelik et al., 2020).

### **4.3. MTX ve Morin Hidratın Bazı Apoptozla İlişkili Protein Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi**

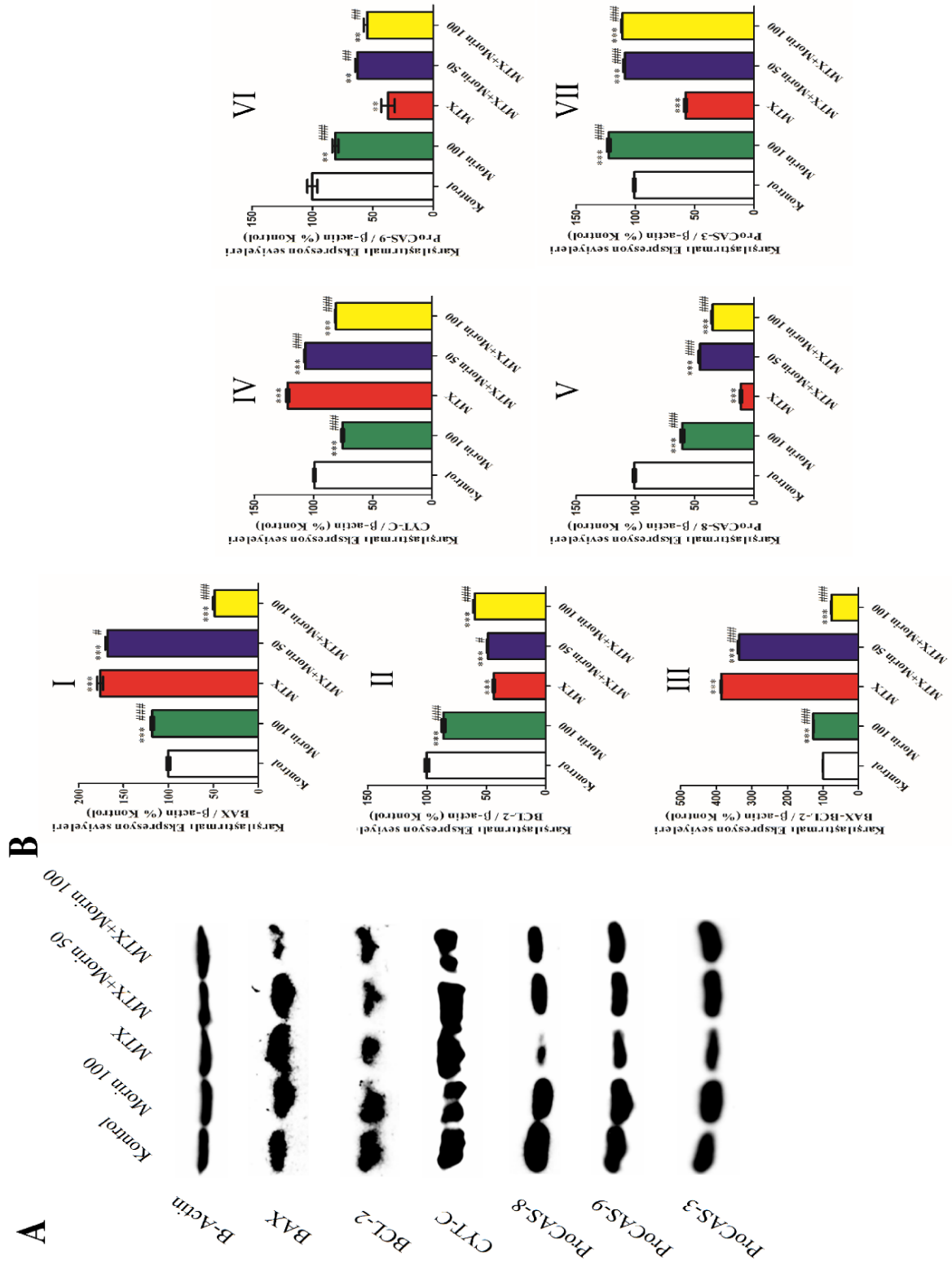
Apoptoz, hücre için doğal bir ölüm mekanizması olup hücrenin homeostazının korunmasında etkili araçlardandır. Bu mekanizma, gerek duyulmayan veya işlevini yitirmiş olan hücreleri ortadan kaldırarak doku bütünlüğünü korumaya yardımcı olmaktadır (Pfeffer et al., 2018). Ancak apoptoz çok az ya da çok fazla gerçekleşmesi ile doku bütünlüğüne zarar veren bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. Apoptozun aktifleşmesinde DNA hasarı başta olmak üzere kontrolsüz çoğalma ve oksidatif stres gibi farklı etkenler bulunabilmektedir (Elmore, 2007; Salva et al., 2018). Apoptoz iç ve dış yolak olmak üzere iki farklı şekilde aktifleşmektedir. Dış yolak, hücre dışında bulunan ölüm reseptörlerinin tetiklenmesi ile aktive edilen Prokaspaz-8 aracılığıyla diğer proteaz enzimlerinden olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 (Cas-3, Cas-6, Cas-7) enzimlerini aktive ederek apoptozu tetiklemektedir (Salva et al., 2018; Ehrhardt et al., 2011). İç yolak ise radyasyon, hipoksi, toksinler, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve oksidatif stres gibi uyarılar ile antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-XL vb.) inhibisyonu ile aynı zamanda bazı proapoptotiklerin (Bax, Bad vb.) tetiklenmesi sonucunda mitokondri membran potansiyelinin değişmesi ile sitoplazmaya proapoptotik CYT-C gibi proteinlerin salınımı gerçekleşir. Sitoplazma içerisine geçen CYT-C proteini apaf-1 ile birleşerek Prokaspaz-9'ları aktifleştirerek apoptozom yapısını kazanırlar. Bu yapı sistein proteazları olan Cas-3'leri aktifleştirerek apoptozu gerçekleştirir (Elmore, 2007; Ehrhardt et al., 2011; Pfeffer et al., 2018; Salva et al., 2018).

Mahmoud ve arkadaşları (2018) erkek sıçanlarda MTX ile oluşturdukları böbrek hasarı sonucunda MTX'in apoptozun iç yolağında önemli görevleri olan Bax ve Bcl-2 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimleri vurgulayarak MTX'in uygulandığı gruplarda Bax ekspresyon seviyesinde artış olduğunu, Bcl-2 ekspresyon seviyesinde ise azalma olduğunu bildirmişlerdir (Mahmoud et al., 2018).

