



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.  
2023; 37 (2): 107 - 113  
http://www.fusabil.org

### Metotreksatin Neden Olduğu Hepatorenal Hasarda Dimetilarginin Dimetilaminohidrolaz, Asimetrik Dimetilarginin ve Nitrik Oksit Sentaz Düzeyleri \*

Gözde ARKALI <sup>1,a</sup>  
Mesut AKSAKAL <sup>1,b</sup>

<sup>1</sup> Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Fizyoloji Ana Bilim Dalı  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>a</sup> ORCID: 0000-0002-0850-7557

<sup>b</sup> ORCID: 0000-0002-6230-2413

Bu çalışmada organizmada birçok komplikasyona neden olabilen metotreksat uygulamasının ratlarda serum, karaciğer ve böbrek dimetilarginin dimetilaminohidrolaz, asimetrik dimetilarginin ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz düzeylerine etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla 10-12 haftalık 250-300 g ağırlığında 20 adet Sprague Dawley ırkı erkek rat kullanıldı. Ratlar kontrol grubu ve metotreksat grubu olarak ikiye ayrıldı. Kontrol grubuna uygulama yapılmadı. Metotreksat grubuna tek doz 20 mg/kg/ intraperitoneal metotreksat uygulaması yapıldı. Onuncu günün sonunda ratlar dekapite edildi. Serumdan aspartat aminotransferaz, alkalen fosfataz, alanin aminotransferaz, üre, kreatinin düzeyleri; karaciğer, böbrek ve serumda dimetilarginin dimetilaminohidrolaz, asimetrik dimetilarginin ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz ile malondialdehit düzeyleri belirlendi. Metotreksat uygulanan grupta serum aspartat aminotransferaz (P<0.05), alkalen fosfataz, alanin aminotransferaz (P<0.01), üre ve kreatinin düzeylerindeki artış (P<0.05) ile serum (P<0.01), karaciğer ve böbrek malondialdehit düzeylerindeki artış (P<0.05) istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Metotreksat grubunda serum, karaciğer ve böbrek asimetrik dimetilarginin ve dimetilarginin dimetilaminohidrolaz-1 düzeyleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken (P>0.05), serum (P<0.05), karaciğer ve böbrek indüklenebilir nitrik oksit sentaz düzeylerindeki artış (P<0.01) istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Sonuç olarak metotreksatin neden olduğu karaciğer ve böbrek hasarında nitrik oksit sentaz üzerinde inhibe edici etkisi olan asimetrik dimetilarginin ve asimetrik dimetilargininin metabolizmasının da önemli etki gösteren dimetilarginin dimetilaminohidrolaz-1 düzeyleri ile ilgili anlamlı bir fark gözlenmedi.

**Anahtar Kelimeler:** Metotreksat, Asimetrik dimetilarginin, Dimetilarginin dimetilaminohidrolaz, Nitrik oksit sentaz, Hepatorenal hasar

#### Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase, Asymmetric Dimethylarginine and Nitric Oxide Synthase Levels in Hepatorenal Damage Caused by Methotrexate

The purpose of this study was to investigate the serum, liver and kidney dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1, asymmetric dimethylarginine and inducible nitric oxide synthase levels of rats induced methotrexate toxicity which causes severe complications in the organism. For this purpose, 10-12 weeks old, weighing 250-300 g, 20 Sprague Dawley male rats were used. Rats were divided into two groups as control and methotrexate. No treatment was applied to the control group. Methotrexate was administered single dose 20 mg/kg/ intraperitoneal to the animals in methotrexate group. The rats were decapitated at the end of 10 days. Serum aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, urea and creatinine levels, liver, kidney and serum dimethylarginine dimethylaminohydrolase, asymmetric dimethylarginine and inducible nitric oxide synthase and malondialdehyde levels were determined. After methotrexate administration, it was determined that significantly increased serum aspartate aminotransferase (P<0.05), alkaline phosphatase, alanine aminotransferase (P<0.01), urea and creatinine levels (P<0.05) and increased serum (P<0.01), liver and kidney malondialdehyde levels (P<0.05) in methotrexate group compared to the control group. While asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 levels in serum, liver and kidney tissue were not statistically significant (P>0.05), the increased in serum (P<0.05), liver and kidney inducible nitric oxide synthase levels (P<0.01) was statistically significant.

As a result, no significant difference was observed in asymmetric dimethylarginine, which has an inhibitory effect on nitric oxide synthase, and dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1, which has a significant effect on asymmetric dimethylarginine metabolism, in liver and kidney damage caused by methotrexate.

