



Ali GÜREL^{1, a}
Kürşat KAYA^{2, b}

¹ Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Nefroloji Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

² Pamukkale Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
Denizli, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0001-8087-8814

^b ORCID: 0000-0002-6353-7791

ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp.Derg.
2021; 35 (3): 168 -171
http://www.fusabil.org

Balık Yağı, Metotreksat Kaynaklı Nefrotoksisite ve Hepatotoksisiteye Karşı Koruyucudur

Amaç: Bu çalışmada metotreksat (MTX) kaynaklı böbrek ve karaciğer hasarına karşı balık yağının (BY) potansiyel koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Dört gruba (n=7) ayrılan ratlarda; Kontrol grubu 14 gün gavajla mısır yağı ve üçüncü gün periton içine (i.p.) fizyolojik tuzlu su, BY grubuna 14 gün gavajla 1000 mg/kg BY ve üçüncü gün i.p. fizyolojik tuzlu su, MTX grubuna 14 gün gavajla mısır yağı ve üçüncü gün i.p. tek doz 20 mg/kg MTX, MTX+BY grubuna 14 gün süreyle gavajla 1000 mg/kg BY ve üçüncü gün i.p. tek doz 20 mg/kg MTX enjekte edildi. Deney sonunda ratlar dekapite edilip, böbrek ve karaciğer -86 °C'de korundu ve biyokimyasal ölçümler yapıldı.

Bulgular: Metotreksat uygulanmasıyla böbrek ve karaciğer dokularında tiyobarbitürikasit reaktif substans (TBARS) seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı; süperoksitdismutaz (SOD), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) aktivitelerinin ise azaldığı görüldü. MTX ile birlikte BY uygulanması, tek başına MTX uygulanan grupla karşılaştırıldığında TBARS seviyesinde azalma; GSH, CAT, SOD ve GPx aktivitelerinde artış sağladı.

Sonuç: Bu çalışmada MTX'in, böbrek ve karaciğer dokularında oksidatif hasara neden olduğu ve BY'nin bu hasarı engellediği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, oksidatif hasar, böbrek, karaciğer, balık yağı

Fish Oil Is Protective Against Methotrexate-Induced Nephrotoxicity and Hepatotoxicity

Objective: In this study, it was aimed to investigate the potential protective effects of fish oil (FO) against methotrexate (MTX)-induced kidney and liver damage.

Materials and Methods: In rats divided into four groups (n=7); the control group was given corn oil by gavage for 14 days and physiological saline intraperitoneally (i.p.) on the third day, FO group was given 1000 mg/kg FO by gavage for 14 days and i.p. physiological saline on the third day, MTX group was given corn oil by gavage for 14 days and i.p. single dose of 20 mg/kg MTX on the third day, MTX+BY group was given 1000 mg/kg FO by gavage for 14 days and i.p. single dose of 20 mg/kg MTX on the third day. At the end of the experiment, rats were decapitated, their kidneys and livers were preserved at -86 °C, and biochemical measurements were made.

Results: With the administration of MTX, thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels increased; superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) activities were decreased compared to the control group. Co-administration of FO with MTX resulted in reduction in TBARS level and increase in GSH, CAT, SOD and GPx activities.

Conclusion: In this study, it was determined that MTX caused oxidative damage in kidney and liver tissues and FO prevented this damage.

Key Words: Methotrexate, oxidative damage, kidney, liver, fish oil

Geliş Tarihi : 23.07.2021
Kabul Tarihi : 06.09.2021

Yazışma Adresi Correspondence

Ali GÜREL
Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Nefroloji Bilim Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

draligürel@gmail.com

Giriş

Metotreksat (MTX) dihidrofolat redüktaz enzim inhibisyonu ile etki eden bir folik asit antagonisti olup, antineoplastik ajan olarak hematolojik ve solid tümörlerin tedavisinde, enflamatuar bağırsak hastalıkları, romatoid artrit gibi otoimmün, inflammatuar hastalıklarda, ektopik gebelik ve gestasyonel trofoblastik hastalıklar gibi jinekolojik patolojilerde kullanılmaktadır (1). Öte yandan ciddi yan etkileri MTX'in kullanımını sınırlamaktadır. Gastrointestinal sistem, karaciğer, böbrekler ve sinir sistemi olmak üzere çeşitli organ ve dokularda yan etkiler gözlemlenebilir. Bu yan etkiler oksidatif stres ve inflammatuar süreçlerle ilişkilendirilmiştir (2).