Hassanein ve arkadaşları (2018) MTX ile indüklenmiş böbrek hasarı sonucunda apoptotik belirteçlerden olan Bax, Bcl-2 ve Cas-3'ün gen ekspresyonlarında önemli değişiklikler olduğunu belirtmişlerdir. MTX'in Bax ve Cas-3 gen ekspresyonlarını artırdığını ayrıca Bcl-2 gen ekspresyonunu ise azalttığını böylelikle MTX'in renal apoptozu indüklediği bildirmişlerdir (Hassanein et al., 2018). Benzer şekilde Shalaby ve arkadaşları da (2019) MTX'in böbreklerde Cas-3 gen ekspresyonunda artış olduğunu belirtmişlerdir (Shalaby et al., 2019).

Folik asit antagonisti olan MTX ile yapılan diğer çalışmalarda MTX'in böbreklerde apoptotik hücre ölümüne sebep olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmada Bcl-2, Bax, CYT-C, Cas-8 ve Cas-3 gibi birçok gen ekspresyonları ele alınmıştır. Bazı araştırmacılar MTX'in Bcl-2 gen ekspresyon düzeyinde azalmaya Bax, CYT-C, Cas-3 ve Cas-8 gibi genlerin ekspresyonlarında ise artışa sebep olarak apoptozu indükleyebildiğini belirtmişlerdir (Paul et al., 2015; Abdelaziz et al., 2020; Wei et al., 2021). Benzer olarak Aladaileh ve arkadaşlarının (2019) gerçekleştirdikleri bir çalışmada MTX ile indüklenen böbreklerde apoptotik hücre ölümüne neden olduğu ortaya konulmuştur. Hücre ölüm mekanizması olan apoptoza Bcl-2, Bax, Cas-3 ve Cas-9 gibi gen ekspresyonlarında önemli derecede artış ve azalmalar olduğunu rapor etmişlerdir (Aladaileh et al., 2019).

Morin hidrat'ın bir grup araştırmacı tarafından böbrek dokusundaki antiapoptotik Bcl-2 ve proapoptotik Bax, Cas-3 ve CYT-C gibi gen ekspresyon düzeylerinde etkili olduğu belirtilmiştir. Belirtilen bu çalışmada morinin apoptotik hücre ölümüne neden olan akrilamidin bu genler üzerindeki etkisini azalttığını rapor etmişlerdir (Kandemir et al., 2020). Kemoterapötik bir ilaç olan ifosfamid kaynaklı oluşan böbrek hasarını en aza indirmek için morin kullanılmış ve çalışma da mRNA ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda Bcl-2 ekspresyon seviyesinde ifosfamidin kontrole kıyasla azalma olduğunu ancak morin kullanılan grupların ifosfamid kullanılan gruba kıyasla artış olduğunu belirtmişlerdir (Çomaklı et al., 2022). Yapılan farklı çalışmalarda morinin sadece böbrek hasarı değil aynı zamanda karaciğer, akciğer, kalp ve beyin gibi birçok doku üzerinde de koruyucu etkisi olduğu anlaşılmıştır (Wei et al., 2015; Kuzu et al., 2018; Kuzu et al., 2019; Küçükler et al., 2020; Özdemir et al., 2020; Yesildag et al., 2022).



Şekil 4.8. Böbrek dokusunda MTX'in ve morin maddelerinin apoptoz ile ilişkili protein ekspresyon düzeylerindeki etkileri. (A) Western blot tekniği ile analizleri verilmiş tüm gruplarda  $\beta$ -aktin (43 kDa) yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Bax (23 kDa), Bcl-2 (26 kDa), CYT-C(15 kDa), Prokaspaz-8 (55 kDa), Prokaspaz-9 (46 kDa) ve Prokaspaz-3 (34 kDa) proteinlerinin ekspresyon düzeyleri. (B) apoptotik proteinlerin grafikleri. (I) Proapoptotik Bax, (II) Antiapoptotik Bcl-2, (III) Bax-Bcl-2, (IV) CYT-C, (V) Prokaspaz-8, (VI) Prokaspaz-9 ve (VII) Prokaspaz-3 protein ekspresyon oranları Graphpad 5.1 prism analiz programı ile ölçülmüştür. Veriler ortalama  $\pm$  SEM ile hesaplanmıştır. (kontrol vs diğer gruplar \*\*\* $p$ <0,001; \*\* $p$ <0,01; MTX vs diğer gruplar ### $p$ <0,001; ## $p$ <0,01 \* $p$ <0,05)

Bu tez çalışmasında MTX'in böbrek dokusunda sebep olduğu toksikasyona karşı tedavi amacıyla uygulanan morin hidratin moleküler düzeydeki etkilerini daha ayrıntılı bir biçimde incelemek için antiapoptotik Bcl-2 ve proapoptotik Bax proteinlerinin seviyelerine bakıldı (Şekil 4.8. A). Elde edilen sonuçlara göre Bcl-2 gen ekspresyon seviyesinde sadece MTX uygulanan grup ile kontrol grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte MTX+Morin 50 grubunun MTX grubuna nazaran arttığı, MTX+Morin 100 grubunun ise MTX grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış sergilediği gözlemlendi (Şekil 4.8. B II). Bax proteinin gen ekspresyon düzeyinde ise MTX grubunun kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli düzeyde bir artış olduğu gözlemlenirken MTX+Morin 50 grubunun MTX grubuna nazaran azaldığı, MTX+Morin 100 grubunun ise MTX grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalma sergilediği gözlemlendi (Şekil 4.8. B I). Ancak, Bax/Bcl-2 oranlarının hesaplanması yalnızca Bcl-2 veya yalnızca Bax ekspresyon düzeylerindeki değişimlerden daha önemlidir. Bax/Bcl-2 oranındaki artışın mitokondri üzerinde bulunan porların açılmasına ve sitoplazma içerisine proapoptotik CYT-C'nin salınmasına sebep olarak apoptozu indüklemektedir (Reed, 1997; Darendelioğlu, 2017). Yapılan hesaplama sonucunda MTX uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla Bax/Bcl-2 oranında anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. MTX+Morin 50 ve MTX+Morin 100 grubunun MTX grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8. B III). Bu gen ekspresyon düzeylerine ve hesaplamalara ek olarak apoptozu tetikleyen CYT-C protein ekspresyon düzeyinde MTX uygulanan grubun kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu gözlemlenirken, MTX+Morin 50 ve MTX+Morin 100 grubunun MTX grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.8. B IV). Bunun yanı sıra apoptotik Prokaspaz-9 ve Prokaspaz-3 protein ekspresyonu düzeylerini de araştırdık. Prokaspaz-9 proteinin seviyesinde MTX uygulanan grup kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlemlendi. MTX+Morin 50 ve MTX+Morin 100 grupları ise MTX grubu ile kıyaslandığında artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8. B VI). Bu sonuca göre Prokaspaz-9 enzimindeki azalma, aktif kaspaz-9'un ekspresyon düzeyinde artış olduğu anlamına gelmektedir. Aynı şekilde Prokaspaz-3 gen ekspresyon düzeyinde kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenirken, MTX+Morin 50 grubu ve MTX+Morin 100 grubunun MTX grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 4.8. B VII). Ayrıca apoptotik Prokaspaz-8 gen ekspresyon seviyesine de incelendi. Prokaspaz-8

