



Ratlarda Methotrexate Kaynaklı Karaciğer Toksisitesine Karşı Silymarin ve Naringin'in Yararlı Etkileri*

Fatih Mehmet KANDEMİR¹, Sefa KÜÇÜKLER¹, Cüneyt ÇAĞLAYAN²✉

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
2. Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bingöl, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
22.12.2016	08.03.2017	30.10.2017

Öz: Karaciğer toksisitesi, kemoterapötik bir ilaç olan methotrexate (MTX) terapisinin komplikasyonlarının sonucunda oluşur. Silymarin (SLY) ve naringin (NRG) antioksidant, anti-inflamatuvar ve anti-hiperlipidemik gibi birçok farmakolojik özelliklere sahip biyoflavonoidlerdir. Bu çalışma ratlarda MTX kaynaklı karaciğer toksisitesi üzerine SLY ve NRG'in yararlı etkilerinin araştırılması için yapılmıştır. Ratlara (20 mg/kg) tek doz periton içi MTX verildikten sonra 7 gün boyunca (25 ve 50 mg/kg) SLY ve (50 ve 100 mg/kg) NRG tedavisi oral yoldan gavaj ile verilmiştir. MTX; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzim aktivitelerini ve glutatyon (GSH) seviyesini azaltıp, lipid peroksidasyonunu artırarak oksidatif hasarı tetiklediği belirlenmiştir. Üstelik MTX toksikasyonu aspartat amino transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT) ve alkalın fosfataz (ALP) gibi karaciğer enzim aktivitelerini artırmıştır. Diğer taraftan SLY ve NRG tedavisi GSH seviyesini ve antioksidan enzim aktivitelerini artırıp, lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca SLY ve NRG tedavisi, MTX grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer enzim aktivitelerini azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada SLY ve NRG, MTX'in neden olduğu karaciğer toksisitesine karşı yararlı etki sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer enzimleri, Methotrexate, Naringin, Oksidatif stress, Silymarin.

Beneficial Effects of Silymarin and Naringin Against Methotrexate-induced Hepatotoxicity in Rats

Abstract: Hepatotoxicity occurs as a result of the complications of methotrexate (MTX) therapy, which is a chemotherapeutic drug. Silymarin (SLY) and naringin (NRG) are bioflavonoids possess multiple pharmacological properties such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-hyperlipidemic activity. This study was undertaken to investigate the beneficial effects of SLY and NRG on MTX-induced liver toxicity in rats. After a single dose of intraperitoneal MTX (20 mg/kg) was given to rats, SLY (25 and 50 mg/kg) and NRG (50 and 100 mg/kg) treatment was given by oral gavage for 7 days. It has been determined that MTX induces oxidative stress by increasing lipid peroxidation, decreased in glutathione (GSH) level and antioxidant enzyme activities such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Moreover, MTX toxication has increased liver enzyme activities such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP). On the other hand, SLY and NRG treatment increased the level of glutathione (GSH) and antioxidant enzyme activities and inhibited lipid peroxidation. It has also been determined that SLY and NRG treatment reduces liver enzyme activities when compared to the MTX group. In this study, SLY and NRG provided a beneficial effect against MTX-induced liver toxicity.

Keywords: Liver enzymes, Methotrexate, Naringin, Oxidative stress, Silymarin.

✉ Cüneyt ÇAĞLAYAN

Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bingöl, TÜRKİYE.
e-posta: ccaglayan@bingol.edu.tr

*Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel araştırma projesinin fonuyla desteklenmiştir. (Proje numarası: BAP 2015/52)