Balık yağının (BY) n-3 çoklu doymamış yağ asitleri DHA ve EPA yönünden zengin olması nedeniyle faydalı etkileri vardır. n-3 yağ asitleri, normal büyüme ve gelişme için gerekli olup, ayrıca hipertansiyon, diyabet, koroner arter hastalığı, çeşitli otoimmün ve inflammatuar hastalıklar, karsinogenezin önlenmesi ve tedavisinde olumlu etkileri bildirilmiştir. Bu yararlı etkileri, biyolojik membranların yapısında yer almalarıyla birlikte çoğu dokuyu oksidatif hasara karşı korumalarıyla ilişkilendirilmektedir (3).

Bu çalışmada MTX kaynaklı böbrek ve karaciğerin oksidatif hasarına karşı BY'nin potansiyel koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla oksidatif stres belirteci olarak tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) düzeyi, ve antioksidan

belirteçler olan süperoksitdismutaz (SOD), indirgenmiş glutatyon (GSH), glutatyonperoksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ölçüldü.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Çalışmanın etik kurul onayı, Adıyaman Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulundan alındı (2019/051).

Kimyasallar: Metotreksat (Koçak Farma, 500 mg/20 ml) ve balık yağı [Solgar Omega-3 950 mg (yumuşak jelatin kapsül; her bir kapsül 504 mg EPA 378 mg DHA içeren)] eczaneden, öteki tüm kimyasallar analitik saflıkta veya mevcut en yüksek saflıktaydı ve Sigma-Aldrich'den alındı.

Deneysel Hayvanları ve Çalışma Tasarımı: Çalışmada 28 adet Sprague Dawley erkek rat kullanıldı. Çalışma süresince poliprolen kafeslerde, 21 °C ortam sıcaklığında ve 12 saatlik aydınlık- karanlık döngüsünde tutulan ratlara yem ve su "ad libitum" olarak verildi.

Ratlar 4 gruba ayrıldı (n=7). Kontrol grubundaki ratlara 14 gün süreyle günde bir kez gavajla mısır yağı verildi ve üçüncü gün tek doz fizyolojik tuzlu su periton içine enjekte edildi. BY grubundaki ratlara 14 gün süreyle günde bir kez gavajla 1000 mg/kg BY verildi ve üçüncü gün tek doz fizyolojik tuzlu su periton içine enjekte edildi. MTX grubundaki ratlara 14 gün süreyle günde bir kez gavajla mısır yağı verildi ve üçüncü gün tek doz 20 mg/kg MTX periton içine enjekte edildi. MTX+BY grubundaki ratlara 14 gün süreyle günde 1 kez gavajla 1000 mg/kg BY yağı verildi ve üçüncü gün tek doz 20 mg/kg MTX periton içine enjekte edildi. On beşinci gün ksilazin-ketamin karışımı ile genel anestezi uygulanan ratlar dekapite edildi. Böbrek ve karaciğer dokuları hızla çıkarıldı ve biyokimyasal ölçümler yapılmak üzere hızlıca -86 °C'de dondurularak saklandı.