**Key Words:** Methotrexate, Asymmetric dimethylarginine, Dimethylarginine dimethylaminohydrolase, Nitric oxide synthase, Hepatorenal damage

#### Giriş

Metotreksat (MTX), antineoplastik bir ilaçtır ve etkisini folik asit antimetaboliti olarak göstermektedir (1). MTX oral veya intravenöz olarak; çoğunlukla kanser, sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit ve dermatomyozit gibi hastalıkların

Geliş Tarihi : 03.02.2023  
Kabul Tarihi : 31.03.2023

#### Yazışma Adresi Correspondence

Gözde ARKALI  
Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Fizyoloji Ana Bilim Dalı  
Elazığ – TÜRKİYE

garkali@firat.edu.tr

\* Bu çalışma; Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: VF.22.16).

tedavisinde kullanılmaktadır (2-5). MTX, karaciğer, böbrek, kemik iliği, gastrointestinal sistem, solunum sistemi, dermatolojik ve hematolojik sistemler üzerinde birçok toksik etkiye sahiptir (6-8).

Hepatorenal toksisite, MTX tedavisi esnasında oluşan en önemli komplikasyonlardan biridir (9). MTX'in oluşturduğu hepatorenal hasarının mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak karaciğerde intrasellüler poliglutamat türevlerinin (MTX-PGs) birikimi ve folat eksikliğinin sorumlu olabileceği düşünülmektedir (10, 11). MTX'in atılımının %90'dan fazlası böbrek tarafından olmaktadır. Yüksek doz MTX kullanımı sırasında akut renal yetmezlik gelişebilmekte ve serum kreatinin düzeyinde artış ile birlikte üremi ve hematüri görülebilmektedir (12-14). MTX'in en önemli komplikasyonlarından olan hepatotoksisite ve nefrotoksitenin oluşumunda rol alan fizyopatolojik mekanizmaların aydınlatılması bu komplikasyonlara karşı önlemlerin alınmasında önem arz etmektedir. MTX'in sebep olduğu hepatotoksisite ve nefrotoksisitede ile ilgili yapılan çalışmalarda genellikle oksidatif stresin neden olduğu doku hasarı üzerinde durulmuştur (15, 16).

Nitrik oksit sentaz (NOS), L-arjininden nitrik oksit (NO)'i sentezlemektedir. Nitrik oksit sentaz'ın indüklenebilir (iNOS), endotelial (eNOS) ve nöronal (nNOS) olmak üzere 3 izoformu bulunmaktadır. Fizyolojik koşullar da nitrik oksit, NOS enzimi tarafından devamlı bir şekilde üretilmekte ve endojen metilargininler tarafından da inhibe edilmektedir (17). Asimetrik dimetilarginin (ADMA) bir NOS inhibitörüdür. ADMA, NOS'un hücre içi miktarını, NOS'u inhibe ederek ve/veya NO'ün sentezlendiği L-arjininin hücre içine girişini yarışmalı olarak inhibe ederek azaltmaktadır (18). Karaciğer ve böbrekler ADMA'nın üretim ve atılımında önemli rol oynayan organlardır. ADMA metabolizmasından sorumlu esas enzim dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH)'dir. DDAH enzimi karaciğer başta olmak üzere, böbrekler, böbreküstü bezleri, beyin, pankreas ve testiste bulunmaktadır. DDAH aktivitesindeki azalmaya paralel olarak ADMA miktarı artış görülmektedir. ADMA seviyeleri üzerine DDAH'nın etkisi oldukça önemlidir. DDAH enzimi oksidatif strese karşı oldukça duyarlı bir enzimdir ve reaktif oksijen türlerindeki artış DDAH'ın inhibe olmasına ve miktarının azalmasına neden olmaktadır. DDAH enziminin inhibe olması sonucunda da ADMA düzeylerinde artış görülebilmektedir (19-22).

Birçok karaciğer hastalığında (hepatik disfonksiyon, böbrek yetmezliği, endotel disfonksiyon ve ateroskleroz riski) plazma ADMA konsantrasyonunda artış görüldüğü bildirilmiştir (17, 23-26). Böbrek yetmezliğinde de ADMA düzeylerinin arttığı ve yüksek konsantrasyondaki ADMA seviyesinin kardiyovasküler mortalite ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. ADMA aktivitesindeki artışın hepatorenal sendrom (HRS) oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir. Karaciğer sirozlu hastalarda, karaciğer ADMA düzeyinin artmasına paralel olarak NO düzeylerindeki azalmanın intrahepatik vasküler direnci etkileyerek karaciğer hasarını artırdığı bildirilmiştir ve mortalitede etkili bir faktör olarak öne çıkmıştır (27).

Bu bilgiler ışığında (23-27) ADMA konsantrasyonlarındaki artışın, NOS üretimini etkileyerek çoklu organ yetmezliği gelişiminde etkili bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmada MTX ile indüklenen hepatorenal hasarının patogenezinde serum, karaciğer ve böbrek ADMA, DDAH-1, iNOS düzeylerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

**Araştırma ve Yayın Etiği:** Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın "22.06.2022 tarihli ve 2022/11 nolu izni" ile yapılmıştır. Çalışmada, hayvan deneylerinde uygulanan kurallara ve hayvan refahına uyulmuştur.

