TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER VE BÖBREK HASARI ÜZERİNE SÜT SERUM PROTEİNLERİNİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ELİF TUFAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA (ECZACILIK) ANABİLİM DALI
BESLENME VE BİYOKİMYASI PROGRAMI

DANIŞMAN

Prof. Dr. TUĞBA TUNALI AKBAY

2023-İSTANBUL

BEYAN

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

Elif TUFAN

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bana yol gösteren, her daim yanımda olan, bana verdiği destek ve tecrübelerinden faydalanma olanağı sayesinde akademik açıdan gelişmemde yardımcı olan, tez çalışmamı sabır ve titizlikle takip eden çok değerli danışman hocam **Sayın Prof. Dr. Tuğba Tunalı Akbay'a,**

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan **Prof. Dr. Ayşen Yarat'a, Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan' a, Doç. Dr. Nihal Şehkar Oktay'a, Doç. Dr. Özlem Bingöl Akpınar'a, Prof. Dr. Derya Özsavcı'ya, Prof. Dr. Azize Şener'e,**

Deney süreci boyunca yardımcı olan Fenerbahçe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı **Sayın Prof. Dr. Göksel Şener'e, Doç. Dr. Dilek Özbeyli' ye, Dr. Öğr. Üyesi Esin Ak' a,**

Çalışmamın gerçekleşmesindeki maddi desteklerinden dolayı **Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne**,

Tez çalışmamda bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım **Sümeyye Yılmaz Karaoğlu' na, Begüm Gürel Gökmen' e, Güzin Göksun Sivas' a, Ercan Dursun' a, Eda Çergel'e,**

Yetişmemde büyük emekleri olan, hayatım boyunca benden maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, büyük bir sabır ve anlayışla hep yanımda olan sevgili **anneme, babama, kardeşime** en içten duygularımla teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından '**TYL-2021-10435**' numaralı proje ile desteklenmiştir.

İçindekiler

BEYAN i
TEŞEKKÜR ii
ŞEKİL LİSTESİ ix
TABLO LİSTESİ xi
1. ÖZET 1
2. SUMMARY 2
3. GİRİŞ ve AMAÇ 3
4. GENEL BİLGİLER 6
4.1. Metotreksat 6
4.1.1. Etki mekanizması 6
4.1.1.1. Metotreksatın antiproliferatif etkisi 9
4.1.1.2. Metotreksatın antiinflamatuvar etkisi 9
4.1.2. Metotreksatın farmokokinetik özellikleri 10
4.1.3. Metotreksatın endikasyonları 11
4.1.4. Metotreksatın toksisitesi 11
4.1.4.1. MTX'in hepatotoksik etkisi 13
4.1.4.2. MTX'in nefrotoksik etkisi 14
4.2. Süt Serum (Whey) Proteinleri 15
4.2.1. Protein içeriği 16
4.2.1.1. β-laktoglobulin 17
4.2.1.2. α-laktalbumin 17
4.2.1.3. İmmünoglobulinler 18
4.2.1.4. Serum albumin 18
4.2.1.5. Laktoferrin 18
4.2.1.6. Laktoperoksidaz 18
4.2.1.7. Glikomakropeptid 18
4.2.2. Süt serumu proteinlerinin etkileri 19
4.2.2.1. Antioksidan etkileri 19
4.2.2.2. Antimikrobiyal etkileri 19
4.2.2.3. Antikanser etkileri 20
4.2.2.4. Kas üzerine etkileri 21
4.2.2.5. Immünomodülatör etkileri 21

4.2.2.6. Gastrointestinal sistem üzerine etkileri 22
4.2.2.7. Antihipertansif etkileri.....22
4.2.2.8. Ağırlık yönetimi üzerine etkileri.....22
4.2.2.9. Karaciğer ve böbrek üzerine etkileri 22
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....24
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....24
5.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....24
5.3. Çalışmada İzlenilen Yöntemin Aşamaları 25
5.4. Kullanılan Deney Hayvanları.....25
5.5. Deney Hayvanlarının Beslenmesi.....25
5.6. Süt Serum Proteininin Hazırlanması.....25
5.7. Deney Gruplarının Oluşturulması, Doku Örneklerinin Alınması, İncelenen Parametreler.....26
5.8. Vücut Ağırlığının Ölçülmesi.....27
5. 9. Doku Homojenatlarının Hazırlanması 27
5. 10. Karaciğer ve Böbrekte Araştırılan Parametreler İçin Kullanılan Tayin Yöntemleri.....28
5. 10. 1. Karaciğer ve böbrek dokularında total protein tayini (Lowry ve ark., 1951) 28
5.10.2. Karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyonu (LPO) tayini (Ledwozyw ve ark., 1986) 30
5.10.3. Karaciğer ve böbrek dokularında indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini (Beutler, 1975).....31
5.10.4. Karaciğer ve böbrek dokularında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini (Mylorie ve ark., 1986) 32
5.10.5. Karaciğer ve böbrek dokularında glutatyon- S- transferaz (GST) aktivitesi tayini (Habig ve Jacoby, 1981).....34
5.10.6. Karaciğer ve böbrek dokularında nitrik oksit (NO) tayini (Miranda ve ark., 2001) 35
5.10.7. Karaciğer ve böbrek dokularında doku faktörü aktivite tayini (Ingram ve Hills, 1976).....37
5.10.8. SDS- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS- PAGE) (Laemmli, 1970) ...37
5.11. Kanda Araştırılan Parametreler İçin Kullanılan Tayin Yöntemleri.....40
5.11.1. Kanda oxim metodu ile üre tayini (Rosenthal, 1955) 40
5.11.2. Kanda kreatinin tayini (Slot, 1965).....41
5.11.3. Serum sitokinlerinin tayini 42

5.12. Histolojik İnceleme 42
5.13. İstatiksel Analiz 43
6. BULGULAR 44
6.1. Deney Hayvanlarının Yem Tüketimi ve Vücut Ağırlıkları 44
6.2. Karaciğer Dokusu Sonuçları 45
6.2.1. Karaciğer dokusunda total protein sonuçları 45
6.2.2. Karaciğer dokusunda malondialdehit (MDA) sonuçları 46
6.2.3. Karaciğer dokusunda indirgenmiş glutatyon sonuçları 47
6.2.4. . Karaciğer dokusunda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları 48
6.2.5. Karaciğer dokusunda glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi sonuçları 49
6.2.6. Karaciğer dokusunda nitrik oksit (NO) sonuçları 50
6.2.7. Karaciğer dokusunda doku faktörü aktivitesi sonuçları 51
6.3. Böbrek Dokusu Sonuçları 52
6.3.1. Böbrek dokusunda total protein sonuçları 52
6.3.2. Böbrek dokusunda malondialdehit (MDA) sonuçları 53
6.3.3. Böbrek dokusunda indirgenmiş glutatyon (GSH) sonuçları 54
6.3.4. Böbrek dokusunda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları 55
6.3.5. Böbrek dokusunda glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi sonuçları 56
6.3.6. Böbrek dokusunda nitrik oksit (NO) sonuçları 57
6.3.7. Böbrek dokusunda doku faktörü aktivitesi (TFa) sonuçları 58
6.4. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları 59
6.5. Kan Parametreleri Sonuçları 60
6.5.1. Üre ve kreatinin sonuçları 60
6.5.2. Sitokin sonuçları 61
6.6. Karaciğer ve Böbrek Dokusu Histoloji Sonuçları 62
7. TARTIŞMA ve SONUÇ 64
8. KAYNAKÇA 69
9. EKLER 83
EK 1. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası 86

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

AICAR: Aminoimidazol karboksamid ribonükleotit

ALT: Alanin aminotransferaz

AMP: Adenosin monofosfat

AST: Aspartat aminotransferaz

BCAA: Dallı zincirli aminoasit

CDNB: 1-kloro-2,4-dinitro-benzen

DHF: Dihidrofolat

DHFR: Dihidrofolat redüktaz

dUMP: Deoksiüridin monofosfat

dTMP: Deoksitimidin monofosfat

EDTA-Na: Etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu

FAICAR: 5-Formamidoimidazol-4 karboksamid ribotit

FPGS: Folilpoliglutamat sentetaz

GAR: Glisinamid ribonükleotit

GMP: Glikomakropeptid

GSH: Glutatyon

GST: Glutatyon S-transferaz

HE: Hematoksilin- eozin

IFN: İnterferon

IL: İnterlökin

IMP: İnozin monofosfat

K: Kontrol

LPO: Lipid peroksidasyonu

MDA: Malondialdehit

MTHFR: Metilentetrahidrofolat redüktaz

MTX: Metotreksat

MTX-PGs: Metotreksat- poliglutamat

NO: Nitrik oksit

RFC: İndirgenmiş folat taşıyıcısı

SAM: S-adenozil metiyonin

SAH: S-adenozil homosistein

SDS- PAGE: SDS- poliakrilamid jel elektroforezi

SOD: Süperoksit dismutaz

SSP: Süt serum proteini

TF: Doku faktörü

THF: Tetrahidrofolat

TNF-α: Tümör nekroz faktörü-α

TP: Total protein

TS: Timidilat sentaz

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Folik asitin kimyasal yapısı

Şekil 2: MTX'in kimyasal yapısı

Şekil 3: MTX'in etki mekanizması

Şekil 4: Metotreksat' ın adenozin yolundaki etki mekanizması

Şekil 5: Süt serum proteinlerinin etkileri

Şekil 6: Tez çalışmasında izlenilen yöntem

Şekil 7: Deney grupları

Şekil 8: Sıçanların tükettikleri yem miktarının karşılaştırılması

Şekil 9: Karaciğer total protein düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 10: Karaciğer malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 11: Karaciğer glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 12: Karaciğer süperoksit dismutaz aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 13: Karaciğer glutatyon- S-transferaz aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 14: Karaciğer nitrik oksit düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 15: Karaciğer doku faktörü aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 16: Böbrek total protein düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 17: Böbrek malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 18: Böbrek glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 19: Böbrek süperoksit dismutaz aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 20: Böbrek glutatyon-S-transferaz aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 21: Böbrek nitrik oksit düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 22: Böbrek doku faktörü aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 23: Karaciğer dokusu SDS-PAGE elektroforezi

Şekil 24: Böbrek dokusu SDS-PAGE elektroforezi

Şekil 25: Deney gruplarında karaciğer ve böbrek dokularının histolojik olarak incelenmesi

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: MTX kullanımına bağlı toksisiteler

Tablo 2: Süt serum protein bileşenleri

Tablo 3. Kullanılan cihazlar ve markaları

Tablo 4: Tüketilen yem miktarları (g)

Tablo 5: Sıçanların ağırlık değişimleri (g)

Tablo 6: Karaciğer total protein düzeyleri

Tablo 7: Karaciğer malondialdehit düzeyleri

Tablo 8: Karaciğer glutatyon düzeyleri

Tablo 9: Karaciğer süperoksit dismutaz aktivitesi

Tablo 10: Karaciğer glutatyon-S-transferaz aktivitesi

Tablo 11: Karaciğer nitrik oksit düzeyleri

Tablo 12: Karaciğer doku faktörü aktivitesi

Tablo 13: Böbrek total protein düzeyleri

Tablo 14: Böbrek malondialdehit düzeyleri

Tablo 15: Böbrek glutatyon düzeyleri

Tablo 16: Böbrek süperoksit dismutaz aktivitesi

Tablo 17: Böbrek glutatyon-S-transferaz aktivitesi

Tablo 18: Böbrek nitrik oksit düzeyleri

Tablo 19: Böbrek doku faktörü aktivitesi

Tablo 20: Serum üre and kreatinin düzeyleri

Tablo 21: Serum sitokin düzeyleri

1. ÖZET

Metotreksat ile oluşturulan karaciğer ve böbrek hasarı üzerine süt serum proteinlerinin etkilerinin incelenmesi

Öğrenci Adı: Elif Tufan

Danışman Adı: Prof. Dr. Tuğba Tunalı Akbay

Amaç: Bu çalışmada metotreksat (MTX) ile oluşturulan karaciğer ve böbrek hasarına karşı süt serum proteinlerinin etkileri incelenmiştir.

Gereç ve yöntem: Çalışma 30 adet Sprague-Dawley cinsi sıçandan oluşan 4 grup (kontrol, kontrol+whey protein konsantresi, MTX, metotreksat+whey protein konsantresi) ile gerçekleştirildi. MTX gruplarına 20 mg/kg MTX (tek doz, i.p.) uygulandı. Kontrol ve MTX gruplarına on gün boyunca her gün oral gavaj ile 2 g/kg süt serum proteini konsantresi verildi. 10. günün sonunda kan örnekleri alındıktan sonra karaciğer ve böbrek doku örnekleri alındı. Serum örneklerinde serum protein elektroforezi, üre, kreatinin ve serum sitokin düzeyi ölçümleri yapıldı. Karaciğer ve böbrek dokularında glutatyon, malondialdehit ve nitrik oksit seviyeleri, glutatyon S transferaz ve süperoksit dismutaz aktiviteleri ölçüldü.

Bulgular: Süt serum proteini, MTX'in karaciğer ve böbrekte neden olduğu hasarı önemli ölçüde azaltmıştır. MTX grubunda serum üre düzeyinde azalma ve serum kreatinin düzeyinde artış saptanırken, süt serum proteini bu sonuçları kontrol grubu düzeylerine kadar tersine çevirdi. Süt serum proteinlerinin MTX grubuna uygulanması, karaciğer ve böbreğin histopatolojik hasar skorlarını önemli ölçüde tersine çevirdi.

Sonuç: Süt serum proteini uygulaması, antioksidan özellikleri nedeniyle karaciğer ve böbrek dokularında MTX kaynaklı oksidatif hasarı iyileştirmiştir. Süt serum proteinleri, MTX tedavisinde kullanılması gereken bir yardımcı olarak kabul edilebilir.

Anahtar kelimeler: Süt serum proteini, metotreksat, karaciğer, böbrek, oksidatif stres

2. SUMMARY

Investigation of the effect of milk serum proteins on the methotrexate induced liver and kidney damage

Student Name: Elif Tufan

Name of Supervisor: Prof. Dr. Tuğba Tunalı Akbay

Objective: In this study the effects of whey proteins against MTX-induced liver and kidney damage were investigated.

Material and methods: The study was conducted in four groups of 30 Sprague-Dawley rats (control, control+whey protein concentrate, methotrexate, methotrexate+whey protein concentrate). 20 mg/kg MTX (single dose, i.p.) was administered to the MTX groups. Control and MTX groups were given 2 g/kg whey protein concentrate by oral gavage every day for ten days. At the end of day 10, blood samples were drawn and liver and kidney tissue samples were taken. Serum protein electrophoresis, urea, creatinine and serum cytokine level measurements were carried out in serum samples. Glutathione, malondialdehyde and nitrike oxide levels, glutathione S transferase and superoxide dismutase activities were measured in liver and kidney tissues.

Results: Administration of whey protein concentrate significantly reduced the damage caused by MTX in the liver and kidney. While a decrease in serum urea level and an increase in serum creatinine level were detected in the MTX group, whey protein administration reversed these results up to control group levels.

Conclusion: Whey protein administration ameliorated the MTX induced oxidative damage in the liver and kidney tissues due to its antioxidant properties. Whey proteins can be considered as an adjuvant that should be used in MTX treatment.

Keywords: Milk serum proteins, methotrexate, liver, kidney, oxidative stress

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Sütteki proteinlerin %20 süt serum proteinleridir. Peynir üretimi esnasında Ppyniraltı suyuna geçtikleri için peynir altı suyu da denmektedir (McIntosh ve ark., 1998; Akgül ve Karaman, 2017). Süt serum proteinleri, biyoaktif özellikteki birçok peptit ve proteinleri içermektedir (Korhonen, 2009). Laktoferrin, β-laktoglobulin, α-laktalbümin, immunoglobulinler, proteoz-pepton, serum albümini, ve laktoperoksidaz gibi süt proteinleri bir çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Marshall, 2004). Bu biyoaktif süt serum proteinleri ve peptitler; antibakteriyel, antioksidan, antiviral, antihipertansif (angiotensin-l-dönüştürücü enzim inhibitörü), antikanserojenik, ve hipokolestrolemik ajan olarak iş görme yeteneğine sahiptir (Yüksel ve ark., 2019). Kemik gelişimi ve korunmasını destekleyen süt serum proteinlerine beslenme düzeninde yer verilerek osteoporoz oluşumu ve obezite oluşumunu engellenebilmektedir (Marshall, 2004).

Serum proteinleri, kükürt içeren aminoasitler olan sistein ve metiyonin açısından zengindir. Sistein antioksidan özelliklere bir amino asittir ve glutatyon yapısında yer alır (Dinçoğlu ve Ardıç, 2012; Gür ve ark., 2010). Ayrıca süt serum proteinlerinde, diğer yapısal proteinlere nazaran daha fazla miktarda dallı zincirli amino asit (lösin, isolösin ve valin) bulunur ve bu aminoasitler diğerlerinden daha kolay hidrolize olur, dakikalar içerisinde tokluk plazma seviyeleri artar (Tsutsumi ve Tsutsumi, 2014). Bu amino asitler, glukoz ve protein metabollizmasında, lipit metabolizmasında ve organ gelişiminde yer alan metabolik regülatörlerdir (Gür ve ark., 2010).

Süt serum proteinleri ve bu proteinlerden oluşan peptitler birçok biyokimyasal özelliklerinden dolayı fonksiyonel gıdaların üretiminde de yer alırlar (McIntosh ve ark., 1998). Süt serum proteinleri, gıda sanayisinde bebek maması, dondurma, yoğurt, ekmek, et ve et ürünleri, çeşitli içeceklerin üretiminde; sporcu beslenmesinde kullanılmaktadır (Tsutsumi ve Tsutsumi, 2014; Yüksel ve ark., 2019).

Metotreksat (MTX) bir folat antagonistidir ve romatoid artrit, psoriasis, lösemi ve diğer bazı otoimmün hastalıklarda yaygın olarak kullanılır (Barnhart ve ark., 2001; Uraz ve ark., 2008). MTX, dihidrofolat redüktaza bağlanarak bu enzimi inhibe eder, dihidrofolat'ın tetrahidrofolat 'a dönüşümünü engeller (Armağan, 2015). Tetrahidrofolat sentezi inhibe olunca pürin nükleotidlerinin ve pirimidin timidilatın

biyosentezleri durur (Uygur ve ark., 2019). Biyosentezin durması ile ATP yapımı ve DNA ve RNA'nın sentezi de inhibe olur (Armağan, 2015). MTX, pürin ve pirimidin inhibitörü olduğu için antineoplastik ve immünsupresif olarak da kullanılılır (Quemeneur ve ark., 2003).

MTX, S döneminde yer alan hücrelerde sitotoksik etkiye neden olur (Tsurusawa ve ark.,1990). Ayrıca 5-aminoimidazol, 4-karboksamid ribonükleotid transformilaz gibi enzimleri de inhibe eder, lenfosit proliferasyonu, enflamatuvar sitokinlerin salınımı, serbest radikal oluşumu, polimorfonükleer hücrelerin adezyonunu baskılayarak anti-enflamatuvar özelliklerini gösterir. Keratinosit proliferasyonunu ve dermal enflamatuvar infiltrasyonu baskıladığı için psoriasis tedavisinde kullanılır. Doku hasarı oluşturan spermin ve spermidini de inhibe ederek anti-enflamatuvar etki gösterebilmektedir. (Şentürk, 2016).

Hepatotoksisite, MTX tedavisinde oluşan majör komplikasyonlardandır. Metotreksat, karaciğerde ekstraselüler metaboliti, 7-hidroksimetotreksata dönüşerek hücrelerin içerisinde poliglutamat formunda depolanır. Uzun süreli metotreksat uygulamasının sonunda poliglutamatların birikmesi ve folat seviyelerinde azalma gerçekleşmektedir. Yüksek seviyelerde poliglutamatın varlığı, ilacın hücre içi daha uzun süre kalmasına ve hepatotoksik etkiye neden olmaktadır (Tunalı- Akbay ve ark., 2010).

MTX, metabolik yolaklarda yer alan birçok enzimi inhibe eder. Bu nedenle MTX hücre içi NADPH seviyelerinin azalmasına da neden olur. MTX tedavisi sırasında azalan NADP düzeyleri, bir çok dokuda reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu etkiye sahip glutatyon seviyelerinin düşmesine ve doku hasarına neden olur (Babiak ve ark., 1998; Armağan, 2015)

Metotreksatın, serum kreatinin seviyelerinin artmasına, üremi ve hematüriye neden olabilirken, yüksek dozlarda uygulanmasının akut böbrek yetmezliğine neden olduğu da bildirilmiştir. Bu nedenle nefrotoksisite bu ilacın önemli bir yan etkisidir (Asvadi ve ark., 2011).

Bu bilgiler ışığında tez çalışmamızda antioksidan, antiinflamatuar etkileri olduğu bilinen inek sütü kaynaklı serum proteinleri ve peptitlerinin metotreksat uygulanan hayvanlar üzerindeki etkisinin oksidan-antioksidan sistem ve immün sistem üzerine etkilerini araştırılması amaçlanmıştır. Süt serum proteinlerinin koruyucu etkilerinin mekanizması karaciğer ve böbrek dokusu üzerinde oksidatif stres parametreleri

üzerinden aydınlatılmaya çalışılmıştır. Süt serum proteinlerinin de bu açıdan değerlendirilmesi gereken bir gıda takviyesi olabileceğini düşünülerek bu çalışma planlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Metotreksat

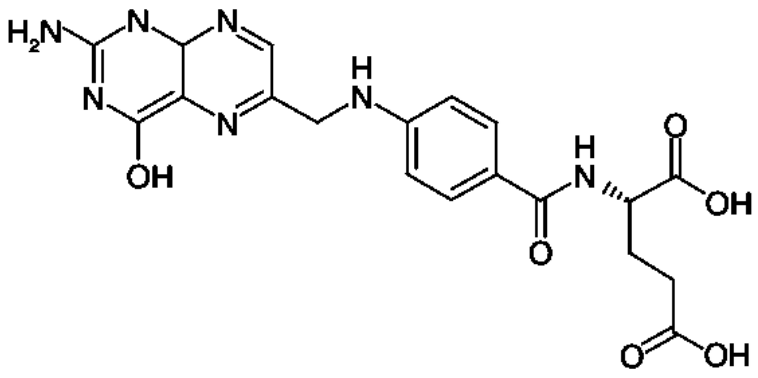
Metotreksat (MTX), bir folik asit antagonisti olup lösemi, romatoid artrit, psoriasis, sarkoidoz gibi çok sayıda hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Saka ve Aouacheri, 2017; Uraz ve ark., 2008).

