



**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**ASİTRETİN VE METOTREKSAT UYGULANMIŞ RATLARDA TESTİS  
HÜCRE HASARI ÜZERİNE ALFA LİPOİK ASİTİN KORUYUCU  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

**Sevil İPLİKÇİOĞLU**

Danışman  
**Doç. Dr. Emine DIRAMAN**

**SAMSUN**  
2021

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI



ASİTRETİN VE METOTREKSAT UYGULANMIŞ  
RATLARDA TESTİS HÜCRE HASARI ÜZERİNE ALFA  
LİPOİK ASİTİN KORUYUCU ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Sevil İPLİKÇİOĞLU

Danışman

Doç. Dr. Emine DIRAMAN

SAMSUN  
2021

## TEZ KABUL VE ONAYI

Sevil İPLİKÇİOĞLU tarafından, Doç. Dr. Emine DIRAMAN danışmanlığında hazırlanan “ASİTRETİN VE METOTREKSAT UYGULANMIŞ RATLARDA TESTİS HÜCRE HASARI ÜZERİNE ALFA LİPOİK ASİTİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 19.2.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği / oy çokluğu ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Nurten KARA Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/>
			Kabul
Üye (Danışman)	Doç. Dr. Emine DIRAMAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/>
			Kabul
Üye	Dr. Öğretim Üyesi Rukiye DEMİR Samsun Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/>
			Kabul
			<input type="checkbox"/>
			Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY  
... / ... / ...  
Prof. Dr. Ali BOLAT  
Enstitü Müdürü

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI**

Hazırladığım yüksek lisans/doktora/sanatta yeterlik tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

İmza

17 /03 / 2021

Sevil İPLİKÇİOĞLU

## **TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI**

**ASİTRETİN VE METOTREKSAT UYGULANMIŞ RATLARDA TESTİS HÜCRE  
HASARI ÜZERİNE ALFA LİPOİK ASİTİN KORUYUCU ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 14.03.2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 11

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

İmza

14/01/ 2021

Doç. Dr. Emine DIRAMAN

## ÖZET

### ASİTRETİN VE METOTREKSAT UYGULANMIŞ RATLARDA TESTİS HÜCRE HASARI ÜZERİNE ALFA LİPOİK ASİTİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevil İPLİKÇİOĞLU

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Şubat/2021

Danışman: Doç. Dr. Emine DIRAMAN

Bu çalışmada asitretin (ACT) ve metotreksat (MTX) etken maddelerinin ve alfa lipoik asitin (ALA) rat testis dokusunda süperoksit dismutaz (SOD) ve mangan süperoksit dismutaz (MnSOD) aktivitelere etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada, toplam 50 tane Wistar albino erkek rat kullanılmıştır. Çalışma grupları, Kontrol grubu (K), ALA grubu, ACT+MTX grubu ve ACT+MTX+ALA grubu olarak oluşturulmuştur. Fareler enjeksiyon öncesi 24 saat aç bırakılmıştır. Enjeksiyon işlemleri her sabah aynı saatte gerçekleştirilmiştir. ACT, MTX ve ALA %0.9'luk NaCl'de çözülmüştür. ACT (20mg/kg/gün), MTX (20mg/kg/hafta), ALA (50mg/kg/gün) ve bunların kombinasyonları da vücut ağırlığı düzeyinde intraperitoneal enjeksiyon ile ratlara verilmiştir. Ratlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiş ve testisleri kalp perfüzyonundan sonra inceleme için çıkarılmıştır. Ratlardan alınan testis doku örneklerinde, sitozolik süperoksit dismutaz (SOD) ve mangan süperoksit dismutaz (MnSOD) enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

ACT+MTX verilen grupta K'ya göre sitozolik SOD enzimi aktivitesinde ve mitokondriyal MnSOD enzimi aktivitesinde ise aktivasyon meydana gelmiştir. Bu durum da MnSOD'un mitokondriyal bir enzim olduğu düşünüldüğünde çalışmada kullanılan etken maddelerden kaynaklı radikal hasara ilk yanıtın mitokondriyal seviyede verildiğini düşündürmektedir. Bu iki etken maddeyle birlikte antioksidan olarak ALA'nın verilmesi sonucu enzim aktivitelerinin inhibisyonu gözlenmiştir. Sonuç olarak, çalışmalarımızda, ACT ve MTX'e karşı ALA'nın koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur.

Ayrıca Bulgularımızı değerlendirdiğimizde ise mitokondriyal seviyede ALA'nın testis dokusunda ACT ve MTX kaynaklı oksidatif hasara karşı daha koruyucu etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

**Anahtar Sözcükler:** Alfa Lipoik Asit, Asitretin, Metotreksat, Testis,

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF ALPHA LIPOIC ACID ON TESTICLE CELL DAMAGE IN ACITRETIN AND METHOTREXATE APPLIED RATS

Sevil İPLİKÇİOĞLU

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Department of Biology

Master, February /2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emine DIRAMAN

In this study, the effects of acitretin (ACT) and methotrexate (MTX) active ingredients and alpha lipoic acid (ALA) on superoxide dismutase (SOD) and manganese superoxide dismutase (MnSOD) activities in rat testis tissue were investigated.

In this study, a total of 50 male Wistar albino rats were used. Study groups were formed as Control group (K), ALA group, ACT + MTX group and ACT + MTX + ALA group. Mice were fasted for 24 hours before injection. Injection procedures were performed every morning at the same time. ACT, MTX and ALA were dissolved in 0.9% NaCl. ACT (20mg / kg / day), MTX (20mg / kg / week), ALA (50mg / kg / day) and their combinations were given to rats by intraperitoneal injection at body weight level. Rats were sacrificed by cervical dislocation and their testicles removed for examination after heart perfusion. Cytosolic superoxide dismutase (SOD) and manganese superoxide dismutase (MnSOD) enzyme activities were measured in testicular tissue samples taken from rats.

When the ACT + MTX given group was compared with the K group, activation occurred in both cytosolic SOD and mitochondrial MnSOD enzyme activities. Inhibition of enzyme activities was observed as a result of the administration of ALA as an antioxidant together with these two active ingredients. As a result, in our studies, it was found that ALA has a protective effect.

When we evaluate our findings, we can say that ALA at the mitochondrial level has a more protective effect against ACT and MTX-induced oxidative damage in testicular tissue.

**Keywords:** Alpha lipoic acid, Acitretin, Methotrexate, Testis,

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde başlamış olduğum yüksek lisans eğitimim boyunca tüm çalışmalarında bilgisini ve desteğini esirgemeyen, bana katmış olduğu bütün tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım, değerli hocam Doç. Dr. Emine Dıraman'a, bilimsel katkı ve deneyimleri ile destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Zafer Eren'e, Dr. Öğretim Üyesi Banu Eren'e, yüksek lisans eğitim hayatımın başlamasına vesile olan, hayatıma her zaman ışık katan, beni her zaman destekleyen ve yol gösteren, tüm tez çalışmalarım sırasında bilgisi, sabrı ve tecrübeleri ile yanımda olan varlığı ile bana güç veren bilimsel ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, ailemden biri olan değerli hocam Dr. Fatma Gönül Solmaz'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında bana yardımcı olan, desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim, yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübeleriyle yanımda olan sevgili dostum, meslektaşım Shadi Sadıgh'a, tez dönemimde benden sevgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, yanımda olan değerli arkadaşım Kimyager Özge Şahin'e çok teşekkür ederim. Bütün hayatım boyunca her zaman desteklerini esirgemeyen, hep yanımda sevgilerini hissettiğim, Babam Mehmet Muzaffer İplikçioğlu, Annem Sevgi İplikçioğlu'na teşekkür ederim. Canım ailem bu tez size ithafen yazılmıştır.

Tüm Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü hocalarıma ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Sevil İPLİKÇİOĞLU

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Testis Anatomisi.....	5
2.2. Metotreksat.....	5
2.2.1. Tarihçesi .....	5
2.2.2. Farmakokinetiği.....	6
2.2.3. Farmokodinamiği.....	7
2.2.4. Etki Mekanizması .....	8
2.2.5. Dozaj ve uygulama .....	9
2.2.6. Yan etkileri ve Kullanım alanları .....	10
2.3. Asitretin .....	11
2.3.1. Kimyasal yapısı ve etki mekanizması.....	11
2.3.2. Farmakokinetiği.....	12
2.3.3. Dozaj ve uygulama .....	14
2.3.4. Asitretinin yan etkileri ve yapılan çalışmalar .....	14
2.4. Serbest Radikaller.....	16
2.4.1. Süperoksit Radikali.....	18
2.4.2. Hidrojen peroksit .....	18
2.4.3. Hidroksil radikali .....	18
2.4.4. Serbest radikallerin kaynakları .....	19
2.4.5. Serbest radikallerin hücre ve dokularda yol açtığı zararlar .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b> 20
2.4.6. Serbest radikal hasarının neden olduğu klinik durumlar .....	20
2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri .....	21
2.5.1. Antioksidanların etki mekanizmaları.....	21
2.5.2. Süperoksit dismutaz (SOD) .....	22
2.5.3. Mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD).....	22

2.5.4. Alfa lipoik asit .....	23
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>26</b>
3.1. Deneyleerde kullanılan farelerin elde edilmesi .....	26
3.2. Farelere uygulanan maddeler .....	26
3.3. Araştırma Gruplarının Oluşturulması .....	27
3.4. Fare testisinin homojenizasyonu ve sonikasyonu.....	28
3.5. Fare Testisinin Santrifigasyonu.....	29
3.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini .....	29
3.7. Mitokondriyal Süperoksit Dismutaz (MnSOD) Aktivite Tayini.....	31
3.8. İstatistiksel Analiz .....	32
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>33</b>
4.1. Sitolik Süperoksit Dismutaz Aktivite Değişimi .....	33
4.2. Sitolik Süperoksit Dismutaz Aktivitesinde MTX+ACT ile MTX+ACT+ALA Gruplarının Karşılaştırılması .....	35
4.3. Mangan Süperoksit Dismutaz Aktivite Değişimi.....	37
4.4. Mangan Süperoksit Dismutaz Aktivitesinde MTX+ACT ile MTX+ACT+ALA Gruplarının Karşılaştırılması .....	39
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>40</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>46</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>47</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	:Santigrat derece
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	:Singlet oksijen
Dk	:Dakika
Gr	:Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:Hidrojen peroksit
HNO <sub>2</sub>	:Nitrik asit
HO <sub>2</sub>	:Hidroperoksil
HOBr	:Hipobromöz asit
HOCl	:Hipokloröz asit
Kg	:Kilogram
L	:Litre
LOO·	:Lipit peroksil
LOOH	:Lipit peroksit
M	:Molar
Mg	:Miligram
mL	:Mililitre
mM	:Milimolar
Mn	:Mangan
Na	:Sodyum
Ni	:Nikel
Nm	:Nanometre
NO <sup>-</sup>	:Nitroksil anyonu
NO	:Nitrik oksit
NO <sup>+</sup>	:Nitroksil katyonu
NO <sub>2</sub>	:Nitrojen dioksit
NO <sub>2</sub> Cl	:Nitril klorid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	:Süperoksit
O <sub>3</sub>	:Ozon
OH	:Hidroksil
Rmp	:Dakikadaki devir sayısı
RO	:Alkoksil
ROO <sup>-</sup>	:Peroksil

Sn	:Saniye
Zn	:Çinko
ml	:Mikrolitre
ACT	:Asitretin
ALA	:Alfa lipoik asit
AMP	:Adenozin monofosfat
CAT	:Katalaz
CuZn-SOD	:Bakır-çinko süperoksit dismutaz
DHF	:Dehidrofolat
DHFR	:Dihidrofolat redüktaz
DHLA	:Dihidrolipoik asit
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik asit
Duvb	:Darbanlı ultraviyole
EC-SOD	:Ekstraselüler süperoksit dismutaz
EDTA	:Etilendiamin tetraasetik asit
FDA	:Food and Drug Administration
GIS	:Gastro intestinal sistem
GSH-Px	:Glutasyon peroksidaz
i.v	:İntravenöz
i.p	:İntraperitoneal
LD	:Letal doz
MHC	:Major histokompabilite kompleks
MnSOD	:Mangan süperoksit dismutaz
MTX	:Metotreksat
NaCl	:Sodyum klorür
NaCN	:Sodyum siyanür
OD	:Optik dansite
PUVA	:Psoralen ultraviyole A
RAR	:Retinoik asit reseptörü
RNA	:Ribonükleik asit
RNT	:Reaktif nitrojen türleri
ROT	:Reaktif oksijen türleri
RXR	:Retinoid X reseptörü

SOD	:Süperoksit dismutaz
THF	:Tetrahidrofolat
UV	:Ultraviyole
UVA	:Ultraviyole A
UVB	:Ultraviyole B
VYA	:Vücut yüzey alanı
ZnSOD	:Çinko süperoksit dismutaz



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Testis anatomisi .....	4
Şekil 2.2. MTX'in kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.3. Folik asitin kimyasal yapısı .....	7
Şekil 2.4. ACT kimyasal yapısı .....	9
Şekil 2.5. Vitamin A kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.6. ACT ve etretinatın ana metabolitleri .....	11
Şekil 2.7. Serbest radikallerin oluşma mekanizması.....	14
Şekil 2.8. ALA ve DHLA kimyasal yapıları.....	18
Şekil 3.1. Deneysel ratlarda kullanılan ratlar.....	20
Şekil 3.2. Ratlara enjeksiyon işleminin uygulanması .....	21
Şekil 3.3. Farelerin karın ve göğüs kısımlarının açılması .....	22
Şekil 3.4. Kalp perfüzyonu işlemi.....	22
Şekil 3.5. Sükroz içerisindeki testis dokuları .....	23
Şekil 4.1. ALA verilmiş ratlarda SOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi .	26
Şekil 4.2. ACT+MTX verilmiş ratlarda sitozolik SOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi.....	27
Şekil 4.3. ACT+MTX+ALA verilmiş ratlarda sitozolik SOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi .....	27
Şekil 4.4. ACT+MTX ile ACT+MTX+ALA verilmiş ratlarda karşılaştırılmış sitozolik SOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi .....	28
Şekil 4.5. ALA verilmiş ratlarda MnSOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi .....	29
Şekil 4.6. ACT+MTX verilmiş ratlarda MnSOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi.....	29
Şekil 4.7. ACT+MTX+ALA verilmiş ratlarda MnSOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi .....	30
Şekil 4.8. ACT+MTX ile ACT+MTX+ALA verilmiş ratlarda karşılaştırılmış MnSOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi .....	31

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo 4.1. K, ALA, ACT+MTX ve ACT+MTX+ALA' nın testis SOD değerleri ve standart sapmaları.....	36
Tablo 4.2. K, ALA, ACT+MTX ve ACT+MTX+ALA' nın testis MnSOD değerleri ve standart sapmaları.....	40



# 1. GİRİŞ

Sistemik ajanlar olarak bilinen metotreksat, asitretin ve siklosporin, biyolojik ajanlardan daha uzun yıllardır tedavi amaçlı kullanılmıştır. Bu nedenle de kısa ve uzun dönem göstermiş oldukları yan etkileri daha iyi bilinmektedir. Geleneksel sistemik ilaçların çoğunlukla oral yolla alınması ve daha az maliyetli olması gibi avantajları vardır (Menter vd., 2011).

İlaçta kalım, hastanın belli bir ilaçla tedavide kalma süresi olarak ve tedavinin başarısını gösteren önemli bir belirteçtir. İlacın etkililiği, güvenliği, hastada göstermiş olduğu yan etkisi ve hastanın tedaviden memnuniyeti gibi etkenlerin tümünü kapsamaması nedeniyle son yıllarda önem kazanan bir araştırma gereği olmuştur (Umezawa vd., 2013; Levin vd., 2014). İlaçta kalımı etkileyen faktörlerin belirlenmesi, hastaya özgü bir tedavi yaklaşımının geliştirilebilmesini ve böylelikle, tedaviye uyum ve hasta memnuniyetinin artmasını sağlayabilmektedir (Feldman vd., 2005; Yeung vd., 2013).

Metotreksat (MTX) bir folik asit (FA) antagonisti olup; antimetabolit özelliği dışında, antiproliferatif, antiinflamatuvar, antipsöriatik, immünosupresif, etkilerinin de olduğu bilinmektedir. Lenfoma, lösemi, osteosarkom, baş ve boyun bölgesinde bulunan tümörlerde, akciğer ve meme kanseri ile birlikte çeşitli kanser tiplerinde kemoterapide ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Feagan ve Alfadhli, 2004).

Yapılan çalışmalarda, MTX'in, antioksidan sistemin etkisini bozarak, hücreleri ROB(reaktif oksijen bileşikleri)'a karşı duyarlı hale getirip hasara neden olduğunu göstermektedir. Oksidatif stres, testis seminifer tübüllerinde hasara ve germ hücrelerinin azalmasına neden olmaktadır (Gao vd., 2002; Babiak, 1998). Bu yüzden, antioksidanlar oksidatif strese karşı testis dokusunun korunmasına yardım edebilir (Vernet vd., 2004).

Asitretin(ACT), vitamin A türevleri ya da onlarla kimyasal olarak ilişkili bileşikler içeren retinoid bir moleküldür (Orfanos vd., 1997). Retinoidler 3 gruba ayrılır. Bunlar; birinci (retinol, retinal, tretinoin [retinoik asit], isotretinoin); ikinci (etretinat ve asitretin) ve üçüncü (adapalen, aratinoid ve tazaroten) olmak üzere üç grupta incelenir (Orfanos vd., 1997; Mukherjee vd., 2006). ACT, etretinatın aktif metabolitidir ve ilaç olarak kullanılan ACT (Neotigason®, TEVA, Türkiye) sentetik

bir retinoid türevi olarak ikinci jenerasyon retinoid sınıfına dahildir. ACT, epitel hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını düzenleyici, antiinflamatuvar ve immünomodülatör etkilere sahiptir (Dogra ve Yadav, 2014).

ACT, genel olarak sedef hastalığı (psoriyazis) tedavisinde kullanılır. Yağ dokusunda daha az sekestre olması ve hızlı eliminasyonu özelliği ile etretinata tercih edilmesi sebebiyle son yıllarda kullanımı artmıştır. Genellikle oral yoldan kullanılan ACT'ye bağlı olarak çok farklı yan etkiler gözlemlenmiştir. ACT'nin en sık görülen yan etkileri arasında; keilitis (en sık), antiinflamatuvar ,cilt soyulması, kuru cilt ve rinit bulunur. ACT, karaciğer enzim düzeylerinde artışa sebep olabilir. ACT ile tedavi edilen hastalarda LDH ve trigliserit düzeylerinde yükselme de gözlemlenmiştir. En ciddi yan etki teratojenitedir (Dogra ve Yadav, 2014; Katz vd., 1999). Nadiren psödötümör serebri(Yalancı Beyin Tümörü) izlenmiştir (Katz vd., 1999). Ayrıca erektil disfonksiyon görüldüğüne dair vaka raporları ve bu konuda çalışmalar da mevcuttur (Coleman ve Macdonald, 1999; Rossi, 2009).

Serbest radikaller vücutta oksidatif stres sonucu oluşan endojen ve dışarıdan alınan bileşiklerdir. Biyolojik sistemlerin en çok etkilendiği serbest oksijen radikalleri yapısında bulunan paylaşılmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktif yapıda atom ve moleküllerdir. Başka bir deyişle dış orbitallerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron bulunan yapılardır ama elektrik yükü olarak pozitif, negatif veya nötr konumda olabilirler. Bu reaktif bileşiklere örnek olarak süperoksit anyonu ( $-O_2^-$ ) veya hidroksil radikali ( $-OH^-$ ) verilebilir. Reaktif oksijen türleri (ROT) hücrelerde metabolik ürün olarak ve/veya mitokondrial solunum zincirindeki tepkimeler sonucu meydana gelirler. Pek çok fizyolojik koşulda üretilen serbest oksijen radikalleri antioksidan savunma sistemi ile nötralize edilir. Serbest oksijen radikallerinin üretimi ve antioksidan savunma bariyeri arasındaki dengenin serbest oksijen radikalleri lehine artışı vücutta hasar oluşturmaktadır (Cross vd., 1987; Manson vd., 1983).

