



**T.C.**

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI**

**METOTREKSAT İLE İNDÜKLENMİŞ DENEYSEL  
İNTESTİNAL MUKOZİT MODELİNDE ARJİNİN,  
OMEGA 3 YAĞ ASİTLERİ VE NÜKLEOTİTLERLE  
ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ORAL FORMÜLÜN ETKİLERİ**

**Uzm.Dyt. Elvan YILMAZ AKYÜZ**

**DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2015**



**T.C.**

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI**

**METOTREKSAT İLE İNDÜKLENMİŞ DENEYSEL  
İNTESTİNAL MUKOZİT MODELİNDE ARJİNİN,  
OMEGA 3 YAĞ ASİTLERİ VE NÜKLEOTİTLERLE  
ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ORAL FORMÜLÜN ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Uzm.Dyt. Elvan YILMAZ AKYÜZ**

**Danışman**

**Prof.Dr. Gül KIZILTAN**

**ANKARA, 2015**

**T.C**  
**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Beslenme ve Diyetetik Doktora Programı çerçevesinde **Elvan Yılmaz Akyüz** tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/02/2015

Tez Konusu: “Metotreksat ile İndüklenmiş Deneysel İntestinal Mukozit Modelinde Arjinin, Omega 3 Yağ Asitleri ile Nükleotitlerle Zenginleştirilmiş Oral Formülün Etkileri”

**TEZ DANIŞMANI:** Prof. Dr. Gül KIZILTAN

**TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ**

Doç. Dr. Zehra Büyüktuncer Demirel

Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Gül KIZILTAN

Başkent Üniversitesi

Doç. Dr. Mendane SAKA

Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Muhittin Tayfur

Başkent Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Perim Türker

Başkent Üniversitesi

**ONAY:** Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 06. /02. / 2015 tarih ve 036.. Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Rengin ERDAL  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince tez danışmanlığımı üstlenerek bilgisi ve motive edici yaklaşımı ile bilimsel ve manevi desteğini esirgmeden yol gösteren değerli tez danışmanım Başkent Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Gül KIZILTAN'a ve diğer tüm hocalarıma,

Doktora eğitimim süresince desteğini esirgemeyen değerli hocam Acıbadem Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Murat BAŞ'a,

Deneysel çalışmaların dizaynı ve gerçekleştirilmesinde önemli katkıları olan Marmara Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sevgili Yrd. Doç. Dr. A.Özer ŞEHİRLİ' ye

Hayatım boyunca bana güvenen ve her zaman yanımda olan canım anneme, babama,

En zor zamanlarımda hep yanımda olan, maddi, manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen sevgili eşim Cebrail Akyüz'e,

Ve varlığı ile hayatımı renklendiren, en büyük mutluluk kaynağım biricik oğlum Mete'ye,

Teşekkür ederim.

## ÖZET

**Elvan YILMAZ AKYÜZ. Metotreksat ile indüklenmiş deneysel intestinal mukozit modelinde arjinin, omega 3 yağ asitleri ve nükleotitlerle zenginleştirilmiş oral formülün etkileri. Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Ana Bilim Dalı Doktora Tezi, 2015.** Bu çalışma, metotreksat ile indüklenmiş deneysel intestinal mukozit modelinde arjinin, omega 3 yağ asitleri ve nükleotitlerle zenginleştirilmiş immunonütrisyonel oral formülün bağırsak mukozası üzerine etkilerini araştırmak için planlanmış ve yürütülmüştür. Çalışma, Marmara Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'ndan alınan onayla 32 sıçan üzerinde dört grup oluşturularak yapılmıştır. 1.gruba (G1) 5 gün boyunca gavajla yalnızca salin, 2.gruba (G2) günde üç kez immunonütrisyonel oral formül (5 mg/kg), 3.gruba (G3) intraperitoneal tek doz metotreksat (20mg/kg) uygulaması sonrası 5 gün boyunca gavajla salin, 4.gruba (G4) tek doz metotreksat uygulamasını takiben 5 gün boyunca günde üç kez immunonütrisyonel oral formül verilmiştir. Gruplardaki bütün denekler 6.gün sakrifiye edilmiştir. Serumda Tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) düzeyleri çalışılmış, jejunal doku örneklerinde de luminol, lusigenin, glutatyon, myeloperoksidaz, malondialdehit ve Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz düzeyleri çalışılmıştır. Histopatolojik olarak değerlendirme yapılmıştır. Bu çalışmanın sonunda, serum TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeyleri, G3 grubunda G1 grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0.001). G4 grubundaki TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeylerinin ise G3 grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu saptanmıştır (p<0.001). Jejunal dokuda, glutatyon ve Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz düzeyleri, G3 grubunda G1 grubuna göre daha düşük belirlenirken (sırasıyla; p<0.05, p<0.01) G4 grubunda ortalama değer G3 grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (p<0.05). Doku myelopeksidaz ve malondialdehit düzeyleri, G3 grubunda G1 grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla; p<0.001, p<0.01). G4 grubundaki myelopeksidaz ve malondialdehit düzeyleri ise G3 grubuna göre istatistiksel olarak düşük olarak saptanmıştır (sırasıyla; p<0.001, p<0.05). G3 grubundaki luminol ve lusigenin düzeyleri, G1 grubuna göre anlamlı derecede yüksek (sırasıyla; p<0.01, p<0.001); G4 grubundaki luminol ve lusigenin düzeyleri de, G3 grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0.01). G1 grubunda

jejunal epitel yapı, goblet hücreleri ve bez yapıları düzgün olarak izlenirken, G2 grubunda muntazam olarak düzenli izlenmiştir. G3 grubunda ileri derecede epitelyum kaybı ve inflamatuvar hücre artışı, G4 grubunda bu olumsuzlukların gerilediği, enterositlerde mitoz artışı ve inflamatuvar hücre yoğunluğunda azalma olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma, kemoterapinin ince bağırsak mukozası üzerine olumsuz etkileri olduğunu göstermiş, immünonütrisyonel oral formülün ise, lipit peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu engelleyici, glutatyon, Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> ATPaz düzeyleri ve histolojik parametreler üzerinde olumlu etkileri nedeniyle metotreksata bağlı intestinal hasarda koruyucu etkisini ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Metotreksat, mukozit, immünonütrisyon, antioksidan, inflamasyon

Bu proje Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulunca onaylanmıştır.

## ABSTRACT

**Elvan YILMAZ AKYUZ. The effects of Oral Nutritional formula enriched with arginin, omega 3 fatty acids and nucleotides on methotrexate-induced experimental intestinal mucositis. Baskent University Institute of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics. Doctoral Dissertation, 2015.**

This study was planned and done to investigate the effects of immunonutritional oral formula which was enriched with arginine, omega-3 fatty acids and nucleotides, on intestinal mucosa in an experimental intestinal mucositis rat model induced by methotrexate. This study was carried out on 32 rats divided into 4 groups, upon the approval of Marmara University Animal Ethics Committee. The first group (G1) was only given saline via gavage for 5 days; the second group (G2) was given immunonutritional oral formula (5 mg/kg) 3 times a day for 5 days. The third group (G3) was given saline via gavage for 5 days after administration of intraperitoneal single-dose methotrexate (20 mg/kg). The fourth group (G4) was given immunonutritional oral formula 3 times a day for 5 days, after administration of intraperitoneal single-dose methotrexate (20 mg / kg). All subjects in all groups were sacrificed at 6th day. Serum TNF-  $\alpha$  and IL- 1 $\beta$  levels were measured in plasma. Jejunal tissue samples, biochemical luminol, lucigenin, glutathione, myeloperoxidase, malondialdehyde and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase levels were measured and analyzed histologically. In this study, serum Tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) levels were significantly higher in G3 group compared to the G1 group (p<0.001). The TNF-  $\alpha$  and IL- 1 $\beta$  levels in the G4 group was statistically lower than the G3 group (p < 0.001) as well. While glutathione and Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATPase levels in the jejunal tissue were lower in the G3 group compared to the G1 group (p<0.05 and p<0.01 respectively); the mean value in G4 group was determined to be higher than G3 group (p<0.05). Tissue myeloperoxidase and malondialdehyde levels were statistically higher in the G3 group compared to the G1 group (p<0.001 and p<0.01 respectively). Myeloperoxidase and malondialdehyde levels in the G4 group were statistically lower than the levels in the G3 group (p<0.001 and p<0.05 respectively). Luminol and lucigenin levels were significantly higher in the G3 group compared to the G1 group (p <0.01, p <0.001). Luminol and

lucigenin levels in the G4 group were significantly lower compared to the G3 group ( $p<0.01$ ). The jejunal epithelium, goblet cells and gland structures were regular and uniform in G1 and G2 groups. While severe epithelium loss and increased inflammatory cell numbers were observed in the G3 group; these problems were seen declined and an increase in mitotic activity in enterocytes and a decrease in inflammatory cell density were observed in the G4 group. Our study shown that chemotherapy had adverse effects on the small intestinal mucosa. Due to its inhibition effects on neutrophil infiltration and lipid peroxidation and positive effects on glutathione and  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase levels and histological parameters, immunonutritional oral formula shown a protective effect on intestinal damage caused by methotrexate.

**Key words:** Methotrexate, mucositis, immunonutrition, antioxidant, inflammation

This project was approved by The Research Committee of Health Science, Baskent University.



# İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER VE RESİMLER	xiii
TABLolar	xiv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Mukozit	3
2.1.1.Mukozite Neden Olan Sitotoksik İlaçlar	4
2.1.2.Mukozit Patogenezi	4
2.1.3.Mukozitin Patolojik ve Klinik Özellikleri	5
2.1.4.Mukozitin Değerlendirilmesi	6
2.1.5.Mukozitin Önlenmesi ve Tedavisi	6
2.2.Metotreksat	7
2.2.1.Folik Asit Antagonisti Olarak Metotreksatın Mekanizması	7
2.2.2.Metotreksatın Yan Etkileri	9
2.2.2.1.Gastrointestinal Sistem Yan Etkileri	9
2.2.2.2.Diğer Sistem Yan Etkileri	9
2.2.3.Metotreksat Toksisitesi ve Oksidatif Stres	10
2.2.4.Metotreksatın Antiinflamatuvar Etkisi	10
2.2.5.Metotreksat ve Mukozit	10
2.3.Arjinin, Omega 3 Yağ Asitleri ve Nükleotitlerle Zenginleştirilmiş Oral Formül (İmmunonütrisyon, IN)	11
2.3.1.Arjinin	12
2.3.2.Omega 3 Yağ Asitleri	13
2.3.3.Nükleotitler	13
2.4.Biyokimyasal Değerlendirmede Kullanılan Parametreler	14

<b>2.4.1.İnflamatuvar Araçılar</b>	<b>14</b>
<b>2.4.1.1.Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	<b>15</b>
<b>2.4.1.2.İnterlökin- 1 Beta (IL-1<math>\beta</math>)</b>	<b>15</b>
<b>2.4.2.Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres</b>	<b>15</b>
<b>2.4.2.1.Luminol ve Lusigenin</b>	<b>15</b>
<b>2.4.3.Malondialdehit (MDA)</b>	<b>16</b>
<b>2.4.4.Myeloperoksidaz (MPO)</b>	<b>16</b>
<b>2.4.5.Glutatyon (GSH)</b>	<b>17</b>
<b>2.4.6.Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz</b>	<b>17</b>
<b>3.GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>18</b>
<b>3.1.Serumda TNF-<math>\alpha</math> ve IL- 1<math>\beta</math> Tayinleri</b>	<b>20</b>
<b>3.2.Malondialdehit Ölçümü</b>	<b>21</b>
<b>3.3.Myeloperoksidaz Aktivitesi Ölçümü</b>	<b>21</b>
<b>3.4.Glutatyon Ölçümü</b>	<b>21</b>
<b>3.5. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz Düzeyi Ölçümü</b>	<b>21</b>
<b>3.6.Dokuda Serbest Oksijen Radikallerinin Kemilüminesans Yöntemi ile Belirlenmesi</b>	<b>22</b>
<b>3.7.Histopatolojik İncelemeler</b>	<b>22</b>
<b>3.8.İstatistiksel Değerlendirme</b>	<b>23</b>
<b>4.BULGULAR</b>	<b>24</b>
<b>4.1.Serum TNF-<math>\alpha</math> ve IL- 1<math>\beta</math> Sonuçları</b>	<b>24</b>
<b>4.2.Glutatyon Sonuçları</b>	<b>26</b>
<b>4.3.Malondialdehit Düzeylerine Ait Sonuçlar</b>	<b>26</b>
<b>4.4.Myeloperoksidaz Düzeylerine Ait Sonuçlar</b>	<b>27</b>
<b>4.5. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz Düzeylerine Ait Sonuçlar</b>	<b>28</b>
<b>4.6.Luminol Düzeylerine Ait Sonuçlar</b>	<b>29</b>
<b>4.7.Lusigenin Düzeylerine Ait Sonuçlar</b>	<b>29</b>
<b>4.8.Histopatoloji Sonuçları</b>	<b>30</b>
<b>5.TARTIŞMA</b>	<b>33</b>
<b>6.SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>38</b>
<b>7.KAYNAKLAR</b>	<b>41</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

GİS	Gastrointestinal Sistem
MTX	Metotreksat
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
MPO	Myeloperoksidaz
MDA	Malondialdehit
$\omega$ - 3	Omega Üç
İN	İmmunonütrisyon
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
NF $\kappa$ - $\beta$	Nükleer Faktör Kappa Beta
TNF- $\alpha$	Tümör Nekrozis Alfa
İL	İnterlökin
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
NCICTC	Ulusal Kanser Enstitüsü Yan Etkiler İçin Genel Terminoloji Kriterleri
RTOG	Radyasyon Tedavisi Onkoloji Grubu
ESMO	Avrupa Medikal Onkoloji Derneği
DHF	Dihidrofolik Asit
FA	Folik Asit
THF	Tetrahidrofolat
SOD	Süperoksit Dismutaz
NO	Nitrik Oksit
DHA	Docosaheksonoik Asit
EPA	Eicosapentanoik Asit
LPS	Lipopolisakkarit
PMNL	Polimorf Nüveli Nötrofil Lökosit
HPLC	Yüksek Performans Lipit Kromatografi
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADH	Dihidronikotinamid Adenin Dinükleotit
KI	Kemilüminesans
ort	Ortalama
OSH	Ortalamanın Standart Hatası

kkal	Kilokalori
h	Saat
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
pg	Pikogram
mL	Mililitre
$\mu$ L	Mikrolitre
M	Mol
mM	Milimolar
mmol	Milimol
nmol	Nanomol
mm	Milimetre
nm	Nanometre
U	Unite
rlu	Bağıl Işıık Birimi
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı

## ŞEKİLLER VE RESİMLER

### Şekil

1. Folik asit metabolizması 8
2. Metotreksat basit haliyle ya da poliglutamam olarak DHFR'ı inhibe eder 8
3. Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarına ait serum a) TNF- $\alpha$  ve b) IL-1 $\beta$  değerleri 25
4. Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarında ince bağırsak dokusuna ait a) GSH ve b) MDA değerleri 27
5. Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarında ince bağırsak dokusuna ait a) MPO ve b) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz aktivite değerleri 28
6. Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarında ince bağırsak dokusuna ait a) luminol ve b) lusigenin değerleri 30

### Resim

1. Orta hat kesisi ile yapılan laparotomide ince bağırsakların görünümü 19
2. Makroskopik olarak görülebilen mukozit alanları 20
3. Vena cavadan kan alınması 20
- 4a. Kontrol grubu, düzgün epitelyum (ok), goblet hücreleri(okbaşları) ve bez yapıları (\*) 31
- 4b. IN grubu, muntazam yapılı goblet hücreleri (ok başları), epitelyum (ok) ve bez morfolojisi (\*) 31
- 4c. MTX grubu, ileri derecede dökülmüş epitelyum (ok) ve hipertrofik Goblet hücreleri (ok başı) yanı sıra lökositler (kırık oklar) 32
- 4d. MTX+IN grubu, rejenere olmuş epitelyum yapısı (ok) ve goblet hücreleri (ok başları) yanı sıra aktif mitoz gözlenen hücreler (kalın oklar) 32

## TABLULAR

### Tablo

1. Mukozitin patofizyolojik evreleri	5
2. Diyare için Ulusal Kanser Enstitüsü Kriterleri	6
3. Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarına ait serum TNF- $\alpha$ ve IL-1 $\beta$ için ortalama ve standart hata değerleri	24
4. Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarında ince bağırsak dokusuna ait GSH, MDA, MPO, Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPaz, luminol ve lusigenin Kemilüminesans (KI) için ortalama ve standart hata değerleri	26

## 1.GİRİŞ

Mukozit, tüm gastrointestinal sistem (GİS) mukozasının ülserasyonu, inflamasyonu ile karakterize ve enfeksiyon eklenmesiyle hayatı tehdit edebilen patolojik inflamatuvar süreçtir. GİS mukoza membranlarının mitotik indeksi yüksek olduğundan, hızlı epitel döngüsüne bağlı olarak kemoterapinin etkilerine daha duyarlıdırlar.

Kemoterapi kaynaklı mukoza iltihabı, çoğu kanser tedavisinde doz kısıtlayıcı önemli bir yan etkidir. Mukozit gelişimi ve ağırlığı hastadan hastaya değişiklikler göstermektedir. Standart doz kemoterapi sonrası % 15-40, yüksek doz kemoterapi sonrası %76-100 oranında oral ve gastrointestinal mukozit gelişimi görülmektedir. Mukozit, hastanede kalış süresini, hastane maliyetlerini, ağrı için narkotik kullanımını, parenteral beslenme ihtiyacını artırır ve yaşam kalitesini (ağrı, beslenme, iletişim, uyku vb.) bozar. Çoğu kanser araştırması, bu yan etkileri sınırlamaya odaklanmıştır, çünkü bu sayede daha yüksek dozlarda kemoterapi alınabilir ve bu da genel mortaliteyi düşürebilir (1,2).

