



Nevin KOCAMAN ^{1,a}
Durrin Özlem DABAK ^{1,b}

¹ Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Histoloji Embriyoloji
Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-6682-6345

^b ORCID: 0000-0001-7210-6873

ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp.Derg.
2019; 33 (2): 67 - 72
http://www.fusabil.org

Metotreksat ile Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda Silymarin'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması *

Amaç: Metotreksat (MTX)'in sıçan karaciğer dokusunda meydana getirdiği hasara karşı silymarin (SİL)'in koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 36 adet erişkin Sprague Dawley tipi erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. 5 günlük deney süresince Grup 1'e 0.5 mL intraperitoneal (i.p) tek doz serum fizyolojik, Grup 2'ye karboksi metil selüloz (CMC) oral olarak, Grup 3'e CMC içinde çözöürölmüş 300 mg/kg Silymarin deney süresince oral yolla, Grup 4'e tek doz 20 mg/kg (i.p) MTX(i.p), Grup 5'e tek doz 20 mg/kg MTX (i.p) + oral CMC, Grup 6'ya ise tek doz 20 mg/kg MTX (i.p) + CMC içinde çözöürölmüş 300 mg/kg dozunda SİL deney süresince oral olarak uygulandı. Deney sonunda sıçanlar dekapite edilerek karaciğer dokuları çıkartıldı. Rutin doku takip işlemlerinden sonra değeriendirildi.

Bulgular: Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'e ait karaciğer dokuları histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelendiğinde birbirlerine benzer idi. Grup 4 ve 5'de histopatolojik bulgular benzer olup vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon ve inflamatuvar hücre artışı göröüldü. Yine bu gruplarda TUNEL, Bax ve Kaspaz 3 pozitif hücreler diğer deney gruplarına göre artmış olarak tespit edildi. Grup 6 de ise doku hasarının önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi.

Sonuç: MTX karaciğerde önemli doku hasarına neden olmuş ve silymarin bu hasarı iyileştirmiştir.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, hepatotoksisite, apoptozis, silymarin, karboksi metil selüloz

Investigation of the Protective Effects of Silymarin on the Methotrexate-Induced Hepatotoxicity in Rats

Objective: To investigate the protective effects of silymarin (SIL) against the damage caused by methotrexate (MTX) in rat liver tissue.

Materials and Methods: A total of 36 adult Sprague-Dawley male rats were divided into 6 groups with 6 animals each: Group I received 0.5 mL intraperitoneal (ip) saline solution, Group II received carboxymethyl cellulose (CMC) orally, Group 3 received SIL 300 mg / kg dissolved in CMC orally, Group IV received a single dose of 20 mg/kg (ip) MTX, Group V received a single dose of 20 mg/kg (ip) MTX + oral CMC, and Group VI received a single dose of MTX 20 mg/kg (ip) + SIL 300 mg/kg dissolved in CMC orally. The experiment was administered over a period of 5 days. At the end of the experiment, rat liver tissues were removed and routine histological procedures were performed.

Results: The liver tissues in Groups I, II, and III were similar in terms of histopathologic and immunohistochemical findings. In groups IV and V, histopathological findings were similar and vascular congestion, sinusoidal dilatation, and inflammatory cell infiltration were observed. In the same groups, the intensity of TUNEL, Bax and Caspase 3 positive cells was increased compared to those of other experimental groups. In group VI, tissue damage decreased significantly.

Conclusion: MTX resulted in significant tissue damage in the liver tissue and SIL ameliorated this damage.

Key words: Methotrexate, hepatotoxicity, apoptosis, silymarin, carboxymethyl cellulose

Geliş Tarihi : 05.03.2019

Kabul Tarihi : 31.05.2019

Giriş

Metotreksat (MTX), bir folik asit analogu olup, romatoid artrit ve diğer otoimmün, kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde rutin olarak kullanılan birinci basamak sentetik antimetabolit bir ajandır (1). Antimetabolit etkisi dışında immünosupresif etkileri de olan MTX, akut lenfoblastik lösemi, non hodgkin lenfoma, osteosarkoma gibi maligniteler yanında, juvenil idiopatik artrit, psoriasis, psoriatic artrit, vaskülit, Wegener granöломatozu, Henoch-Schonlein purpurası vaskuliti, sarkoidoz, sistemik lupus eritematozus, eozinofilik fasiit, Crohn hastalığı, ülseratif kolit ve juvenil idiopatik artritte göröülen uveitte de kullanılmaktadır (2, 3).