MTX, dihidrofolat redüktaza (DHFR) yüksek afiniteyle bağlanarak onu inhibe eder ve bu enzimin dihidrofolatı (DHF) tetrahidrofolata (THF) dönüştürmesini engellemektedir (Shinde ve ark., 2014). THF, timidilat ve pürinlerin biyosentezinde yer aldığı için büyük öneme sahiptir (Howard ve ark., 2016). MTX'in sebep olduğu THF eksikliğine bağlı olarak DNA, RNA, ATP, protein sentezi baskılanmakta ve bir çok metabolik yolak bu durumdan etkilenmektedir (Kocaman ve Çolakoğu, 2013).

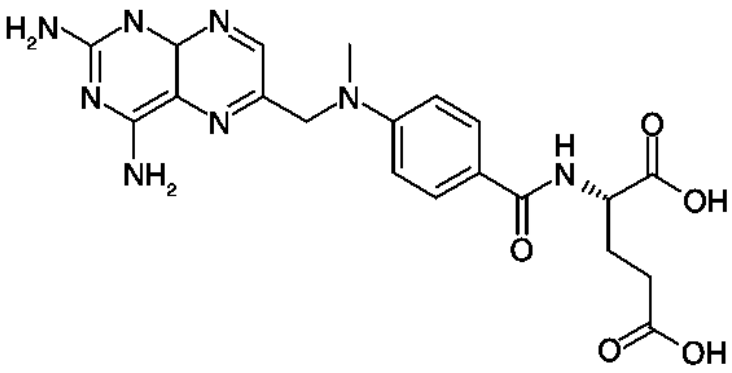
Günümüze kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde pek çok folik asit analoğu kullanılmıştır; bu analoglar içinde MTX birçok kanser türü ve otoimmun hastalığı tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan en etkili ilaçlar arasında yer almaktadır (Koźmiński ve ark., 2020).

4.1.1. Etki mekanizması

MTX (4- amino- N^{10}- metil pteroil glutamik asit), DHFR enzimini inhibe ederek DHF'nin THF'ye dönüşümünü engelleyen sentetik bir folik asit analoğudur (Alfiya ve ark., 2020; Gautam ve ark., 2014).



Şekil 1. Folik asitin kimyasal yapısı (Lima ve ark., 2014)



Şekil 2. MTX'in kimyasal yapısı (Lima ve ark., 2014)

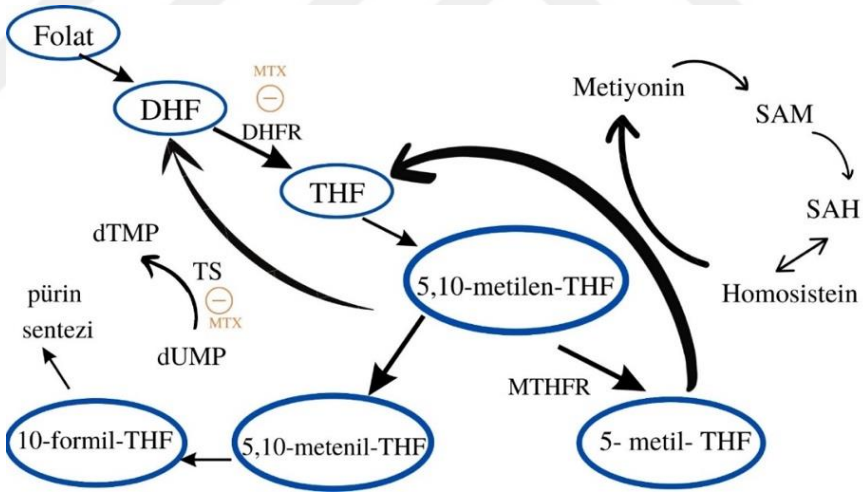
Hücre içerisine indirgenmiş folat taşıyıcıları (RFC) ile alınan MTX, folilpoliglutamat sentetaz (FPGS) tarafından katalize edilen poliglutamasyona uğramaktadır. MTX'e bu yolla glutamat kalıntıları eklenmekte ve metotreksat-poliglutamat (MTX-PGs) formuna dönüşmektedir. Bu kalıntılar hücre membranını kolayca geçemediğinden hücrelerde uzun süre kalabilmektedir (Awad ve ark., 2021).

MTX- PGs; DHFR, timidilat sentaz (TS), aminoimidazol karboksamid ribonükleotit (AICAR) transformilaz, glisinamid ribonükleotit (GAR) transformilaz, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) dahil birçok önemli enzimi yarışmalı olarak inhibe ederek folat metabolizmasını engellemektedir (Fisher ve Cronstein, 2009; Panetta ve ark., 2010). Bu inhibisyon, DNA sentezi için gerekli olan de novo pürin sentezinin ve TS' nin azalması ya da durmasına neden olmaktadır (Panetta ve ark., 2010).

MTX'in birincil hedefi, DHFR enzimidir (Banerjee ve ark., 1995). DHFR, redüktaz enzim ailesinin bir üyesidir ve DHF'nin THF'ye indirgenmesini katalize etmektedir (S. Askari ve Krajinovic, 2010). MTX, DHFR enzimine karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bu enzime bağlanarak onu inhibe etmekte bunun sonucunda DNA ve RNA sentezi için gerekli olan THF'nin eksikliğine yol açmaktadır (Barnhart ve ark., 2001).

THF, DNA zincirlerinin sentez, onarım ve replikasyonu için gerekli olan pürin ve pirimidin nükleotitlerinin sentez yollarındaki çeşitli transmetilasyon reaksiyonlarında önemli bir koenzim olarak görev yapar. Protein, amino asit, DNA, RNA ve fosfolipidlerin sentezindeki sayısız metilasyon reaksiyonlarında proksimal metil

donörü olarak bulunmaktadır (Koźmiński ve ark., 2020). Organizmada, metilen, metil, formil gibi monokarbon ünitelerinin donörleri olan 5,10-metilen-THF, 5-metil-THF, 10-formil-THF gibi çeşitli aktif folat formları bulunmaktadır. THF, serinin glisine dönüştürülmesinde de yer alan serin hidroksimetil transferaz enziminin aracılığıyla 5,10-metilen-THF'ye dönüştürülmektedir. 5,10-metilen-THF, TS'nin aracılık ettiği deoksiüridin monofosfatın (dUMP) deoksitimidin monofosfata (dTMP) metilasyonunda karbon donörüdür. THF sentezinin MTX tarafından inhibisyonu sonucu oluşan THF eksikliği, de novo pirimidin sentezini etkilemektedir. Ayrıca TS, metabolize edilmemiş DHF'nin yanısıra doğrudan MTX tarafından da inhibe edilebilir. 5,10-metilen-THF, metilentetrahidrofolat redüktaz aracılıyla 5-metil-THF'ye dönüşebildiği gibi 5,10-metenil-THF üzerinden 10-formil-THF'ye de dönüşebilir. 10-formil-THF, pürinlerin de novo sentezi için gereklidir (Maksimovic ve ark., 2020). Pürin biyosentezi yüksek DHF konsantrasyonunun yanı sıra MTX-PGS' in GAR transformilaz ve AICAR transformilaz üzerindeki doğrudan etkileri ile inhibe edilmektedir (Neradil ve ark., 2012).



Şekil 3. MTX'in etki mekanizması

DHF: Dihidrofolat, **DHFR:** Dihidrofolat redüktaz**, THF:**Tetrahidrofolat, **dTMP:** Deoksitimidin monofosfat, **dUMP:** Deoksiüridin monofosfat, **SAM:** S-adenozil metiyonin, **SAH:** S-adenozil homosistein, **TS:**Timidilat sentaz, **MTHFR:** Metilentetrahidrofolat redüktaz, **MTX:** Metotreksat

MTX doğrudan ya da DHFR'nin inhibisyonunun bir sonucu olarak de novo purin ve dTMP sentezini inhibe eder (Neradil ve ark., 2012). Bunun sonucunda hücre proliferasyonu için gerekli olan DNA, RNA sentezi baskılanır ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (Kanarek ve ark., 2018; Armağan, 2015). MTX de novo pürin ve

pirimidin sentezini inhibe ettiğinden, klinikte yaygın olarak antineoplastik ilaç olarak kullanılmaktadır (Maksimovic ve ark., 2020).

4.1.1.1. Metotreksatın antiproliferatif etkisi

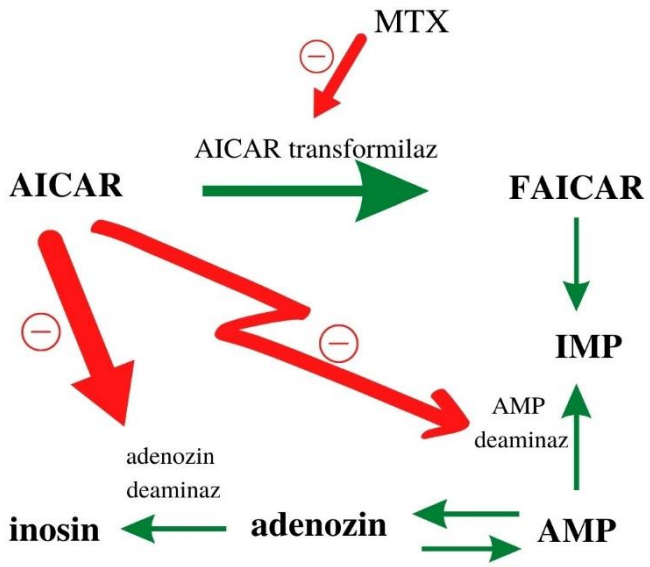
Güçlü antiproliferatif ve antimetabolit etkisi ile MTX, pek çok kanser türünün tedavisinde yüksek dozlarda kullanılır. MTX ve MTX-PGs hücre proliferasyonunda rol oynayan DNA ve RNA prekürsörlerinin sentezini inhibe eder, metabolik dengesizliğe ve hücre apoptozisine neden olmaktadır. MTX en çok aktif bölünen hücreleri etkiler ve aktivite esas olarak hücre döngüsünün S fazında görülür. Hızlı bölünen kanser hücreleri de MTX etkisine en duyarlı olanlardandır. MTX, bu hücrelerde folat metabolizmasını antagonize ederek antitümör etki göstermektedir (Koźmiński ve ark., 2020).

4.1.1.2. Metotreksatın antiinflamatuvar etkisi

MTX, AICAR transformilazı inhibe ederek hücre içi AICAR düzeylerinin yükselmesine yol açar. AICAR, bir adenosin monofosfat (AMP) deaminaz inhibitörüdür. Böylece bu inhibisyon sonucunda, hücre içi AMP ve adenozin seviyesi artar. MTX'in antiinflamatuar etkilerinden yüksek AMP ve adenozin seviyeleri sorumludur (Bălănescu ve ark., 2019). Adenozin ve AMP konsantrasyonları hücre içinde yükseldikçe, hücre dışı ortamda görünmeleri de daha olasıdır. Hücre dışında AMP, çoğunlukla A2α reseptörlerine bağlanan adenozine dönüştürülür. A2 reseptörüne bağlandıktan sonra hücre içi sinyal iletiminde ikinci haberci olan siklik adenozin monofosfat konsantrasyonu artmaktadır (Swierkot ve Szechiński, 2006).

Sonuç olarak aktive edilmiş nötrofil ve makrofajlardaki adenozin, endotelyum ve fagositoz üzerindeki adezyon yeteneklerini ve süperoksit anyonları ile diğer reaktif oksijen türlerinin oluşumunu baskılamaktadır. Tümör nekroz faktörü α (TNF-α), interferon (IFN)- γ, interlökin (IL)-12, IL-6 üretimi azalmakta ve antiinflamatuar sitokinlerden IL-4 ve IL-10 ise artmaktadır. (Koźmiński ve ark., 2020; Swierkot ve Szechiński, 2006). Bunlarla beraber adenozin, IL-6 ve IL-8 üretimini azaltarak ve lökositlerin adezyonunu engelleyerek endotel hücrelerde sitokin aracılı inflamasyonu bozmaktadır (Koźmiński ve ark., 2020). Böylece, adenozin aracılı etkilerin, MTX'in

antiinflamatuar etkisinin oluşmasında merkezi bir rolü olduğu görülmektedir. (Swierkot ve Szechiński, 2006).



Şekil 4. Metotreksat' in adenozin yolundaki etki mekanizması (Maksimovic ve ark., 2020' den değiştirilerek kullanılmıştır)

AICAR: 5-Aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotit, **FAICAR:** 5-Formamidoimidazol-4 karboksamid ribotit, **MTX:** metotreksat, **IMP:** inozin monofosfat, **AMP:** adenozin monofosfat

4.1.2. Metotreksatın farmokokinetik özellikleri

MTX; oral, intravenöz, intramüsküler, subkutan olarak uygulanabilir (Kavala ve ark., 2014). Proksimal jejenumda hızla emilen MTX'in oral biyoyararlanımı bireylerarası değişkenlik göstermekle birlikte ortalama olarak %70' dir (Lucas ve ark., 2019). Çalışmalar artan MTX dozlarında (15 mg/hafta üzerindeki) RFC1 doygunluğuna bağlı olarak absorbsiyonun azaldığını göstermiştir. Oral uygulamadan 45 dakika- 2 saat sonra ilaç maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır (Maksimovic ve ark., 2020). Dolaşımdaki MTX'in yaklaşık olarak %50'si plazma proteinlerine bağlanır (Bedoui ve ark., 2019). Serum yarılanma ömrü 6 ila 10 saat arasında değişmektedir (Lucas ve ark., 2019). En yüksek konsantrasyonlara ulaştığı dokular karaciğer, böbrek, safra kesesi, deri, dalaktır (Swierkot ve Szechiñski, 2006). Karaciğerde ana metaboliti olan 7-hidroksi-MTX'e dönüştürülmektedir (Bedoui ve ark., 2019). Hücre içi MTX ile 7-

hidroksi- MTX'in bir bölümüne poliglutamat eklenerek karaciğer ve eritrositlerde uzun süre depolanır (Swierkot ve Szechiñski, 2006).

MTX'in birincil atılım yeri böbreklerdir ve burada ilacın yaklaşık % 65-80' i atılmaktadır (Swierkot ve Szechiñski, 2006). MTX, glomerüller tarafından süzülüp tübüler sekresyon ve geri emilime uğrar. Böbrekler dışında küçük bir kısmı safrayla atılır. Böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda ilacın eliminasyonu azalacağı için bu hastalar dikkatle izlenmeli, gerekli durumlarda doz azaltılmalı ya da MTX tedavisi kesilmelidir (Bedoui ve ark., 2019).

4.1.3. Metotreksatın endikasyonları

MTX, birçok solid tümör, hematolojik malignite ve otoimmün hastalığı tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan etkili terapötik ajanlar arasında yer alır (Abolmaali ve ark., 2013). MTX; akut lenfoblastik lösemi, meme kanseri, osteosarkom, koryokarsinom, akciğer kanseri, mesane karsinomu, meningeal lösemi, medulloblastom, non-Hodgkin lenfoma, akut miyeloid lösemi gibi birçok neoplazmın tedavisinde kritik rol oynar (Abolmaali ve ark., 2013; Koźmiński ve ark., 2020). Kemoterapötik ajan olarak kullanımının dışında psoriasis, romatoid artrit, multipl skleroz, Crohn hastalığı, jüvenil idiopatik artrit, sarkoidoz, myastenia gravis gibi birçok hastalık için endikedir (Abolmaali ve ark., 2013; Koźmiński ve ark., 2020). Ayrıca ektopik gebelik tedavisinde tek ya da multipl doz şeklinde de kullanılmaktadır (Uğurlucan ve ark., 2013).

4.1.4. Metotreksatın toksisitesi

MTX, inflamatuar ve otoimmun pek çok hastalığın tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmasına rağmen bazı dokular üzerinde toksisiteye neden olabilir (Bedoui ve ark., 2019). Klinikte MTX tedavisinin kesilme sebebi genellikle etkinliğinin eksikliğinden değil toksisitesinden kaynaklanmaktadır (Bedoui ve ark., 2019). Spesifik olarak hücre siklusunun S fazında DNA, RNA sentezi sırasında etki eden MTX, kemik iliği ve bağırsak mukozasındaki hücreler gibi hızlı bölünen hücreler üzerinde daha büyük bir toksik etkiye yol açar (Cipriani ve ark., 2014; Şener ve ark., 2006). MTX kullanımına bağlı olarak hepatotoksisite, nefrotoksisite, mukozit, myelosupresyon, nörotoksisite, pulmoner toksisite gelişebilmektedir (Ahmadzadeh ve

ark., 2019; Alfiya ve ark., 2020). Tedavi süresi, ilaç dozu, hastalık tipi, hasta bireylerin risk faktörü MTX kullanımına bağlı toksisiteyi etkilemektedir (Şener ve ark., 2006). MTX klirensini azaltan ve/veya MTX'i serum proteinlerinden ayıran birçok ilaç, MTX'in metabolizmasını etkileyip toksik dozlara ulaşmasına yol açar (Gaies, 2012). Salisilat, sülfonamid, fenitoin, probenesid, nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar bunlardan bazılarıdır (Awad ve ark., 2021). Çalışmalar lökovorinin, hücrelerde metotreksatın neden olduğu yan etkileri (özellikle gastrointestinal, hematolojik toksisiteyi) azaltabileceğini göstermiştir (Awad ve ark., 2021; Bedoui ve ark., 2019).

Gastrointestinal Toksisite: Gastrointestinal toksisite, MTX'in hem düşük hem de yüksek doz uygulamasında görülebilir (Awad ve ark., 2021). Genellikle hastalarda bulantı, kusma, karın ağrısı ve diyare görülmektedir (Awad ve ark., 2021). Ayrıca şişkinlik, malabsorpsiyon, kilo kaybı,ülserasyon ve stomatit de görülebilir (Zhou ve ark., 2018; Boussios ve ark., 2012). İntestinal toksisite, MTX tedavisinde doz sınırlayıcı bir faktördür (Zhou ve ark., 2018).

Hematolojik Toksisite: MTX kullanımına bağlı gelişen ciddi komplikasyonlardan biri olan hematolojik toksisitede, trombositopeni ve ardından hızla ilerleyen lökonötropeni meydana gelir. Düşük doz MTX tedavisinde megaloblastik anemi, trombositopeni, lökopeni ve pansitopeni gibi hematolojik toksisiteler nadir görülür (Gaies ve ark., 2012).

Nörotoksisite: MTX'in başlıca intratekal veya intravenöz uygulanmasının ardından akut, subakut ve kronik nörotoksisite gelişebilmektedir (Kıroğlu ve ark., 2008; Gaies ve ark., 2012). Bulantı, kusma, baş ağrısı ve menenjit en sık görülen akut belirtiler olup geçicidirler.

Pulmoner Toksisite: MTX'e bağlı pulmoner yan etkiler hem düşük hem de yüksek doz kullanımda meydana gelebilir (Akdemir ve ark., 2016). Komplikasyonlar çoğunlukla akut veya subakut başlangıçlıdır ve en yaygın semptom olan kuru öksürüğün yanında dispne, halsizlik, ateş hastalarda görülebilir (Ohbayashi ve ark., 2010; Awad ve ark., 2021). MTX kullanımına bağlı olarak akut interstisyel pnömoni, pulmoner fibrozis, nonkardiyojenik pulmoner ödem, plevral efüzyon gelişebilir (Iikuni ve ark., 2004). Pulmoner toksisiteden şüphelenilirse MTX uygulaması hemen durdurulmalıdır (Akdemir ve ark., 2016).

Kutanöz Toksisite: Özellikle yüksek doz MTX uygulandığında çeşitli kutanöz yan etkiler meydana gelebilmektedir. Oral mukoza ülserasyonları, fotosensitivite, ciltte yanma hissi, ürtiker, akral eritem, eritema multiforme ve vaskülit MTX'e karşı en sık görülen mukokutanöz reaksiyonlardır (Gaies ve ark., 2012).

Üreme Sistemi Üzerine Yan Etkiler: MTX kullanımına bağlı olarak erkek hastalarda oligospermi görülebilir. Teratojenik etkisi nedeniyle gebelik öncesinde veya sırasında kullanılmaması önerilmemektedir (Bedoui ve ark., 2019).

Tablo 1. MTX kullanımına bağlı toksisiteler (Bedoui ve ark., 2019)

Sistem	**MTX İlişkili Yan Etkiler**
Hepatik	Yüksek karaciğer enzimleri Steatoz, fibroz, siroz
Renal	Glomerüler filtrasyon hızında azalma Böbrek yetmezliği
Gastrointestinal	Kusma, ishal, mide bulantısı Stomatit, mukozit
Hematolojik	Lökopeni Anemi Trombositopeni Pansitopeni
Pulmoner	Pnömoni Pulmoner Fibroz
Dermatolojik	Alopesi
Ürogenital	Teratojenite, oligospermi

4.1.4.1. MTX'in hepatotoksik etkisi

MTX'in karaciğer üzerinde asemptomatik transaminaz yüksekliğinden fibrozis ve ölümcül hepatik nekroza kadar (steatoz, kolestaz, siroz da dahil) çeşitli toksik etkilerinin olabileceği bilinmektedir (Conway ve Carey, 2017; Çetinkaya ve ark., 2006). MTX'e maruz kalma süresi ve ilacın kümülatif dozu, yaş, nonalkolik steatohepatit, diyabet, obezite öyküsü, alkol tüketimi, hepatit B, hepatit C,

hepatotoksik ilaçlar gibi pek çok risk faktörü MTX'in hepatotoksik etkisini arttırabilir (Sotoudehmanesh ve ark., 2010).

MTX'e bağlı hepatotoksisitenin mekanizması tam olarak açıklanamasa da çeşitli çalışmalar bu toksik etkinin oksidatif stres kaynaklı olabileceğini göstermiştir (Samdanci ve ark., 2019; Roghani ve ark., 2020).