Bir folik asit antagonisti olan metotreksat (MTX) lösemi, lenfoma, meme kanseri gibi bazı kanser tiplerinde kemoteropatik ajan olarak kullanılabildiği gibi dermatomyozit, psöriyazis, romatoid artrit, sarkoidoz gibi hastalıkların tedavisinde de yaygın olarak kullanılabilmektedir (3-5). MTX' in gastrointestinal, renal, kemik iliği ve karaciğer toksisiteleri sık görülmektedir (6). Sitotoksik tedavi sonrası mukozit oluşumu sıktır. Maksimum mukozal hasar 4- 10 gün içerisinde gelişir. Bakterilerin aşırı çoğalması ve derin nötropeni, mukozit oluşumunu kolaylaştırır (7). Sıçanlara MTX verilmesi ile ince bağırsakta antioksidan özellikler gösteren glutatyon (GSH) seviyelerinin azaldığı, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyesinin arttığı belirlenmiştir (8).

Son yirmi yılda gelişen ve kabul gören yaklaşımla standart beslenmenin ötesinde çeşitli besin öğeleri ile zenginleştirilerek uygulanan beslenme ile hastanın immun durumunun güçlendirilmesine çalışılmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada immun yönden desteklemenin, hastaların bir kısmında akut faz inflamatuvar cevabın süresinin ve büyüklüğünün kontrol edebileceği gösterilmiştir. Arjinin, glutamin,

diyet nükleotitleri, çoklu doymamış yağ asitleri, antioksidantlar, bakır, selenyum, çinko gibi besin öğelerinin inflamatuvar cevabın oldukça karmaşık yapısı içinde önemli basamaklarda rolleri olduğu bilinmektedir. İmmun modülatör nütrientlerden biri olan arjinin, yara iyileşmesini hızlandırır, timus bezine trofik etkisi ile Naturel Killer ve T helper hücrelerini artırır ve serbest radikalleri vücuttan uzaklaştırır (9,10). Omega 3 ( $\omega$ -3) yağ asitleri, antiinflamatuvar ve antitrombotik etki yaparak doku hasarını önler, mukoza iyileşmesine yardımcı olur, T hücre cevabını artırır (11). Diyet nükleotitleri ise T hücresi, makrofaj ve enterositler gibi hızlı çoğalan hücreler tarafından kullanılarak immün fonksiyonu geliştirir ve enfeksiyonlara direnci artırır (12).

Bu deneysel çalışmada değişik sistemlerde toksik etkileri olduğu bilinen MTX' in yan etkilerinden biri olan intestinal mukozitin, arjinin,  $\omega$ -3 yağ asitleri ve nükleotidlerle zenginleştirilmiş oral formül ile (İmmunonütrisyon-IN) engellenip engellenemeyeceğinin belirlenmesi, aynı zamanda kemoteröpatik ajanların yan etkilerinin sınırlandırılmasında farklı bir bakış açısının sunulması amaçlanmıştır.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Mukozit

Mukozit, malign hastalıkların tedavisinde doz kısıtlayıcı ya da tedaviyi kesici önemli bir toksititedir. Ağızdan anüse kadar tüm gastrointestinal sistem mukozasının hasarı sonucu hafif inflamasyondan derin ülserlere kadar değişebilen patolojik bir süreçtir (1). Tedavilerin neden olduğu mukozit, mukozanın etkilenme şiddetine göre besin alımında bozulma, ağrı, kanama, enfeksiyon, disfaji gibi hastanın yaşam kalitesinde ciddi bir bozukluğa yol açabilir, hastanede kalış süresinde ve tedavi maliyetlerinde artışa neden olabilir (2).

Gastrointestinal kanalın mukozası aynı embriyolojik kanaldan gelişmesine rağmen fonksiyonu ve anatomik özellikleri farklıdır. Bu nedenle mukozit, oral ve gastrointestinal olarak iki sınıfta değerlendirilmelidir (13). Gastrointestinal kanal lümeni, içeriden dışarıya doğru mukozaya, submukozaya, musküler ve seroza tabakalarından oluşur. Mukozaya ve submukozaya; epitel dokusu, kan ve lenfatiklerden zengin bağ dokusu ile düz kas hücreleri içerir. Musküler tabakada ise sirküler ve longitudinal kaslar bulunur. İnce bağırsak mukozasında diğer gastrointestinal sistemden farklı olarak tek tabaka kolumnar epitel, kripta ve villüsler, epitelinde kök emici, kadeh, paneth ve nöroendokrin hücreler yer alır (14).

Normalde ağız mukozası hücreleri 7-14 günde, bağırsak hücreleri ise 4 günde bir kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Hücre döngüsündeki bu farklılık nedeni ile radyoterapi ve kemoterapi sonrası gastrointestinal mukozit, oral mukozitten daha önce başlar. Ancak, oral mukozit gastrointestinal sistemin diğer kısımlarına göre daha sık görülür. Bunun nedeni gastrointestinal mukozitin az bildirilmesi ve değerlendirmesinin zor olması ile ilgili olduğu düşünülmektedir (2).

Mukozit gelişimi tedavi ve hasta ile ilişkili faktörlere göre değişebilen patolojik bir sürecin sonucu olarak ortaya çıkar. Örneğin tedavi ile ilişkili olarak çoğu kemoterapötikler (metotreksat ve etoposide gibi) kan yolu ile mukozal membranlara ulaşır. Hastayla ilişkili faktörler; eşlik eden diğer hastalıklar, enfeksiyonlar, uzun süre steroid kullanımı ve ilaç metabolizmasının hastaya bağlı nedenlerle farklı olmasıdır. Örneğin, metotreksatın mukozite neden olma riski oldukça yüksektir. Eğer hastada metilentetrahidrofolat redüktaz enziminde

polimorfizm var ise, bu enzimin aktivitesi azalacağı için, metotreksat daha ciddi mukoziteye neden olmaktadır. Günümüzde tedavi başlangıcında mukozit riskini öngörebilen bir model henüz yoktur. Yakın gelecekte moleküler yöntemlerin gelişmesi ve farmakogenomiklerin kullanıma girmesi, hastaların genotip özelliklerinin önceden belirlenerek, hastaya uygun ilaç(lar)ın gereken doz ve kombinasyonda kullanılmasını sağlayacaktır (2,15).

### **2.1.1.Mukozite Neden Olan Sitotoksik İlaçlar**

Bazı sitotoksik ilaçlar tek başına ya da kombine kullanım ile birlikte mukozite yol açabilirler: Metotreksat gibi timidin sentetaz inhibitörleri, topoizomeraz II inhibitörleri (etoposid, irinotekan), pirimidin analogları (sitozin arabinosid), pürin analogları (6-merkaptopürin ve 6-tioguanin), yüksek dozda kullanılan alkilleyici ajanlar (busülfan, melfalan, siklofosfamid) ve antrasiklinler (idarubisin, doksorubisin, daunorubisin) gibi. Bu ajanlar birkaç siklusta ardışık kullanıldıklarında, mukozit riski her tedavi siklusunda biraz daha artmaktadır (2).

### **2.1.2.Mukozit Patogenezi**

Mukozit gelişim patofizyolojisinde 5 evreli model bulunmaktadır; 1) *Başlangıç*, 2) *Haberci sinyalleri iletimi*, 3) *Amplifikasyon*, 4) *Ülserasyon*, ve 5) *İyileşme* (Tablo 1).

Başlangıç evresinde DNA hasarı ve serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumu ve diğer yollar aktive olur. Haberci sinyallerin oluşumu esnasında fibroblastlar, makrofajlar, endotel ve epitel hücreleri tarafından nükleer faktör kappa beta (NFκ-B) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu sürecini tümör nekrozis faktör- alfa (TNF-α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı takip eder. Bu evrede ayrıca hücre ölümü (apoptozis) ve mukoza zedelenmesinin ilerlemesine neden olan enzimler üretilir. Bu aşamada, bakteriler ülser yüzeyine kolonize olur ve zedelenmeyi daha da artırırlar, hastada nötropeni de olduğu için bakteriyemi ve sepsise neden olabilirler. Ülserasyon evresini sonunda iyileşme evresi takip eder ve hastada düzelme görülür. Oral mukozadaki lezyonlar esasen keratinize olmayan bölümü içermesi nedeni ile infeksiyonlara oldukça duyarlıdır. Gastrointestinal mukozitte ise kript hücre ölümü ve sitostazise neden olan çok sayıda mekanizma bulunur. Bu olayları kontrol eden

moleküler mekanizmalar kesin bilinmemesine rağmen çeşitli kemoterapötik ajanların p53 ve kaspaz aktivasyonu ile etki ettikleri bildirilmektedir (2,16).

**Tablo 1: Mukozitin patofizyolojik evreleri**

Biyolojik evre	Tanım ve Yorumlar
Evre 1:Başlangıç	Radyo- ve/veya kemoterapi bazal epitel hücrelerinde DNA hasarına neden olur; SOR oluşumuna da yol açarak submukozadaki kan damarlarında daha fazla hücresel hasar gelişir.
Evre 2: Sinyal İletimi	Radyo- ve/veya kemoterapi ve SOR'lar hücrelerde apoptoza ve inflamatuvar sitokinlerin artışına neden olurlar.
Evre 3: Amplifikasyon	İnflamatuvar sitokinler daha fazla doku hasarına, sinyal iletiminde artışa ve doku zedelenmesinde ilerlemeye yol açarlar.
Evre 4: Ülserasyon	Mukozada bütünlük kaybı nedeniyle ciddi ağırlı lezyonlar gelişir. Dolayısıyla bu lezyonlardan bakteriler, virusler ve mantarların girişi kolaylaşır.
Evre 5: İyileşme	Epitel hücrelerinde çoğalma, farklılaşma ve migrasyon ile mukoza bütünlüğü yeniden düzenlenir. Mukozit mutlak nötrofil sayısında azalmaya eşlik ettiği için, nötropeninin düzelmesi ile birlikte iyileşmede görülür. Aslında epiteldeki bazal hücrelerin mitotik aktivitesinin normale dönmesi iyileşmeyi sağlar. Genellikle nötropeninin düzelmesi ile birliktelik gösterir.

**Kaynak:** Niscola P, et al. Haematologica 2007; 92:222-231.

### 2.1.3.Mukozitin Patolojik ve Klinik Özellikleri

Mukozit gelişiminde patolojik olaylar 4 aşamada izlenir. Kemoterapi uygulamasından sonra, herhangi bir klinik ve belirgin bir patolojik görünümün olmadığı, inflamatuvar/ vasküler fazı kemoterapinin 4.-5. gününde vaskülaritedeki artış nedeniyle eritem ve epitelde atrofinin geliştiği epitelyal faz takip eder. Bu dönemde yutma, çiğneme gibi aktiviteler azalırken ishal, karın ağrısı gibi şikayetler başlar, günden güne mikrotravmalarla ülserler gelişir (ülseratif faz). Bu faz genellikle tedavinin ilk haftasını takiben ortaya çıkar; bu döneme bakteriyolojik faz veya psödomembranöz faz da denilmektedir. Epitelin kaybı sonucunda eksüdatif psödomembranlar ve ülserler oluşur. Bu sırada eşlik eden nötropeni hasarlı mukoza üzerinde özellikle gram negatif bakterilerin ve maya mantarlarının yerleşmesini kolaylaştırır. Son aşama ise iyileşme fazıdır, yaklaşık 12-16. günler arasında olur. İyileşme hızını belirleyen faktörler; epitelin çoğalma hızı, hematopoetik toparlanma,

bölgesel mikrofloranın yeniden oluşma hızı ve yara iyileşmesini etkileyen infeksiyon veya mekanik bir tahrişin olup olmamasıdır (17).

Klinik olarak gastrointestinal mukozit ile ilişkili semptomlar kemoterapi verilmesinden 3-5 gün sonra başlar ve 7-15 gün kadar sürer. Bu durum hafif ile karın duvarına yansıyan şiddetli ağrı arasında değişen visseral ağrı ve diyare nedeni ile bağırsak motilitesinde artışla ilişkilidir. Gastrointestinal mukozit, obstruksiyon, perforasyon ve infeksiyon ile ağır klinik durumlara neden olabilmektedir (2).

#### 2.1.4. Mukozitin Değerlendirilmesi

Mukozitin klinik değerlendirmesinde henüz standart tanısal ve değerlendirme kriterleri bulunmamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (*WHO=World Health Organisation*) ve Ulusal Kanser Enstitüsü Yan Etkiler için Genel Terminoloji Kriterleri (*NCICTC= National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Event*) veya Radyasyon Tedavisi Onkoloji Grubunun (*RTOG= Radiation Therapy Oncology Group*) derecelendirmesi kullanılmaktadır. Gastrointestinal mukozit değerlendirilmesi, diyare sıklığı, miktarı ve komplikasyonlarının başlamasına göre yapılır. Sıklıkla Ulusal Kanser Enstitüsünün Yan Etkiler için Genel Terminoloji Kriterleri kullanılarak diyare derecelendirilmesi yapılmaktadır (Tablo 2) (18).

**Tablo 2: Diyare için Ulusal Kanser Enstitüsü Kriterleri**

1	2	3	4	5
Günde <4 dışkılama; Günlük aktiviteyi kısıtlamamaktadır.	Günde 4-6 dışkılama; iv sıvı gereksinimi 24 saatten az; günlük aktiviteyi kısıtlamamaktadır.	Günde $\geq 7$ dışkılama inkontinans; iv sıvı ihtiyacı $\geq 24$ saat; günlük aktiviteyi kısıtlamaktadır.	Yaşamı tehdit eden (ör:şok)	ölüm

**Kaynak:** National Cancer Institute Common Terminology Criteri v3.0 (CTCAE). August 9, 2006. (<http://ctep.cancer.gov>)

#### 2.1.5. Mukozitin Önlenmesi ve Tedavisi

Gastrointestinal mukozitin önlenmesi ve tedavisi üzerine birden çok yayın literatürde bulunmasına rağmen bu çalışmaların çoğu, kanıta dayalı kılavuza eklenmek üzere yükümlülüklerini yerine getirememiştir (13,16,19,20).

Avrupa Medikal Onkoloji Derneğinin (*ESMO= European Society for Medical Oncology*) 2009 yılında yayınlamış olduğu kılavuza göre kanıta dayalı temel

bağırsak bakımı, yeterli hidrasyonu içermelidir. Ek olarak geçici laktoz intoleransı potansiyeli ve bakteriyel patojenler de dikkate alınmalıdır. Siklofosamid, metotreksat veya 5- fluorourasil tedavisini takip eden epigastrik ağrının önlenmesi için omeprozol veya ranitidin önerilir (Kanıt II A). Sistemik glutamin ise gastrointestinal mukozitin tedavisinde önerilmez (Kanıt II C). Standart doz veya yüksek doz kemoterapi ile ilişkili diyarenin kontrolünde ise loperamid yetersiz kalırsa günde iki kez 100 mikrogram okreotit önerilir (Kanıt II A) (20). Eğer semptomlar devam eder ve hasta nötropenik ise antibiyotik kullanmak gerekir (21).

## **2.2.Metotreksat**

Özellikle neoplazmlarda kullanılan bir folik asit antimetabolitidir ve yapısı folik asite benzer. Antimetabolitler; DNA, RNA, proteinler ve diğer temel hücre komponentlerinin sentez zincirinin değişik basamaklarında substrat veya koenzim olarak rol oynayan çeşitli doğal metabolitlerin analoglarıdır. Antimetabolitler, çoğu kez çoğalma fraksiyonu yüksek tipteki tümörlere etkili olmaktadır. En önemli toksik etkileri kemik iliği ve bağırsak mukozası epitelini üzerindedir. Fetüse, gebeliğin bütün dönemlerinde zarar verebilir (6).

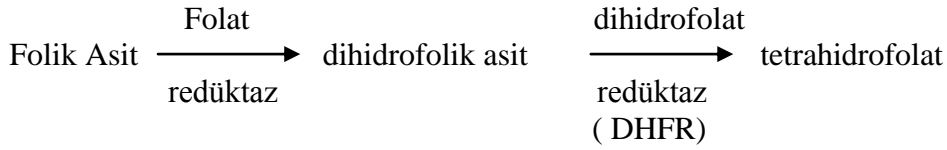
Folik asit antimetabolitlerinin ilk defa Sydney Farber tarafından 1948’de tanımlanmasıyla kanser kemoterapisinde yeni bir dönem açılmıştır (22,23). Klinikte şimdiye kadar birçok folat analogu kullanılmasına rağmen metotreksat en yaygın kullanılanıdır ve metotreksat sodyum, metotreksat LPF, rheumatex, amethopterin ve NSC-740 olarak da bilinmektedir (22).

Kimyasal olarak folik asitin 4-amino, N<sup>10</sup>-metil analogudur. Kimyasal metotreksat, N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinyl)methylamino]benzoyl]-L-glutamik asit’tir (23).