**Çalışma Dizaynı:** Çalışmada 10-12 haftalık 250-300 gram ağırlığında 20 adet Sprague Dawley ırkı erkek rat kullanıldı. Deneysel uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakımı için uygun olan 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ve 24±3°C ortam koşullarında yürütüldü. Deneysel uygulamalar boyunca ratlara standart ticari rat yemi (pellet yem) ve musluk suyu ad libitum sağlandı. Çalışmada bir haftalık adaptasyon periyodunun ardından ratlar, kontrol grubu ve MTX grubu olarak 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (n=10) herhangi bir laboratuvar yapılmadı. MTX grubuna (n=10); MTX 20 mg/kg (13, 28) dozda serum fizyolojik içerisinde çözündürülerek intraperitoneal olarak tek doz uygulandı. Onuncu günün sonunda ratlar dekapite edilerek kan örnekleri alındı ve serumları ayrılarak analizlere kadar -80 °C'deki derin dondurucuda saklandı. Çalışma sonunda karaciğer ve böbrek dokuları alınarak soğuk PBS ile yıkandı, polietilen poşetlere sarılarak etiketlendi. Alınan doku numuneleri analizlere kadar -80 °C'deki derin dondurucuda saklandı. Elde edilen serumlar aligotlara ayrılarak, aspartat aminotransferaz (AST), alkalin fosfat (ALP), alanin aminotransferaz (ALT), üre, kreatin ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ile ADMA, DDAH-1 ve iNOS düzeyleri belirlendi. Alınan karaciğer ve böbrek dokularından MDA, ADMA, DDAH ve iNOS düzeyleri belirlendi.

**Malondialdehit ve Serum Biyokimya Analizleri:** Serum, karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri Placer ve ark. (29) tanımladığı spektrofotometrik yöntemle göre belirlendi. Alınan kan örneklerinden elde edilen serumlardan ALT, AST, ALP aktiviteleri ile üre, kreatin düzeylerinin analizleri hizmet alımı şeklinde Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkezi Laboratuvarı'nda yapıldı.

**ELISA Analizleri:** Serum, karaciğer ve böbrek ADMA, DDAH-1 ve iNOS konsantrasyonları rat spesifik ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü. ADMA, DDAH-1 ve iNOS konsantrasyonlarını belirlemek için, kitin içerisinde yer alan stok standarttan farklı konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı ve bu standartlardan elde edilen eğri kullanıldı.

**İstatistiksel Analizler:** İstatistiki değerlendirmeler için SPSS paket programı kullanıldı. Çalışma sonunda elde edilen veriler normallik analizi sonucunda normal

dağılım gösterdiler ve parametrik bir test olan Bağımsız t-testi kullanıldı. Çalışma verileri, gruplar için ortalama  $\pm$  standart sapma ( $X \pm SD$ ) olarak sunuldu. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $P < 0.05$  olarak kabul edildi.

## Bulgular

**Malondialdehit Düzeyleri ve Serum Biyokimyası:** Serum, karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri Tablo 1'de, serum ALP, AST, ALT, üre, kreatin düzeyleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında MTX grubunda serum ( $P < 0.01$ ), karaciğer ve böbrek MDA düzeylerinde artış ( $P < 0.05$ ), serum AST ( $P < 0.05$ ) ALP ( $P < 0.01$ ), ALT ( $P < 0.01$ ), üre, kreatin ( $P < 0.05$ ) düzeylerinde artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

**ADMA, DDAH-1, iNOS Düzeyleri:** Serum, karaciğer ve böbrek ADMA, DDAH-1 ve iNOS düzeyleri

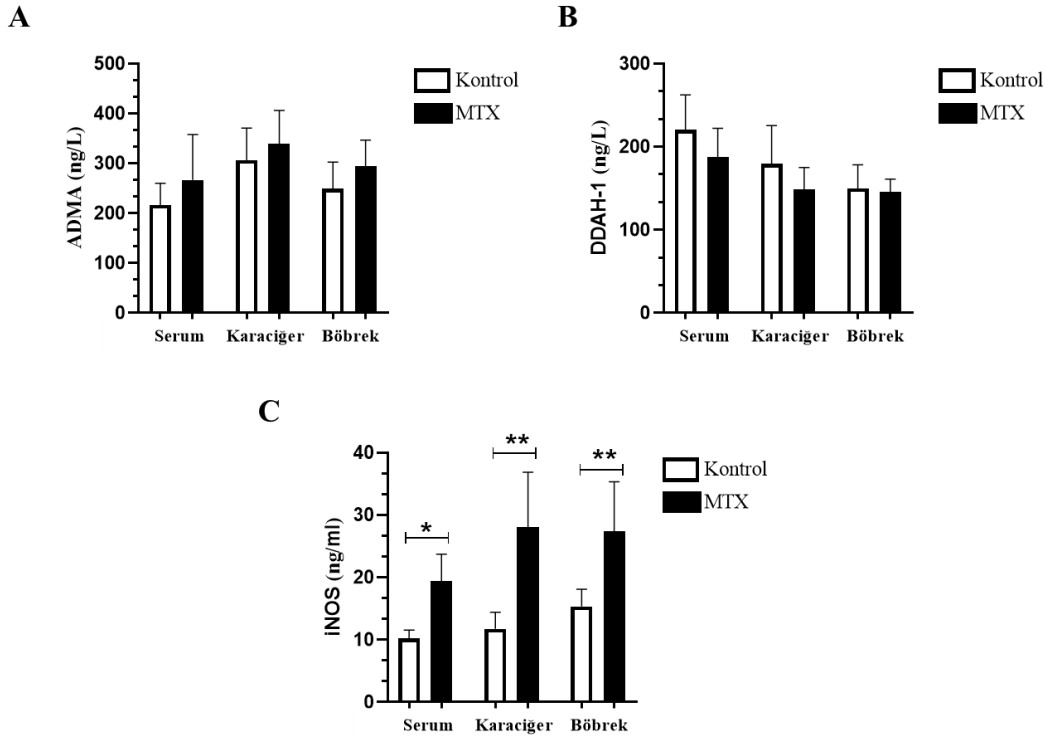
Şekil 1A, 1B ve 1C'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında MTX grubunda serum, karaciğer ve böbrek ADMA ile DDAH-1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ( $P > 0.05$ ), iNOS düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ).