MTX, sitozolik nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) bağımlı dehidrogenazlar ve NADP malik enzimini inhibe eder ve bu enzimlerin inhibisyonu sonucu hücrelerdeki NADPH miktarı azalır. NADPH normal şartlarda, hücrelerdeki indirgenmiş glutatyon seviyesini koruyan glutatyon redüktaz tarafından kullanılır. MTX uygulamasına bağlı olarak azalan NADPH, ROS' a karşı koruyucu etki sağlayan glutatyonun seviyelerinin düşmesine neden olur. Bunan sonucu olarak da antioksidan savunma sisteminin etkinliğinin azalması sonucunda ROS aracılı hasara karşı hücrelerin hassasiyeti artar (Akbay ve ark., 2010).

Lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen radikalleri aracılığıyla hücre zarında hasara neden olan bir kimyasal reaksiyondur. Çalışmalar MTX toksisitesinin lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehiti (MDA) arttırdığını göstermektedir (Kumari, 2016).

MTX tarafından nükleik asitlerin, bazı amino asit ve proteinlerin sentezinin engellenmesi; karaciğer parankimal hücrelerinin plazma membranlarının ve organellerinin hasar görmesine, işlevlerinin bozulmasına yol açabilir (Kumari, 2016).

Hepatositlere indirgenmiş folat taşıyıcı 1 ile giren MTX, FPGS tarafından MTX poliglutamatlara (MTX-PGs) dönüştürülür. İlaca uzun süreli maruziyet sonucunda MTX-PGs hepatositlerde birikir, folik asit seviyeleri düşer, karaciğer nekrozu oluşur (Kocasari ve ark., 2021). Hedef hücrelerde uzun süre kalabilen MTX-PGs; fibroz, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozu tetiklemektedir (Ezhilarasan, 2021).

4.1.4.2. MTX'in nefrotoksik etkisi

Çalışmalar MTX ve metabolitlerinin renal tübüllerde çökelmesi sonucu tübüler hasarın oluşacağını ve böbrek fonksiyonlarının bozulabileceğini göstermiştir. MTX kaynaklı nefrotoksisite asidik idrarla artar. Bunun sebebi MTX'in düşük pH'da az

çözünmesidir, MTX kristalleşir ve idrar akışının tıkanmasına yol açar (Feinsilber ve ark. 2018).

MTX uygulaması serum kreatinin seviyelerinde yükselmeye, hematüri ve üremi gelişimine yol açabilir. Aynı zamanda yüksek dozlarda da akut böbrek yetmezliğine neden olabileceği çalışmalarda gösterilmiştir (Jahovic ve ark., 2003).

MTX dozu, ileri yaş, erkek cinsiyeti, düşük başlangıçlı böbrek fonksiyonu, bazı antibiyotiklerin kullanımı MTX aracılı nefrotoksisite riskini arttırabilir (Kitamura ve ark., 2018). MTX'in büyük çoğunluğu renal olarak atıldığı için, nefrotoksisitenin başlaması sonucu MTX klirensi azalır ve bu durum diğer sistemik toksisite riskini arttırır (May ve ark., 2014).

4.2. Süt Serum (Whey) Proteinleri

Süt, içerdiği değerli bileşenler sayesinde dengeli beslenmenin önemli bir parçasıdır (Davoodi ve ark., 2016).

Yaşam kalitesini arttırma potansiyeli olan süt proteinleri, kazein ve süt serum proteinleri olmak üzere iki ana gruba ayrılır. İnek sütündeki total proteinin yaklaşık % 80'ini kazeinler oluştururken kalan % 20'sini ise süt serum proteinleri oluşturmaktadır (Davoodi ve ark., 2016).

Süt serumu, sütün sarı- yeşil renkli sıvı kısmıdır; peynir serumu ya da peynir altı suyu olarak da adlandırılabilir. Süt serumu, sütün asitler ya da proteolitik enzimler kullanılarak pıhtılaşması sırasında pıhtının ayrılmasından sonra elde edilmektedir (Minj ve Anand, 2020).

Süt serumu yaklaşık olarak % 94 su, % 4,3 laktoz (kuru maddenin ana bileşeni), % 0,8 protein, % 0,5 mineraller ve % 0,1 yağ içermektedir (Minj ve Anand, 2020).

Peynir üretiminin bir yan ürünü olan süt serumu, önceleri atık ürün olarak kabul edilirken günümüzde ise bağışıklık modülasyonu, antimikrobiyal aktivite, gelişmiş kas gücü ve vücut kompozisyonu sağlanmasında, bazı hastalıkların oluşum riskinin azaltılmasında fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak kabul edilmektedir (Marshall, 2004; Gür ve ark., 2010). Bütün bu etkilerinden dolayı terapötik uygulamalar ve sporcu içecekleri yapımı da dahil pek çok alanda kullanılmaktadır (Khan ve Selamoglu, 2019).

Ultrafiltrasyon, ters osmoz, mikrofiltrasyon ve iyon değişimi de dahil olmak üzere süt serumunun işlenmesindeki teknolojik gelişmelerle birlikte süt serumu protein konsantreleri (%25-89 protein), süt serum protein izolatı (%90-95 protein), laktozu azaltılmış süt serumu, demineralize süt serumu, hidrolize süt serumu gibi farklı işlenmiş süt serumu ürünleri elde edilmektedir (Marshall, 2004).

4.2.1. Protein içeriği

Süt serum proteinleri; diğer protein kaynaklarına kıyasla esansiyal aminoasitlere ve dallı zincirli aminoasitlere (BCAA) daha yüksek konsantrasyonlarda sahip olup biyoaktif peptitler açısından zengindir (Marshall, 2004; Minj ve Anand 2020). BCAA'lar (lösin, izolösin, valin), özellikle de lösin doku büyümesi ve onarımında etkili bir rol oynar (Marshall, 2004). Lösin, protein metabolizmasında (protein sentezinin translasyon-başlama yolu sırasında) kritik öneme sahip bir amino asittir (Marshall, 2004).

Süt serum proteinleri; soya, buğday, mısır gibi diğer protein kaynaklarına göre daha hızlı emilir ve daha fazla vücutta kullanılır (Khan ve Selamoglu, 2019).

Ayrıca süt serumu, kükürt içeren amino asitler açısından da zengindir (Minj ve Anand, 2020).

Süt serum proteinleri bileşenleri içerisinde β-laktoglobulin, α- laktalbumin, sığır serum albumini, laktoferrin, immünoglobulinler, laktoperoksidaz, glikomakropeptid bulunur (Marshall, 2004).

Tablo 2. Süt serum protein bileşenleri (Marshall, 2004; Khan ve Selamoglu, 2019)

Süt Serumunun Protein Bileşeni	**%**	**Biyolojik Aktivite**
β – laktoglobulin	50-55	Esansiyel aminoasitler ve BCAA'ların kaynağı
α – laktalbümin	20-25	Laktozun biyosentezinde etki
Glikomakropeptid (GMP)	10-15	Fenilalaninden yoksun (fenilketonürili hastaların beslenmesinde kullanım)
Immunoglobulin	10-15	Bağışıklık modüle edici
Serum Albümin	5-10	Vücutta yağ bağlayıcı özellikler
Laktoferrin	1-2	Antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiviral
Laktoperoksidaz	0,5	Bakterilerin büyümesinin baskılanması

4.2.1.1. β-laktoglobulin

Süt serumu total protein içeriğinin yaklaşık yarısını oluşturan β- laktoglobulin, esansiyel aminoasitlerce zengin olup BCAA'ların kaynağıdır (Gupta ve Prakash, 2017).

4.2.1.2. α-laktalbumin

Meme bezinde sentezlenen α- laktalbumin, süt serumu proteinlerinde nicel olarak ikinci sırada yer alır ve toplam süt serum proteinlerinin % 20- 25'ini oluşturur. Yapılan araştırmalarda süt serumu proteinlerinin kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca gastrik mukozada koruyucu ve üst solunum sisteminde bakterisidal etkileri bulunduğu gösterilmiştir (Gupta ve Prakash, 2017).

Anne sütüne benzer yapıda protein profiline sahiptir. Bu sebeple bebek maması üretiminde kullanılır (Marshall, 2004).

4.2.1.3. İmmünoglobulinler

Süt serumunda bulunan immünoglobulinler bebekler için pasif bağışıklığı sağlayarak bebekleri hastalıklara karşı korur; yetişkinlerde de bağışıklık sistemini güçlendirici etkiye sahiptirler (Yerlikaya ve ark., 2010).

4.2.1.4. Serum albumin

Albumin, meme bezinde üretilmez ancak kan dolaşımından süte salgılanmaktadır. Yağ asitleri taşıyıcısı olup serbest yağ asitlerine, diğer lipitlere, tatlandırıcılara bağlanabilir (Gupta ve Prakash, 2017).

4.2.1.5. Laktoferrin

Laktoferrin, antioksidan özelliklere sahip olan demir bağlayıcı bir glikoproteindir. Demir iyonları için iki bağlanma noktası bulunan tek polipeptit zincirden oluşan laktoferrin, anne sütündeki süt serum proteininin baskın bir bileşenidir (Marshall, 2004). Antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuar, antimikrobiyal, immunomodülatör, antifungal özelliklere sahiptir ve önemli bir konak savunma molekülüdür (Marshall, 2004; Gupta ve Prakash, 2017).

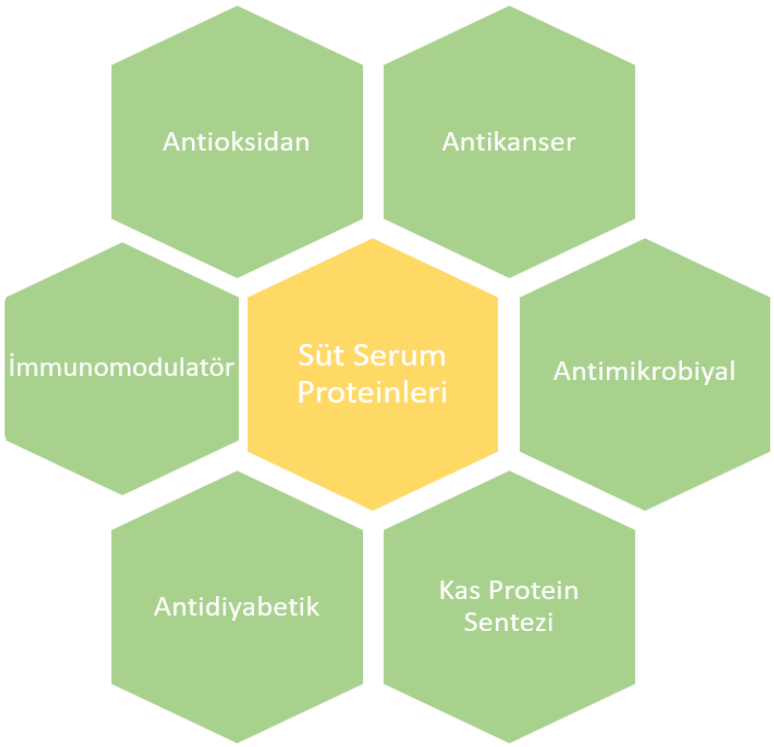
4.2.1.6. Laktoperoksidaz

Süt serum proteinlerinin % 0,25-0,5'ini oluşturan laktoperoksidaz enzimi, çeşitli bakteri türlerini inhibe eden/öldüren ürünler üreten tiyosiyanat ile bazı halojenürlerin peroksidasyonunu katalize eder (Marshall, 2004). Mikroorganizmaların istilasına karşı doğal bir koruma sistemine sahip bu enzim antiviral etkisinin dışında hücreleri hasarlara ve peroksidatif etkilere karşı da korur. Ayrıca yenidoğan bebeklerin sindirim sistemindeki patojenlere karşı savunma sistemi sağlar (Gupta ve Prakash, 2017).

4.2.1.7. Glikomakropeptid

Glikomakropeptid (GMP), peynir üretimi sırasında kimozinin kazein üzerindeki etkisi sonucu süt serumunda % 10-15 oranında bulunan, işleme sırasında sadece kimozin kullanıldığında mevcut olan bir proteindir. Süt serumu aromatik aminoasitlerce (fenilalanin, tirozin, triptofan) fakirdir. Fenilalanin içermediği için fenilketonürili hastaların beslenmesinde güvenli bir şekilde kullanılabilmektedir (Marshall, 2004).

4.2.2. Süt serumu proteinlerinin etkileri



Şekil 5. Süt serum proteinlerinin etkileri (Minj ve Anand, 2020)

4.2.2.1. Antioksidan etkileri

Süt serumu, güçlü bir hücre içi antioksidan olan glutatyonun (GSH) sentezi için büyük bir önem taşıyan sistein amino asidi açısından zengin olduğundan güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir. GSH; glutamat, glisin ve sisteinden oluşan tripeptit yapıda bir antioksidan olup, etkili hali indirgenmiş formudur (Marshall, 2004). Süt serum proteinlerinden biyoaktif peptitlerin salınmasıyla hücre içi GSH seviyesi yükselir ve böylece süt serumu, stres faktörlerinin olumsuz etkilerini baskılayıp antioksidan aktivite gösterir (Minj ve Anand, 2020).

4.2.2.2. Antimikrobiyal etkileri

Süt serumu; laktoferrin, immünoglobulinler, laktoperoksidaz, glikomakropeptid gibi önemli antimikrobiyal ve antiviral özelliklere sahip protein ve enzimler içerir. Bu

bileşenler mide ve ince bağırsaktan parçalanmadan geçip kalın bağırsakta biyolojik etkilerini gösterirler (Gupta ve Prakash, 2017).

IgA, IgM, IgG bağırsakta antimikrobiyal etki gösterirler. *Clostridium difficile* tarafından üretilen toksine bağlanan IgG dehidratasyonu, diyareyi ve kas ağrılarını azaltır (Gupta ve Prakash, 2017).

Laktoferrin, süt serumunda bulunan ve antibakteriyal özelliklere sahip demir bağlayıcı bir proteindir. Patojenlerin büyüme ve metabolizma için yüksek demir gereksinimi bulunmaktadır. Bakterilerden demiri ayıran laktoferrin bu özelliğiyle antimikrobiyal etkiye sahiptir Ayrıca hepatit B ve C virüslerine karşı antiviral özellik de gösterir (Gupta ve Prakash, 2017).

Laktoferrin ve laktoferrisin; mantar, gram pozitif ve gram negatif bakteriler, maya gibi çeşitli mikroorganizmalara karşı inhibitör aktivite göstermesinin yanı sıra gıda kaynaklı patojenlerin (*E. coli* ve *Listeria monocytogenes* gibi) büyümesini de engellerler (Gupta ve Prakash, 2017).

Çalışmalar, β- laktoglobulinin insan bağışıklık yetmezliği virüsünün (HIV) yayılmasını ve genital herpes virüs enfeksiyonunun bulaşmasını önlemede önemini ortaya koymuştur (Gupta ve Prakash, 2017).

4.2.2.3. Antikanser etkileri

Kanserin önlenmesi ve tedavisinde süt serum proteinlerinin etkisi ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır ve glutatyonun bağışık düzenleyici ana mekanizma olduğu düşünülmektedir (Marshall, 2004). Glutatyon; detoksifikasyon bileşiklerini katalize eden, kanserojen ve mutajenleri bağlayan ve böylelikle vücuttan atılmalarını kolaylaştıran bazı enzimler için substrat görevi görür (Gupta ve Prakash, 2017).

Kolon kanserinin önlenmesinde laktoferrinin demir bağlama yeteneğinin faydalı olabileceği gösterilmiştir. Laktoferrin bu faydayı tümör hücrelerinde apoptozu indükleyerek sağlar (Gupta ve Prakash, 2017).

Çakır ve Tunalı Akbay'ın yaptığı çalışmada pepsin, tripsin ve papain enzimleriyle işlenmiş süt serum protein fraksiyonlarının HCT 116 hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelenmiş; HCT 11 hücre canlılığı yüzdesinin önemli ölçüde azaldığı ve en yüksek

hücre ölüm oranının 10 µg/mL süt serum proteini fraksiyonu ile elde edildiği gözlenmiştir (Cakir ve Tunali-Akbay, 2021).

Sahna ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada keçi sütü proteinleri ve biyoaktif peptidlerinin MCF-7 meme kaneri hücre hattındaki etkileri incelenmiş ve çalışmanın sonuçları keçi sütünün whey fraksiyonunun meme kanseri hücrelerinin hayatta kalmasını engelleyebileceği gösterilmiştir (Sahna ve ark., 2022).

4.2.2.4. Kas üzerine etkileri

Süt serum proteinleri, yeni proteinlerin sentezlenmesi için etkili substratlar olan BCAA'ları %26 ya varan yüksek oranlarda içermesi ve yüksek protein kalitesi sayesinde sporcu gıdaları pazarında büyük bir öneme sahiptir (Marshall, 2004). BCAA'lardan lösin protein sentezinin başlatılmasında yer alan bir sinyal molekülüdür; bundan dolayı kas gücünü ve hipertrofisini arttırma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir (Marshall, 2004).

Amino asit profili sayesinde süt serumu, protein sentezini ve kas büyümesini destekler; vücut kompozisyonu için idealdir. Ayrıca birçok biyoaktif bileşen içerir. Glutamin, IgA, laktoferrin gibi süt serum bileşenleri sporculardaki gastrointestinal rahatsızlıklar, tekrarlayan enfeksiyonlar gibi şikayetleri olumlu bir şekilde etkileyebilir; bağışıklık fonksiyonunu geliştirebilir (Marshall, 2004).

4.2.2.5. Immünomodülatör etkileri

Süt serumunda bulunan laktoferrin, IgG'ler, laktoperoksidaz konak bağışıklığına katılır. IgG'ler kalın bağırsaktaki bakteri yükünü, bakteriyel toksinlere bağlanarak azaltır. Laktoferrin ve laktoperoksidaz da patojenik mikroorganizmalar üzerinde antibakteriyel etkiye sahiptir ve konak bağışıklığında oldukça önemlidir. Bağışıklık sisteminin uyarılmasıyla, laktoferrin makrofaj aktivitesini arttırır, TNF- α, IL-8 ve nitrik oksit gibi inflamatuar sitokinleri indüklenir. Lenfositlerin proliferasyonunu uyarır; nötrofilleri, monositleri, doğal öldürücü hücreleri aktive eder (Gupta ve Prakash, 2017).

Hücre içi glutatyon üretimi için gerekli bir amino asit olan sistein süt serum proteinlerinde yüksek miktarda bulunarak bağışıklığın korunmasına yardımcı olur (Khan ve Selamoglu, 2019).

4.2.2.6. Gastrointestinal sistem üzerine etkileri

Süt serumunda bulunan GMP ve laktoferrin; gastrointestinal sağlık için önemlidir. Her ikisi de prebiyotik etki gösterir. GMP, bifidobakterilerin; laktoferrin de laktobasillerin ve bifidobakterilerin büyümesini destekler (Gupta ve Prakash, 2017).

4.2.2.7. Antihipertansif etkileri

Süt serum proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptitler, anjiyotensin dönüştürücü enzim'i inhibe edebilir ve antihipertansif aktivite gösterebilir (Minj ve Anand, 2020).

4.2.2.8. Ağırlık yönetimi üzerine etkileri

Süt serum proteinlerinin tokluğu arttırma, yağsız vücut kütlesini koruma ve glukoz homeostazı üzerindeki olumlu etkileri sayesinde kilo kaybına yardımcı olarak ağırlık yönetiminde önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır (Khan ve Selamoglu, 2019).

4.2.2.9. Karaciğer ve böbrek üzerine etkileri

Süt serumu proteinlerinin karaciğer ve böbrek üzerine etkileri ile ilgili çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Vaconcelos ve ark. (2021) süt serumu proteinlerinin karaciğer fonksiyonu üzerinde bazı olumsuz etkilere neden olabileceğini bildirmiştir (Vasconcelos ve ark. 2021). Bu süt serumu proteini takviyesinin potansiyel olumsuz etkileri hakkında bir uyarı sağlayan ilk sistematik derlemedir, ancak yazarlar tarafından öne sürülen sonuçlar doğrulanmamıştır.

Süt serum protein izolatlarının, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesini baskılayarak ve portal fibrozda azalma gibi histopatolojik değişikliklere yol açarak hepatoprotektif rolünün olabileceğine dair sonuçlar çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur (Radic ve ark., 2019).

Kume ve ark. (2006) D-galaktozamin kaynaklı hepatit ve karaciğer fibrozu üzerinde süt serum proteinlerinin etkisini inceledikleri çalışmalarında süt serum proteini içeren

diyetle beslenen sıçanlarda ALT, AST, laktat dehidrogenaz, bilirubin gibi hepatit belirteçleri ile fibroz belirteci olan hyaluronik asitteki artışın baskılandığını belirtmiştir. Ayrıca safra kanalı proliferasyonu, portal fibroz ve perivenüler sklerozun histopatolojik belirtilerinin de baskılandığını tespit etmişlerdir (Kume ve ark., 2006).

Goncalves Reis (2021) ise derlemesinde süt serumu proteini takviyesinin insan sağlığı üzerindeki olumlu veya zararlı etkileri hakkında kesin iddialarda bulunulmadan önce daha fazla veriye ihtiyaç olduğu belirtilmiştir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

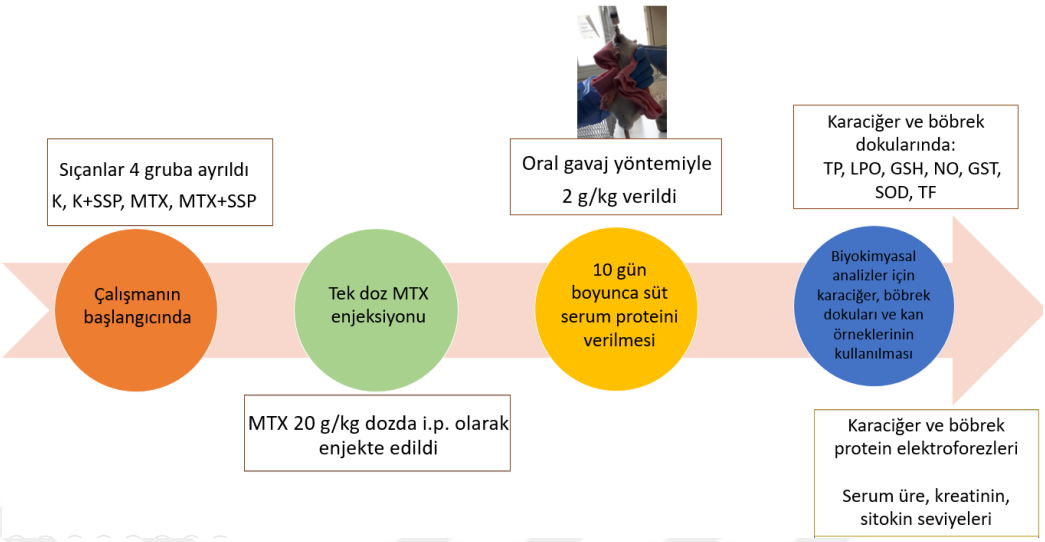
Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıktadır ve Sigma- Aldrich firmasından temin edilmiştir.