Alfa Lipoik Asit (ALA) canlılarda çeşitli dokulardan sentezlenen ve bazı sebzelerde bulunan hidrofilik ve lipofilik özelliği olan bir antioksidan moleküldür. İnsanlarda lipoik asit enerji oluşumunu içeren çeşitli 2-oksoasit dehidrogenazların bir parçasıdır. Okside lipoik asit ve redükte lipoik asit olmak üzere iki formda bulunur. Redükte form olarak adlandırılan dihidrolipoik asit biyolojik olarak aktiftir. Lipoik

asit pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonunda koenzim olarak görev yapmaktadır (Karaca, 2015)

ALA, güçlü antioksidatif etkileri nedeniyle serbest oksijen radikallerinden dolayı oluşan nöral hasarı tedavi etmek için uygun özelliklere sahiptir. Ayrıca, ALA'nın aynı zamanda kendisi gibi antioksidan olan E ve C vitamini rejenere ettiği gözlemlenmiştir (Van Dam vd., 2001).

Yapmış olduğumuz çalışmada in vivo koşullarda ACT ve MTX etken maddelerinin ve ALA'nın rat testis dokusunda sitozolik Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Mangan Süperoksit Dismutaz (MnSOD) aktivitelerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen veriler, bu alanda daha sonra yapılabilir olan çalışmalara güvenilir bir kaynak niteliği sağlayacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. TESTİS ANATOMİSİ

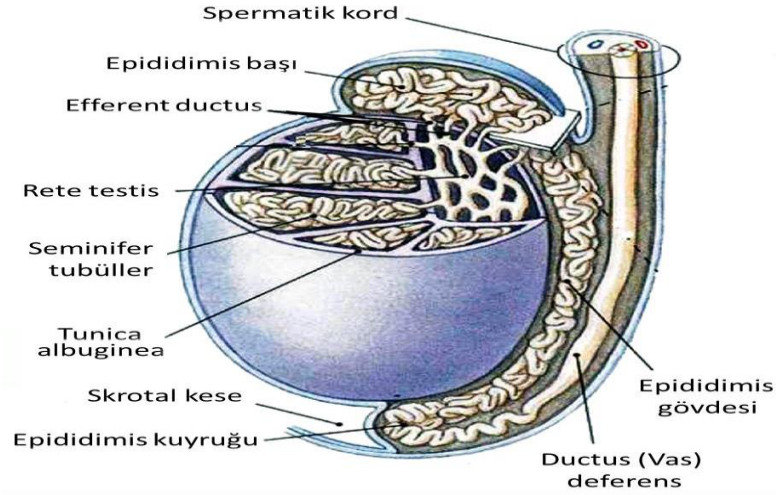
Testisler vücutta skrotum adı verilen kaslı bir kese içinde bulunur. Skrotum derisi, yağ bezleri, ter bezleri, duyuşal sinirler ve pigmentasyon bakımından oldukça zengindir. Skrotum testis haricinde spermatik kordon, kan ve lenf damarları ve testiküler sinir liflerini de sarar. Skrotum içerisinde spermanın taşınmasından sorumlu spermatik kordon bulunur. Spermatik kordon pubisin ön yüzünde inguinal kanalın içinden uzanarak testisin arkasından ve üstünden geçerek testise bağlanır. Anatomik olarak incelendiğinde skrotum içerisinde sol testis genel olarak sağ testisin altında asılı bir şekilde kalır. Skrotumun anatomik olarak katlarına bakıldığında subkutan katını musculus dartos (dartos kası) oluşturur (Mescher, 2016; Betts vd., 2014; Saladin, 2017).

Testisler üreme hücresi spermanın üretilip, olgunlaşması ve depolanmasından görevli organlardır. Hem ekzokrin (sperm) hem de endokrin (testesteron gibi) sekresyon yapan testisler pubertastan ölüme kadar aktif olarak kalırlar. Türlerine göre ağırlıkları değişiklik gösterir, Fakat şekil olarak incelendiğinde oval yapıda ve içte loblara bölünmüştür. Testisler sperm üreten yaklaşık olarak 900 sargılı seminifer tubullerden oluşmaktadır. Her testis dıştan içe doğru üç tabakayla kaplıdır.

1-Tunica vaginalis: pariyetal ve ince viseral tabakaya sahip seröz yapıda bir membrandır. Testislerin serbest hareketini sağlar.

2-Tunica albuginea: Yoğun fibröz bağ dokudan oluşan testisi saran bir kapsüldür.

3-Tunica vaskulosa: kan damarlarından zengin, ağ dokusundan oluşur (Bobrysheva, 2011; Betts vd., 2014; Mescher, 2016; Saladin, 2017).



Şekil 2.1. Testis dokusunun anatomik görünümü (Sembulingam, 2012)

Testisin posterior yüzü incelendiğinde mediastinum köken alan septula adında bağ doku testisin içine doğru yayıldığı ve tunica albuginea'ya çeşitli noktalardan bağlandığı görülür. Böylece testis bazaldan perifer'e doğru uzanan 200-300 adet piramidal loba ayrılmış olur (Sembulingam, 2012).

Her bir lobül interlobüler bağ dokusu tarafından sarılmış ve desteklenmiş, seminifer tübüller olarak bilinen genelde 4 tübülden oluşur. Her bir testiste yaklaşık 400 ila 900 seminifer tübül vardır. Her bir tüp, 30-70 cm uzunluğunda ve 150-300 µm çapındadır.

## 2.2. Metotreksat

### 2.2.1. Tarihçesi

Metotreksat (MTX, 4-amino-N<sup>10</sup>-metil folik asit) ilk olarak 1940'larda folik asitin özel bir antagonisti olarak geliştirilmiştir (Jukes, 1978; Chan ve Cronstein, 2002). Folik asit B kompleks ailesine ait bir vitamindir. Yapısı ve fonksiyonları moleküler olarak tanımlandıktan sonra, folik asitin araştırmacılar tarafından molekül yapısında küçük değişiklikler yapmışlardır. Elde edilen folik asit analoglarını tedavi amaçlı sentezlemeye başlamışlardır. Çalışmalarda ilk analog, sentetik reaksiyonda butiraldehit kullanılarak hazırlanan "ham x-metil folik asit"'tir". Bu molekülün 1946'da iki test organizması olan *Streptococcus faecalis* ve *Lactobacillus casei*'nin büyümesini engellediği gözlemlenmiştir. Araştırmacılar tarafından bakıldığında bu molekülün sıçanların büyümesini yavaşlattığı ve yine ortama katılan doğal folik asit ilavesinin büyümeyi tekrar devam ettirdiği bildirilmiştir. Bu durumda geliştiren analogun, folik asit analogu olmasına rağmen folik asidin hücresel fonksiyonlarını

bozduğu fakat bu durumun doğal folik asit katkısı ile tersine döndürülebileceği gösterilmiştir. Fakat daha sonra X-metil folik asitin insanlar üzerinde hayvan modelleriyle aynı etkiye sahip olmadığı gözlemlenmesi üzerine ortama folik asit eklenmesiyle etkileri kolayca geri döndürülemez olan başka analoglar sentezlenmesi ihtiyacını çıkarmıştır. Bu yeni bileşiklerin ilki, 4-amino-pteroyilglutamik asittir (4-amino PGA) . Bu bileşik aminopterin olarak adlandırılmış ve ilk kez Dr. Sydney Farber tarafından lösemili çocuklarda kullanılmıştır. Fakat aminopterinin önemli toksisitesi, araştırmacıları daha az toksik olan bir bileşik bulmaya yönlendirmiştir. Bu yeni bileşik, 1948'de bir kimya şirketi tarafından üretilmiş olan MTX olarak bilinen 4-amino-10-metil pteroyilglutamik asittir (Jukes, 1978).

MTX öncelikli olarak pürinlerin ve pirimidinlerin sentezini inhibe ederek malign hücrelerin çoğalmasını engellemektedir. Başlangıçta MTX bir ön ilaç olarak tasarlanmamasına rağmen emiliminden sonra aktif bir maddeye dönüştürülür. İndirgenmiş folat taşıyıcılarla hücreler tarafından alınır ve daha sonra hücreler içinde poliglutamatlara dönüştürülür (Chabner vd., 1985).

MTX, amopterin gibi bilinen bir folik asit analogudur. 1950 yılında akut lösemi, 1950-1960 yılları arasında ise diğer solid tümörler için kullanılan bir ilaçtır. 1980'li yıllara kadar yapılan deneysel çalışmalar, diğer endikasyonlar için düşük doz MTX kullanımının ilk raporları erişkin romatoid artrit için 1951 yılında ortaya koyulmuştur. Bu zaman diliminde juvenil romatoid artrit tedavisinde, MTX kullanımına bağlı ilk raporlar 1992'de Union of Soviet Socialist Republics tarafından yayınlanmıştır. MTX, juvenil idiyopatik artrit (JIA) poliartiküler seyirli tedavisinde standart haline getirilmiştir. MTX'in kanserler için etki mekanizması iyi anlaşılmış olsa da iltihaplı hastalıklardaki mekanizması sadece etkinlik keşfinden sonra açıklanmıştır. Son yıllarda, MTX kullanımı birçok uzmanlık ve anabilim dallarını kapsayacak şekilde hızla genişlemiştir (Hashkes vd., 2013).

MTX, solid tümörler ve hematolojik kanserlerin yanı sıra inflamatuvar ve otoimmün hastalıkları içeren sayısız hastalık tedavisinde kullanılan en başarılı ilaçlardan biridir (El-Sheikh vd., 2014).

### **2.2.2. Farmakokinetik**

MTX'in serumdaki yarılanma ömrü ilaç verildikten sonra 6-8 saat olup ilaç verildikten 24 saat sonra serumda bulunmaz. Absorpsiyon sonrasında MTX'in

%10'u karaciğerde 7-hidroksi MTX'a dönüştürülür. Hem MTX hem de metaboliti (7-OH MTX) öncelikle böbrekler tarafından küçük bir kısmı ise safra yoluyla atılır (Seideman vd., 1993; Edno vd., 1996).

MTX'in yaklaşık %50'si taşıyıcı proteinlere bağlanır ve yüksek doku dağılımı olan bir ilaçtır. Ekstra vasküler havuzda birikir. Metotreksat ve metaboliti hücreler tarafından alındığında bir kısmı poliglütamat türevlerine metabolize olur (Tian ve Cronstein, 2007). Diğer kısmı ise bağırsak bakterileri tarafından oluşturulan ve plazmada bulunan metaboliti 4-amino-4-deoksi-N-metilpteroik asite dönüştürülür. Eritrositlerdeki MTX-Glu konsantrasyonu ilacın terapötik etkinliği ile ilişkilidir (Tian ve Cronstein, 2007).

### 2.2.3. Farmakodinamik

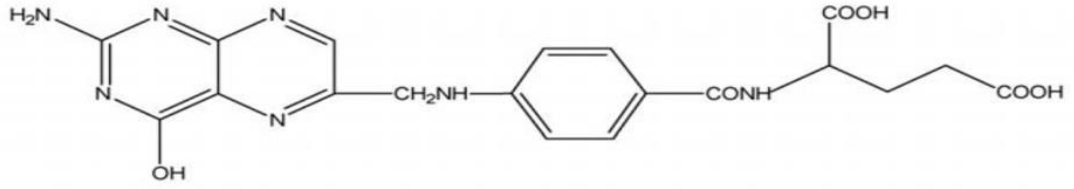
MTX, yapısal olarak folik asite benzemektedir. Bu sebeple emiliminin ve metabolizma yollarının birçoğunun aynı olduğu MTX, öncelikle indirgenmiş folat taşıyıcısı ile hücrenin içine taşınır (; Kremer ve Lee, 1986; Tian ve Cronstein, 2007). Sirkulasyonda bir grup MTX glutamat (MTX-PG1) halinde bulunurlar. Hücre içinde ise MTX değişen miktarlarda glutamat grupları olan çoklu metabolitlerden oluşurlar. Hücrenin içine girdikten sonra ekstra glutamat kısımları folylpolyglutamate sentaz (FPGS) enzimi ile birlikte MTX poliglütamatlarına dönüştürülür (Gangjee vd., 2002).

MTX-PG'ler, hücrenin dışına atılabilmesi için,  $\gamma$ -glutamil hidrolaz (GGH) enzimi ile monoglütamat formuna dönüştürür. MTX'in monoglütamat formunda hücre dışına ATP bağımlı ABC ailesi tarafından taşınırlar. Poliglütamasyon, dekonjügasyon, alım ve atılım arasındaki denge, MTX-PG'lerin zincir uzunluklarının (MTX-PG2-7'ye kadar) farklılığından kaynaklanmaktadır. Bağlanan glutamat moleküllerinin sayısına bağlı olarak (polyglutamation) molekülün büyüklüğü ve anyonik özelliğinin artması MTX tedavisi için önemlidir. MTX-PG'lerin konsantrasyonu ve dağılımı, MTX'in uygulama yoluna, dozuna ve yaş gibi faktörlere bağlıdır (Dervieux vd., 2004; Assaraf, 2006). MTX poliglütamat'landıktan sonra molekül büyüklüğünün artması hücre dışına pasif difüzyonla çıkmasını engeller. Eklenen glutamat zincir uzunluğuna göre hücre içinde tek zincir için (MTX-PG1), ABCC1'den ABCC4'e kadar olan taşıyıcılarla aktif olarak hücrenin dışına pompalanırken, iki veya üç zincir için (MTX-PG2 ve MTX-PG3) ABCC5 ve ABCG2 aktif taşıyıcıların kullanıldığı bildirilmiştir. Dört veya daha

fazla zincirin (MTX-PG4-7) taşınmasıyla ilgili henüz hiçbir kanıt yoktur. Zincir sayısının artması zaman içinde hücrede MTX-PG'lerin biriktirilmesiyle sonuçlanır. Ayrıca MTX'in poliglütamatlanmış biçimlerinin doğal MTX ile karşılaştırıldığında hedef enzimlere karşı daha yüksek afiniteye sahip olduğu ve MTX'in etkinliğinin poliglütamasyon seviyeleri ile arttığı düşünülmektedir (Assaraf, 2006).

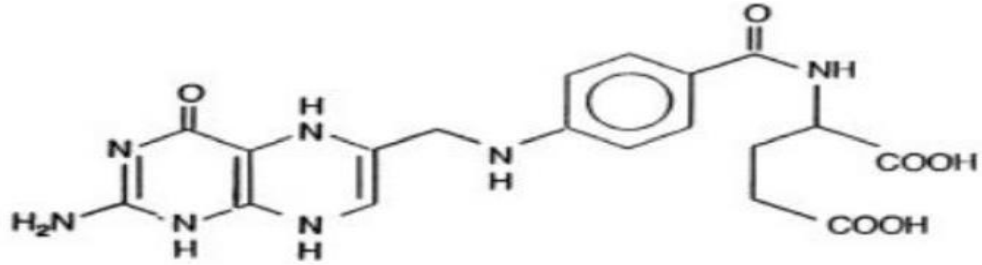
#### 2.2.4. Etki Mekanizması

Metoreksat, folik asidin 4-amino, N10 –metil analogudur.(Şekil 2.2 ) (Assaraf, 2006)



Şekil 2.2. MTX'in Kimyasal Yapısı (Assaraf, 2006)

Folik asit ise, DNA sentezinde önemli olan tetrahidrofolat öncülüdür (Kayaalp, 1998) (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. Folik asitin kimyasal yapısı (Kayaalp, 1998)

MTX timidilat sentezi (TS) güçlü bir şekilde inhibe eder. MTX ve MTX-PG'ler Dhfr ve Thf dönüştüren kilit enzim olan Dhfr'nin aktivitesini bloke eder (Lima vd., 2014).

MTX'in CAT, GPx ve SOD gibi enzimlerin aktivitesinde önemli azalmalara neden olduğu belirlenmiştir. Hücreler için MTX'in sitotoksik etkilerinin artan ROS'a karşı cevap veremeyen antioksidan mekanizmaya bağlı olduğu gösterilmiştir (Kumari S vd., 2016). Antioksidanlar ile Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) üretilmesi arasındaki denge bozulunca MTX dengenin ROS lehine kaymasına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, MTX'in metiyonin sentezi, katalaz, GPx ve SOD

gibi antioksidan enzimlerde azalmaya ve MTX'le tedavi olan hastaların beyin omurilik sıvısında S-Adenosil Metioninin (SAM) azalmasına neden olduğu bildirilmektedir. MTX'in neden olduğu SAM eksikliğinin, ROS'un artmasından sorumlu olduğu vurgulanmıştır (Kumari S vd., 2016).

MTX'in dolaylı olarak poliamin üreten enzimleri de inhibe etmesi sonucu poliamin üretiminin azaldığı ve bu durumun hücre içi ROS seviyelerinin artmasına yol açtığı ifade edilmiştir (Wessels vd., 2008).

### **2.2.5. Dozaj ve uygulama**

MTX, günümüzde başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Gastrointestinal tedavilerde 12 saatlik aralıklarla 3 bölünmüş dozdan oluşan bir rejimin uygulanması tavsiye edilmektedir. MTX, RA tedavisinde haftada bir kez tek doz olarak verilir (Bannwarth vd., 1996).

MTX genel olarak oral yol ile verilir. Dirençli ve ciddi artitli hastalarda, oral yerine subkutan yol ile uygulanması önerilmektedir (Lui vd., 2013). Genellikle, yetişkinlerde haftalık dozaj 5 ile 7.5 mg ve çocuklarda 0.3 mg /kg uygulanmalıdır. İlacın etkisi tedavi sırasında takip edilir. Yeterli gelmediği ve olumsuz yan etkilere sebep olmuyorsa, dozaj değişimi yapılabilir. 0.6mg/kg ve 25 mg'a kadar 6 ile 8 haftalık aralıklarla devamlı olarak artırılabilir. Yüksek dozlar uygulanan hastalarda olası yan etkilere ve endikasyonlara karşı dikkatli bir şekilde kullanılması önerilmelidir (Roeningh vd., 1998). MTX, günümüzde başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Gastrointestinal tedavilerde 12 saatlik aralıklarla 3 bölünmüş dozdan oluşan bir rejimin uygulanması tavsiye edilmektedir. MTX, RA tedavisinde haftada bir kez tek doz olarak verilir (Bannwarth vd., 1996).

Onkoloji hastalarına uygulanan dozlardan 100-1000 kat düşük dozlarda (1,000-33,000 mg/m<sup>2</sup>) uygulanma durumunda; antiinflamatuvar, hücre bölünmesini baskılayan etkisi nedeniyle testikuler kanser, psöriyazis, romatoid artritler, gastrointestinal kanalın ve karaciğerde oluşan bazı inflamatuvar hastalıklar ve şiddetli astım durumlarında uygulanmaktadır (Choudhury vd., 2001; Jahovic, 2003; Dökmeci, 2007; Nouri vd., 2009; Padmanabhan, 2009; Arora, 2011).

MTX, dozaj serumunun üzerinde uygulanabilir. MTX'in sitotoksik etkisi düşük konsantrasyonu 0.01 µmol /l ya da 4.5 µg/l olarak tahmin edilmektedir (Jeffes ve

Kaneshiro, 1998). MTX'in kullanımında; sitrovorum faktörü olmaksızın geleneksel düşük doz, sitrovorum faktörü ile yüksek doz MTX ve intratekal MTX tedavisi olmak üzere üç farklı temel metot vardır.

### **2.2.6. Yan etkileri ve kullanım alanları**

MTX Geçmişten günümüze kadar birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Tedavisi esnasında fazla sayıda ve ciddi yan etkilerin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir.

