



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2021; 35 (3): 151 - 157
http://www.fusabil.org

Ratlarda Metotreksat ile Oluşturulan Karaciğer ve Böbrek Hasarı Üzerine Eskuletin'in Etkileri

Mustafa CELLAT ^{1, a}
Tuncer KUTLU ^{2, b}

¹ Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı,
Hatay, TÜRKİYE

² Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı,
Hatay, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0003-2559-096X

^b ORCID: 0000-0002-8771-1256

Bu çalışmada metotreksat (MTX) ile ratlarda oluşturulan karaciğer ve böbrek hasarı üzerine Eskuletin'in etkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışma Grup 1 (Kontrol grubu), Grup 2 (MTX), Grup 3 (Eskuletin) ve Grup 4 (MTX+Eskuletin) olmak üzere toplam 4 gruptan oluştu. Grup 3 ve 4'deki ratlara 14 gün süre ile 100 mg/kg dozda eskuletin uygulandı. Ayrıca Grup 2 ve 4'deki ratlara denemenin 9. gününde 20 mg/kg dozda intraperitoneal olarak MTX enjekte edildi. MTX uygulamasından 5 gün sonra çalışma sonlandırıldı. Çalışma sonunda, MTX grubunda karaciğer ve böbrek dokusu malondialdehit (MDA) düzeylerinin arttığı, karaciğerde redukte glutatyon (GSH) düzeyinin azaldığı, her iki dokuda glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerinin ise önemli düzeyde azaldığı ve MTX uygulamasının bu dokularda oksidatif strese neden olduğu tespit edildi. Eskuletin ile tedavi edilen gruplarda karaciğer ve böbrek dokusu MDA seviyelerinin azaldığı, GSH-Px ve CAT aktivitelerinin arttığı belirlendi. Ayrıca eskuletin uygulamasının artan serum alanin transaminaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST) seviyelerini de azalttığı görüldü. Histopatolojik analizlerde ise MTX'in hem karaciğer hem böbrekte hidropik dejenerasyon, yangısal hücre infiltrasyonu gibi dejeneratif ve yangısal değişikliklere sebep olduğu; eskuletin uygulamasının bu lezyonları önemli miktarda azalttığı tespit edildi. Sonuç olarak eskuletinin, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri ile MTX'in sebep olduğu karaciğer ve böbrek hasarını önlediği veya minimize ettiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Eozinofilik nefritis, eskuletin, histopatoloji, metotreksat, oksidatif stres

Effects of Esculetin on the Methotrexate Induced Liver and Kidney Damage in Rats

In this study, it was aimed to investigate the effect of Esculetin on liver and kidney damage induced by methotrexate (MTX) in rats. Our study consisted of 4 groups: Group 1 (Control group), Group 2 (MTX), Group 3 (Esculetin) and Group 4 (MTX+Esculetin). Groups 3 and 4 received a dose of 100 mg / kg esculetin by orally during 14 days. In addition, groups 2 and 4 received MTX at a dose of 20 mg / kg intraperitoneally on the 9th day of the experiment. The study was terminated 5 days after the MTX application. Liver and kidney tissue MDA levels increased, GSH level and CAT and GSH-Px enzyme activities significantly decreased in MTX group and MTX administration caused oxidative stress in these tissues. Esculetin administration reduced the MDA level in liver and kidney tissues and increased the CAT and GSH-Px enzyme activities. In addition, esculetin administration decreased serum AST, ALT. At the histopathological examination, MTX caused degenerative and inflammatory changes such as hydropic degeneration and inflammatory cell infiltration in both liver and kidney. It was determined that esculetin significantly reduced these lesions. In conclusion, esculetin can prevent or minimize MTX induced liver and kidney damage due to its antioxidant and anti-inflammatory activities.

Key Words: Eosinophilic nephritis, esculetin, histopathology, methotrexate, oxidative stress

Giriş

Bir folik asit antagonisti ve immun baskılayıcı ilaç olan metotreksat (MTX), çeşitli inflamatuvar, otoimmün, romatolojik, onkolojik ve dermatolojik hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (1). MTX, dihidrofolat redüktazı inhibe ettiği için antifolat tipinde bir antimetabolit etkiye sahip olup; DNA, RNA ve proteinlerin sentezini kısıtlar (2-4). MTX, farklı rahatsızlıkların tedavisinde önemli bir yere sahip olmasına rağmen, hepatotoksisite ve nefrotoksisite gibi bazı dezavantajlara sahiptir (4-7). MTX'in hepatotoksik etkisinin tam mekanizması bilinmemekle birlikte oksidatif stres ve inflamasyona neden olduğu belirtilmektedir. Karaciğerde lipid peroksidasyon miktarını arttırmak ve antioksidan düzeyini azaltmak suretiyle oksidatif strese; histopatolojik olarak ta yağlı değişikliklerden fibrozise varan değişikliklere neden olduğu belirtilmektedir (4, 6, 8-11).