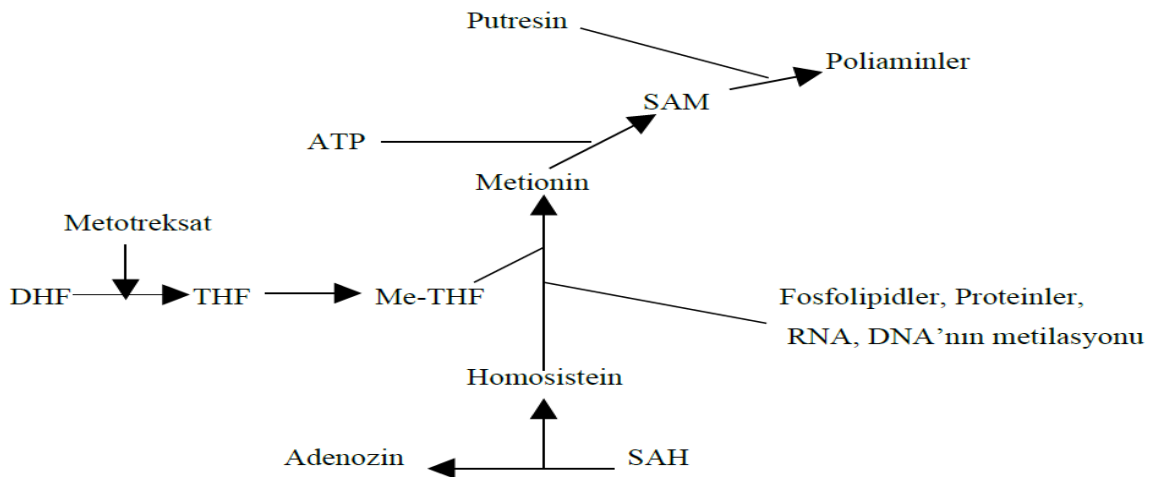
### **2.2.1.Folik Asit Antagonisti Olarak Metotreksat’ın Mekanizması**

İnsanlar, vücut için gerekli maddelerden biri olan folik asidi sentezleyemediklerinden dolayı diyetle folik asit alımı zorunludur. Dihidrofolat redüktaz (DHFR), dihidrofolik asidi (DHF) folik aside (FA) bağımlı yollarda temel bileşen olarak hizmet eden tetrahidrofolata (THF) dönüştürür (Şekil 1). Chabner ve arkadaşları (24) MTX’ in FA antagonisti mekanizması olarak iki teoriyi öne sürmüşlerdir. Birincil olarak folik asit azalma teorisi: intrasellüler FA’ nin azalması DHFR’nin blokajına dayanmaktadır. İkincil olarak yarışma teorisi: nükleotidlerin

sentezinde görevli basamakları MTX' in doğrudan inhibe etmesine ve DHF birikimine dayanmaktadır. MTX, DHFR'ı inhibe eder bu yüzden THF'in azalmasına neden olur (Şekil 2). MTX poliglutamatları 5,10 metilen THF redüktaz, glisinamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz ve aminoimidazol-karbokzamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz enzimlerini doğrudan inhibe eder. Bu enzimlerdeki inhibisyon pürin ve pirimidin metabolizmasında inhibisyonla sonuçlanır (5). Bu yapı taşlarının üretilmemesi, hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA sentezi ile enerji üretimi için gerekli ATP üretimini inhibe eder. Ayrıca THF'ya dönüşmeden kalan dihidrofolat, poliglutamatlar ve MTX' in poliglutamat türevleri toksik inhibitör metabolitler şeklinde birikir. Timidilat sentazın ve pürinin sentezinde rol oynayan transformilaz enzimlerinin inhibisyonu, MTX' in iki poliglutamat metaboliti tarafından yapılır. MTX' in hücrelerdeki toksik etkileri dışarıdan ilaç olarak verilen folinik asit (N5-formiltetrahidrofolat) tarafından antagonize edilir, folik asidin kendisi ise bu durumda THF' a dönüşemediğinden antidotal etkinlik göstermez (25).



**Şekil 1:** Folik asit metabolizması



**Şekil 2:** Metotreksatın basit haliyle ya da poliglutamat olarak DHFR'ı inhibe etme metabolizması

### **2.2.2. Metotreksat'ın Yan Etkileri**

MTX tedavisi esnasında ortaya çıkan yan etkiler oldukça yaygındır. İlacın yan etkilerinin şiddeti değişkendir. En sık rastlanan yan etkiler hafif ve geri dönüşümlüdür. Bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme ve stomatit gibi yan etkiler sıklıkla dozla ilişkilidir. Genel olarak bu yan etkiler tedavi bitimi veya doz azaltımı sonrasında geçer. MTX tedavisi alan hastaların yaklaşık %30' unda tedavi ilaç toksisitesi nedeniyle kesilmektedir (5,26,27).

#### **2.2.2.1. Gastrointestinal Sistem Yan Etkileri**

İştahsızlık, mide bulantısı, kusma, ince bağırsak villus atrofişi nedeniyle ishal, kilo kaybı gibi yan etkiler sık görülür. Bu yan etkiler hastaların büyük kısmında hafif seyreder ve kısa sürer. Ancak hastaların % 2.5'inde ilacı kesecek şiddette olabilir. Yine çeşitli şiddette ağrılı ülser ve eritemden oluşan stomatit görülebilir. Gastrointestinal sistem yan etkileri, düzenli verilecek folik asit takviyesi, MTX dozunun azaltılması veya MTX' in parenteral uygulamaya geçilmesiyle azaltılabilir (26,28-30).

#### **2.2.2.2. Diğer Sistem Yan Etkileri**

Alopesi, güneş ışığına hassasiyet, eritem, ürtiker ve kutanoz vaskülit oluşabilir (26,31). Yeterli folik asit desteği verilmeksizin uzun süre MTX kullanımı, folat eksikliğine ve eritrositlerde makrositoza neden olabilir. Lökopeni, trombositopeni, megaloblastik anemi ve pansitopeni nadirdir ve %5'ten az görülür (26,28,31). Düşük doz haftalık MTX ile renal toksisite bildirilmemiştir. İlaç böbreklerden atıldığı için renal yetmezlikte kullanılmamalıdır. Renal fonksiyonların düzenli takibi gerekmektedir (31). Kansere kemoterapisinde kullanılan yüksek doz MTX ile geçici oligospermi olabilir. Overyan disfonksiyon ise bildirilmemiştir. MTX teratojen bir ajandır (26-34). Son yıllarda MTX kullanan olgularda lenfoma sıklığında artış gözlenmektedir. Hematolojik malignite sıklığında ise artış saptanmamıştır (26). MTX ile pulmoner toksisite, akut veya kronik olabilir. Pulmoner reaksiyon % 3-5 sıklıkta bildirilmiştir (26, 28, 31).

Düşük doz MTX tedavisi ile hepatotoksisite riski düşüktür, ancak alkol kullanımı, diyabetes mellitus, kronik hepatit B ve C taşıyıcılığı, obezite,  $\alpha$ -1 antitripsin eksikliği riski arttıran faktörlerdir. MTX kullanan olgularda hastalık

aktivitesi düzelirken belirli aralıklarla yapılan karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme ve serum albumininde düşüş görülmektedir (28,31-33).

Baş ağrısı, kilo kaybı, yorgunluk, ateş, poliartralji, baş dönmesi, grip benzeri semptomlar olabilmektedir (28).

### **2.2.3. Metotreksat Toksisitesi ve Oksidatif Stres**

Anti-kanser ilaçlarla yapılan toksisite çalışmalarında, oksidatif stres üzerine dikkat çekilmektedir. Karaciğer, böbrek, ince bağırsak ve merkezi sinir sistemindeki MTX' in yan etki mekanizması için oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır (8,35-37).

Babiak ve arkadaşları (38), MTX' in He-La hücrelerinde vücudun önemli antioksidanı olan glutasyon seviyelerini azalttığını göstermişlerdir. Jahovic ve arkadaşları (8), intraperitoneal 20 mg/kg tek doz MTX uygulanan ratlarda, kan, karaciğer, böbrek ve ince bağırsak dokularında glutasyon seviyelerinde azalma, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan miyeloperoksidaz aktivitesinde artma ve malondialdehit seviyelerinde belirgin şekilde artma olduğunu bulmuşlardır. Miyazono ve arkadaşları (39), MTX' in yan etkisi olarak rat incebarsağında süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitelerinde artma, glutasyon seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX' in yol açtığı ince bağırsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdir. Devrim ve arkadaşları (36) da MTX nefrotoksisitesinde oksidatif stresin önemini vurgulamışlardır. Benzer şekilde Uz ve arkadaşları (37) da MTX alan ratların böbrek dokularında nitrik oksit seviyelerinde artış olduğunu bildirmişler ve MTX toksisitesinden korunmak için antioksidan ajanlarla birlikte kullanması gerekliliğini öne sürmüşlerdir.

### **2.2.4. Metotreksat'ın Antiinflamatuvar Etkisi**

MTX, romatoid artrit ve psöriatik artrit tedavisinde antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. Tümör nekrozis faktör-alfa, interlökin 1-beta gibi sitokinler ile metaloproteinazlar gibi inflamasyonun inflamatuvar mediatörlerinin romatoid artritte MTX tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir (3).

### **2.2.5. Metotreksat ve Mukozit**

Mukozit, sitotoksik kemoterapi ve radyoterapinin bir yan etkisidir. Ağrı, karında şişkinlik, bulantı, kusma ve ishal gibi belirtiler ile sonuçlanan, sindirim sisteminin mukozal ülserasyon ve inflamasyonunu içeren önemli ölçüde tedaviye uyumu bozabilen bir durumdur. Sıklıkla yüksek doz kemoterapi başlangıcından 4-7



gün sonra ortaya çıkar ve kendini sınırlayan bir nitelik taşımaktadır. Sitotoksik kemoterapi bittikten 2-4 hafta sonra ise kaybolur (1,40).

Metotreksat, dihidrofolat redüktaz ve DNA sentezi inhibitörüdür, ince bağırsak kript ve villüslarda mitotik aktiviteyi yavaşlatır (41,42), bağırsak epitel bariyerini bozabilir (43). Mukozit gelişimindeki temel mekanizma; kemoterapi veya radyoterapinin bağırsak yüzey epitelyum hücrelerine (turn-overı hızlı olan yüzey epitelyum hücreleri) doğrudan sitotoksik etkilerinin sonucu olduğu kabul edilir (44,45). Sindirim sisteminde yapılan hem deneysel hem de insan çalışmalarında mukozitin beş aşamadan oluştuğu kabul edilmektedir: başlangıç, up-regülasyon ve haberci sinyallerin üretimi, sinyal güçlendirme, ülser ve iyileşmedir (40,46,47).

### **2.3.Arjinin, Omega 3 Yağ Asitleri ve Nükleotitlerle Zenginleştirilmiş Oral Formül (İmmunonütrisyon, IN)**

Spesifik bazı nütrientlerin (glutamin, arjinin,  $\omega$ -3 yağ asitleri ve diyet nükleotitleri gibi) günlük ihtiyaçlarının üzerinde alındıklarında inflamasyon baskılayıcı, metabolizma ve immün sistem prosesleri üzerine güçlü ve yararlı etkileri oldukları A seviyesinde kanıtla ortaya konmuştur (48). İmmunonütrisyon gerek immün sistem aktivasyonunun modülasyonu, gerekse besin öğelerinin normal diyetle olduğundan daha fazla verilmesi ile immün sistem aktivasyonunun sonuçları olarak tarif edilebilir (49).

Kanser hastalarında nütrisyon desteği tedavinin ayrılmaz bir parçası olup ve öneminin her geçen gün daha iyi anlaşılması ile spesifik besin öğelerinin etkileri ile ilgili araştırmalar hızla artmaktadır. Ancak besin öğelerinin tek başına ve diğerleriyle birlikte gösterdikleri etkiler in vivo ve in vitro şartlarda değişiklikler göstermektedir. Özellikle kemoterapi tedavisi uygulananlarda nütrisyon kavramının yanı sıra immunonütrisyon hatta farmakonütrisyon kavramı da oluşmaktadır (50).

Kanser hastalarında, primer kullanım nedenleri tedavi etmeye yönelik çabaların yanı sıra malnütrisyonu engelleyici veya geliştikten sonra modüle edici ve hatta tedavi edici yöntemlerin arasında nütrisyonel desteğinin yeri kesinlik kazanırken, besin öğelerinin immün sisteme etkileri tartışılmaya başlanmıştır. Tedavi esnasında verilen kemoterapi ve buna sekonder düzeyde eşlik eden serbest oksijen

radikal oluşumuna bağlı intestinal bariyer hasarı ile mücadele etmek için birçok deneysel ve klinik çalışma yapılmıştır (51).

### **2.3.1.Arjinin**

Arjinin, nitrojen içeriği en fazla olan aminoasit olup non-esansiyeldir. Büyüme, hastalık, stres ve travmada endojen sentez, pozitif nitrojen dengesi için yeterli değildir. Bu gibi durumlarda esansiyel aminoasit durumuna gelir (52).

Arjininin en önemli özelliği nitrik oksit (NO) fizyolojik prekürsörüdür (52). NO düşük konsantrasyonlarda antiinflamatuvar etki, yüksek konsantrasyonlarda ise pro-inflamatuvar etki gösterir. NO' nun, immunité, vasküler tonus ve inflamasyon üzerinde düzenleyici etkileri vardır, aşırı dozu bakteri, fungus ve tümör hücrelerini öldürmektedir (53). Arjinin endotelial hasar oluşmasını önleyici yönde etki gösterir, vazokonstriksiyona karşı koruma sağlar ve reperfüzyon sonrası ödem oluşumunu azaltır (54).

Arjinin, lenfosit işlevlerini ve fagositozu artırır, yara iyileşmesini hızlandırır. Majör cerrahi ve travmalardan sonra baskılanan T hücre yanıtının daha erken normalleşmesini sağlar, CD4 düzeyini artırır. Arjinin eksikliğinde T-hücre çoğalması ve CD3 sunumu baskılanır. Anabolik hormonların salınımını uyarır, poliamin ve kreatin sentezinde önemli rol oynar. Poliaminler hücre bölünmesinde, kasta ATP sentezinde ve makrofaj aracılı tümör hücresi sitotoksitesinde önemli rol oynamaktadır (52).

Sepsisli hastalarda plazma arjinin düzeyi, azalmış sentez ve alıma bağlı olarak belirgin düşük saptanır. Bu nedenle sepsiste arjinin desteği mantıklı olur gibi görünse de klinik uygulamalarda sonuçlar farklıdır. Sepsiste NO yapımı belirgin olarak artmıştır ve vasküler kollapsın ana nedeni olarak kabul edilir (55). Aşırı NO üretimi mitokondriyal solunumu etkileyerek apoptozise ve nekroza neden olabilir (53). Bunun yanında insanlarda yapılan deneysel bir çalışmada enteral arjinin desteğinin doza bağlı olarak NO sentezini artırdığı fakat pro ve antiinflamatuvar sitokinlerin sentezine etkisi olmadığı gösterilmiştir (56). Deneysel çalışmalarda arjinin desteğinin bakteriyal translokasyon ve sepsis oranını azalttığı bildirilmiştir (57,58). Kollojen sentezinde kullanılan hidroksiprolin düzeyini artırarak, yara iyileşmesini sağlar (59).

Leitao ve arkadaşlarının (7) yapmış oldukları bir çalışmada, metotreksat verilmiş ratlarda arjininin ince bağırsak mukoza iltihabı üzerine etkileri

araştırılmıştır. Bu çalışmada, arjininin, villus azalması, kript hasarı, inflamatuvar değişiklikler, hücre ölümü ve miyeloperoksidaz aktivitesi üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir.

### **2.3.2.Omega 3 Yağ Asitleri**

Esansiyel yağ asitleri, hücre membranının temel unsurlarındandır. İnsanlar için iki adet esansiyel yağ asidi vardır; linoleik asit ( $\omega$ -6) ve alfa-linolenik asit ( $\omega$ -3). Bu esansiyel yağ asitlerinden  $\omega$ -3 yağ asitleri, çeşitli enzimlerce daha uzun çoklu doymamış yağ asitlerine çevrilirler.  $\omega$ -3 yağ asitlerinden dokosaheksanoik asit (DHA) ve eikosapentanoik asit (EPA) oluşur. Oluşan bu metabolitler daha az oranda inflamatuvar ya da antiinflamatuvar özellik gösterirler (60).

$\omega$ -3 yağ asitlerinin inflamatuvar reaksiyonların şiddetini azalttığı, konakçı savunmasını güçlendirdiği, sepsiste splankinik kan akımını ve bağırsak bariyer fonksiyonlarını iyileştirdiği ve tümör büyümesini engellediği yönünde veriler mevcuttur (60,61).

Besinler ile alınan  $\omega$ -3 yağ asitleri hücre membranında fosfolipidlerin yapısına katılarak akışkanlığı artırır, reseptörleri, iyon kanallarını, taşıyıcıları ve immun modülasyonda rol oynayan genlerin ekspresyonunu etkilerler (60,62).

Deneysel hayvan çalışmalarında  $\omega$ -3 yağ asitleri desteği, doğal öldürücü hücre aktivitesini, CD8 T-hücre aktivitesini, gama-interferon ve TNF- $\alpha$  sentezini etkilemektedir (63). Sitokinler üzerine etkileri ile kanser kaşeksisi üzerine olumlu yönde etkileri olabilmektedir (64). Deneysel olarak hayvan modellerinde  $\omega$ -3 desteği intestinal bakteriyel translokasyonu ve villus atrofisini azaltmaktadır (65).

Koppelman ve arkadaşlarının (66) yapmış oldukları çalışmada, enteral omega 3 yağ asitlerinin intestinal hücrelerde apoptozisi azalttığı, intestinal mukoza hasarı üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir.

### **2.3.3.Nükleotidler**

Nükleotidler, bir pentoz ve bir veya birden fazla fosfat grubuna bağlı nitrojenli bir bazdan oluşur. Bu bileşikler (pürin ve pirimidinler), hayvansal ve bitkisel besinlerde doğal olarak bulunurlar ve hücrenin yapı taşlarıdır. Karbonhidrat, protein, yağ ve nükleik asit metabolizmasında önemli rolleri vardır (67). Endojen sentezleri kompleks ve enerji gerektiren bir durum olduğundan hastalık, stres ya da

travma anında immün sistem, gastrointestinal mukoza atrofisini devam ettirmek için dışarıdan sağlanmaları önem taşımaktadır (50).

Pürin ve pirimidinler, T lenfosit ve bağırsak epitelyal hücreleri gibi hızlı çoğalan, bölünen, büyüyen ve yeterli nükleotit sentezleme yeteneği olmayan hücreler için esansiyeldirler (68). Bu hücreler, nükleotitleri protein sentezinde ve hücre bölünmesinde kullanmak için diyetle alım veya geri dönüşüm yolu ile karşılarlar (69).

Enfeksiyöz atağa karşı pürin verilmesi, konakçı immün cevabını daha iyi fagositik hücre aktivasyonu ve hücrel immünite ile düzeltir (69).

Diyetteki nükleotitler, gastrointestinal mukoza fonksiyonları üzerinde önemli rol oynar. Nükleotit içermeyen beslenme, jejunum mukozasının matürasyonunu ve optimal büyümesini bozarken, normal besin alımı ile kıyaslandığında, parenteral nütrisyonunda nükleotit suplementasyonu jejunum mukozasında yaş ağırlığını, kript derinliğini, villus yüksekliğini, protein, nükleik asit konsantrasyonlarını ve fırça-kenar enzim aktivitesini düzenler (70).

Klinik çalışmaların çoğunda nükleotitler ile immüniteyi güçlendiren bir diyet oluşturabilmek amacıyla  $\omega$ -3 yağ asitleri ve aminoasitler ile kombine edilmiştir. Bu nedenle nükleotitlerin tek başına yarattıkları etkiyi ayırmak zordur (71).