Yan etkinin şiddeti Hastalığın seviyesine, hastanın yaşı, doz değişimi ve birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Genellikle sık rastlanan yan etkiler hafif ve geri dönüşümlüdür.

Bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme ve stomatit gibi yan etkiler sıklıkla dozla ilişkilidir. MTX tedavisi alan romatoid artritli hastaların yaklaşık %30'unda ilaç toksisitesi nedeniyle tedavi kesilir (Van, 1998).

MTX'in hücreler üzerine sitotoksik etkisi bu hücreler için seçici olmaması nedeniyle kemik iliği, intestinal mukoza, kıl kökleri gibi sağlıklı dokularda da toksisite gözlenebilmektedir. Antikanser ilaçlar bunun yanında gonadlar üzerine de etkilidir (Vardı vd., 2010).

MTX, oksidatif hasar yoluyla veya doğrudan toksisite göstererek testiküler hasara neden olmaktadır. Fareler üzerinde yapılan çalışmada MTX uygulaması ile seminifer tübüllerde atrofiyle beraber hücresel deskuamasyon , vakualizasyon ve yapısal farklılıklar gözlenmiştir (Oktar, 2010).

Metotreksat Onkoloji ve Hematoloji alanında sıklıkla kullanılır. lösemiler, lenfomalar, meme kanseri, baş ve boyun kanserlerinde kullanılır (Quinn ve Kamen, 1996).

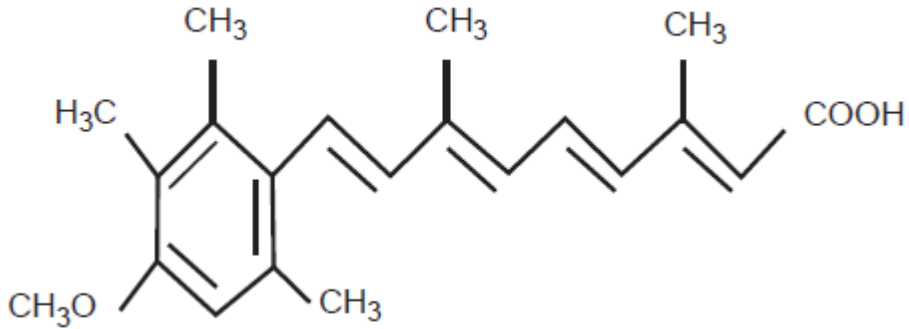
Ayrıca, MTX'in romatizmal hastalıklardan kanser metastazına kadar oldukça yaygın kullanım endikasyonları bulunmaktadır. Çocuklarda gelişen akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılan önemli bir ilaçtır. Meningeal karsinomatosis tedavisinde, meningeal lösemi ve lenfomanın profilaksi ve tedavisinde intratekal olarak kullanılır (Bruton, 2009). Remüsyonda olan hastalarda yüksek doz kullanılır.

Kür şansı yüksek olmasına rağmen erişkinlerde görülen lösemilerde, lösemik menenjitin önlenmesi ve tedavisi dışında MTX'in tedavi edici etkisi daha sınırlıdır.

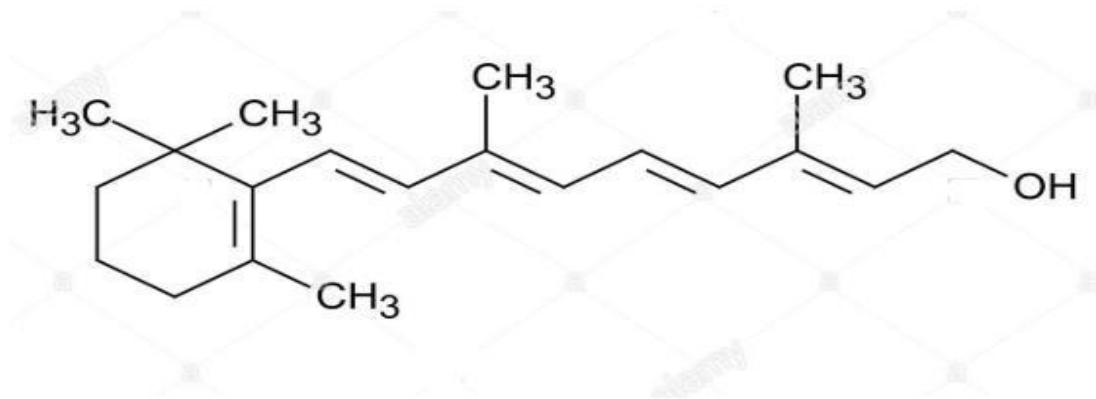
## 2.3. Asitretin

### 2.3.1. Kimyasal yapı ve etki mekanizması

Asitretin (ACT) (Şekil 2.4) hücrenin farklılaşma ve proliferasyonunu düzenleyen vitamin A (Şekil 2.5) analogu ve monoaromatik retinoiddir (Şekil 2.4) (Lee ve Koo, 2005). ACT etretinatın aktif bileşiği ve majör metaboliti olup farmakokinetik olarak daha avantajlı olması nedeniyle tercih edilmektedir (Doğra vd., 2014). Tam olarak etki mekanizması bilinmemekle birlikte retinoidlerin epidermiste hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlediği, immünmodulator ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Yamauchi vd., 2004; Menter vd., 2009).



Şekil 2. 4. ACT kimyasal yapısı (Bhuiyan ve Chowdhury, 2016)



Şekil 2. 5. Vitamin A kimyasal yapısı (Oruch ve Pryme, 2012)

ACT ve etretinat keratinizasyon rahatsızlıkları spektrumuna karşı etki bakımından aynıdır. Fakat, ACT etretinattan daha hızlıca elimine edilmektedir (Stuck, 1989).

ACT yüksek oranda lipofilik olan zayıf bir asittir. Fiziksel yapısı bakımından, yeşil ve sarımsı bir rengi vardır. Suda az çözünebildiği gibi pH 7,5 olduğunda da çözünebilmektedir. Kapalı formülü  $C_{21}H_{26}O_3$  olup kimyasal olarak (4-Methoxy-2, 3, 6-trimethyl phenyl)-3, 7- dimethyl-2, 4, 6, 8-nonatetraenoic acid şeklinde adlandırılmaktadır. Erime noktası 228-2300C civarındadır.

ACT, hücre farklılaşması, çoğalması, enflamasyon ve keratinizasyonu gibi süreçlerini inhibe edebilme ve kontrol edebilmektedir. Bazı çalışmalarda, ACT'in immünomodülatör ve anti-enflamatuar özelliklerine sahip bir ilaç olduğu gösterilmiştir. Bunların arasında, stratum orneumda polimorfonükleer lökosit birikimini inhibe edilmesi ve mitojenlerin lenfositik blastogenezini inhibe edilmesi gibi mekanizmalar ACT'den kaynaklı olduğu varsayılmaktadır (Pilkington ve Brogden, 1992; Lee ve Li, 2009).

Retinoidler, yağ dokusunun aktivitesini etkileyebilmektedir. Bunu dışında nükleer reseptörlerine etki ederek epidermal hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını etkilemektedirler.

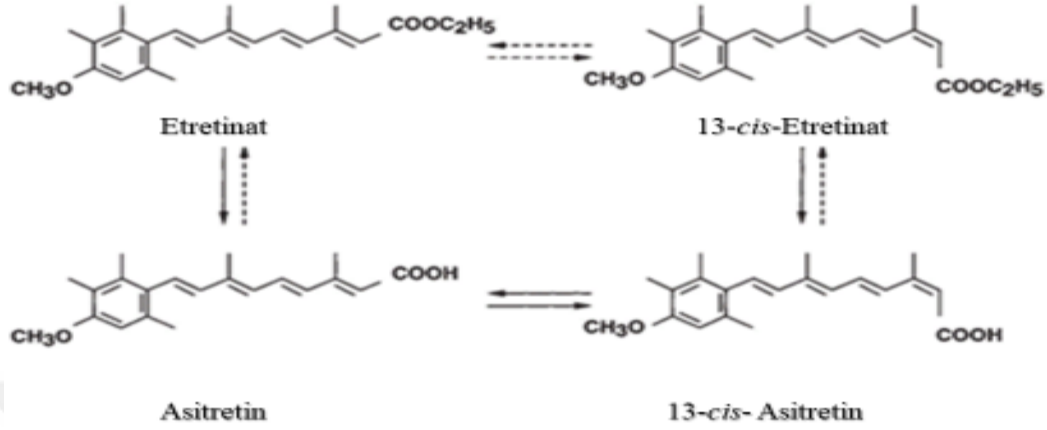
ACT, hücre içinde RA gibi CRABP üzerinden etki göstermesinin dışında; bazı protein kinazların aktivitelerini de etkilemektedir. Siklik adenozin monofosfat (cAMP) bağımlı iki farklı protein kinaz formu tanımlanmaktadır: Bunlar, RI ve RII'dir. RI formu hücre çoğalmasında etki gösterirken, RII formu hücre farklılaşmasında ve hücre büyümesinin inhibisyonunda rol oynamaktadır (Byus vd., 1977; Costa vd., 1978). Normal hücrelere bakıldığı zaman psoriyatik fibroblastlarda cAMP'nin büyümei inhibe edici etkisi azalmaktadır (Raynaud vd., 1987).

Yapılan çalışmalarda, ACT insan psoriyatik fibroblastlarında eksik oldukları bilinen cAMP'ye bağlı protein kinazların seviyesini ve aktivitesini artırdığı; ancak normal fibroblastlar üzerinde hiçbir etki oluşturmadığı bildirilmiştir (Raynaud vd., 1987). İnsan promiyelosit lösemi ve miyeloblast hücre hatlarında ise asitretin, cAMP-bağımlı protein kinazın aktivitesini ve fosfolipaz-sensitif kalsiyum-bağımlı protein kinaz ve protein kinazın aktivitesini artırmıştır (Fontana vd., 1986).

### **2.3.2 Farmokokinetiği**

ACT'nin farmakokinetiğine ilişkin kapsamlı bir çok çalışma yapılmıştır. ACT'nin metabolit olarak tartışıldığı ve ana ilaç olarak etretinat kullanılan çalışmalar da mevcuttur (Ward vd 1983). ACT ile ilgili yapılan çalışmalarda ; ACT ana ilaç

olarak kullanıldığı zaman tüm emilim ve eliminasyon süreçlerinin etretinatın metaboliti olarak üretilen asitretininkine kıyasla daha hızlı olduğu bulunmuştur (Şekil 2.6) (Larsen vd., 1987).



Şekil 2.6. ACT ve Etretinatın ana metabolitleri (Wiegand ve Jensen, 1992)

ACT'nin kimyasal yapısı incelendiği zaman, yapısında serbest karboksil grubu bulundurulur. Bu bakımdan etretinata kıyasla daha az lipofilik vardır. Bu yüzden daha kısa bir yarı ömrüne sahiptir: etretinat yaklaşık 120 gün (4 ay) yarı ömrüne sahip iken, ACT sadece yaklaşık olarak 2 gün (50 saat) sürmektedir (Wiegand ve Jensen, 1992).

Etretinat'ın üretimi, her bir bireydeki ACT'in miktarına bağlı olarak değişen doğal bir esterleşme işlemidir. ACT az miktar ile esterleşir ve etretinat'a (etil ester) dönüşür. Fakat, bu reaksiyon karaciğerde bulunan bir enziminin etkisiyle ve etanol'ün varlığında daha hızlı bir şekilde gerçekleşir. Etretinat ACT'den yağda daha fazla çözünür ve vücutta özellikle yağ dokusunda daha uzun süre kalabilmektedir (Bhuiyan ve Chowdhury, 2016).

ACT, kimyasal reaksiyonların ürünüdür, etretinat'ın dönüştürülmesinden üretilen aktif bir metabolittir. ACT ile yapılan tedavilerde, hastaların tok karnına almaları önerilmelidir, çünkü ilacın absorpsiyonu hızlandırabilir ve biyoyararlığı beş katına kadar artırabilir, özellikle yağlı yiyecekler biyoyararlığı çok fazla artırabilmektedir (Lee ve Li, 2009; Ormerod, 2010).

ACT, alkol ile birlikte kullanıldığında etretinata re-esterifikasyon olabilmektedir. Bu sebeple asitretin tedavisi alan hastalarda zorunlu kontrasepsiyon süresi bulunmaktadır. Bu süre 2 yıl olarak belirlenmiştir. Buna karşılık Food and

Drug Administration (FDA) için bu süre 3 yıldır (Bilgili, 2008). Yapılan çalışmalarda, tedavi süresince ve tedavi bittikten sonra 2 ay boyunca alkol kullanmayan kadınlar için ACT'nin farmakokinetik avantajı etretinattan daha fazladır (Sarkar vd., 2013).

### **2.3.3. Dozaj ve Uygulama**

ACT kullanımında hastanın yaş,boy,kilo ve hastalığın evresine göre değişebilmektedir. Yüksek doz olarak alınan doz tedaviye daha hızlı yanıt verebilir fakat vücut yüksek dozu tolere edemeyebilir. Bu sebeple tedaviye düşük doz uygulanarak başlanır. 10-25 mg/gün gibi düşük doz ile başlayan hastaya yanıt değerlendirmesine ve hastanın tolerasına bakılarak en fazla 75 mg/gün olacak şekilde artırılabilir (Dogra ve Yadav, 2014).

Tekli tedavi şeklinde uygulanan ACT'nin püstüler psoriasis tedavisinde en yüksek seviyede yanıt alınmıştır fakat guttat psoriasis, eritrodermik psoriasis ve plak psoriasis ise daha düşük yanıt gözlemlenmiştir (Yamauchi vd., 2003).

ACT hematolojik rahatsızlıklarda düşük dozda etkili olduğu gözlemlenmiştir. (Lui vd., 2013).

### **2.3.4. Asitretinin yan etkileri ve yapılan çalışmalar**

ACT sedef hastalığında kullanılan bir tedavi yöntemidir. ACT kullanımında bazı yan etkiler gözlemlenmektedir. Yan etkilerin seyirine bağlı olarak ilaç kullanımı durdurulabilir. ACT, teratojen yapıda bir ilaçtır. Bu yapısından dolayı gebelikte kullanılmaması önerilir. Gebeliğin 3 ila 6 haftalarında retinoid kullanılırsa fetüste anomallikler gözlemlenebilmektedir ( David vd., 1988). İlaç kullanımı bittikten sonra vücuttan atılım süresi göz önüne alınarak 3 yıla kadar gebeliğe izin verilmemelidir (Ergün, 2007).

Yapılan çalışmalarda, ACT, 50 mg/gün doz ile tedavi edilen hastaların % 35'inde hipertrigliseridemi gözlemlenmiş ve serum kolesterolündeki miktarında artış görülmüştür. ACT, hepatik enzimlerin seviyelerini de etkiler ve bunun sonucunda hepatit oluşmasına neden olmaktadır (Pilkington ve Brogden, 1992; Pearce vd., 2006). ACT, akut karaciğer toksisitesine (transaminit) de neden olabilir (Katz vd., 1999). ACT'in kullanımı karaciğer enzimlerin serumunu artırmasına neden olabilmektedir. Klinik olarak, ACT ile tedavi edilen 3 hastanın yaklaşık 1'inde

aspartat amino transferaz (AST), alanin transaminaz (ALT) veya laktat dehidrogenaz (LDH)'nin seviyeleri yükseldiği bildirilmiştir (Roeningk vd., 1998).

ACT ile ilgili sıklıkla bildirilen laboratuvar anormalliği hiperlipidemidir. Bu durum hastaların %25-40'ında görülebilmektedir (Pearce vd., 2006). Hipertrigliserideminin görülme sıklığı hiperkolesterolemiye oranla daha çoktur. Düzenli beslenme, spor ve zararlı alışkanlıkları olmayan hastalarda ilacın verdiği yanıt diğer hastalara oranla daha iyidir. Laboratuvar sonuçlarına bakıldığında Trigliseridin 499 mg/dl üzerine çıktığı zaman ilacın dozunu %50 azaltmak gerekir. Trigliseridin 800 mg/dl üzerine çıktığı zaman ise tedaviyi sonlandırmak gerekir. Hastaya yeme düzeni ve spor önerilir. Bunun sonucunda hiperlipidemide düzelmeye görülmemişse oral antilipidemik ilaç kullanılması gerekir (Dogra ve Yadav, 2014).

ACT ile yapılan çalışmalarda ,hastaların % 10'ünde cildin kabarması ve saç yapısında değişiklik gibi yan etkiler de görülmüştür. Çok nadir durumlarda ise , bulantı, kusma, ishal, hepatit ve sarılık konjonktivit, kornea ülseri gibi rahatsızlıkları hastalarda görülebilmektedir (Bhuiyan ve Chowdhury, 2016).

Laboratuvar sonuçlarına bakıldığında hastaların %13-16'sında transaminaz yüksekliği gözlemlenebilmektedir (Vahlquist, 1992). Bu durum ilacın dozuna bağlı değişkenlik gösterir. Kalıcı bir yan etki değildir. Nadir durumlarda olsa da transaminaz yüksekliği aşırı bir değer gösterebilir. Bu durumda tedavinin sonlandırılması gerekir. Hepatoksisite daha çok diyabet hastalarında, aşırı alkol tüketimi olan bireylerde ve obezite durumu olan kişilerde gözlenir (Vahlquist, 1992; Dogra ve Yadav, 2014).

ACT, pankreatite neden olabilmektedir. Bazı hastalarda tedaviden sonra özellikle diyabet ve obezite hastalarda trigliserit seviyeleri arttığı görülmüştür (Pilkington ve Brogden, 1992).

ACT başta olmak üzere sistemik retinoidlerin kullanımı, nörotolojik patolojiler (yalancı serebri veya hafif intrakraniyal hipertansiyon) gibi nadir durumlar ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Katz vd., 1999).

Öztürk (2018)'ün yaptığı çalışmada, kutanöz liken planus hastalarında prednizolon ve ACT tedavileri uygulanması ile Bcl-2 ve Ki-67 seviyelerinde azalma olduğu ve COX-2 seviyelerinde herhangi bir değişme olmadığı gözlenmiştir.

Önder (2014)'in yapmış olduğu çalışmasında, oral ACT verilmiş ratlarda, ACT'nin epifiz plağının yapısında bozulma olduğu gözlemlenmiştir. Ancak epifiz plağında belirgin bir şekilde incelmeye olmadığı; düşük dozda uygulanan tedaviler ile epifiz plağında oluşacak etkiler ve kemik mineralizasyonunun daha güvenli olduğunu açıklamıştır.

Pearce vd (2006)'nin yaptıkları çalışmada ACT'nin doz farklılıklarına karşı yan etkileri karşılaştırılmıştır. Lipid ve hepatik enzim yüksekliğine yüksek doz asitretinde daha çok rastlanmıştır.

Şengör vd (2006) yaptıkları çalışma ile 0.75 mg/kg/gün ve 1.5 mg/kg/gün dozlarında ACT verdikleri ratlarda doz karşılaştırması yaparak, Johnsen skoru açısından değerlendirme yaptıklarında, ACT'nin terapötik dozlarda verildiğinde ratlarda spermatogenezde bir etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir.

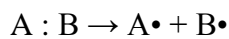
#### **2.4. Serbest Radikaller**

Serbest radikal; Birçok fizyolojik veya patolojik prosede üretilen, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu bulunan herhangi bir elektron veya moleküldür. Bir bileşik bir elektron kaybederek veya ilave bir elektron alarak serbest radikal oluşabilir. Serbest radikaller pozitif veya negatif yüklü veya nötral olabilirler (Brody, 1988).

