

Yaban Mersini Ekstresinin Metotreksat Kaynaklı Hepatotoksisite Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Investigation of the Effects of Bilberry Extract on Methotrexate-Induced Hepatotoxicity

Gökçen KERİMOĞLU¹, Gamze BİLGİN², Servet KERİMOĞLU³, Nihal TÜRKMEN ALEMDAR⁴,
Selim DEMİR⁵, Yüksel ALİAZICIOĞLU⁶

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Trabzon, TÜRKİYE

²Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Trabzon, TÜRKİYE

³Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Ana Bilim Dalı, Trabzon, TÜRKİYE

⁴Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Trabzon, TÜRKİYE

⁵Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Trabzon, TÜRKİYE

⁶Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Trabzon, TÜRKİYE

Öz

Amaç: Metotreksat (Mtx), kanser ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak Mtx, kendisi gibi birçok kemoterapötiklerin metabolizmasından sorumlu olan karaciğerde toksisiteye neden olabilir. Yaban mersini (Ym) meyvesi, yapısında yoğun olarak bulunan fenolik bileşikler sayesinde antioksidan ve antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Bu çalışma, Ym ekstresinin, Mtx kaynaklı hepatotoksisiteye olan etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır.

Materyal ve metod: Çalışma için 21 adet Sprague Dawley ırkı erişkin sıçan, sayıca eşit üç gruba bölündü. Bir gruba, deneyin ilk günü tek doz 30 mg/kg intraperitoneal (ip.) Mtx verildi (MtxG). Diğer gruba tek doz 30 mg/kg ip. Mtx ve beş gün boyunca günde bir kez oral gavajla 200 mg/kg Ym ekstresi verildi (Mtx+YmG). Kontrol grubuna ise herhangi bir işlem yapılmadı (KG). Deney sonunda alınan karaciğer dokularının bir kısmı histolojik olarak değerlendirilerek skorlanırken diğer kısmı da biyokimyasal olarak değerlendirildi.

Bulgular: MtxG'nin karaciğer dokularında malondialdehid (MDA) ve kaspaz 3 düzeyleri KG'ye göre yüksekti. KG'ye göre anlamlı olmamakla birlikte MtxG'de, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ve oksidatif stres indeksi (OSİ)'nde artış; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve total antioksidan kapasite (TOS)'de ise azalma mevcuttu. Mtx+YmG'de MDA düzeyleri MtxG'ye göre azaldı. Bu grupta, kaspaz 3, OSİ ve 8-OHdG düzeylerinde de MtxG'ye göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan belirgin bir azalma görüldü. Ayrıca bu gruptaki SOD seviyesi KG'ye göre düşüken CAT ve total antioksidan kapasite (TAS) seviyeleri ise MtxG'ye göre istatistiksel anlamlı olmasa da yüksekti. MtxG'de; total hasar skorunda, hepatositlerdeki vakuolizasyon/dejenerasyon/piknoziste, Kupffer hücrelerinde ve vazodilatasyon/konjesyonda kontrole göre artış mevcuttu. Mtx+YmG'de ise tüm bu histopatolojik bulgularda ve total hasar skorunda azalma mevcuttu.

Sonuç: Oral yolla uygulanan Ym ekstresi, sıçan karaciğerindeki Mtx kaynaklı oksidatif stresi, apoptozu ve bunların neden olduğu hepatotoksisiteyi azaltabilir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, Metotreksat, Oksidatif stress, Yaban mersini

Abstract

Background: Methotrexate (Mtx) is widely used in the treatment of cancer and autoimmune diseases. But it can cause toxicity in the liver, which is responsible for the metabolism of many chemotherapeutics such as Mtx. Bilberry (Bb) fruit has antioxidant and anti-inflammatory effects thanks to the phenolic compounds it contains. This study aims to investigate the effects of oral Bb extract on Mtx-induced hepatotoxicity.

Materials and Methods: For the study, 21 Sprague Dawley adult rats were divided into three groups equal in number. One group was given a single dose of 30 mg/kg intraperitoneal (ip.) Mtx on the first day of the experiment (MtxG). The other group was given a single dose of 30 mg/kg ip. Mtx and 200 mg/kg Bb extract by oral gavage once a day for five days (Mtx+BbG). No procedure was applied to the control group (CG). While some of the liver tissues taken at the end of the experiment were evaluated and scored histologically, the other part was evaluated biochemically.

Results: Malondialdehyde (MDA) and caspase 3 levels were higher in liver tissues of MtxG than CG. Although it is not significant according to CG, there was an increase in 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and oxidative stress index (OSI), but a decrease in superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and total antioxidant capacity (TOS) in MtxG. In Mtx+BbG, MDA levels decreased compared to MtxG. In this group, a nonsignificant statistical decrease was also observed in caspase 3, OSI and 8-OHdG levels compared to MtxG. In addition, while the SOD level in this group was lower than in CG; CAT and total antioxidant status (TAS) levels were higher than in MtxG, although not statistically significant. In MtxG, there was an increase in total damage score, vacuolization/degeneration/pyknosis in hepatocytes, Kupffer cells and sinusoidal vasodilation/congestion compared to the control. In Mtx+BbG, there was a decrease in all these histopathological findings and the total damage score.