Yu ve arkadaşları (67) nükleotit desteği verilen yenidoğanlarda yaptıkları çalışmada bağırsak mukoza bütünlüğünün korunduğunu ve mikrofloranın düzenlendiğini saptamışlardır. Bu nedenle nükleotitlerin gastrointestinal sistemde glutamin benzeri etki gösterdiğini ifade etmişlerdir.

## **2.4. Biyokimyasal Değerlendirmede Kullanılan Belirteçler**

### **2.4.1. İnflamatuar Araçlar**

TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  makrofajlardan salınan önemli sitokinlerdir. Sitotoksik etkileri yanında, inflammatuar reaksiyon ve inflamasyonun regülasyonunda da önemli bir role sahiptirler. Nötrofiller, inflamasyonda ve travmada serbest oksijen radikalleri ve bir takım lizozomal enzimler salgılamaktadır. Ek olarak nötrofiller uyarı aldıklarında TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  gibi sitokinler de salgılamaktadırlar (72).

#### **2.4.1.1.Tümör Nekrozis Faktör-Alfa**

TNF- $\alpha$ , proinflamatuvar bir sitokindir ve inflamatuvar cevaba aracı olmaktadır (73). Endotoksin, inflamatuvar olaylar, immun kompleksler, fiziksel hasar ve toksin salınımını uyarmaktadır. İnterlökin-1 ile birçok aynı özelliği paylaşmaktadır. TNF- $\alpha$ , IL-1 ile birlikte ya da ayrı ayrı sistemik inflamasyonu tetiklemekte ve ateş gibi belirtilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı yapısında bulunan ve aynı zamanda bir endotoksin olan lipopolisakkaridler (LPS), TNF- $\alpha$  üretimini tetiklemektedir. Ayrıca, nötrofil ve monositler için kemotaktiktir ve nötrofil aktivitesini artırır. TNF- $\alpha$ 'nın lokal olarak konsantrasyonunun artması, bakteriyel enfeksiyonlarla ilişkili olan belirtilere (septik şok, ateş, kas ağrısı, uyuşukluk, baş ağrısı, mide bulantısı ve inflamasyon) neden olmaktadır (74).

#### **2.4.1.2.İnterlökin-1 Beta (IL-1 $\beta$ )**

TNF- $\alpha$  gibi enfeksiyon ve diğer inflamatuvar uyaranlara karşı konak yanıtının mediatörüdür. TNF- $\alpha$  ile beraber etki gösterir. Ana kaynağı mononükleer fagositler olmasına rağmen nötrofiller, epitelial hücreler ve endotel hücreleri tarafından da sentezlenirler. Düşük konsantrasyonlarda lokal inflamasyonun mediyatörüdürler. Yüksek konsantrasyonlarda dolaşıma geçerek endokrin etkiler gösterirler (ateş, akut faz reaktanlarının salınması, kaşeksi gibi) (75).

#### **2.4.2.Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres**

Serbest oksijen radikalleri, hücre metabolizmasında ortaya çıkan, en dış tabakalarında eşlenmemiş elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğiliminde olan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Oksidantların arttığı veya antioksidantların yetersiz kaldığı durumlarda organizmanın maruz kaldığı “oksidatif stres” sonucunda bozulan hücresel metabolizma, moleküler yıkım ve doku hasarını getirir. Oksidatif hasarın olduğu dokuda artan radikal metabolitler ve bunların oluşturduğu lipid peroksidasyonu ile protein ve DNA oksidasyonu sonucu hücre membranında kontrol kaybolur, geçirgenlik artışı ve hücresel ölüm gelişir (76).

##### **2.4.2.1.Luminol ve Lusigenin**

Birçok inflamatuvar hastalıkta ve doku hasarında reaktif oksijen radikalleri oluşmaktadır (77,78). Luminol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>, hipoklorit, peroksinitrit ve lipid peroksil

radikalleri için kullanılan bir tekniktir, lusigenin ise süperoksit radikalleri için selektiftir (79).

Kemillüminesans yöntemi, serbest oksijen radikallerinin ölçümü için kullanılan direkt ve noninvazif bir yöntemdir. Kemillüminesans, ekzotermik oksidatif reaksiyon gösteren organik bileşiklerin genel bir özelliğidir ve ışık yayılmasını ifade eder. Luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4 fitalazinedion phthalazinedione) ve lusigenin (bis-N-metilakridinumnitrat methylacridiniumnitrate), SOR gibi oksidantlarla tepkimeye girerek sırasıyla fotonik aktiviteye yol açan 3-aminofitalat ve N-metilakridon oluşturur (79,80).

### **2.4.3.Malondialdehit**

Plazma membranı, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi biyolojik membranlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinde serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasara lipid peroksidasyonu denilmektedir (81). Lipid peroksidasyonu, bir lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks bir olaydır. Lipid peroksidasyonu sonucunda hücrede kendiliğinden devam eden zincirleme reaksiyonlar başlamaktadır. Oksidasyon sonucunda oluşan lipid peroksit radikalleri bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonları başlatırlar (81). Bu ürünlerin daha ileri parçalanmaya uğraması ile hidroperoksidlere, hidroperoksidler de daha zararlı radikal özelliği olan aldehidlere dönüşürler. Bu aldehidler içinde en çok bilineni MDA' dır. Dolayısıyla bir dokuda MDA seviyesinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir (82). Malondialdehidin kendisi de üretildiği yerde iki yönlü hareket edebilir; hem dış ortama hem de hücrenin iç kısmına yönelebilir. Hücre içinde birçok yapıya zararlı etkileri vardır. Dolayısıyla serbest oksijenlerin lipidlere etkisi sonucu açığa çıkan patolojik ürün olan MDA daha ileri yıkımlara sebep olabilir. Hücre membranlarının lipid kısmının büyük çoğunluğu fosfolipid ve bunların yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinden oluşmuştur. Bu hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozulur (81,82).

### **2.4.4.Miyeloperoksidaz**

Serbest oksijen radikalleri hem dokuya doğrudan zarar vermekte hem de polimorf nüveli lökositlerin (PMNL) hasarlı dokuda birikmesini sağlamaktadır.

Nötrofil ve monositler primer lizozomal granüllerinde bir Hem enzimi olan miyeloperoksidaz ihtiva ederler. Nötrofiller dolaşımında bulunan PMNL'lerin %90'ından fazlasını oluştururlar. Kompleman fragmanları, hidroksil radikalleri, reaktif oksijen radikalleri ve sitokinler gibi uyarılar nötrofil aktivasyonuna neden olur. Dokuya gelen aktive PMN lökositler; MPO, elastaz, proteaz, kollajenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimleri açığa çıkarırlar. Bu enzimler hem dokudaki hasarı arttırmaları, hem de daha fazla radikal oluşmasına neden olurlar (83,84).

MPO, çeşitli bileşikler (elektron ya da hidrojen donörleri) okside edebilen bir enzim substrat kompleksi oluşturmak için, substratı olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birleşir ve bunların oksidasyonu sonucu, çeşitli yollarla organizmayı etkileyebilen toksik ajanlar meydana gelir ve bunlar hücre ölümüne yol açarlar. Nötrofillerin primer fonksiyonu fagositoz ve mikroorganizmaların sindirimi olmasına rağmen bu hücrelerden toksik ajanların sızıntısı veya sekresyonu yakın hücrelere zarar verir. Fagositik kaynaklı oksidantlar ototoksik, immunosüpresif ve mutajenik etkiler gösterirler (83,84).

#### **2.4.5. Glutatyon**

Oksidatif stresin ölçümünde kullanılan bir antioksidandır. Redükte glutatyon (GSH) / okside glutatyon (GSSG) oranı, oksidatif durumlarda azalır. GSH ve GSSG "yüksek performans lipid kromatografi" (HPLC) ve spektrofotometrik yöntemlerle tespit edilir (85). Glutatyon karaciğerde glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Çok önemli bir antioksidant olan glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girip onları zararsız ürünlere çevirerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Proteinlerdeki sülfidril gruplarını da indirgenmiş halde tutarak okside olmasını engeller (86).

#### **2.4.6. Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATPaz**

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz, hücre içi elektrolit homeostazında konsantrasyon gradyanına karşı ATP kullanarak sodyum ve potasyum değişimini sağlar (87). Membran bağımlı bir enzimdir, birçok membran bağımlı enzim gibi Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATPaz' da aktivite gösterebilmesi için fosfolipitlere ihtiyaç duyar. Ancak iskemide, lipid peroksidasyonunun başlangıcında ve enerji depolarının azalması ile serbest oksijen radikalleri artar ve sonrasında membran Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATPaz aktivitesi inhibe olur (88,89).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma, T.C. Sağlık Bakanlığı Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınan izin ile (protokol kodu:76.2012.mar) gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar, Marmara Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiş ve deney aynı merkezde yapılmıştır.

Çalışmada 8 haftalık 32 adet Wistar-Albino sıçan (180–220 g) kullanılmıştır. Sıçanlar standart pellet yem (protein % 24, lysine % 1, metionin % 0.6, sistein % 0.4, selüloz % 7, NaCl % 1, kalsiyum % 1-2 ve enerji 2650 kkal/kg ) ile beslenmiş ve deney süresince su alımları serbest bırakılmıştır. Tüm hayvanlar polipropilen kafeslerde tutulmuş, 22-24°C sıcaklık ve 12 saat ışık-12 saat karanlık siklusuna uygun standart koşullar sağlanmıştır. Her bir kafeste 3 hayvan bulundurulmuştur.

Her biri 8 hayvandan oluşan 4 grup belirlenmiştir. **G1:** kontrol grubu, **G2:** arjinin,  $\omega$ -3 yağ asitleri ve nükleotidlerle zenginleştirilmiş immünonütrisyonel oral formül (IN) verilen grup, **G3:** Metotreksat (MTX) verilen grup, **G4:** MTX + IN verilen grup.

**G1 grubu:** Tek doz intraperitoneal serum fizyolojik (SF) uygulanmıştır. SF uygulaması sonrası 5 gün süresince gavaj ile oral salin verilmiş ve 6.gün laparotomi yapılmıştır. Periferik kan örneği alınarak, biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için ince bağırsak (jejunal) doku örnekleri alınmıştır.

**G2 grubu:** Tek doz intraperitoneal SF uygulanmıştır. SF uygulaması sonrası 5 gün süresince gavaj ile günde üç doz halinde (her defasında 5 mL /kg), arjinin,  $\omega$ -3 yağ asitleri ve nükleotidlerle zenginleştirilmiş immünonütrisyonel oral formül (IN) verilmiş ve 6.gün laparotomi yapılmıştır. Periferik kan örneği alınarak, biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için ince bağırsak (jejunal) doku örnekleri alınmıştır.

**G3 grubu:** Tek doz 20 mg/kg MTX intraperitoneal olarak uygulanmıştır. MTX uygulaması sonrası 5 gün süresince gavaj ile salin verilmiş ve 6.gün laparotomi yapılmıştır. Periferik kan örneği alınarak, biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için ince bağırsak (jejunal) doku örnekleri alınmıştır.

**G4 grubu:** Tek doz 20 mg/kg MTX intraperitoneal olarak uygulanmıştır. MTX uygulaması sonrası 5 gün süresince gavaj ile günde üç doz halinde (her seferinde 5 mL /kg), arjinin,  $\omega$ -3 yağ asitleri ve nükleotidlerle zenginleştirilmiş oral formül (IN)



verilmiş ve 6.gün laparotomi yapılmıştır. Periferik kan örneği alınarak, biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için ince bağırsak (jejunal) doku örnekleri alınmıştır.

MTX uygulaması tek doz şeklinde intraperitoneal 20 mg/kg olarak uygulanmıştır. Arjinin,  $\omega$ -3 yağ asitleri ve nükleotidlerle zenginleştirilmiş oral formül (IN) uygulaması ise MTX uygulaması sonrası deney sonuna kadar her gün oral olarak (gavaj ile) günde üç doz halinde 5 mL /kg olarak uygulanmıştır. Deneyin her aşamasında sıçanlara standart yiyecek ve suları verilmiştir. Bütün gruplara 6.gün intraperitoneal Ketamin Hidroklorid 100 mg/kg + 10 mg/kg ksilazin HCl ile anestezi verilerek, karın tüyleri traşlanmış, cilt %10'luk povidon iyot ile temizlenmiş, steril koşullar altında orta hat kesisi ile laparotomi yapılmıştır (Resim 1). Yapışıklıklara müdahale edilmeksizin makroskopik olarak görülebilen mukozit alanları rezeke edilmiştir (Resim 2), görülemeyen sıçanlarda ise jejunum ansı total olarak çıkartılmıştır. Deney sonunda vena kavadan 2 mL kan alınmıştır (Resim 3). Alınan kan örnekleri, jelli vakumlu tüplere konulmuş ve 3000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası plazma kısımları bir pipet yardımı ile alınarak eppendorflara konulmuş ve örnekler -20 °C' de saklanmıştır. Biyokimyasal inceleme için alınan doku örnekleri alüminyum folyo içerisinde -20 °C' de ve histopatoloji için alınan örnekler ise % 10'luk formaldehit içerisinde saklanmıştır.



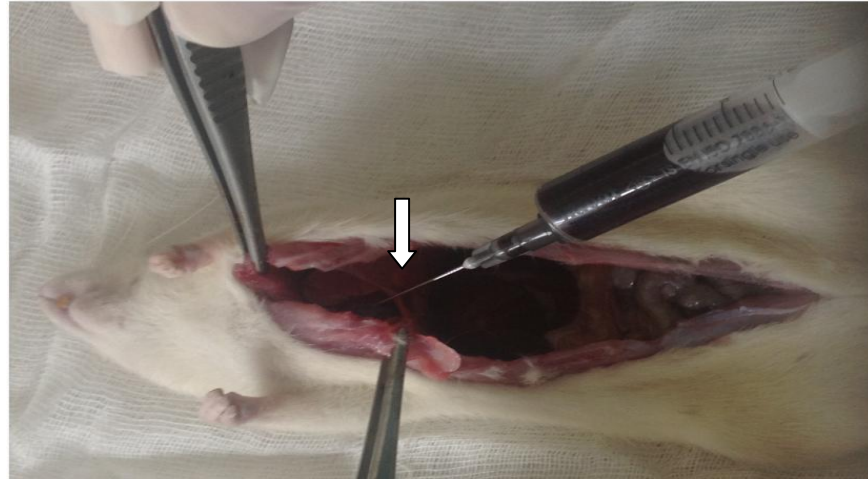
**Resim 1:** Orta hat kesisi ile yapılan laparotomide ince bağırsakların görünümü

Serumda inflamatuvar reaksiyonda önemli rol oynayan tümör nekrozis faktör-alfa, interlökin-1 beta düzeyleri ile ince bağırsak dokusunda serbest oksijen

radikallerinin direkt belirteci olan luminol ve lusigenin düzeyleri, glutasyon, malondialdehit, myeloperoksidaz,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPaz}$  çalışılmıştır. Ayrıca bağırsak doku örnekleri histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.



**Resim 2:** Makroskopik olarak görülebilen mukozit alanları



**Resim 3:** Vena-cavadan kan alınması

### 3.1. Serumda $\text{TNF-}\alpha$ ve $\text{IL-1}\beta$ Tayinleri

Serumda  $\text{TNF-}\alpha$  ölçümü, Biosource kiti (ELISA, BioSource Europe S.A. Catalog No. KRC 3014, Nivelles, Belgium) ile Elx808IU Ultra Microplate cihazında Enzyme Immunoassay (ELISA) yöntemi ile çalışılmıştır.  $\text{IL-1}\beta$  ölçümü ise Biosource kiti kullanılarak (ELISA, BioSource Catalog No. KRC0011, Nivelles,

Belgium) yine Elx808IU Ultra Microplate cihazında Enzyme Immunoassay yöntemi ile çalışılmıştır (90).

### **3.2. Malondialdehit Ölçümü**

MDA ölçümü, MDA Elisa kiti (ELISA, Uscn Life Science Inc, Cat No. E0597Ra, USA ) ile Elx808IU Ultra Microplate cihazında Enzyme Immunoassay (ELISA) yöntemi ile çalışılmıştır. MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de optik dansitesinin ölçülmesi prensibine dayanan Ohkawa ve arkadaşlarının (87) metoduna göre yapılmıştır. 0.5 mL plazma üzerine % 8.1 sodyum dodesil sülfat 0.2 mL, pH'sı 3.5 olan % 20 asetik asit 1.5 mL ve % 0.8 tiobarbitürik asit solüsyonu 1.5 mL eklenerek 95° C'de 60 dakika ısıtılmıştır. Soğutulduktan sonra 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst tabakanın absorbansı 532 nm'de ölçülmüştür. Standart olarak 1,1,3,3- tetraetoksiopropan kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiğinden numunedeki MDA miktarı hesaplanarak ve nmol/mL olarak ifade edilmiştir.

### **3.3. Myeloperoksidaz Aktivitesi Ölçümü**

MPO ölçümü, MPO Elisa kiti (ELISA, Uscn Life Science Inc, Cat No. SEA601Ra, USA ) ile Elx808IU Ultra Microplate cihazında Enzyme Immunoassay (ELISA) yöntemi ile çalışılmıştır. Dokulardan alınan 0.2-0.3 g ağırlığındaki örnekler 20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=7.4) çözeltisi ile 10 kez sulandırılıp homojenize edildikten sonra 12000 devirde 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüje edilmiştir. Aynı hacimde %0.5'lik heksadesiltrimetilamonyum hidroksit içeren 50 Mm K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ile yeniden homojenize edilen örneklerde MPO aktivitesi, O-dianizidin dihidrokloritin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e bağlı oksidasyonunun spektrofotometrik ölçümüyle saptanmıştır. Bir ünite enzim aktivitesi, 37 °C'de 460 nm absorbansta (1.0 mL/dk) meydana gelen değişiklik olarak değerlendirilmiştir (92).

### **3.4. Glutasyon Ölçümü**

Ellman yöntemi modifiye edilerek, 0.3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve Ellman solüsyonlarına ilave edilen doku örneklerinden reaktif maddelerin oluşumu spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlenmiştir (93).