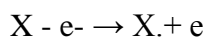
Hücrede oluşan başlıca serbest radikaller tek bir elektronun moleküler oksijene eklendiği süperoksit radikalleri ( $O_2^-$ ) ve bu radikallerin bazı metal iyonlarının mevcudiyetinde ( $Fe^{+}$ )  $H_2O_2$  ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan daha reaktif OH radikalleridir.  $O_2$  radikallerinin patolojik prosesleri bu radikaller çok fazla sayıda olmadıkça başlamaz (Arthur, 1985)

Serbest radikallerin oluşumu ile ilgili 3 yol olduğu kabul edilmektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

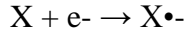
1- Kovalent bağlar homolitik bir şekilde kırılmaya uğrarlar ve iki elektronun her biri farklı atomlarda kalır.



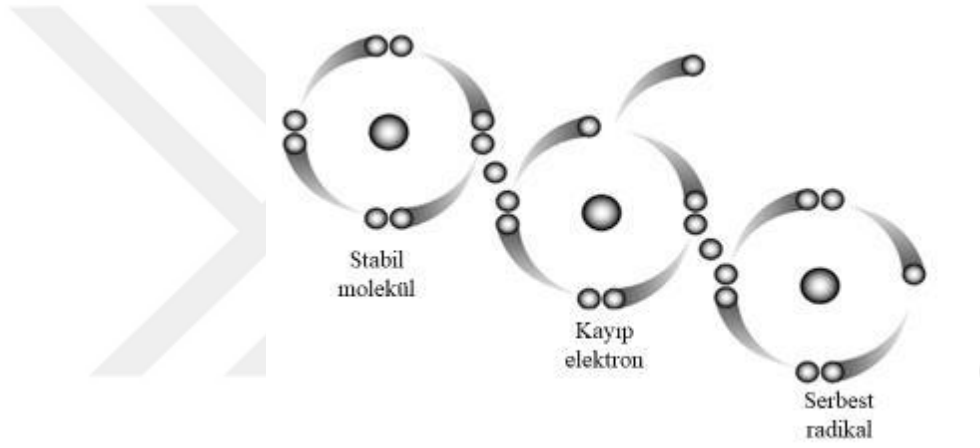
2- Molekül elektron kaybına uğrar.



### 3- Molekül elektron transferine uğrar



Oksijen radikallerinin hücumuna uğrayabilecek önemli vücut yapıları arasında proteinler (enzimler,kollajen) nörotransmitterler,genetik materyaldeki nükleik asitler,membrandaki yağ asitleri vardır. Hücre membranındaki yağ asitleri oksitlendiğinde membran bütünlüğü bozulur ve hücre penetrasyonu müsait hale gelir. Oluşan lipid peroksitler selüler hasara yol açan metabolizmayı ilerleten ve kan akımını azaltan potent kimyasal maddelerdir. Lizozomal membranların peroksidasyonu neticesinde hidrolazlar sitoplazmaya yayılarak hücrenin ölümüne sebep olurlar (Brody, 1988).



Şekil 2.7. Serbest radikallerin oluşma mekanizması (Agarwal vd., 2008)

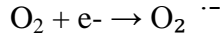
Temel olarak oksidatif stres, antioksidanlarla prooksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar yönünde artması şeklinde belirtilmiştir (Bhuvaramurthy vd., 1996). Oksidatif stresin tetiklenmesi ise ROB oluşumu artması ile şekillenmektedir. Hücreler oksidatif stres ile mücadele edebilmelerine rağmen antioksidan enzim sistemleri aktivasyonunu başlatırlar. Bunun dışında, hücrenin savunma sistemleri yetersiz kaldığı zaman, ROB ve antioksidan arasındaki denge bozulur. Bu nedenle oksidan hasara duyarlı proteinler, nükleotidler, karbonhidratlar ve lipidler olmak üzere çeşitli yapılar zarar görmektedir (Gutteridge, 1993; Zadak, 2009; Wildburger vd., 2009; Berger, 2005; Halliwell ve Gutteridge, 1986).

Yapılan çalışmalarda, antioksidanlar yönünden zengin besinlerin kanserlerin, kardiyovasküler hastalıkların, Parkinson ve Alzheimer olmak üzere nörodejeneratif

hastalıkların ve ayrıca inflamasyonun, hücre ve deri yağlanması'nın sebep olduğu problemlerin önlenmesinde önemli rol oynadıkları gözlemlenmiştir (Zhou vd., 2001).

#### **2.4.1. Süperoksit Radikali**

Süperoksit ( $O_2^{\cdot -}$ ), biyolojik sistemler üzerine olumsuz etkileri olan önemli bir anyondur.  $O_2^{\cdot -}$  aerobik metabolizma sırasında  $O_2$ 'nin kısmi indirgenmesinin birincil yan ürünü olarak üretilir ve ROS'ların en önemli bileşenidir (Jalilov ve ark., 2016).



Süperoksit anyonu canlı organizmada en yaygın olarak üretilen serbest radikaldir ve makrofajlar ile nötrofiller gibi fagositik hücreler  $O_2^{\cdot -}$ 'nin önde gelen kaynaklarıdır (Scheibmeir ve ark., 2005).

Süperoksit anyonu organizmada SOD ya da CAT enzimleri ile önce  $H_2O_2$ 'ye sonra da suya dönüşerek, zararsız hale getirilir (Conner ve Grisham, 22 1996). Süperoksit üretimi çoğunluk olarak hücrenin mitokondrisi içinde gerçekleşir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, hücrede yaşam için gerekli olan ATP'nin ana kaynağıdır. Enerji iletimi sırasında, az sayıda elektron oksijene sızar ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol alan  $O_2^{\cdot -}$ 'yi oluşturur (Valko ve ark., 2007).

#### **2.4.2. Hidrojen peroksit**

Hidrojen peroksit, oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması ile meydana gelir. Peroksit molekülü de iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi oluşturur (Cheeseman ve Slater, 1993). Hidrojen peroksidin oksitleyici tür olarak bilinmesinin sebebi Cu, Fe gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikali özelliği taşıyarak öncü gibi davranmasından kaynaklanmaktadır (Kılınç ve Kılınç, 2002). Yapısında paylaşılmamış elektron olmadığından dolayı radikal özelliği taşımaz.

Aerobik canlılarda süperoksit radikallerin  $H_2O_2$ 'ye çevrilmesi, katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir. SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimi bu şekilde engellenmiş olur (Kılınç ve Kılınç, 2002).

#### **2.4.3. Hidroksil radikali**

Hidroksil radikali, biyolojik moleküllerle zincirleme reaksiyonları başlatan ve kimyada en reaktif olarak bilinen radikal olarak bilinmektedir. Bu yüzden in vivo

oluşan hidroksil radikali çoğunlukla her moleküle saldırır. Oluştığı yerde de büyük hasarlara sebep olmaktadır (Tekkes,2006; Jialal vd., 1993; Kılınç ve Kılınç, 2002).

Biyolojik ve kimyasal ortamlarda oluşan bu radikal canlılarda iki farklı yol ile oluşur. İlk olarak canlılarda radyasyonun toksik etkisinden sorumlu tutulan, iyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması ile diğeri ise hidrojen peroksidin eksik indirgenmesidir ve bu vücutta en önemli hidroksil radikali kaynağı olarak görülmektedir (Wheeler ve Salzman,1990; Ames vd., 1993).

#### **2.4.4. Serbest radikal kaynakları**

Serbest radikal kaynakları iki grupta incelenir. Bunlar;

Endojen kaynaklar;

- Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, aminoasit oksidaz, gibi bazı enzimlerin katalitik döngüleri esnasında serbest radikaller oluşur (McCord ve Fridovich, 1968).
- Tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler gibi oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında görev alabilen küçük moleküller, serbest radikal oluşturabilir.
- Mitokondriyal elektron transportu, hücrelerdeki en büyük reaktif oksijen türü kaynağıdır ve bu sistemdeki elektron kaçağı, süperoksit radikali üretebilir (Halliwell, 1994).
- Nükleer membranlara ve endoplazmik retikulum bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklı da serbest radikal üretimi olur (Morehous vd., 1984).
- Plazma membranında yer alan lipooksijenaz, protein kinaz, siklooksijenaz, gibi enzimlerin aktivasyonu ile serbest kalan araşidonik asidin oksidasyonu sonucunda serbest radikaller oluşur (Morehous vd., 1984).
- İskemi, travma, yanık gibi oksidatif stres meydana getiren durumlar da serbest radikal kaynağıdır.

Ekzojen kaynaklar;

- Hava kirliliği, sigara dumanı, solventler, aromatik hidrokarbonlar, pestisidler çevresel ajanlar serbest radikal oluşturur.

- Radyasyon serbest radikal oluşumunda önemli rol oynar.
- Stres, katekolaminlerin sentezini uyarır, katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal oluşumuna sebep olur (Kadiiska, 2005).

#### **2.4.5. Serbest Radikallerin Hücre ve Dokularda Yol Açtığı Zararlar**

- DNA'nın tahrip olması
- Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı
- Protein ve lipidlerle kovalan bağlanması
- Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler
- Seroid ve yağ pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi
- Proteinlerin tahrip olması
- Lipid peroksidasyonu, zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi
- Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması
- Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü bileşiklerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerde atrofik değişikliklerin oluşması (Uysal, 1998). Gibi hücre ve dokulara zararlı etkileri vardır.

#### **2.4.6. Serbest radikal hasarının neden olduğu klinik durumlar**

Yapılan çalışmalarda, oksidatif hasarın etkileri birçok hastalık grubunda gözlemlenmiştir. AIDS, iskemik hastalıklar, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, İnflamatuvar hastalıklar, kistik fibrozis, gastrik ülser, metabolik hastalıklar, diyabet, nörolojik hastalıklar, hipertansiyon gibi pek çok hastalıklarda, serbest radikal hasarının etkisi gözlemlenmiştir (McCord, 2000).

Serbest oksijen radikalleri (SOR), dış orbitallerinde bir ya da birden fazla paylaşılmamış elektron içeren reaktif moleküllerdir. Dış orbitallerde eşleşmemiş elektron bulunması sebebiyle serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir. Vücutta sıklıkla oksijen, kükürt, karbon ve azot kaynaklı radikaller oluşur. Oksijenden oluşan serbest radikaller, biyolojik sistemdeki en önemli radikallerdir. Oksijen insan yaşamı için elzem bir moleküldür. Vücutta oksidasyon tepkimeleri, adenozin trifosfat (ATP) üretilmesi ve detoksifikasyon için oksijen

gerekmektedir. Oksijenin kullanımı neticesinde radikal olan ve olmayan pek çok oksijen türevi bileşik oluşmaktadır.

## **2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri**

Serbest oksijen radikallerinin hücrel ve moleküler düzeyde oluşturdukları hasarı önlemek için insan vücudunda antioksidan savunma sistemi denilen güçlü savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidan Savunma Sistemlerini bazı enzimler ve serbest radikal tutucular meydana getirmektedir.

Bu savunma sisteminde işlev gören enzimler, serbest oksijen radikallerini tutan molekülere göre daha potenttirler. Antioksidanlar peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engellemek suretiyle lipid peroksidasyonunu inhibe eden maddeler veya reaktif oksijen radikallerini tutan maddeler olarak da söylenebilir (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

Serbest oksijen radikalleri normal aerobik metabolizması sırasında sürekli olarak üretilir ve bazı antioksidanlar tarafından ortamdaki uzaklaştırılırlar. Ancak antioksidan koruma %100 etkinlikte değildir. Bu yüzden hayatta kalma için tamir mekanizmalarının varlığı önemlidir. Antioksidanların başarısızlığı ya da prooksidanlarda artma, oksidatif stres durumunu oluşturur. Bu durum ise moleküler hasar ve doku zedelenmesi ile sonuçlanır (Yeum vd., 2004).

### **2.5.1. Antioksidanların etki mekanizmaları**

Antioksidanların etki mekanizmaları çeşitli yollarla oluşabilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1984). Bunlar;

- Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun engellenmesi
- Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalizleyen metal iyonlarının bağlanması
- Yok edici antioksidanlar
- Zedelenmiş hücrel yapıların hasar sonrası tamir edilmesi veya temizlenmesi.
- Tamir özelliğine sahip antioksidanlar

### 2.5.2. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit radikallerinin canlılarda üretildiği uzun yıllar boyunca bilinmemektedir. Fakat 1968 yılına kadar bu radikallerinin temizlenmesi ile ilgili herhangi bir enzimatik etkinlik bilinmiyordu. Fridowich ve arkadaşları tarafından, süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizleyen bir enzimin varlığı gösterildi ve enzim SOD olarak adlandırıldı (Kılınç, 1985).

SOD, süperoksit radikalinin ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen bir antioksidan enzimdir. Bu enzim, aerobik solunum yapan hücrelerde mitokondri tarafından sürekli üretilen süperoksit anyonlarını,  $H_2O_2$ 'e dönüştürür (Polat, 2008). Bu, GSH-Px enzimi ile detoksifiye edilir (Fernandes ve Cotter, 1994).

İnsan vücudunda iki tip SOD bulunur, biri sitoplazmada bulunan ve içeriğinde bakır (Cu) ve çinko (Zn) içerir, diğeri ise mitokondride bulunur ve mangan (Mn) içerir. Metabolizmanın normal seviyelerde olması durumunda hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit oluşsa bile bu enzim aktivitesi ile hücre içi süperoksit seviyeleri düşük tutulur. Hücre içi aktiviteleri yüksek, hücre dışı aktiviteleri düşüktür (Çıkrıkçıoğlu ve Duran, 2001).

#### 2.5.2.1. Mangan süperoksit dismutaz (MnSOD)

MnSOD, mitokondriyal bir enzim olarak tanımlanmıştır. Dört adet eşit protein alt ünitesi vardır ve her biri tek bir mangan atomu içerir. Mn-SOD ile Cu/Zn-SOD'un amino asit dizisi karşılaştırıldığında birbirinden farklıdır. MnSOD siyanür ile inhibe edilememektedir. Bu durum bu iki enzimin birbirine karışmamasını sağlar (Is ve Woodside, 2001; Mates ve ark,1999).

MnSOD sitoplazmada yer alan endojen antioksidatif bir enzim olup transkribe edildikten sonra mitokondriye iletir (Wispe vd., 1989). Ve süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve oksijene indirger. Böylelikle mitokondride serbest radikalleri temizleyerek oksidatif strese karşı savunma sağlar (Barra vd., 1984). Tümör nekrosis Faktör, MnSOD'u seçici olarak indüklerken çeşitli fare dokuları ve kültüre edilmiş hücrelerde CAT, CuZn-SOD, GSH-Px'i indükleyemez.

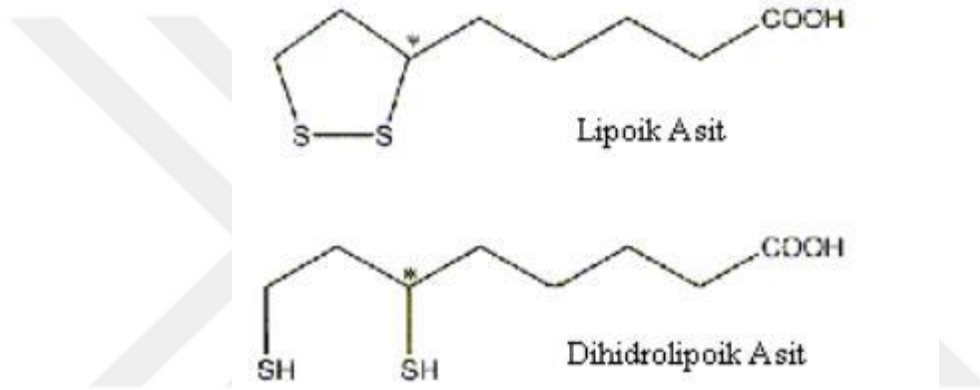
Saccharomyces cerevisiae'daki genlerin elimine edilmesi MnSOD'un oksijene karşı duyarlılığını arttırabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, MnSOD DNA'sının

kültüre edilmiş hücrelere transfeksiyonu hücrelerin paraquata karşı dirençli bir hale gelmesi sağlanmıştır (Mates ve ark, 1999).

### 2.5.3. Alfa Lipoik Asit (ALA)

İlk olarak 1930'lu yıllarda Laktobasilus gelişiminde büyüme faktör olarak tanımlanan ekstre içinde bulunmuştur. Tanımlanan lipoik asit 1950'li yıllarda Reed ve ark. tarafından karaciğerden saflaştırıldıktan sonra kimyasal olarak 1-2 ditiyolen 3 pentanoik olarak isimlendirilmiştir (Morris vd., 1995; Reed vd., 1951).

Molekül olarak sekiz karbonludur ve ditiyolen halka yapısında iki tane sülfür atomu bulunmaktadır (Şekil 2.8 ) (Cadenas, 2001).



Şekil 2. 8. ALA ve DHLA kimyasal yapıları (Kramer, 2001)

Hayvanlarda enerji metabolizması bakımından yüksek olan karaciğer, kalp ve böbrekte yüksek miktarda tespit edilmektedir. Bitkilerde ise, brokoli, domates ve ıspanakta fazla miktarda bulunduğu bildirilmiştir (Karaca, 2015).

ALA'nın SOD ve CAT enzim aktivitelerinin artmasını sağlama, moleküler hasarları onarma, asetilkolin üretimini artırma gibi görevleri bulunabilirken, C ve E vitaminlerinin rejenerasyonu, lipid peroksidasyonu oluşma ihtimaline ve serbest radikallere karşı koruma görevleri de mevcuttur (Tetikçok vd., 2015). ALA'nın takviye olarak dışarıdan alınan %80 oranında kısmı böbrekler yoluyla dışarı atılır. ALA'nın iki formu bulunmaktadır ve bu formlar kimyasal tepkimelerle birbirine dönüşebilmektedirler. Redükte formu dihidrolipoik asit (DHLA) olarak adlandırılır. ALA'nın redükte ve redükte olmayan formu canlıda aktivite gösterir ancak DHLA formu hücrede daha aktiftir (Ayaz, 2014).

Yapısındaki tiyol sayesinde antioksidan etkisini gösterir. Serbest oksijen radikallerini yakalama ve kurşun kadmiyum vb. ağır metallere şelat oluşturmada, geri kalan antioksidanların etkilerini artırmada rol oynamaktadır. ALA'nın bir diğer önemli özelliklerinden biri de kan-beyin bariyerini geçerek santral sistemin içinde antioksidan ve ajan olarak kullanılabilmesidir (Patel ve Roche, 1990).

Amfifilik özelliği nedeniyle hem hidrofilik hem de lipofilik ortamlarda antioksidan görevi görebilmektedir.

ALA'nın klinik etkilerine bakıldığında ilk olarak Amantia mantar zehirlenmesinde kullanılmıştır (Patel ve Roche, 1990).

Ayrıca, oksidatif stresi azalttığı, Nükleer faktör kappa B ve insülin sinyal ileti yollarında düzenleme yapmıştır ve endotel disfonksiyonu engellemektedir.

Klinik kullanımına bakıldığı zaman ALA ile ilgili en çok araştırma yapılan hastalıkların başında nöropatiler gelmektedir. Hastalığın seyrinde %30 kadar nöropati görülebilen diyabetes mellitusta ALA kullanımı yaygındır. Bunun dışında diyabette kullanılan ALA ile ilgili terapötik dozlarda glikoz alımını indüklediği gözlenmiş, laktat oluşumunu azalttığı ve insülin hassasiyeti artırdığı izlenmiştir (Konrad vd., 1999).

Bu özelliği sayesinde nöropati oluşumunu da azaltan ALA'nın aynı zamanda diabetik retinopatide (Patel ve Roche, 1990) ve diğer nedenli periferik nöropatilerde koruyucu etkileri olduğu gözlenmiştir (Ziegler vd., 2004).