GİRİŞ

Folik asit antagonisti olarak bilinen Methotrexate (MTX), dihidrofolat redüktazı (DHFR) inhibe ederek nükleik asit sentezine doğrudan müdahale edebilen kemoterapötik bir ilaçtır. Methotrexate, farklı kanser tipleri, sedef hastalığı ve otoimmün bozuklukların tedavisinde sıklıkla kullanılır (1). Methotrexate'ın klinik kullanımını sınırlayan en önemli yan etkilerinden biri karaciğer toksisitesine neden olmasıdır (2). Karaciğer, ilaçların hem biyolojik dönüşümü hem de ilaçların neden olduğu zararların azaltılması için merkezi bir rol oynamasına rağmen, bu ajanlar tarafından indüklenen toksisiteye karşı oldukça yatkındır (3). Methotrexate kaynaklı hepatotoksitenin esas mekanizması henüz bilinmemesine rağmen, başta oksidatif stres olmak üzere birkaç hipotez öne sürülmüştür (4,5). Methotrexate'ın karaciğerdeki toksik etkilerinin altında yatan temel sebep, serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle artan oksidatif strese bağlı olduğu hipotezi daha ağır basmaktadır (6). Bunun için birçok çalışmada, doğal bitkisel ürünlerin ham ve saflaştırılmış formları kullanılarak anti-kanser ilaçların neden olduğu yan etkileri azaltılması için çalışmalar sürdürülmektedir (7,8).

Fenolik yapıları antioksidanların, hücre bileşenlerini oksidatif hasara karşı koruyarak oksidatif strese bağlı çeşitli hastalıkların riskini sınırlandırdığı bildirilmiştir (9). Silymarin (SLY), bitki kökenli bir flavonoid olup, Süt dikeninin (Silymarin Marianum) tohum ve meyvelerinden izole edilir (10). Radyasyon, alkol bağımlılığı, iskemi, çevresel toksinler ve CCl₄ gibi kimyasal ajanlar ile indüklenen karaciğer hasarına karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir. Ayrıca antioksidan, anti-inflamator ve anti-apoptotik gibi farmakolojik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (11).

Naringin (NRG) (4',5,7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside) üzüm meyvesi ve birçok narenciye meyvesinin majör ve aktif bir flavanon glikozitidir. Naringin oral yoldan verildiğinde, α -ramnosidaz ve β -glukozidaz gibi enzimler tarafından hidroliz edilerek emilebilir formu olan naringenin bileşiğine dönüşür

(12). Naringin'in anti-ülser, antioksidan anti-inflamator, anti-apoptotik ve anti-hiperlipidemik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (13). Bu çalışma, ratlarda methotrexate'ın neden olduğu karaciğer hasarına karşı silymarin ve naringin'in etkilerinin araştırılması için yapıldı.

MATERYAL ve METOT

Deneysel Protokol

Methotrexate (50 mg flakon®) Koçak farma şirketinden satın alındı (İstanbul, Türkiye). Silymarin (katalog no: S0292), naringin (katalog no: 10236-47-2) ve diğer kimyasallar analitik saflıkta olup, Sigma-Aldrich kimyasal şirketinden satın (St. Louis MO, ABD) alındı. Methotrexate, silymarin ve naringin'in doz seçimleri önceki çalışmalar esas alınarak yapıldı (14-16).

Çalışmada Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde (ATADEM) yetiştirilen 220-250 gram ağırlığındaki 56 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar uygulamadan bir hafta önce seçilerek yeni ortamlarına adaptasyonları sağlandı. Hayvanlar 24-25 °C sabit sıcaklık ve onikişer saatlik karanlık-aydınlık siklusu sağlanarak kontrollü bir odada, kafeslerde tutuldu. Deney süresince ratlara standart sıçan yemi ile su *ad libitum* verildi. Yapılan çalışmanın etik kurallara uygun olduğu Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığının izni ile onaylandı (Protokol No: 2015-2/52).

Sprague dawley ratlar rastgele her grupta 7 rat olacak şekilde 8 gruba ayrıldı.

1.Grup (Kontrol): Sadece periton içi serum fizyolojik uygulandı.

2.Grup (NRG 100): Hayvanlara oral yolla gavaj ile 100 mg/kg/gün dozunda NRG 7 gün süre ile verildi.

3.Grup (SLY 50): Hayvanlara oral yolla gavaj ile 50 mg/kg/gün dozunda SLY 7 gün süre ile verildi.

4.Grup (MTX): Karaciğer toksisitesi sağlamak üzere 20 mg/kg/gün periton içi tek doz olarak MTX verildi.