MTX akut lösemilerin tedavisinde olduğu gibi yüksek doz ama aralıklı kullanımı yanında, psöriazisteki gibi tedavinin uzun sürmesi şeklinde de kullanılmakta olup progresif hepatik fibrosis ve siroza gidebilen karaciğer hasarı gibi yan etkiler sıklıkla görölmektedir. Düşük dozda uzun dönem takip edilen hastaların yaklaşık %8'inde,

Yazışma Adresi Correspondence

Nevin KOCAMAN
Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Histoloji Embriyoloji
Anabilim Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

drnkocaman@gmail.com

* Uluslararası FEPS Kongresi, 26-29 Ağustos 2015, Kaunas/LİTVANYA.

transaminazların normalin üç katına yükseldiği gösterilmiş olup, MTX tedavisi alan psöriazisli hastalardaki siroz gelişme riski %7 civarındadır (4). Bu yan etkiler; tedavinin aksamasına, hatta kesilmesine bile neden olmaktadır. Gastrointestinal, hepatik, renal ve kemik iliği toksisiteleri, sık görülen yan etkiler olmasına rağmen MTX'in en ciddi yan etkisi hepatotoksisitedir (5). Bu etkiler çoğunlukla reaktif oksijen radikallerinin (ROS) meydana getirdiği oksidatif stres sebebiyle olmaktadır (6). Kullanılan pek çok antioksidan ajan bu riskleri büyük ölçüde ortadan kaldırmaktadır (7). Bunlardan biri olan silymarin, antioksidan etkisi yanında antiinflatuar ve antikanserijen etki de göstermektedir. Silymarin (SİL), süperoksit anyonu, H₂O₂, perhidroksi, hidroksil, alkoksil ve peroksil radikalleri gibi serbest oksijen türevlerinin oluşumunu engellemekte olup aynı zamanda viral hepatit, toksik hepatit, karaciğer yağlanması, siroz, iskemik hasar ve radyasyon toksisitesinde de güçlü antioksidan özelliği kanıtlanmış bir ajandır (8).

Karboksi metil selüloz (CMC) ise bir polisakkarit olup sodyum monoklor asetatın selülozla reaksiyonundan elde edilir. CMC ısıya dayanıklı olup solüsyonları şeffaf, yarı jelatinöz bir yapıya sahiptir. Özellikle besin, kozmetik ve farmasötik sanayinde kullanılmakta olup eritici özelliği sebebiyle adezyonları önlemek için abdomen cerrahisinde de kullanılmaktadır (9).

Bu çalışmada MTX'in, sıçan karaciğer dokusunda meydana getirdiği hasara karşı SİL'in koruyucu etkilerinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu deneysel çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan kurul onayı (2011/39) alındıktan sonra Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında yapıldı.

Deneysel Hayvanları: Deneylerde kullanılan en az 8 haftalık erişkin Sprague Dawley tipi erkek sıçanlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezin'den temin edildi. Hayvanların buldukları ortamın sıcaklığı 22-25^o C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında ve 12 saat karanlıkta takip edildi. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler özel çelik kaplarda, su ise paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deneysel hayvanları özel olarak hazırlanan pelletler halindeki rat yemleriyle beslendi.

Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulama: Çalışmada her grupta 6 sıçan (n=6) olmak şartıyla 6 grup oluşturuldu.

Grup 1 (Kontrol): Bu gruptaki deneysel hayvanlarına sadece deneyin ilk günü tek doz 0.5 mL serum fizyolojik i.p. olarak verildi.