5.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Tablo 3. Kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz	**Marka**
Spektrofotometre	Rayleigh UV- 1800
Mikro santrifüj	Heraeus- Biofuge
Soğutmalı santrifüj	Hettich Mikro 220 R Mikro Santrifüj
Vortex	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Buzdolabı	Arçelik
pH metre	Mettler Toledo
Su banyosu (100 ˚C)	Nüve BT 400
Otomatik pipet	Rainin
Etüv	Nüve EN 400
Liyofilizatör	Virtis Benchtop 3L Tabletop Freeze Dryer
Distile su cihazı	Elga Purelab Option Q
Manyetik karıştırıcı	Janke & Kunkel IKA Labortecknik
Elektronik hassas terazi	OHAUS
Doku homojenizatörü	IKA Ultra-Turrax T25 Basic; Labortechnik, Staufen, Germany
Mikroskop	Olympus BX51, Tokyo, Japan
Elektoforez cihazı	Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell

5.3. Çalışmada İzlenilen Yöntemin Aşamaları



Şekil 6. Tez çalışmasında izlenilen yöntem

5.4. Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 10.05.2021 tarihinde ve 55.2021mar protokol nolu izni ile yapılmıştır.

Çalışmada Sprague Dawley cinsi 250-300 g ağırlığında, 30 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen sıçanlar deney öncesinde 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüde, 22 ± 2 ℃ 'lik sabit oda sıcaklığında konvansiyonel kafeslerde tutularak deney koşullarına alışmaları sağlanmıştır.

5.5. Deney Hayvanlarının Beslenmesi

Çalışmadaki sıçanlar deney süresince kafeslerinde tutuldu. Beslenme ve su ihtiyaçları laboratuvar koşullarında günlük olarak karşılandı. Beslenmeleri için standart pellet sıçan yemi, su ihtiyaçları için de içme suyu kullanıldı.

5.6. Süt Serum Proteininin Hazırlanması

Süt serum proteini (Tazelen whey protein içeceği, Kaan Gıda Sanayi, İstanbul, Türkiye), -50° C' de VIRTIS Freeze Drier (SP Industries Inc, USA) kullanılarak liyofilize edildi. Liyofilizayon sonrası kuru haldeki süt serum proteini musluk suyu ile çözülerek ilgili deney gruplarına oral gavajla (2 g/kg) verildi. Doz ayarlaması Nair ve

Jacob' ın hayvanlar ve insanlar arasında doz dönüşümü ile ilgili makaleleri göz önüne alınarak yapılmıştır (Nair ve Jacob, 2016).

5.7. Deney Gruplarının Oluşturulması, Doku Örneklerinin Alınması, İncelenen Parametreler

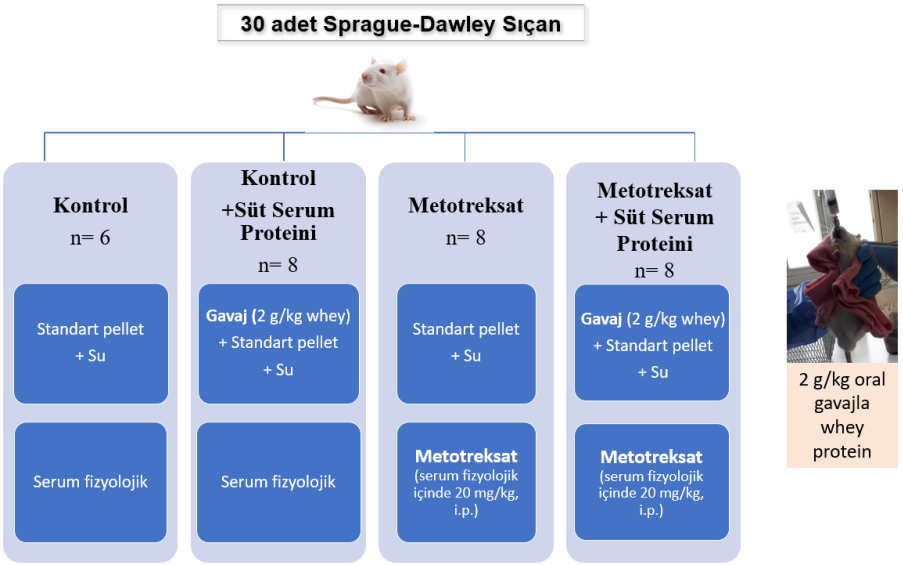
Çalışmamızda sıçanlar dört gruba ayrıldı.

Kontrol grubu (n=6): Tek doz intraperitoneal serum fizyolojik uygulamasını takiben 10 gün boyunca standart yemle beslendiler. 0,5 mL musluk suyu oral gavaj yöntemi ile verildi.

Kontrol+ süt serum proteini grubu (n=8): Tek doz intraperitoneal serum fizyolojik uygulamasını takiben, süt serum proteini oral gavaj yöntemi (2 g/kg, 0,5 mL) ile 10 gün boyunca verildi. Sıçanlar standart yem ile beslenmeye devam etti.

Metotreksat grubu (n=8): Deney hayvanlarına, MTX (serum fizyolojik içinde 20 mg/kg) intraperitoneal olarak deney başında tek doz uygulandı. 10 gün boyunca standart yemle beslendiler. 0,5 mL musluk suyu oral gavaj yöntemi ile verildi.

Metotreksat+ süt serum proteini grubu (n=8): Deney hayvanlarına, MTX (serum fizyolojik içinde 20 mg/kg) intraperitoneal olarak deney başında tek doz uygulandı. Süt serum proteini, oral gavaj yöntemi (2 g/kg, 0,5 mL) ile 10 gün boyunca verildi. Sıçanlar standart yem ile beslenmeye devam etti.



Şekil 7. Deney grupları

10. günün sonunda tüm gruplardaki sıçanlar dekapite edilerek kan örnekleri, karaciğer ve böbrek dokuları alındı. Histolojik incelemeler için karaciğer ve böbrek dokusu örnekleri alındıktan sonra geri kalan karaciğer ve beyin dokusu homojenize edildi.

Kan örneklerinden serum örnekleri hazırlandı. Serum örneklerinde üre, kreatin, IL-6, TNF- α incelendi. Serum örneklerinde ayrıca protein profilleri değişiminin tespit edilmesi için SDS poliakrilamid jel elektroforezi uygulandı.

Karaciğer ve böbrek homojenatlarında total protein (TP), lipid peroksidasyon (LPO), GSH ve nitrik oksit (NO) düzeyleri; glutatyon S-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD ve doku faktörü (TF) aktiviteleri ölçüldü.

5.8. Vücut Ağırlığının Ölçülmesi

Deneyin başlangıcından 10. günün sonuna kadar her gün sıçanlar tartılarak vücut ağırlıkları kaydedilmiştir.

5. 9. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Alınan karaciğer ve böbreklerin her biri ayrı ayrı serum fizyolojik ile yıkandı; kan ve damarları temizlendikten sonra dokular tartıldı ve tartım sonuçları kaydedildi. Makas ile kesilerek küçük parçalara ayrılan dokular motorlu doku homojenizatöründe homojenize edildi. Serum fizyolojik kullanılarak hazırlanan % 10 g ‘lık her doku homojenatı ayrı ayrı küçük kısımlara ayrıldı ve ölçümlerin yapılacağı deney gününe kadar derin dondurucuda -20 ℃ de saklandı. Tüm homojenizasyon işlemleri soğukta yapıldı.

Karaciğer ve böbrek dokuları dondurucudan çıkarıldıktan sonra +4 ℃ ‘ye alındı, buzlar çözündükten sonra deney sırasında buz üzerinde bekletilerek kullanıldı. Bazı analizlerde homojenat direk kullanılırken, bazılarında 4000 pm’ de 10 dakika soğukta santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant kullanıldı.

5. 10. Karaciğer ve Böbrekte Araştırılan Parametreler İçin Kullanılan Tayin Yöntemleri

5. 10. 1. Karaciğer ve böbrek dokularında total protein tayini (Lowry ve ark., 1951)

Deneyin Prensibi: Proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokulur. Daha sonra fosfomolibdik - fosfotungstik asit reaktifi (folin reaktifi) ile indirgenir. Oluşan mavi rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

Gerekli çözeltiler

A çözeltisi: Sodyum karbonat çözeltisi (% 2 g, 0,1 N NaOH'teki); 0,4 g NaOH biraz suda çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır. 2 g sodyum karbonat, hazırlanan 0,1 N NaOH çözeltisinde çözülür; hacmi 100 ml'ye 0,1 N NaOH çözeltisi ile tamamlanır.

Bakır sülfat (% 1 g) çözeltisi: 1 g bakır sülfat biraz distile suda çözüldükten sonra hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Sodyum potasyum tartarat (% 2 g) çözeltisi: 2 g sodyum potasyum tartarat biraz distile suda çözüldükten sonra hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

B çözeltisi: %1 g' lık bakır sülfat çözeltisi ile % 2 g'lık sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanılır (kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanır).

C çözeltisi : 50 ml A çözeltisi ve 1 ml B çözeltisi karıştırılarak kullanılır (kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanır).

Folin çözeltisi : Folin çözeltisi (F9252, Sigma Aldrich, USA) satın alınmıştır.

Serum fizyolojik (% 0,9 g NaCl) çözeltisi: 0,9 g NaCl biraz suda çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Protein stok standart (% 100 mg albumin) çözeltisi: 100 mg albumin biraz serum fizyolojikte çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlanır.

Protein çalışma standart çözeltileri: Stok çözeltiden uygun hacimler alınarak % 5, 10, 15 mg albumin ihtiva edecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlanır.

Deneyin yapılışı

5 adet deney tüpü alınır; numune (N), standart 1 (St1), standart 2 (St2), standart 3 (St3) ve kör (K) olmak üzere tüpler işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune (N)	St1 % 5 mg albumin	St2 % 10 mg albumin	St3 % 15 mg albumin	Kör (K)
Albumin (%100 mg)	-	25 µl	50 µl	75 µl	-
Doku homojenatı (ya da süpernatant)	10 µl	-	-	-	-
Serum fizyolojik	490 µl	475 µl	450 µl	425 µl	0,5 ml
Toplam hacim	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Vortekste karıştırılır					
C çözeltisi	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Vortekste iyice karıştırılır. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir					
Folin ayıracı	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Tüpler vortekste iyice karıştırılır, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir. 30 dakika sonunda 500 nm de köre karşı absorbanslar kaydedilir.

Hesaplama

Standart grafiği çizilir. Protein miktarı standart grafiği yardımıyla protein (mg)/g nemli doku biriminden hesaplanır.

5.10.2. Karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyonu (LPO) tayini (Ledwozyw ve ark., 1986)

Deneyin Prensibi: LPO ürünü olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak ölçülür.

Gerekli çözeltiler

TBA (0,047 M) çözeltisi : 500 mg TBA ile 6 ml 1 M' lık NaOH ile karıştırılır. Üzerine 69 ml distile su ilave edilir.

NaOH (1 M) çözeltisi: 4 gram NaOH tartılır, biraz distile suda çözülür. Hacmi 100 ml' ye distile su ile tamamlanır.

Triklorasetik asit (TCA) (1,22 M) çözeltisi: 20 ml TCA (%100 g TCA) ile 5 ml HCl (% 37 g lık, d=1,19 g/dl lik HCl) karıştırılır. Hacmi distile su ile 100 ml ye tamamlanır.

n-butanol: Orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin yapılışı

2 adet deney tüpü alınır, numune ve kör olmak üzere işaretlenir. Aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune	Kör
Doku homojenatı	0,25 ml	-
Distile su	-	0,25 ml
TCA	1,25 ml	1,25 ml
Vortekste karıştırılır ve 15 dk bekletilir.		
TBA	0,75 ml	0,75 ml
Vorteks ile karıştırılır. 30 dk kaynar su banyosunda inkübe edilir.		
n-butanol	2 ml	2 ml

İlave edilir. Vortekslenir. 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilir. Butanol fazı alınarak 532 nm'de köre karşı absorbanslar kaydedilir.

Hesaplama

MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1,56.10^5$ $M^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak sonuçlar nmol MDA/g doku cinsinden hesaplanır.

5.10.3. Karaciğer ve böbrek dokularında indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini (Beutler, 1975)

Deneyin Prensibi: Elmann ayıracı, 5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit (DTNB) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli çözeltiler

Sodyum sitrat (% 1 g) çözeltisi: 1 g sodyum sitrat tartılır. Bir miktar distile suda çözülerek hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Elmann ayıracı (% 40 mg DTNB) : 40 mg DTNB tartılır, biraz sodyum sitrat çözeltisinde (% 1 g) çözülür. Hacmi % 1 g' lık sodyum sitrat çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır.

Proteinsizleştirme çözeltisi : 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu (EDTA-Na), 30 g sodyum klorür ayrı ayrı biraz distile suda çözülür. Hepsi birleştirilir. Hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Disodyum fosfat (0,3 M) çözeltisi: 4,26 gram Na_2HPO_4 (veya 5,34 gram $Na_2HPO_4.2H_2O$) biraz distile suda çözülür. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı

0.2 ml doku homojenatı bir deney tüpüne konur. Vorteks ile karıştırılır. Üzerine 0.3 ml proteinsizleştirme çözeltisinden ilave edilir. Tekrar vorteks ile karıştırılır. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Çökelti atılır. Süpernatant alınır. İki adet deney tüpü alınır. Numune ve kör olarak işaretlenerek aşağıdaki şekilde çalışılır.

	Numune	Kör
Distile su	-	0,2 ml
Süpernatant	0,2 ml	-
Na_2HPO_4	0,8 ml	0,8 ml
Elmann ayıracı	0,1 ml	0,1 ml

Tüpler vortekste karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir. Köre karşı 412 nm'de absorbanslar kaydedilir.

Hesaplama

Sonuçlar seyreltme faktörü ve oluşan sarı renkli ürünün 412 nm'de ekstinksiyon katsayısı ($13600/m^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak GSH mg/g doku cinsinden hesaplanır.

5.10.4. Karaciğer ve böbrek dokularında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini (Mylorie ve ark., 1986)

Deneyin Prensibi: SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını arttırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşür. H_2O_2 ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu da o kadar çok olur. Oluşan renkli ürünün absorbansı, 460 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli çözeltiler

Fosfat tamponu (50 mM, pH = 7,8): 0,136 gram KH_2PO_4 ve 0,697 gram K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülür, birleştirilir. Hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7,8'e ayarlanır) (2^oC de saklanır).

Fosfat tamponu + 0.1 mM lık Na-EDTA: 0,0037 gram Na-EDTA tartılır, biraz 50mM' lık fosfat tamponunda çözülür. Hacmi 50 mM' lık fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

Potasyum fosfat tamponu (10 mM, pH=7,5): 0,041 gram KH_2PO_4 ve 0,122 gram K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülür, birleştirilir ve hacmi distile su

ile 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml' ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7,5' a ayarlanır) (2^{o}C de saklanır).

Riboflavin (0,2 mM) çözeltisi: 7,5 mg riboflavin 100 ml potasyum fosfat tamponunda (10mM' lık, pH = 7,5) çözülür.

o- dianisin (6 mM) çözeltisi: 19 mg o-dianisin 10 ml distile suda çözülür.

SOD (120 IU /ml) stok standardı (Sigma S-2515-3000 U): Liofilize SOD standardı 120 IU /ml olacak şekilde soğuk distile su ile çözülür. Daha sonra bu stok standarttan uygun hacimler alınarak deney ortamında 3, 6, 9, 12 ünite SOD olması sağlanır.

Deneyin yapılışı

% 10 gramlık doku homojenatı 10 dakika 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınır, tam ya da 1/10 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır. 3 deney tipi numune, standart ve kör olmak üzere alınır.

	Numune	Standart 3 U	Standart 6 U	Standart 9 U	Standart 12 U	Kör
Fosfat tamponu (pH = 7,8)	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
o- dianisidin	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Distile su	--	0,075 ml	0,05 ml	0.025 ml	--	0,1 ml
Stok standart (120 U/ml)	--	0,025 ml	0,05 ml	0.075 ml	0,1 ml	--
Dilue süpernatant	0,1 ml	--	--	--	--	--
Her tüpe 30 saniye ara ile 0,2 ml riboflavin konur, karıştırılır. 460 nm'de abs okunur.						
Sonra tüpler oda sıcaklığında 20 W Floresans lamba (lamba 20 dakika önceden açılır ve ısınması sağlanır) bulunan kutu içinde 8 dk inkübe edilir. Tekrar 460 nm'de abs okunur.						

Hesaplama

Standart grafiği yardımıyla yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak süpernatantın SOD aktivitesi U/g doku cinsinden hesaplanır.

5.10.5. Karaciğer ve böbrek dokularında glutatyon- S- transferaz (GST) aktivitesi tayini (Habig ve Jacoby, 1981)

Deneyin Prensibi: GST aktivitesi tayini, GSH ve 1-kloro-2,4-dinitro-benzenin (CDNB) konjugasyonu ile oluşan ürünün, 340 nm'deki absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi temeline dayanır.

Gerekli çözeltiler

Sodyum fosfat tamponu (0,2 M, pH= 6,5): 0,534 gram $Na_2HPO_4.2H_2O$ ve 2,3 gram KH_2PO_4 ayrı ayrı biraz distile suda çözülür ve birbirine karıştırılır. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 6,5' e ayarlanır) (2^oC de saklanır).

Glutatyon (GSH) (60 mM) çözeltisi:1,84 gram glutatyon biraz distile suda çözülür. Hacmi 100 ml'ye tamamlanır (taze hazırlanır).

CDNB (60 mM) çözeltisi : Absolü etanolde taze hazırlanır. 1,22 gram CDNB tartılır ve biraz etanolde çözülür ve hacmi 100 ml'ye tamamlanır (taze hazırlanır).

Deneyin Yapılışı

% 10 gramlık doku homojenatı 10 dakika 4000 rpm' de santrifüj edilir. Süpernatant alınır. 1/300 oranında serum fizyolojik ile seyreltilir. İki tüp alınır. Numune ve kör olarak işaretlenip aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune	Kör
Dilue süpernatant	0,5 ml	--
SF veya distile su	--	0,5 ml
Fosfat tamponu	1,5 ml	1,5 ml
GSH çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
CDNB çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
Distile su	0,90 ml	0,90 ml
Toplam hacim	3 ml	3 ml

Karıştırılır. 3 dakika süre (0., 1., 2., 3. dakikalarda) ile karışımın 340 nm'de (25 °C) absorbansları izlenir, kaydedilir. Absorbans artışı hesaplanır.

Hesaplama

Glutatyon ve CDNB'nin konjugasyonu sonucu oluşan ürün için saptanmış olan ekstrinksiyon katsayısı (9,6 mM^{-1} x cm^{-1}) kullanılarak sonuçlar hesaplanır. Enzimsel konjugasyon sonucundan, enzimsel olmayan konjugasyon değerleri çıkarılır.

5.10.6. Karaciğer ve böbrek dokularında nitrik oksit (NO) tayini (Miranda ve ark., 2001)

Deneyin Prensibi: Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrike indirgenir. Nitrikle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm' de spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli çözeltiler

NaOH (0,3 M) çözeltisi: 0,6 g NaOH tartılıp bir miktar distile suda çözülür. Üzeri distile su ile 50 ml' ye tamamlanır.

% 10'luk $ZnSO_4$ çözeltisi: 5 g $ZnSO_4$ ya da 8,9 g $ZnSO_4.7\ H_2O$ tartılır bir miktar distile suda çözülür. Üzeri distile su ile 50 ml' ye tamamlanır.

HCl (1 M): 4,20 ml HCl çekilir. Üzeri distile su ile 50 ml' ye tamamlanır.

VCl_3: 0,4 g VCl_3 bir miktar 1 M HCl' de çözülür. Üzeri aynı çözelti ile 50 ml' ye tamamlanır.

HCl (%5) çözeltisi: 2,86 ml % 37'lik HCl çekilir. Üzeri distile su ile 25 ml' ye tamamlanır.

Sülfanilamid (%2, SULF) çözeltisi: 0,5 g SULF tartılır, 25 ml % 5' lik HCl içerisinde çözülür.

N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür (0,1, NEDD) çözeltisi: 0,025 g (25 mg) NEDD tartılır. Bir miktar deiyonize suda çözülür ve üzeri deiyonize su ile 25 ml' ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı

Doku homojenatı 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. 0,3 ml süpernatant alınır. Üzerine 0,3 ml 0,3 M NaOH ilave edilir. Oda sıcaklığında 5 dakika beklenir. 0,3 ml % 10'luk $ZnSO_4$ ilave edilir. Vortekslenir. +4'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Üst faz alınır ve +4'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. İki adet deney tübü alınarak kör ve numune olarak işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune	Kör
Deprotenize sıvı	0,3 ml	-
Distile su	-	0,6 ml
VCl_3	0,3 ml	0,3 ml
SULF	0,15 ml	-
NEDD	0,15 ml	-
30 dakika 37 °C'de etüvde inkübe edilir.		

Köre karşı 540 nm'de absorbans kaydedilir.

Hesaplama

Sonuçlar 53000 M^{-1}/cm^{-1} ekstinksiyon katsayısı ile µmol/ g doku cinsinden hesaplanır.