gen ekspresyon seviyesinde kontrolle kıyasla istatistiksel olarak önemli bir azalma olduğu gözlemlenirken, tedavi amacıyla kullanılan MTX+Morin 50 ve MTX+Morin 100 gruplarının MTX grubu ile kıyaslandığında önemli derecede artış olduğu tespit edildi (Şekil 4.8. B V). Yapılan çalışmanın sonunda elde edilen tüm veriler literatür ile benzerlik göstermektedir.



## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, Wistar albino cinsi erkek ratlarda MTX ile indüklenen böbrek hasarına karşı morin hidrat'ın koruyucu etkilerinin olup olmadığını araştırmak için deneysel hayvan modelleri kullanıldı. Çalışma için 5 farklı deney grubu tasarlandı ve bu gruplar i) Kontrol, ii) Morin, iii) MTX, iv) MTX+Morin 50, v) MTX+Morin 100 olarak adlandırıldı. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre kemoterapötik ajan olan MTX'in böbrek hasarını belirlemede sıkça kullanılan testlerden serum üre ve kreatinin seviyelerinde artış olduğu tespit edildi. Bununla birlikte MTX'in antioksidan savunma sistemini azalttığını ve MDA seviyesini de arttırdığı tespit edildi. Bir antioksidan olarak bilinen morinin 50 ve 100 mg/kg dozlarının MTX ile kombine bir biçimde kullanıldığında antioksidan savunma sistemini güçlendirdiğini ve MDA seviyesini azalttığı tespit edilmiştir. Antioksidan olarak kullanılan morinin 50 mg/kg dozuna kıyasla morin 100 mg/kg dozunun böbrek hasarını önlemede daha etkili olduğu saptanmıştır. Çalışmada ayrıca enzim (SOD, KAT, GPx) ve nonenzim (GSH) aktivitelerde ölçüldü. Ölçülen sonuçlarda elde edilen verilere göre SOD, KAT, GPx ve GSH düzeylerinin MTX gruplarında azaldığı tespit edildi. Ayrıca antioksidan olarak kullanılan morinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozları uygulanan gruplarda bu antioksidan parametrelerde MTX grubuna kıyasla önemli düzeyde artış tespit edildi. Ek olarak bu çalışmada MTX ve morinin böbrek dokusundaki apoptotik etkileri de araştırılmıştır. Çalışma sonucunda MTX'in apoptozun iç ve dış yolakları (Bcl-2, Bax, CYT-C, Prokaspaz-3, Prokaspaz-8, Prokaspaz-9) üzerinde ilgili genlerin seviyelerinde önemli etkiler tespit edildi.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında kullanılan morin hidratın, MTX kaynaklı olarak ortaya çıkan böbrek hasarında antioksidan ve antiapoptotik etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda MTX ile indüklenen böbrek hasarında morinin antioksidan ve antiapoptotik etkileri incelenmediğinden bu tez çalışmasının gelecekte bu alanda yapılacak olan çalışmalara sıklıkla referans olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca morin MTX'in sebep olduğu böbrek toksikasyonuna karşı destekleyici bir tedavi olarak uygulanabileceği tespit edildi.

## KAYNAKLAR

Abdel-Daim, M. M., Khalifa, H. A., Abushouk, A. I., Dkhil, M. A., Al-Quraishy, S. A. (2017). Diosmin attenuates methotrexate-induced hepatic, renal, and cardiac injury: a biochemical and histopathological study in mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.

Abdel-Raheem, I. T., & Khedr, N. F. (2014). Renoprotective effects of montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor antagonist, against methotrexate-induced kidney damage in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 387(4), 341-353.

Abd El-Twab, S. M., Hussein, O. E., Hozayen, W. G., Bin-Jumah, M., Mahmoud, A. M. (2019). Chicoric acid prevents methotrexate-induced kidney injury by suppressing NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome activation and up-regulating Nrf2/ARE/HO-1 signaling. *Inflammation Research*, 68(6), 511-523.

Abdelaziz, R. M., Abdelazem, A. Z., Hashem, K. S., Attia, Y. A. (2020). Protective effects of hesperidin against MTX-induced hepatotoxicity in male albino rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 393(8), 1405-1417.

Aebi, H. E. (1983). Catalase. *Methods of enzymatic analysis*.

Ahmed, W., Zaki, A., Nabil, T. (2015). Prevention of methotrexate-induced nephrotoxicity by concomitant administration of garlic aqueous extract in rat. *Turkish journal of medical sciences*, 45(3), 507-516.

Akacha, A., Badraoui, R., Rebai, T., & Zourgui, L. (2020). Effect of *Opuntia ficus indica* extract on methotrexate-induced testicular injury: A biochemical, docking and histological study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-11.

Akşit, H., and BİLDİK, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1), 55-63.

Aktuğ, H. (2014). Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Tıp Dergisi*, 53(1), 60-64.

Akyüz, E.Y. (2015). Metotreksat ile indüklenmiş deneysel intestinal mukozit modelinde arjinin, omega 3 yağ asitleri ve nükleotitlerle zenginleştirilmiş oral formülün etkileri (PhD thesis, Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü)

Aladaileh, S. H., Hussein, O. E., Abukhalil, M. H., Saghir, S. A., Bin-Jumah, M., Alfwuaires, ... and Mahmoud, A. M. (2019). Formononetin upregulates Nrf2/HO-1 signaling and prevents oxidative stress, inflammation, and kidney injury in methotrexate-induced rats. *Antioxidants*, 8(10), 430.

Anitha T, Rajadurai M. (2014) Antioxidative potential of chrysin, a flavone in streptozotocin–nicotinamide-induced diabetic rats. *Biomed Prev Nutr*, 2014, 4: 511-517.

Arab, H. H., Salama, S. A., & Maghrabi, I. A. (2018). Camel milk attenuates methotrexate-induced kidney injury via activation of PI3K/Akt/eNOS signaling and intervention with oxidative aberrations. *Food & function*, 9(5), 2661-2672.