Conclusions: Orally administered Bb extract may reduce Mtx-induced oxidative stress, apoptosis, and the hepatotoxicity caused by them in rat liver.

Key Words: Liver, Methotrexate, Oxidative stress, Bilberry

Sorumlu Yazar/Corresponding Author

Dr. Gökçen KERİMOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Trabzon, TÜRKİYE

E-mail: gokcen_kaplan@yahoo.com

Geliş tarihi / Received: 05.10.2023

Kabul tarihi / Accepted: 23.10.2023

DOI: 10.35440/hutfd.1367773

Giriş

Karaciğer, kanser tedavisinde kullanılan bazı kemoterapötik ilaçlar da dahil olmak üzere çoğu ilacın metabolizmasından sorumlu bir organdır (1). Bu nedenle sisplatin, siklofosamid ve metotreksat (Mtx) gibi birçok kemoterapötik ajan, karaciğerde toksik etkilere neden olabilir (2-4). Hatta oluşan bu karaciğer hasarı, kullanılan ilacın metabolizmasını bozabilir ve bu durum hasarı daha da artırabilir (1). Mtx, uzun yıllardan beri lösemi ve akciğer kanseri gibi birçok kanser türünün yanında romatoid artrit ve psöriazis gibi otoimmün hastalıkların ve ektopik gebeliğin tedavisinde de kullanılan bir folat antagonisti kemoterapötiktir (5,6). Mtx kullanımı, kanser ve otoimmün hastalıklardaki faydalı etkilerinin yanında akciğer, böbrek ve karaciğer gibi organlarda toksik etkilere neden olabilir. Karaciğerdeki Mtx kaynaklı toksik etkinin nedeni kesin olarak bilinmemekle beraber; dokulardaki reaktif oksijen türleri (ROS), oksidatif stres, enflamasyon, DNA hasarı ve apoptoz artışına bağlı olabilir (7). Literatürde Mtx kaynaklı karaciğer toksisitesini azaltmak amacıyla yapılan çalışmalarda; üzüm çekirdeği, limon otu ve siyah kaküle (amomum subulatum) gibi antioksidan ve antienflamatuvar özellikleri bilinen birçok farklı bitki ekstresi denenmiştir (8-10).

Yaban mersini (Ym) (*Vaccinium myrtillus*), genellikle taze olarak tüketilmekle birlikte; kurutulmuş, dondurularak ve meyve suyu ve reçel yapılarak da tüketilebilen bir meyvedir (11). Günümüzde hem kendisi hem de yaprakları, farmakolojik ve endüstriyel olarak gittikçe daha fazla ilgi çekmektedir (11,12). Ym yaprakları, içerdiği çok sayıda polifenolik bileşikten kaynaklandığı düşünülen tedavi edici etkileri nedeniyle birçok ülkede geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır (12). Ym meyvesinin de yapısında bulunan fenolik asitler ve flavanoidler gibi fenolik bileşikler yanı sıra gallik asit, klorojenik asit ve askorbik asit gibi organik asitler nedeniyle doğal antioksidan ve antienflamatuvar özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (11,13). Ym yapısında bol miktarda bulunan ve flavanoidlerden olan antosiyaninler sayesinde mavi-mor renkli, küçük bir meyvedir (11). Yapılan deneysel çalışmalarda, karbon tetraklorür ve yüksek yağ-kolesterol içeren diyet kaynaklı karaciğer hasarına karşı Ym'nin antioksidan ve antienflamatuvar etkileri gösterilmiştir (14,15). Ancak literatürde, Mtx kaynaklı hepatotoksisite üzerine Ym'nin etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Bu nedenle çalışmamızda; sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan Mtx kaynaklı hepatotoksisite üzerine oral yolla verilen Ym meyve ekstresinin etkilerinin biyokimyasal ve histolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Çalışmamız, Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınarak yapıldı (Onay no: 2022/49). Deney süresince tüm sıçanlar Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde bulunan; ortalama 22±2°C sıcaklık, %50±5 nisbi nem ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsüne sahip bir odadaki kafeslerde tutuldu. Bu çalışmada kullanılan 21 adet Sprague Dawley ırkı erişkin

dişi sıçan; her birinde eşit sayıda sıçan olacak şekilde rastgele üç gruba bölündü. İlk grup, kontrol grubu (KG) olup bu gruba hiçbir işlem uygulanmadı. Deneyin ilk günü intraperitoneal (ip.) tek doz 30 mg/kg Mtx uygulanan Mtx grubu (MtxG) bir diğer gruptu. Son grup ise Mtx ve Ym grubu (Mtx+YmG) olup bu gruba; deneyin ilk günü tek doz ip. 30 mg/kg Mtx ve ilave olarak beş gün süresince her gün aynı saate bir kez oral gavajla 200 mg/kg (literatüre göre belirlenen dozda) Ym ekstresi uygulandı (16). Deney sonunda, tüm sıçanlar 10 mg/kg ip. ksilazin hidroklorür (Rompun®; Bayer, Leverkusen, Almanya) ve 50 mg/kg ip. ketamin hidroklorür (Ketalar®; Pfizer, İstanbul, Türkiye) ile derin anestezi altında iken karaciğer dokuları alındı ve sonra kansızlaştırma yoluyla sakrifiye edildi. Alınan karaciğer dokularının bir kısmı, serum fizyolojik (SF) ile yıkayıp biyokimyasal analizler yapılmaya kadar -80°C'de tutulurken; bir kısmı da, histopatolojik analizler için % 10 luk formalin solüsyonunda tespit edildi.