5.10.7. Karaciğer ve böbrek dokularında doku faktörü aktivite tayini (Ingram ve Hills, 1976)

Karaciğer ve böbrek doku faktörü aktiviteleri sağlıklı kişilerden alınan plazma kullanarak Quick metoduna göre tespit edildi. Doku homojenatı, tromboplastin kaynağı olarak kullanılmıştır. Aktivite, geçen süre ile ters orantılı olarak değişir.

Gerekli çözeltiler

Sodyum sitrat (%3,8 g) çözeltisi: 3,8 g sodyum sitrat biraz distile suda çözülür. Hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Stok kalsiyum klorür (0,2 M) çözeltisi: 2,22 gram $CaCl_2$ biraz distile suda çözülerek hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Seyreltik kalsiyum klorür (0,02 M) çözeltisi: 1 ml stok kalsiyum klorür çözeltisi üzerine 9 ml distile su konur, karıştırılır. 37 ºC de tutulur (taze hazırlanmalıdır).

Deneyin yapılışı

37ºC lik su banyosunda, küçük bir deney tüpünün içine

Doku homojenatı	0,1 ml
İlave edilir, 2 dakika inkübe edilir.	
Plazma	0,1 ml
İlave edilir, karıştırılır. 30 saniye inkübe edilir.	
0,02 M lık $CaCl_2$ çözeltisi	0,1 ml
İlave edilir, karıştırılır. Kronometre ile pıhtı oluşumu için geçen süre tayin edilir.	

5.10.8. SDS- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS- PAGE) (Laemmli, 1970)

Gerekli çözeltiler

Tris çözeltisi (1,5 M , pH: 8,8): 18,1 gram Tris biraz suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Tris-HCl çözeltisi (1 M , pH: 6,8): 12,1 gram Tris biraz suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.

SDS çözeltisi (Sodyum dodesil sülfat) (%10 g): 10 gram SDS biraz suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.

Akrilamid / Bisakrilamid çözeltisi ((30g/0,8 g)/dL): 30 gram akrilamid ve 0,8 gram bisakrilamid biraz suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Amonyum persülfat çözeltisi (%10 g): 10 gram amonyum persülfat biraz suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml' ye tamamlanır. Taze hazırlanıp kullanılır.

TEMED : Orijinal şişeden alınarak kullanıldı.

Gliserin: Orijinal şişeden alınarak kullanıldı.

2-Merkaptoetanol: Orijinal şişeden alınarak kullanıldı.

Bromfenol blue çözeltisi (%1 g): 1 gram bromfenol blue biraz suda çözünür ve hacmi distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.

Boyama çözeltisi : 2.5 g Commasie Brillant Blue , 454 mL distile su içinde çözülür. Üzerine 454 mL metanol ve 92 mL glasiyal asetik asit ilave edilir. İyice karıştırılır. Koyu renkli şişede ağzı sıkıca kapalı bir şekilde saklanır.

Boya çıkarma çözeltisi: Asetik asit çözeltisi (% 10 g) (v/v)

PAGE tamponu: 3 g Tris, 15 g glisin, 1 g SDS ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra karıştırılır. Hacim 1000 mL' ye tamamlanır (1 g SDS yerine % 10 g SDS çözeltisinden 10 mL alınabilir).

PAGE yükleme tamponu:

1 M Tris çözeltisi (pH: 6,8)	1 ml
Gliserin	1.6 ml
% 10 g SDS çözeltisi	2 ml
2-merkaptoetanol	0,4 ml
%0,1 Bromfenol blue	1 ml
Distile su	8 ml
Yukarıdakiler karıştırılarak hazırlanır. Uzun süre dayanır.	

Deneyin yapılışı

1. PAGE için jellerin hazırlanması

a) Alt jelin hazırlanması (% 5 g)

Bir erlene sırası ile 17,2 ml distile su, 7,5 ml 1.5 M Tris çözeltisi (pH:8,8), 4,91 ml Akrilamid / Bisakrilamid çözeltisi (30 g / 0,8 g) / dL), 0,1 ml % 10 g amonyum persülfat, 0,3 ml % 10 g SDS çözeltisi, 100 µL Temed devamlı karıştırılarak konulur. Hemen cam levhalar arasına dökülür, polimerize olması için 20 dakika beklenir.

b) Üst Jelin Hazırlanması (% 3,5 g)

Bir erlene sırası ile 7,8 ml distile su, 1,25 ml 1 M Tris çözeltisi (pH: 6,8), 1,2 ml Akrilamid / Bisakrilamid çözeltisi (30 g / 0.8 g) / dL), 0,1 ml % 10 g amonyum persülfat, 0,1 ml % 10 g SDS çözeltisi, 100 µL Temed devamlı karıştırılarak konulur. Hemen alt jel üzerine dökülür. Çok çabuk polimerize olduğundan hemen tarak yerleştirilir.

2. PAGE için numunelerin hazırlanması

Total protein tayini yapılmış karaciğer ve böbrek homojenatlarının her biri ayrı ayrı ve protein standardı olarak albumin çözeltisi hacimce ¼ oranında PAGE yükleme tamponu ile karıştırılır. 5 dakika, 90-100° C 'da ısıtılır ve soğuması beklenir. Bu şekilde denatüre edilen proteinlerden 20 µg protein içeren hacimler (µL) halinde kuyulara tatbik edilir (kuyular en fazla 30 µL konulabilir).

3. PAGE yapılışı

Tarak üst jeli, çalışılacağı zaman bozmayacak şekilde dikkatlice çıkarılır. Denatüre edilmiş örnekler hesaplanan miktarlarda Hamilton enjektörü yardımı ile kuyulara tatbik edilir. Cam levhaları tutan alt bant çıkarılır ve cam levha elektroforez tankına yerleştirilir.

Bir slab jel başına 30 mA 'lik akım uygulanır. Boya jelin alt kısmına 0, 5-1 cm yaklaşıncaya kadar elektroforeze devam edilir. Bu aşama yaklaşık 2-2,5 saat kadar sürebilir. Elektroforez tamamlanınca cam levhaları tutan yandaki bandlar açılır. İçindeki jeller bir spatül ile alınarak boyama çözeltisi içine batırılır ve 15-20 dakika bu çözelti içinde tutulur. Daha sonra boya çıkarma çözeltisine alınır. Bir gece ya da daha fazla bu çözelti içinde tutularak protein bandlarının iyice belirginleştirilmesi sağlanır.

Dansitometrede, elektroforez sonunda elde edilen protein bandları değerlendirilir.

5.11. Kanda Araştırılan Parametreler İçin Kullanılan Tayin Yöntemleri

5.11.1. Kanda oxim metodu ile üre tayini (Rosenthal, 1955)

Deneyin Prensibi: Ürenin ferrik iyonları varlığında diasetil monooksim ve tiyosemikarbazid ile sıcak ve asidik ortamda reaksiyona girerek pembe renkli bir bileşik oluşturur. Reaksiyon için gerekli olan ferrik iyonları ve asidik ortamı sağlayan asit çözeltisi sayesinde üre ile diasetil monooksim kondense olarak sarı renkli bir kompleks oluşturur. Sonrasında oluşan kompleksin tiyosemikarbazid ile reaksiyona girmesiyle renk pembeleşerek koyulaşır; oluşan pembe renkli ürünün absorbansı ölçülür.

Gerekli çözeltiler

Oksim çözeltisi: 1 g diasetil monooksim, 0,2 g tiyosemikarbazid, 9 g NaCl bir miktar distile suda çözülür ve ve hacmi 1 litre distile su ile tamamlanır (Buzdolabında saklanır)

Asit çözeltisi: 800 ml suya 60 ml derişik H_2SO_4 ve 10 ml %85 H_3PO_4 ilave edilir. 0,1 g $FeCl_3$ de ilave edilerek hacmi distile su ile 1 litreye tamamlanır (Buzdolabında saklanır).

Üre stok standart çözeltisi: 2 g sodyum benzoat bir miktar distile suda çözülür ve hacmi 1 litreye distile su ile tamamlanır. Üzerine 0,8 ml derişik H_2SO_4 ilave edilir.Bu çözelti standart çözeltileri hazırlamak için kullanılır. 322 mg üre bu çözeltide çözülür ve hacmi bu çözelti ile 500 ml' ye tamamlanır. Bu çözelti 30 mg üre azotu içerir.

Üre çalışma standardı: 10 ml üre stok standart çözeltisi 100 ml'ye sodyum benzoat çözeltisi ile seyreltilir. Bu çözelti %3 mg üre azotu içerir (Buzdolabında saklanır).

Deneyin yapılışı

Kan santrifüj edilerek serumu ayrılır ve kullanılır. 3 tüp alınır. Numune (N), kör (K) ve standart (St) olarak işaretlenir.

	K	St	N
Numune	-	-	50 µl
Üre çalışma standart çözeltisi	-	50 µl	-
Distile su	50 µl	-	-
Oksim çözeltisi	3 ml	3 ml	3 ml
Asit çözeltisi	3 ml	3ml	3 ml
Kaynar suda 15 dakika bekletilir			
Soğutularak oda sıcaklığına getirilir			
520 nm' de absorbanslar kaydedilir			

Hesaplama

Sonuçlar 2.26 x 10^4 $M^{-1}cm^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı ile hesaplanır. Sonuç serumda %mg üreyi verir.

5.11.2. Kanda kreatinin tayini (Slot, 1965)

Gerekli çözeltiler

H_2SO_4 ($\frac{2}{3}$ N, 1,84 g/ml) çözeltisi: Bir miktar suya 1,81 ml H_2SO_4 eklenir ve hacim distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.

Sodyum tungstat (%10 g) çözeltisi: 10 gram sodyum tungstat biraz suda çözünür ve hacmi distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.

Pikrik asit (0,04 M) çözeltisi: 1,28 gram pikrik asit biraz distile suda çözülür ve hacmi 100 ml' ye tamamlanır.

NaOH (0,75 N) çözeltisi: 3 gram NaOH biraz distile suda çözülür ve hacmi 1000 ml' ye tamamlanır.

Stok standart çözeltisi: 150 mg kreatinin üzerine 1ml derişik HCl ilave edilir. Distile su ile 100 ml ye tamamlanır (1,5 mg/ml) (Buzdolabında saklanır).

Çalışma standardı çözeltisi: 1 ml stok standardı 100 ml ye distile su ile tamamlanır (0,015 mg). Çözelti dayanıklı değildir. Taze hazırlanır.

Deneyin yapılışı

Santrifüj tüpüne 2 ml serum, 2 ml distile su, 1 ml %10 sodyum tungstat, 3 ml $\frac{2}{3}$ N H_2SO_4 karıştırılır ve 5 dakika santrifüj edilir. Süzüntüden 3 ml alınır üzerine 1 ml pikrik asit, 1 ml NaOH eklenir ve karıştırılır. 20 dakika beklenir. 520 nm' de okunur.

Hesaplama

($Numune_{abs}/St_{abs}$) x 133 x St_{mg} formülünden serumda % mg kreatinin hesaplanır.

5.11.3. Serum sitokinlerinin tayini

Dört deney grubunun serum sitokin seviyeleri ticari ELISA test kiti (Katalog no: EA-1201, Signosis Inc., Sunnyvale, CA, ABD) kullanılarak tayin edildi. IL-6 ve TNF- α olmak üzere iki farklı sitokinin düzeyleri kit içerisinde belirtilen adımlar takip edilerek belirlendi ve hesaplandı.

5.12. Histolojik İnceleme

Karaciğer ve böbrek dokusunun histoloji olarak incelenme aşaması Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı, Histoloji ve Embryoloji Birimi tarafından yapılmıştır.

Işık mikroskobu ile inceleme için karaciğer ve böbrek doku örnekleri %10' luk nötral formaldehitte fikse edilmiştir. Rutin doku işlemlerinden sonra örnekler parafine gömülmüştür. Yaklaşık 5 µm kalınlığındaki kesitler hematoksilin ve eozin (HE) ile boyanmış ve morfolojik analiz için her örnekte en az beş mikroskobik alan incelenmiştir.

Karaciğer dokusu için histopatolojik skorlama hepatositlerin dejenerasyonu, vasküler konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon, enflamatuar hücre infiltrasyonu ve aktif Kupffer hücrelerinin sayısı kriterlerine göre yapılmıştır.

Böbrek dokusu için histopatolojik skorlama ise glomerüler yapının dejenerasyonu ve Bowman boşluğunun genişlemesi, proksimal ve distal tübülün dejenerasyonu, vasküler konjesyon ve inflamatuar hücre infiltrasyonu kriterlerine göre yapılmıştır.

Karaciğer ve böbrek dokularının mikroskobik skorları, her bir kritere verilen skorların toplamı olarak hesaplanmıştır.

Kriterlerin her biri yarı niceliksel olarak

0: yok

1: hafif

2: orta

3: şiddetli olacak şekilde skorlanmıştır.

Her iki doku için maksimum toplam puan "12" olarak hesaplanmıştır. Boyama işlemleri sonrasında mikroskopa bağlı bir dijital kamera ile görüntüler fotoğraflanmıştır.

5.13. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler Graphpad Prism 6.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Tüm sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak verildi.

Gruplar arası karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi ANOVA (post hoc Tukey testi) kullanıldı. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Deney Hayvanlarının Yem Tüketimi ve Vücut Ağırlıkları

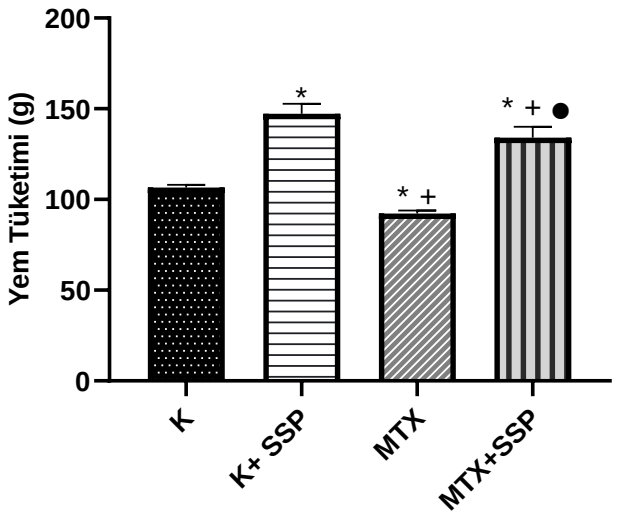
Sıçanların yem tüketimi MTX grubunda kontrol (K) grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır; kontrol+ süt serum proteini (K+SSP) ve MTX+ süt serum proteini (MTX+ SSP) grubunda ise yem tüketimleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış göstermiştir (Tablo 4, Şekil 8). Yem tüketimleri MTX ve MTX+SSP grubunda K+SSP grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (Tablo 4, Şekil 8). MTX+ SSP grubunda yem tüketimleri MTX grubu ile karşılaştırınca anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (Tablo 4, Şekil 8).

Tablo 4. Tüketilen yem miktarları (g)

	K		**K+ SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
Yem Tüketimi (g)	106,7	1,39	147,3*	5,57	92,2^{*+}	1,64	134,1$^{*+\bullet}$	6,00	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı

Şekil 8. Tüm gruplarda sıçanların tükettikleri yem miktarının karşılaştırılması

Deney başlangıcında hayvanların ağırlıkları arasında önemli bir fark saptanmamıştır. 10. günün sonunda ağırlıklar değerlendirildiğinde MTX grubunda K grubuna göre anlamlı bir ağırlık azalmasına neden olduğu, MTX+ SSP grubunda anlamlı bir kilo artışı görüldüğü tespit edilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Sıçanların ağırlık değişimi (g)

	K		**K+ SSP**		**MTX**		**MTX+SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
Ağırlık Değişimi (g)	4,33	0,82	11,00*	1,41	-18,67^{*+}	1,97	-8,83$^{*+\bullet}$	1,33	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı

6.2. Karaciğer Dokusu Sonuçları

6.2.1. Karaciğer dokusunda total protein sonuçları

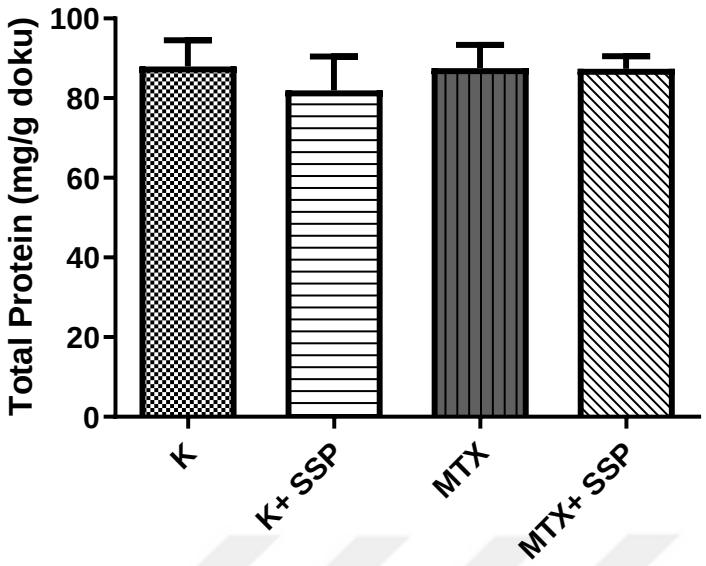
Karaciğer total protein düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 6, Şekil 9).

Tablo 6. Karaciğer total protein düzeyleri

	K		**K+SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
Total Protein (mg/ g doku)	87,94	6,63	81,98	8,48	87,57	5,84	87,36	3,15	0,28

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir.



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Şekil 9. Karaciğer total protein düzeylerinin karşılaştırılması

6.2.2. Karaciğer dokusunda malondialdehit (MDA) sonuçları

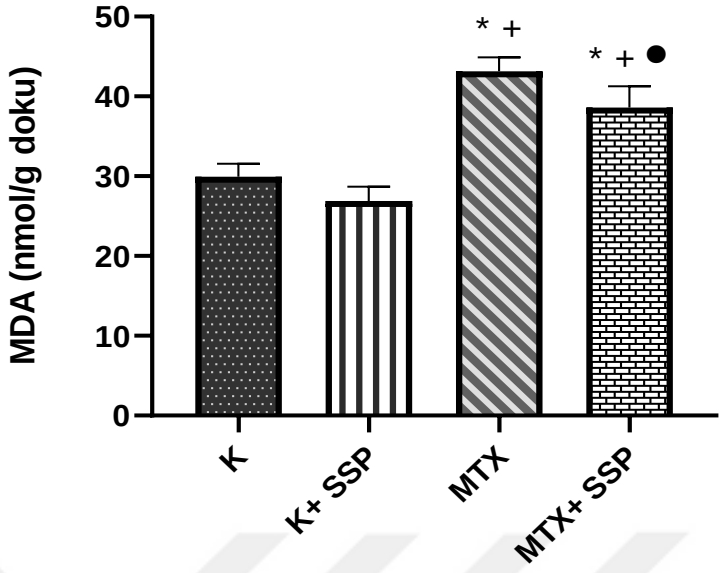
Karaciğerde MDA değerlerinin MTX grubunda , K grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Tablo 7, Şekil 10). MDA değeri MTX+SSP grubunda, MTX grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ancak K grubu değerlerine kadar azalmamıştır (Tablo 7, Şekil 10).

Tablo 7. Karaciğer malondialdehit düzeyleri

	K		**K+ SSP**		**MTX**		**MTX+SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
MDA (nmol/ g doku)	29,95	1,60	26,90	1,77	43,15^{*+}	1,76	38,59$^{*+\bullet}$	2,68	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı

Şekil 10. Karaciğer malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması

6.2.3. Karaciğer dokusunda indirgenmiş glutatyon sonuçları

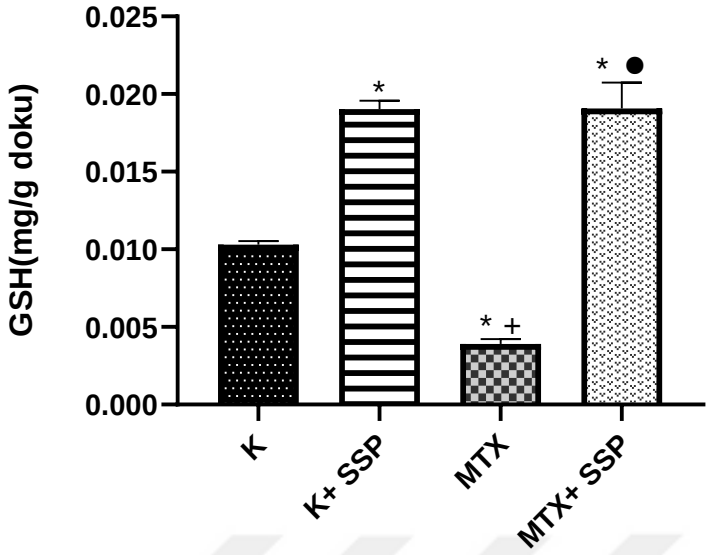
Karaciğer GSH düzeylerinde MTX grubunda K grubuna göre anlamlı azalma tespit edilmiştir (Tablo 8, Şekil 11). MTX grubuna SSP uygulanması ile GSH değerinin MTX grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Kontrol grubuna SSP uygulaması da GSH değerini arttırmıştır (Tablo 8, Şekil 11).

Tablo 8. Karaciğer glutatyon düzeyleri

	K		**K+ SSP**		**MTX**		**MTX+SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
GSH (mg/ g doku)	0,01	0,0002	0,02*	0,0005	0,004^{*+}	0,0003	0,02$^{*\bullet}$	0,002	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı

Şekil 11. Karaciğer glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması

6.2.4. . Karaciğer dokusunda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları

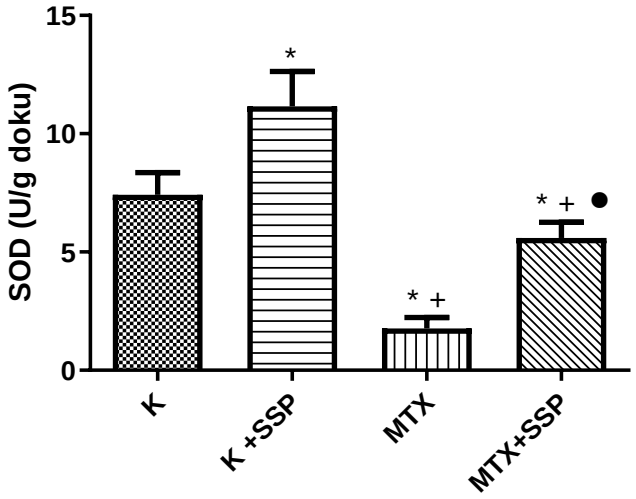
Karaciğer SOD aktivitesinin MTX grubunda K grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 9, Şekil 12). MTX grubuna SSP uygulanması ile SOD aktivitesi MTX grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (Tablo 9, Şekil 12).