Arslan, B. (2020). Nefroloji hemşireliği üriner sistem fizyolojisi ve değerlendirmesi.

Armağan, İ. (2015). Metotreksat'ın karaciğer ve böbrekte neden olduğu hasarda oksidatif stresin rolü. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 22(4).

Armagan, I., Bayram, D., Candan, I. A., Yigit, A., Celik, E., Armagan, H. H., Uğuz, A. C. (2015). Effects of pentoxifylline and alpha lipoic acid on methotrexate-induced damage in liver and kidney of rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 39(3), 1122-1131.

Asci, H., Ozmen, O., Ellidag, H. Y., Aydin, B., Bas, E., Yilmaz, N. (2017). The impact of gallic acid on the methotrexate-induced kidney damage in rats. *journal of food and drug analysis*, 25(4), 890-897.

Ashkenazi, A. (2008). Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature reviews Drug discovery*, 7(12), 1001-1012.

Ashkenazi, A., Fairbrother, W. J., Levenson, J. D., Souers, A. J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective Bcl-2 family inhibitors. *Nature reviews drug discovery*, 16(4), 273-284.

Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü. YILDIZ, M., Öztürk, A., Çetin, M., ... ve YILMAZ, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369.

Aşçı, H. (2010). Metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında misoprostolün koruyucu etkisi (Medical expertise thesis, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi)

Atasoy, N. (2016). Çinko Oksit Nanopartikülleri Ve Siklofosfamidin Sıçanlarda Testis Histolojisi, Apoptozis Ve Oksidan-Antioksidan Değerler Uzerine Etkisi (Doctoral dissertation, Necmettin Erbakan University (Turkey)).

Ateş, S. (2015). Farklı üzüm çeşitlerinin olgunlaşma sürecinde polifenol içerikleri ile antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi (Master's thesis, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).

Bangert, C.A. ve Costner, M.I. (2007). Dermatolojide metotreksat. Dermatolojik Tedavi , 20 (4), 216-228.

Başaklar, A.C.(2008). Cerrahi Anatomi Modern Cerrahinin Embriyolojik ve Anatomik Temelleri. ANKARA: Palme Yayıncılık

Bebe, F. N., and Panemangalore, M. (2003). Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 38(3), 349-363.

Benzer, F., Kandemir, F. M., Kucukler, S., Comaklı, S., Caglayan, C. (2018). Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress and oxidative DNA damage. Archives of physiology and biochemistry, 124(5), 448-457.

Beytur, A. (2019). Deneysel böbrek iskem/reperfüzyon hasarında saksagliptinin etkilerinin araştırılması (Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Birangane, R. S., Chole, D. G., Reddy, K. S. P. (2011). A review of antioxidants. Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology, 23(5), 351.

Boujbiha, M. A., Hamden, K., Guermazi, F., Bouslama, A., Omezzine, A., Kammoun, A., El Feki, A. (2009). Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. Reproductive toxicology, 28(1), 81-89.

Boxtel CJV. 2007, Antineoplastik Ajanlar, İlaç Yararları ve Riskleri, Farmakoterapötik Ürünler. Ankara, Türk Eczacıları Birliği Yayınları, s: 185-188.

Can G. (2005), Antineoplastik İlaçların Yan Etkileri ve Hemşirelik Yaklaşımları. Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi, 2, 8-15.

Cengiz, Ö. (2018). Diyabetik ve nondiyabetik orta derecede böbrek yetmezliği olan hastalarda renal osteodistrofi parametrelerinin karşılaştırması (Master's thesis, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Cetinkaya, A., Bulbuloglu, E., Kurutas, E. B., & Kantarceken, B. (2006). N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. Medical science monitor, 12(8), BR274-BR278.

Ceyhan, D. (2017). Kanser hastalarında kemoterapi ile ilişkili periferik nörotoksisite ve eğitim gereksinimlerinin incelenmesi (Yüksek lisans tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Chabner, B. A., Allegra, C. J., Curt, G. A., Clendeninn, N. J., Baram, J., Koizumi, S., ... and Jolivet, J. (1985). Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug?. The Journal of clinical investigation, 76(3), 907-912.

Chan, E. S., Cronstein, B. N. (2010). Methotrexate—how does it really work?. Nature Reviews Rheumatology, 6(3), 175-178.

Chu, E. ve Sartorelli, AC (2018). Kanser kemoterapisi. Lange's Basic and Clinical Pharmacology , 948-976.

Çağlayan, C. (2018). Ratlarda civa (II) klorür kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarı üzerine rutin etkililerinin araştırılması.(Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü)

Çağlayan, C. (2019), Morin'in Karbonik Anhidraz, Asetilkolinesteraz ve  $\alpha$ -glikozidaz Enzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkileri. Journal of the Institute of Science and Technology, 9(3), 1443-1451.

Çelik, H., Kucukler, S., Çomaklı, S., Özdemir, S., Çağlayan, C., Yardım, A., Kandemir, F. M. (2020). Morin attenuates ifosfamide-induced neurotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, neuroinflammation and neuronal apoptosis. Neurotoxicology, 76, 126-137.

Çetin, E. S., Tetiker, H., Çelik, Ö. İ., Yılmaz, N., Ciğerci, İ. H. (2017). Methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: protective effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract. Complementary medicine research, 24(6), 364-370.

Çınar, İ., (2013), Tiyamin pirofosfatın sıçanlarda metotreksatla oluşturulan gastrotoksisite üzerindeki koruyucu etkisinin biyokimyasal olarak araştırılması (Yükseklisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi)

Çomaklı, S., Kandemir, F. M., Küçükler, S., Özdemir, S. (2022). Morin mitigates ifosfamide induced nephrotoxicity by regulation of NF-kappaB/p53 and Bcl-2 expression. Biotechnic & Histochemistry, 1-10.

Darendelioğlu, E. (2017). İnsan kolon kanseri hücrelerinde (HT-29) *Lactobacillus reuteri* türünden elde edilen bazı kısa zincirli yağ asitlerinin apoptotik etkilerinin araştırılması. (Doktora tezi, Bingöl-Bitlis Eren Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)

Demir, F., Uzun, F. G., Durak, D., Kalender, Y. (2011). Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(1), 77-81.

Doğan A., (2008), Kronik böbrek yetmezliğinde hemodiyaliz kan kurşun, kadmiyum, çinko ve bakır düzeylerine etkileri (Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü)

Ehrhardt, H., Wachter, F., Maurer, M., Stahnke, K., Jeremias, I. (2011). Important role of caspase-8 for chemosensitivity of ALL cells. *Clinical Cancer Research*, 17(24), 7605-7613.