Yaban mersini ekstresinin elde edilmesi

Olgun Ym meyveleri dallarından özenle toplandıktan sonra 45°C'de kurutuldu. Kurutulmuş meyveler, laboratuvar değirmeni (Retsch ZM200, Haan, Almanya) ile toz haline gelene kadar öğütüldü. Bu örnekten ayrılan 3 g toz Ym, 30 mL saf etanol ile iyice karıştırıldı. Daha sonra Ym tozu-etanol karışımı, 45°C'de 150 rpm'de sürekli çalkalanarak 24 saat boyunca inkübe edildi. Bu sürenin sonunda karışım; 10 dakika süresince 1800xg'de santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant, süzgeç kağıdından süzülüp 0.2 µm'lik filtreden geçirildi. Son olarak bu etanollü ekstre, deneyde kullanılmak üzere ışık geçirmez malzemeyle kaplı kavanozda +4°C'de saklandı (17).

Histolojik analiz

%10'luk formalin solüsyonunda bekletilen dokular 3 günlük tespitten sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (sırasıyla %70'lik, %90'lık, %96'lık ve absölü alkol) dehidrate edildi. Dokular, daha sonra sırasıyla ksilen ve yumuşak parafinle muamele edilerek 58°C'deki parafine gömüldü. Elde edilen bloklar; önce oda ısısında, parafin soğuyup sertleştikten sonra 4°C'de buzdolabında tutuldu. Buzdolabında soğutulan parafin bloklardan, yarı otomatik mikrotom yardımıyla (Leica RM 2255, Leica Instruments, Nussloch, Almanya) 4-5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Lam üzerine alınan kesitler, hematoksilen-eozin (HE) boyası ile boyanarak lamelle kapatıldı. Hazırlanan boyalı kesitler, ışık mikroskopunda (Olympus BX 51, Japonya) histopatolojik olarak incelendi ve fotoğraflar, mikroskoba entegre dijital fotoğraf makinesi (Olympus, DP 71, Japonya) ile çekildi. Kesitlerdeki karaciğer hasarını göstermek için 3 temel kriter (a. Hepatositlerde vakuolizasyon/piknoz/dejenerasyon b. Kupffer hücre aktivasyonu ve c. Sinüzoidlerde dilatasyon/konjesyon) belirlendi. Tüm boyalı kesitler, her bir kriter için 0 ile 3 arasında (0: hasar yok, 1: hafif hasar, 2: orta hasar ve 3: ciddi hasar) değerler verilerek maksimum total hasar skoru 9 olmak üzere skorlandı (2).

Biyokimyasal analiz

Karaciğer dokusundaki malondialdehit (MDA) ve 8 hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) seviyeleri; ELISA kitler (sırasıyla YLBiont, Cat No: YLA0029RA, Shanghai, Çin ve YLBiont, Cat No: YLA0061RA, Shanghai, Çin) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar sırasıyla nmol/mg protein ve ng/mg protein olarak verildi. Doku örneklerindeki total oksidan kapasite (TOS) ve total antioksidan kapasite (TAS) seviyeleri; kolorimetrik kitler (sırasıyla Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0024, Gaziantep, Türkiye ve Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0017, Gaziantep, Türkiye) yardımıyla belirlendi ve sonuçlar; sırasıyla $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L ve mmol TE/L birimiyle verildi. Oksidatif stres indeksi (OSİ) ise takip eden formül kullanılarak hesaplandı (OSİ=[(TOS, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L)/(TAS, $\mu\text{mol TE/L}$)]x100) (18). Doku örneklerinin süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) seviyeleri, ELISA kitler (sırasıyla YLBiont, Cat No: YLA0115RA, Shanghai, Çin ve USCN, Cat No: SEC418Ra, Wuhan, Çin) kullanılarak ölçüldü ve sonuçlar ng/mg protein olarak verildi. Dokulardaki kaspaz-3 seviyeleri de, üretici firmanın tavsiyelerine göre ELISA kit (YLBiont, Cat No: YLA0017RA, Shanghai, Çin) ile ölçülerek sonuçlar, ng/mg protein şeklinde ifade edildi.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 22.0 kullanılarak yapıldı. Parametrik olmayan veriler Kruskal-Wallis; parametrik veriler ANOVA ve post hoc Tukey testi ile analiz edildi. Sonuçlar ortalama±standart sapma (SD) şeklinde verildi ve istatistiksel olarak anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edildi.