Ratlarda MTX'in böbrek tubullerini etkilemek suretiyle nefrotoksik etkisinin olduğu, kan üre nitrojen ve kreatinin düzeyleri ile böbrek dokusu oksidatif stres belirteçlerinde artışlara, antioksidan düzeylerinde ise azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (5). Ayrıca tubullerde dejenerasyon, nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi değişikliklere neden olduğu belirtilmektedir (5, 12). MTX'in dezavantajları ve yan etkilerini azaltmak için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (13).

Eskuletin (6,7-dihydroxycoumarin) araşidonat metabolizmasının lipoksijenaz ve siklooksijenaz yollarını inhibe eden bir antioksidan kumarin türevidir (14). Eskuletinin antioksidan, antiinflamatuvar, anajezik, antitümoral, immunomodülatör ve

Geliş Tarihi : 16.04.2021

Kabul Tarihi : 23.09.2021

Yazışma Adresi Correspondence

Mustafa CELLAT
Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı,
Hatay – TÜRKİYE

mcellat@mku.edu.tr

antihiperglisemik etkilerinin olduğu ifade edilmektedir (15, 16, 17, 18, 19). Yapmış olduğumuz literatür taramalarında MTX'in oluşturduğu karaciğer ve böbrek toksisitesi üzerine eskuletin'in etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmadı. Bu çalışmada ratlarda MTX ile oluşturulan deneysel toksisite modelinde eskuletin'in karaciğer ve böbrek üzerindeki olası koruyucu etkileri araştırıldı.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 15/12/2020 tarihli toplantısında almış olduğu 2020/07-5 numaralı izin kararı ile yapıldı.

Çalışmada Wistar Albino ırkı, 180-250 g ağırlığında dişi ratlar kullanıldı. Deneysel uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanım şartlarına (12 saat aydınlık-12 saat karanlık ve $21\pm 1^{\circ}\text{C}$) uygun olarak yürütüldü. Deneysel uygulamalar süresince ratlara standart ticari yem (pelet yem) ve musluk suyu ad-libitum olarak sağlandı. Ratlar her grupta 8 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Grup 1 ve Grup 2'deki ratlara 14 gün süre ile günde bir defa ve oral gavaj yöntemi kullanılarak 1 mL serum fizyolojik uygulaması yapıldı. Grup 3 ve Grup 4'e ise 14 gün süre ile günde bir defa ve oral gavaj yöntemi kullanılarak 1 mL serum fizyolojik içerisinde ve 100 mg/kg dozda eskuletin uygulaması yapıldı (20). Grup 2 ve Grup 4'deki ratlara denemenin 9. günü intraperitoneal olarak 20 mg/kg dozda ve bir defa MTX uygulandı (21). Ratlardan ketamin (60 mg/kg) + ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altında kan örnekleri alındı ve daha sonra dekapitasyon yöntemiyle ötanazi uygulandı. Son olarak karaciğer ve böbrek dokuları çıkarıldı; bu dokuların bir kısmı histopatolojik inceleme için %10'luk tamponlu formalinde tespit edildi. Geriye kalan doku örnekleri ise oksidatif stres parametre analizleri için derin dondurucuda (-80°C) saklandı.

Biyokimyasal Analizler

AST, ALT, Kreatinin ve Üre Düzeyleri: Serum tüplerine alınan kan örnekleri 5000 devirde ve 15 dakika santrifüj edildi ve kan serumları hazırlandı. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Merkez Laboratuvarında bulunan Gesan marka otomatik biyokimya analizatörü kullanılarak taze serum örneklerinde AST, ALT, kreatinin ve üre düzeyleri belirlendi.

MDA ve GSH Düzeyleri ile CAT ve GSH-Px Enzim Aktiviteleri: Derin dondurucudan (-80°C) çıkarılan karaciğer ve böbrek dokusu örneklerinde oksidatif hasar ve antioksidan aktivite durumunu ortaya koyabilmek için spektrofotometrik olarak malondialdehid (MDA) ve redükt glutatyon (GSH) düzeyleri ile katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitelerine bakıldı. Lipit peroksidasyonu ve antioksidan etkinlik için alınan doku örnekleri homojenize edildikten sonra analizler spektrofotometre yardımıyla gerçekleştirildi. Lipid peroksidasyonu seviyesi, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler konsantrasyonuna göre ölçüldü ve üretilen MDA miktarı, lipid peroksidasyonunun bir indeksi olarak kullanıldı. 532

nm'de MDA seviyesi protein gramı başına nanomol cinsinden ifade edildi (22). GSH düzeyi, Sedlak ve Lindsay (23) tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak ölçüldü. 412 nm'de GSH seviyesi protein gramı başına nanomol olarak ifade edildi. GSH-Px aktivitesi, Lawrence ve Burk (24) tarafından tanımlanan metoda göre belirlendi. 340 nm'de GSH-Px enzim aktivitesi, gram protein başına uluslararası birimler olarak ifade edildi. CAT aktivitesi, 240 nm'de hidrojen peroksit (H_2O_2) ayrışımının ölçülmesi ile belirlendi ve kg/protein olarak ifade edildi (25). Protein analizleri için Lowry (26) metodu kullanıldı.