Biyokimyasal Ölçümler: Dokular, tüm homojenatın 1:10 (w/v) dilüsyonunu elde etmek amacıyla, soğuk zincir şartları altında, 0.2 M Tris-HCl tamponu (pH: 7.4) içerisinde homojenize edildi. TBARS ölçümleri için doğrudan homojenat kullanıldı. Homojenatların 3220 rpm'de 30 dk (4°C) santrifüjlenmesiyle elde edilen süpernatantlardan SOD, CAT ve GPx aktiviteleri ile GSH düzeyleri belirlendi. Bir lipit peroksidasyon indeksi olan TBARS seviyeleri Yağı'nin yöntemi kullanılarak ölçüldü (4). Bu yöntemde iki molekül tiyobarbitürik asit bir molekül TBARS ile reaksiyona girerek pembe renkli ürün oluşturur. Ürünler spektrofotometrik olarak 532 nm'de ölçülerek değerlendirildi ve sonuçlar nmol/g doku olarak gösterildi. SOD, CAT ve GPx hücrel enzimatik antioksidan savunma sistemi üyeleridir. SOD, süperoksit anyonunu hidrojen perokside dönüştürerek, CAT ve mitokondride GPx hidrojen peroksidi suya indirgeyerek serbest oksijen radikallerine karşı en güçlü savunmayı yapan ilk antioksidan savunma hattını oluştururlar (5). SOD, CAT ve GPx aktivitelerinin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntem kullanıldı ve sonuçlar ünite/mg doku proteini olarak ifade edildi. SOD aktivitesinin belirlenmesinde Sun ve ark. (6), yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde

ksantininkksantinoksidaz tarafından ürik aside çevrilmesi esnasında oluşan süperoksit radikali ortamda bulunan nitrobluetetrazolyum (NBT) ile reaksiyona girerek mor renkli formazon oluşturur. Ortamda SOD bulunması halinde oluşan süperoksit radikali hidrojen perokside dönüştürüleceğinden NBT redüksiyonu ve dolayısıyla formazon oluşumu azalacaktır. Formazon azalması spektrofotometrik olarak 560 nm'deki absorbans azalması ölçülerek belirlenmiştir. NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi 1 U SOD aktivitesi olarak kabul edilmektedir. CAT aktivitesi Aebi (7) metoduna göre, ortamda bulunan hidrojen peroksidin CAT etkisiyle yıkılmasının 240 nm dalga boyunda absorbans azalması şeklinde takip edilmesi prensibine dayanan yöntemle belirlendi. Birim zaman başına absorbans farkı, CAT aktivitesinin bir ölçüsü olarak kullanıldı. GPx aktivitesi Paglia ve Valentine (8)'in yöntemine göre belirlendi. Bu yöntemde, hidrojen peroksidi suya indirgeyen GPx, redükteglutatyonu da okside forma dönüştürür. Ortamda glutatyonredüktaz ve NADPH bulunması halinde okside glutatyon tekrar redükte glutatyon haline indirgenir. Ortamdaki NADPH azalması 340 nm'de absorbans azalması şeklinde takip edilir. Absorbansdaki bu azalma GPx aktivitesiyle doğru orantılıdır. GSH, ikinci hat antioksidan savunma sistemi üyelerinden biridir. Serbest radikallere elektron vererek onları temizler. GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay (9)'in yöntemine göre 412 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu yöntemde GSH'in yapısında bulunan sülfidril grupları 5, 5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı-yeşil renkli kromojen bileşik oluşturur. Doku GSH düzeyleri nmol/mg doku proteini olarak ifade edildi. Beyin dokusu protein miktarının belirlenmesinde Lowry metodu kullanıldı (10).

İstatistik Analizler: İstatistiksel analizler IBM SPSS 21 programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile analiz edildi. Gruplar arası değişkenlerin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi kullanıldı. Levene testi analizine göre homojen varyans gösteren değişkenler için Tukey HSD ve homojen varyans göstermeyen değişkenler için Games-Howell testleri post hoc testleri olarak kullanıldı. Sonuçlar ortalama± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (güven aralığı %95).

Bulgular

Böbrek ve karaciğer dokusu TBARS ve GSH seviyeleri ile SOD, GPx ve CAT aktiviteleri Tablo 1 ve 2'de verilmiştir. Bu çalışmada MTX uygulanması, böbrek dokusunda TBARS seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmasına, SOD, GPx ve CAT aktivitelerinin anlamlı şekilde azalmasına, GSH aktivitesindeyse istatistiksel anlamlılığa ulaşmayan azalmaya neden oldu. MTX ile birlikte BY uygulanması, tek başına MTX uygulanan gruba karşılaştırıldığında TBARS seviyesinde anlamlı bir azalmaya; SOD, GPx ve CAT aktivitelerinde anlamlı artışa, GSH aktivitesindeyse istatistiksel anlamlılığa ulaşmayan artışa neden oldu.