Ekinci-Akdemir, FN, Yıldırım, S., Kandemir, FM, Gülçin, İ., Küçükler, S., Sağlam, YS, Yakan, S. (2018). Sıçanlarda metotreksatin neden olduğu karaciğer hasarı üzerine kastisin ve mirisetin etkileri. *İran temel tıp bilimleri dergisi*, 21 (12), 1281.

Elçin, A.E., Erkoç, F., Sarıkaya, R., Selvi, M., Atik, A.D., Öztekin, M.(2010). Molekülden Hücreye, Dokudan Fizyolojiye Biyoloji Deneyleri. ANKARA: Palme Yayıncılık

Elmansy, RA, Seleem, HS, Mahmoud, AR, Hassanein, EH ve Ali, FE (2021). Rebamipid, oksidatif stres ve inflamasyonun inhibisyonu yoluyla metotreksatin neden olduğu nefrotoksisiteyi potansiyel olarak azaltır: Moleküler ve histokimyasal bir çalışma. *Anatomik Kayıt* , 304 (3), 647-661.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Elias, R. J., Kellerby, S. S., Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(5), 430-441.

Elsawy, H., Alzahrani, A. M., Alfwuaires, M., Abdel-Moneim, A. M., Khalil, M. (2021). Nephroprotective effect of naringin in methotrexate induced renal toxicity in male rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112180.

Eren, E., Alper, A. T. A., Arıcan, A. (2012). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ve nefrotoksisite. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 229-235.

Erkurt, M. A., KUKU, İ., KAYA, E., Aydoğdu, İ. (2009). Kanser kemoterapisi ve böbrek. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 16(1), 63-68.

Ezhilarasan, D. (2021). Hepatotoxic potentials of methotrexate: Understanding the possible toxicological molecular mechanisms. *Toxicology*, 458, 152840.

Famurewa, A. C., Aja, P. M., Nwankwo, O. E., Awoke, J. N., Maduagwuna, E. K., Alope, C. (2019). Moringa oleifera seed oil or virgin coconut oil supplementation abrogates cerebral neurotoxicity induced by antineoplastic agent methotrexate by suppression of oxidative stress and neuro-inflammation in rats. *Journal of food biochemistry*, 43(3), e12748.

Finco, D. R. (1997). Kidney function. In *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press, p, 441-484.

Frohman, E. M., Villemarette-Pittman, N. R., Cruz, R. A., Longmuir, R., Rowe, V., Rowe, E. S., ... and Frohman, T. C. (2020). Part II. High-dose methotrexate with leucovorin rescue for severe COVID-19: an immune stabilization strategy for SARS-CoV-2 induced 'PANIC' attack. *Journal of the neurological sciences*, 415, 116935.

Franklin, R. A., and McCubrey, J. A. (2000). Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia*, 14(12), 2019-2034.

Gao, X., Xu, J., Jiang, L., Liu, W., Hong, H., Qian, Y., ... and Wei, Z. (2021). Morin alleviates aflatoxin B1-induced liver and kidney injury by inhibiting heterophil extracellular traps release, oxidative stress and inflammatory responses in chicks. *Poultry Science*, 100(12), 101513.

Goudarzi, M., Kalantar, M., Sadeghi, E., Karamallah, M. H., Kalantar, H. (2021). Protective effects of apigenin on altered lipid peroxidation, inflammation, and antioxidant factors in methotrexate-induced hepatotoxicity. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394(3), 523-531.

Gökhan, A., Kılıç, K. D., Gülle, K., Uyanıkgil, Y., Çavuşoğlu, T. (2020). Apoptotik yolaklar ve hedefe yönelik tedaviler. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 27(4).

Guilland, J. C., Aimone-Gastin, I. (2013). Vitamin B9. *La Revue du praticien*, 63(8), 1079-1081.

Günay, T., Yardımcı, O. D., Hocoğlu, M., Bör, E. D., Turgut, A., Karateke, A. (2019). Factors affecting success of single-dose methotrexate treatment in ectopic pregnancy. *Kocaeli Medical Journal*, 8(1), 189-194.

Hafez, S. M. N. A., Elbassuoni, E., Abdelzاهر, W. Y., Welson, N. N., Batiha, G. E. S., Alzahrani, K. J., Abdelbaky, F. A. F. (2021). Efficacy of vitamin E in protection against methotrexate induced placental injury in albino rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111637.

Hassanein, E. H., Mohamed, W. R., Shalkami, A. G. S., Khalaf, M. M., Hemeida, R. A. (2018). Renoprotective effects of umbelliferone on methotrexate-induced renal injury through regulation of Nrf-2/Keap-1, P38MAPK/NF- $\kappa$ B, and apoptosis signaling pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 116, 152-160.

Hassanein, E. H., Shalkami, A. G. S., Khalaf, M. M., Mohamed, W. R., Hemeida, R. A. (2019). The impact of Keap1/Nrf2, P38MAPK/NF- $\kappa$ B and Bax/Bcl2/caspase-3 signaling pathways in the protective effects of berberine against methotrexate-induced nephrotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 47-56.

Ijaz, M. U., Shehzadi, S., Zahra, Z., Samad, A., Ehsan, N., Afsar, T., ... and Razak, S. (2021). Ameliorative effects of morin on cisplatin-induced toxicity in renal mitochondria isolated from rats. *Journal of King Saud University-Science*, 101655.

Jalili, C., Ghanbari, A., Roshankhah, S., Salahshoor, M. R. (2020). Toxic effects of methotrexate on rat kidney recovered by crocin as a consequence of antioxidant activity and lipid peroxidation prevention. *Iranian biomedical journal*, 24(1), 39.

Joshi, D., Mittal, D. K., Shukla, S., Srivastav, A. K., & Srivastav, S. K. (2014). N-acetyl cysteine and selenium protects mercuric chloride-induced oxidative stress and antioxidant defense system in liver and kidney of rats: a histopathological approach. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(2), 218-226.

Kalender, S., Uzun, F. G., Demir, F., Uzunhisarcıklı, M., Aslanturk, A. (2013). Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. *Food and chemical toxicology*, 55, 456-462.

Kaltalioglu, K., and Coskun-Cevher, S. (2016). Potential of morin and hesperidin in the prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Renal Failure*, 38(8), 1291-1299.

Kandemir, C. (2019). Bazı sentetik bileşiklerin antioksidan ve antibakteriyal özelliklerin incelenmesi (Master's thesis, Sakarya Üniversitesi).