5.Grup (MTX + NRG 50): 20 mg/kg/gün, tek doz periton içi MTX uygulaması ile birlikte, 50 mg/kg/gün NRG oral yolla gavaj ile 7 gün süre ile verildi.

6.Grup (MTX + NRG 100): 20 mg/kg/gün, tek doz periton içi MTX uygulaması ile birlikte, 100 mg/kg/gün NRG oral yolla gavaj ile 7 gün süre ile verildi.

7.Grup (MTX + SLY 25): 20 mg/kg/gün, tek doz periton içi MTX uygulaması ile birlikte, 25 mg/kg/gün SLY oral yolla gavaj ile 7 gün süre ile verildi.

8.Grup (MTX + SLY 50): 20 mg/kg/gün, tek doz periton içi MTX uygulaması ile birlikte, 50 mg/kg/gün SLY oral yolla gavaj ile 7 gün süre ile verildi.

Çalışma süresinin bitiminde 24 saat sonra hayvanlar hafif sevofloran (Sevorane liquid 100%, Abbott Laboratuvar, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında dekapite edilerek, kan ve doku örnekleri alındı. Kan örnekleri serum enzim analizleri için antikoagülsüz tüplere aktarıldı, +4 °C' de 1000xg'de, 10 dk. santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve biyokimyasal analizler yapılıncaya kadar -20°C' de (deep-freezede) saklandı. Hayvanlardan alınan karaciğer dokusu ise biyokimyasal tahliller için alınarak deneyler yapılıncaya kadar -20 °C' de muhafaza edildi.

Karaciğer Fonksiyon Analizi

Serum ALP, ALT, AST aktiviteleri ticari kitler (TML, Tanı Medikal Ürünler, Ankara, Türkiye) ile ELİSA reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) cihazında ölçüldü.

Lipid Peroksidasyon ve Antioksidanların Analizi

Karaciğer doku homojenatındaki malondialdehit (MDA) seviyesi Placer ve ark. metoduna göre belirlendi (17). MDA seviyesi nmol/g

doku olarak belirtildi. Karaciğer katalaz (KAT) enzim aktivitesi için Aebi metodu kullanıldı (18) ve katal/g protein olarak ifade edildi. Protein konsantrasyonunun tayininde Lowry ve ark. metodu kullanıldı. (19). Karaciğer dokusundaki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Sun ve ark. metodu ile tayin edildi (20). Birimi U/g protein olarak belirtildi. Karaciğer dokusunun glutatyon (GSH) seviyesi Sedlak ve Lindsay (21) metoduna göre yapıldı. nmol/g karaciğer doku olarak ifade edildi. Karaciğer dokusundaki glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi Lawrence ve Burk (22) metoduna göre ölçümü yapılmış olup, U/g protein olarak ifade edildi.