**Tablo 1.** Serum, karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri ( $X \pm SD$ )

Gruplar	Serum (nmol/mL)	Karaciğer (nmol/g doku)	Böbrek (nmol/g doku)
Kontrol Grubu	2.85 $\pm$ 0.15	38.15 $\pm$ 6.30	40.70 $\pm$ 4.40
MTX Grubu	3.46 $\pm$ 0.32	54.06 $\pm$ 14.20	52.62 $\pm$ 12.55
Önemlilik	$P < 0.01$	$P < 0.05$	$P < 0.05$

**Tablo 2.** Serum ALT, AST, ALP aktiviteleri ile üre, kreatin düzeyleri ( $X \pm SD$ )

Gruplar	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	Kreatinin (mg/L)
Kontrol Grubu	203.25 $\pm$ 13.78	178.83 $\pm$ 20.04	47.00 $\pm$ 6.68	49.16 $\pm$ 4.74	0.21 $\pm$ 0.05
MTX Grubu	264.40 $\pm$ 46.99	200.96 $\pm$ 3.10	62.71 $\pm$ 9.34	61.00 $\pm$ 13.40	0.28 $\pm$ 0.03
Önemlilik	$P < 0.01$	$P < 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.05$	$P < 0.05$



**Şekil 1.** (A) Serum, karaciğer ve böbrek ADMA düzeyleri (B) Serum, karaciğer ve böbrek DDAH-1 düzeyleri (C) Serum, karaciğer ve böbrek iNOS düzeyleri. Veriler ortalama, standart sapma şeklinde sunulmuştur (\*;  $P < 0.05$ , \*\*;  $P < 0.01$ ).

## Tartışma

Bu çalışmada, 20 mg/kg/ intraperitoneal tek doz metotreksat uygulanan ratlarda, MTX'in karaciğer ve böbrek dokusunda lipid peroksidasyonunu artırarak oksidatif doku hasarına neden olduğu ayrıca oluşan hepatorenal hasarın serum AST, ALT, ALP, üre ve kreatin değerlerinin artması ile biyokimyasal olarak desteklenmesiyle ortaya konmuştur. MTX uygulamasının hepatorenal hasara neden olduğu bildirilmiş ve hepatorenal hasarda artan oksidatif stresin rolü üzerinde durulmuştur (30-34). Yapılan bu çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTX grubunda serum, karaciğer ve böbrek MDA düzeylerinde (Tablo 1) istatistiksel olarak anlamlı artış belirlenmiş olup MTX'in neden olduğu oksidatif stres ile ilgili yapılan birçok çalışma ile paralellik göstermektedir (30-34).