Farelerde yapılan çalışmalarda deneysel mani tedavisinde kısmi olarak katkıda bulunduğu ve fareler üzerinde yapılan bilişsel fonksiyon çalışmalarında oksidatif stresi azalttığı ve bilişsel fonksiyonlara katkıda bulunduğu belirtildi (Farr vd., 2003). Üst solunum yolları enfeksiyonu sonrası oluşan anosmi tedavisinde yararlı olabileceği ve terapötik ajan olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir (Hummel vd., 2002; Gregorio vd., 2014). Multiple skleroz ve akut alerjik ensefalomyelit modellemesinde, Sisplatin indüklenerek oluşturulmuş deneysel işitme kaybı modellemesinde (Koo vd., 2016), akut otitis mediayada inflamasyonu azaltıp komplikasyon oluşmasının azaltılmasında (Tarar vd., 2016), sistin taş oluşumunun azaltılmasında yararlı etkileri mevcuttur (Zee vd., 2017).

ALA'nın kilo verme için kullanımda etkisi olduğunu ve bu yüzden kullanılacak güvenli dozun 1200 mg/gün olduğu belirlenmiştir . Bu etkiyi lipoprotein lipaz

aktivitesinin azalmasını sağlayarak, enerji harcaması ve lipogenezi inhibe etmesi gibi yollar ile sağlamaktadır (Namazi vd., 2018).

Günlük dışarıdan alınan dozun 50-600 mg olduğu hakkında görüşler mevcuttur. Yüksek dozlarda alınan ALA'nın alerjik reaksiyonlar ve hipoglisemiye neden olabileceği bildirilmektedir (Packer vd., 2001).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. DeneYlerde Kullanılan Farelerin Elde Edilmesi

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan izinle (2018/13) gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda Ondokuz Mayıs Üniversitesi, DeneY Hayvanları Araştırma Merkezi (DEHAM)'nde üretilip yetiştirilen Winstar albino tipi erkek ratlar kullanılmıştır. Kullanılan laboratuvar farelerinin ortalama ağırlıkları 200-250 gr arasındadır. Fareler enjeksiyondan önceki son 24 saat aç bırakılmışlardır. Kullanılan fareler Samsun Yem Fabrikası'nda üretilen standart fare yemi ile beslenmiş ve su serbest olarak verilmiştir (Şekil 3.1).



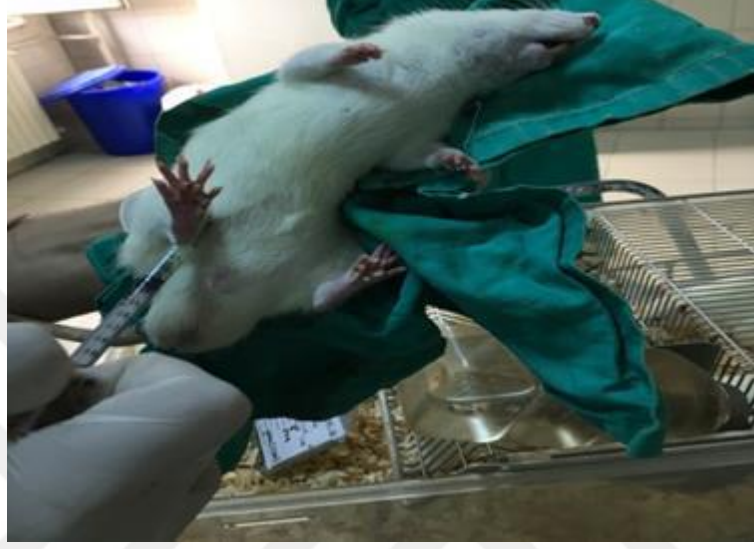
Şekil 3. 1. DeneYlerde kullanılan ratlar

#### 3.2. Farelere Uygulanan Maddeler

Farelere; Teva İlaçları firması tarafından üretilen ve eczanelerde ‘ Neotigason’ adı ile satılan ilacın etken maddesi olan ACT; Meda Pharma İlaçları firması tarafından üretilen ve eczanelerde THİOCTACİD® 600 mg HR Film Tablet adı ile satılan ilacın etken maddesi olan ALA; KOÇAK FARMA İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş. tarafındaN üretilen ve eczanelerde MTX-Koçak Flakon 50mg/5ml olarak satılan ilacın etken maddesi olan MTX uygulanmıştır. Ayrıca genel anestezi olarak 50 mg/kg ketamin HCl (ketalar) ve 10 mg/kg Xylazine (Rompul) verilmiştir.

### 3.3. Araştırma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmalarda; herhangi bir işleme tabi tutulmamış kontrol grubu (K), ALA, MTX+ACT ve MTX+ACT+ALA verilmiş grup olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. Kontrol grubunda 5, diğer gruplarda 15'er fare kullanılmıştır.



şekil 3. 2. Ratlara enjeksiyon işleminin uygulanması

Araştırma gruplarına verilecek ilaçlar ve enjeksiyon işlemleri řu şekilde yapılmıştır;

**1. Grup:** (n=5) Kontrol grubudur. Hiçbir işlem yapılmamıştır. Sakrifiye edildikten sonra testisler çıkarılmıştır.

**2. Grup:** (n=15) ALA grubudur. ALA her gүн aynı saatlerde i.p. verilmiştir. Grubun 5 tanesi 3. gүн, 5 tanesi 5. gүн, 5 tanesi 7. gүн sakrifiye edilmiştir ve testisleri çıkarılmıştır.

**3. Grup:** (n=15) MTX + ACT grubudur. ACT her gүн aynı saatlerde i.p. verilmiştir. MTX ise enjeksiyonun 2. gүнü yapılmıştır. Grubun 5 tanesi 3. gүн, 5 tanesi 5. gүн, 5 tanesi 7. gүн sakrifiye edilecek ve testisleri çıkarılmıştır.

**4. Grup:** (n=15) MTX + ACT + ALA grubudur. ACT ve ALA her gүн aynı saatlerde i.p. verilmiştir. MTX ise enjeksiyonun 2. gүнü yapılmıştır. Grubun 5 tanesi 3. gүн, 5 tanesi 5. gүн, 5 tanesi 7. gүн sakrifiye edilmiş ve testisleri çıkarılmıştır.

Enjeksiyon işlemleri de sabah saat 8:30-9:00 arasında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). ACT, MTX ve ALA % 0,9'luk NaCl'de çözülerek ACT (20 mg/kg/gün) (Jingang vd., 2017), MTX (20 mg/kg/hafta) (Jingang vd., 2017), ALA (50 mg/kg/gün) (Maritim vd., 2003) ve bunların kombinasyonları da vücut ağırlığı düzeyinde i.p enjeksiyonla ratlara verilmiştir.

### 3.4. Fare Testisinin Homojenizasyonu ve Sonifikasyonu

Fareler servikal dislokasyon yöntemi ile öldürüldükten sonra, karın ve göğüs kısımları açılıp (Şekil 3.3) %0,9'luk NaCl ile kalp perfüzyon işlemi yapılmıştır (Şekil 3.4) ve testisler çıkarılmıştır. Alınan testisler hassas terazide (Ohaus Adventure Pro AV 264C) tartılmıştır.



Şekil 3. 3. Farelerin karın ve göğüs kısımlarının açılması



Şekil 3. 4. Kalp perfüzyonu işlemi

Elde edilen testisler, işlemlere geçilmeden önce ölçülen testis hacminin iki katı kadar 0.25 M'lık sükröz çözeltisi içerisine konulmuştur. Etiketlenerek -80°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5. Sükröz içerisindeki testis dokuları

Derin dondurucudan çıkarılan testisler +4°C'de çözülmeye bırakılmıştır. Doku örnekleri çözüldükten sonra hassas terazide tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir. Plastik tüp içerisine alınan doku örneklerine 1/10 (w/v) oranında soğuk fosfat tamponu (0,1 M pH:7,4) çözeltisi eklenmiştir. Sonra doku örnekleri buz içerisindeki plastik tüpte fosfat tamponu içinde ince ince doğranmıştır.

Doku örnekleri, Ultra-Turrax T.25 tipi homojenizatörde 20 sn süre 10 sn aralıkla 8000 rpm de 3 kere homojenize edilmiştir. Örneklerin içinde bulunduğu cam şişe buz kabına alınarak, ultrasonikasyon aletinde (Sonics vibracell vcx 130) 20 sn süre 10 sn aralıklarla 6 kere %25 amplitut da homejenizasyonu yapılmıştır ( Bu işlemlerin hepsi buzlu ortamlarda gerçekleşmiştir).

### 3.5. Fare Testisinin Santrifigasyonu

Elde edilen homojenatlar ependorflara aktarılmış ve +4 °C'de 15.000 rpm'de 15dk santrifüj (Kubota Centrifuges 3500) edilerek enzim aktivitesi ölçümleri için süpernatantları ayrılarak etiketli ependorflara konulmuştur. Ölçüm yapılana kadar süpernatantlar -80° C'de saklanmıştır.

### 3.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

SOD aktivitesi Mc Cord ve Fridovich (1969)' in spektrofotometrik metodu ve Flohe ve Otting'in (1984) metodu ile belirlenmiştir.

**A çözeltisi:**

0.76 mg (5µl) ksantin'in 10ml 0.001 N NaOH'daki çözeltisi ve 24.8mg (2µmol) sitokrom c'nin 100ml 50 Mm pH 7.8 ve 0.1 M EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi karıştırıldı (Bu çözelti +4°C'de 3 gün kararlıdır).

**B çözeltisi:**

Taze bir şekilde hazırlanan ksantin oksidazın 0.1mM EDTA'daki çözeltisi 0.2 U/ml.

**Yöntem:**

- Spektrofotometre (Jenway 6105 UV/VİS.) tüpüne 3ml distile su konuldu. Kör (curve tüp) olarak kullanıldı. Alet kör tüpe karşı sıfırlandı.
- 3 ml'lik küvete 2.9 ml A çözeltisi eklendi. Daha sonra 25 µl örnek konuldu.
- Reaksiyon 75 µl B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı.
- Hızlı bir şekilde karıştırılıp 550nm'de 2dk. 30sn aralıklarla absorbans değişimi köre karşı okundu.
- Kontrol tüpü için örnek yerine 25 µl distile su eklendi ve köre karşı 2 dk boyunca 30 sn aralıkla okundu.
- Örnekleri değerlendirme işlemi kontrol tüpüne göre yapıldı.
- Kalibrasyon grafiği çizmek için belli konsantrasyondaki ( $5 \times 10^{-7}$  M) SOD çözeltisinin 5 µl, 10 µl ve 15 µl'deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlem için saf SOD enzimi kullanıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\Delta \text{OD Konulan örnek}}{\Delta \text{OD Blank}} \times 100$$

Formülü ile hesaplamalar yapıldı ( $\Delta \text{OD} = \text{Optik Dansite}$ ).

SOD'un bir ünitesi Xanthine/Xanthine Oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen süperoksit anyonu ile Sitokrom c'nin redüksiyonunun inhibisyonun %50'si için gerekli enzimin miktarı olarak belirlenir. 550 nm'de spektrofotometrik olarak izlenir.

### 3.7. Mitokondriyal Süperoksit Dismutaz (MnSOD) Aktivite Tayini

MnSOD aktivitesi Mc Cord ve Fridovich (1969)'in spektrofotometrik metodu ve Flohe ve Otting'in (1984) metodu ile belirlendi.

#### A çözeltisi:

0.76 mg (5µl) ksantin'in 10ml 0.001 N NaOH'daki çözeltisi ve 24.8mg (2µmol) sitokrom c'nin 100ml 50 Mm pH 7.8 ve 0.1 M EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi karıştırıldı (Bu çözelti +4°C'de 3 gün kararlıdır).

#### B çözeltisi:

Taze bir şekilde hazırlanan ksantin oksidazın 0.1mM EDTA'daki çözeltisi 0.2 U/ml.

-NaCN'in distile su içindeki 5Mm'lık çözeltisi hazırlandı.

#### Yöntem:

→Spektrofotometre (Jenway 6105 UV/VİS.) tüpüne 3ml distile su konuldu. Ve kör (curve tüp) olarak kullanıldı. Alet kör tüpe karşı sıfırlandı.

→3 ml'lik küvete 2.9 ml A çözeltisi eklendi. Daha sonra 25 µl örnek konuldu.

→Reaksiyon 75 µl B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı.

→Hızlı bir şekilde karıştırılıp 550nm'de 2dk. 30sn aralıklarla absorbans değişimi köre karşı okundu.

→Kontrol tüpü için örnek yerine 25 µl distile su eklendi ve köre karşı 2 dk. boyunca 30 sn aralıkla okundu.

→Örnekleri değerlendirme işlemi kontrol tüpüne göre yapıldı.

→Kalibrasyon grafiği çizmek için belli konsantrasyondaki (5x10<sup>-7</sup> M) SOD çözeltisinin 5 µl, 10 µl ve 15 µl'deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlem için siyanid ile inkübasyona bırakılmış olan saf SOD enzimi kullanıldı.

$$\% \text{ Inhibisyon} = \frac{\Delta\text{OD Konulan örnek}}{\Delta\text{OD Blank}} \times 100$$

Formülü ile hesaplamalar yapıldı (ΔOD=Optik Dansite).

MnSOD'un bir ünitesi Xanthine/Xanthine Oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen süperoksit anyonu ile sitokrom c'nin redüksiyonunun inhibisyonunun %50'si için gerekli enzimin miktarı olarak belirlenir. 550 nm'de spektrofotometrik olarak izlenir.

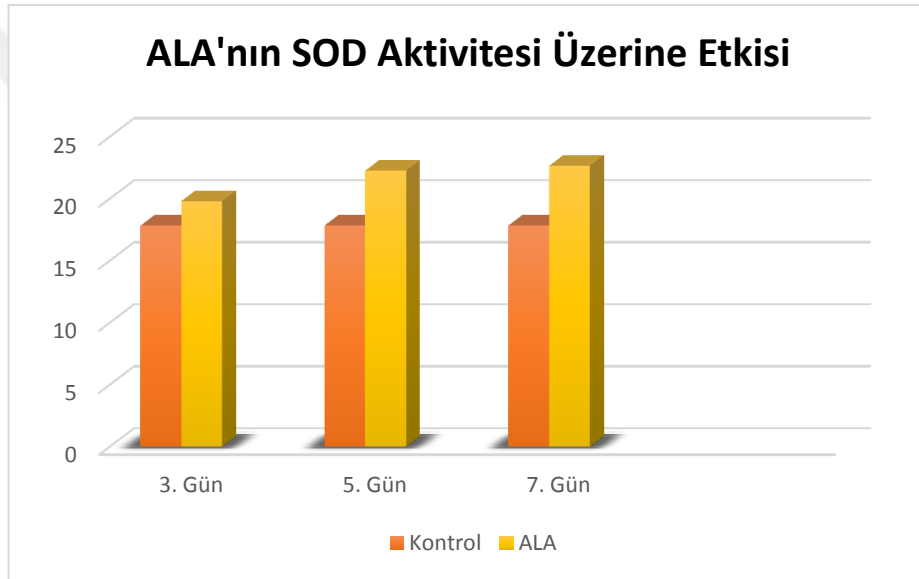
### **3.8. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analiz için SPSS programı kullanıldı. Analizlerde normallik varsayımı sağlanmadığından dolayı bir yönlü varyans analizinin parametrik olmayan karşılığı olan Kruskal Wallis testi yapıldı. SOD ve MnSOD ölçüm sonuçlarının  $10^3$  katı alındıktan sonra istatistiksel analiz yapıldı. Grafikler Microsoft Excel programında hazırlandı.

## 4. BULGULAR

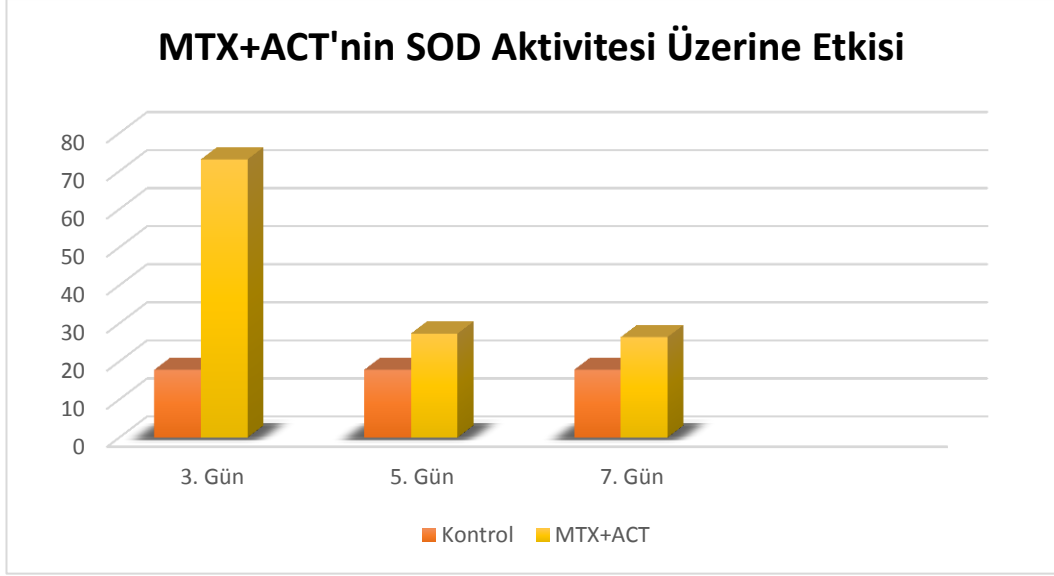
### 4.1. Sitozolik Süperoksit Dismutaz Aktivite Değişimi

**Kontrol grubu ve deney gruplarında, ALA'nın sitozolik SOD enzimi aktivite değerleri karşılaştırılmıştır.** ALA enjeksiyonunu izleyen 3., 5. ve 7. günlerdeki aktivite değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrole göre artan aktivasyon gözlenmiştir. ALA verilen grupta, kontrol grubuna oranla 3.günde sitozolik SOD aktivitesi yaklaşık %11 düzeyde aktivasyonla başlarken bu aktivasyonun 5.günde %25 civarına ulaştığı, 7. günde ise %27 olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). Bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).



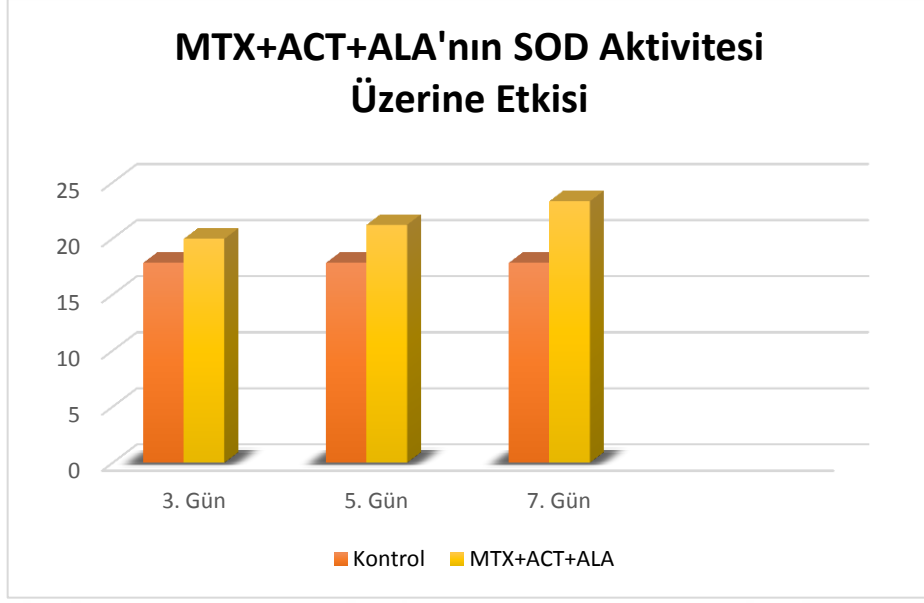
Şekil 4. 1. ALA verilmiş ratlarda sitozolik SOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi

**Kontrol grubu ve deney gruplarında, ACT+MTX'in sitozolik SOD enzimi aktivite değerleri karşılaştırılmıştır.** ACT+MTX enjeksiyonunu izleyen 3. Günde SOD aktivitesinde kontrole göre 3 kat artış olduğu gözlenmiştir. Aktivitedeki bu artış İstatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur( $p<0.05$ ). Bu aktivasyon 5. günde azalarak %53 civarına ulaştıktan sonra 7.günün sonunda % 48.12 oranında olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2). Fakat bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).