Histopatolojik Analizler: Ötanazi sonrası %10'luk tamponlu formalinde tespit edilen böbrek ve karaciğer dokuları rutin yöntemlere göre alkol, ksilol serilerinden geçirildikten sonra parafine gömülerek 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler ksilolde deparafinize edilip; 100, 96, 80 ve 70'lik alkol serilerinden geçirildikten sonra Hematoksilen Eozin (HE) ile boyandı. Histopatolojik bulguların skorlaması şu kriterlere göre yapıldı:

Derece 0: Histopatolojik değişiklik %5'in altında;

Derece 1: Tüm alanın %5 ile %33'ü arasında meydana gelen hafif histopatolojik değişiklikler;

Derece 2: Tüm alanın %33 ile %66'sı arasındaki alanda meydana gelen orta derecede histopatolojik değişiklikler;

Derece 3: Tüm alanın %66'sından fazla alanda meydana gelen ağır histopatolojik değişiklikler (27, 28).

İstatistiksel Analizler: Çalışma sonunda elde edilen verilerde gruplara ait değerlerin normal dağılım gösterip göstermediklerini belirlemek için Shapiro-Wilk normallik analizi yapıldı ve testin sonucunda tüm parametrelerdeki değerlerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi. Grup ortalamalarını karşılaştırmak amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve gruplar arası farklılıkları belirlemek amacıyla da Tukey testi yapıldı. İstatistiksel değerlendirme IBM SPSS Statistics 23 paket programı kullanılarak yapıldı ve $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (21, 27).

Bulgular

Biyokimyasal Bulgular: Serum ALT, AST, üre ve kreatinin düzeyleri ile ilgili analiz sonuçları Tablo 1'de verildi. MTX uygulanan ratların serum AST ve ALT enzim seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki açıdan anlamlı derecede arttığı tespit edildi ($P:0.00$). Eskuletin tedavisinin serum AST ve ALT enzim seviyelerini kontrol grubuna yakın seviyelere düşürdüğü belirlendi ($P<0.001$). MTX uygulanan ratlarda serum üre düzeyinde hafif bir yükselmenin olduğu fakat bunun istatistiki açıdan önemli olmadığı görüldü. Serum kreatinin düzeylerinde gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bir farkın olmadığı belirlendi. Sadece eskuletin uygulanan gruptaki ratların serum AST ve ALT enzim seviyeleri ile üre düzeylerinde istatistiki açıdan önemli olmayan düzeyde azalmaların meydana geldiği tespit edildi.

Çalışma sonunda elde edilen karaciğer dokusu oksidatif stres ve antioksidan etkinlik parametreleri Tablo 2'de verildi. MTX uygulamasının karaciğer dokusu MDA seviyelerini önemli düzeyde arttırdığı (P:0.00), GSH düzeyi (P:0.012) ve GSH-Px (P:0.00) ve CAT (P:0.019) enzim aktivitelerini ise önemli oranda düşürdüğü belirlendi. Eskuletin tedavisinin ratlarda karaciğer dokusu MDA düzeyini önemli oranda düşürdüğü (P:0.00), GSH düzeyi (P:0.012) ile GSH-Px enzim aktivitesinde (P:0.00) ise istatistiki açıdan anlamlı artışlara neden olduğu görüldü. Ayrıca eskuletin tedavisinin karaciğer dokusu CAT enzim aktivitesi üzerinde etkili olmadığı belirlendi. Sadece eskuletin uygulanan ratların karaciğer dokusu MDA düzeyinde azalma olduğu, GSH düzeyinde artışların meydana geldiği fakat bu değişimlerin istatistiki açıdan önemsiz olduğu tespit edildi. Ayrıca sadece eskuletin uygulanan ratlarda karaciğer dokusu GSH-Px enzim aktivitesinin önemli derecede arttığı görüldü.

Böbrek dokusu oksidatif stres ve antioksidan etkinlik analiz sonuçları Tablo 3'de gösterildi. MTX grubu ratlarda böbrek dokusu MDA düzeyinde artış (P:0.00), GSH-Px (P:0.00) ve CAT (P:0.019) enzim aktivitelerinde ise azalmaların olduğu görüldü. Eskuletin tedavisinin MDA (P:0.00) düzeyini kontrol grubuna yakın değerlere indirdiği tespit edildi. Ayrıca eskuletin tedavisinin böbrek dokusu GSH-Px (P:0.00) ve CAT (P:0.019) enzim

aktivitelerinde istatistiki açıdan önemli yükselmelere neden olduğu belirlendi. Sonuç olarak MTX ile birlikte eskuletin uygulamasının MTX'in böbrek dokusunda meydana getirdiği oksidatif stresi baskıladığı ve böbrek hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edildi.