Kandemir, F. M., Kucukler, S., Caglayan, C., Gur, C., Batil, A. A., & Gülçin, İ. (2017). Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: Biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and antiautophagic properties. *Journal of food biochemistry*, 41(5), e12398.

Kandemir, F. M., Kucukler, S., Eldutar, E., Caglayan, C., Gülçin, İ. (2017). Chrysin protects rat kidney from paracetamol-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy: a multi-biomarker approach. *Scientia pharmaceutica*, 85(1), 4.



Kandemir, F. M., Yıldırım, S., Kucukler, S., Caglayan, C., Darendelioğlu, E., Dortbudak, M. B. (2020). Protective effects of morin against acrylamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity: A multi-biomarker approach. *Food and Chemical Toxicology*, 138, 111190.

Kanmaz, Ö. (2019). Hastanelerde Hazırlanan Onkolojik İlaçların İmha Maliyetlerinin Düşürülmesinde Eczacının Rolü (Yüksek lisans tezi, İstanbul Medipol Üniversitesi)

Karabulut, H., ve Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 65-76.

Kartlaşmış, K., Kökbaş, U., Kayrın, L. (2016). Apoptozis Biyokimyası. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 25(1), 52-69.

Kasnak, C., ve Palamutoğlu, R. (2015). Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *Türk tarım-gıda bilim ve teknoloji dergisi*, 3(5), 226-234.

Kavram, K. (2016). Metotreksat uygulanan sıçanlarda aposinin'in testisler üzerindeki etkilerinin biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmesi (Yüksek lisans tezi, Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Kavala, M., Türkoğlu, Z., Özlü, E. (2014). Metotreksat ve dermatolojide klinik kullanımları. *Med Med J*, 29, 104-110.

Keeton, W.T. (2004). Genel Biyoloji. ANKARA: Palme Yayıncılık

Kocaman, N. (2012). Metotreksat ile karaciğer hasarı oluşturulmuş sıçanlarda silmarinin koruyucu etkilerinin araştırılması/I? nvestigation op the protective effects of silymarin on the metotrexate-induced hepatotoxicity in rats (Uzmanlık tezi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)

Kucukler, S., Caglayan, C., Darendelioğlu, E., Kandemir, F. M. (2020). Morin attenuates acrylamide-induced testicular toxicity in rats by regulating the NF-κB, Bax/Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways. *Life Sciences*, 261, 118301.

Kuzu, M., Kandemir, F. M., Yildirim, S., Kucukler, S., Caglayan, C., Turk, E. (2018). Morin attenuates doxorubicin-induced heart and brain damage by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 443-453.

Kuzu, M., Yıldırım, S., Kandemir, F. M., Küçükler, S., Çağlayan, C., Türk, E., Dörtbudak, M. B. (2019). Protective effect of morin on doxorubicin-induced hepatorenal toxicity in rats. *Chemico-biological interactions*, 308, 89-100.

KV, A., Madhana, R. M., Kasala, E. R., Samudrala, P. K., Lahkar, M., Gogoi, R. (2016). Morin hydrate mitigates cisplatin-induced renal and hepatic injury by impeding oxidative/nitrosative stress and inflammation in mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 30(12), 571-579.

Lüleyap, H. Ü. (2008). *Moleküler Genetiğin Esasları*, Nobel Kitabevi. İzmir, 437s.

Mahmoud, A. M., Germoush, M. O., Al-Anazi, K. M., Mahmoud, A. H., Farah, M. A., Allam, A. A. (2018). Commiphora molmol protects against methotrexate-induced nephrotoxicity by up-regulating Nrf2/ARE/HO-1 signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 499-509.

Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *The FEBS journal*, 275(15), 3959-3970.

Matkovics, B. (1988). Determination of enzyme activity in lipid peroxidation and glutathione pathways. *Laboratoriumi Diagnosztika*, 15, 248-250.

Mclaughlin D., Stamford J., White D. (2014), *Human Physiology*, Nobel Akademik Yayıncılık, ANKARA

Mehrzadi, S., Fatemi, I., Esmaeilzadeh, M., Ghaznavi, H., Kalantar, H., Goudarzi, M. (2018). Hepatoprotective effect of berberine against methotrexate induced liver toxicity in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 233-239.

Mendoza-Wilson, A. M., Santacruz-Ortega, H., Balandrán-Quintana, R. R. (2011). Relationship between structure, properties, and the radical scavenging activity of morin. *Journal of Molecular Structure*, 995(1-3), 134-141.

Moodi, H., Hosseini, M., Abedini, M. R., Hassanzadeh-Taheri, M., Hassanzadeh-Taheri, M. (2020). Ethanolic extract of *Iris songarica* rhizome attenuates methotrexate-induced liver and kidney damages in rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 10(4), 372.

Morsy, M. A., Ibrahim, S. A., Amin, E. F., Kamel, M. Y., Rifaai, R. A., Hassan, M. K. (2013). Curcumin ameliorates methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Advances in pharmacological sciences*, 2013.

Mottaghi, S., and Abbaszadeh, H. (2021). The anticarcinogenic and anticancer effects of the dietary flavonoid, morin: Current status, challenges, and future perspectives. *Phytotherapy Research*, 35(12), 6843-6861.

Nakada, T., Kudo, T., Kume, T., Kusuhara, H., Ito, K. (2019). Estimation of changes in serum creatinine and creatinine clearance caused by renal transporter inhibition in healthy subjects. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 34(4), 233-238.

Nandhakumar, R., Salini, K., Niranjali Devaraj, S. (2012). Morin augments anticarcinogenic and antiproliferative efficacy against 7, 12-dimethylbenz (a)-anthracene induced experimental mammary carcinogenesis. *Molecular and cellular biochemistry*, 364(1), 79-92.

Nedelcu, R. I., Balaban, M., Turcu, G., Brinzea, A., Ion, D. A., Antohe, M., ... and Zurac, S. A. (2019). Efficacy of methotrexate as anti-inflammatory and anti-proliferative drug in dermatology: Three case reports. *Experimental and therapeutic medicine*, 18(2), 905-910.

Olayinka, E. T., Ore, A., Adeyemo, O. A., Ola, O. S. (2019). The role of flavonoid antioxidant, morin in improving procarbazine-induced oxidative stress on testicular function in rat. *Porto biomedical journal*, 4(1).

Olayinka, E. T., Ore, A., Olotu, O. O., Ogbuji, V. U., Adeyemo, O. A., Ola, O. S. (2021). Preservation of antioxidant defense system by Morin in bicalutamide-induced rat testicular toxicity. *Ife Journal of Science*, 23(1), 115-122.