ALT, AST, ALP aktiviteleri ile üre ve kreatin düzeylerinin serumda artışı karaciğer ve böbrek hasarının en önemli göstergeleridir. Hepatositlerin yapısal bütünlüğünün hasar görmesi sonucu serum ALT, AST ve ALP enzim aktiviteleri yükselirken (35); böbrek hasarının sonucu kanda üre ve kreatin miktarı artmaktadır (36). MTX kullanımının, karaciğer biyokimyasal testlerinin anormalliği ile ilişkilendiği yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir (37, 38). Metotreksat kaynaklı serum ALT artış insidansı %14 olarak bildirilirken, AST artış insidansı %8 olarak bildirilmiştir (39). Metotreksat uygulamasının serum ALT, AST, ALP aktiviteleri ile üre ve kreatin düzeyleri üzerine etkileri ile ilgili literatürde farklı sonuçlar bildirilmektedir. Kürt (40) ratlara 20 mg/kg/intraperitoneal MTX uygulamasının, AST aktivitelerinde anlamlı bir fark olmazken ALT ve ALP aktivitelerinin MTX gruplarında kontrol grubuna kıyasla düşük düzeylerde olduğunu ifade etmiştir. Akbulut ve ark. (41) ise 20 mg/kg MTX uygulamasının sıçanlarda serum AST ve ALP aktivitelerini azaltırken, ALT aktivitesini artırdığını rapor etmişlerdir. Dalaklıoğlu ve ark. (37) yaptıkları bir çalışmada 7 mg/kg/gün dozda MTX'in 3 gün süreyle uygulamanın serum AST, ALT, ALP düzeylerini anlamlı derecede artırdığını bildirmişlerdir. Hafez ve ark. (38) yaptıkları bir çalışmada da 20 mg/kg/intraperitoneal MTX uygulamasının serum AST, ALT düzeylerini artırdığını ifade etmişlerdir. Deneysel çalışmalarda MTX'in böbrek dokusunda yangısal hücre infiltrasyonu, glomeruloskleroz ve tubul hücrelerinde dejenerasyondan nekroza varan histopatolojik değişikliklere sebep olduğu belirtilmektedir (38, 42). Cellat ve ark. (34) ratlarda MTX ile oluşturulan böbrek hasarında serum üre ve kreatin düzeylerinde anlamlı bir farklılık bildirmemişlerdir. Asci ve ark. (42) ise 20 mg/kg MTX uygulamasının sıçanlarda serum üre ve kreatin düzeylerini artırdığını bildirmişlerdir. Belirtilen çalışmalarda elde edilen bu farklı sonuçların, karaciğer ve böbrek dokusunun patolojik olarak etkilenme derecesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmada serum AST, ALP, ALT aktiviteleri ile üre ve kreatin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur (Tablo 2). Elde edilen sonuçlar Hafez ve ark. (38)'nin, Dalaklıoğlu ve ark. (37)'nin, Asci ve ark. (42)'nin, Bozkurt ve ark. (43)'nin ile Elsayy Abdullah ve ark. (44)'nin yaptıkları çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

ADMA, klinik tanıda biyobelirteç olarak kullanılmak için üzerinde çalışmaların artarak devam ettiği bir metillenmiş arjinin türevidir (18). Karaciğer ürettiği DDAH-1 aracılığıyla ADMA metabolizmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Çeşitli etiyojilere sahip karaciğer hastalıklarında (karaciğer sirozu, alkolik hepatit ve akut karaciğer yetmezliği gibi) plazma ADMA seviyeleri ile hepatik disfonksiyon derecesi arasında pozitif bir korelasyon gösterilmiştir. Böbrek, ADMA'nın metabolize edilmesinde rol aldığı için ADMA konsantrasyonu böbrek için de büyük önem taşımaktadır (45, 46). ADMA düzeylerinin böbrek hasarı ile ilişkisi ilk olarak Vallence ve ark. (22)'nin hemodiyaliz tedavisi gören hasta grubunda serum ADMA ve simetrik dimetilarginin (SDMA) düzeylerinde arttığını göstermesiyle ortaya konulmuştur. Bu yüzden karaciğer ve böbrek hasarında artan ADMA seviyelerinin rolü ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı giderek artmaktadır (56-61). Karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğunda artan ADMA konsantrasyonlarının muhtemel mekanizmaları arasında; şiddetli inflamasyon, oksidatif stres ve bozulmuş DDAH aktivitesi varsayılmaktadır (47-54).

Nitrik oksit, çok sayıda fizyolojik fonksiyonla ilişkili serbest bir radikaldir. Nitrik oksit, savunma sisteminde ve homeostazda önemli olmasına rağmen, aynı zamanda zararlı olarak kabul edilmekte ve çok çeşitli inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır (53). Karaciğer sinüzoidleri, kanı hepatik arterin terminal dallarından ve lobüllerin periferindeki portal venden alan ve santral venlere ileten düşük basınçlı vasküler kanallardır (54). Karaciğer sinüzoidal endotel hücrelerinde, vazodilatatör ve antitrombotik faktör olarak görev yapan NO için bir kaynak olarak, eNOS ekspresyonu gerçekleşmektedir. Normal düzeyde eNOS ekspresyonu yapan sağlıklı endotel hücreleri, karaciğer hücrelerini hasar veya yaralanmaya karşı korumaktadır (55, 56). Nitrik oksit sentazların indüklenebilir formu (iNOS), farklı sitokinlerin (TNF-a ve IFN-γ gibi), etkisiyle farklı patolojik koşullarda ifade edilmekte ve patolojik NO seviyelerine neden olmaktadır. Bu nedenle, iNOS'un aşırı ekspresyonu birçok akut hastalık durumuyla (septik şok, hemorajik şok, hepatit gibi) ilişkilendirilmiştir (57). Böbrekte NO'nun rolü ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, fizyolojik durumda NO'nun esas olarak eNOS gibi yapısal NOS'tan türetildiğini ve NO'nun glomerüler mikrosirkülasyonun düzenlenmesinde ve trombosit agregasyonu ve adezyonunun inhibisyonuna katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (58, 59). Böbrek dokusunda da endotelial, tübüler, mezenkimal hücrelerden ve infiltre olan mononükleer hücrelerden üretilen eNOS ve iNOS, patolojik seviyelerde NO üretiminden sorumludur. Endotelial NOS'un ekspresyon seviyelerindeki azalmanın renal kan akışındaki azalmadan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (60). Ewees ve ark. (61), Pekgöz ve ark. (62) ile El-Sheikh ve ark. (63) yaptıkları çalışmalarda 20 mg/kg/intraperitoneal tek doz MTX uygulamasının karaciğer eNOS düzeylerini düşürdüğünü, iNOS düzeylerini ise artırdığını bildirmişlerdir. Sahindokuyucu Kocasari ve ark. (64), ile Armağan ve ark. (30)'nin 20 mg/kg/intraperitoneal tek doz MTX uygulamasının böbrek dokusunda iNOS