Histopatolojik Bulgular: Kontrol ve deneme gruplarında gözlenen histopatolojik bulguların skor grafikleri Şekil 1 ve 2'de verildi. Kontrol grubunda karaciğer ve böbrek dokuları normal histolojik yapısında gözlemlendi (Şekil 3a). MTX grubu ratlarda karaciğerde sinozoidlerin ve vena sentralislerin eritrositlerle dolu olduğu dikkat çekti. Hepatositler arasında Kupffer hücre proliferasyonu mevcuttu. Hepatositlerde nükleer pleomorfizm ve yağlı dejenerasyon ile hidropik dejenerasyona varan dejeneratif değişiklikler gözlemlendi (Şekil 3b). Portal bölgelerde fokal odaklar halinde perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü (Şekil 3c). Böbreklerde hiperemi ve tubul epitellerinde farklı şiddetlerde parankim ve hidropik dejenerasyonuna rastlandı (Şekil 4a). Korteks ve medulla intersitisyel bölgelerde mononükleer hücre infiltrasyonu ile birlikte pelvis renaliste lamina propria yoğun eozinofilik lökosit infiltrasyonu dikkat çekti (Şekil 4b, 4c, 4d). Eskuletin grubunda bazı karaciğer ve böbreklerde hafif hiperemi ve parankim dejenerasyonu dışında kontrol grubu gibi normal histolojik yapısında gözlemlendi.

Tablo 1. Serum ALT, AST, üre ve kreatinin seviyeleri (Veriler Ort ± SH şeklinde verilmiştir)

Grup/Parametre	ALT (U/L)	AST (U/L)	Üre (mg/dL)	Kreatinin (mg/dL)
Kontrol	52.200±3.65 ^{ab}	127.400±4.36 ^{ab}	73.666±1.28 ^{ab}	0.870±0.02
MTX	66.800±1.59 ^c	152.240±2.68 ^c	79.333±2.30 ^b	0.888±0.02
Eskuletin	45.000±3.25 ^a	114.660±2.86 ^a	66.833±1.95 ^a	0.836±0.03
MTX+Eskuletin	56.800±1.49 ^{bc}	134.033±3.38 ^b	74.166±1.10 ^b	0.823±0.04
P Değeri	0.00	0.00	0.001	0.572

Sütunlardaki farklı harflendirme (a, b, c) istatistiksel olarak anlamlı farklılık ifade etmektedir.

Tablo 2. Karaciğer dokusu MDA ve GSH seviyeleri ile GSH-Px ve CAT aktiviteleri (Veriler Ort ± SH şeklinde verilmiştir)

Grup/Parametre	MDA (nmol/g prot)	GSH (nmol/g prot)	GSH-Px (IU/g)	CAT (kg/prot)
Kontrol	4.991±0.33 ^a	1.055±0.09 ^b	245.045± 20.85 ^b	85.97±4.77 ^b
MTX	8.086±0.38 ^b	0.705±0.02 ^a	173.015± 3.13 ^a	67.316±3.98 ^a
Eskuletin	4.692±0.38 ^a	1.123±0.12 ^b	265.187± 9.70 ^c	77.065±3.85 ^{ab}
MTX+Eskuletin	4.959±0.27 ^a	1.051±0.058 ^b	218.655± 6.07 ^b	68.757±3.18 ^a
P Değeri	0.000	0.012	0.000	0.019

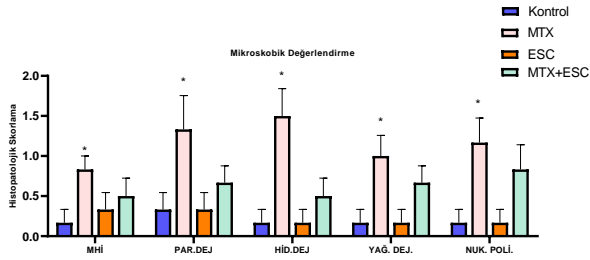
Sütunlardaki farklı harflendirme (a, b, c) istatistiksel olarak anlamlı farklılık ifade etmektedir.

Tablo 3. Böbrek dokusu MDA ve GSH seviyeleri ile GSH-Px ve CAT aktiviteleri (Veriler Ort ± SH şeklinde verilmiştir)

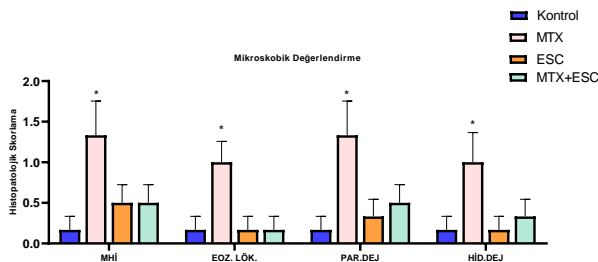
Grup/Parametre	MDA (nmol/g prot)	GSH (nmol/g prot)	GSH-Px (IU/g)	CAT (kg/prot)
Kontrol	5.644±0.16 ^{ab}	0.968±0.12	116.179±7.61 ^b	70.436±1.31 ^b
MTX	6.658±0.14 ^c	0.719±0.15	82.407±5.53 ^a	55.238±1.40 ^a
Eskuletin	4.795±0.34 ^a	1.137±0.12	135.012±9.58 ^b	72.386±2.61 ^c
MTX+Eskuletin	5.781±0.39 ^b	0.827±0.10	124.885±5.73 ^b	64.319±2.25 ^b
P Değeri	0.003	0.150	0.001	0.000

Sütunlardaki farklı harflendirme (a, b, c) istatistiksel olarak anlamlı farklılık ifade etmektedir.