Şekil 4. 2. ACT+MTX verilmiş ratlarda sitozolik SOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi

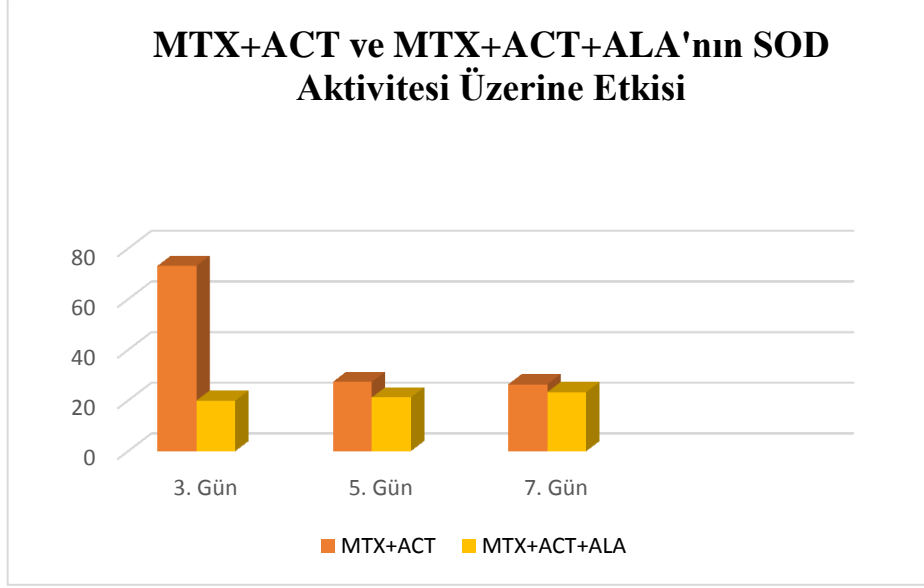
**Kontrol grubu ve deney gruplarında, ACT+MTX+ALA' ın sitozolik SOD enzimi aktivite değerleri karşılaştırılmıştır.** Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ACT+MTX+ALA enjeksiyonunu izleyen 3., 5. ve 7. günlerde kontrole göre giderek artan aktivasyon gözlenmiştir. ACT, MTX ve ALA'nın birlikte enjeksiyonunu izleyen 3.günde sitozolik SOD aktivitesi, kontrol grubuna oranla yaklaşık %11.70 aktivasyonla başlamıştır. Bu aktivasyon giderek artış göstermiş ve 5. günde kontrole oranla %18.60 aktivasyon gözlemlenirken, 7. günün sonunda %31 civarında maksimum aktivasyon göstermiştir (Şekil 4.3). Fakat bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).



Şekil 4. 3. ACT+MTX+ALA verilmiş ratlarda sitozolik SOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi

#### 4.2. Sitozolik Süperoksit Dismutaz Aktivitesinde MTX+ACT İle MTX+ACT+ALA Gruplarının Karşılaştırılması

ACT+MTX ile ACT+MTX+ALA gruplarının sitozolik SOD enzimi aktivite değerleri karşılaştırıldığında; ACT+MTX kombinasyonuna, ALA eklendiğinde 3.günde %73 oranında inhibisyon gözlemlenmiştir. Fakat bu inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu inhibisyon 5.günde azalarak %22.40 iken 7.günde ise %11.80 oranında inhibisyon gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Bu inhibisyonlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).



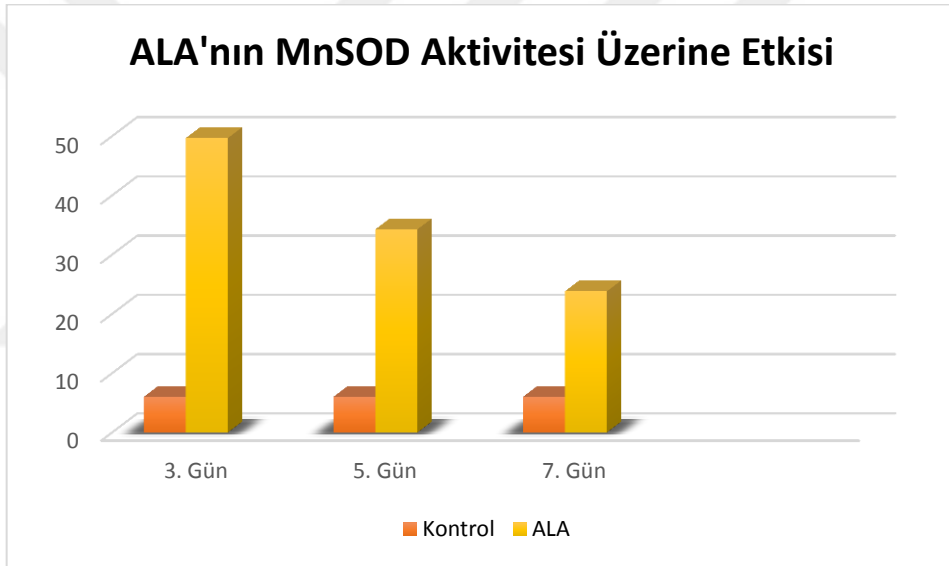
Şekil 4. 4. ACT+MTX ile ACT+MTX+ALA verilmiş ratlarda karşılaştırılmış sitozolik SOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi

GRUPLAR	AKTİVİTE DEĞERLERİ	STANDART SAPMA
KONTROL	3.10	1.44
ALA'NIN 3.GÜN	1.98	0.58
ALA'NIN 5.GÜN	2.22	0.57
ALA'NIN 7.GÜN	2.26	0.80
ACT+MTX'İN 3 GÜN	7.31	9.62
ACT+MTX'İN 5 GÜN	2.73	1.23
ACT+MTX'İN 7 GÜN	2.64	1.25
MTX+ACT+ALA'NIN 3. GÜN	1.99	1.29
MTX+ACT+ALA'NIN 5. GÜN	2.12	1.23
MTX+ACT+ALA'NIN 7. GÜN	2.33	1.12

Tablo 4.1. K, ALA, ACT+MTX ve ACT+MTX+ALA' nın testis dokusunda SOD değerlerinin aktivite değerleri ve standart sapmaları

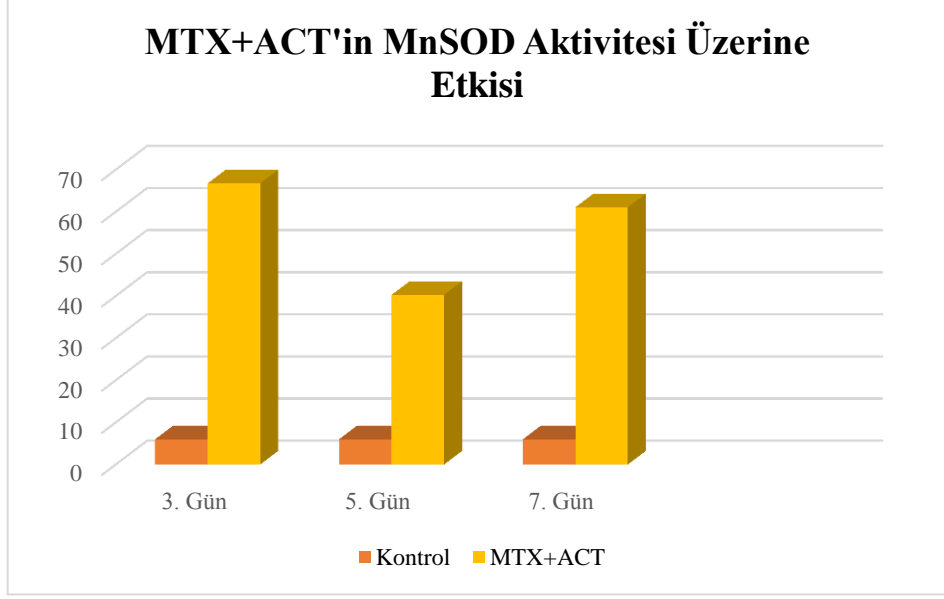
### 4.3. Mangan Süperoksit Dismutaz Aktivite Değişimi

**Kontrol grubu ve deney gruplarında, ALA' nın MnSOD enzimi aktivite değerleri karşılaştırılmıştır.** Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ALA enjeksiyonunu izleyen 3. ve 5.günlerde aktivasyon; 7. günde ise aktivasyon gözlenmiştir. Mn-SOD aktivitesinde, ALA' nın etkisiyle enjeksiyonu izleyen 3. günde kontrol grubuna göre yaklaşık %88 civarında bir aktivasyon gözlenmiştir. 5.günün sonunda bu aktivasyon azalma göstererek %83.20 iken, 7. günün sonunda ise bu aktivasyon kontrol grubuna göre %75 civarında aktivasyon gözlenmiştir (Şekil 4.5). ALA verilen grupta, kontrol grubuna göre tüm saatlerde oldukça yüksek aktivasyon olmasına rağmen, bu aktivasyonlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).



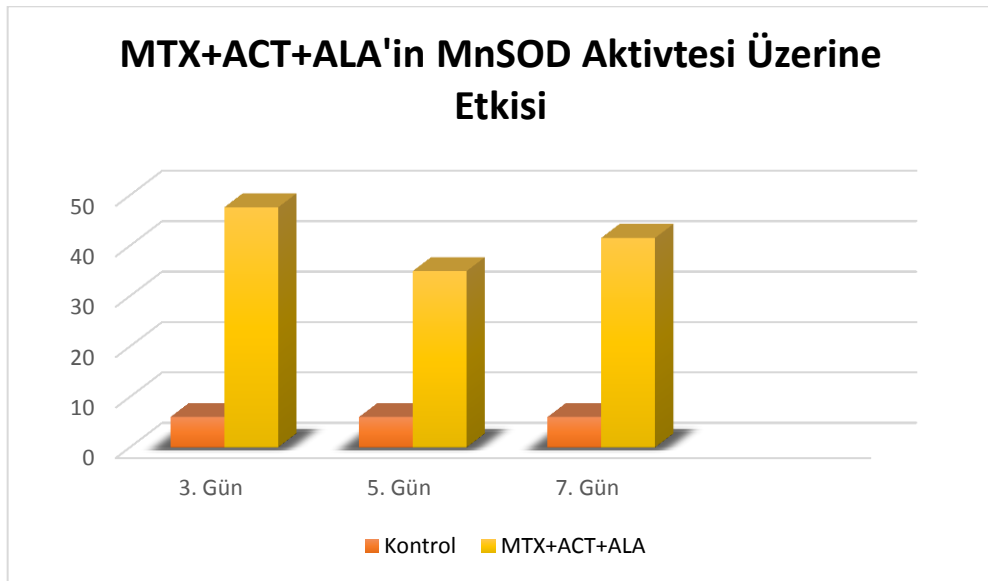
Şekil 4. 5. ALA verilmiş ratlarda MnSOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi

**Kontrol grubu ve deney gruplarında, ACT+MTX' in MnSOD enzimi aktivite değerleri karşılaştırılmıştır.** ACT+MTX' enjeksiyonunu izleyen 3., 5. ve 7. günlerdeki aktivite değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrole göre aktivasyon gözlenmiştir. ACT ve MTX etkisiyle MnSOD aktivitesi, enjeksiyonu takiben 3.günde kontrol grubuna göre % 91 gibi bir aktivasyon düzeyinde gözlenmiştir. 5.günün sonunda yükselerek kontrol grubuna göre %100 oranında maksimum aktivasyon gerçekleşmiş, 7.günün sonunda ise bu aktivasyon kontrol grubuna göre %90 düzeyine gerilemiştir (Şekil 4.6) . Bu aktivasyonlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).



Şekil 4. 6. ACT+MTX verilmiş ratlarda MnSOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi

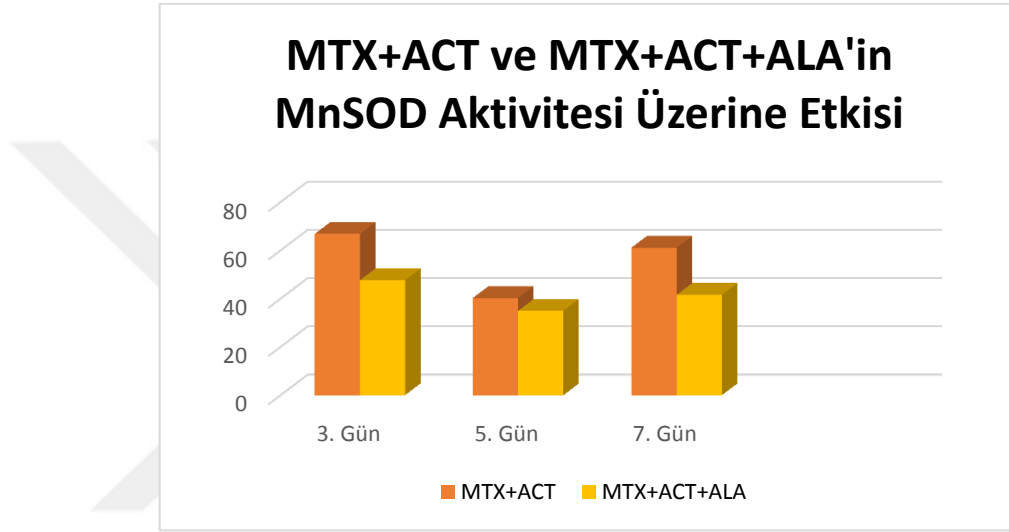
**Kontrol grubu ve deney gruplarında, ACT+MTX+ALA' ın MnSOD enzimi aktivite değerleri karşılaştırılmıştır.** Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ACT+MTX+ALA enjeksiyonunu izleyen 3., 5. ve 7. günlerde kontrole göre aktivasyon gözlenmiştir. MnSOD aktivitesi, ACT, MTX ve ALA' nın birlikte enjeksiyonunu izleyen 3. günde kontrole göre yaklaşık %87 oranda aktivasyonla başlamıştır. Bu aktivasyon 5.günün sonunda azalarak %83 düzeyinde gözlenmiştir. 7.günün sonunda ise aktivasyon kontrole oranla %86 oranında gözlemlenmiştir. (Şekil 4.7). Bu aktivasyonlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).



Şekil 4. 7. ACT+MTX+ALA verilmiş ratlarda MnSOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi

#### 4.4. Mangan Süperoksit Dismutaz Aktivitesinde MTX+ACT İle MTX+ACT+ALA Gruplarının Karşılaştırılması

ACT+MTX ile ACT+MTX+ALA gruplarının MnSOD enzimi aktivite değerleri karşılaştırıldığında; ACT+MTX kombinasyonuna, ALA eklendiğinde 3.günde %28.70 oranında inhibisyon gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu inhibisyon 5.günde azalarak %13.22 iken 7.günde ise %32 civarında inhibisyon gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). Bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).



Şekil 4. 8. ACT+MTX ile ACT+MTX+ALA verilmiş ratlarda karşılaştırılmış MnSOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi

GRUPLAR	AKTİVİTE DEĞERLERİ	STANDART SAPMA
KONTROL	0.13	0.07
ALA'NIN 3.GÜN	3.97	3.40
ALA'NIN 5.GÜN	2.74	2.20
ALA'NIN 7.GÜN	1.90	2.08
ACT+MTX'İN 3 GÜN	5.34	2.77
ACT+MTX'İN 5 GÜN	3.22	3.48
ACT+MTX'İN 7 GÜN	4.88	3.70
MTX+ACT+ALA'NIN 3. GÜN	4.75	2.14
MTX+ACT+ALA'NIN 5. GÜN	2.79	3.13
MTX+ACT+ALA'NIN 7. GÜN	3.32	2.42

Tablo 4.2. K, ALA, ACT+MTX ve ACT+MTX+ALA' nın testis dokusunda MnSOD değerlerinin aktivite değerleri ve standart sapmaları

## 5.TARTIŞMA

Günümüzde kanser ölüme sebep olabilen bir hastalıktır. Kanser tedavisi için geçmişten günümüze birçok çalışma yapılmıştır. Kanser tedavisi için halen çeşitli klinik araştırmalar devam etmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ise çeşitli yan etkilere neden olabilmektedir. Bu ilaçların yan etkilerini önleme veya azaltmak için çeşitli antioksidanlar ile çalışmalar denenmiştir.

MTX, bir folik asit antimetabolitidir. Lösemi ve diğer malignitelerde kemoterapotik bir ajan olarak, düşük dozlarda da psoriasis ve romatoid artrit gibi inflamasyon hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Feagan vd., 2004; Jahovic ,2004). MTX gibi kemoterapotik ilaçların hücreler üzerine sitotoksik etkisi bu hücreler için seçici olmaması nedeniyle çoğalma hızı yüksek olan kemik iliği, intestinal mukoza, kıl kökleri gibi sağlıklı dokularda da toksisite gözlenebilmektedir. Bunun yanında antikanser ilaçlar gonadlar üzerine de etkilidir (Vardı vd., 2010).

Yapılan çalışmalarda MTX'in oksidatif hasar yoluyla veya doğrudan toksisite göstererek testiküler hasara neden olduğu ve üreme sistemi üzerine olumsuz etkilere neden olduğu görülmüştür. Farelerde yapılan çalışmada MTX uygulaması ile seminifer tübüllerde atrofiyle beraber vakualizasyon, hücresel deskuamasyon ve yapısal farklılıklar gözlenmiştir (Oktar, 2010)

ACT, hücrenin proliferasyon ve farklılaşmasını düzenleyen bir vitamin A analogu ve monoaromatik retinoittir (Lee ve Koo, 2005). ACT, sedef hastalığı, hiperkeratotik ve enflamatuar cilt hastalıklar, ve non-melanom cilt kanserleri dahil olmak üzere dermatozlar tedavisinde önemli bir yer almaktadır (Pilkington ve Brogden, 1992; Dunn vd., 2011). Hipertrigliseridemi (Pilkington ve Brogden, 1992), ağız, burun ve mukoz kuruluk, burun kanaması, eritem, kaşıntı, dermatit, saç ve tırnak seyrelmesi (Borghui vd., 2015), hepatoksisite (Katz vd., 1999), transaminite (Roeningk vd., 1998), pankreatit (Pilkington ve Brogden, 1992) ve epifiz plağı dejenerasyonu (Önder, 2014) gibi yan etkilerine neden olan ACT, kullanımı sırasında dikkatli olunması önerilmektedir.

Serbest radikaller genellikle kararsız ve yüksek oranda reaktiflerdir (Li ve ark., 2015; Yoshikawa ve Naito, 2002). Oksidatif stres antioksidan enzim sistemlerinin etkinliğinin azalması ve fazla miktarda ROS üretilmesi sonucu meydana gelir.

Süperoksit dismutaz enzim sistemi, süperoksit anyonunun  $H_2 O_2$  ve moleküler oksijene ayrışmasını katalize eder ve ilk savunma hattını oluşturan en önemli antioksidan enzimdir (Jung, 2014). Serbest radikaller, hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açan önemli makromoleküllere saldırır. Lipitler, nükleik asitler ve proteinler ana hedeflerdir. Serbest radikaller ve diğer aktif oksijen türleri, canlı organizmalarda normal metabolik faaliyetler veya X ışınları, ozon, sigara, hava kirlenmeler ve endüstriyel kimyasallara maruz kalma gibi dış etkenler sonucu oluşur. Serbest radikaller, hücrelerde hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucu meydana gelebilir. Enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin (PG) sentezinde ve sitokrom P-450 sisteminde oluşurken, oksijenin organik bileşiklere ve iyonlaştırıcı radyasyonlara maruz kalmasıyla başlatılan enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucunda da ortaya çıkabilirler (Bagchi ve Puri, 1998).