Tablo 9. Karaciğer süperoksit dismutaz aktivitesi

	K		**K+ SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
SOD (U/ g doku)	7,42	0,93	11,16*	1,47	1,76^{*+}	0,46	5,60$^{*+\bullet}$	0,66	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı

Şekil 12. Karaciğer süperoksit dismutaz aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

6.2.5. Karaciğer dokusunda glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi sonuçları

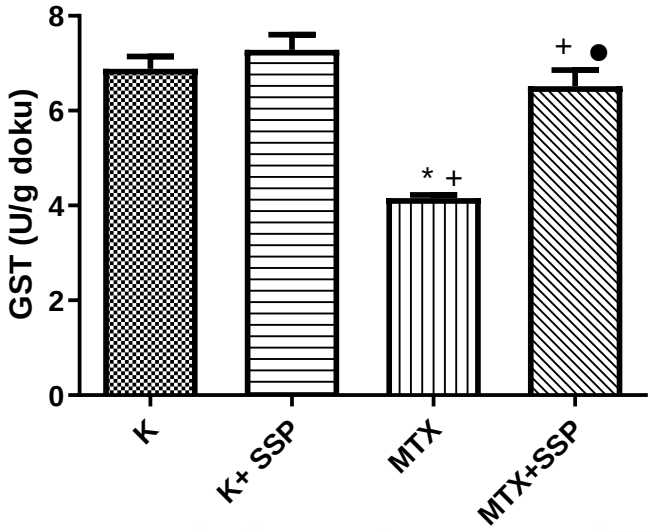
Karaciğer GST aktivitesi, MTX grubunda K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (Tablo 10, Şekil 13). MTX grubuna SSP uygulanması ile GST aktivitesi anlamlı olarak artmıştır. Bu artış sonrası MTX+SSP grubunun GST aktivitesi ile K grubunun GST aktivite değerleri karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Tablo 10, Şekil 13). MTX+SSP grubunun GST aktivitesinin, K+SSP grubunun GST aktivitesinden anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır (Tablo 10, Şekil 13).

Tablo 10. Karaciğer glutatyon-S-transferaz aktivitesi

	K		**K+SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
GST (U/ g doku)	6,88	0,26	7,28	0,31	$4,15^{*+}$	0,06	$6,51^{+\bullet}$	0,34	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı

Şekil 13. Karaciğer glutatyon- S-transferaz aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

6.2.6. Karaciğer dokusunda nitrik oksit (NO) sonuçları

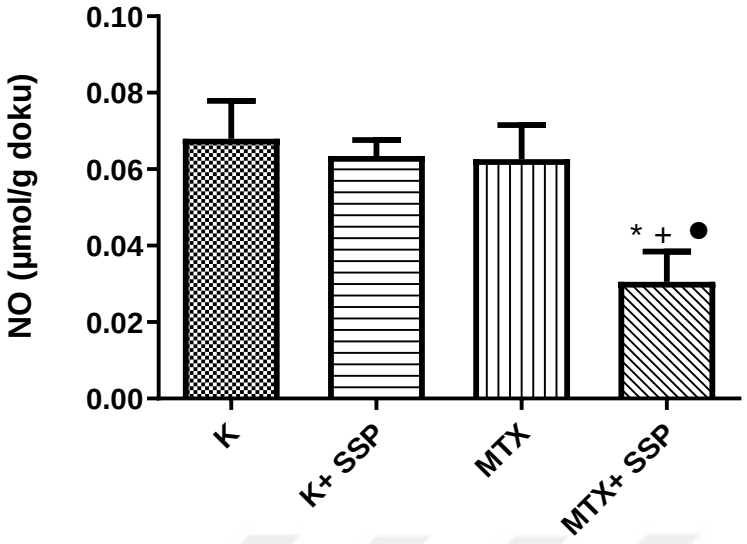
Karaciğer NO değerlerinin MTX+SSP grubunda K, K+ SSP, MTX gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (Tablo 11, Şekil 14).

Tablo 11. Karaciğer nitrik oksit düzeyleri

	K		**K+ SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
NO (µmol/ g doku)	0,07	0,01	0,06	0,004	0,06	0,009	$0,03^{*+\bullet}$	0,008	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı

Şekil 14. Karaciğer nitrik oksit düzeylerinin karşılaştırılması

6.2.7. Karaciğer dokusunda doku faktörü aktivitesi sonuçları

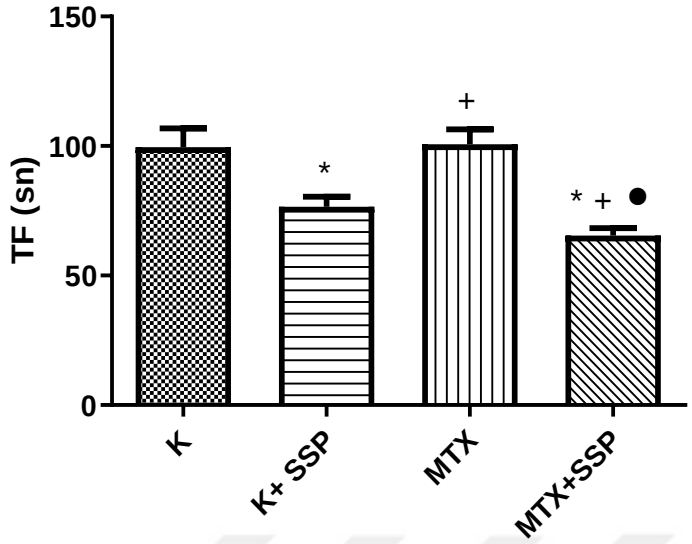
Pıhtı oluşumu için geçen sürenin uzaması, doku faktörü aktivitesinin azaldığını göstermektedir. Karaciğer dokusunda TF aktivitesi, SSP uygulanan K ve MTX gruplarında K grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (Tablo 12, Şekil 15). MTX grubuna SSP uygulanması TF aktivitesini MTX grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır (Tablo 12, Şekil 15).

Tablo 8. Karaciğer doku faktörü aktivitesi

	K		**K+SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
TFa (sn)	99,50	7,26	76,50*	3,99	100,7^{+}	5,75	65,38$^{*+\bullet}$	2,92	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu **TFa:** Doku Faktörü Aktivitesi

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı

Şekil 15. Karaciğer doku faktörü aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

6.3. Böbrek Dokusu Sonuçları

6.3.1. Böbrek dokusunda total protein sonuçları

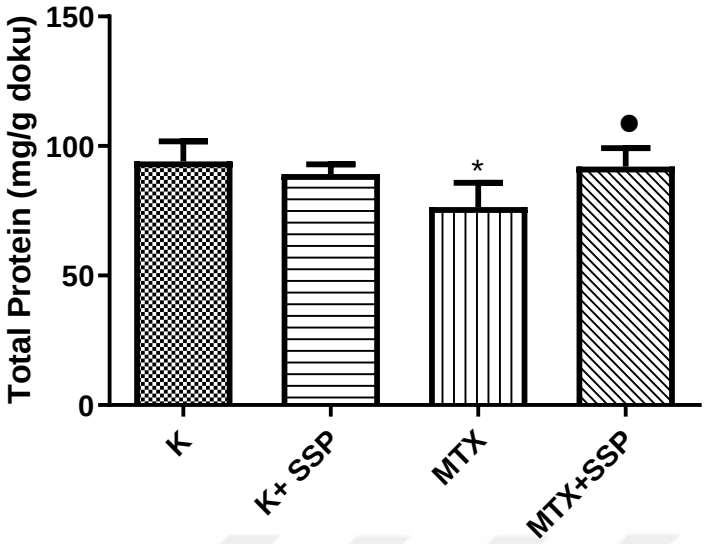
MTX grubunun total protein düzeyleri K grubu ve MTX+ SSP ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13, Şekil 16).

Tablo 13. Böbrek total protein düzeyleri

	K		**K+ SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
Total Protein (mg/g doku)	94,03	7,85	89,21	3,69	76,43*	9,37	92,02•	7,15	0,0026

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı

Şekil 16. Böbrek total protein düzeylerinin karşılaştırılması

6.3.2. Böbrek dokusunda malondialdehit (MDA) sonuçları

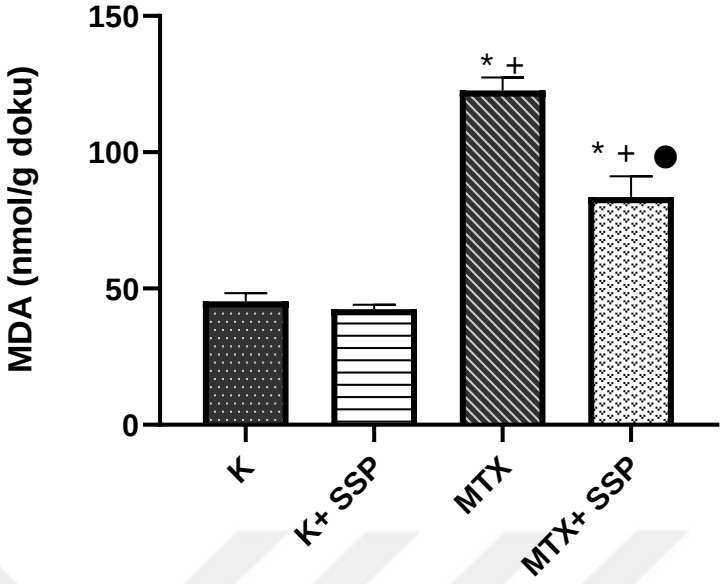
MTX ve MTX+SSP gruplarında MDA değerlerinin K ve K+SSP gruplarının MDA değerlerine göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Tablo 14, Şekil 17). MTX grubuna SSP uygulanması ile MDA değerleri MTX grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (Tablo 14, Şekil 17).

Tablo 14. Böbrek malondialdehit düzeyleri

	K		**K+SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
MDA (nmol/ g doku)	45,30	3,02	42,39	1,63	122,7^{*+}	4,69	83,58$^{*+\bullet}$	7,63	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı

Şekil 17. Böbrek malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması

6.3.3. Böbrek dokusunda indirgenmiş glutatyon (GSH) sonuçları

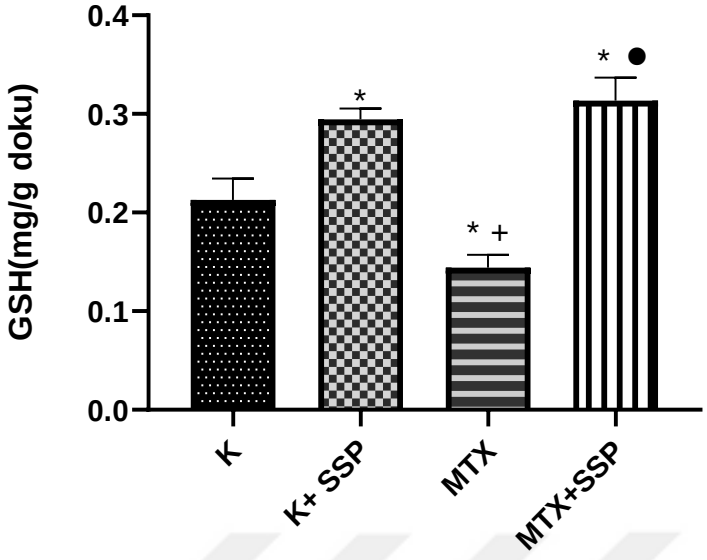
Böbrek GSH düzeylerinin MTX grubunda K grubuna göre anlamlı olarak azaldığı, K+ SSP ve MTX+ SSP gruplarında ise GSH düzeylerinin K grubuna göre anlamlı arttığı tespit edilmiştir (Tablo 15, Şekil 18). MTX grubuna SSP uygulanması, GSH düzeylerinde MTX grubuna göre anlamlı artışa neden olmuştur (Tablo 15, Şekil 18).

Tablo 15. Böbrek glutatyon düzeyleri

	K		**K+SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
GSH (mg/ g doku)	0,21	0,02	0,29*	0,01	0,14*+	0,01	0,31*●	0,02	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı

Şekil 18. Böbrek glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması

6.3.4. Böbrek dokusunda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları

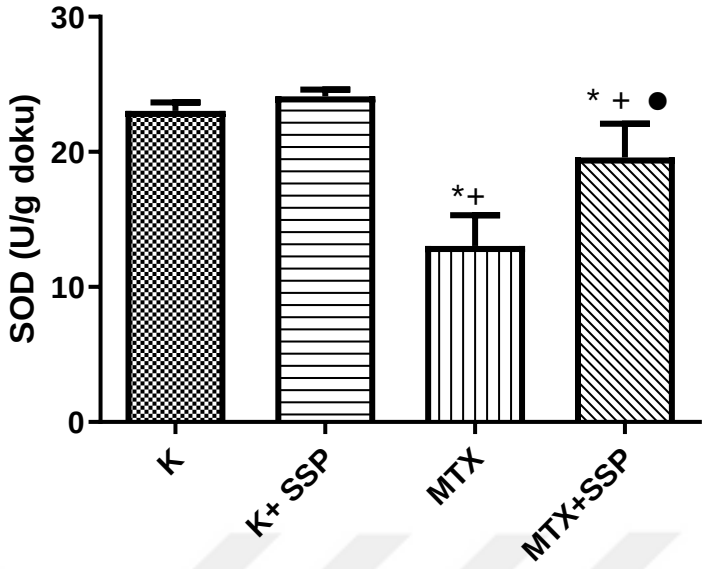
Böbrek SOD aktivitesinin MTX ve MTX+SSP gruplarında, K ve K+SSP gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 16, Şekil 19). MTX grubuna SSP uygulanması ile SOD aktivitesinin MTX grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir (Tablo 16, Şekil 19).

Tablo 16. Böbrek süperoksit dismutaz aktivitesi

	K		**K+ SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
SOD (U/ g doku)	23,04	0,62	24,12	0,48	13,03^{*+}	2,29	19,60$^{*+\bullet}$	2,48	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı

Şekil 19. Böbrek süperoksit dismutaz aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

6.3.5. Böbrek dokusunda glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi sonuçları

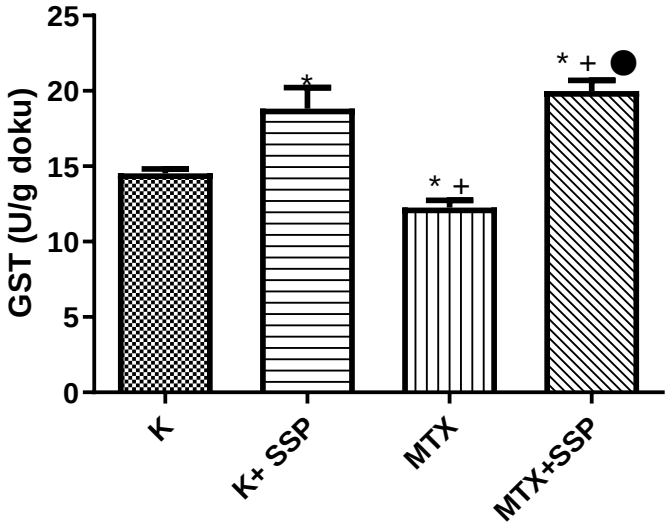
MTX grubununun GST aktivitesi, K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 17, Şekil 20). K+SSP ve MTX+ SSP gruplarının GST aktivitelerinin K grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Tablo 18, Şekil 21). MTX+ SSP grubunun GST aktivitesinin MTX ve K+SSP grubunun GST aktivitesinden anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 17, Şekil 20).

Tablo 17. Böbrek glutatyon-S-transferaz aktivitesi

	K		**K+ SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
GST (U/ g doku)	14,5	0,03	18,23*	1,192	11,69^{*+}	0,50	19,55$^{*+\bullet}$	0,54	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı

Şekil 20. Böbrek glutatyon-S-transferaz aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

6.3.6. Böbrek dokusunda nitrik oksit (NO) sonuçları

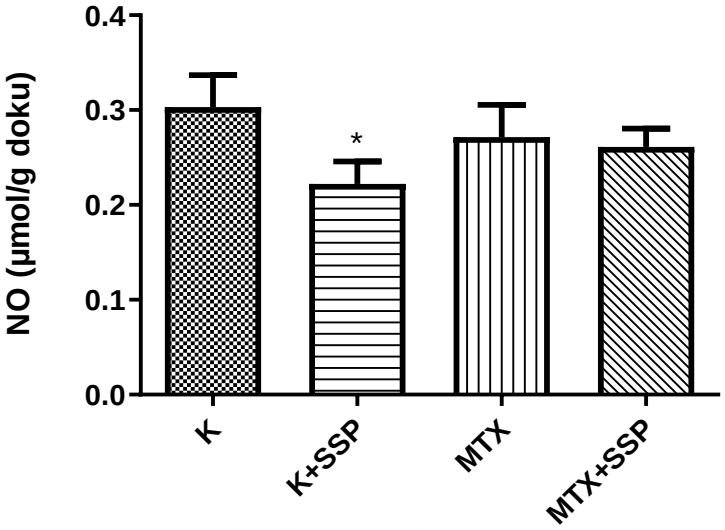
Böbrek dokusunun NO düzeyleri, K+SSP grubunda K grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (Tablo 18, Şekil 21).

Tablo 18. Böbrek nitrik oksit düzeyleri

	K		**K+ SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
NO (µmol / g doku)	0,30	0,03	0,22*	0,02	0,27	0,03	0,26	0,02	0,0033

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı

Şekil 21. Böbrek nitrik oksit düzeylerinin karşılaştırılması

6.3.7. Böbrek dokusunda doku faktörü aktivitesi (TFa) sonuçları

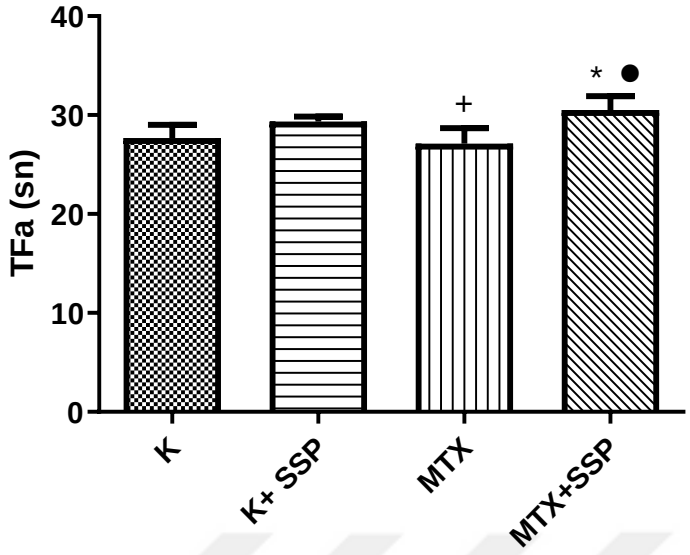
Uzayan pıhtı oluşum zamanı, azalmış doku faktörü aktivitesini (TFa) göstermektedir. Böbrek TF aktivitesi MTX grubunda K grubuna göre anlamlı bir değişime neden olmamıştır. MTX+ SSP grubunda K grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (Tablo 19, Şekil 22). TFa MTX+SSP grubunda MTX grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (Tablo 19, Şekil 22).

Tablo 15. Böbrek doku faktörü aktivitesi

	K		**K+SSP**		**MTX**		**MTX+ SSP**		**P (Anova)**
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
TFa (sn)	27,67	1,37	29,33	0,52	$27,13^{+}$	1,55	$30,50^{*\bullet}$	1,41	0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı



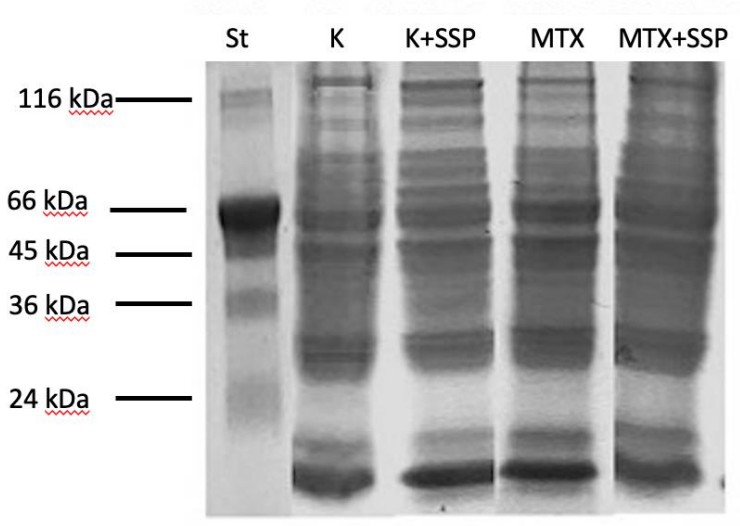
K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

(*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı

Şekil 22. Böbrek doku faktörü aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

6.4. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları

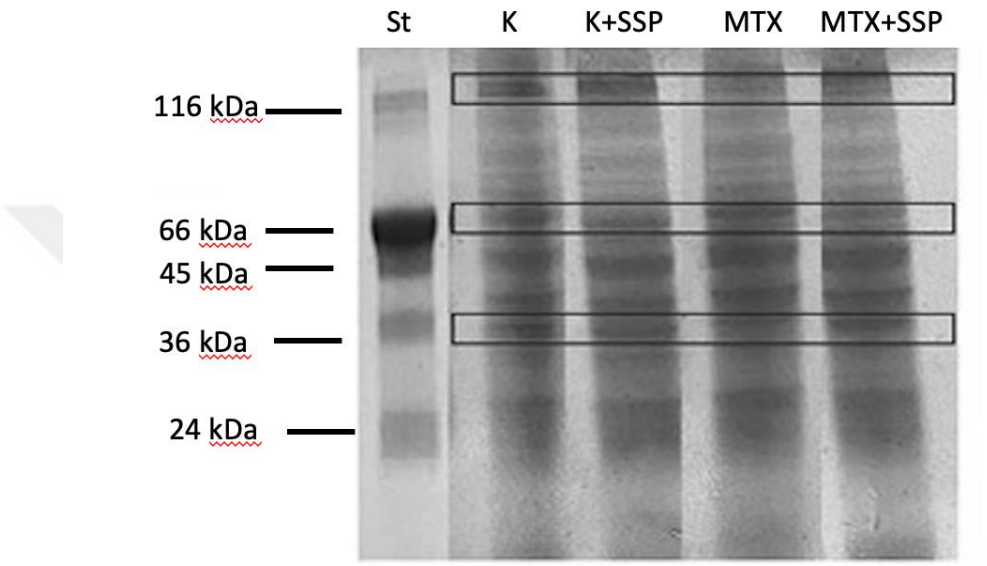
Karaciğer dokusu elektroforetik olarak incelendiğinde, MTX uygulanması karaciğer protein bantlarının yoğunluğunda önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 23).