### **3.5. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz Düzeyi Ölçümü**

Doku Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz miktarı SİGMA 366-A kiti kullanılarak ölçülmüştür. Bu yöntemle ince bağırsak dokusu mekanik olarak homojenize edildikten sonra doku

içinde mevcut ATP 3-fosfogliserat ile fosfogliserat fosfokinaz enzimi varlığında reaksiyona sokularak ADP + 1.3 difosfogliserata çevrilmiştir. Daha sonra 1,3-difosfogliserat, dihidronikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ile gliseraldehid fosfat dehidrojenaz enzimi varlığında reaksiyona sokulmuştur. Sonuçta NADH' in oksitlenmesi ile açığa çıkan nikotinamid adenin dinükleotit (NAD)' ın 340 nm de absorbansı ölçülerek başlangıçta 1 mg doku ile reaksiyona giren Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz 'ın miktarı orantı ile tespit edilmiştir (94).

### **3.6. Dokuda Serbest Oksijen Radikallerinin Kemilüminesans Yöntemi ile Belirlenmesi**

Dokular, 2mL PBS-Hepes tamponu içine konulmuş ve içinde aynı dokunun örnekleri olan iki ayrı tüpe 4'er µL (0.2mM) luminol ve (0.2mM) lusigenin eklenmiştir. Reaktif oksijen türleri ile luminol ve lusigenin maddelerinin reaksiyonu sonucu ortaya çıkan fotonik aktivite luminometre aracılığı ile 10 dakika süreyle kaydedilmiştir (95).

### **3.7. Histopatolojik İncelemeler**

Dokular % 10'luk formole alındıktan sonra en az 3 saat veya 1 gece çeşme suyunda yıkanmış ve artan alkol konsantrasyonları ile dehidratasyon (% 70'lik alkol ile 15 dakika, % 90'lık alkol ile 15 dakika, % 96'lık alkol ile 30 dakika, %100'lük alkol ile iki kere 30 dakika, % 100'lük tolüen ile 2 kere 30 dakika) yapılmıştır, ardından 1 gece parafinde 60 °C'de bekletilmiş, ertesi gün doku parafin bloklara gömülmüştür. Bloklama işleminden sonra dokulardan 5-6 mm kalınlığında kesitler alınarak lama yerleştirilmiş ve parafinden kurtarma işlemi için 2 saat toluende bırakılmış, ardından alkolün azalan konsantrasyonları ile suya indirgenme (% 100'lük alkol ile 2 dakika, % 90'lık alkol ile 2dakika, % 70'lik alkol ile 2 dakika muamele edilmesi) yapılmış ve distile suya bırakılmış, 15 dakika hematoksilen ile muamele edildikten sonra çeşme suyunda 10 dakika morartma işlemi için bırakılmıştır. Eosin ile 5 dakika ilave olarak distile su uygulandıktan sonra tekrar alkolün artan konsantrasyonları ile dehidratasyon (% 70'lik alkol ile 2 dakika, %90'lık alkol ile 2 dakika, % 96'lık alkol ile 2 dakika, % 100'lük alkol ile 10 dakika) yapılmış ardından tolüen ile 2 kere yıkanmıştır (1. Banyo 5 dakika, 2. Banyo 10 dakika) ve entellan ile dokunun üzeri kapatılarak, doku ışık mikroskobu (Olympus CX 41) düzeyinde incelenmiştir (96).

İnceleme, gruplar bilinmeksizin bir histopatolog tarafından tek kör olarak yapılmıştır. Bağırsak doku örneklerinde mukozal hasar histopatolojik olarak değerlendirilmiş, inflamasyon yoğunluğu, epitel yapısı, mitoz ve goblet hücreleri morfolojik olarak değerlendirilmiştir (97).

### **3.8. İstatistiksel Değerlendirme**

Bu çalışmadan elde edilen verilerin analizinde GraphPad Prism 3.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) kullanılmıştır. Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası (Ort.  $\pm$  O.S.H.) olarak verilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu 'Kolmogrov-Smirnov' testi ile değerlendirilmiştir. Grupların varyanslarının homojenliği ise, 'Levene testi' ile incelenmiştir. Histopatolojik değerler Mann-Whitney U testi ile, diğer parametreler varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır. 'p' değerinin 0.05' ten küçük olması anlamlı, 0.001' den küçük olması ise ileri derecede anlamlı olarak yorumlanmıştır.

## 4. BULGULAR

Kontrol ve IN grupları arasında tüm parametrelerde istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu nedenle MTX, MTX+IN gruplarının kıyaslamaları kontrol grubuna göre yapılmıştır.

### 4.1. Serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ Sonuçları (Tablo 3, Şekil 3)

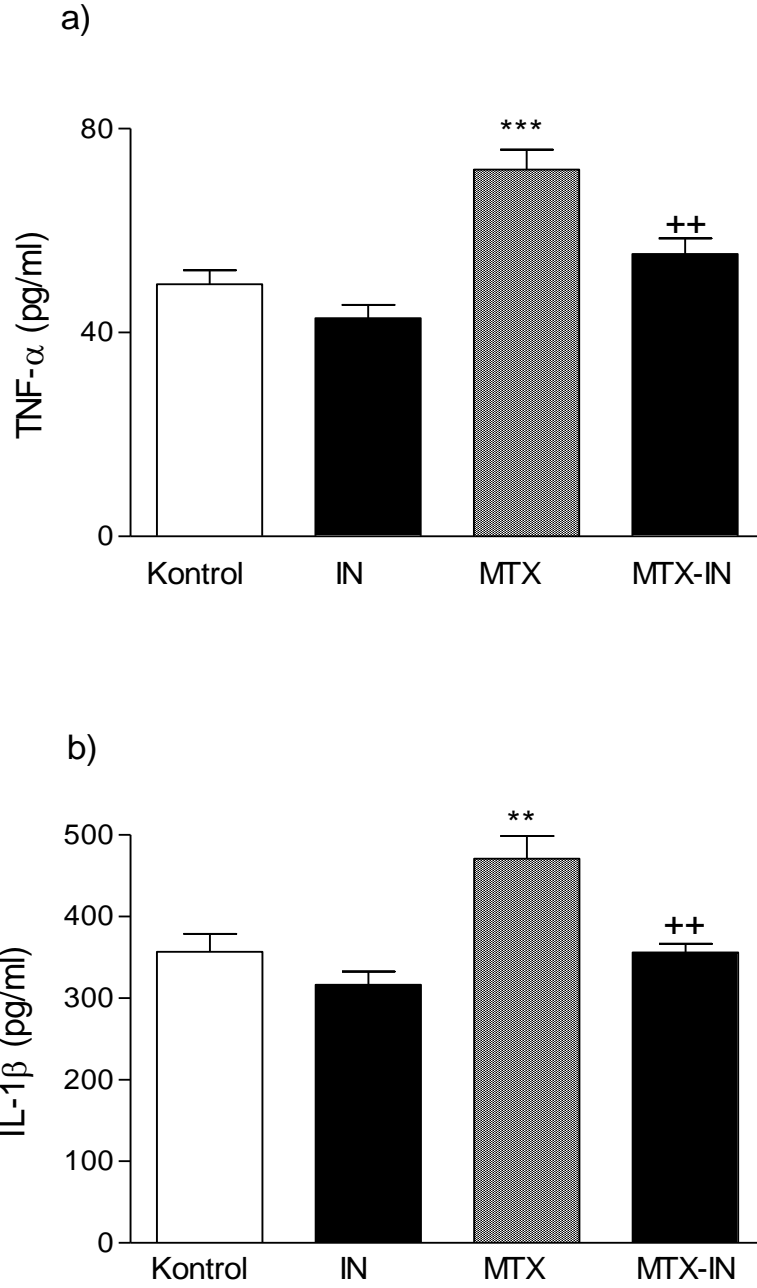
Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri, kontrol grubunda  $49.52\pm 2.71$  pg/mL, IN grubunda  $42.82\pm 2.63$  pg/mL, MTX grubunda  $71.95\pm 3.92$  pg/mL ve MTX+IN grubunda ise  $55.40\pm 3.11$  pg/mL olarak bulunmuştur. MTX grubundaki TNF- $\alpha$  düzeylerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). MTX + IN grubundaki TNF- $\alpha$  düzeylerinin ise MTX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

Serum IL-1 $\beta$  düzeyleri kontrol grubunda  $357\pm 22$  pg/mL, IN grubunda  $316\pm 17$  pg/mL, MTX grubunda  $471\pm 28$  pg/mL ve MTX + IN grubunda ise  $356\pm 11$  pg/mL olarak belirlenmiştir. MTX grubundaki IL-1 $\beta$  düzeyleri, kontrol grubuna göre daha yüksek olarak belirlenmiş ve bu fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0.001$ ). MTX + IN grubundaki IL-1 $\beta$  düzeyleri ise MTX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak daha düşük saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

**Tablo 3: Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarına ait serum TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  için ortalama ve standart hata değerleri.**

	Kontrol	IN	MTX	MTX-IN
	Ort $\pm$ OSH	Ort $\pm$ OSH	Ort $\pm$ OSH	Ort $\pm$ OSH
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	$49.52 \pm 2.71$	$42.82 \pm 2.63$	$71.95 \pm 3.92$ ***	$55.40 \pm 3.11$ ++
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	$357 \pm 22$	$316 \pm 17$	$471 \pm 28$ ***	$356 \pm 11$ ++

\*\*\*  $p<0.001$  kontrol grubuna göre, ++  $p<0.001$  MTX grubuna göre karşılaştırmalar.



**Şekil 3:** Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarına ait serum a) TNF- $\alpha$  ve b) IL-1 $\beta$  değerleri.

\*\*\* p<0.001 kontrol grubuna göre, \*\* p<0.001 MTX grubuna göre karşılaştırmalar.

#### 4.2. Glutatyon Sonuçları (Tablo 4, Şekil 4)

İnce bağırsak dokusunda GSH düzeyleri, kontrol grubunda  $2.43 \pm 0.17$  nmol/g, IN grubunda  $2.77 \pm 0.13$  nmol/g, MTX grubunda  $1.84 \pm 0.15$  nmol/g ve MTX+IN grubunda ise  $2.45 \pm 0.12$  nmol/g olarak belirlenmiştir. MTX grubundaki GSH düzeyleri, kontrol grubuna göre daha düşük olarak saptanmış ve bu fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). MTX + IN grubundaki GSH düzeyleri ise MTX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak daha yüksek saptanmıştır ( $p < 0.05$ ).

#### 4.3. Malondialdehit Düzeylerine Ait Sonuçlar (Tablo 4, Şekil 4)

İnce bağırsak dokusunda MDA düzeyleri, kontrol grubunda  $19.20 \pm 2.08$  nmol/g, IN grubunda  $18.55 \pm 2.93$  nmol/g, MTX grubunda  $40.65 \pm 4.90$  nmol/g ve MTX+IN grubunda ise  $23.13 \pm 3.46$  nmol/g olarak bulunmuştur. MTX grubundaki MDA düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek ( $p < 0.01$ ); MTX + IN grubundaki MDA düzeyleri ise MTX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak daha düşük olarak saptanmıştır ( $p < 0.05$ ).

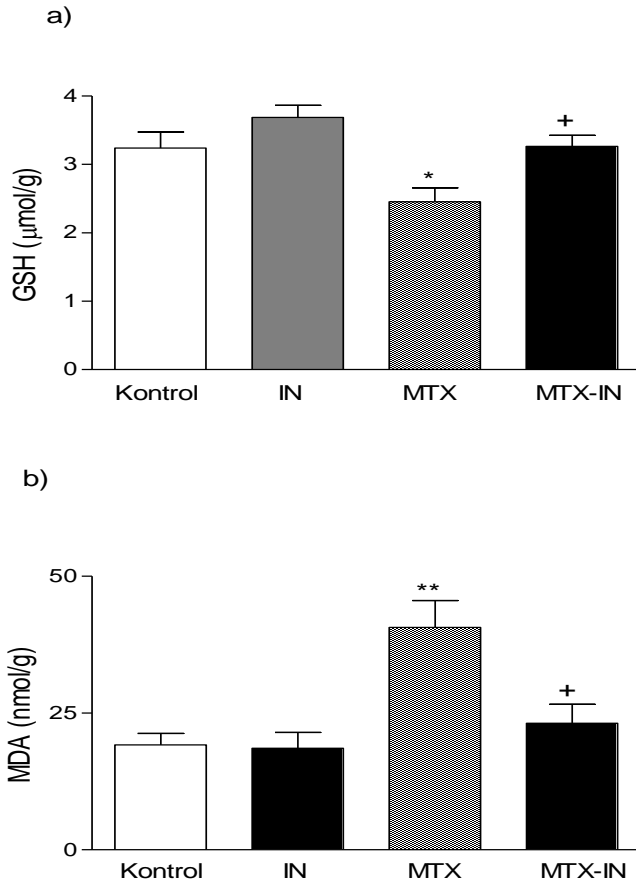
**Tablo 4: Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarında ince bağırsak dokusuna ait GSH, MDA, MPO,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz, luminol ve lusigenin Kemilüminesans (KI) için ortalama ve standart hata değerleri**

	Kontrol	IN	MTX	MTX-IN
	Ort $\pm$ OSH	Ort $\pm$ OSH	Ort $\pm$ OSH	Ort $\pm$ OSH
GSH (mmol/g)	$2.43 \pm 0.17$	$2.77 \pm 0.13$	$1.84 \pm 0.15$ *	$2.45 \pm 0.12$ +
MDA (nmol/g)	$19.20 \pm 2.08$	$18.55 \pm 2.93$	$40.65 \pm 4.90$ **	$23.13 \pm 3.46$ +
MPO (U/g)	$13.35 \pm 1.25$	$11.18 \pm 1.32$	$43.15 \pm 5.40$ ***	$20.00 \pm 3.33$ +++
$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz (mmol/mg protein/h)	$3.63 \pm 0.56$	$3.38 \pm 0.31$	$1.65 \pm 0.18$ **	$3.20 \pm 0.34$ +
Luminol KI (rlu/mg)	$122 \pm 12$	$101 \pm 15$	$224 \pm 27$ **	$129 \pm 11$ ++
Lusigenin KI (rlu/mg)	$133 \pm 8$	$102 \pm 6$	$289 \pm 34$ ***	$176 \pm 15$ ++

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  kontrol grubuna göre,

+  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , +++  $p < 0.001$  MTX grubuna göre karşılaştırmalar.





**Şekil 4:** Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarında ince bağırsak dokusuna ait a) GSH ve b) MDA değerleri

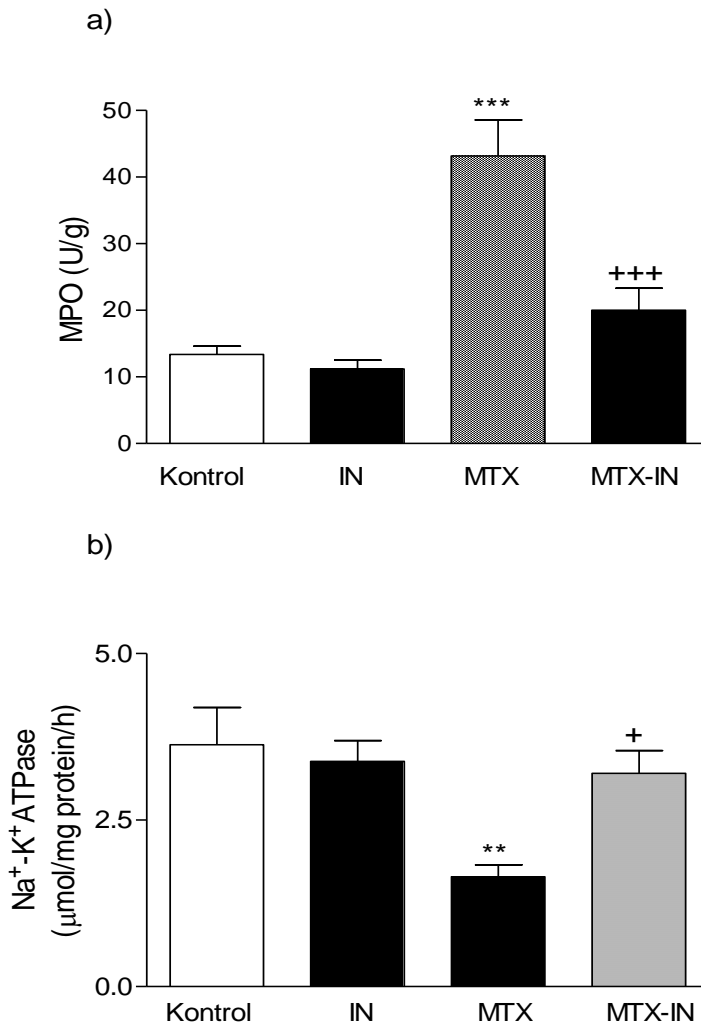
\* p<0.05, \*\* p<0.01 kontrol grubuna göre, + p<0.05 MTX grubuna göre karşılaştırmalar.

#### 4.4. Myeloperoksidaz (MPO) Düzeylerine Ait Sonuçlar (Tablo 4, Şekil 5)

İnce bağırsak dokusunda MPO düzeyleri, kontrol grubunda  $13.35 \pm 1.25$  U/g, IN grubunda  $11.18 \pm 1.32$  U/g, MTX grubunda  $43.15 \pm 5.40$  U/g ve MTX+IN grubunda ise  $20.0 \pm 3.33$  U/g olarak belirlenmiştir. MTX grubundaki MPO düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek ( $p < 0.001$ ); MTX + IN grubundaki MPO düzeyleri ise MTX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak düşük saptanmıştır ( $p < 0.001$ ).

#### 4.5. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz Düzeylerine Ait Sonuçlar (Tablo 4, Şekil 5)

İnce bağırsak dokusunda Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz düzeyleri, kontrol grubunda 3.63±0.56 mmol/mg protein/h, IN grubunda 3.38±0.31 mmol/mg protein/h, MTX grubunda 1.65±0.18 mmol/mg protein/h ve MTX+IN grubunda ise 3.20±0.34 mmol/mg protein/h olarak bulunmuştur. MTX grubundaki Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük (p<0.01); MTX + IN grubundaki Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz düzeyleri ise MTX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır (p<0.05).



**Şekil 5:** Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarında ince bağırsak dokusuna ait a) MPO ve b) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz aktiviteleri.