Grup 2 (CMC): Bu gruptaki deneysel hayvanlarına 5 gün süreyle CMC oral verildi.

Grup 3 (SİL): Bu gruptaki deneysel hayvanlarına 5 gün süreyle SİL, 300 mg/kg/gün oral uygulandı.

Grup 4 (MTX): Bu gruptaki deneysel hayvanlarına 1. gün MTX 20 mg/kg i.p. dozunda uygulandı (4).

Grup 5 (MTX+CMC): Bu gruptaki deneysel hayvanlarına 1. gün MTX 20 mg/kg tek doz i.p. uygulandı, ilaveten 5 gün süreyle CMC oral verildi.

Grup 6 (MTX+SİL): Bu gruptaki deneysel hayvanlarına 1. gün MTX 20 mg/kg dozunda i.p. olarak verildi ilave olarak CMC içerisinde çözözülmüş SİL, 300 mg/kg/gün dozunda oral 5 gün süreyle uygulandı.

Deneysel sonunda tüm gruplardaki sıçanlar ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında dekapite edildi. Sıçanların karaciğer dokuları hızla çıkarılıp %10 formaldehitte tespit edildikten sonra rutin histolojik takiplerin ardından histopatolojik inceleme için Hematoksilen Eozin ile boyandı.

İmmünohistokimyasal İnceleme: Karaciğer dokus kesitlerine BAX ve kaspaz 3 immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi uygulandı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilip daha sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ ile muamele edildi. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block solüsyonu ile muameleden sonra primer antikor (Bax mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, sc-7480, California, USA; caspase 3 Rabbit polyclonal IgG, Abcam, ab2302, London, UK) ile 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biyotinli anti-mouse / rabbit IgG, Diagnostic BioSystems, KP 50A, Pleasanton, USA), streptavidin horseradish peroksidaz ve 3-Amino-9-ethyl karbazol kromojeni uygulandıktan sonra Mayer's hematoksilenle zıt boyama yapıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine phosphate buffered saline kullanıldı. PBS ve distile sudan geçirilen dokular uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100) ve şiddeti (0: yok, +0.5:çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu (Histoskor= yaygınlık x şiddet) (10).

TUNEL Yöntemi: Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Metil Green ile yeşile boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi.

Analizlerde en az 500 normal ve apoptotik hücre sayılmıştır. İstatistiksel analizler apoptotik indeks (AI) ve apoptotik hücrelerin toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranı hesaplanarak yapıldı.

İstatistiksel Analiz: Elde edilen veriler ortalama standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve Posthoc Tukey testi ile yapıldı. $P<0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Histokimyasal Bulgular: Kontrol grubuna ait sıçanların karaciğer dokuları incelendiğinde *v.sentralis*, hepatositler, sinüzoidler, sinüzoidal Kupffer hücreleri ve endotel hücreleri normal yapıda gözlemlendi (Şekil: 1a). CMC ve SİL gruplarına ait karaciğer dokuları kontrol grubuna benzer şekilde tespit edildi (Şekil: 1b, 1c). MTX ve MTX+CMC grubuna ait karaciğer dokuları incelendiğinde; Remark kordonlarının ışınal yapısının bozulduğu, hepatositlerin normal yapılarını korumadığı, sinüzoidlerde genişleme (kırmızı ok), vasküler konjesyon (siyah yıldız) ve özellikle portal alanlarda daha yaygın olan mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah ok), gözlemlendi (Şekil: 1d, 1e, 1f). MTX+SİL grubuna ait karaciğer dokularında ise sinüzoidal ve vasküler dilatasyonun azaldığı, mikroveziküler yağlanmanın ve piknotik çekirdekli hepatositlerin kaybolduğu, mononükleer hücre infiltrasyonunun ve vasküler konjesyonun belirgin bir şekilde azaldığı görüldü (Şekil 1g).