düzeylerini arttırdığını bildirmişlerdir. Ancak MTX ile ilgili yapılan birçok çalışmada NOS seviyeleri üzerinde etkili olan ADMA ve ADMA metabolizmasında önemli rol oynayan DDAH düzeyleri ile ilgili kısıtlı sayıda literatür bilgi mevcuttur (40, 65). Bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışma da MTX'in neden olduğu hepatorenal hasarda ADMA, DDAH-1, iNOS düzeyleri araştırıldı ve serum, karaciğer, böbrek ADMA ve DDAH-1 düzeyinde istatistiksel olarak bir fark bulunmazken, iNOS düzeyinde anlamlı bir artış belirlendi (Şekil 1A,1B, 1C).

Chen ve ark. (65) ratlarda yaptıkları bir çalışmada, 100 mg/kg dozda intraperitoneal MTX uygulamasının neden olduğu uzamsal bellek bozukluğunda, periferik ve merkezi homosistein metabolizması ile plazma ve hipokampal ADMA düzeyindeki artışa paralel DDAH-1 düzeyindeki azalışın etkili olabileceğini ifade etmişlerdir. Kürt (40)'ün yapmış olduğu çalışmada ise 20 mg/kg tek doz intraperitoneal MTX uygulaması sonucu serum ADMA düzeylerinde bir fark olmadığı ifade edilmiştir. Yapılan bu çalışma Kürt'ün yapmış olduğu çalışma ile benzerlik gösterirken, Chen ve ark. (65)'nin yaptıkları çalışma ile farklılık göstermektedir. Bu farklı sonuçların MTX'in uygulama yolunun, uygulama dozunun ve metotreksat uygulamasından sonra geçen deneysel sürenin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmada serum, karaciğer ve böbrek iNOS düzeylerindeki artış anlamlı bulunurken, ADMA ve DDAH-1 düzeyinde anlamlı farklılık bulunmaması aşırı NO üretiminin, ADMA tarafından inhibe edilemeyen, inflamasyon tarafından aktive edilen iNOS

aktivasyonunun bir sonucu olabileceği düşünülmektedir. ADMA'nın NOS'un güçlü bir endojen inhibitörü olarak biyolojik rolü göz önüne alındığında, ADMA'daki bir artışın NO seviyelerinde bir düşüşe yol açması beklenecektir. Ancak Dragicevic ve ark. (66)'nin son dönem karaciğer hastalığı olan hastalarda ADMA ve nitrik oksit düzeylerinin kardiyovasküler risk ile ilişkisi üzerine yaptıkları bir çalışmada, karaciğer transplantasyonu bekleyen hastalarda artmış kardiyovasküler risk ile ADMA ve NO'nun bağımsız ilişkisi görülmektedir. Yapılan bu çalışma Dragicevic ve ark. (66)'nin yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir. Liu ve ark. (67) ise ADMA'nın eNOS'un fosforilasyonunu doğrudan azalttığını ve eNOS eksikliği olan farelerde vasküler hasarın şiddetlendiğini göstermişlerdir. Ayrıca yapılan son çalışmalar da, DDAH'nin hem ADMA'ya bağımlı hem de bağımsız mekanizmalar yoluyla NOS aktivitesini ve endotel fonksiyonunu düzenleyebileceğini düşündürmektedir (68).

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada 20 mg/kg tek doz intraperitoneal MTX'in neden olduğu hepatorenal hasarda serum, karaciğer ve böbrek ADMA ve DDAH-1 düzeylerinde bir fark bulunmazken, iNOS düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Metotreksatın neden olduğu komplikasyonlarda ADMA/DDAH/NOS yolağının farklı doz MTX uygulaması yapılarak farklı deney sürelerinde değerlendirilmesinin gerektiği düşünülmektedir.