ALA, suda ve yağda çözünebilen bir antioksidandır. Serbest oksijen, süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleri, hipoklorit ve peroksinitrit gibi serbest radikalleri nötralize eder (Karaca, 2007).

Lipoik asit'in sahip olduğu antioksidan etkilerinin yanında diğer antioksidanları yenileyici ve hücre içi düzeylerini artırıcı etkileri de vardır. Çünkü bir antioksidan serbest radikali nötralize edince antioksidan özelliğini kaybeder. Ancak başka bir antioksidan yardımı ile yenilenebilir. Lipoik asit de glutatyon, GSH, vitamin C, E ve mitokondriyal antioksidan koenzim Q10 (ubikinon) gibi bir çok iyi bilinen antioksidanı radikal veya okside formlarını indirgeyerek yenileyebilir (Roy ve Packer, 1998).

Klinikte lipoik asit, diyabetik nöropati için endikasyon almış olmakla birlikte Lipoik asit takviyesi insanlarda çeşitli hastalıklarda denenmektedir (Abdul ve Hager, 2007). Bunlar arasında diyabette kan şekerinin düşürülmesi, damar hastalıkları, metabolik sendrom, multipl skleroz, Alzheimer, demans sayılabilir (Abdul ve Butterfield, 2007; Pershadsingh, 2007; Salinthon vd., 2008; Karaca, 2007). Yapılan hayvan çalışmalarında ise iskemi-reperfüzyon hasarı, katarakt oluşumu, nörodejenerasyon, yaşlanma, kolit, radyasyon hasarı ve çeşitli ilaç (adriamisin, siklofosfamid, siklosporin A) toksisitelerine karşı yararlı olduğu gösterilmiştir (Glantzounis vd., 2006).

Yapmış olduğumuz çalışmamızda, ACT ve MTX etken maddelerinin ve ALA'nın rat testis dokusunda sitozolik SOD ve MnSOD aktivitelerine etkileri araştırılmıştır. Bunun için kontrol (K), ALA, ACT+MTX ve ACT+MTX+ALA olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. Bunların 3., 5. ve 7. günlerdeki antioksidan savunma sistemi enzimleri olan SOD ve MnSOD aktiviteleri spektrofotometrik olarak incelenmiştir.

Deney gruplarının sitozolik SOD aktivite değerleri karşılaştırıldığında sadece ALA verilen grupta, enjeksiyonu izleyen 3.günde sitozolik SOD değeri K grubuna göre aktivasyon ile başlamıştır. Bu aktivasyon 5.günde ve 7. günde giderek artış göstermiştir. ALA'ya maruz kalma süresi uzadıkça testis dokusunda SOD aktivitesinin indüklendiği gözlenmiştir.

ACT+MTX uygulanan grupta ise 3.günde sitozolik SOD aktivitesinde K'ya göre 3 kat fazla aktivasyon gözlemlenmiştir. 5.günde ve 7. günde aktivasyon değerinde düşüş gözlemlenmiştir. ACT+MTX+ALA uygulanan grupta ise K'ya göre sitozolik SOD enzimi aktivite değerleri giderek yükselen bir aktivasyon göstermiş. K grubu ve deney gruplarının sitozolik SOD enzimi aktivite değerleri karşılaştırıldığında K grubuna göre deney gruplarının tümünde sitozolik SOD enzim aktivitesinde aktivasyon gözlenmiştir.

ACT+MTX grupları ile ACT+MTX+ALA gruplarının sitozolik SOD aktivite değerleri karşılaştırıldığında ise, ACT+MTX kombinasyonuna ALA eklendiği zaman 3.günde %73 oranında inhibisyon gözlemlenmiştir. Bu inhibisyonun 5.günde %22.40, 7. günde ise %11.80 civarlarında olduğu ve giderek azaldığı gözlenmiştir. ACT+MTX kombinasyonunun neden olduğu SOD aktivite artışı bu kombinasyona ALA'in eklenmesiyle düşüşe geçmiştir. ALA'in eklenmesiyle gözlenen aktiviteki azalmanın ALA'in radikal süpürücü özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Deney gruplarının MnSOD aktivite değerleri karşılaştırıldığında sadece ALA verilen grupta, K'ya göre aktivasyon gözlemlenmiştir. Bu aktivasyon 3.günde maksimum bir değer gösterirken 5. ve 7. günde düşüş göstermiştir. Sonuç olarak ALA, MnSOD aktivitesinde de artışa neden olmuştur. Fakat SOD aktivitesi günlere göre giderek artarken MnSOD aktivitesi giderek azalmıştır. Çalışmamızdan elde edilen bu sonuçlar Tetikçok ve ark. (2015),'nın ALA'nın SOD ve CAT enzim aktivitelerini arttırdığını belirttiği çalışmaları ile uyum sağlamaktadır. ACT+MTX uygulanan grupta ise MnSOD değeri, K grubuna göre tüm günlerde aktivasyon

göstermiş olup bu aktivasyon 5.günde maksimum bir değer gösterirken,7 .günde düşüş gözlemlenmiştir. K grubuna göre ACT+MTX+ALA grubunun MnSOD enzimi aktivite değerlerinde tüm günlerde aktivasyon gözlenmiştir.

ACT+MTX grubu ile ACT+MTX+ALA grubu MnSOD enzim aktivite değerleri karşılaştırıldığında ACT+MTX+ALA grubunda tüm günlerde inhibisyon gözlemlenmiştir. ACT+MTX kombinasyonuna ALA'nın eklenmesiyle MnSOD aktivitelerinde inhibisyon gözlenmesi ALA'nın antioksidan davranışı ile ilişkilendirilebilir.

Dagguli ve ark. (2014), MTX uygulamasına bağlı testis hasarının gelişmesinde oksidatif stresin (TOS, OSI ve MDA seviyelerinin artması) önemini belirtmişlerdir

Yuluğ ve ark. (2013), MTX kullanımının Johnson'ın testis biyopsi skorunu (JTBS) anlamlı şekilde düşürdüğü, apoptotik indeksi ise testis ve epididimde arttırdığını vurgulamışlardır. Diğer bir çalışmada seminifer tübül epitelinin incelenmesi ve spermatogonial hücrelerde azalma gibi histopatolojik bulgulara ek olarak elektron mikroskopik bulgularda da benzer hasarlar tespit edilmiştir

Safaei vd (2017) yaptıkları çalışma ile MTX'in CAT, GPx ve SOD aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalttığını ve gallik asit ile muamelesi sonucunda MTX'in neden olduğu CAT, GPx ve SOD aktivitesinin azalmasının önemli ölçüde inhibe olduğunu göstermişlerdir.

Maremanda ve ark. (2017), MTX ile tedavi edilen sıçanların testislerinde tübüler atrofi ve tunel pozitif hücre sayısının arttığını (germ hücrelerde DNA hasarı) göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada MTX verilen grupta apoptoz belirteçleri olan Bax protein miktarının arttığı, Bcl-2'nin (antiapoptoz) ise azaldığı belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada sıçanlarda MTX uygulamasına bağlı olarak interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), üreme hormonları (FSH, LH ve testosteron) ve antioksidanların (GST, SOD ve CAT) serum seviyelerinde azalma olduğunu belirtmişlerdir (Saad vd., 2018).

Ayrıca Saad ve ark. (2018), MTX grubundaki sıçanlarda GST, SOD, steroidojenez ilişkili genler, IFN- $\gamma$ , Bcl-2 ve NFKB'nin mRNA ekspresyonunun azaldığını, BAX ekspresyonu ve caspase-9'un immünoreaktivitesinin arttığını göstermişlerdir.

Yine Fatemeh ve ark. (2016) farelerde MTX'in neden olduğu germ hücre apoptozisine karşı timokinonun koruyucu etkilerinin incelendiği çalışmada MTX grubunda germ hücre dejenerasyonunda ve apoptotik indekste anlamlı bir artış olduğunu bildirmişlerdir (Fatemeh vd., 2016). Bunlara ek olarak p53, kaspaz-8, kaspaz-3, kaspaz-9, Bax, Bax/Bcl-2 oranının mRNA ifadesinde anlamlı bir artış olduğunu fakat Bcl-2 ifadesinde bir azalma olduğunu ifade etmişlerdir (Fatemeh vd., 2016).

MTX'in hasarladığı testis dokusunda resveratrolün etkilerini değerlendirdikleri çalışmada Yuluğ ve ark. (2013), MTX uygulanan grupta SOD ve CAT enzim düzeylerinin azalmış olduğunu bildirdiler. Vardı ve ark. (2010) da MTX'in sıçan karaciğerinde SOD, CAT ve Glutasyon peroksidaz (GSHPx) enzim düzeylerinin azaldığını gözlemlediler.

Yapılan çalışmalarda MTX'in çeşitli dokularda SOD, CAT, GPx gibi enzimlerin aktivitelerinde inhibisyona neden olduğu gözlenirken çalışmamız sonuçlarına göre testis dokusunda MTX+ACT kombinasyonunun SOD ve MnSOD aktivitelerini artırdığı gözlenmiştir.

Aşcı (2010) yaptığı çalışmada böbrek dokusunda kontrole göre MTX'in MDA düzeyini arttırdığı, CAT ve SOD aktivitelerinde inhibisyon meydana getirdiğini gözlemlemiştir. Buna karşın Misoprostol'un MDA düzeyini anlamlı olarak azalttığı, CAT ve SOD aktivitelerini ise normal seviyeye ulaştırığını bildirmiştir.

Selvakumar ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada Siklofosamid ile oluşturulan testis hasarında Alfa Lipoik Asit'in koruyucu etkinliğini biyokimyasal olarak incelediklerinde, GPX değerlerinde azalış ve GSH değerlerinde ise kontrol grubuna göre artış olduğunu belirtmişlerdir.

Lebda ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada Akrilamid ile oluşturulan testis hasarına ALA'nın etkinliğini biyokimyasal olarak incelediklerinde, MDA değerinin kontrol grubuna göre Lipoik Asit grubunda azaldığını, GSH ve GPx değerlerinin ise kontrol grubuna göre Lipoik Asit grubunda arttığını belirtmişlerdir.

Lowenthal vd (2008), ACT ve MTX'in eş zamanlı kullanımı hakkında yaptıkları bir çalışmada aynı anda MTX ve ACT alan psoriasisli 18 hastanın klinik verilerini gözden geçirmişlerdir. Hastalara günde bir kez veya alternatif günlerde bir kez 25 mg ACT ve haftalık olarak 7.5 ila 25 mg MTX uygulanmıştır. Bu hasta

serisinde, ACT ve MTX kombinasyonunun, hepatoksisiteyi arttırmadığı ve MTX veya ACT ile monoterapiye dirençli hastalarda bu kombinasyon tedavisinin uygun olabileceğini düşünmüşler ve düşük dozda ACT'nin ile MTX ile kombin edilebileceği sonucuna varmışlardır.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde MTX+ALA verilen grup ile MTX+ACT+ALA verilen grup karşılaştırıldığında MTX+ACT kombinasyonuna ALA eklenmesiyle hem SOD hem de MnSOD aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte tüm deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yine hem SOD hem de MnSOD aktivitesinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da önemli derecede yüksek olduğu gözlenmiştir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre ALA verilen grupta hem SOD hem de MnSOD enzim aktivitesinde K grubuna göre aktivasyon olduğu gözlenmiştir. ACT+MTX verilen grup ile ACT+MTX+ALA verilen grup karşılaştırıldığında ise ACT+MTC+ALA verilen gruptaki SOD ve MnSOD aktivitelerinde ACT+MTX verilen gruba göre inhibisyon olduğu gözlenmiştir. Bu gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olsa da ACT+MTX kombinasyonuna ALA'nın eklenmesiyle SOD ve MnSOD aktivitelerinde inhibisyon gözlenmesi ALA'nın antioksidan davranışı ile ilişkilendirilebilir.

ALA'nın farklı doz ve süre uygulamalarının yapılacağı çalışmalar ACT+MTX kombinasyonuna karşı ALA'nın koruyucu etkisini açıklamaya destek olacak ve literatüre katkıları sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abdul, H. M., and Butterfield, D. A. (2007). Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2007;; 42: 371–384.
- Agarwal, A., Cocuzza, M., Abdelrazik, H., & Sharma, R. K. (2008). Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. *Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment*, 195-218.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915–7922. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7915>
- Assaraf, Y., G. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat.* 2006 Aug-Oct;9(4-5):227-46. doi: 10.1016/j.drug.2006.09.001. Epub 2006 Nov 7. PMID: 17092765.
- Arora, V., Kuhad, A., Tiwari, V., & Chopra, K. (2011). Curcumin ameliorates reserpine-induced pain-depression dyad: behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. *Psychoneuroendocrinology*, 36(10), 1570–1581.
- Arthur, M. J., Bentley, I. S., Tanner, A. R., Saunders, P. K., Millward-Sadler, G. H., & Wright, R. (1985). Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology*, 89(5), 1114–1122.
- Ayaz, A. (2014). Alfa Lipoik Asidin Sağlık Üzerine Etkileri The Health Effects of Alpha Lipoic Acid. 2014:11-23.
- Babiak, R. M., Campello, A. P., Carnieri, E. G., & Oliveira, M. B. (1998). Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell biochemistry and function*, 16(4), 283–293.
- Bannwarth, B., Péhourcq, F., Schaefferbeke, T., & Dehais, J. (1996). Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clinical pharmacokinetics*, 30(3), 194–210.
- Berger M. M. (2005). Can oxidative damage be treated nutritionally?. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 24(2), 172–183.
- Berk, M., Ng, F., Dean, O., Dodd, S., & Bush, A. I. (2008). Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in pharmacological sciences*, 29(7), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.001>.
- Betts, J. G., DeSaix, P., Johnson, E., Johnson, J. E., Korol, O., Kruse, D. H., et al. (2014). *Anatomy and Physiology*.
- Bhuiyan, Z., H. and Chowdhury, M., K. (2016). Acitretin in dermatology A review. *Bangladesh Medical Journal*, 45(2), 98-100.
- Bhuvarahamurthy, V., Balasubramanian, N., & Govindasamy, S. (1996). Effect of radiotherapy and chemoradiotherapy on circulating antioxidant system of human uterine cervical carcinoma. *Molecular and cellular biochemistry*, 158(1), 17–23.
- Bobrysheva, V., K., S., A. (2011). *Histology, Cytology, Embryology: Textbook*. Lugansk: Knowledge; p-480-499.
- Brody, E. C. J. (1988). The destructive potential of free oxygen radicals. *International Herald Tribune*. April 2 : p4 - 5.
- Bruton, L. (2009). *Tedavinin Farmakolojik Temeli*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 1315-1405.

- Byus, C. V., Klimpel, G. R., Lucas, D. O., & Russell, D. H. (1977). Type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinase as opposite effectors of lymphocyte mitogenesis. *Nature*, 268(5615), 63–64.
- Cadenas, E., & Sies, H. (1998). The lag phase. *Free radical research*, 28(6), 601–609. <https://doi.org/10.3109/10715769809065816>.
- Chabner, B. A., Allegra, C. J., Curt, G. A., Clendeninn, N. J., Baram, J., Koizumi, S., Drake, J. C., & Jolivet, J. (1985). Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug. *The Journal of clinical investigation*, 76(3), 907–912. <https://doi.org/10.1172/JCI112088>.
- Chan, E. S., & Cronstein, B. N. (2002). Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis research*, 4(4), 266–273.
- Choudhury, R. C., Ghosh, S. K., & Palo, A. K. (2001). Potential transmission of the cytogenetic toxic effects of methotrexate in the male germline cells of Swiss mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, 10(3), 81–88.
- Coleman, R., & MacDonald, D. (1994). Effects of isotretinoin on male reproductive system. *Lancet (London, England)*, 344(8916), 198.
- Conner, E. M., & Grisham, M. B. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 12(4), 274–277.
- Costa, M., Gerner, E. W., & Russell, D. H. (1978). Cyclic AMP levels and types I and II cyclic AMP-dependent protein kinase activity in synchronized cells and in quiescent cultures stimulated to proliferate. *Biochimica et biophysica acta*, 538(1), 1–10.
- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., McCord, J. M., & Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of internal medicine*, 107(4), 526–545.
- Çıkrıkçıoğlu, M. And Duran., E. (2001). Koroner dolaşım, iskemi ve reperfüzyon. İnsizyon; 4(4): 119- 122
- Dagullu, M., Dede, O., Utangac, M. M, et al. (2014). Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(12), 5511–5516.
- Dalrymple, J. M., Stamp, L. K., O'Donnell, J. L., Chapman, P. T., Zhang, M., & Barclay, M. L. (2008). Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 58(11), 3299–3308.
- David, M., Hodak, E., & Lowe, N. J. (1988). Adverse effects of retinoids. *Medical toxicology and adverse drug experience*, 3(4), 273–288.
- Dervieux, T., Furst, D., Lein, D. O., Capps, R., Smith, K., Walsh, M., & Kremer, J. (2004). Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 50(9), 2766–2774.
- Dogra S, Yadav S. Acitretin in psoriasis: an evolving scenario. *Int J Dermatol*. (2014). May;53(5):525-38. doi: 10.1111/ijd.12365. Epub 2014 Mar 6. PMID: 2460198.
- Dökmeci, İ. (2007). Oral Antikoagülanlar. İçinde: Farmakolojik İlaçlar ve Etkileri. İstanbul: Alfa Yayıncılık; s.369–75.
- Dogra, S., & Yadav, S. (2014). Acitretin in psoriasis: an evolving scenario. *International journal of dermatology*, 53(5), 525–538. <https://doi.org/10.1111/ijd.12365>.

- Edno L, Bressolle F, Gomeni R, Bologna C, Sany J, Combe B. Total and free methotrexate pharmacokinetics in rheumatoid arthritis patients. *Ther Drug Monit.* 1996 Apr;18(2):128-34. doi: 10.1097/00007691-199604000-00004. PMID: 8721274.
- El-Sheikh, A. A., Morsy, M. A., & Al-Taher, A. Y. (2014). Multi-drug resistance protein (Mrp) 3 may be involved in resveratrol protection against methotrexate-induced testicular damage. *Life sciences*, 119(1-2), 40–46.
- Ergun, T. (2007). Psoriasisin Sistemik Tedavi K›lavuzu: Y›ntem Seçimi veç zlemleç Içgili Pratik Öneriler, Tart› flmal› Konular. *Turkish Journal of Dermatology*, 1, 8-14.
- Farr, S. A., Poon, H. F., Dogrukol-Ak, D., Drake, J., Banks, W. A., Eyerma, E., & Morley, J. E. (2003). The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *Journal of neurochemistry*, 84(5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01580.x>
- Fatemeh Sheikhbahaei MS, Mozafar Khazaei, Ph.D.1, Arezou Rabzia, M.Sc.1, Kamran Mansouri, M.Sc.2, Ali Ghanbari, Ph.D.1\*. Protective Effects of Thymoquinone against Methotrexate-Induced Germ Cell Apoptosis in Male Mice. *Royan Institute International Journal of Fertility and Sterility* Vol 9, No 4, Jan-Mar 2016, Pages: 541-547.
- Feagan, Brian & Alfadhli, Ahmad. (2004). Methotrexate in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology clinics of North America*. 33. 407-20, xi. 10.1016/j.gtc.2004.03.001.
- Feldman, S. R., Evans, C., & Russell, M. W. (2005). Systemic treatment for moderate to severe psoriasis: estimates of failure rates and direct medical costs in a north-eastern US managed care plan. *The Journal of dermatological treatment*, 16(1), 37–42.
- Fernandes, R. S., & Cotter, T. G. (1994). Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. *Biochemical pharmacology*, 48(4), 675–681. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90044-2).
- Fontana, J. A., Reppucci, A., Durham, J. P., & Miranda, D. (1986). Correlation between the induction of leukemic cell differentiation by various retinoids and modulation of protein kinases. *Cancer research*, 46(5), 2468–2473.
- Glantzounis, G. K., Yang, W., Koti, R. S., Mikhailidis, D. P., Seifalian, A. M., & Davidson, B. R. (2006). The role of thiols in liver ischemia-reperfusion injury. *Current pharmaceutical design*, 12(23), 2891–2901.
- Gangjee, A., Dubash, N. P., Zeng, Y., & McGuire, J. J. (2002). Recent advances in the chemistry and biology of folypoly-gamma-glutamate synthetase substrates and inhibitors. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 2(3), 331–355. <https://doi.org/10.2174/1568011024606352>.
- Gao, F., Tomitori, H., Igarashi, K., & Horie, T. (2002). Correlation between methotrexate-induced intestinal damage and decrease in polyamine content. *Life sciences*, 72(6), 669–676.
- Gregorio, L. L., Caparroz, F., Nunes, L. M., Neves, L. R., & Macoto, E. K. (2014). Olfaction disorders: retrospective study. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 80(1), 11–17. <https://doi.org/10.5935/1808-8694.20140005>
- Gutteridge J. M. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-biological interactions*, 91(2-3), 133–140.
- Halliwell B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet (London, England)*, 344(8924), 721–724.