Olonode, E. T., Aderibigbe, A. O., Adeoluwa, O. A., Eduviere, A. T., & Ben-Azu, B. (2019). Morin hydrate mitigates rapid eye movement sleep deprivation-induced neurobehavioural impairments and loss of viable neurons in the hippocampus of mice. *Behavioural brain research*, 356, 518-525.

Owumi, S. E., Ajijola, I. J., & Agbeti, O. M. (2019). Hepatorenal protective effects of protocatechuic acid in rats administered with anticancer drug methotrexate. *Human & experimental toxicology*, 38(11), 1254-1265.

Özdemir, S., Kucukler, S., Çomaklı, S., & Kandemir, F. M. (2020). The protective effect of Morin against ifosfamide-induced acute liver injury in rats associated with the inhibition of DNA damage and apoptosis. *Drug and chemical toxicology*, 1-10.

Parrino, J., Hotchkiss, R. S., Bray, M. (2007) Immune Cell Apoptosis Prevention as Potential Therapy for Severe Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 13(2).

Paul, M., Hemshekhar, M., Thushara, R. M., Sundaram, M. S., NaveenKumar, S. K., Naveen, S., ... and Girish, K. S. (2015). Methotrexate promotes platelet apoptosis via JNK-mediated mitochondrial damage: alleviation by N-acetylcysteine and N-acetylcysteine amide. *PloS one*, 10(6), e0127558.

Pfeffer, C. M., and Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.

Placer, Z. A., Cushman, L. L., Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical biochemistry*, 16(2), 359-364.

Pınar, N., Kaplan, M., Özgür, T., Özcan, O. (2018). Ameliorating effects of tempol on methotrexate-induced liver injury in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 758-764.

Pompei, L. M., Cunha, E. P., Steiner, M. L., Theodoro, T. R., Mader, A. M. A. A., Petri, G., ... and Fernandes, C. E. (2015). Effects of estradiol, progestogens, and of tibolone on breast proliferation and apoptosis. *Climacteric*, 18(4), 518-522.

Reed, J. C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, 387(6635), 773-776.

Renahan, A. G., Booth, C., & Potten, C. S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? Education and debate. *Bmj*, 322(7301), 1536-1538.

Roghani, M., Kalantari, H., Khodayar, M. J., Khorsandi, L., Kalantar, M., Goudarzi, M., Kalantar, H. (2020). Alleviation of liver dysfunction, oxidative stress and inflammation underlies the protective effect of ferulic acid in methotrexate-induced hepatotoxicity. *Drug design, development and therapy*, 14, 1933.

Safaei, F., Mehrzadi, S., Khadem Haghighian, H., Hosseinzadeh, A., Nesari, A., Dolatshahi, M., ... and Goudarzi, M. (2018). Protective effects of gallic acid against methotrexate-induced toxicity in rats. *Acta Chirurgica Belgica*, 118(3), 152-160.

Sahindokuyucu-Kocasari, F., Akyol, Y., Ozmen, O., Erdemli-Kose, S. B., Garli, S. (2021). Apigenin alleviates methotrexate-induced liver and kidney injury in mice. *Human & Experimental Toxicology*, 09603271211009964.

Salva, K. A., Kim, Y. H., Rahbar, Z., Wood, G. S. (2018). Epigenetically Enhanced PDT Induces Significantly Higher Levels of Multiple Extrinsic Pathway Apoptotic Factors than Standard PDT, Resulting in Greater Extrinsic and Overall Apoptosis of Cutaneous T-cell Lymphoma. *Photochemistry and photobiology*, 94(5), 1058-1065.

Samdanci, E. T., Huz, M., Ozhan, O., Tanbek, K., Pamukcu, E., Akatli, A. N., Parlakpınar, H. (2019). Cytoprotective effects of molsidomine against methotrexate-induced hepatotoxicity: an experimental rat study. *Drug design, development and therapy*, 13, 13.

Sang, L., Wang, X. M., Xu, D. Y., Sang, L. X., Han, Y., Jiang, L. Y. (2017). Morin enhances hepatic Nrf2 expression in a liver fibrosis rat model. *World Journal of Gastroenterology*, 23(47), 8334.

Sapmaz, C. (2015). Effect of antioxidant morin on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene and endosulfan treated healthy and streptozotocin-induced diabetic rats.

Sedlak, J., and Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192-205.

Shalaby, Y. M., Menze, E. T., Azab, S. S., Awad, A. S. (2019). Involvement of Nrf2/HO-1 antioxidant signaling and NF- $\kappa$ B inflammatory response in the potential protective effects of vincamine against methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: cross talk between nephrotoxicity and neurotoxicity. *Archives of toxicology*, 93(5), 1417-1431.

Singh, R. K., Gautam, R. K., Karchuli, M. S. (2014). Evaluation of nephroprotective activity of *Mentha arvensis* L. in cisplatin induced nephrotoxicity. *Asian journal of Pharmaceutical and clinical research*, 7(4).

Sobczyńska-Malefora, A., and Harrington, D. J. (2018). Laboratory assessment of folate (vitamin B9) status. *Journal of clinical pathology*, 71(11), 949-956.

Su, L., Wang, M., Yin, S. T., Wang, H. L., Chen, L., Sun, L. G., Ruan, D. Y. (2008). The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3), 483-489.

Subash, S., and Subramanian, P. (2009). Morin a flavonoid exerts antioxidant potential in chronic hyperammonemic rats: a biochemical and histopathological study. *Molecular and cellular biochemistry*, 327(1), 153-161.

Sun, Y. I., Oberley, L. W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497-500.

Şenol, O. (2015). Bazı ilaç etkin maddelerinin antioksidan aktivite/kapasitelerinin çeşitli yöntemlerle belirlenmesi ve kemometrik hesaplamalarla sınıflandırılması (Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi)

Temel M.K. (2015). Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi [The development of cytotoxic chemotherapeutics in the twentieth century]. *Turkish J Oncol*, 30(2), 96-108.

Tian, H., & Cronstein, B. N. (2007). Understanding the mechanisms of action of methotrexate. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 65(3), 168-173.

Toptancı, B. Ç., Kizil, G., Kizil, M.(2016) DNA Damage Mechanisms Of Anti-Cancer Drugs. *Middle East Journal of Science*, 2(1), 33-49.

TUNA, R. (2014). Onkoloji hemşireliğinde antineoplastik ilaçların güvenli kullanımı. *Sağlık ve Hemşirelik Yönetimi Dergisi*, 1(2), 105-111.