Bulgular**Biyokimyasal bulgular**

MtxG'de, MDA ve kaspaz 3 düzeylerinde KG'ye göre istatistiksel anlamlı artış görüldü. (sırasıyla, $p=0,003$ ve $p=0,02$). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, MtxG'nin 8-OHdG ve OSİ düzeyleri KG'ye göre yüksek bulunurken; SOD, CAT ve TAS seviyeleri ise KG'ye göre azalmıştı.

Mtx+YmG'de, MDA düzeyinin MtxG'ye göre belirgin olarak azaldığı tespit edildi ($p=0,003$). Benzer şekilde Mtx+YmG'nin OSİ, 8-OHdG ve kaspaz 3 seviyelerinde de istatistiksel olarak fark yaratmasa da MtxG'ye göre belirgin düşüş vardı. İlave olarak, Mtx+YmG'nin CAT ve TAS seviyeleri de MtxG'ye göre istatistiksel anlamlı olmasa da yüksekti. Ancak Mtx+YmG'nin SOD seviyesinde, KG'ye göre bir azalma mevcuttu ($p=0,04$) (Tablo 1).

Tablo 1. Karaciğer dokusuna ait biyokimyasal veriler

	KG	MtxG	Mtx+YmG
MDA	12,5±5,9	32,8±8,30*	12,1±8,3**
8-OHdG	0,07±0,01	0,12±0,04	0,07±0,02
TOS	20,48±0,94	19,92±2,26	20,44±3,54
OSİ	6,89±1,30	9,23±2,97	7,24±3,45
TAS	0,30±0,04	0,24±0,06	0,29±0,12
SOD	0,45±0,18	0,27±0,03	0,23±0,09*
CAT	24,12±12,44	18,98±16,09	22,84±23,36
Kaspaz-3	0,06±0,00	0,12±0,04*	0,07±0,02

Malondialdehid (MDA), 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), total oksidan kapasite (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ), total antioksidan kapasite (TAS), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT). Kontrol grubu (KG), metotreksat grubu (MtxG) ve metotreksat ve yaban mersini grubu (Mtx+YmG).

Veriler mean±SD olarak verilmiştir.

* $p<0,05$ KG'ye göre.

** $p<0,05$ MtxG'ye göre.

Histolojik bulgular

KG'ye ait karaciğer dokularında, santral vene doğru uzanan kordonlar şeklinde düzenlenmiş tek veya çift çekirdekli, normal görünümlü hepatositler ve hepatosit kordonları arasında doğal görünümlü sinüzoidler mevcuttu (Şekil 1A). KG ile kıyaslandığında MtxG'de; hepatositlerde vakuolizasyon/dejenerasyon/piknozis, Kupffer hücrelerinde artış ve

sinüzoidlerde dilatasyon/konjesyon mevcuttu. Ayrıca total hasar skoru da yüksekti (hepsi için $p<0,001$). İlave olarak MtxG'deki karaciğer dokularında yer yer nekroz ve hemoraji de mevcuttu (Şekil 1B). Mtx+YmG'de ise tüm bu patolojilerde belirgin azalma mevcut olup karaciğer dokusunun genel görünümünde düzelme mevcuttu (Şekil 1C) (Tablo 2).