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet (London, England)*, *1*(8391), 1396–1397. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91886-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91886-5).
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics*, *246*(2), 501–514. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90305-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90305-x).
- Hashkes, P. J., Becker, M. L., Cabral, D. A., Laxer, R. M., Paller, A. S., Rabinovich, C. E., Turner, D., & Zulian, F. (2014). Methotrexate: new uses for an old drug. *The Journal of pediatrics*, *164*(2), 231–236.
- Hsu, S., Papp, K. A., Lebwohl, M. G., et al. (2012). Consensus guidelines for the management of plaque psoriasis. *Archives of dermatology*, *148*(1), 95–102.
- Hummel, T., Heilmann, S., & Hüttenbriuk, K. B. (2002). Lipoic acid in the treatment of smell dysfunction following viral infection of the upper respiratory tract. *Laryngoscope*. *112*(11):2076-2080. doi:10.1097/00005537-200211000-00031
- Is, Y., and Woodside, J. V. (2001). Antioxidant in health and disease. *J Clin Pathol*, *54*(3), 176-186.
- Jahovic, N., Cevik, H., Sehirli, A. O., Yeğen, B. C., & Sener, G. (2003). Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *Journal of pineal research*, *34*(4), 282–287.
- Jahovic, N., et al., (2004). *Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats*. *Cell Biochem Funct.* **22** (3): p. 169-78.
- Jalilov, A. S., Zhang, C., Samuel, E. L., Sikkema, W. K., Wu, G., Berka, V., Kent, T. A., Tsai, A. L., & Tour, J. M. (2016). Mechanistic Study of the Conversion of Superoxide to Oxygen and Hydrogen Peroxide in Carbon Nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*, *8*(24), 15086–15092. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b03502>.
- Jeffes, E. and Kaneshiro, C. (1998). Methotrexate and Antifolate Drugs: Cytotoxic drugs with Multiple Uses. *Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology (AACCC)* ;19/4 :93-103.
- Jialal, I., & Fuller, C. J. (1993). Oxidized LDL and antioxidants. *Clinical cardiology*, *16*(4 Suppl 1), I6–I9. <https://doi.org/10.1002/clc.4960161304>.
- Jukes, T., H. (1978). The history of methotrexate. *Cutis*, *21*(3), 396–398.
- Kadiiska, M. B., Gladen, B. C., Baird, D. D., et al. (2005). Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl4 poisoning. *Free radical biology & medicine*, *38*(6), 711–718. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.024>.
- Karaca, E. G. (2008). Lipoik asit evrensel antioksidan. *Afyon Kocatepe Fen Bilimleri Dergisi*. *8*:231-46.
- Karaca, E., G. (2015). Lipoik Asit: Evrensel Antioksidan. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilim Derg.*;8(1):231-245.
- Karaca, G. (2007). Dietilnitrozamin verilen ratlarda alfa lipoik asidin koruyucu etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Katz, H. I., Waalen, J., & Leach, E. E. (1999). Acitretin in psoriasis: an overview of adverse effects. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *41*(3 Pt 2), S7–S12.
- Kayaalp, O. (1998). *Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Tas Ankara*. p. 388-393.
- Kılınç, K., and Kilinc, A. (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Med. J*, *33*(2), 110-118.

- Kılınc. K. Oksijen Radikalleri, Üretilmeleri, Fonksiyonları. Toksik Etkileri. *Biyokimya Dergisi*, 1985; 10: 60-89.
- Konrad, T., Vicini, P., Kusterer, K., et al. (1999). alpha-Lipoic acid treatment decreases serum lactate and pyruvate concentrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 22(2):280-287. doi:10.2337/diacare.22.2.280
- Koo, D. Y., Lee, S. H., Lee, S., Chang, J., Jung, H. H., & Im, G. J. (2016). Comparison of the effects of lipoic acid and glutathione against cisplatin-induced ototoxicity in auditory cells. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 91, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.10.008>
- Kramer, K. (2001). *Nutra ceutials in Health and Disease Prevention*. Marcel Dekker Incorporated, New York; 8:113.
- Kremer, J. M., Galivan, J., Streckfuss, A., & Kamen, B. (1986). Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis and rheumatism*, 29(7), 832–835.
- Kremer, J. M., & Lee, J. K. (1986). The safety and efficacy of the use of methotrexate in long-term therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 29(7), 822–831.
- Kumari, S. S. K., Sharma, A. K., Kaur, I. (2016). Methotrexate induced hepatotoxicity and its management. *Inter J Sci Res*. 5: 1477-1481.
- Larsen, F. G., Jakobsen, P., Larsen, C. G., Nørgaard, A., Kragballe, K., & Nielsen-Kudsk, F. (1987). Single dose pharmacokinetics of etretin and etretinate in psoriatic patients. *Pharmacology & toxicology*, 61(2), 85–88.
- Lee, C. S., & Koo, J. (2005). A review of acitretin, a systemic retinoid for the treatment of psoriasis. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 6(10), 1725–1734.
- Lee, C. S., & Li, K. (2009). A review of acitretin for the treatment of psoriasis. *Expert opinion on drug safety*, 8(6), 769–779. <https://doi.org/10.1517/14740330903393732>.
- Lebda, M., Sadek, M. K., Tohamy, G. H., Abouzed, K. T., Shukry, M., Umezewa, M., El-Sayed, S. Y. (2018). Potential role of  $\alpha$ -lipoic acid and *Ginkgo biloba* against silver nanoparticles-induced neuronal apoptosis and blood-brain barrier impairments in rats. *Life Sciences*, Volume 212, Pages 251-260.
- Levin, A. A., Gottlieb, A. B., & Au, S. C. (2014). A comparison of psoriasis drug failure rates and reasons for discontinuation in biologics vs conventional systemic therapies. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, 13(7), 848–853.
- Lima, A., Seabra, V., Bernardes, M., Azevedo, R., Sousa, H., & Medeiros, R. (2014). Role of key TYMS polymorphisms on methotrexate therapeutic outcome in portuguese rheumatoid arthritis patients. *PloS one*, 9(10), e108165.
- Liu, D. Y., Lon, H. K., Wang, Y. L., DuBois, D. C., Almon, R. R., & Jusko, W. J. (2013). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicities of methotrexate in healthy and collagen-induced arthritic rats. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 34(4), 203–214. <https://doi.org/10.1002/bdd.1838>.
- Macêdo, D. S., Medeiros, C. D., Cordeiro, R. C., et al. (2012). Effects of alpha-lipoic acid in an animal model of mania induced by D-amphetamine. *Bipolar disorders*, 14(7), 707–718.
- Maczurek, A., Hager, K., Kenkies, M., Sharman, M., Martins, R., Engel, J., Carlson, D. A., & Münch, G. (2008). Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Advanced drug delivery reviews*, 60(13-14), 1463–1470.

- Manson, P. N., Anthenelli, R. M., Im, M. J., Bulkley, G. B., & Hoopes, J. E. (1983). The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Annals of surgery*, 198(1), 87–90.
- Maremanda, K. P., & Jena, G. B. (2017). Methotrexate-induced germ cell toxicity and the important role of zinc and SOD1: Investigation of molecular mechanisms. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(1), 596–601.
- Mates, M. J., Perez-Gomez, C., De Castro, N. I. (1999). Antioxidant Enzymes and Human Disease. *Clinical Biochemistry*, 8:595-603
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *The Journal of biological chemistry*, 243(21), 5753–5760.
- Menter, A., Korman, N. J., Elmets, C. A., et al. (2009). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 61(3), 451–485.
- Menter, A., Korman, N. J., Elmets, C. A., et al. (2011). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 6. Guidelines of care for the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis: case-based presentations and evidence-based conclusions. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(1), 137–174
- Mescher, A. (2016). Junqueira's Basic Histology text and atlas. fourteenth ed. McGraw-Hill Education; p:439-459.
- Morehouse, L. A., Thomas, C. E., & Aust, S. D. (1984). Superoxide generation by NADPH-cytochrome P-450 reductase: the effect of iron chelators and the role of superoxide in microsomal lipid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 232(1), 366–377.
- Morris, T. W., Reed, K. E., & Cronan, J. E., Jr (1995). Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lplA* and *lipB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *Journal of bacteriology*, 177(1), 1–10. <https://doi.org/10.1128/jb.177.1.1-10.1995>
- Mukherjee, S., Date, A., Patravale, V., Korting, H. C., Roeder, A., & Weindl, G. (2006). Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clinical interventions in aging*, 1(4), 327–348.
- Namazi N, Larijani B, Azadbakht L. (2018). Alpha-lipoic acid supplement in obesity treatment: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Clin Nutr*. Apr;37(2):419-428. doi: 10.1016/j.clnu.2017.06.002. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28629898.
- Nouri, H. S., Azarmi, Y., & Movahedin, M. (2009). Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia*, 41(2), 105–110.
- Oktar, S., Gökçe, A., Aydin, M., Davarci, M., Meydan, S., Oztürk, O. H., & Koç, A. (2010). Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. *Toxicology and industrial health*, 26(7), 433–438.
- Orfanos, C. E., Zouboulis, C. C., Almond-Roesler, B., & Geilen, C. C. (1997). Current use and future potential role of retinoids in dermatology. *Drugs*, 53(3), 358–388.
- Ormerod, A. D., Campalani, E., Goodfield, M. J., & BAD Clinical Standards Unit (2010). British Association of Dermatologists guidelines on the efficacy and use of acitretin in dermatology. *The British journal of dermatology*, 162(5), 952–963.
- Oruch, R., and Pryme, I. F. (2012). The biological significance of vitamin A in humans: A review of nutritional aspects and clinical considerations. *ScienceJet*, 1, 19.

- Packer, L., Kraemer, K., & Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 17(10), 888–895i
- Patel, M. S., & Roche, T. E. (1990). Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4(14), 3224–3233.
- Padmanabhan, S., Tripathi, D. N., Vikram, A., Ramarao, P., & Jena, G. B. (2009). Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid. *Mutation research*, 673(1), 43–52.
- Pershad Singh, H. A. (2007). Alpha--lipoic acid: physiologic mechanisms and indications for the treatment of metabolic syndrome. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;;16(3): 291-302.
- Pilkington, T., & Brogden, R. N. (1992). Acitretin : A Review of its Pharmacology and Therapeutic Use. *Drugs*, 43(4), 597–627.
- Polat, D. K. (2008). Retinitis pigmentosa"lı hastalarda bazı enflamasyon ve oksidatif stres belirteçlerinin değişimi. Uzmanlık tezi. İstanbul.
- Quinn, C. T., & Kamen, B. A. (1996). A biochemical perspective of methotrexate neurotoxicity with insight on nonfolate rescue modalities. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 44(9), 522–530.
- Raynaud, F., Leduc, C., Anderson, W. B., & Evain-Brion, D. (1987). Retinoid treatment of human psoriatic fibroblasts induces an increase in cyclic AMP-dependent protein kinase activity. *The Journal of investigative dermatology*, 89(1), 105–110.
- Reed, L. J., Debusk, B. G., Gunsalus, I. C., & Hornberger, C. S., Jr (1951). Crystalline alpha-lipoic acid; a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science (New York, N.Y.)*, 114(2952), 93–94.
- Roenigk, H. H., Jr, Auerbach, R., Maibach, H., Weinstein, G., & Lebwohl, M. (1998). Methotrexate in psoriasis: consensus conference. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 38(3), 478–485. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(98\)70508-0](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(98)70508-0).
- Rossi, M., & Pellegrino, M. (2009). Acitretin-associated erectile dysfunction: a case report. *Cases journal*, 2, 210.
- Roy, S., & Packer, L. (1998). Redox regulation of cell functions by alpha-lipoate: biochemical and molecular aspects. *BioFactors (Oxford, England)*, 8(1-2), 17–21.
- Saad, D. Y., Soliman, M. M, Mohamed, A. A, & Youssef, G. B.(2018). Protective effects of sea cucumber (Holothuriaatra) extract on testicular dysfunction induced by immune suppressant drugs in Wistar rats. *Andrologia*.50(6).
- Saladin, K. S. (2017). Human Anatomy fifth edition by McGraw-Hill Education: p:702-26.
- Salinthon, S., Yadav, V., Bourdette, D. N., & Carr, D. W. (2008). Lipoic acid: a novel therapeutic approach for multiple sclerosis and other chronic inflammatory diseases of the CNS. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 8(2), 132–142.
- Sarkar, R., Chugh, S., & Garg, V. K. (2013). Acitretin in dermatology. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*, 79(6), 759–771.
- Scheibmeir, H. D., Christensen, K., Whitaker, S. H., Jegaethesan, J., Clancy, R., & Pierce, J. D. (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive & critical care nursing*, 21(1), 24–28.

- Seideman, P., Beck, O., Eksborg, S., & Wennberg, M. (1993). The pharmacokinetics of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in patients with rheumatoid arthritis. *British journal of clinical pharmacology*, 35(4), 409–412.
- Selvakumar, E., Prahalathan, C., Sudharsan, P. T., & Varalakshmi, P. (2006). Protective effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced testicular toxicity. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 367(1-2), 114–119.
- Sembulingam K, SPEoMPSe, Jaypee Brothers Medical Publishers. 2012; p 455-513
- Sheikhbahaei, F., Khazaei, M., Rabzia, A., et al. (2016). Protective Effects of Thymoquinone against Methotrexate-Induced Germ Cell Apoptosis in Male Mice. *Royan Institute International Journal of Fertility and Sterility* Vol 9, No 4, Jan-Mar 2016, Pages: 541-547. 2016.
- Stuck, A. E., Brindley, C. J., Busslinger, A., & Frey, F. J. (1989). Pharmacokinetics of acitretin and its 13-cis metabolite in patients on haemodialysis. *British journal of clinical pharmacology*, 27(3), 301–304.
- Tatar, A., Korkmaz, M., Yayla, M., Gozeler, M. S., Mutlu, V., Halici, Z., Uslu, H., Korkmaz, H., & Selli, J. (2016). Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of alpha-lipoic acid in experimentally induced acute otitis media. *The Journal of laryngology and otology*, 130(7), 616–623.
- Tekkes., Y. (2006). Streptozotisin ile diabe oluşturulmuş farelerde aspirin ve e vitamininin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmara Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı.
- Tetikçok, R., Özçetin, M., Çeltek, N. Y., Oktay, G., Ünlü, U., ve Şengül, M. (2015). LİPOİK ASİT. *Journal of Contemporary Medicine*, 5(3), 206-209.
- Tian, H., & Cronstein, B. N. (2007). Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases*, 65(3), 168–173.
- Umezawa, Y., Nobeyama, Y., Hayashi, M., Fukuchi, O., Ito, T., Saeki, H., & Nakagawa, H. (2013). Drug survival rates in patients with psoriasis after treatment with biologics. *The Journal of dermatology*, 40(12), 1008–1013.
- Uysal, M. (1998). Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*. 1998. 11:336-341.
- Vahlquist, A. (1992). Long-term safety of retinoid therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 27(6 Pt 2), S29–S33.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44–84.
- Van Dam, P. S., van Asbeck, B. S., Van Oirschot, J. F., Biessels, G. J., Hamers, F. P., & Marx, J. J. (2001). Glutathione and alpha-lipoate in diabetic rats: nerve function, blood flow and oxidative state. *European journal of clinical investigation*, 31(5), 417–424.
- Van Ede, A. E., Laan, R. F., Blom, H. J., De Abreu, R. A., & van de Putte, L. B. (1998). Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 27(5), 277–292.
- Vardi, N., Parlakpınar, H., Ates, B., Cetin, A., & Otlu, A. (2009). Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertility and sterility*, 92(6), 2028–2033.

- Vardı, N., Parlakpınar, H., Ateş, B., Otlı, A. (2010). *Metotreksatın Neden Olduğu Testiküler Hasara Karşı Klorogenik Asidin Koruyucu Etkileri*. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*.
- Vernet, P., Aitken, R. J., & Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and cellular endocrinology*, 216(1-2), 31–39.
- Ward, A., Brogden, R. N., Heel, R. C., Speight, T. M., & Avery, G. S. (1983). Etretinate. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in psoriasis and other skin disorders. *Drugs*, 26(1), 9–43.
- Wessels, J. A., Huizinga, T. W., & Guchelaar, H. J. (2008). Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 47(3), 249–255.
- Wiegand, U.-W., & Jensen, B. K. (1992). Pharmacokinetics of Acitretin in Humans. *Retinoids: 10 years on* (pp. 192-203). Karger Publishers.
- Wildburger, R., Mrakovcic, L., Stroser, M., Andricic, L., Borovic Sunjic, S., Zarkovic, K., Zarkovic, N. (2009). *Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence:Review Citation*. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 29 (1): p. 189-193.
- Wheeler, C. R., Salzman, J. A., Elsayed, N. M., Omaye, S. T., & Korte, D. W., Jr (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical biochemistry*, 184(2), 193–199.
- Yamauchi, P. S., Rizk, D., Kormeili, T., Patnaik, R., & Lowe, N. J. (2003). Current systemic therapies for psoriasis: where are we now?. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(2 Suppl), S66–S77.
- Yamauchi, P. S., Rizk, D., & Lowe, N. J. (2004). Retinoid therapy for psoriasis. *Dermatologic clinics*, 22(4), 467–x.
- Yeum, K. J., Russell, R. M., Krinsky, N. I., & Aldini, G. (2004). Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of biochemistry and biophysics*, 430(1), 97–103.
- Yeung, H., Wan, J., Van Voorhees, et al (2013). Patient-reported reasons for the discontinuation of commonly used treatments for moderate to severe psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 68(1), 64–72.
- Yuluğ, E., Türedi, S., Alver, A., Türedi, S., & Kahraman, C. (2013). Effects of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 489659.
- Yüncü, M., Zengin G., Birinci H., Bostancıeri N., & Polat S. (2019). *European Journal Of Therapeutics*, Cilt.25, Ss.51-57, 2019
- Zadák, Z., Hyspler, R., Tichá, A., Hronek, M., Fikrová, P., Rathouská, J., Hrcnciariková, D., & Stetina, R. (2009). Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological research*, 58 Suppl 1, S13–S17.
- Zee, T., Bose, N., Zee, et al. (2017).  $\alpha$ -Lipoic acid treatment prevents cystine urolithiasis in a mouse model of cystinuria. *Nat Med*. 23(3):288-290. doi:10.1038/nm.4280.
- Ziegler, D., Nowak, H., Kempler, P., Vargha, P., & Low, P. A. (2004). Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 21(2), 114–121. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2004.01109.x>
- Zhou, L. Z. H., Johnson, A. P., Rando, T. A., (2001). NF- $\kappa$ B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 31: 1405-1416.