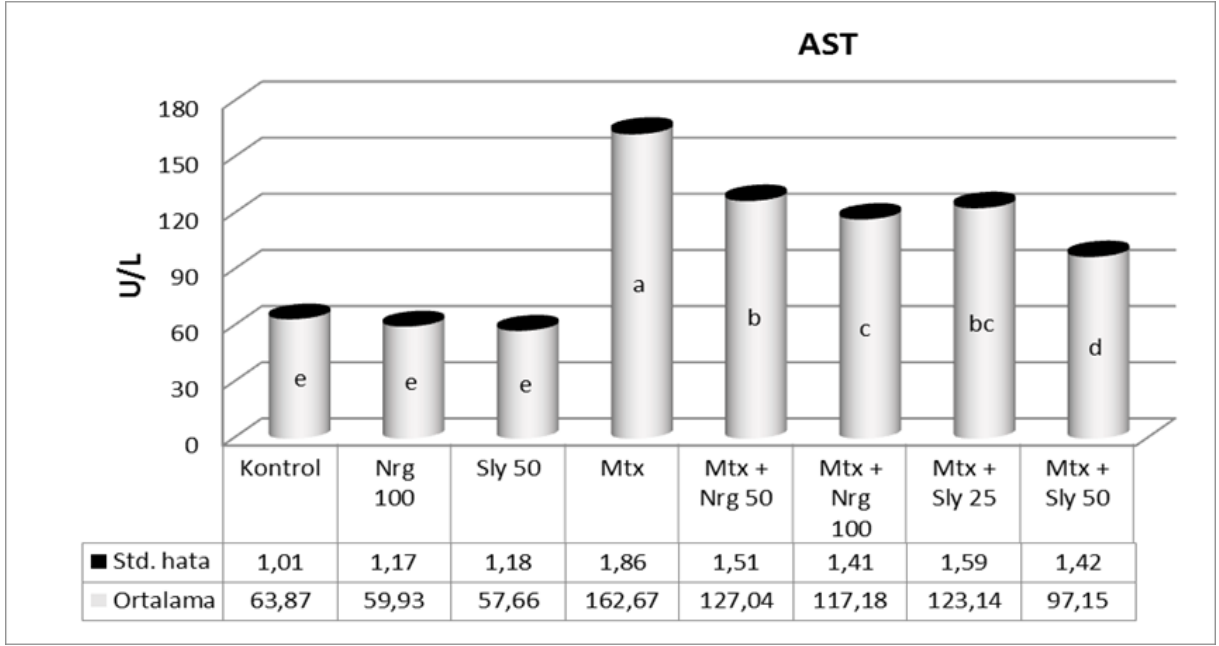
İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 12.0 paket programı kullanıldı. istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri "One-way Analysis of Variance (ANOVA)" testi ile belirlenirken gruplar arası farkların tespitinde Tukey testinden yararlanıldı. P<0.05 seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edilirken tüm değerler ortalama ± standart hata (± SEM) olarak verildi.