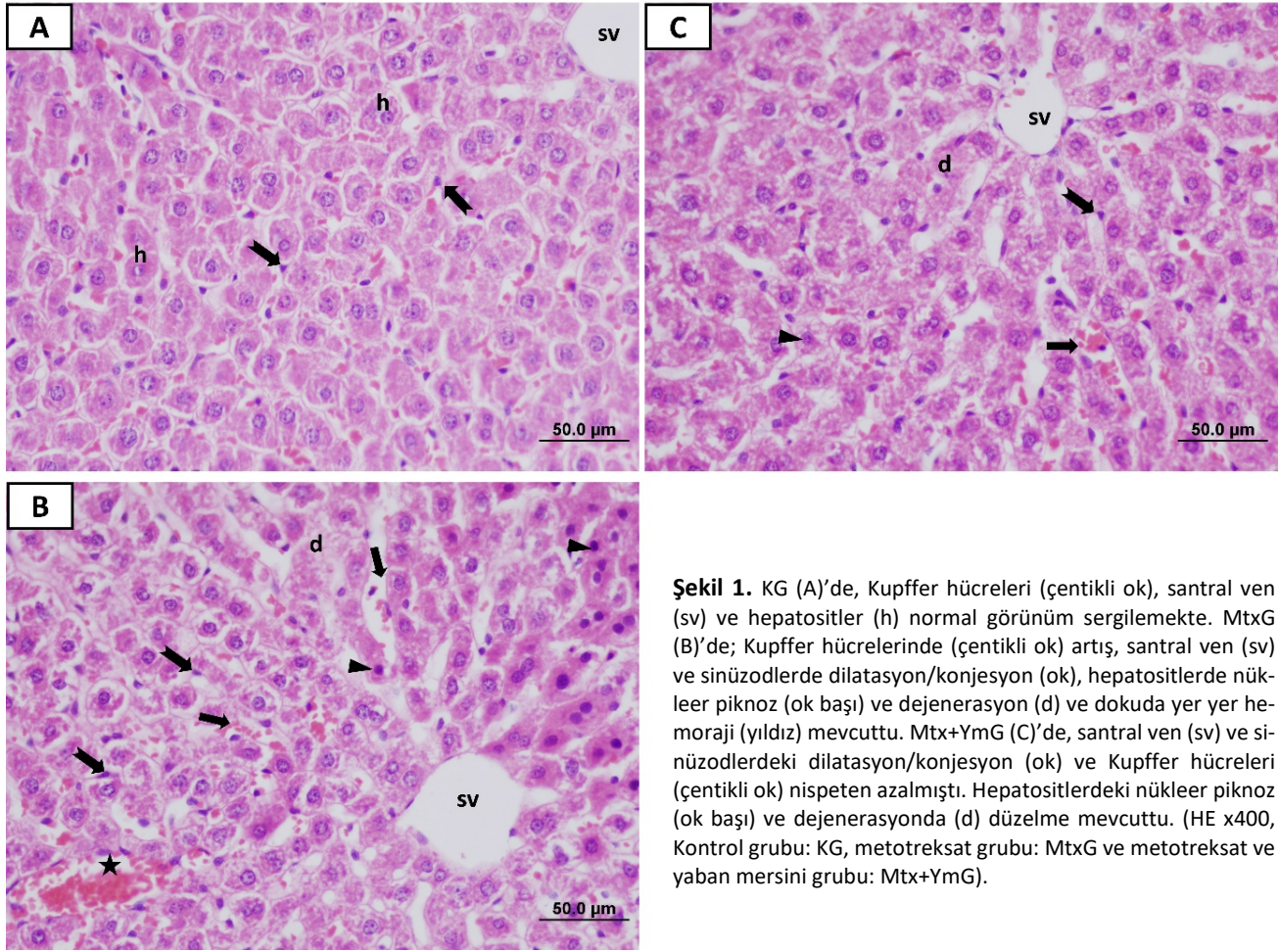
Tablo 2. Karaciğer dokusuna ait histopatolojik hasar skoru

	Hepatositlerde vakuolizasyon/ dejenerasyon/nükleer piknozis	Kupffer hücre aktivasyonu	Vazokonjesyon/ dilatasyon	Total skor
KG	0,42±0,53	0,14±0,37	0,71±0,48	1,14±0,37
MtxG	2,71±0,48*	2,28±0,48*	2,57±0,53*	7,57±0,53*
Mtx+YmG	1,71±0,48	1,42±0,53	1,85±0,37	5,14±0,69

Kontrol grubu (KG), metotreksat grubu (MtxG) ve metotreksat ve yaban mersini grubu (Mtx+YmG).

Veriler mean±SD olarak verilmiştir.

* $p<0,05$ KG'ye göre.



Şekil 1. KG (A)'de, Kupffer hücreleri (çentikli ok), santral ven (sv) ve hepatositler (h) normal görünüm sergilemekte. MtxG (B)'de; Kupffer hücrelerinde (çentikli ok) artış, santral ven (sv) ve sinüzodlerde dilatasyon/konjesyon (ok), hepatositlerde nükleer piknoz (ok başı) ve dejenerasyon (d) ve dokuda yer yer hemoraji (yıldız) mevcuttu. Mtx+YmG (C)'de, santral ven (sv) ve sinüzodlerdeki dilatasyon/konjesyon (ok) ve Kupffer hücreleri (çentikli ok) nispeten azalmıştı. Hepatositlerdeki nükleer piknoz (ok başı) ve dejenerasyonda (d) düzelleme mevcuttu. (HE x400, Kontrol grubu: KG, metotreksat grubu: MtxG ve metotreksat ve yaban mersini grubu: Mtx+YmG).

Tartışma

Mtx, farklı kanser türlerinden otoimmün hastalıklara kadar geniş kullanım alanına sahip olan folat antagonisti bir anti-metabolit kemoterapötiktir (19,20). Mtx, folata olan yapısal benzerliği sebebiyle, dihidrofolat enziminin çalışmasını bloke ederek pürin ve pirimidin bazlarının ve DNA'nın sentezini bozup dolaylı yoldan hücre ölümüne neden olur (19). Mtx, tedavi edici etkilerinin yanında nefrotoksisite ve hepatotoksisite gibi klinik kullanımını sınırlayan bazı istenmeyen etkilere de sahiptir (19,20). Mtx kaynaklı hepatotoksisitenin nedeni henüz tam olarak belirlenememiştir. Ancak Mtx'in, aralarında karaciğerin de olduğu birçok dokuda, hücre ölümünün yanında özellikle oksidatif stres, nitroztatif stres ve enflamasyonu artırarak hasara neden olabileceği bilinmektedir (20-22).