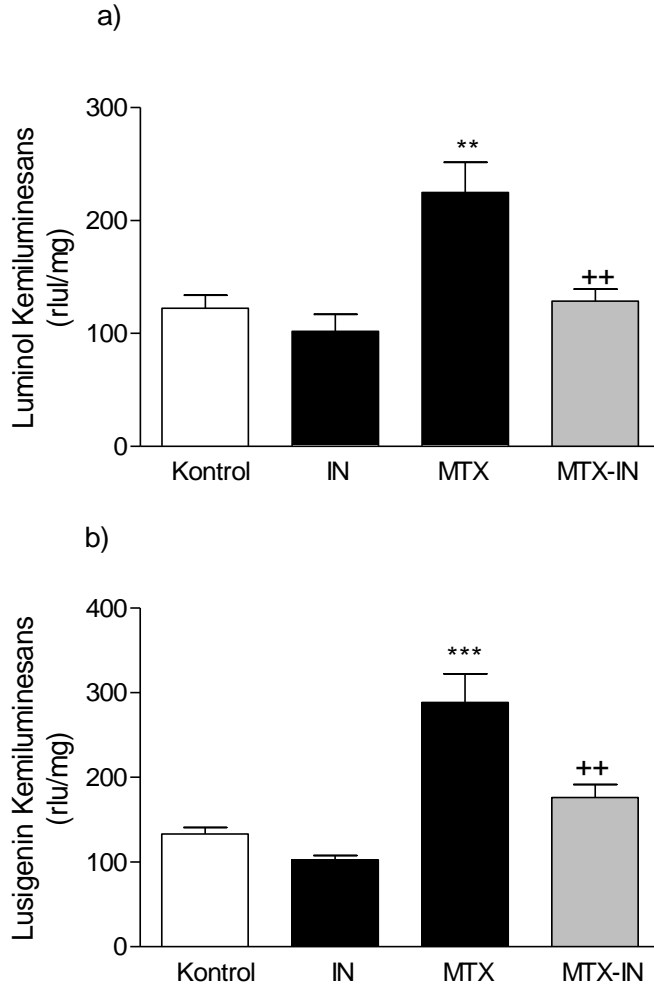
\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 kontrol grubuna göre, + p<0.05, +++ p<0.001 MTX grubuna göre karşılaştırmalar.

#### **4.6.Luminol Düzeylerine Ait Sonuçlar (Tablo 4, Şekil 6)**

İnce bağırsak dokusunda luminol düzeyleri, kontrol grubunda  $122\pm 12$  rlu/mg, IN grubunda  $101\pm 15$  rlu/mg, MTX grubunda  $224\pm 27$  rlu/mg ve MTX+IN grubunda ise  $129\pm 11$  rlu/mg olarak bulunmuştur. MTX grubundaki luminol düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek ( $p<0.01$ ); MTX + IN grubundaki luminol düzeyleri ise MTX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak daha düşük saptanmıştır ( $p<0.01$ ).

#### **4.7.Lusigenin Düzeylerine Ait Sonuçlar (Tablo 4, Şekil 6)**

İnce bağırsak dokusunda lusigenin düzeyleri, kontrol grubunda  $133\pm 8$  rlu/mg, IN grubunda  $102\pm 6$  rlu/mg, MTX grubunda  $289\pm 34$  rlu/mg ve MTX+IN grubunda ise  $176\pm 15$  rlu/mg olarak bulunmuştur. MTX grubundaki lusigenin düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek ( $p<0.001$ ); MTX+IN grubundaki lusigenin düzeyleri ise MTX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak daha düşük saptanmıştır ( $p<0.01$ ).

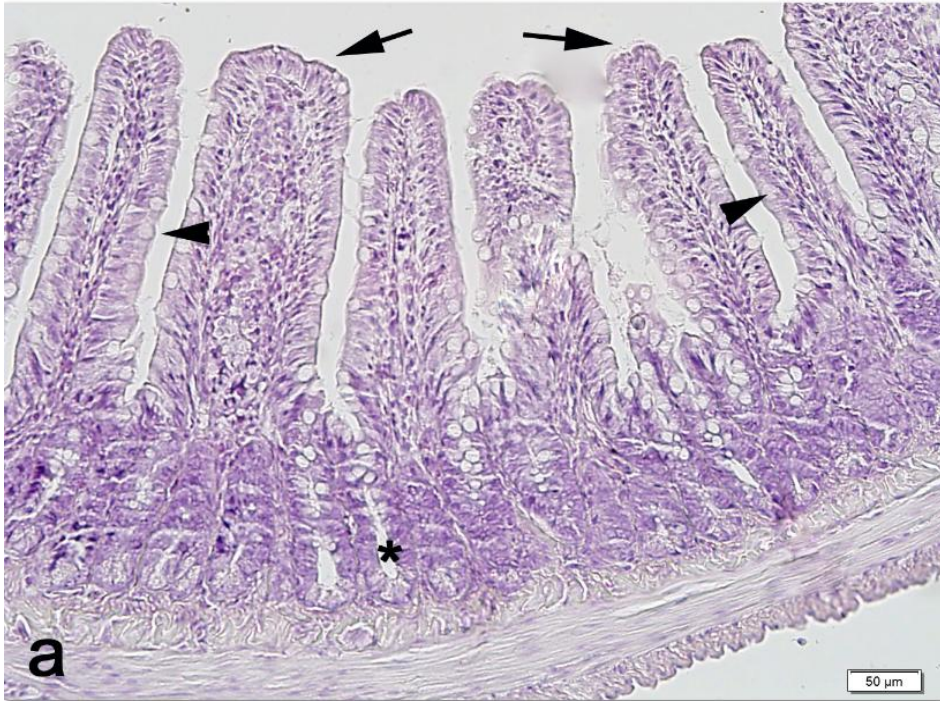


**Şekil 6:** Sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak mukozit modelinde, kontrol, IN, MTX ve MTX-IN gruplarında ince bağırsak dokusuna ait a) luminol ve b) lusigenin değerleri.

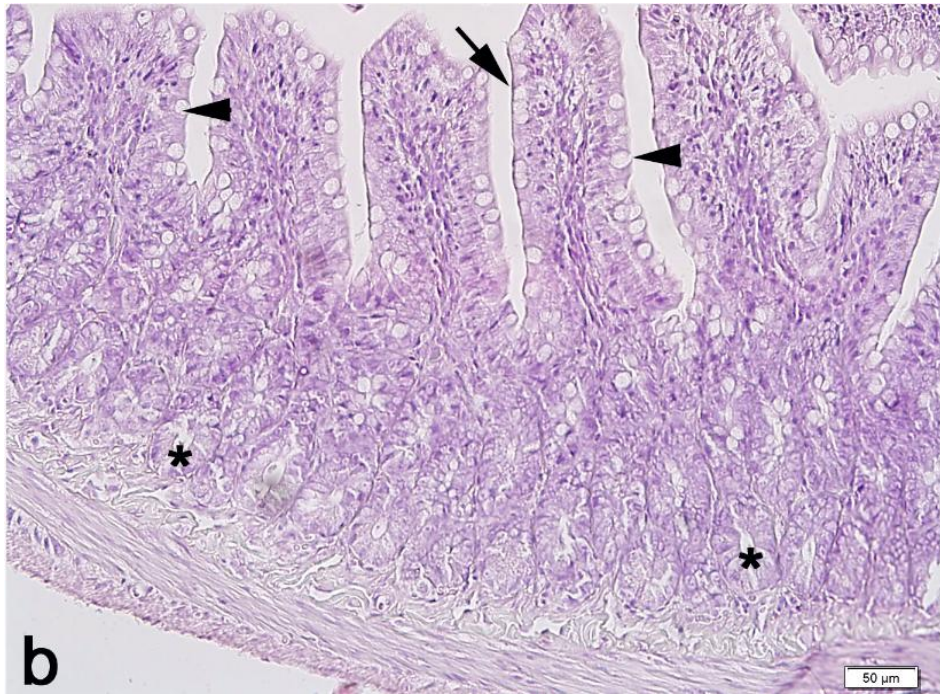
\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 kontrol grubuna göre, ++ p<0.01 MTX grubuna göre karşılaştırmalar.

#### 4.8.Histopatoloji Sonuçları

Histopatolojik incelemeler sonucunda, kontrol grubunda epitel yapısı, goblet hücreleri ve bez yapıları düzgün olarak izlenmiştir (Resim 4a). IN grubunda epitel yapısı, goblet hücreleri ve bez yapıları muntazam olarak düzenli görülmüştür (Resim 4b). MTX grubunda ise, ileri derecede epitelyum kaybı, lökosit artışı ve goblet hücrelerinde hipertrofi gözlenmiştir (Resim 4c). MTX + IN grubunda anlamlı olarak epitelyum rejenerasyonu, goblet hücre morfolojisinde düzelme ve mitoz artışı izlenmiştir (Resim 4d).

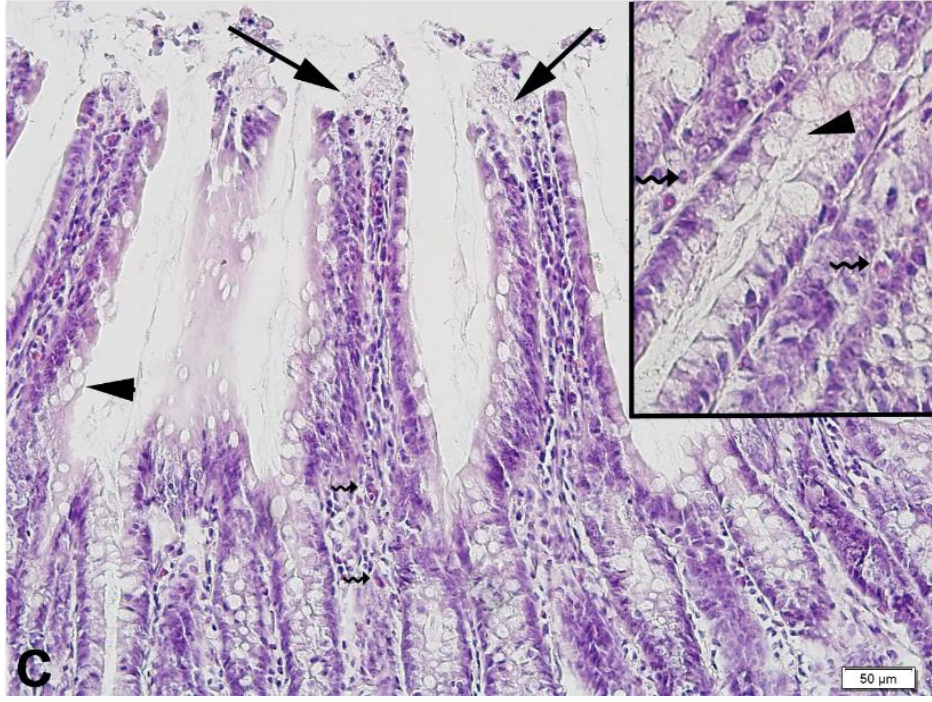


**Resim 4a:** Kontrol grubu, düzgün epitelyum (ok) goblet hücreleri (okbaşları) ve bez yapıları (\*)

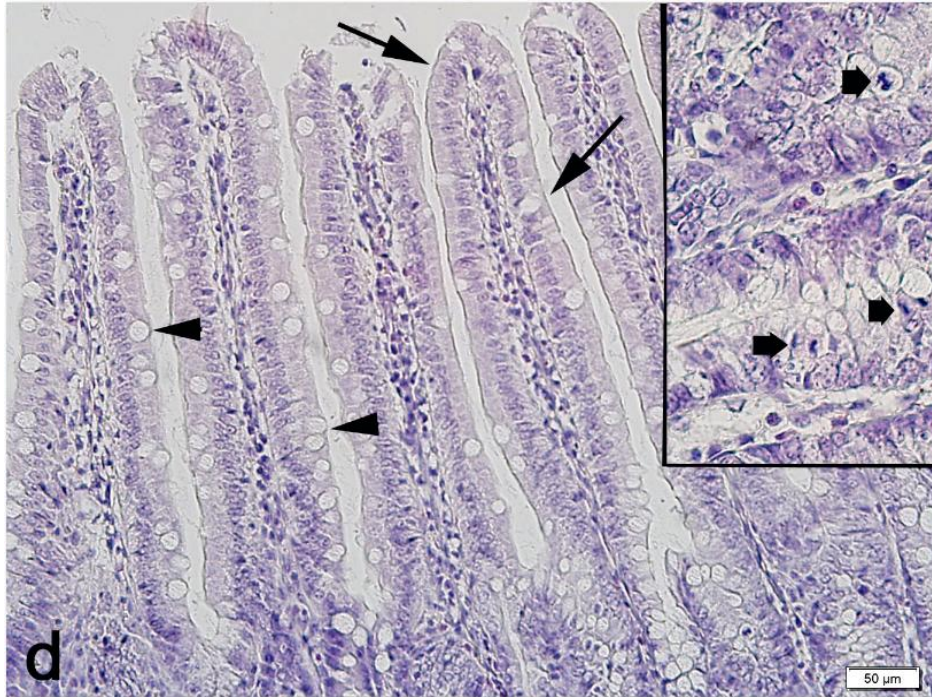


**Resim 4b:** IN grubu, muntazam yapılı goblet hücreleri (ok başları), epitelyum (ok) ve bez morfolojisi (\*)





**Resim 4c:** MTX grubu, ileri derecede dökülmüş epitelyum (ok) ve hipertrofik goblet hücreleri (ok başı) yanı sıra lökositler (kırık oklar)



**Resim 4d:** MTX+IN grubu, rejenere olmuş epitelyum yapısı (ok) ve goblet hücreleri (ok başları) yanı sıra aktif mitoz gözlenen hücreler (kalın oklar).

## 5.TARTIŞMA

İntestinal mukozit, kanser hastalarının tedavisinde kullanılan antimitotik ilaçların toksik yan etkilerinden birisidir. Bu toksik etki, kanser tedavisinde doz kısıtlamasına veya kesilmesine neden olabilir. Metotreksatın anoreksik etkisi ya da mukozitin neden olduğu azalmış besin tüketimi, bağırsak mukoza bütünlüğü üzerindeki harabiyeti artırmaktadır. Tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için patofizyolojik mekanizmaların iyi anlaşılması gerekir. Deneysel olarak kemoterapi nedenli mukozitlerde proteolitik yollardaki değişiklikler rapor edilmesine rağmen kemoterapötik ilaçlar veya besin alımındaki azalma nedeniyle oluşan gastrointestinal ağrıların nedeni tam olarak bilinmemektedir (98).

Kemoterapi kaynaklı gastrointestinal mukozitli hastalarda genellikle anoreksiyayla birlikte kilo kaybına ve malnütrisyonu neden olan ishal ve karın ağrısı görülmektedir (29,99). Bu komplikasyonlar intravenöz analjeziklerin kullanımını arttırmış, nütrisyonel problemlere ve hastanede kalış süresinin uzamasına neden olmuştur (40). Bunlara ek olarak, mukozitler ve mukozite bağlı gelişen komplikasyonlar kemoterapi dozlarının düşürülmesine yol açtığı için kanser hastalarının sağ kalım sürelerini kısaltmaktadır (100).

Mukozit histolojik olarak villüs atrofi, enterosit hasarı ve inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile karakterizedir (40,101,102). Bu histolojik değişiklikler, epitelyum fonksiyon kaybını işaret etmesine rağmen mukozit esnasında enterositlerin sindirim ve emilim kapasitesi henüz bilinmemektedir. Besinlerin emiliminde rol oynayan enzim ve taşıyıcı proteinlerde mRNA sinyallerinin azaldığı, bunun da yetersiz sindirim ve emilime neden olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (101,103,104). Ancak, mukozit esnasında sindirim ve emilim fonksiyonlarının incelendiği az sayıda çalışma bulunmaktadır. Eğer gastrointestinal mukozit esnasında bağırsak fonksiyonlarının nasıl olduğu bilirse uygun bir beslenme planı ile hastanın beslenme durumu iyileştirilebilir, iyileşmesi hızlandırılabilir ve/veya hastanın sağ kalım süresi arttırılabilir.

Metotreksat ile tedavi, kanser kemoterapisi uygulanan hastalardaki oral ve intestinal mukozitin sık bilinen bir sebebidir. Metotreksat toksisitesini, dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek intrasellüler folat düzeyini azaltarak ve DNA

sentezini bozarak gösterir (42). MTX'in sitotoksik etkisi kanser hücrelerine selektif değildir. Hızlı proliferasyon özelliği gösteren hemopoetik sistem, kemik iliği ve gastrointestinal sistem mukozası gibi normal dokularda MTX'e bağlı toksisite daha sık görülür. MTX'e bağlı major toksik etkilerden birisi de intestinal hasar ve enterokolittir. MTX'e bağlı ince bağırsak hasarı malabsorbsiyon ve ishale yol açar (105). Gibson ve arkadaşlarının (106) yapmış oldukları bir çalışma MTX'e bağlı GİS hücre kaybında apoptozisin etkili olduğunu desteklemektedir. SOR'lar MTX'e bağlı ince bağırsak hasarında temel rol oynamaktadır (107). MTX; SOR' ları inhibe etmek için kullanılan önemli sitozolik antioksidanlar olan nikotin amid adenozin difosfat (NADP) dehidrojenaz ve NADP malik enzimlerini inhibe eder. MTX glutatyon düzeylerini azaltarak enterositleri SOR' lara karşı daha hassas ve korumasız bırakır (108, 109). Land ve arkadaşları (110) MTX'e bağlı NF-κB aktivasyonunun intestinal epitelyal hücrelerde proinflamatuvar sitokin ve kemokin üretimine yol açarak intestinal mukozal hasar oluşturduğunu in vivo ve in vitro olarak saptamışlardır.

Son 30 yıldır yapılan klinik araştırmalar içeriğinde yüksek dozlarda spesifik immunonütrientler içeren formüllerle yapılan beslenme şekilleri, immunmodülatör, antiinflamatuvar, anabolik ve doku koruyucu etkileri sayesinde standart nütrisyon formülleri veya geleneksel tedavi yöntemleri ile kıyaslandığında hasara karşı konakçı cevabını iyileştirdiğini açıkça göstermiştir. Bazı araştırmacılar bu besin öğelerinin konakçı savunma mekanizmalarını iyileştirdiğini ve inflamatuvar cevabı modüle ettiğini yaptıkları çalışmalarda vurgulamışlardır (111-114). Bu deneysel çalışmada da metotreksat ile oluşturulmuş intestinal mukozit üzerine immunmodülatör olarak kullanılan arjinin, ω-3 yağ asitleri ve nükleotidlerle zenginleştirilmiş oral formülün (İmmunonütrisyon) etkileri araştırılmıştır.