Tablo 1. MTX ve BY uygulanan ratların böbrek dokularındaki TBARS ve GSH seviyelerindeki ve SOD, GPx ve CAT aktivitelerindeki değişiklikler (n=7)

Böbrek	TBARS (nmol/g yaş doku)	GSH (nmol/mg doku prot)	SOD (U/mg doku prot)	GPx (U/mg doku prot)	CAT (U/mg doku prot)
Kontrol	106.82±4.97 ^a	10.68±0.88 ^{ab}	4.73±0.13 ^a	0.89±0.01 ^a	760.38±59.70 ^a
Balıkyacağı	117.19±3.34 ^a	12.59±0.59 ^b	4.86±0.10 ^a	0.94±0.03 ^a	791.22±23.49 ^a
Metotreksat	135.88±1.04 ^b	10.34±0.40 ^a	3.78±0.13 ^b	0.77±0.02 ^b	607.13±28.19 ^b
Met+BY	122.42±3.05 ^a	11.07±0.15 ^{ab}	6.36±0.37 ^a	0.95±0.02 ^a	780.97±30.30 ^a

^{a,b}: Aynı sütun içinde farklı üst simgeler taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıdır (p<0.05). Ortalama ± SEM

Tablo 2. MTX ve BY uygulanan ratların karaciğer dokularındaki TBARS ve GSH seviyelerindeki ve SOD, GPx ve CAT aktivitelerindeki değişiklikler (n=7)

Karaciğer	TBARS (nmol/g yaş doku)	GSH (nmol/mg doku prot)	SOD (U/mg doku prot)	GPx (U/mg doku prot)	CAT(U/mg doku prot)
Kontrol	61.50±6.05	7.30±0.49 ^{ad}	3.79±0.01 ^a	1.12±0.03 ^a	2020.69±137.35 ^a
Balıkyacağı	60.16±3.97	8.22±0.54 ^a	4.30±0.20 ^{ac}	1.20±0.08 ^a	2461.61±116.96 ^a
Metotreksat	69.05±5.07	5.29±0.16 ^{bc}	2.63±0.04 ^b	0.89±0.00 ^b	1184.05±78.59 ^b
Met+BY	64.43±7.06	5.95±0.70 ^{cd}	5.03±0.18 ^c	1.25±0.04 ^a	1560.41±137.35 ^c

^{a,b}: Aynı sütun içinde farklı üst simgeler taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıdır (p<0.05). Ortalama ± SEM

Karaciğer dokusunda, MTX uygulanması TBARS seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı olmamakla birlikte artışa; GSH, SOD, GPx ve CAT aktivitelerinin anlamlı şekilde azalmasına neden oldu. MTX ile birlikte BY uygulanması, tek başına MTX uygulanan grupla karşılaştırıldığında TBARS seviyesinde anlamlı olmamakla birlikte fark edilir şekilde azalmaya; GSH, SOD, GPx ve CAT aktivitelerindeyse anlamlı artışa neden oldu.

Tartışma

Sitotoksik bir antineoplastik ajan olan MTX, birçok malignitenin tedavisinde kullanılan bir folat antimetabolitidir. İmmünsüresif/ modölatör etkisi nedeniyle romatoid artrit ve bazı öteki romatizmal ve inflamatu r hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (11). Hücre içine girdikten sonra oluşan MTX-poli glutamatlar, dihidrofolat redüktaz enzimini potent biçimde inhibe eder. Dihidrofolat redüktaz enziminin inhibisyonu, sentezi için tetrahidrofolata ihtiyaç duyan timidin ve pürinlerin sentezini bloke ederek protein sentezini durdurur (12). Metotreksat, başta yüksek proliferasyon özellikli dokular olmak üzere bir çok doku ve organda, dozunun azaltılmasını/ kesilmesini gerektiren ciddi yan etkilere neden olur. Hepatotoksisite, nefrotoksisite, pulmotoksisite, hematotoksisite, nörotoksisite, kardiyotoksisite, gastrointestinal ve gonadaltoksisite ve neokarsinogenik etki başlıca yan etkileridir (13). Yan etkiler doz, uygulama yolu, uygulama sıklığı ve birlikte folinik asit kullanım durumuna bağlıdır.