St: Protein Standart **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Şekil 23. Karaciğer dokusu SDS-PAGE elektroforezi

Böbrek dokusu elektroforetik olarak incelendiğinde MTX uygulanması ile 116 kDa ve 36 kDa protein bantlarının yoğunluğunda azalma ve 66 kDa protein bandının yoğunluğunda artış tespit edilmiştir. SSP uygulaması K ve MTX gruplarında 36 kDa protein bandının yoğunluğunda artışa neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 24).



St: Protein Standart **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Şekil 24. Böbrek dokusu SDS-PAGE elektroforezi

6.5. Kan Parametreleri Sonuçları

6.5.1. Üre ve kreatinin sonuçları

MTX grubunun serum üre düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken, serum kreatinin düzeyi anlamlı olarak arttı (Tablo 20). MTX grubuna SSP verilmesi üre ve kreatinin seviyelerini K+SSP grubu seviyelerine getirdi. Kontrol grubuna SSP uygulaması, kontrol grubuna kıyasla üre ve kreatinin seviyelerini önemli ölçüde azalttı ancak üre ve kreatinin seviyeleri hala normal aralıktaydı (Tablo 20).

Tablo 20. Serum üre and kreatinin düzeyleri

	K		K+SSP		MTX		MTX+SSP	
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort.**	**SD**
Üre (mg/dL)	28.1	0.83	23.0 *•	1.41	20.2 *	1.17	24.0 * +•	0.32
Kreatinin (mg/dL)	0.77	0.04	0.47 * •	0.03	1.03 *	0.06	0.51* +•	0.07

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı

6.5.2. Sitokin sonuçları

TNF-α ve IL-6 seviyeleri MTX grubunda K grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. MTX grubuna SSP verilmesi TNF-α ve IL-6 seviyelerini MTX grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır. K grubuna SSP verilmesi TNF-α ve IL-6 seviyelerini K grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır (Tablo 21).

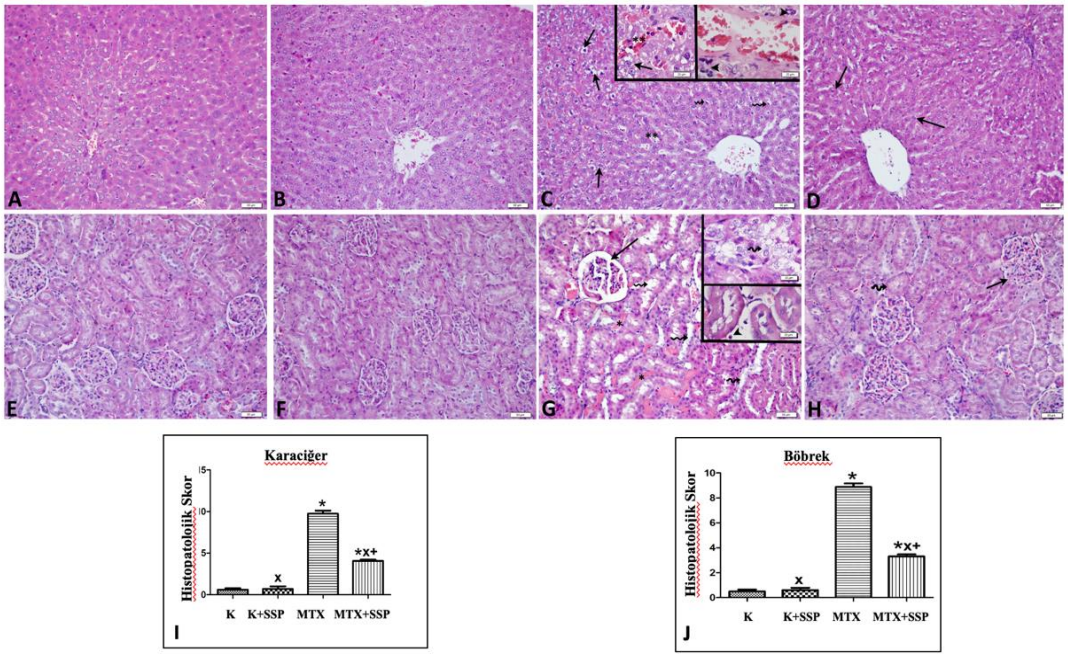
Tablo 21. Tüm gruplarda serum sitokin düzeyleri

	K		K+SSP		MTX		MTX+ SSP		P (Anova)
	Ort	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	**Ort**	**SD**	
TNF-α (pg/mL)	0,61	0,01	1,05*	0,05	0,17*+	0,004	0,36*+•	0,007	<0,0001
IL-6 (pg/mL)	0,54	0,006	0,57*	0,03	0,11*+	0,002	0,22*+•	0,02	<0,0001

SD: Standart sapma, **Ort:** Ortalama, **K**: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu

Kontrol grubunda n= 6, diğer gruplarda n=8'dir. (*) p< 0,05 kontrol grubuna göre anlamlı, (+) p< 0,05 K+ SSP'ye göre anlamlı, (●) p< 0,05 MTX grubuna göre anlamlı

6.6. Karaciğer ve Böbrek Dokusu Histoloji Sonuçları



K: Kontrol grubu, **K+ SSP**: Kontrol+ süt serum proteini grubu, **MTX**: Metotreksat grubu, **MTX+ SSP**: Metotreksat+ süt serum proteini grubu **(*):** Kontrol grubuna göre p<0,05, **(x):** MTX grubuna göre p<0,05, **(+):** K+SSP grubuna göre p<0,05, n=8

Şekil 25. Deney gruplarında karaciğer ve böbrek dokularının histolojik olarak incelenmesi

Kontrol ve K+SSP gruplarında (A ve B) düzenli karaciğer parankim mevcuttur. MTX grubunda (C), dejenere hepatositler (oklar), belirgin sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon (**), aktive edilmiş Kupffer hücrelerinin sayısında artış (kırık oklar), inflamatuar hücre infiltrasyonu (ok başları) tespit edilmiştir. MTX+SSP grubunda (D) karaciğer parankiminin bazı bölgelerinde hepatositlerde hafif vakuoler dejenerasyonun yanı sıra hepatosit yapısında iyileşme (oklar) gözlenmiştir. Kontrol ve K+SSP gruplarında (E, F) düzenli böbrek morfolojisi görülmektedir. MTX grubunda (G), Bowman boşluğunda belirgin glomerüler konjesyon ve dilatasyon (ok), inflamatuar hücre inflamasyonu (ok başı), şiddetli vasküler konjesyon (*) ve tübüler dejenerasyon (kırık oklar) saptanmıştır. MTX+SSP grubunda (H) böbreğin çoğu bölgesinde normal glomerüler (ok) ve tübüler (kırık ok) yapılar mevcuttur (A-H); HE

boyama, bar (çubuk): 50 μm, ekli küçük resim: 20 μm. Deney gruplarında karaciğer (I) ve böbrek (J) dokusunun histopatolojik skorunun grafiği.

Kontrol ve K+SSP gruplarının ışık mikroskobik değerlendirmesine göre, hepatositlerin ve sinüzoidler düzenli dizilişte olup normal karaciğer morfolojisine sahiptir. MTX grubunda, hepatositlerde ciddi vakuolar dejenerasyon ve piknotik çekirdek, artmış aktif Kupffer hücre sayısı, enflamatuar hücre infiltrasyonu ve belirgin sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon, morfolojik hasarın belirgin özelliklerini ortaya koymaktadır. Öte yandan, MTX+SSP grubunda aktif Kupffer hücre sayısında azalma ve enflamatuar hücre infiltrasyonu, azalmış sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon ile hepatositlerde hafif vakuoler dejenerasyon gözlenmiştir. MTX tedavisi karaciğer dokusunun histopatolojik skorunu kontrol ve K+SSP grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artırmıştır ($p<0.05$).

Kontrol ve K+SSP gruplarında glomerül ve tübülleri içeren düzenli böbrek parankimi gözlenmiştir. Metotreksat tedavisi, tübüllerde belirgin bir dilatasyona ve tübüler hücrelerde dejenerasyona, belirgin vasküler ve glomerüler konjesyona, Bowman boşluğunda genişlemeye ve interstisyumda enflamatuar hücre infiltrasyonuna neden olmuştur. MTX+SSP grubunda ise hafif glomerüler ve vasküler konjesyon, Bowman boşluğu dilatasyonunda ve interstisyumda inflamatuar hücre inflamasyonunda gerileme, dilate tübüllerde ve dejenere tübüler hücrelerde düzelme gözlenmiştir. MTX grubundaki böbrek dokusunun histopatolojik skoru, kontrol ve K+SSP grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksektir ($p <0.05$). SSP'nin MTX grubuna uygulanması bu histopatolojik skoru önemli ölçüde tersine çevirmiştir ($p <0.05$).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Metotreksat (MTX); antimetabolit, antikanserojen, antiinflamatuar etkili bir ilaç olup otoimmun ve inflamatuar pek çok hastalığın tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Kocaman ve Çolakoğlu, 2013). Geniş kullanım alanlarına sahip olmasına rağmen MTX dokularda hasar oluşturarak hepatotoksisite, nefrotoksisite, nörotoksisite, gastrointestinal toksisite gibi ciddi toksik etkiler oluşturabilmektedir (Kaya ve ark., 2021). MTX kullanımına bağlı olarak dokularda reaktif oksijen türleri artarak oksidatif strese neden olmaktadır (Jahovic ve ark., 2003; Olayinka ve ark., 2016; Moghadam ve ark., 2015). Bu nedenle birçok araştırmada MTX ile oluşturulan oksidatif strese karşı antioksidan özellikli çeşitli ajanların etkileri incelenmiştir (Armağan, 2015; Savran ve ark., 2017; Jahovic ve ark., 2003; Özgöçmen ve Yeşilot, 2021; Yuksel ve ark., 2016; Olayinka ve ark., 2016). Bu doğrultuda çalışmamızda, sıçanlarda MTX ile oluşturulan karaciğer ve böbrek hasarına karşı antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinen süt serum proteinlerinin olası etkileri incelenmiştir.

MTX; deney hayvanı modellerinde çoğunlukla kaşeksi, anoreksiya, bağırsak mukoziti, sindirim-emilim bozukluğu oluşturmak için kullanılmıştır (Boukhettala ve ark., 2009; Leblond ve ark., 2008; Sinno ve ark., 2010). Fox ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada MTX'ın sıçanlarda enterit oluşturmadan ağırlık kaybına yol açtığı gösterilirken (Fox ve ark., 1988), Jahovic ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada MTX'ın sıçanlarda malabsorpsiyon ve enterokolit nedeniyle ağırlık kaybına uğradıkları belirtilmiştir (Jahovic ve ark., 2004). Çalışmamızda sıçanların ağırlıkları karşılaştırıldığında MTX grubundaki sıçanların yem tüketimi ve ağırlıklarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ve ayrıca enterit oluşmadığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada karaciğer ve böbrek dokularında MTX' in neden olduğu oksidatif hasar sonucunda lipid peroksidasyon seviyesinin arttığı ve GSH seviyesinin azaldığı, SOD ve GST aktivitelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Uygulanan dozda MTX oksidatif strese neden olurken, karaciğer ve böbrek NO seviyelerinde ve TF aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır.

MTX' in serum üre ve kreatinin düzeylerine etkisini incelediğimizde serum üre seviyesinin kontrol grubuna göre azaldığı ve serum kreatinin seviyesinin ise arttığı saptanmıştır. Moodi ve arkadaşları bizim bulgularımızdan farklı olarak 20 mg/ kg MTX uyguladıkları sıçanlarda üre ve kreatinin seviyelerini artmış olarak tespit etmişlerdir (Moodi ve ark., 2019). Çalışmamızda serum üre konsantrasyonunun azalmasının nedeninin yem tüketiminin azalması ve ayrıca karaciğer hasarına bağlı olarak üre sentezinin azalması olduğu düşünülmektedir. Serum kreatinin konsantrasyonun artışının nedeni ise MTX ile oluşturulan böbrek hasarıdır.

Serum TNF-α ve IL-6 düzeyleri MTX uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Bu bulgular MTX'in immün baskılayıcı özelliklerini destekleyen literatürdeki çalışmalar ile uyumludur (Kim ve diğerleri, 2009; Olsen ve diğerleri, 2014).

MTX' ın karaciğer dokusunda hasar oluşturma mekanizması tam anlamıyla netlik kazanmamakla beraber, hepatik folat rezervlerinin tükenmesinin ve karaciğerde metotreksat-poliglutamat oluşumunun MTX hepatotoksisitesinin olası nedenleri olabileceği düşünülmektedir (Bedoui ve ark., 2019).

Çalışmamızda karaciğer dokusunun histolojik analizinde, MTX grubunda, hepatositlerde ciddi vakuolar dejenerasyon, piknotik çekirdek, artmış aktif Kupffer hücre sayısı, enflamatuar hücre infiltrasyonu, belirgin sinüzoidal dilatasyon ve konjesyonun eşlik ettiği morfolojik hasar gözlenmiştir.

MTX kaynaklı nefrotoksisitenin mekanizması da belirsizliğini hala korumaktadır. MTX malik enzimi inhibe ederek hücrelerde NADP'den NADPH oluşumunu azaltmaktadır. NADPH, glutatyon redüktaz tarafından kullanılarak antioksidan özelliğe sahip olan indirgenmiş glutatyon (GSH) oluşturmaktadır. Glutatyon redüktaz enzimi NADP'yi yeterli miktarda kullanamadığı zaman GSH miktarı azalır ve hücreler oksidatif strese karşı daha savunmasız hale gelir. (Fang ve ark., 2002; Jahovic ve ark., 2003). Li ve arkadaşları, sıçanlarda düşük doz MTX uygulaması ile oluşturdukları böbrek yetmezliği modelinde oksidatif stresteki artışın böbrekte MTX birikimine neden olduğunu ve bunun sonucunda da glomerüler ve tübüler hasarın oluştuğunu göstermişlerdir (Li ve ark., 2016).

Çalışmamızda böbrek dokusunun histolojik analizinde, metotreksat verilmesinin böbrek tübüllerinde belirgin bir dilatasyona ve tübüler hücrelerde dejenerasyona, belirgin vasküler ve glomerüler konjesyona, Bowman boşluğunda genişlemeye ve interstisyumda enflamatuar hücre infiltrasyonuna neden olduğu belirlenmiştir.

Jahovic ve arkadaşları, MTX ile oluşturulan hepatorenal oksidatif hasarda melatoninin koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında; MTX uygulamasıyla karaciğer ve böbrekte lipid peroksidasyon seviyelerinde artış gözlerken, GSH düzeylerini azalmış olarak tespit etmişlerdir. Tedaviye melatonin eklenmesiyle bu etkiler tersine çevrilmiş ve her iki dokuda da lipid peroksidasyon seviyeleri azalırken, GSH seviyeleri de artmış olarak tespit edilmiştir (Jahovic ve ark., 2003). Çetinkaya ve arkadaşlarının metotreksat ile oluşturulan hepatotoksisitede N-asetilsisteinin etkisini inceledikleri çalışmada da karaciğer dokusunda lipid peroksidasyon seviyelerinde artış, GSH seviyesi ve SOD aktivitesinde azalma belirlenmiştir. N-asetilsisteinin uygulaması ile oksidatif stresin azaldığı belirtilmiştir (Cetinkaya ve ark., 2006). Abdel-Daim ve arkadaşları MTX'in karaciğer, böbrek ve kalp dokularında oluşturduğu hasara karşı bir flavonoid olan diosminin rolünü araştırmışlardır. MTX uygulaması ile sıçanların karaciğer ve böbrek dokusunda kontrol grubuna göre MDA ve NO seviyelerinin arttığını; GSH, GST ve SOD seviyelerinin ise azaldığını tespit etmişler ve diosminin bu hasar üzerindeki olumlu etkilerini göstermişlerdir (Abdel-Daim ve ark., 2017).

Bu çalışmalara benzer olarak literatürde, MTX ile oluşturulan doku hasarlarına karşı C vitamini (Savran ve ark., 2017), resveratrol (Özgöçmen ve Yeşilot, 2021), kuersetin (Yuksel ve ark., 2016), berberin (Mehrzadi ve ark., 2018) ve gallik asit (Olayinka ve ark., 2016) gibi birçok antioksidan ajanın kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Biz de çalışmamızda süt serum proteinlerini antioksidan özelliklere sahip oldukları için kullandık.

Süt serum proteinleri kanser, immünomodülasyon, kardiyovasküler hastalıklar, diabetes mellitus, bağırsak fonksiyon bozuklukları, obezite yönetimi ve kas sentezinin iyileştirilmesi gibi hastalıkların önlenmesine yönelik birçok olumlu özellik sergileyen fonksiyonel gıdalar arasında yer almaktadır (Mehra ve ark., 2021).

Foisy-Sauve ve arkadaşları, süt serum proteinlerinden biri olan glikomakropeptit ve hidrolizatlarının, makrofajlarda süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz

enzimlerinin endojen antioksidan enzim aktivitelerini artırarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu engellediğini ve oksidatif strese karşı koruduğunu belirtmişlerdir (Foisy-Sauve ve ark., 2021). Flaim ve arkadaşları süt serum proteinlerinin antioksidan etkilerini inceledikleri çalışmalarında plazma glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesinde artış ve plazma ürik asit konsantrasyonunda azalma tespit etmişlerdir. Ayrıca yağ kütlesinde azalma ve kas kütlesinde artış olduğunu belirtmişlerdir (Flaim ve ark., 2017).

Çalışmamızda MTX grubuna SSP verilmesi ile iştah kaybının önlendiği, dolayısıyla sıçanların yem tüketiminin ve ağırlıklarının arttığı tespit edilmiştir. Kontrol grubuna SSP verilmesi de yem tüketiminde artışa neden olmuştur.

MTX grubuna SSP verilmesi karaciğer ve böbrek dokusunun MDA seviyesinin azalmasına, GSH seviyesinin, SOD ve GST aktivitelerinin artmasına neden olmuştur. Ayrıca MTX grubuna SSP verilmesi ile karaciğer TF aktivitesinin arttığı ve böbrek TF aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir.

MTX grubuna SSP verilmesi ile serum üre konsantrasyonun MTX grubuna göre arttığı ve serum kreatinin konsantrasyonunun ise azaldığı belirlenmiştir. Bu bulgular SSP verilen sıçanlarda karaciğer hasarının iyileştiğini ve bu nedenle serum üre konsantrasyonunun arttığını göstermektedir. Ayrıca serum kreatinin konsantrasyonunun azalması da böbrek fonksiyonlarının normale döndüğünü işaret etmektedir.

Süt serum proteinlerinin MTX grubuna verilmesi ile serum TNF- α ve IL-6 seviyeleri MTX grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. TNF- α ve IL-6 seviyelerindeki bu artışlar süt serum proteinlerinin, MTX ile baskılanan immün sistemi desteklediğini göstermektedir.

MTX grubuna SSP verilmesi ile aktif Kupffer hücre sayısında azalma ve enflamatuar hücre infiltrasyonu, azalmış sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon ile hepatositlerde hafif vakuoler dejenerasyon gözlenmiştir. Böbrek dokusunun histolojik analizinde, MTX grubuna SSP verildiğinde ise hafif glomerüler ve vasküler konjesyon, Bowman boşluğu dilatasyonunda ve interstisyumda inflamatuar hücre inflamasyonunda gerileme, dilate tübüllerde ve dejenere tübüler hücrelerde düzelme gözlenmiştir. Sonuç

olarak, histolojik incelemeler ile elde ettiğimiz bulgular da SSP'nin MTX ile oluşturulan karaciğer ve böbrek hasarını ortadan kaldırdığını göstermektedir. Ayrıca SSP uygulanan kontrol grubu sıçanlarının karaciğer ve böbrek dokusunda histolojik olarak bir hasar oluşmadığı da tespit edilmiştir.

Boukhettala ve arkadaşları, MTX tedavisinin protein metabolizmasında değişikliğe neden olduğunu bildirmiştir (Boukhettala ve ark., 2010). Çalışmalarında MTX verilmesi sonucunda sıçanların jejunal mukozasındaki protein sentezinin azaldığı; proteolizin ve özellikle lizozomal yolun arttığı belirtilmiştir (Boukhettala ve ark., 2009). Çalışmamızda MTX kaynaklı karaciğer ve böbrek dokusu protein profilinde değişim olup olmadığını tespit etmek için yaptığımız SDS-PAGE uygulaması sonucunda karaciğer dokusunun protein profilinin değişmediği, böbrek dokusunda ise bazı protein bantlarında azalmaya neden olduğu saptanmıştır. MTX grubuna SSP verilmesi böbrek dokusunun bozulan protein profilini düzeltmiştir. Bu sonuç, süt serum proteinlerinin azalan böbrek proteinlerinin telafi edilmesine katkı sağladığını göstermektedir.

Oral olarak uygulanan süt serum proteinleri gastrointestinal sindirime uğradığından süt serum proteinleri kaynaklı antioksidan özellikli biyoaktif peptidlerin oluşabileceği ve bu biyoaktif peptitlerin MTX ile oluşturulan karaciğer ve böbrek hasarının giderilmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, süt serum proteinleri MTX ile oluşturulan karaciğer ve böbrek hasarını iyileştirici yönde etki göstermiştir. Zengin protein içeriğine sahip süt serum proteinlerinin MTX tedavisinde uygun dozlarda kullanıldığında beslenmeyi destekleyici etkiye sahip olacağı düşünülmektedir.