İmmünohistokimyasal Bulgular:

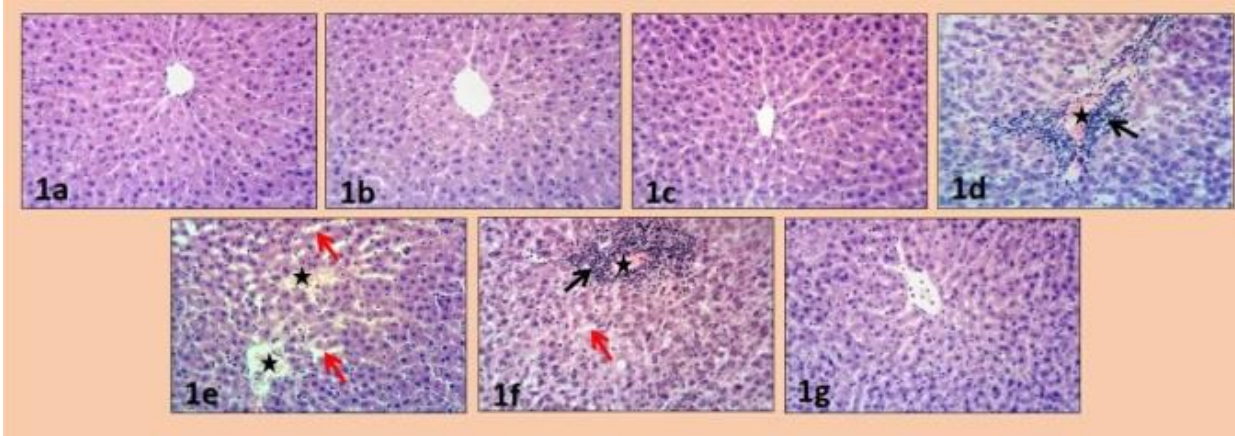
Bax İmmünreaktivitesi: Karaciğer dokusunda Bax immünreaktivitesi; Kontrol (Şekil 2a), CMC (Şekil 2b) ve SİL (Şekil 2c) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında MTX (Şekil 2d) ve

MTX+CMC (Şekil 2e) grubunda Bax immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu. MTX ve MTX+CMC grupları ile kıyaslandığında ise MTX+SİL (Şekil 2f) grubunda Bax immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış bulundu ($P<0.05$) (Tablo 1). Negatif kontrol grubunda Bax immünreaktivitesi görülmedi (Şekil 2g).

Kaspaz 3 İmmünreaktivitesi: Karaciğer dokusunda Kaspaz 3 immünreaktivitesi; Kontrol (Şekil 3a), CMC (Şekil 3b) ve SİL (Şekil 3c) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında MTX (Şekil 3d) ve MTX+CMC (Şekil 3e) grubunda Kaspaz 3 immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu. MTX ve MTX+CMC grupları ile kıyaslandığında ise MTX+SİL (Şekil 3f) grubunda Kaspaz 3 immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış bulundu ($P<0.05$) (Tablo 1). Negatif kontrol grubunda kaspaz 3 immünreaktivitesi görülmedi (Şekil 3g).

TUNEL Bulguları: Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopisi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği karaciğer dokusunda hepatositlerde (kırmızı ok) gözlemlendi.

TUNEL pozitifliği; Kontrol (Şekil 4a), CMC (Şekil 4b) ve SİL (Şekil 4c) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında MTX (Şekil 4d) ve MTX+CMC (Şekil 4e) gruplarında TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu. MTX ve MTX+CMC grupları ile kıyaslandığında ise MTX+SİL (Şekil 4f) grubunda TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış bulundu ($P<0.05$). Tablo 1. Pozitif kontrol grubunda Tunel pozitif hücreler tespit edildi (Şekil 4g). Negatif kontrol grubunda Tunel pozitif hücre görülmedi (Şekil 4h).