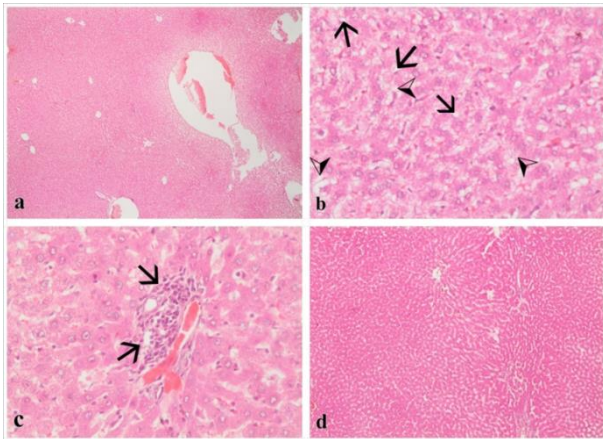
MTX+Eskuletin grubu, MTX grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer ve böbrek dokusunda histopatolojik lezyonların istatistiki olarak anlamlı şekilde ya hafiflediği ya da ortadan kalktığı gözlemlendi (Şekil 3d). Karaciğerde çok hafif yağlanma, parankim dejenerasyonu ve küçük fokal odaklar halinde perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu belirlendi. Hafif nükleer pleomorfizme rastlandı. Aynı grubun böbreklerinde de özellikle glomerüllerde hiperemi gözlemlendi (Şekil 4e). Tubul epitellerinde hafif parankim dejenerasyonu saptandı. İntersitisyel bölgelerde çok az mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenmekle birlikte pelvis renaliste eozinofilik lökosit infiltrasyonuna hiç rastlanmadı (Şekil 4f).



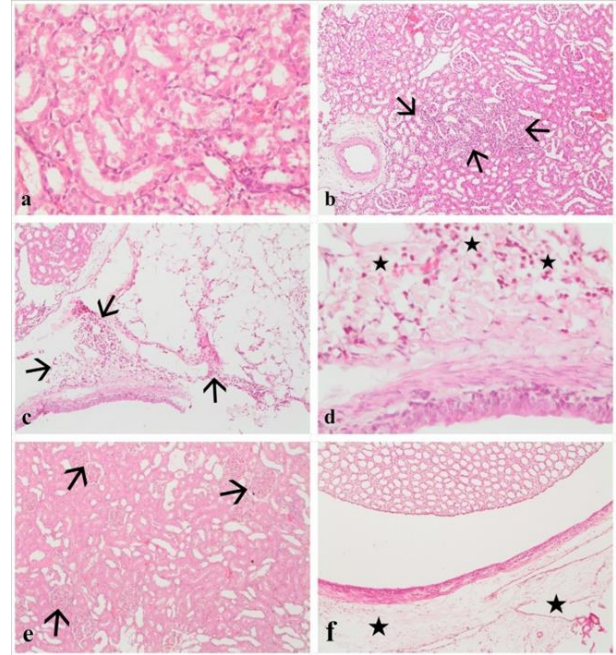
Şekil 1. Gruplara ait karaciğerde gözlenen histopatolojik bulgular. Grup içindeki işaretli (*) sütunlar istatistiksel olarak farklıdır (P<0.001)



Şekil 2. Gruplara ait böbreklerde gözlenen genel histopatolojik bulgular. Grup içindeki işaretli (*) sütunlar istatistiksel olarak farklıdır (P<0.001)



Şekil 3. Karaciğerde gözlenen histopatolojik bulgular. **a)** Kontrol grubu; karaciğerde normal histolojik yapı, 100x, HE. **b)** MTX grubu; Hepatositlerde yağlı dejenerasyon (oklar) ve hidropik dejenerasyona varan dejeneratif değişiklikler (ok başları), 400x, HE. **c)** MTX grubu; perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar), 400x, HE. **d)** MTX + Eskuletin grubu; karaciğerde normal histolojik yapı, 100x, HE.



Şekil 4: Böbreklerde gözlenen histopatolojik bulgular. **a)** MTX grubu; tubul epitellerinde dejeneratif değişiklikler, 400x, HE. **b)** MTX grubu; intersitisyel bölgelerde mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar), 100x, HE. **c)** MTX grubu; lamina propria eozinofilik lökosit infiltrasyonu (oklar), 100x, HE. **d)** MTX grubu; lamina propria eozinofilik lökosit infiltrasyonu (oklar), 400x, HE. **e)** MTX + Eskuletin grubu; glomerüllerde hiperemi (oklar), 100x, HE. **f)** MTX + Eskuletin grubu; lamina propria normal histolojik yapıda (yıldızlar), 100x, HE.