BULGULAR

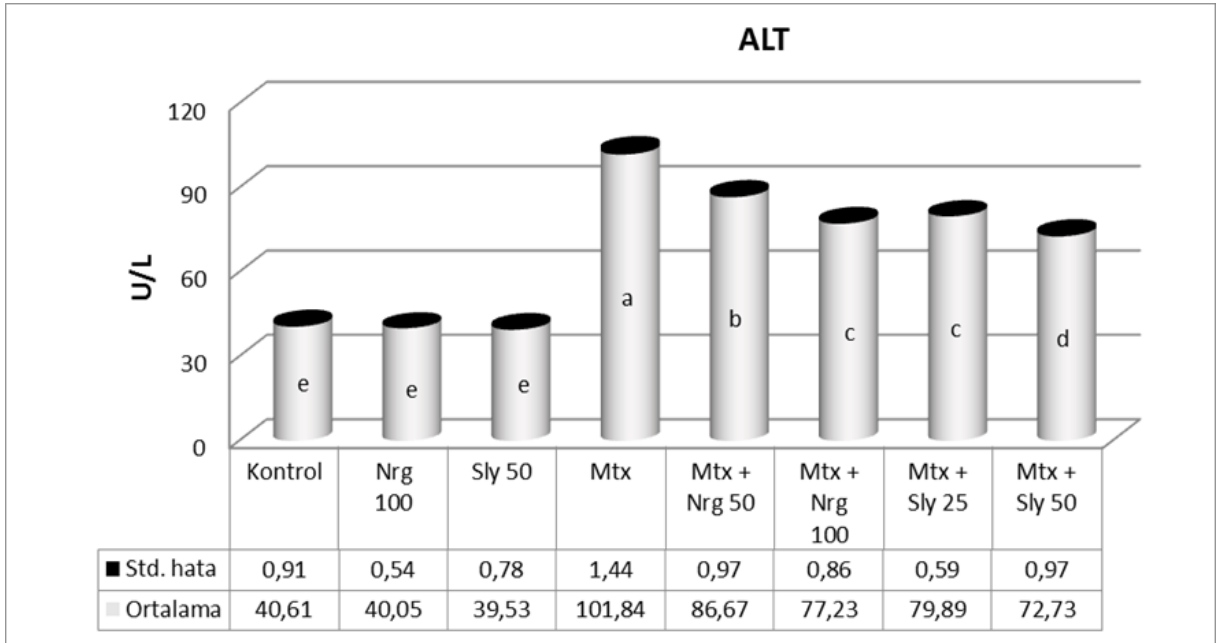
Karaciğer Fonksiyon Analizi

Karaciğer fonksiyon testleri olarak bilinen serum AST, ALT ve ALP enzim aktiviteleri şekil 1, 2 ve 3'te gösterilmiştir. Methotrexate uygulamasının serum AST, ALP ve ALT düzeylerini kontrol grubuna göre artırdığı (P<0.05) gözlemlenmiştir. Methotrexate ile birlikte tedavi amacıyla verilen silymarin (25 ve 50 mg/kg) ve naringin (50 ve 100 mg/kg) dozlarının serum AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerini MTX ile indüklenen gruba göre belirgin şekilde azalttığı tespit edilmiştir (P<0.05)



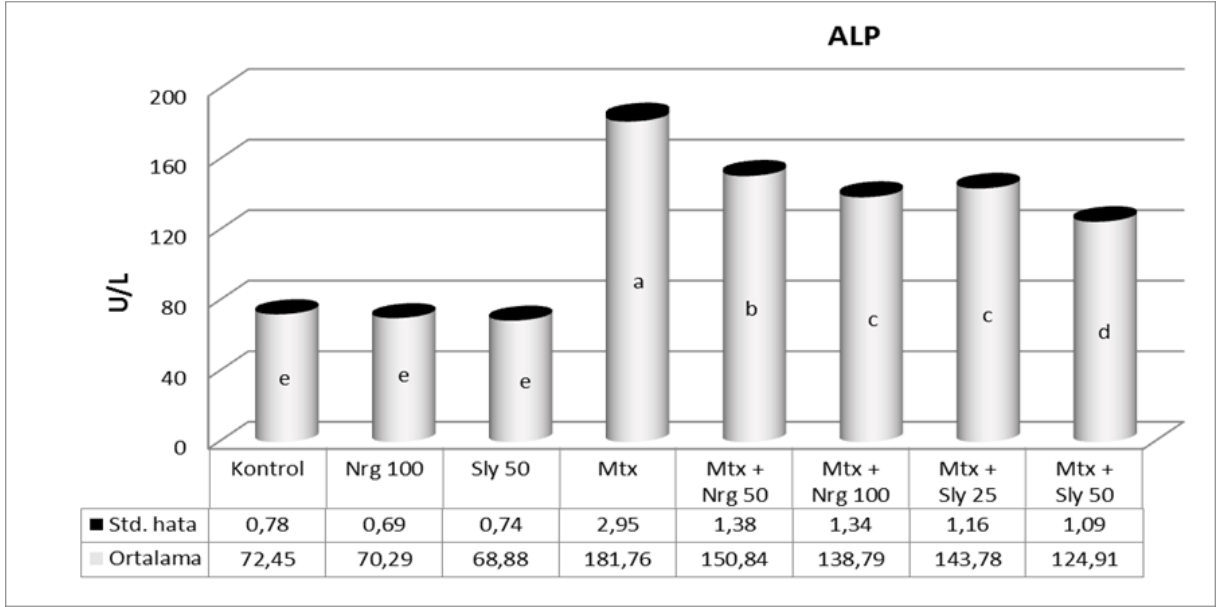
Şekil 1. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında aspartat aminotransferaz (AST) enzim aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 1. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on aspartate aminotransferase (AST) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).



Şekil 2. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında alanin aminotransferaz (ALT) enzimi aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 2. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on alanine aminotransferase (ALT) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).