Şekil 1. Metotreksat ile hasar oluşturmuş ve Silmarin tedavisi verilen sıçanlarda karaciğer dokularının histolojik görünümü. Kontrol, CMC ve SİL gruplarına ait karaciğer dokuları normal yapılarında ayırt edilmektedir. (Şekil: 1a, 1b, 1c). MTX ve MTX+CMC grubuna ait karaciğer dokularında sinüzoidal dilatasyon (kırmızı ok), vasküler konjesyon (siyah yıldız) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah ok) gözlenmektedir (Şekil: 1d, 1e, 1f). MTX+SİL grubuna ait karaciğer dokularında ise sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyonun ve mononükleer hücre infiltrasyonunun belirgin bir şekilde azaldığı görülmektedir (Şekil 1g) HE 200X.

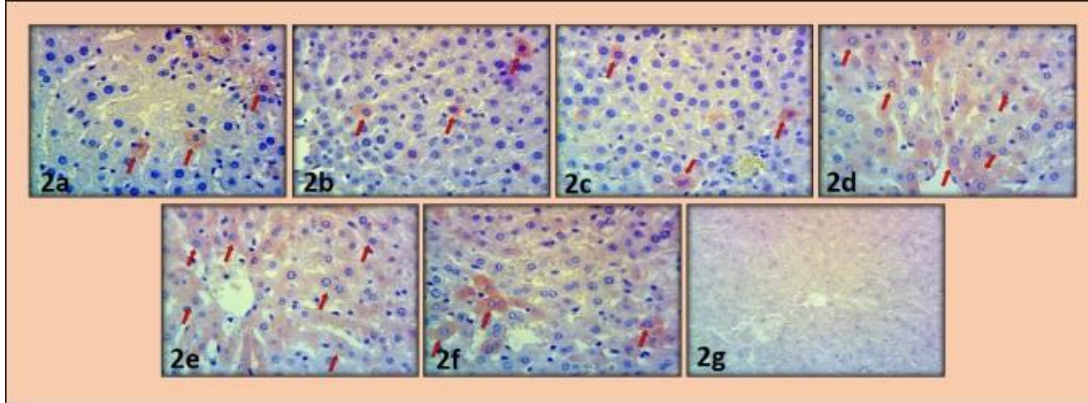
Tablo 1. Deney grupları karaciğer dokularının apoptotik indek ve Bax, Kaspaz3 immünoreaktivitesi

	Apoptotik indeks (%)	Bax histoskoru	Kaspaz histoskoru
Kontrol	2.66±1.63	0.23±0.10	0.29±0.11
CMC	2.33±1.50	0.34±0.09	0.33±0.08
SİL	3.16±1.94	0.25±0.12	0.25±0.10
MTX	16.50±4.18 ^a	1.60±0.64 ^a	1.60±0.30 ^a
MTX+ CMC	15.83±4.95 ^a	1.43±0.71 ^a	1.50±0.65 ^a
MTX+ SİL	5.16±1.16 ^b	0.61±0.15 ^b	0.62±0.24 ^b

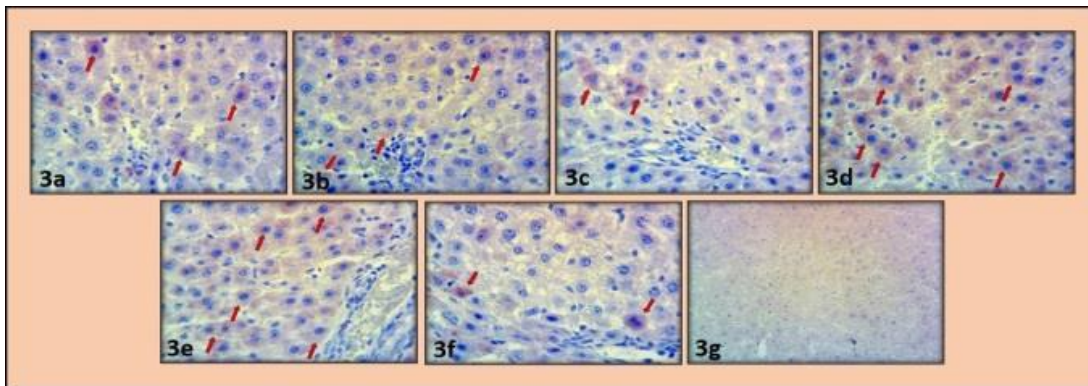
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