Tartışma

MTX kullanımının karaciğer ve böbrek üzerindeki olumsuz etkilerinin dokularda sebep olduğu oksidatif stres artışından kaynaklanabileceği ifade edilmektedir (4-7, 29). Doza ve uygulama süresine bağlı olarak MTX kullanımının karaciğerde yağlı değişikliklerden siroza varan değişikliklere neden olabileceği belirtilmektedir (2, 4, 6 10, 11, 30). Bu çalışmada MTX'in karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonu ve hidropik dejenerasyon gibi değişikliklere neden olduğu tespit edildi. Eskuletin uygulamasının MTX'in karaciğer dokusunda sebep olduğu bu yangısal ve dejeneratif değişiklikleri önemli derecede azalttığı ve karaciğerde koruyucu etki gösterdiği belirlendi. Lin ve ark. (31) eskuletinin karaciğerde oksidatif stresi baskıladığını; lökosit infiltrasyonu ve hepatosit dejenerasyonunu azalttığını saptamışlardır.

Karaciğer fonksiyonlarında görülen bozukluk MTX tedavisinde görülen en önemli komplikasyonlardan birisidir (32). AST, ALT gibi enzimler, karaciğer hasarının hassas belirteçleridir ve dolaşımdaki seviyelerinin tahmini, hepatoselüler hasarı belirtmek için yararlı bir nicel belirteçtir (33, 34). Yapılan bilimsel çalışmalarda (33, 34, 35) MTX uygulamasının karaciğer fonksiyonlarının belirteci olan karaciğer enzim aktivitelerinde artışlara yol açtığı bildirilmektedir. Yapılan çalışmada da MTX uygulaması serum AST ve ALT seviyelerini yükseltti. MTX'in sebep olduğu karaciğer

hasarının mekanizmasında intrasellüler MTX-PGs birikimi ve folat azalmasının sorumlu olabileceği düşünülmektedir (36). MTX uygulaması, sıçan karaciğerinde artan lipid peroksidasyonu ve NO seviyeleri ile gösterildiği gibi hem oksidatif hem de nitroztatif stresleri indüklemiştir. MTX uygulaması, rat karaciğerinde artan lipid peroksidasyonu sonucu oksidatif stresi indüklemektedir. Oksidatif stres kaynaklı hücre hasarı, birçok akut ve kronik hastalığın patogeneğinde önemli bir faktördür (37). Bu çalışmada da MTX uygulamasının karaciğer dokusu MDA düzeylerini önemli derecede arttırdığı tespit edildi. MTX'in mitokondriyal enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan mekanizmanın tükenmesi yoluyla karaciğer mitokondriyal hasarına dolaylı olarak etki ettiği bildirilmektedir (38) Mitokondri, oksidatif stres için birincil hücre içi hedeftir ve mitokondri hasar gördüğünde mitokondriyal ROS/RNS üretimi önemli ölçüde artarak oksidatif hasarı indükler (39) MTX ile indüklenen oksidatif stres, azalan GSH ve antioksidan enzimler GSH-Px ve CAT aktiviteleri ile daha da doğrulanmış oldu. Bu veriler önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir (35). Bu antioksidan savunmalar, oksidatif stres ve inflamasyona karşı korumada merkezi bir rol oynar (40).

Yapılan çalışmalarda (31, 41-43) deneysel karaciğer hasarında eskuletin uygulamasının MDA düzeylerini düşürdüğü, karaciğer dokusu GSH düzeyini arttırdığı ve bu suretle oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir. Bu çalışmada MTX+Eskuletin grubunda serum AST ve ALT düzeyleri ile karaciğer dokusu MDA düzeylerinde azalma olduğu, karaciğer dokusu GSH düzeyi ile GSH-Px enzim aktivitesinde önemli düzeylerde artışların görüldüğü tespit edildi. Elde edilen bulgular eskuletin'in serbest radikal süpürücü ve antioksidan etkilerinden kaynaklı olabileceğini göstermektedir.

Deneysel çalışmalarda (5, 12, 44, 45) MTX'in böbrek dokusunda yangısal hücre infiltrasyonu, glomeruloskleroz ve tubul hücrelerinde dejenerasyondan nekroza varan histopatolojik değişikliklere sebep olduğu

belirtilmektedir. Yapılan çalışmada MTX uygulamasının böbrek tubul epitellerinde dejenerasyona ve mononükleer hücre infiltrasyonuna neden olduğu belirlendi. Ancak bu çalışmada ilk defa MTX'in pelvis renaliste eozinofilik lökosit infiltrasyonuna neden olduğu gözlemlendi. Eozinofil lökosit infiltrasyonu ilaç reaksiyonlarında, özellikle antibiyotiklere bağlı olanlarda gözlenen bir durumdur (46). MTX, eskuletin ile birlikte uygulandığında ise böbrek dokularında sadece hafif parankim dejenerasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonu saptandı. Pelvis renaliste ise eozinofilik lökosit infiltrasyonuna rastlanmadı. Parabakaran ve ark. (47) eskuletininin karaciğer ve böbrek dokusunda antioksidan ve antiinflamatuvar etkiye sahip olduğunu belirtmektedirler. Yapılan çalışmada da eskuletinin mononükleer hücre infiltrasyonunu ve dejenerasyonu azalttığı tespit edildi. Ayrıca eozinofil lökosit infiltrasyonunu tamamen önlediği saptandı.