## Kaynaklar

- Schilsky RL. Methotrexate: An effective agent for treating cancer and building careers. The polyglutamate era. *Stem Cells* 1996; 14(1): 29-32.
- Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, et al. Methotrexate in rheumatoid arthritis: An update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 27(5): 277-292.
- Kishi T, Tanaka Y, Ueda K. Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy. *Cancer* 2000; 89(4): 925-931.
- Norris RE, Adamson PC. Clinical potency of methotrexate, aminopterin, talotrexin and pemetrexed in childhood leukemias. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2010; 65(6): 1125-1130.
- Wenzel J, Braher S, Bauer R, et al. Efficacy and safety of methotrexate in recalcitrant cutaneous lupus erythematosus: Results of a retrospective study in 43 patients. *Br J Dermatol* 2005; 153(1): 157-162.
- Braun J. Optimal administration and dosage of methotrexate. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28 (5): 46-51.
- Jahovic, N, Sener G, Cevik H, et al. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct* 2004; 22(3): 169-178.
- Sener G, Eksioğlu Demiralp E, Cetiner M, et al. Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol* 2006; 542(1-3): 170-178.
- Jahovic N, Cevik H, Sehri AO, et al. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 2003; 34(4): 282-287.
- Kevat S, Ahern M, Hall P. Hepatotoxicity of methotrexate in rheumatic diseases. *Medical Toxicology and Adverse Drug Experience* 1988; 3(3): 197-208.
- Hempel L, Misselwitz J, Fleck C, et al. Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. *Med Pediatr Oncol* 2003; 40(6): 348-354.
- Izzedine H, Launay-Vacher V, Karie S, et al. Is low-dose methotrexate nephrotoxic? Case report and review of the literature. *Clin Nephrol* 2005; 64(4): 315-319.
- Asvadi I, Hajipour B, Asvadi A, et al. Protective effect of pentoxifylline in renal toxicity after methotrexate administration. *Euro Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15(9): 1003-1009.
- Ahmad S, Shen FH, Bleyer WA. Methotrexate-induced renal failure and ineffectiveness of peritoneal dialysis. *Arch Intern Med* 1978;138(7): 1146-1147.
- Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, et al. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct* 1998; 16(4): 283-293.
- Uraz S, Tahan V, Aygun C, et al. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci* 2008; 53(4): 1071-1077.

17. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the atherogene study. *Circ Res* 2005; 97(5): e53-e59.
18. Buğdaycı G, Serin E. Asimetrik Dimetilarginin (ADMA). *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 2: 36-41.
19. Trocha M, Merwid-Lad A, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine synthesis and degradation under physiological and pathological conditions. *Adv Clin Exp Med* 2010; 19(2): 233-243.
20. Sydow K, Münzel T. ADMA and oxidative stress. *Atherosclerosis Supplements* 2003; 4(4): 41-51.
21. Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. *Vascular Medicine* 2005; 10 (1): 73-81.
22. Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339(8793): 572-575.
23. Mookerjee RP, Malaki M, Davies NA, et al. Increasing dimethylarginine levels are associated with adverse clinical outcome in severe alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2007; 45(1): 62-71.
24. Mookerjee RP, Mehta G, Balasubramanian V, et al. Hepatic dimethylarginine-dimethylaminohydrolase1 is reduced in cirrhosis and is a target for therapy in portal hypertension. *J Hepatol* 2015; 62(2): 325-331.
25. Yilmaz MI, Sađlam M, Sönmez A, et al. Improving proteinuria, endothelial functions and asymmetric dimethylarginine levels in chronic kidney disease: Ramipril versus valsartan. *Blood Purif* 2007; 25(4): 327-335.
26. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2032-2037.
27. Keleş ME. Asymmetric dimethylarginine and its association with liver toxicity. *Nobel Medicus* 2017; 13(3): 16-21.
28. Yucel Y, Oguz E, Kocarslan S, et al. The effects of lycopene on methotrexate-induced liver injury in rats. *Bratisl Lek Listy* 2017; 118 (4): 212-216.
29. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malondialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1996; 16(2): 359-364.
30. Armagan I, Bayram D, Candan IA, et al. Effects of pentoxifylline and alpha lipoic acid on methotrexate-induced damage in liver and kidney of rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015; 39(3):1122-1131.
31. Dogra A, Gupta D, Bag S, et al. Glabridin ameliorates methotrexate-induced liver injury via attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Life Sciences* 2021; 278: 119583.
32. Vardi N, Parlakpınar H, Cetin A, et al. Protective effect of  $\beta$ -carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol Pathol* 2010; 38(4): 592-597.
33. Devrim E, Cetin R, Kilicoglu B, et al. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Renal Failure* 2005; 27(6): 771-773.
34. Abraham P, Kolli VK, Rabi S. Melatonin attenuates methotrexate-induced oxidative stress and renal damage in rat. *Cell Biochem Funct* 2010; 28(5): 426-433.
35. Ersoy O. Karaciğer Enzim Yükleklığının Deđerlendirilmesi *Ankara Medical Journal* 2012; 12(3): 129-135.
36. Abernethy VE, Lieberthal W. Acute renal failure in the critically ill patient. *Crit Care Clin* 2002;18(2): 203-222.
37. Dalaklıoglu S, Genc GE, Aksoy NH, et al. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol* 2013; 32(6): 662-671.
38. 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.
39. Berkowitz RS, Goldstein DP, Bernstein MR. Ten year's experience with methotrexate and folinic acid as primary therapy for gestational trophoblastic disease. *Gynecol Oncol* 1986; 23(1): 111-118.
40. Kürt E. Ratlarda Metotreksat ile Oluşturulan Hepatotoksisite Üzerine Silibininin Etkisinin Deđerlendirilmesi. *Uzmanlık Tezi, Sakarya, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı*, 2018.
41. Akbulut S, Elbe H, Eris C, et al. Cytoprotective effects of amifostine, ascorbic acid and N-acetylcysteine against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *World J Gastroenterol* 2014; 20(29): 10158-10165.
42. 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(4): 890-897.
43. Bozkurt M, Bodakci MN, Turku G, et al. Protective effects of carvedilol against methotrexate-induced liver toxicity in rats. *Acta Chir Belg* 2014; 114(6): 404-409.
44. Elsayy H, Alzahrani AM, Alfwaaires M, et al. Nephroprotective effect of naringin in methotrexate induced renal toxicity in male rats. *Biomed Pharmacother* 2021; 143: 112180.
45. Strobel J, Mieth M, Endress B, et al. Interaction of the cardiovascular risk marker asymmetric dimethylarginine (ADMA) with the human cationic amino acid transporter, (CAT<sub>1</sub>). *J Mol Cell Cardiol* 2012; 53(3): 392-400.
46. De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 2009; 15(4): RA91-101.
47. Lluch P, Torondel B, Medina P, et al. Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2004; 41(1): 55-59.
48. Mookerjee RP, Dalton RN, Davies NA, et al. Inflammation is an important determinant of levels of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine (ADMA) in acute liver failure. *Liver Transpl* 2007; 13(3): 400-405.
49. Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MPC, et al. Elevation of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in patients