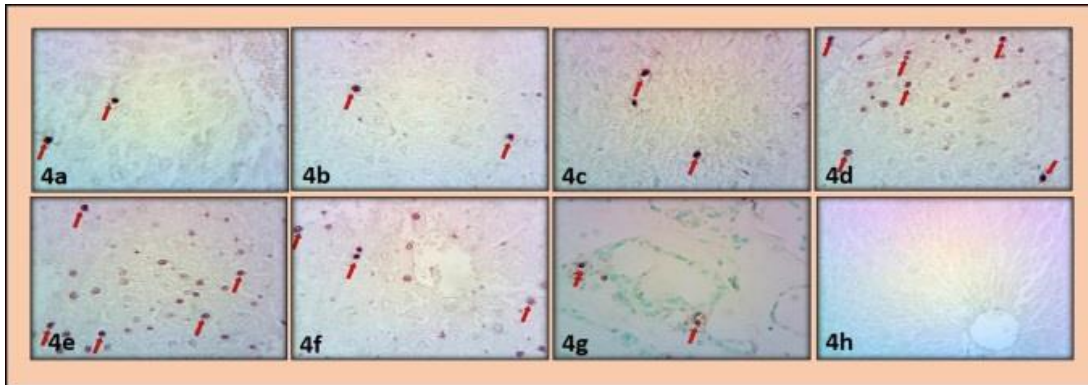
^b MTX grubu ile karşılaştırıldığında, (P<0.05).



Şekil 2. Tüm gruplarda karaciğer hepatositlerinde (kırmızı ok) Bax ekspresyonu. Ok, Bax pozitif hepatosit immünoreaktivitesini göstermektedir.



Şekil 3. Tüm gruplarda karaciğer hepatositlerinde (kırmızı ok) Kaspaz 3 ekspresyonu. Ok, Kaspaz 3 pozitif hepatosit immünoreaktivitesini göstermektedir.



Şekil 4. Gruplar arasındaki TUNEL pozitifliğinin karşılaştırılması. Kırmızı ok, TUNEL pozitif hepatosit immünoreaktivitesini göstermektedir.

Tartışma

MTX antikanserojen, antiinflamatuvar, antimetabolit etkili bir ilaç olup lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer, meme kanseri yanında psöriasis, dermatomyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (11). Klinikte geniş kullanım alanları olmasıyla birlikte, karaciğer üzerine olan toksik etkisinden dolayı da dikkat çekmektedir (4). Kronik düşük doz MTX, fibrozis ve siroza neden olurken yüksek doz MTX, karaciğer fonksiyon testlerinde ani bozulmaya sebep olur (11). MTX'in böbrek, karaciğer, ince barsak ve kan hücrelerinde oksidan antioksidan sistem üzerine olan etkisi araştırılmış ve mitokondrielerde pirüvat dehidrogenaz, 2 okzogluterat dehidrogenaz ve nikotinamid adenindinükleotid (NAD)⁺'e bağımlı enzimler ile sitozolik nikotinamid adenindinükleotid fosfat (NADP) bağımlı dehidrogenazları inhibe ettiği gösterilmiştir (12). Sitosolik nikotinamid adenin fosfatdehidrogenaz (NADPDH) ve NADP bağımlı malik enzimin inhibe olması, hücre içi NADPH'nin azalmasına neden olmaktadır. NADPH, önemli bir sitozolik antioksidan madde olan indirgenmiş glutatyonun (GSH) devamlılığını sağlayan glutatyon reduktaz (GSSG-R) enzimi için gerekmektedir. MTX tedavisi nedeniyle GSH seviyesinin azalmasının, süperoksit ve anyon, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroklorik radikaller gibi reaktif oksijen radikallerine karşı hücreleri koruyan antioksidan savunma sistemlerinin etkinliğinin azalmasına neden olduğu bilinmektedir (12). Serbest oksijen radikalleri olan reaktif oksijen ürünleri, karaciğer gibi yoğun fizyolojik ve metabolik olayların geçtiği bir ortamda sürekli olarak üretilmekte ve detoksifiye edilmektedir. Oksidatif stres, ROS ve çeşitli sitokinler sebebiyle; hepatosit, Kupffer ve İto hücrelerinin etkileşimiyle gelişen proinflamatuvar olaylara, hepatositlerin apoptoza gitmesine ve sonuçta fibrojenin oluşmasına katkıda bulunmaktadır (13).