Turgut F. ve Pandya S. (2018), Böbreklerinizi Koruyun, Samarpan kidney foundation, Hindistan

Uysal, Ü., (2021). Kalsiyum Okzalit Böbrek Taşı Olan Hastalarda Klodn (Cl<sub>dn</sub>) Gen Ailesi Üyelerinin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi (Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim dalı)

Vallon, V., Muhlbauer, B., Osswald, H. (2006). Adenosine and kidney function. *Physiological reviews*, 86(3), 901-940.

Vardi, N., Parlakpınar, H., Ates, B., Cetin, A., Otlu, A. (2013). The protective effects of *Prunus armeniaca* L (apricot) against methotrexate-induced oxidative damage and apoptosis in rat kidney. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(3), 371-381.

Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J. P., Srivastava, S., Prabha, S. (2016). Antioxidants and its functions in human body-A Review. *Res. Environ. Life Sci*, 9(11), 1328-1331.

Yesildag, K., Eroz, R., Genc, A., Dogan, T., Satici, E. (2022). Evaluation of the protective effects of morin against acrylamide-induced lung toxicity by biomarkers of oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy. *Journal of Food Biochemistry*, e14111.

Yıldıran, H., ve Gençer, F. (2018). Böbrek Hastalıkları ve Protein Metabolizması. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 46, 7-12.

Yousef, M. I., Omar, S. A., El-Guendi, M. I., Abdelmegid, L. A. (2010). Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3246-3261.

Yu, J., and Zhou, P. (2020). The advances of methotrexate resistance in rheumatoid arthritis. *Inflammopharmacology*, 1-11.

Yumurtacı, A. (2004). Bitkilerde Antitumoral Antibiyotiklerin Sitolojik Etkileri (Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi (Turkey)).

Zhang, J., Shao, S., Huang, D., Zhang, J., Dai, Y., Wei, Z., Xia, Y. (2021). Effect and underlying mechanism of morin on the pharmacokinetics of diclofenac sodium in rats. *Xenobiotica*, 51(10), 1181-1187.

Zulaikhah, S. T. (2017). The role of antioxidant to prevent free radicals in the body. *Sains Medika*, 8(1), 39-45.

Wafa, T., Amel, N., Issam, C., Imed, C., Abdelhedi, M., Mohamed, H. (2011). Subacute effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic herbicide on antioxidant defense system and lipid peroxidation in rat erythrocytes. *Pesticide biochemistry and physiology*, 99(3), 256-264.

Welbat, J. U., Naewla, S., Pannangrong, W., Sirichoat, A., Aranarochana, A., Wigmore, P. (2020). Neuroprotective effects of hesperidin against methotrexate-induced changes in neurogenesis and oxidative stress in the adult rat. *Biochemical Pharmacology*, 178, 114083.

Wei, Z., He, X., Kou, J., Wang, J., Chen, L., Yao, M., ... and Yang, Z. (2015). Renoprotective mechanisms of morin in cisplatin-induced kidney injury. *International Immunopharmacology*, 28(1), 500-506.

Wei, X., Wu, Y., Tang, H., Wang, B., Wang, Y., Sun, W., ... and Wang, C. (2021). CP-25 ameliorates methotrexate induced nephrotoxicity via improving renal apoptosis and methotrexate excretion. *Journal of Pharmacological Sciences*, 146(1), 21-28.

Widemann, B. C., Adamson, P. C. (2006). Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *The oncologist*, 11(6), 694-703.

**EKLER**

Evrak Tarih ve Sayısı: 23/09/2020-E.17204



**T.C.**  
**BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ**  
 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı :85680299/020/  
 Konu :Olurlar, Onaylar

Sayın Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN  
 Dekan Yardımcısı

Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 23.09.2020 tarihinde yapılan toplantısında "**Ratlarda Metotreksat ile oluşturulan böbrek hasarı üzerine morin hidratin etkilerinin araştırılması**" başlıklı araştırma projeniz Etik Kurul yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunmuştur. Projenizin onay belgesi ektedir.  
 Gereğini rica ederim.





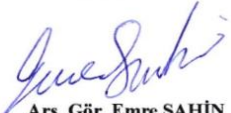


**e-imzalıdır**  
**Prof. Dr. Bahri PATİR**  
**Kurul Başkanı**

EK :  
 Onay Belgesi





T.C  
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

Toplantı Tarihi: <b>23.09.2020</b>	Toplantı Sayısı: <b>2020/03</b>	Karar Sayısı: <b>03/07</b>
<p>Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında görevli Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN tarafından sunulan <b>“Ratlarda Metotreksat ile oluşturulan böbrek hasarı üzerine morin hidratin etkilerinin araştırılması”</b> başlıklı araştırma projesi başvurusu etik yönden değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda projede Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyle Yere Etik Kurul Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından <b>uygun olduğuna ve aşağıdaki hususlar göz önüne alınarak yürütülmesine oy birliği ile karar verilmiştir.</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması</li> <li>2. Projede çalışacak olan araştırmacılar ile ilgili değişikliklerde kurulumuzdan onay alınması</li> <li>3. Çalışma belirtilen sürede tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması</li> <li>4. Çalışma bitiminde sonuç raporunun gönderilmesi</li> </ol>		
 <b>Prof. Dr. Bahri PATIR</b> Başkan		<b>KATILMADI</b> <b>Prof. Dr. Mehmet Nuri AÇIK</b> Başkan Yardımcısı
 <b>Doç. Dr. Hakan İNCİ</b> Üye	 <b>Dr. Öğr. Üyesi Aykut ULUCAN</b> Üye	 <b>Vet. Hekim Perihan AÇIK</b> BÜDAM Sorumlu Veteriner Hekimi
 <b>Arş. Gör. Emre ŞAHİN</b> BÜHADYEK Sekreteri	 <b>Mustafa KARAARSLAN</b> STK	 <b>Nihat KORLAELÇİ</b> Sivil Üye

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
<b>Adı Soyadı:</b>	Sevda SAĞ
<b>Doğum tarihi:</b>	05.07.1995
<b>Doğum Yeri:</b>	Merkez/BATMAN
<b>Uyruğu:</b>	T.C.
<b>Adres:</b>	Onur Mahallesi 45036 Sokak No:16/1 Seyhan/ADANA
<b>Tel:</b>	0541 947 85 86
<b>E-mail:</b>	svdsg72@gmail.com
Eğitim	
<b>Lise:</b>	Batman Ticaret Meslek Lisesi
<b>Lisans:</b>	Bingöl Üniversitesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2015-2019)
Yabancı Dil Bilgisi	
<b>İngilizce:</b>	Orta Düzey