8. KAYNAKÇA

Abdel-Daim MM, Khalifa HA, Abushouk AI, Dkhil MA, Al-Quraishy SA. Diosmin Attenuates Methotrexate-Induced Hepatic, Renal, and Cardiac Injury: A Biochemical and Histopathological Study in Mice. Oxid. Med. Cell. Longev. 2017; 1–10.

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

Ahmadzadeh A, Zamani N, Hassanian-Moghaddam H, Hadeiy SK, Parhizgar P. Acute versus chronic methotrexate poisoning; a cross-sectional study. BMC Pharmacol Toxicol. 2019; 20(1): 1-7.

Akdemir SE, Çelik P,Pırıldar T. Metotreksata Bağlı Gelişen Pulmoner Toksisite Resp Case Rep. 2016; 5(3): 169-173.

Akgül FY, Karaman AD. Süt ürünlerinde serum protein izolatı kullanımı. ADÜ ZİRAAT DERG. 2017; 14(1): 95-99.

Alfiya R, Sabu ST, Dharan SS. A detailed study of methotrexate treatment in ectopic pregnancy. Int J Res Hosp Clin Pharm 2020; 2(4): 85-92.

Armağan İ. Metotreksat 'ın karaciğer ve böbrekte neden olduğu hasarda oksidatif stresin rolü. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 2015; 22(4): 151-155.

Asvadi I, Hajipour B, Asvadi A, Asl NA, Roshangar L, & Khodadadi A. Protective effect of pentoxyfilline in renal toxicity after methotrexate administration. Eur. Rev. Med. Pharmacol. 2011; 15(9): 1003-1009.

Awad HS, Riad KF, Farghaly U. Management of Methotrexate Toxicity. J Adv Biomed Pharm Sci. 2021; 4: 32-36.

Babiak, RMV, Campello AP, Carnieri EGS, Oliveira, MBM. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. Cell Biochem Funct. 1998; 16(4): 283–293.

Bălănescu AR, Bojincă VC, Bojincă M, Donisan T, Bălănescu SM. Cardiovascular effects of methotrexate in immune-mediated inflammatory diseases. Exp Ther Med. 2019; 17(2): 1024-1029.

Banerjee D, Ercikan-Abali E, Waltham M, Schnieders B, Hochhauser D, Li WW, Fan J, Gorlick R, Goker E, Bertino JR. Molecular mechanisms of resistance to antifolates, a review. Acta Biochim Pol. 1995; 42(4): 457-464.

Barnhart K, Coutifaris C, Esposito, M. The pharmacology of methotrexate. Exp Opin Pharmacother. 2001; 2(3): 409-417.

Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, Ralandison S, Gasque P. Methotrexate an old drug with new tricks. Int J Mol Sci, 2019; 20(20): 5023.

Beutler E. Glutathione in Red Cell Metabolism: A manual of Biochemical methods, 2nd ed., Grune and Stratton, New York; 1975, s: 112-114.

Boukhettala N, Leblond J, Claeyssens S, Faure M, Le Pessot F, Bôle-Feysot C, Hassan A , Mettraux C, Vuichoud J , Lavoinne A. Methotrexate induces intestinal mucositis and alters gut protein metabolism independently of reduced food intake. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; 296(1): E182-E190.

Boukhettala N, Ibrahim A, Aziz M, Vuichoud J, Saudan KY, Blum S, Déchelotte P, Breuillé D, Coëffier Ms. A Diet Containing Whey Protein, Free Glutamine, and Transforming Growth Factor-β Ameliorates Nutritional Outcome and Intestinal Mucositis during Repeated Chemotherapeutic Challenges in Rats. J Nutr. 2010; 140(4): 799-805.

Boussios S, Pentheroudakis G, Katsanos K, Pavlidis N. Systemic treatment-induced gastrointestinal toxicity: incidence, clinical presentation and management. Ann Gastroenterol. 2012; 25(2): 106-118.

Cakir B, Tunali-Akbay T. Potential anticarcinogenic effect of goat milk-derived bioactive peptides on HCT-116 human colorectal carcinoma cell line. Anal Biochem. 2021; 622, 114166.

Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. Med Sci Monit, 2006; 12(8): BR274-278.

Cipriani P, Ruscitti P, Carubbi F, Liakouli V, Giacomelli R. Methotrexate: an old new drug in autoimmune disease. Exp Rev Clin Immunol. 2014; 10(11): 1519-1530.

Conway R, Carey JJ. Risk of liver disease in methotrexate treated patients. World J Hepatol. 2017; 9(26): 1092-1100.

Davoodi SH, Shahbazi R, Esmaeili S, Sohrabvandi S, Mortazavian A, Jazayeri S, Taslimi A. Health-related aspects of milk proteins. Iranian J Pharm Res. 2016; 15(3): 573-591.

Dinçoğlu AH, Ardıç M. Peynir altı suyunun beslenmemizdeki önemi ve kullanım olanakları. Harran Üniv Vet Fak Derg. 2012; 1(1): 54-60.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition, 2002; 18(10): 872-879.

Fisher MC, Cronstein BN. Metaanalysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate toxicity. J Rheumatol. 2009; 36(3): 539-545.

Flaim C, Kob M, Di Pierro AM, Herrman M, Lucchin L. Effects of a whey protein supplementation on oxidative stress, body composition and glucose metabolism among overweight people affected by diabetes mellitus or impaired fasting glucose: A pilot study. J Nutr Biochem. 2017; 50 (2017): 95-102.

Foisy-Sauvé M, Spahis S, Delvin E, Levy E. Glycomacropeptıde: A Bıoactıve Mılk Derıvatıve To Allevıate Metabolıc Syndrome Outcomes. ARS. 2021; 34 (3): 201-222.

Fox AD, Kripke SA, De Paula J, Berman JM, Settle RG, Rombeau JL. Effect of a Glutamine-Supplemented Enteral Diet on Methotrexate-Induced Enterocolitis. JPEN. 1998; 12(4): 325–331.

Gaies E, Jebabli N, Trabelsi S, Salouage I, Charfi R, Lakhal M, Klouz A. Methotrexate side effects: review article. J Drug Metab Toxicol. 2012; 3(4): 1-5.

Gautam M, Nadkarni N, Patil S, Godse K, Agarwal S. Review of systemic methotrexate therapy in pediatric dermatoses. Indian J Paediatr Dermatol. 2014; 15(2): 66-73.

Gupta C, Prakash D. Therapeutic potential of milk whey. Beverages. 2017; 3(3): 31.

Gür F, Güzel M, Öncül N, Yıldırım Z, Yıldırım M. Süt serum proteinleri ve türevlerinin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri. Akademik Gıda. 2010; 8(1): 23-31.

Habig WH, Jacoby WB. Assays for differentation of glutathion- s- transferases. Methods in Enzymology. 1981; 77: 398-405.

Howard SC, McCormick J, Pui CH, Buddington RK, Harvey RD. Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate. Oncol. 2016; 21(12): 1471-1482.

Iikuni N, Iwami S, Kasai S, Tokuda H. Noncardiogenic pulmonary edema in low-dose oral methotrexate therapy. Intern Med. 2004; 43(9): 846-851.

Ingram GIC, Hills M. Reference method for the one stage prothrombin time test on human blood. Thromb Haemostas. 1976; 36: 237-238.

Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yeğen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. J Pineal Res. 2003; 34(4): 282-287.

Kanarek N, Keys HR, Cantor JR, Lewis CA, Chan SH, Kunchok T, Abu-Remaileh M, Freinkman E, Schweitzer LD, Sabatini DM. Histidine catabolism is a major determinant of methotrexate sensitivity. Nature. 2018; 559(7715): 632-636.

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

Kaya K, Gürel A, İpek V. Metotreksat kaynaklı beyin hasarına karşı bromelainin potansiyel faydalı etkilerinin araştırılması. Pamukkale Tıp Dergisi. 2021;14(4): 846-853.

Khan UM, Selamoglu Z. Nutritional Values and Medical Perspectives of Whey Protein - A Review. J Tradit Med Clin Natur. 2019; 8(1): 281.

Kıroğlu Y, Cinbiş M, Bican M, Polat A. Metotreksat tedavisine bağlı nörotoksisite gelişen iki olgunun Klinik ve radyolojik incelemesi. Pamukkale Tıp Dergisi. 2008; (2): 109-112.

Kocaman N, Çolakoğlu N. Tekrarlayan dozlarda metotreksat uygulamasının sıçan karaciğer dokusu üzerine etkileri. Fırat Med J. 2013; 18(3): 141-145.

Korhonen H. Milk-Derived Bioactive Peptides: From Science to Applications. J Funct Foods I. 2009; 177-187.

Koźmiński P, Halik PK, Chesori R, Gniazdowska E. Overview of dual-acting drug methotrexate in different neurological diseases, autoimmune pathologies and cancers. Int J Mol Sci. 2020; 21(10): 3483.

Kume H, Okazaki K, Sasaki H. Hepatoprotective Effects of Whey Protein on D-Galactosamine-Induced Hepatitis and Liver Fibrosis in Rats. Bioscience, Biotechnol Biochem. 2006; 70(5): 1281–1285.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259): 680-685.

Leblond J, Le Pessot F, Hubert-Buron A, Duclos C, Vuichoud J, Faure M, Breuillé D, Dechelotte P, Coeffier M. Chemotherapy-induced mucositis is associated with changes in proteolytic pathways. Exp Biol Med. 2008; 233(2): 219-228.

Ledwozyw A, Michalak D, Stepien A, Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. Clin Chim Acta. 1986; 155: 275-283.

Li X, Abe E, Yamakawa Y, Yoneda G, Fujino R, Yamashita M, Iida Y, Jono H, Saito H. Effect of administration duration of low dose methotrexate on development of acute kidney injury in rats. J Kidney. 2016: 2(3): 3.

Lima A, Sousa H, Monteiro J, Azevedo R, Medeiros R, Seabra V. Genetic polymorphisms in low-dose methotrexate transporters: current relevance as methotrexate therapeutic outcome biomarkers. Pharmacogenom. 2014; 15(12): 1611-1635.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265-275.

Lucas CJ, Dimmitt SB, Martin JH. Optimising low-dose methotrexate for rheumatoid arthritis—A review. British J Clin Pharmacol. 2019; 85(10): 2228-2234.

Maksimovic V, Pavlovic-Popovic Z, Vukmirovic S, Cvejic J, Mooranian A, Al-Salami H, Mikov M, Golocorbin-Kon S. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. Mol Biol Rep. 2020; 47(6): 4699-4708.

Marshall K. Therapeutic applications of whey protein. Altern Med Rev. 2004; 9(2): 136-156.

McIntosh GH, Royle PJ, Le Leu RK, Regester GO, Johnson MA, Grinsted RL, Kenward RS, Smithers GW. Whey proteins as functional food ingredients? Intern Dairy J. 1998; 8(5-6): 425-434.

Mehra R, Kumar H, Kumar N, Ranvir S, Jana A, Buttar HS, ……& Guine R. Whey proteins processing and emergent derivatives: An insight perspective from constituents, bioactivities, functionalities to therapeutic applications. JFF. 2021; 87:104760.

Mehrzadi S, Fatemi I, Esmaeilizadeh M, Ghaznavi H, Kalantar H, Goudarzi M. Hepatoprotective effect of berberine against methotrexate induced liver toxicity in rats. Biomed. Pharmacother. 2018; 97: 233–239.

Minj S, Anand S. Whey proteins and its derivatives: Bioactivity, functionality, and current applications. Dairy. 2020; 1(3): 233-258.

Miranda KM, Michael GE, David AW. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrike. Nitric oxide. 2001; 5: 62-71.

Moghadam AR, Tutunchi S, Namvaran-Abbas-Abad A, Yazdi M, Bonyadi F, Mohajeri D, Mazani M, Marzban H, Łos MJ, Ghavami S. Pre-administration of turmeric prevents methotrexate-induced liver toxicity and oxidative stress. BMC Compl Altern Med. 2015; 15(1): 1-13.

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

Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of cupper status in rats ingesting lead acetate. Toxicol Appl Pharmacol. 1986; 82: 512-520.

Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. J Basic Clin Pharm. 2016; 7: 27–31.

Neradil J, Pavlasova G, Veselská R. New mechanisms for an old drug; DHFR-and non-DHFR-mediated effects of methotrexate in cancer cells. Klin Onkol. 2012; 25 (Suppl 2): 2S87-2S92.

Ohbayashi M, Suzuki M, Yashiro Y, Fukuwaka S, Yasuda M, Kohyama N, Kobayashi Y, Yamamoto T. Induction of pulmonary fibrosis by methotrexate treatment in mice lung in vivo and in vitro. J Toxicol Sci .2010; 35(5): 653-661.

Olayinka ET, Ore A, Adeyemo OA, Ola OS. Ameliorative effect of gallic acid on methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rat. J Xenobiot. 2016; 6(1): 14-18.

Özgöçmen M, Yeşilot Ş. The role of resveratrol in hepatatoxicity caused by methotrexate. MAE Vet Fak Derg. 2021; 6 (2): 57 – 63.

Panetta JC, Sparreboom A, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells. PLoS Comp Biol. 2010; 6(12): e1001019.

Quemeneur, L, Gerland LM, Flacher M, Ffrench M, Revillard JP, Genestier L. Differential Control of Cell Cycle, Proliferation, and Survival of Primary T Lymphocytes by Purine and Pyrimidine Nucleotides. J Immunol. 2003; 170(10): 4986–4995.

Radic I, Mijovic M, Tatalovic N, Mitic M, Lukic V, Joksimovic B, … Hudomal S. Protective effects of whey on rat liver damage induced by chronic alcohol intake. Human Exp Toxicol. 2019; 38(6): 632-645.

Reis CEG. Discussion of “Whey protein supplementation and its potentially adverse effects on health: a systematic review” — Unsubstantiated claims of adverse effects of whey protein supplementation on human kidney and liver function. Appl Physiol Nutr Metab. 2021; 46(1): 90-91.

Roghani M, Kalantari H, Khodayar MJ, Khorsandi L, Kalantar M, Goudarzi M, Kalantar H. Alleviation of liver dysfunction, oxidative stress and inflammation underlies the protective effect of ferulic acid in methotrexate-induced hepatotoxicity. Drug Design Develop Ther. 2020; 14: 1933-1941.

Rosenthal H. Determination of urea in blood and urine with diacetyl monoxime. Anal Chem. 1955; 27(12): 1980-1982.

S Askari B, Krajinovic M. Dihydrofolate reductase gene variations in susceptibility to disease and treatment outcomes. Curr Genom. 2010;11(8): 578-583.

Sahna KO, Cakir B, Tunali- Akbay T. Antiproliferative Activity of Whey and Casein Bioactive Peptides on Breast Cancer: An In Vitro and In Silico Study. Int J Peptide Res Ther. 2022; 28:128.

Saka S, Aouacheri O. The investigation of the oxidative stress-related parameters in high doses methotrexate-induced albino Wistar rats. J Bioequiv Availab. 2017; 9(2): 372-376.

Savran M, Cicek E, Doguc DK, Asci H, Yesilot S, Candan IA, … Ozer MK. Vitamin C attenuates methotrexate-induced oxidative stress in kidney and liver of rats. Physiol. Int.. 2017; 104(2): 139–149.

Shinde CG, Venkatesh MP, Kumar TP, Shivakumar HG. Methotrexate: a gold standard for treatment of rheumatoid arthritis. J Pain Palliat Care Pharmacother. 2014; 28(4): 351-358.

Sinno MH, Coquerel Q, Boukhettala N, Coëffier M, Gallas S, Terashi M. Ibrahim A, Breuillé D, Déchelotte P, Fetissov SO. Chemotherapy-induced anorexia is accompanied by activation of brain pathways signalling dehydration. Physiol Behav. 2010; 101(5): 639-648.

Slot C. Plasma creatinine determination a new and specific Jaffe reaction method. Scand. J. Clin. Lab. 1965; 17(4): 381-387.

Sotoudehmanesh R, Anvari B, Akhlaghi M, Shahraeeni S, Kolahdoozan S Methotrexate hepatotoxicity in patients with rheumatoid arthritis. Middle East J. Dig. Dis. 2010; 2(2): 104-109.

Świerkot J, Szechiñski J. Methotrexate in rheumatoid arthritis. Pharm Rep.. 2006; 58(473): 473-492.

Şener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan, F. Şirvancı S, Gedik N, Yeğen BC. L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. Cell Biol Toxicol. 2006; 22(1): 47-60.

Şentürk N. Metotreksat. Turkderm- Arch Turk Dermatol Venerology. 2016; 50(Suppl 1): 18-21.

Tsurusawa M, Niwa M, Katano N, Fujimoto T. Methotrexate Cytotoxicity as Related to Irreversible S Phase Arrest in Mouse L1210 Leukemia Cells. Japanese J Cancer Res.1990; 81(1): 85–90.

Tsutsumi R, Tsutsumi YM. Peptides and proteins in whey and their benefits for human health. Austin J Nutri Food Sci. 2014;1(1): 1002.

Tunalı- Akbay T, Şehirli 0, Ercan F, Şener G. Resveratrol Protects Against Methotrexate-lnduced Hepatic Injury in Rats. J Pharm Pharmaceut Sci 2010; 13(2):303-310.

Uğurlucan FG, İyibozkurt AC, Çetin C, Nehir A, Akhan S. Ektopik gebelik tedavisinde metotreksat kullanımı: Tedavi sonucunu etkileyen faktörler. Ege Tıp Dergisi. 2013; 52(4): 199-204.

Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M, Şentürk Ö, Avşar E, Haklar G, Çelikel Ç, Hulagu S, Tozun N. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. Dig Dis Sci. 2008; 53(4): 1071-1077.

Uygur A, Şingirik E, Yücel AH. Metotreksat Kaynaklı Hasarlarda Alfa Lipoik Asit'in Koruyucu Etkisi. Arc Med Rev J. 2019;28(3): 227-236.

Vasconcelos QDJS, Bachur TPR, Aragao GF. Whey protein supplementation and its potentially adverse effects on health: a systematic review. Appl Physiol Nutr Metab. 2021; 46(1): 27-33.

Yerlikaya O, Kınık Ö, Akbulut N. Peyniraltı Suyunun Fonksiyonel Özellikleri Ve Peyniraltı Suyu Kullanılarak Üretilen Yeni Nesil Süt Ürünleri. 2010; 35 (4): 289-296.

Yuksel Y, Yuksel R, Yagmurca M, Haltas H, Erdamar H, Toktas M, Ozcan O. Effects of quercetin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. Hum. Exp. Toxicol. 2016; 36(1): 51–61.

Yüksel AK, Yüksel M, Ürüşan H. Peynir Altı Suyunun Çeşitli Özellikleri ve Kullanım Olanakları. KSÜ Mühendislik Bilimleri Dergisi. 2019; 22(3): 114-125.

Zhou B, Xia X, Wang P, Chen S, Yu C, Huang R, ... , Yang L. Induction and amelioration of methotrexate-induced gastrointestinal toxicity are related to immune response and gut microbiota. EBioMed. 2018; 33: 122-133.

9. EKLER

EK 1. Tez Kaynaklı Sözel Bildiriler



OP6

The Effect of Whey Proteins on Methotrexate-Induced Liver and Kidney Damage

Elif Tufan[1], Göksun Sivas[1], Begüm Gürel Gökmen[1], Sümeyye Yılmaz Karaoğlu[1], Ercan Dursun[1], Dilek Özbeyli[2], Göksel Şener[3], Tuğba Tunalı-Akbay[1]

[1] Marmara University, Faculty of Dentistry, Department of Basic Medical Sciences, Istanbul, Turkey
[2] Vocational School of Health Services, Marmara University, Istanbul, Turkey
[3] Vocational School of Health Services, Fenerbahçe University, Istanbul, Turkey

Methotrexate (MTX) is a cytotoxic chemotherapy agent and an immunosuppressant that is widely used in the treatment of tumours, rheumatoid arthritis, and psoriasis. Whey proteins have antioxidant, antitumor, antihypertensive, antiviral, hypolipidemic and antibacterial properties. This study aims to determine the effect of whey protein on MTX induced liver and kidney damage in rats. For this purpose, rats were divided into four groups as control, control+whey, MTX, MTX+whey. A single dose of 20 mg/kg MTX was administered intraperitoneally to the MTX group. Control+whey and MTX+whey groups were given 2 g/kg whey protein concentrate by gavage every day for ten days. At the end of day 10, blood and tissue samples were taken for the biochemical analyzes.

Serum TNF-α and IL-6 values decreased, and IF-γ values did not significantly change in the MTX group. With the administration of whey protein to the rats treated with MTX, TNF-α and IL-6 values significantly increased compared to the MTX group, while IF-γ values did not change. An increase in lipid peroxidation and a decrease in glutathione levels were detected in the liver and kidney of the MTX given rats. Giving whey protein to the MTX treated rats decreased lipid peroxidation and increased glutathione levels in the liver and kidney tissues. In conclusion, while a decrease was detected in the blood cytokine levels of the MTX treated rats, oxidative damage was also detected in the liver and kidney tissues. Whey protein administration ameliorated the oxidative damage induced by MTX due to its antioxidant properties.

Keywords: Milk serum proteins, whey, methotrexate, liver, kidney, oxidative stress



CERTIFICATE OF APPRECIATION

ELIF TUFAN

Thank you for your contribution with Oral Presentation during the VIII. International Congress of Molecular Medicine which was held in Istanbul-Turkey on 09-12 November 2021.

«The Effect of Whey Proteins on Methotrexate-Induced Liver and Kidney Damage»

Elif Tufan, Göksun Sivas, Begüm Gürel Gökmen , Sümeyye Yilmaz Karaoğlu, Ercan Dursun , Dilek Özbeyli , Göksel Şener, Tuğba Tunalı-Akbay

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

hadmek Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

Sayın **ELİF TUFAN**

10.01.2022 - 21.01.2022 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi HADYEK tarafından İstanbul ilinde düzenlenen "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası" eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.

Düzenlenme Tarihi 05-04-2022

MÜSEM Belge No MS.2022.01183