Günümüzde, koruyucu ve tedavi edici özellikleri sebebiyle pek çok antioksidan ajan kullanılmakta olup oksidatif hasar risklerini büyük ölçüde ortadan kaldırmaktadır (7). Bu amaçla kullanılan ajanlardan biri olan silymarin, bir flavonoid olup literatürde pek çok kimyasal madde ve toksin etkisiyle oluşan karaciğer hasarını önlemede oldukça etkilidir. SİL'in hepatoprotektif etkilerinde ana mekanizmalar antioksidan özellik göstermesidir. SİL, glutatyon azalmasına engel olarak lipid peroksidasyonunu engellemekte ve güçlü detoksifikasyon ve koruyucu etkiler yapmaktadır. Yine aynı çalışmada liopoksijenaz enzimini inhibe ederek karaciğerde lökotrien oluşumunu engellediği, hepatositlerde protein sentezini arttırdığı, tümör öncüllerinin aktivitesini azalttığı, mast hücre stabilizasyonunu sağladığı, immun fonksiyonları modüle ettiği ve anti-inflamatuvar ve antifibrotik etkilere neden olduğu gösterilmiştir (14).

MTX oldukça yaygın kullanılan ve özellikle karaciğer üzerine yan etkileri bilinen bir antimetabolittir.

SİL'in MTX hasarını önlemede veya oluşan hasarı düzeltmedeki etkisinin gösterilmesi bu çalışmayı oldukça değerli yapmaktadır. Çalışmada G4 ve G5 gruplarına ait dokularda yaptığımız incelemeler, karaciğerde doku hasarı oluştuğunu ve bu hasarın G1 dokularına kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek olduğunu gösterdi ki zaten bu bulgular MTX'a yönelik önceki literatür bilgileriyle birebir uyumlu idi (4). Aynı şekilde tedavi gruplarına ait doku incelemeleri, SİL'in karaciğer hasarını anlamlı derecede azaldığını ve karaciğer dokularında iyileşme sağladığını gösterdi.

Çalışmada MTX uygulanan deney hayvanlarının karaciğerinde meydana gelen histopatolojik değişikliklerin; oksidatif hasarın artmasına bağlı olduğu ve MTX verilmesinin kan, karaciğer, böbrek ve ince barsakta glutatyon (GSH) seviyelerinin azalmasına, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyelerinin artmasına neden olduğunu göstermiştir (7, 12, 13). SİL uygulanmasının bu değişiklikleri düzeltmesinin ve dokuları kısmi olarak iyileştirmesinin SİL'in antioksidan özelliğinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Çünkü SİL'in hepatoprotektif etkilerini bu yolla yaptığı bilinmekte olup, MTX'e bağlı hasarıda bu şekilde düzelttiği yönünde düşünülmüştür (14).