Yüksek ROS ürünleri daha önce farklı kemoterapötik kaynaklı nefrotoksisitede rapor edilmiştir. MTX'in ROS ürünlerinin seviyelerini doğrudan arttırmamasından kaynaklanan zararlı etkisi hücresel işlev bozukluğuna neden olabilir. Aşırı ROS üretimi, oksijen kaynaklı serbest radikallerin seviyelerini artırarak hücresel hasarı tetikleyebilir (48). Yapılan çalışmalarda (44, 45) MTX uygulamasının ROS artışını tetikleyerek böbrek dokusu MDA düzeylerini arttırdığı, böbrek dokusu GSH düzeyi ve SOD, CAT ve GSH-Px gibi enzim aktivitelerinde ise azalmaya neden olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada da MTX uygulamasının böbrek dokusu MDA düzeyini arttırdığı, GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerini ise istatistik açıdan anlamlı derecede düşürdüğü gözlemlendi. Eskuletin tedavisinin ise böbrek dokusu MDA düzeyini kontrol grubuna yakın değerlere indirdiği tespit edildi. Ayrıca GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerinde artışa neden olduğu belirlendi. Eskuletin'in antioksidan özelliğinin bu etkileri gösterdiği söylenebilir.

Sonuç olarak, eskuletin uygulamasının MTX'in karaciğer ve böbrek dokusunda meydana getirdiği hasara karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edildi.

Kaynaklar

1. Montasser AOS, Saleh H, Ahmed-Farid OA, Saad A, Marie MS. Protective effects of balanites aegyptiaca extract, melatonin and ursodeoxycholic acid against hepatotoxicity induced by methotrexate in male rats. *Asian Pac J Trop Med* 2017; 10: 557-565.
2. Yousefi G, Shafaatic A, Zarghic A, Foroutan SM. Pharmacokinetics and biodistribution of pegylated methotrexate after IV administration to mice. *Iran J Pharm Res* 2018; 17: 111-123.
3. Hagner N, Joerger M. Cancer chemotherapy: Targeting folic acid synthesis. *Cancer Manag Res* 2010; 2: 293-301.
4. Bath RK, Brar NK, Forouhar FA, Wu GY. A review of methotrexate-associated hepatotoxicity. *J Dig Dis* 2014; 15: 517-524.
5. Asci H, Ozmen O, Ellidag HY, et al. The impact of gallic acid on the methotrexate-induced kidney damage in rats. *J Food Drug Anal* 2017; 25: 890-897.
6. Ali N, Rashid S, Nafees S, et al. Protective effect of chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. *Chem Biol Interact* 2017; 272: 80-91.
7. Xu K, Cai YS, Lu SM, et al. Autophagy induction contributes to the resistance to methotrexate treatment in rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells through high mobility group box chromosomal protein 1. *Arthritis Res Ther* 2015; 17: 1-10.
8. Coleshowers CL, Oguntibeju OO, Ukpong M, Truter EJ. Effects of methotrexate on antioxidant enzyme status in a rodent model. *Med Tech SA* 2010; 24: 5-9.
9. Wiczter T, Dotson E, Tuten A, Phillips G, Maddocks K. Evaluation of incidence and risk factors for high-dose methotrexate-induced nephrotoxicity. *J Oncol Pharm Pract* 2016; 22: 430-436.