İmmunonütrientlerden biri olan arjininin, serbest radikalleri vücuttan uzaklaştırırken yara iyileşmesini artırdığı, ince bağırsak mukozasında villus azalması, kript hasarı, inflamatuvar değişiklikler; hücre ölümü ve miyeloperoksidaz aktivitesi üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (7). Koppelman ve arkadaşlarının (66) yapmış oldukları çalışmada, omega 3 yağ asitlerinin, antiinflamatuvar ve antitrombotik etki yaparak doku hasarını önlediği, mukoza iyileşmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir. Diyet nükleotitleri, T hücresi, makrofaj ve enterositler gibi hızlı çoğalan hücrelerce kullanılarak immun fonksiyonu geliştirir ve infeksiyonlara direnci



artırır. Nükleotit desteği verilen yenidoğanlarda yapılan bir çalışmada bağırsak mukoza bütünlüğünün korunduğu ve mikrofloranın düzenlendiği görülmüştür. (67).

TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  makrofajlardan salınan önemli sitokinlerdir. Sitotoksik etkileri yanında inflamatuvar reaksiyon ve inflamasyonun regülasyonunda da önemli bir role sahiptirler. Nötrofiller; inflamasyonda, travmada serbest oksijen radikalleri ve bir takım lizozomal enzimler ile uyarı aldıklarında TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi sitokinler de salgılamaktadırlar (72). Logan ve arkadaşlarının (115) yaptıkları çalışmada MTX uygulanan sıçanlarda inflamatuvar cevap daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni olarak TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin, intestinal mukozitin amplifikasyon fazında bariyer fonksiyonlarının zayıflaması, epitel bütünlüğünün bozulması ve mukus salınımının değişmesinin fonksiyonel sonuçları olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada ise proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$  konsantrasyonu, MTX+IN, MTX ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, MTX uygulananlarda kontrol grubuna kıyasla ileri derecede yüksek saptanmış ( $p < 0.001$ ), bu yükseklik IN tedavisi eklenmesi ile MTX grubuna oranla anlamlı derecede önlenmiştir ( $p < 0.001$ ). Bu etki IN oral formülün proinflamatuvar sitokinlerin plazma seviyelerini azaltıcı etkisine bağlanabilir (105-108). Bu sonuçlar da doku hasarında tetikleyici rol oynayan nötrofillerin aktivasyon ve infiltrasyonunun, IN oral formül ile engellenerek inflamatuvar cevabın azaldığını göstermiştir. Buna ek olarak malnütrisyon, ince bağırsaklardan sitokin salınımına neden olabilir ve monositlerden IL-1 $\beta$  üretimini arttırabilir (116,117). Bu çalışmada, MTX verilen grupta IL-1 $\beta$  düzeylerinin arttığı ( $p < 0.001$ ), MTX+ IN verilen grupta bu artışın kontrol grubu düzeylerine indiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre IN oral formül, MTX tedavisi sonrası ortaya çıkan malnütrisyona bağlı sitokin üretimini azaltmıştır.

Birçok inflamatuvar hastalıkta ve doku hasarında reaktif oksijen radikalleri oluşmaktadır (77,78). Luminol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>, hipoklorit, peroksinitrit ve lipit peroksil radikalleri için kullanılan bir tekniktir, lusigenin ise süperoksit radikalleri için selektiftir (79). Yapılan literatür araştırmasında mukozit oluşturulmuş ince bağırsak dokusunda luminol ve lusigenin düzeylerinin çalışılmadığı saptanmıştır. Bu çalışmada, kemoluminesans yöntem kullanılarak jejenum dokusunda serbest oksijen radikal düzeyleri ölçülmüştür. MTX uygulamasında, jejenum dokusunda luminol düzeylerinin kontrol grubuna oranla anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir ( $p < 0.01$ ).

Luminol değerleri MTX+IN grubunda, MTX grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ( $p<0.01$ ). Jejenum dokusunda lusigenin düzeyleri, kontrol grubuna göre MTX uygulanan grupta yüksek bulunmuştur ( $p<0.001$ ). Bu artışın, IN oral formül uygulanan tedavi grubunda, MTX grubuna göre anlamlı olarak önlendiği grlmştir ( $p<0.01$ ). Tespit edilen luminol ve lusigenin değerleri, IN oral formül ile azalmış olduğundan, jejunal doku örneklerinde IN oral formülün antioksidan özellikler içerdiği saptanmıştır.

Glutasyon, oksidatif stresin ölçümünde kullanılan bir antioksidandır. Glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girip onları zararsız ürünlere çevirerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır (86). MTX tedavisi sonrası ortaya çıkan mukozit ve malnütrisyon, intestinal permeabilite artışı, inflamatuvar cevap, sıçan barsağında intestinal proteolizis ve GSH konsantrasyonunda azalma ile ilişkilidir (116,118-120). Bu alışmada, MTX grubundaki GSH düzeyleri, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Ayrıca, MTX+IN verilen grupta ise GSH düzeyleri, MTX uygulanan gruba göre anlamlı olarak artmıştır ( $p<0.05$ ). Bu sonuçla, IN oral formülün sıçan jejunal dokuda GSH konsantrasyonunu artırdığı, oksidatif hasara karşı sıçan barsağını koruduğu gösterilmiştir.

İnce bağırsakta myeloperoksidaz düzeyleri, nötrofil infiltrasyonu ve akut inflamasyonun göstergesidir (121). Nötrofillerden salınan MPO enzimi dokudaki hasarı artırır ve daha fazla radikal oluşumuna neden olur (83,84). Bu alışmada, MTX grubundaki MPO düzeyleri, kontrol grubuna göre oldukça yüksek bulunmuştur ( $p<0.001$ ). MTX+IN verilen grupta ise MPO düzeyleri, MTX uygulanan gruba göre anlamlı derecede azalmıştır ( $p<0.001$ ). MTX'e bağlı intestinal hasarda oksidatif mekanizmayı başlatan nötrofil aktivasyonu ve MPO düzeylerindeki artış IN oral formül verilmesi ile engellenmiştir.

Serbest radikaller organizma için fagositozda rol almak gibi faydalı işlevleri yanında, aşırı miktarda bulduklarında lipitler ve glikoproteinler gibi hücresel yapılar üzerine toksik etkiler oluştururlar (122,123). Lipitler bu hasara en duyarlı olan ve üzerinde řu ana dek en çok çalışılan bileşiklerdir (124-126). Poliansatüre yağ asitlerinin çift bağları ile reaksiyona giren bu zararlı reaktifler lipit hidroperoksitlerin oluşmasına yol açarlar (127). Poliansatüre yağ asitlerinin sekonder oksidasyon ürünü olması ve serbest radikal hasarıyla ilişkisi olduğu düşünülen pek çok hastalıkta

seviyelerinin yükseldiği bilindiğinden, MDA sık kullanılan oksidatif hasar belirteçlerindedir (128,129). MTX'e bağlı intestinal hasarda lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak malondialdehitin arttığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (130). Bu çalışmada da, MTX grubundaki MDA düzeyleri, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş (p<0.01) ve MTX+IN verilen grupta ise MDA düzeyleri, MTX uygulanan gruba göre önemli oranda azaldığı saptanmıştır (p<0.05). Çalışmamız, IN oral formülün, MTX'e bağlı intestinal hasarda önemli rol oynayan ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA artışını engellediğini göstermiştir.

Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> ATPaz enterositlerin basolateral membranında besinlerin emilimi için önemli sodyum ve potasyum gradyentini sağlayarak hücre yapısı ve fizyolojisinde anahtar rol oynayan fosfolipit bağımlı önemli bir membran enzimidir (131). MTX'e bağlı ince bağırsak hasarında ortaya çıkan SOR' lar membran Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> ATPaz aktivitesini inhibe etmektedir (88,89). Bu çalışmada, MTX grubunda belirgin olarak düşüş gösteren Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> ATPaz aktivitesi (p<0.01), MTX+IN verilen grupta anlamlı derecede önlenmiştir (p<0.05). Bu da IN oral formülün normal enterosit yapısı ve fizyolojisinin korunmasına yardımcı olduğunu göstermektedir.

Mukozit histolojik olarak villus atrofişi, enterosit hasarı ve inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile karakterizedir. Bu histolojik değişiklikler epitelyum fonksiyonunun kaybını işaret etmesine rağmen mukozit sırasında enterositlerin sindirim ve emilim kapasitesi henüz bilinmemektedir (40,101,102). Bizim çalışmamızda, MTX tedavisi uygulanan sıçanlarda, mukozitlerin tipik histolojik bulgularından olan villus körelmesi ile birlikte düzensiz hatta vakuolleşmiş enterositlerin varlığı gözlemlenmiştir. Goblet hücreleri hipertrofiye uğramış ve villusların tepelerinde birikmiştir. Önemli oranda epitelyum dökülmüş ve inflamatuvar hücrelerin villusların stromalarına akın ettiği tespit edilmiştir. Mukozitlerin bu karakteristik özellikleri diğer araştırmacılar tarafından da bulunmuştur (101-104,132). Sıçanlara IN oral formül verilmesi sonrası epitelyumun ve goblet hücrelerinin rejenere olduğu, villus yapısının düzeldiği ve enterositlerde mitoz artışının olduğu izlendi. IN oral formül, MTX ile indüklenmiş mukoza hasarında hücre çoğalmasını artırarak bağırsak hasarını tersine çevirmiş ve bağırsak yenilenmesini uyarımiştır.

## 6.SONUÇ ve ÖNERİLER

### Sonuçlar

Mukozit, malign hastalıkların tedavisinde, kemoterapiye bağlı doz kısıtlayıcı ya da tedaviyi kesici önemli bir yan etkidir. Bu sürecin sonunda hastalarda malnütrisyon gelişmekte, bununla birlikte morbidite ve mortalite de artmaktadır. Klinik olarak intestinal mukozit tanısı koymanın zorluğu nedeni ile bu çalışma sıçanlarda planlanmış olup mukozit üzerine immunonutrisyonel oral formülün etkileri incelenmiştir ve sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

1. Standart yem ve su ile beslenen sıçanlarda serum TNF- $\alpha$  düzeyi  $49.52 \pm 2.71$  pg/mL bulunmuştur. Bu düzey MTX verilen sıçanlarda  $71.95 \pm 3.92$  pg/mL' ye yükselmiştir ( $p < 0.001$ ). MTX'e IN eklenen grupta  $55.40 \pm 3.11$  pg/mL' ye seviyesine kadar düşmüştür ( $p < 0.001$ ).
2. Standart yem ve su ile beslenen sıçanlarda serum IL-1 $\beta$  düzeyleri  $357 \pm 22$  pg/mL saptanmıştır. MTX grubunda  $471 \pm 28$  pg/mL' ye yükselmiştir ( $p < 0.001$ ). MTX'e IN eklenen grupta ise  $356 \pm 11$  pg/mL olarak bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).
3. Standart yem ve su ile beslenen sıçanlarda ince bağırsak dokusu GSH düzeyleri  $2.43 \pm 0.17$  nmol/g olarak bulunmuştur. Bu düzey MTX verilen sıçanlarda  $1.84 \pm 0.15$  nmol/g' ye düşmüştür ( $p < 0.05$ ). MTX'e IN eklenen grupta ise  $2.45 \pm 0.12$  nmol/g' ye yükselmiştir ( $p < 0.05$ ).
4. Standart yem ve su ile beslenen sıçanlarda ince bağırsak dokusu MDA düzeyleri  $19.20 \pm 2.08$  nmol/g saptanmıştır. MTX grubunda  $40.65 \pm 4.90$  nmol/g 'ye yükselmiştir ( $p < 0.01$ ). MTX'e IN eklenen grupta ise  $23.13 \pm 3.46$  nmol/g olarak bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).
5. Standart yem ve su ile beslenen sıçanlarda ince bağırsak dokusu MPO düzeyi  $13.35 \pm 1.25$  U/g bulunmuştur. MTX verilen sıçanlarda  $43.15 \pm 5.40$  U/g'ye yükselmiştir ( $p < 0.001$ ). MTX'e IN eklenen grupta  $20.0 \pm 3.33$  U/g seviyesine kadar düşmüştür ( $p < 0.001$ ).
6. Standart yem ve su ile beslenen sıçanlarda ince bağırsak dokusu Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz düzeyleri  $3.63 \pm 0.56$  mmol/mg protein/h olarak bulunmuştur. Bu düzey MTX verilen sıçanlarda  $1.65 \pm 0.18$  mmol/mg protein/h'ye düşmüştür ( $p < 0.01$ ). MTX'e IN eklenen grupta ise  $3.20 \pm 0.34$  mmol/mg protein/h'ye yükselmiştir ( $p < 0.05$ ).

7. Standart yem ve su ile beslenen sıçanlarda ince bağırsak dokusu luminol düzeyi  $122 \pm 12$  rlu/mg bulunmuştur. MTX verilen grupta  $224 \pm 27$  rlu/mg' ye yükselmiştir ( $p < 0.01$ ). MTX'e IN eklenen grupta  $129 \pm 11$  rlu/mg' ye seviyesine kadar düşmüştür ( $p < 0.01$ ).
8. Standart yem ve su ile beslenen sıçanlarda ince bağırsak dokusu lusigenin düzeyi  $133 \pm 8$  rlu/mg bulunmuştur. Bu düzey MTX verilenlerde  $289 \pm 34$  rlu/mg' ye yükselmiştir ( $p < 0.001$ ). MTX'e IN eklenen grupta  $176 \pm 15$  rlu/mg' ye seviyesine kadar düşmüştür ( $p < 0.01$ ).
9. Histopatolojik olarak ince bağırsak dokusu standart yem ve su ile beslenen sıçanlarda epitel yapısı, goblet hücreleri ve bez yapıları düzgün olarak izlenmiştir. IN oral formül verilenlerde ise bu yapılar muntazam olarak görülmüştür. MTX verilen sıçanlarda ise ileri derecede epitelyum kaybı, lökosit artışı ve goblet hücrelerinde hipertrofi gözlenmiştir. MTX'e IN eklenen grupta ise anlamlı olarak epitelyum rejenerasyonu, goblet hücre morfolojisinde düzelme ve mitoz artışı izlenmiştir.
10. IN oral formül, MPO, luminol ve lusigenin düzeylerini düşürerek nötrofil infiltrasyonunu engellemiştir.
11. IN oral formül, MDA seviyelerini düşürerek lipit peroksidasyonunu önlemiştir.
12. IN oral formül, GSH ve  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPaz}$  düzeyleri üzerine olumlu etki göstererek ince bağırsak hasarı üzerinde koruyucu etki göstermiştir.
13. IN oral formül, epitelyum ve goblet hücrelerinde rejenerasyonu artırmış, villus yapısının düzelmesini ve enterositlerde mitoz artışını uyarmıştır.

Daha önce yapılmış çalışmalar incelendiğinde kemoterapiye sekonder gelişen intestinal mukozitin tedavisinde klinikte sıkça kullanılan ve immunonütrisyon ürünü olarak kabul edilen, arjinin, omega 3 ve diyet nükleotitlerinden zengin oral formülün etkinliğinin araştırılmadığı saptanmıştır. Çalışmamız ile deneysel olarak IN oral formülün intestinal mukozitte faydalı olduğu belirlenmiştir. Bunun daha sonraki deneysel ve klinik çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir ve literatüre katkısı açısından bir iltir. Doğru ve etkin bir tedavi planlaması için randomize, prospektif klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

## **Öneriler**

Gastrointestinal toksitite, malign hastalıkların tedavisinde ciddi bir komplikasyondur. Bu toksisiteler tedavide doz azaltılması, gecikmeler ve hatta tedavinin sonlandırılmasına neden olabilirler. Günümüzde malignite tedavisinde kombine rejimler, yüksek doz tedaviler ve hedeflenmiş tedavilerin uygulanması, hastalarda uzun dönem hastalıksız sağkalıma ve beraberinde genel sağkalımda düzelmelere neden olmaktadır. Bu nedenle;

1. Önleyici ve destek tedavilerinin artması, toksisitelerin erkenden tanınıp önlenmesi ve tedavilerindeki ilerlemeler günümüzde kanser tedavisindeki gelişmelere ve olumlu sonuçlara katkıda bulunacaktır.
2. IN oral formül kemoterapiye bağlı hasar sonrası bağırsak oksijenasyonunu ve bağırsak fonksiyonlarını artırarak ciddi mukoziti önleyebilir.
3. Bu ürünler, protein ve enerji kaynağı veya cerrahi sonrası baskılanan immün yanıtı düzenlemek için değil aynı zamanda kemoterapiye bağlı gelişen gastrointestinal toksisitelerin tedavisinde de kullanılabilir.

## 7.KAYNAKLAR

1. Duncan M, Grant G. Review article: oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther* 18: 853-874, 2003.
2. Niscola P, Romani C, Cupelli L. Mucositis in patients with hematologic malignancies: an overview. *Haematologica* 92: 222-231, 2007.
3. Kane D, Gogarty M, O'leary J. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis Rheum* 50: 3286-3295, 2004.
4. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit* 12: 274-278, 2006.
5. Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum* 27: 277-292, 1998.
6. Kayaalp, O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 7' inci baskı. Ankara, Güneş Kitabevi. Cilt 1, 41: 1035-1037, 1994.
7. Leitão RF, Brito GA, Oriá RB. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. *BMC Gastroenterol* 11:90, 2011.
8. Jahovic N, Sener G, Cevik H. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct* 22: 169-78, 2004.
9. Holzner PA, Kulemann B, Kuesters S. Impact of remote ischemic preconditioning on wound healing in small bowel anastomoses. *World J Gastroenterol* 17: 1308-16, 2011.
10. Parry RV, Ward SG. Protein arginine methylation: a new handle on T lymphocytes? *Trends Immunol* 31: 164-9, 2010.
11. Fan C, Zirpoli H, Qi K. N-3 fatty acids modulate adipose tissue inflammation and oxidative stress. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16: 124-32, 2013.
12. Hess JR, Greenberg NA. The role of nucleotides in the immune and gastrointestinal systems: potential clinical applications. *Nutr Clin Pract* 27: 281-94, 2012.
13. Keefe DM. Intestinal mucositis: mechanisms and management. *Curr Opin Oncol* 19: 323-7, 2007.