Çalışma bulguları, MTX verilen deney grubundaki hayvanların karaciğer dokularında apoptotik proteinler olduğu bilinen Bax, kaspaz 3 proteinlerinin immunreaktivitesinin arttığını yine apoptotik hücre hasarını gösteren TUNEL boyamanın sonucunda da TUNEL pozitif hücrelerin yani apoptozun arttığını gösterdi. Normalde kaspaz ve bax proteinlerinde artış olması bir dokuda apoptozise eğilimin arttığını göstermektedir. Bunun dokuda serbest radikallerin artışına bağlı olduğu ve bu radikallerin hem mitokondri, hem plazma membranı, hem de genom üzerine etkilerle apoptotik süreci tetikleyebildiği bildirilmiştir. Dolayısıyla elde edilen bulgulara dayanarak apoptozdaki artışın oksidatif stres ile ilişkili olduğu söylenebilir (15, 16). Yine çalışmanın verileri, tedavi olarak verilen SİL'in apoptozu azalttığını gösterdi. İn vitro ve in vivo pek çok çalışma SİL'in hepatoprotektif etkisinin serbest radikallere karşı antioksidan gibi davranması ve sitokin üretimi üzerinde düzenleyici rol almasından kaynaklandığını göstermiştir (17). Tedavi grubumuzda karaciğer hasarının azalmasını ve iyileşmeyi SİL'in antioksidan özelliğine bağlayabiliriz. MTX'in klinikte çok geniş kullanım alanı olduğu düşünüldüğünde, patofizyolojisinin aydınlatılmasına ve yeni tedavi stratejilerinin oluşturulmasına yönelik çalışmaların değeri daha da önem kazanmaktadır.

Sonuç olarak, MTX kullanımıyla ilgili meydana gelebilecek istenmeyen etkileri önlemeye ve SİL ile ilişkili tedavi yaklaşımlarının güncelleştirilmesine ve değişik doz ve sürelerde tedavi uygulamalarına yönelik daha ayrıntılı çalışmaların planlanmasına ihtiyaç olduğunu kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Amaral K, Bingham O, Schoen R. Successful methotrexate treatment of chronic chikungunya Arthritis. *Journal of Clinical Rheumatology* 2018; 1076-1608.
2. Fiehn C. Methotrexate in rheumatology. *Z Rheumatol* 2009; 68: 747-756.
3. Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev* 2007; 33: 448-460.
4. Uraz S, Tahan V, Aygun C, et al. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1071-1077.
5. Wade SD, Yoshida EM, Carruthers MN, Weinblatt ME. Transient elastography for monitoring for hepatotoxicity in rheumatoid arthritis patients on long-term methotrexate. *J Clin Rheumatol* 2018; 10: 1097.
6. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, et al. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 2003; 34: 282-287.
7. Amin F, Bano B. Oxidation of cystatin imparted by riboflavin generated free radicals: Spectral analysis. *Int J Biol Macromol* 2018; 141: 8130-8131.
8. Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clinical Drug Investigation* 2002; 22: 51-65.
9. Wang P, He H, Cai R, et al. Cross-linking of dialdehyde carboxymethyl cellulose with silk sericin to reinforce sericin film for potential biomedical application. *Carbpol* 2019; 15: 403-411.
10. Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, et al. Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis. *Clin Cancer Res* 2004;10: 3448-3456.
11. Samdanci ET, Huz M, Ozhan O, et al. Cytoprotective effects of molsidomine against methotrexate-induced hepatotoxicity: An experimental rat study. *Drug Des Devel Ther* 2018; 20: 13-21.
12. Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: Pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct* 1998; 16: 283-293.
13. Jayesh K, Helen LR, Vysakh A, et al. Protective role of Terminalia bellirica (Gaertn.) roxb fruits against CCl₄ induced oxidative stress and liver injury in rodent model. *Indian J Clin Biochem* 2019; 34: 155- 163.
14. Goli F, Karimi J, Khodadadi I, et al. Silymarin attenuates ELMO-1 and KIM-1 expression and oxidative stress in the kidney of rats with type 2 diabetes. *Indian J Clin Biochem* 2019; 34: 172-179.
15. Ercan S, Arinc S, Yilmaz SG, et al. Investigation of caspase 9 gene polymorphism in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2019; 39: 2437- 2441.
16. Yin Y, Lv L, Wang W. Expression of miRNA-214 in the sera of elderly patients with acute myocardial infarction and its effect on cardiomyocyte apoptosis. *Exp Ther Med* 2019; 17: 4657- 4662.
17. Amir H, Makan P, Hamed M, et al. The effects of silymarin supplementation on metabolic status and oxidativestress in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review andmeta-analysis of clinical trials. *Complementary Therapies in Medicine* 2018; 41: 311-319.