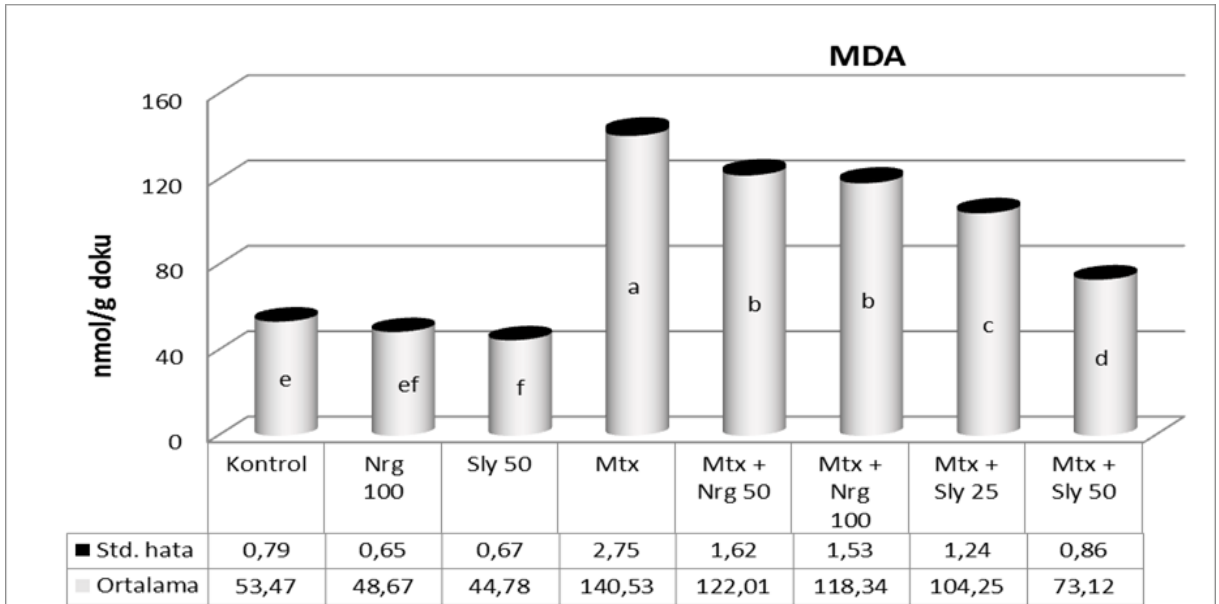
Şekil 3. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında alkalen fosfataz (ALP) enzimi aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 3. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on alkaline phosphatase (ALP) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).

Lipid Peroksidasyonu

Oksidatif hasarın en önemli parametrelerinden biri olan MDA düzeyleri incelendiğinde MTX uygulamasının, karaciğer MDA düzeylerini kontrol

grubuna göre önemli ölçüde artırdığı ($P<0.05$) tespit edilmiştir. Silymarin ve naringin uygulamalarının her iki dozunun da artmış olan bu düzeyi düşürdüğü belirlenmiştir ($P<0.05$). (Şekil 4).



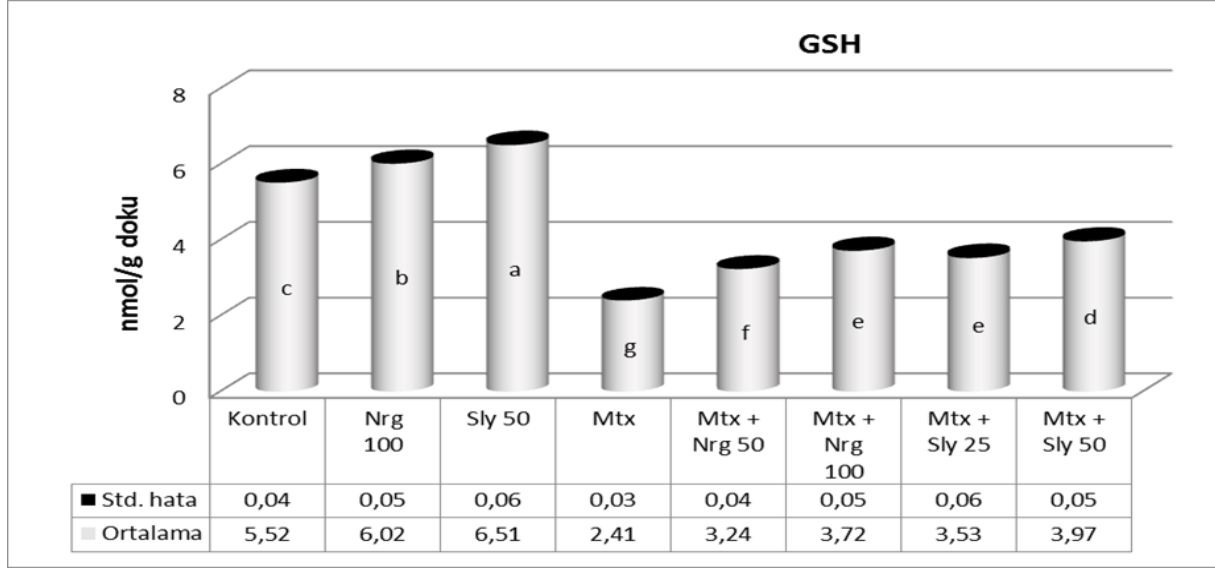
Şekil 4. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında malondialdehit (MDA) seviyesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-f gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 4. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on malondialdehyde (MDA) level in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-f indicated significant differences between groups ($P<0.05$).