10. Lanse SB, Arnold GL, Gowans JD, Kaplan MM. Low incidence of hepatotoxicity associated with long-term, low-dose oral methotrexate in treatment of refractory psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 104-109.
11. Zachariae H. Liver biopsies and methotrexate: A time for reconsideration? *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 531-534.
12. Uzar E, Koyuncuoglu HR, Uz E, et al. The activities of antioxidant enzymes and the level of malondialdehyde in cerebellum of rats subjected to methotrexate: Protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 2006; 291: 63-68.
13. Nurgali K, Jagoe RT, Abalo R. Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? *Front Pharmacol* 2018; 9: 245.
14. Payá M, Halliwell B, Hoult JRS. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 205-214.
15. Witaicenis A, Seito LN, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylsculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chem Biol Interact* 2010; 186: 211-218.
16. Tubaro A, Del Negro P, Ragazzi E, et al. Anti-inflammatory and peripheral analgesic activity of esculetin in vivo. *Pharmacol Res Commun* 1988; 20: 83-85.
17. Kuo HC, Lee HJ, Hu CC, Shun HI, Tseng TH. Enhancement of esculetin on Taxol-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 210: 55-62.
18. Leung KN, Leung PY, Kong LP, Leung PK. Immunomodulatory effects of esculetin (6, 7-dihydroxycoumarin) on murine lymphocytes and peritoneal macrophages. *Cell Mol Immunol* 2005; 2: 181-188.
19. Prabakaran D, Ashokkumar N. Antihyperglycemic effect of esculetin modulated carbohydrate metabolic enzymes activities in streptozotocin induced diabetic rats. *J Funct Foods* 2012; 4: 776-783.
20. Kadakol A, Malek V, Goru SK, et al. Esculetin attenuates alterations in Ang II and acetylcholine mediated vascular reactivity associated with hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 461: 342-347.
21. Türk E, Güvenç M, Cellat M, et al. Zingerone protects liver and kidney tissues by preventing oxidative stress, inflammation, and apoptosis in methotrexate-treated rats *Drug and Chem Toxicol* 2020; 1-12.
22. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
23. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
24. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-958.
25. Aebi HI. Methods of enzymatic analysis. Catalase, 1983: 673-686.
26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
27. Güvenç M, Cellat M, Gökçek İ, et al. Nobiletin attenuates acetaminophen-induced hepatorenal toxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2020; 34: e22427.
28. Özkan H, Kutlu T, Yakın A, Özsoy ŞY. Molecular, biochemical and histopathological effects of long term low and high percentage fructose consumption on liver in rats. *Ankara Univ Vet Fak Derg* 2021: <https://doi.org/10.33988/auvfd.855124>.
29. Ohbayashi M, Kubota S, Kawase A, et al. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in methotrexate-induced pulmonary fibrosis. *J Toxicol Sci* 2014; 39: 319-330.
30. Mehrzadi S, Mehrabani M, Malayeri AR, et al. Ellagic acid as a potential antioxidant, alleviates methotrexate-induced hepatotoxicity in male rats. *Acta Chir Belg* 2019; 119: 69-77.
31. Lin WL, Wang CJ, Tsai YY, et al. Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by t-butyl hydroperoxide in rat liver. *Arch. Toxicol* 2000; 74: 467-472.
32. West SG. Methotrexate hepatotoxicity. *Rheum Dis Clin N Am* 1997; 23: 883-915.
33. Dolar E. Klinik Karaciğer Hastalıkları, 1.Baskı, Ankara: Nobel&Güneş Tıp Kitabevi, 2002: 133-146.
34. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji, 12. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 2013: 937-942.
35. Erdogan E, Ilgaz Y, Gurgor PN et al. Rutin ameliorates methotrexate induced hepatic injury in rats1. *Acta Cir Bras* 2015; 30: 778-784.
36. Kevat S, Ahern M, Hall P. Hepatotoxicity of methotrexate in rheumatic diseases. *Med Toxicol Adverse Drug Exp* 1988; 3: 197-208.
37. Mahmoud AM, Hussein OE, Hozayen WG, Abd el-Twab SM. Methotrexate hepatotoxicity is associated with oxidative stress, and down-regulation of PPAR γ and Nrf2: protective effect of 18 β -Glycyrrhetic acid. *Chem Biol Interact* 2017; 270: 59-72.
38. Kolli VK, Natarajan K, Isaac B, Selvakumar D, Abraham P. Mitochondrial dysfunction and respiratory chain defects in a rodent model of methotrexate-induced enteritis. *Hum Exp Toxicol* 2014; 33: 1051-1065.
39. Messarah M, Boumendjel A, Chouabia A et al. Influence of thyroid dysfunction on liver lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats. *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62: 301-310.
40. Circu ML, Aw TY. Redox biology of the intestine. *Free Radic Res* 2011; 45: 1245-1266.
41. Mohamed DI, Khairy E, Tawfek SS, Habib EK, Fetouh MA. Coenzyme Q10 attenuates lung and liver fibrosis via modulation of autophagy in methotrexate treated rat. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 892-901.
42. Abdelaziz AI, Mantawy EM, Gad AM, Fawzy HM, Azab SS. Activation of pCREB/Nrf-2 signaling mediates repositioning of liraglutide as hepato-protective for methotrexate-induced liver injury (MILI). *Food Chem Toxicol* 2019; 132: 110719.

43. Gilani AH, Janbaz KH, Shah BH. Esculetin prevents liver damage induced by paracetamol and CCl₄. *Pharmacol Res* 1998; 37: 31-35.
44. Hafez HM, Ibrahim MA, Ibrahim SA, et al. Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol* 2015; 768: 1-12.
45. Famurewa AC, Aja PM, Maduagwuna EK, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of virgin coconut oil supplementation abrogate acute chemotherapy oxidative nephrotoxicity induced by anticancer drug methotrexate in rats. *Biomed Pharmacother* 2017; 96: 905-911.
46. Gönülüşen G. Tubulointerstitial hastalıklar. In: Sarioğlu S. (Editör). *Nefropatoloji Böbrek Hastalıkları ve Böbrek Transplantasyon Patolojisi*. İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2012: 84-104.
47. Prabakaran D, Ashokkumar N. Protective effect of esculetin on hyperglycemia-mediated oxidative damage in the hepatic and renal tissues of experimental diabetic rats. *Biochimie* 2013; 95: 366-373.
48. Özen S, Akyol Ö, Iraz M, et al. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2004; 24: 27-35.