Oksidatif stres, normal durumda hücrede de üretilen ve bazı fizyolojik olaylarda da görev alan ROS gibi oksidanlar ile SOD, CAT ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik veya glutatyon (GSH) gibi nonenzimatik endojen antioksidanlar arasındaki dengenin, oksidanlar lehine bozulması ile oluşur (23,24). Antioksidanlarca dengelenemeyen ROS, hücrede lipidlere, proteinlere ve DNA'ya hasar verebilir. ROS etkisi ile DNA'da oluşan hasar 8-OHdG ölçümü ve hücre lipidlerinde oluşan hasar ise MDA ölçümü ile gösterilebilir (24). Samdancı ve ark.'nın çalışması, tek doz Mtx uygulamasının sıçan

karaciğer dokularında MDA düzeyini artırdığını gösterdi (21). Başka çalışmalarda da farklı doz ve sürelerde Mtx uygulamasının doku MDA düzeylerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (22,25-27). Ayrıca Mtx karaciğer dokusunda oksidatif stres göstergelerinden olan TOS'ta da artışa neden olabilir (19,28). Çalışmamızda da MtxG'nin MDA ve istatistiksel anlamlı olmasa da TOS seviyelerinde literatürle uyumlu artış mevcuttu. Bu artışın, Mtx'in dokularda neden olduğu oksidatif stresten kaynaklanmış olabileceğini düşündük.

Mtx oksidatif stresi farklı yollarla artırabilir. Mtx metaboliti olan Mtx-poliglutamatlar (Mtx-PGs), oksidan seviyelerini artırmalarının yanında, antioksidanları da baskılayarak karaciğer dokusunda oksidatif stresi indükleyebilir (29). Mtx uygulamasının; SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerde ve GSH'de azalmaya yol açtığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir (27,30) ilave olarak Mtx TAS'ta da azalmaya neden olabilir (28). Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak MtxG'deki TAS, CAT ve SOD düzeylerinde, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte bir düşüş saptadık.

Apoptoz, etkilenen hücrede yapısal olarak önce büzülme ve hücre çekirdeğinde piknozun görüldüğü sonra da hücre sitoplazmasının ve organellerinin membranla çevrili küçük parçacıklara ayrıldığı enerji gerektiren programlı hücre ölü-

müdür (29). Mtx kaynaklı oksidatif stres, hücrelerde apoptoza neden olabilir (22,27). Mtx-PGs de karaciğer hücrelerinde oksidatif strese neden olabildiği gibi, intrinsek yol üzerinden kaspaz 3'ü indükleyerek apoptoza da neden olabilir (7). Mtx'in karaciğer dokusunda yol açtığı kaspaz 3 ve apoptoz artışının gösterildiği birçok çalışma mevcuttur (22,27,31). Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak en yüksek kaspaz 3 düzeylerinin MtxG'de olduğunu gördük. Bu artışın, Mtx ve/veya Mtx-PGs tarafından indüklenen oksidatif stres ve apoptoza bağlı olabileceğini düşündük. Mtx, karaciğer hücrelerinde vakuolizasyon, dejenerasyon ve nükleer piknoza ve sinüzoidlerde dilatasyon ve konjesyona neden olabilir (20,22,25). İlave olarak Kupffer hücrelerinde artışa ve dokuda enflamasyona da yol açabilir (25,31). Mtx, bizim çalışmamızda da literatüre benzer şekilde karaciğer sinüzoidlerinde dilatasyon/konjesyona, Kupffer hücrelerinde artışa, hepatositlerde vakuolizasyon/dejenerasyon/piknoz gibi patolojik değişikliklere neden oldu.

Yapısında fenolik bileşikler ve antosiyaninler gibi çok sayıda biyoaktif bileşik barındıran Ym meyvesi, antioksidan, anti-enflamatuvar, antimikrobiyal, hipoglisemik, ve kardiyoprotektif etkilere sahiptir (11). Özlem ve ark., ovarium iskemisi reperfüzyon hasarı oluşturdukları sıçanların over dokularında Ym'nin MDA'da azalmaya; CAT ve SOD'da ise artışa yol açtığını gördüler (32). Propionibacterium acnes ve lipopolisakkarid ile karaciğer hasarının indüklendiği bir başka çalışmada; Ym'nin, oksidatif stres belirteci MDA ve birçok enflamatuvar belirteçte düşüşe neden olduğu bildirildi (33). Karbon tetraklorür (CCl₄) ile indüklenen karaciğer hasarında Ym'nin, proenflamatuvar belirteçlerde düşüş ve antioksidan savunma kapasitesinde artış oluşturduğu gözlemlendi (14). Ayrıca, Ym ekstresinin kısıtlama stresi uygulanan farelerde artan ROS'u temizlediği ve karaciğerde bozulan mitokondriyal fonksiyonu düzelttiği bildirildi (34). Bizim çalışmamızda da Ym, literatürle uyumlu olarak karaciğer doku MDA'sında anlamlı düşüşe neden oldu. İlave olarak bu grupta istatistiksel anlamlı olmasa da 8-OHdG ve OSİ'de azalma ve TAS ve CAT'da artış mevcuttu. Bu durumun Ym ekstresinin sahip olduğu antioksidan kapasiteye bağlı olabileceğini düşündük. Ym ekstresinin, bir deneysel çalışmada kafa travması etkisiyle beyinde ve bir başka çalışmada ise ışık sebebiyle retinada artmış olan apoptozu azalttığı gösterilmiştir (35,36). Biz de Ym uygulanan gruptaki karaciğer dokularında apoptozun literatürle uyumlu olarak azaldığını tespit ettik. Ym, karaciğer dokusunda apoptozu azalttığı gibi enflamasyonu, Kupffer hücre sayısını ve nekrozu da azaltabilir (14). Bizim çalışmamızda da literatüre benzer şekilde Ym ekstresi karaciğerde görülen Mtx kaynaklı histopatolojik hasarı azalttı.