14. Stringer AM, Gibson RJ, Bowen JM. Chemotherapy-induced mucositis: the role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment. *J Support Oncol* 5: 259-267, 2007.
15. Mitchell EP. Gastrointestinal toxicity of chemotherapeutic agents. *Semin Oncol* 33: 106-120, 2006.
16. Lalla RV, Peterson DE. Treatment of mucositis, including new medications. *Cancer J* 12: 348-354, 2006.
17. Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol* 34: 39-43, 2006.
18. National Cancer Institute Common Terminology Criteri v3.0 (CTCAE). (<http://ctep.cancer.gov>). Erişim tarihi: 9/8/2006.
19. Keefe D, Peterson D, Schubert M. Developing evidence-based guidelines for the management of alimentary mucositis: processes and pitfalls. *Support Care Cancer* 14: 492-498, 2006.
20. Peterson DE, Bensadoun RJ, Roila F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO clinical recommendations. *Ann Oncol* 20: 174-7, 2009.
21. Benson AB, Ajani JA, Catalano RB. Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. *Clin Oncol* 22: 2918-2926, 2004.
22. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 309: 1094-104, 1983.
23. Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 11'inci baskı. Ankara, Hacettepe-Taş Yayıncılık. 1. Cilt , 317-343, 2005
24. Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* 76: 907-912, 1985.
25. Bram J, Allegra CJ, Fine RL. Effects of methotrexate on intracellular folate pools in purified myeloid precursor cells from normal bone marrow. *J Clin Invest* 79: 692-697, 1987.
26. Ersoy Y. Metotreksat ve diğer toksik ilaçlar. (Goksoy T, ed). Romatizmal hastalıkların tanı ve tedavisi, 1' inci baskı. İstanbul, Yüce Basımevi, 907-26, 2002.
27. Van Ede AE, Laan RFJM, Rood MJ. Effects of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatism* 44: 1515-24, 2001.



28. James R. O'Dell, MD. Methotrexate use in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin N Amer* 23: 779-96, 1997.
29. Fijlstra M, Rings E.H, Verkade H.J. Lactose maldigestion during methotrexate-induced gastrointestinal mucositis in a rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: 283–291, 2011.
30. Fijlstra M, Tissing WJ, Stellaard F. Reduced absorption of long-chain fatty acids during methotrexate-induced gastrointestinal mucositis in the rat. *Clin Nutr* 32: 452-9, 2013.
31. Weinblatt ME. Methotrexate. *Textbook of Rheumatology* (William NK, ed). Fourth Edition. Philadelphia, Vol. 2, 767-778, 1993.
32. Bruce N Cronstein, MD. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin N Amer* 23: 739-55, 1997.
33. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 46: 328-46, 2002.
34. Van Ede A E, Laan RFJM, De Abreu RA. Purine enzymes in patients with rheumatoid arthritis treated with metotrexate. *Ann Rheum Dis* 61: 1060-64, 2002.
35. Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs* 6: 187-195, 2005.
36. Devrim E, Cetin R, Kiliçoglu B. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail* 27: 771-773, 2005.
37. Uz E, Oktem F, Yilmaz HR. The activities of purinecatabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 277: 165-170, 2005.
38. Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stres. *Cell Biochem Funct* 16: 283-293, 1998.
39. Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol* 39: 1119-1127, 2004.
40. Sonis ST, Elting LS, Keefe D. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 100: 1995–2025, 2004.

41. Margolis S, Philips FS, Sternberg SS. The cytotoxicity of methotrexate in mouse small intestine in relation to inhibition of folic acid reductase and of DNA synthesis. *Cancer Res* 31: 2037–2046, 1971.
42. Carneiro-Filho BA, Lima IP, Cavalcante MC. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. *Dig Dis Sci* 49: 65–72, 2004.
43. Koning BA, Sluis M, Lindenbergh-Kortleve DJ. Methotrexate-induced mucositis in mucin 2-deficient mice. *J Cell Physiol* 210: 144–152, 2007.
44. Paris F, Fuks Z, Kang A. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293: 293–297, 2001.
45. Sonis ST, Peterson RL, Edwards LJ. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol* 36: 373–381, 2000.
46. Logan RM, Stringer AM, Bowen JM. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev* 33: 448–460, 2007.
47. Stringer AM. Interaction between host cells and microbes in chemotherapy-induced mucositis. *Nutrients* 29: 1488-99, 2013.
48. Braga M, Ljungqvist O, Soeters P. ESPEN guidelines on parenteral nutrition: surgery. *Clin Nutr* 28: 378- 386, 2009.
49. Uyar M. İmmunonütrisyön. *Klinik Nütrisyön Temel Kavramlar* (Korfalı G, ed). 3'üncü Baskı. İstanbul, Logos Yayıncılık. 177-182, 2004.
50. Uyar M. İmmüñiteyi etkileyen besinler: deneysel ve klinik veriler. *Klinik Nütrisyönun Temel Kavramları* (Güñdođdu H, ed). 4'üncü Baskı. Ankara, Bayt Yayıncılık. 299-308, 2013.
51. Kılıçturgay S. Kanser hastalarında nütrisyön desteği. *Klinik Nütrisyönun Temel Kavramları* (Güñdođdu H, ed). 4'üncü Baskı. Ankara, Bayt Yayıncılık. 573-582, 2013.
52. Evoy D, Lieberman MD, Fahey TJ 3rd, Daly JM. Immunonutrition: the role of arginine. *Nutrition* 14: 611-7, 1998.
53. Weitzberg E. L-arginine transport and sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand* 49: 434-6, 2005.
54. Engelman DT, Watanabe M, Maulik N. L-arginine reduces endothelial inflammation and myocardial stunning during ischemia/ reperfusion. *Ann Thorac Surg* 60: 1275-81, 1995.

55. Amin HJ, Zamora SA, McMillan DD. Arginine supplementation prevents necrotizing enterocolitis in the premature infant. *J Pediatr* 140: 425-31, 2002.
56. Lecleire S, Coeffier M, Leblond J. Modulation of nitric oxide and cytokines production by L-arginine in human gut mucosa. *Clin Nutr* 24: 353-9, 2005.
57. Efron DT, Barbul A. Arginine and immunonutrition: a reevaluation. *Nutrition* 16: 73-4, 2000.
58. Quirino IE, Correia MI, Cardoso VN. The impact of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. *Clin Nutr* 26: 335-40, 2007.
59. Jonker R, Engelen MP, Deutz NE. Role of specific dietary amino acids in clinical conditions. *Br J Nutr* 108: 139-48, 2012.
60. Alexander JW. Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids. *Nutrition* 14: 627-33, 1998.
61. Calder PC. N-3 fatty acids, inflammation, and immunity--relevance to postsurgical and critically ill patients. *Lipids* 39: 1147-61, 2004.
62. Fernandes G, Troyer DA, Jolly CA. The effects of dietary lipids on gene expression and apoptosis. *Proc Nutr Soc* 57: 543-50, 1998.
63. Field CJ, Johnson IR, Schley PD. Nutrients and their role in host resistance to infection. *Leukoc Biol* 71: 16-32, 2002.
64. Barber MD, Ross JA, Fearon KC. The anti-cachectic effect of fatty acids. *Proc Nutr Soc* 57: 571-6, 1998.
65. Zulfikaroglu B, Zulfikaroglu E, Ozmen MM. The effect of immunonutrition on bacterial translocation, and intestinal villus atrophy in experimental obstructive jaundice. *Clin Nutr* 22: 277-81, 2003.
66. Koppelman T, Pollak Y, Mogilner J. Reversal of severe methotrexate-induced intestinal damage using enteral n-3 fatty acids. *Br J Nutr* 109: 89-98, 2013.
67. Yu VY. Scientific rationale and benefits of nucleotide supplementation of infant formula. *J Paediatr Child Health* 38: 543-9, 2002.
68. Kulkarni AD, Rudolph FB, Van Buren CT. The role of dietary sources of nucleotides in immune function: a review. *J Nutr* 124: 1442-1446, 1994.
69. Yamauchi K, Adjei AA, Ameho CK. A nucleoside-nucleotide mixture and its components increase lymphoproliferative and delayed hypersensitivity responses in mice. *J Nutr* 126: 1571-7, 1996.

70. Grimble GK, Westwood OM. Nucleotides as immunomodulators in clinical nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4: 57, 2001.
71. Uyar M. İmmüneyi etkileyen nütrientler: klinik ve deneysel veriler. *Klinik Nütrisyon Temel Kavramlar* (Korfalı G, ed). 3'üncü Baskı. İstanbul, Logos Yayıncılık. 186-187, 2004.
72. Hillegass LM, Griswold DE, Brickson B. Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *J Pharmacol Methods* 24: 285-95, 1990.
73. Ait-Ali D, Turquier V, Tanguy Y. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  persistently activates nuclear factor- $\kappa$ B signaling through the type 2 TNF receptor in chromaffin cells: implications for long-term regulation of neuropeptide gene expression in inflammation. *Endocrinology* 149: 2840-2852, 2008.
74. Camussi G, Albano E, Tetta C. The molecular action of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Eur J Biochem* 202: 3-14, 1991.
75. Dinarello CA. Interleukin-1 and the effects of cyclooxygenase inhibitors on its biological activities. *Bull N Y Acad Med* 65: 80-92, 1989.
76. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue damage. *Laboratory Investigation* 4: 412-426, 1982.
77. Grisham MB, Volkmer C, Tso P. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* 101: 540-547, 1991.
78. Siems WG, Grune T, Werner A. Protective influence of oxypurinol on the trinitrobenzene sulfonic acid (TNB) model of inflammatory bowel disease in rats. *Cell Mol Biol* 38: 189-199, 1992.
79. Haklar G, Yüksel M, Yalçın AS. Chemiluminescence in the measurement of free radicals: theory and application on a tissue injury model. *Marmara Medical Journal* 11: 56-60, 1998.
80. Hendriks T, Walter J, Mastboom B. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Colon Rectum* 33: 891-901, 1990.
81. Akkus İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1'inci baskı. Konya, Mimoza Yayınları, 1-132, 1995.
82. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 222: 1-15, 1984.
83. Yılmaz HR, Uz E, Yucel N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Molecular Toxicology* 18: 234-238, 2004.

84. Akyüz C, Şehirli AO, Topaloğlu U. Protective effects of proanthocyanidin on cerulein-induced acute pancreatic inflammation in rats. *Gastroenterology Research 2*: 20-28, 2009.
85. Delogu G, Antonucci A, Moretti S. Oxidative stress and mitochondrial glutathione in human lymphocytes exposed to clinically relevant anesthetic drug concentrations. *Clin Anesth 16*: 189-194, 2004.
86. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicol 189*: 41-54, 2003.
87. Skou JC, Esmann M. The Na, K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr 24*: 249-61, 1992.
88. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischgmia/ reperfusion injury. *Eur J Pharmacol 426*: 1-10, 2001.
89. İlhan N, Halifeoglu I, Ozercan HI. Tissue malondialdehyde and adenosine triphosphatase level after experimental liver ischaemia-reperfusion damage. *Cell Biochem Funct 19*: 207-12, 2001.
90. Özyurt H, Özden SA, Çevik Ö. Investigation into the role of the cholinergic system in radiation-induced damage in the rat liver and ileum. *J Radiat Res 55*: 866-875, 2014.
91. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem 95*: 351-8, 1979.
92. Yagi K. Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal, and pancreatic diseases. *Adv Exp Med Biol 366*: 165-9, 1994.
93. Aykaç AG, Uysal M, Yalçın AS. The effect of cronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology 36*: 71- 76, 1985.
94. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem 193*:265-75, 1951.
95. Haklar G, Yüksel M, Yalçın AS. Chemiluminescence in the measurement of free radicals: theory and application on a tissue injury model. *Marmara Medical Journal 11*: 56-60, 1998.
96. Şehirli AÖ, Tatlıdede E, Yüksel M. Protective effects of alpha-lipoic acid against oxidative injury in tnbs-induced colitis. *Erciyes Medical Journal 31*: 15-26, 2009.

97. Gulgun M, Erdem O, Oztas E. Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol* 62:109-15, 2010.
98. Leblond J, Le Pessot F, Hubert-Buron A. Chemotherapy-induced mucositis is associated with changes in proteolytic pathways. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 219–228, 2008.
99. Keefe DM, Schubert MM, Elting LS. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer* 109: 820-31, 2007.
100. Elting LS, Cooksley C, Chambers M. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. *Cancer* 98: 1531–1539, 2003.
101. Taminiou JA, Gall DG, Hamilton JR. Response of the rat small intestine epithelium to methotrexate. *Gut* 21: 486–492, 1980.
102. Tooley KL, Howarth GS, Lynn KA. Oral ingestion of streptococcus thermophilus diminishes severity of small intestinal mucositis in methotrexate treated rats. *Cancer Biol Ther* 5: 593–600, 2006.
103. De Koning BA, Lindenbergh-Kortleve DJ, Pieters R. The effect of cytostatic drug treatment on intestine-specific transcription factors Cdx2, GATA-4 and HNF-1alpha in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 57: 801–810, 2006.
104. Verburg M, Renes IB, Van Nispen DJ. Specific responses in rat small intestinal epithelial mRNA expression and protein levels during chemotherapeutic damage and regeneration. *J Histochem Cytochem* 50: 1525– 1536, 2002.
105. Nagakubo J, Tomimatsu T, Kitajima M. Characteristics of transport of fluoresceinated methotrexate in rat small intestine. *Life Sci* 69: 739-47, 2001.
106. Gibson RJ, Bowen JM, Cummins AG. Relationship between dose of methotrexate, apoptosis, p53/p21 expression and intestinal crypt proliferation in the rat. *Clin Exp Med* 4: 188- 95, 2005.
107. Gao F, Horie T. A synthetic analog of prostaglandin E1 prevents the production of reactive oxygen species in the intestinal mucosa of methotrexate treated rats. *Life Sci* 71: 1091-9, 2002.
108. Cody V, Luft JR, Pangborn W. Understanding the role of Leu22 variants in methotrexate resistance: comparison of wild-type and Leu22Arg variant mouse and human dihydrofolate reductase ternary crystal complexes with methotrexate and NADPH. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61: 147-55, 2005.
109. Ter Borg EJ, Seldenrijk CA, Timmer R. Liver cirrhosis due to methotrexate in a patient with rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 49: 244-6, 1996.

110. Van't Land B, Blijlevens NM, Marteiijn J. Role of curcumin and the inhibition of nf-kappa $\beta$  in the onset of chemotherapy-induced mucosal barrier injury. *Leukemia* 18: 276-84, 2004.
111. Braga M, Vignali A, Gianotti L. Immune and nutritional effects of early enteral nutrition after major abdominal operations. *Eur J Surg* 162: 105-12, 1996.
112. Daly JM, Lieberman MD, Goldfine J. Enteral nutrition with supplemental arginine, RNA, and omega-3 fatty acids in patients after operation: immunologic, metabolic, and clinical outcome. *Surgery* 112: 56-67, 1992.
113. Kemen M, Senkal M, Homann HH. Early postoperative enteral nutrition with arginine-omega-3 fatty acids and ribonucleic acid-supplemented diet versus placebo in cancer patients: an immunologic evaluation of impact. *Crit Care Med* 23: 652-9, 1995.
114. Senkal M, Kemen M, Homann HH. Modulation of postoperative immune response by enteral nutrition with a diet enriched with arginine, RNA, and omega-3 fatty acids in patients with upper gastrointestinal cancer. *Eur J Surg* 161: 115-22, 1995.
115. Logan RM, Gibson RJ, Bowen JM. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol* 62: 33-41, 2008.
116. Lyoumi S, Tamion F, Petit J. Induction and modulation of acute-phase response by protein malnutrition in rats: comparative effect of systemic and localized inflammation on interleukin-6 and acute-phase protein synthesis. *J Nutr* 128: 166-174, 1998.
117. Cederholm T, Wretling B, Hellstrom K. Enhanced generation of interleukins 1 beta and 6 may contribute to the cachexia of chronic disease. *Am J Clin Nutr* 65: 876-882, 1997.
118. Belmonte L, Coeffier M, Le Pessot F. Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock. *World J Gastroenterol* 13: 2833-2840, 2007.
119. Samuels SE, Taillandier D, Arousseau E. Gastrointestinal tract protein synthesis and mRNA levels for proteolytic systems in adult fasted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 271: 232-238, 1996.
120. Welsh FK, Farmery SM, MacLennan K. Gut barrier function in malnourished patients. *Gut* 42: 396-401, 1998.
121. Howarth GS, Francis GL, Cool JC. Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats. *J Nutr* 126: 2519-2530, 1996.

122. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78: 547-81, 1998.
123. McCormick M, Denning GM, Reszka GM. Biological effects of menadione photochemistry. *Biochem J* 350: 797-804, 2000.
124. Marnett L. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 181-182: 219-22, 2002.
125. Ulusu NN, Sahilli M, Avcı A. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs. *Neurochem Res* 28: 815-23, 2003
126. Uchida K. 4-hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003; 569: 1-26.
127. Reddy RD, Yao JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostag Leukotr Ess* 55: 33-43, 1996.
128. Mateos R, Leumberri E, Ramos S. Determination of MDA by high performance liquid chromatography in serum and liver. *J Chromatogr* 827: 76-82, 2005.
129. Valko M, Leibfritz D, Moncol J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84, 2007.
130. Ciralik H, Bulbuloglu E, Cetinkaya A. Effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced small intestinal damage in rats. *Mt Sinai J Med* 73: 1086-92, 2006.
131. Persson J. Alcohol and the small intestine. *Scand J Gastroenterol* 26: 3-15, 1991.
132. Lindsay RJ, Geier MS, Yazbeck R. Orally administered emu oil decreases acute inflammation and alters selected small intestinal parameters in a rat model of mucositis. *Br J Nutr* 104:113–119, 2010.