Böbrekler ve karaciğer organizmada homeostaz, toksin/ metabolit/ ilaç eliminasyonu ve karmaşık metabolik işlevlerden sorumlu organlardır. Metotreksat kaynaklı nefrotoksisite ve hepatotoksisite; oksidatif

hasar, inflamasyon ve apoptozis patolojik süreçlerine bağlanmaktadır (14).

Bu çalışmada 20 mg/kg tek doz MTX uygulanması rat böbrek ve karaciğer dokularında kontrol grubuna göre TBARS düzeylerinde artışa ve SOD, GPx, GSH, CAT aktivitelerinde azalmaya neden oldu. Bu sonuçlar MTX etkisiyle oluşan oksidatif hasarı saptayan önceki çalışmalarla uyumluydu. Pinar ve ark. (15, 16), tek doz 20 mg/kg MTX uygulamasının rat böbrek ve karaciğer dokularında ve testis dokusunda MDA seviyelerini anlamlı şekilde arttırdığını ve SOD, CAT ve GPx aktivitelerini anlamlı şekilde azalttığını göstermiştir. Fikry ve ark. (17), çalışmalarında bir hafta arayla 2 kez 14 mg/kg oral MTX verilmesinin rat kalp dokusu MDA seviyesinde anlamlı bir artışa ve GSH seviyesi ile CAT aktivitesinde anlamlı bir azalmaya neden olduğunu saptamışlardır. Yalçın ve Gürel (14), benfotiamin uygulamasının MTX aracılı nefrotoksisitede, anlamlı biyokimyasal ve histolojik iyileşmeyle sonuçlandığını saptamışlardır. Öte yandan Vardi ve ark. (18), MTX aracılı hepatotoksisiteye bağlı artan oksidatif stresin beta karoten uygulamasıyla önemli ölçüde geri döndürüldüğünü ortaya koymuşlardır. Hafez ve ark. (1), bir TNF-α inhibitörü olan etanercept ve bir iNOS inhibitörü olan aminoguanidinin ayrı ayrı ve kombine olarak kullanımlarının MTX kaynaklı böbrek ve karaciğer hasarı üzerine etkilerini araştırmışlar ve her iki ajanın da oksidatif stres yolaklarını baskılayarak organ koruyucu etki yaptıklarını saptamışlardır.

Metotreksat yan etkilerine karşı BY'nın etkilerinin araştırıldığı az sayıda çalışma vardır. Vanderhoof ve ark. (19), balık yağının MTX kaynaklı mukozal hasarı iyileştirdiğini; Horie ve ark. (20), DHA'nın farelerde oral MTX uygulamasının neden olduğu ince bağırsak hasarını güçlü şekilde engellediğini; Nadhanan ve ark. (21), BY'nın MTX'in kemikler üzerinde oluşturduğu yan

etkileri engellediğini ortaya koymuşlardır. Metotreksat yan etkilerini oksidan-antioksidan sistem üzerinden değerlendiren Elbarbary ve ark. (22), akut lenfoblastik lösemi hastalarına tedavilerinde kullanılan MTX ile birlikte balık yağı kaynaklı 1000 mg omega-3 yağ asidi vermiş ve bu gruptaki hastaların tam kan SOD ve GPx aktiviteleri ile serum total antioksidan kapasite ve MDA düzeylerinde anlamlı bir düzelme oluştuğunu göstermişlerdir.