Sonuç olarak Ym ekstresi, sıçan karaciğerindeki Mtx kaynaklı oksidatif stres, apoptoz ve doku hasarını azaltabilir. Çalışmamızda da gösterilen antioksidan, anti-enflamatuvar ve antiapoptotik etkileri ile Ym meyvesi, Mtx kaynaklı hepatotoksisiteyi önlemek için muhtemel bir oral tamamlayıcı

tedavi olabilir ancak bunun için ilave deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik onam: Çalışma için Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Onay no: 2022/49).

Yazar Katkıları:

Konsept: G.K., G.B., S.K.

Literatür Tarama: G.K., G.B., S.K., N.T.A., S.D.

Tasarım: G.K., S.K., S.D., Y.A.

Veri toplama: G.K., S.K., G.B., N.T.A., S.D., Y.A.

Analiz ve yorum: G.K., G.B., N.T.A., S.D., Y.A.

Makale yazımı: G.K., S.K., S.D., Y.A.

Eleştirel incelenmesi: G.K., S.K., G.B., N.T.A., S.D., Y.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma herhangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Kaynaklar

1. Mudd TW, Guddati AK. Management of hepatotoxicity of chemotherapy and targeted agents. Am J Cancer Res. 2021 Jul 15;11(7):3461-3474.
2. Işeri S, Ercan F, Gedik N, Yüksel M, Alican I. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. Toxicology. 2007 Feb;230(2-3):256-264.
3. Gedikli S, Şengül E. Ratlarda Siklofosamid ile İndüklenen Hepatotoksisite Üzerine Kuersetinin Etkileri. Dicle Tıp Dergisi. 2019;46(1):41-50.
4. Özgöçmen M, Aşçı H, Doğan HK, İlhan İ, Pekköz Ş, Mustafaoğlu A. A study on Wistar Albino rats: investigating protective role of ramelteon on liver damage caused by methotrexate. Drug Chem Toxicol. 2022;45(6):2678-2685.
5. Hamed KM, Dighriri IM, Baomar AF, Alharthy BT, Alenazi FE, Alali GH et al. Overview of Methotrexate Toxicity: A Comprehensive Literature Review. Cureus. 2022 Sep 23;14(9):e29518.
6. Koca I, Ucar M, Tutoglu A, Berhögü A, Boyacı A. Henschönlein Purpura induced by Low-Dose Methotrexate. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2014;11(3):316-320.
7. Ezhilarasan D. Hepatotoxic potentials of methotrexate: Understanding the possible toxicological molecular mechanisms. Toxicology. 2021 Jun 30;458:152840.
8. Abdul-Hamid M, Abdel-Reheim ES, Hegazy W, Allam A, Othman SI, Alwaele MA. Effect of gervinal in attenuating hepatotoxicity caused by methotrexate or azathioprine in adult albino rats. Environ Sci Pollut Res Int. 2022 Jul;29(31):46788-46801
9. Shahani S, Mehraban N, Talebpour Amiri F, Abedi SM, Noaparast Z, Mohammadinia S. Melissa Officinalis L. aqueous extract pretreatment decreases methotrexate-induced hepatotoxicity at lower dose and increases^{99m}Tc-phytate liver uptake, as a probe of liver toxicity assessment, in rats. Ann Nucl Med. 2023 Mar;37(3):166-175.
10. Drishya S, Dhanisha SS, Guruvayoorappan C. Antioxidant-rich fraction of Amomum subulatum fruits mitigates experimental methotrexate-induced oxidative stress by regulating TNF- α , IL-1 β , and IL-6 proinflammatory cytokines. J Food Biochem. 2022 Apr;46(4):e13855.
11. Pires TCSP, Caleja C, Santos-Buelga C, Barros L, Ferreira ICFR. Vaccinium myrtillus L. Fruits as a Novel Source of Phenolic Compounds with Health Benefits and Industrial Applications