- developing hepatic failure after major hepatectomy. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 2004; 28(6): 382-387.
50. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme. N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989; 264(17):10205-10209.
  51. Fleck C, Schweitzer F, Karge E, et al. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin Chim Acta* 2003; 336(1-2): 1-12.
  52. Ferrigno A, Pasqua LGD, Berardo C, et al. Liver plays a central role in asymmetric dimethylarginine-mediated organ injury. *World J Gastroenterol* 2015; 21(17): 5131-5137.
  53. Liew FY. Nitric oxide in infectious and autoimmune diseases. *Ciba Found Symp* 1995;195: 234-239.
  54. Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1995; 16(3): 128-130.
  55. Wisse E, De Zanger RB, Jacobs R, et al. Scanning electron microscope observations on the structure of portal veins, sinusoids and central veins in rat liver. *Scan Electron Microsc* 1983; (Pt 3): 1441-1452.
  56. De Castele MV, Van Pelt JF, Nevens F, et al. Low NO bioavailability in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rat livers might result from low NO synthesis combined with decreased superoxide dismutase activity allowing superoxide-mediated NO breakdown: a comparison of two portal hypertensive rat models with healthy controls. *Comp Hepatol* 2003; 2(1):2.
  57. Sass G, Koerber K, Bang R, et al. Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice. *J Clin Invest* 2001;107(4): 439-447.
  58. Raji L, Baylis C. Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int* 1995;48(1):20-32.
  59. Pfeilschifter J, Kunz D, Mühl H. Nitric oxide: An inflammatory mediator of glomerular mesangial cells. *Nephron* 1993; 64(4): 518-525.
  60. Bae EH, Lee J, Ma SK, et al. Alpha-lipoic acid prevents cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(9): 2692-2700.
  61. Ewees MG, M Abdelghany TM, Abdel-Aziz AH, et al. Enoxaparin prevents fibrin accumulation in liver tissues and attenuates methotrexate-induced liver injury in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2019; 392(5): 623-631.
  62. Pekgöz S, Asci H, Erzurumlu Y, et al. Nebivolol alleviates liver damage caused by methotrexate via AKT<sub>1</sub>/Hif<sub>1</sub>α/eNOS signaling. *Drug Chem Toxicol* 2022; 45(5): 2153-2159.
  63. El-Sheikh AAK, Morsy MA, Abdalla AM, et al. Mechanisms of thymoquinone hepatorenal protection in methotrexate-induced toxicity in rats. *Mediators of Inflamm* 2015; 2015: 859383.
  64. Sahindokuyucu-Kocasari F, Akyol Y, Ozmen O, et al. Apigenin alleviates methotrexate-induced liver and kidney injury in mice. *Hum Exp Toxicol* 2021; 40(10): 1721-1731.
  65. Chen YC, Sheen JM, Hsu MH, et al. Melatonin rescued methotrexate-induced spatial deficit and hyperhomocysteinemia and increased asymmetric dimethylarginine in plasma and dorsal hippocampus in developing rats. *Life Sci* 2020; 242: 116931.
  66. Dragičević M, Košuta I, Kruezi E, et al. Association of asymmetric dimethylarginine and nitric oxide with cardiovascular risk in patients with end-stage liver disease. *Medicina (Kaunas)* 2020; 56(11): 622.
  67. Liu X, Hou L, Xu D, et al. Effect of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on heart failure development. *Nitric oxide* 2016; 54: 73-81.
  68. Pope AJ, Karupiah K, Cardounel AJ. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol Res* 2009; 60(6) :461-465.