Bir başka çalışmada sarımsak suyu ekstresinin MTX kaynaklı nefrotoksisitede etkisi araştırılmış ve MTX uygulaması öncesi verilen sarımsak suyunun renal fonksiyonları ve dokuda antioksidan enzim düzeylerini artırdığı ortaya konulmuştur (23). Bu çalışmada 1000 mg

oral BY verilmesi MTX grubuna göre böbrek ve karaciğer dokularında, TBARS düzeylerinde azalmaya; CAT, SOD ve GPx aktivitelerinde ise artışa neden oldu. Benzer bir çalışmada, balık yağının MTX uygulamasının kemik dokusu üzerindeki enflamatuar/ oksidatif süreçleri biyokimyasal ve histolojik düzeyde anlamlı biçimde azalttığı ortaya konulmuştur (21).

Sonuç olarak bu çalışma, MTX'in böbrek ve karaciğer dokularında oksidatif hasara neden olduğunu ve BY'nın bu hasarı engelleme potansiyelini ortaya koymuştur. Bu nedenle BY, MTX tedavisi alan kişilerde oluşabilecek nefrotoksisite ve hepatotoksisitenin engellenmesinde faydalı olabilir.

Kaynaklar

- 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.
- Bernsen EC, Hagleitner MM, Kouwenberg TW, Hanff LM. Pharmacogenomics as a tool to limit acute and long-term adverse effects of chemotherapeutics: An update in pediatric oncology. *Front Pharmacol* 2020; 11: 1-19.
- Kamisli S, Ciftci O, Cetin A, et al. Fish oil protects the peripheral and central nervous systems against cisplatin-induced neurotoxicity. *Nutr Neurosci* 2014; 17: 116-126.
- Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 1998; 108: 101-106.
- Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* 2018; 54: 287-293.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
- Aebi H. Catalase. *Methods Enzym Anal* 1974; 673-684.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
- 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.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. The folin by oliver. *Readings* 1951; 193: 265-275.
- Wang W, Zhou H, Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *Eur J Med Chem* 2018; 158: 502-516.
- Howard SC, McCormick J, Pui C, et al. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *Oncologist* 2016; 21: 1471-1482.
- Campbell JM, Bateman E, Peters MDJ, et al. Fluoropyrimidine and platinum toxicity pharmacogenetics: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Pharmacogenomics* 2016; 17: 435-451.
- Yalçın A, Gürel A. Therapeutic potency of benfotiamine against methotrexate-induced kidney injury and irisin immunoreactivity. *Journal of Ankara Health Sciences (JAHS)* 2020; 9: 244-253.
- Pınar N, Kaplan M, Özgür T, Özcan O. Ameliorating effects of tempol on methotrexate-induced liver injury in rats. *Biomed Pharmacother* 2018; 102: 758-764.
- Pınar N, Çakırca G, Özgür T, Kaplan M. The protective effects of alpha lipoic acid on methotrexate induced testis injury in rats. *Biomed Pharmacother* 2018; 97: 1486-1492.
- Fikry EM, Hassan WA, Gad AM. Bone marrow and adipose mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibrosis induced by methotrexate in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2017; 31: 1-8.
- Vardi N, Parlakpınar H, Cetin A, et al. Protective effect of β -carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol Pathol* 2010; 38: 592-597.
- Vanderhoof JA, Blackwood DJ, Mohammadpour H, Park JH. Effect of dietary menhaden oil on normal growth and development and on ameliorating mucosal injury in rats. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 346-350.
- Horie T, Nakamaru M, Masubuchi Y. Docosahexaenoic acid exhibits a potent protection of small intestine from methotrexate-induced damage in mice. *Life Sci*. 1998; 62: 1333-1338.
- Nadhanan RR, Fan CM, Su YW, et al. Fish oil in comparison to folic acid for protection against adverse effects of methotrexate chemotherapy on bone. *J Orthop Res* 2014; 32: 587-596.
- Elbarbary NS, Ismail EAR, Farahat RK, El-Hamamsy M. ω -3 fatty acids as an adjuvant therapy ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: A randomized placebo-controlled study. *Nutrition* 2016; 32: 41-47.
- Ahmed WMS, Zaki A. Prevention of methotrexate-induced nephrotoxicity by concomitant administration of garlic aqueous extract in rat. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2015; 45: 507-516.