- A Review. *Curr Pharm Des.* 2020;26(16):1917-1928.
12. Ștefănescu R, Laczkó-Zöld E, Ósz BE, Vari CE. An Updated Systematic Review of *Vaccinium myrtillus* Leaves: Phytochemistry and Pharmacology. *Pharmaceutics.* 2022 Dec 21;15(1):16.
 13. Sharma A, Lee HJ. Anti-Inflammatory Activity of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Curr Issues Mol Biol.* 2022 Sep 30;44(10):4570-4583.
 14. Popović D, Đukić D, Katić V, Jović Z, Jović M, Lalić J. Antioxidant and proapoptotic effects of anthocyanins from bilberry extract in rats exposed to hepatotoxic effects of carbon tetrachloride. *Life Sci.* 2016 Jul 15;157:168-177.
 15. Haga S, YiMin, Yamaki H, Jin S, Sogon T, Morita N. Extracts of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits improve liver steatosis and injury in mice by preventing lipid accumulation and cell death. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019 Nov;83(11):2110-2120.
 16. Pandir D, Kara O. Chemopreventive effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage as shown by the comet assay in peripheral blood of rats. *Biologia.* 2014;69:811-816
 17. Demir S, Turan I, Demir F, Ayazoglu Demir E, Aliyazicioglu Y. Cytotoxic Effect of *Laurocerasus officinalis* Extract on Human Cancer Cell Lines. *Marmara Pharmaceutical Journal.* 2017;21(1):121-126.
 18. Tusat M, Mentese A, Demir S, Alver A, Imamoglu M. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. *Int Braz J Urol.* 2017;43(6):1160-1166.
 19. Pekköz S, Asci H, Erzurumlu Y, Savran M, İlhan I, Hasseyid N. Nebivolol alleviates liver damage caused by methotrexate via AKT1/Hif1 α /eNOS signaling. *Drug Chem Toxicol.* 2022 Sep;45(5):2153-2159.
 20. Abdel-Daim MM, Khalifa HA, Abushouk AI, Dkhil MA, Al-Quraishy SA. Diosmin Attenuates Methotrexate-Induced Hepatic, Renal, and Cardiac Injury: A Biochemical and Histopathological Study in Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:3281670.
 21. Samdanci ET, Huz M, Ozhan O, Tanbek K, Pamukcu E, Akatli AN. Cytoprotective effects of molsidomine against methotrexate-induced hepatotoxicity: an experimental rat study. *Drug Des Devel Ther.* 2018 Dec 20;13:13-21.
 22. Al-Khawalde AAA, Abukhalil MH, Jghef MM, Alfwuaires MA, Alaryani FS, Aladaileh SH. Punicalagin Protects against the Development of Methotrexate-Induced Hepatotoxicity in Mice via Activating Nrf2 Signaling and Decreasing Oxidative Stress, Inflammation, and Cell Death. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 15;23(20):12334.
 23. Aslanköç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2019; 26(3): 362-369.
 24. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763.
 25. Ghoneum M, El-Gerbed MSA. Human placental extract ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via regulating antioxidative and anti-inflammatory responses. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2021 Dec;88(6):961-971.
 26. Türk S, Kazak F, Peker P, Kısaçam M.A. Rutin Attenuates Methotrexate-Induced Hepatic Oxidative Stress in Rats. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi.* 2021;16(3):291-297.
 27. Kızıl HE, Çağlayan C, Darendelioğlu E, Ayna A, Gür C, Kandemir FM, Küçükler S. Morin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity via targeting Nrf2/HO-1 and Bax/Bcl2/Caspase-3 signaling pathways. *Mol Biol Rep.* 2023 Apr;50(4):3479-3488.
 28. Özgöçmen M, Yesilot S. The role of resveratrol in hepatotoxicity caused by methotrexate. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2021;6(2):57-63.
 29. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol.* 2021;81(4):1133-1143.
 30. Gürel A, Kaya K. Bromelain has Antioxidant Effect on Methotrexate Hepatotoxicity and Nephrotoxicity . *Van Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2022;15(1):37-42.
 31. Parthasarathy M, Prince SE. *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees Alleviates Methotrexate-Induced Hepatotoxicity in Wistar Albino Rats. *Life (Basel).* 2023 May 12;13(5):1173.
 32. Ozlem K, Birkan Y, Mustafa K, Emin K. Protective effect of *Vaccinium myrtillus* on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2018 Dec;57(6):836-841.
 33. Luo H, Lv XD, Wang GE, Li YF, Kurihara H, He RR. Anti-inflammatory effects of anthocyanins-rich extract from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on croton oil-induced ear edema and *Propionibacterium acnes* plus LPS-induced liver damage in mice. *Int J Food Sci Nutr.* 2014;65(5):594-601.
 34. Bao L, Abe K, Tsang P, Xu JK, Yao XS, Liu HW. Bilberry extract protect restraint stress-induced liver damage through attenuating mitochondrial dysfunction. *Fitoterapia.* 2010 Dec;81(8):1094-101.
 35. Ozdemir A, Mercantepe T, Erdvanlı B, Sen A, Mercantepe F, Tumkaya L. Neuroprotective effects of *Vaccinium myrtillus* on damage-related brain injury. *J Chem Neuroanat.* 2023 Jan;127:102193.
 36. Wang Y, Zhao L, Lu F, Yang X, Deng Q, Ji B. Retinoprotective Effects of Bilberry Anthocyanins via Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Apoptotic Mechanisms in a Visible Light-Induced Retinal Degeneration Model in Pigmented Rabbits. *Molecules.* 2015 Dec 14;20(12):22395-410.