Glutasyon Seviyesi ve Antioksidan Enzim aktiviteleri

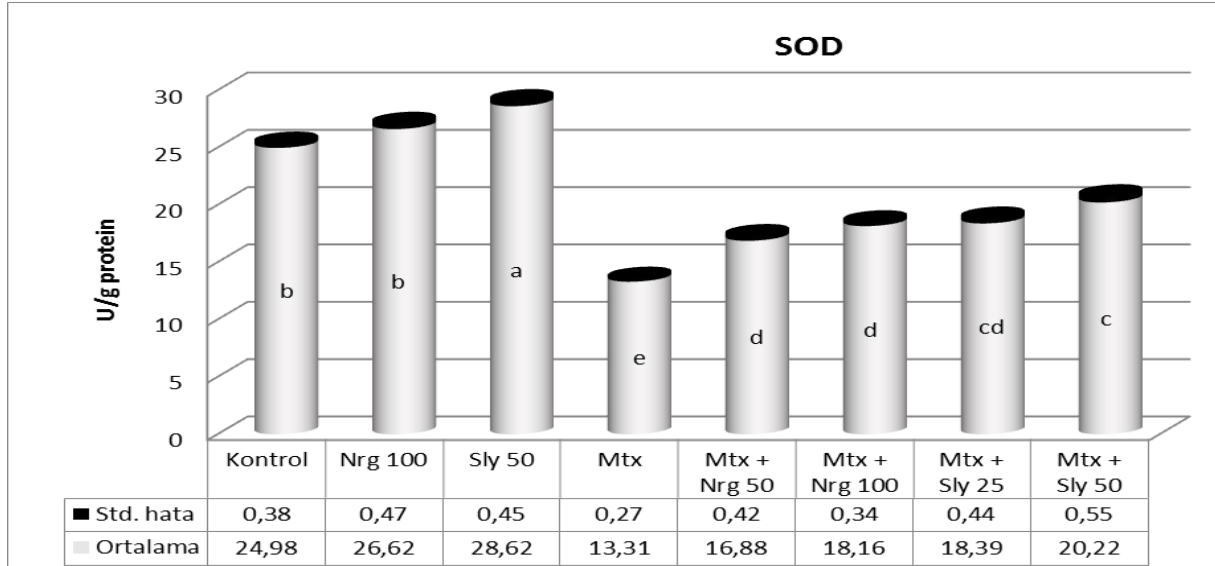
Methotrexate uygulamasının GSH seviyesini ve SOD, KAT ve GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerini kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşürdüğü ($P<0.05$) tespit edilmiştir. Methotrexate ile kombine

kullanılan silymarin (25 ve 50 mg/kg) ve naringin (50 ve 100 mg/kg) dozlarının SOD, KAT ve GPx gibi karaciğer antioksidan enzim aktivitelerini ve GSH düzeyini artırdığı ($P<0.05$) kaydedilmiştir (şekil 5, 6, 7, 8).



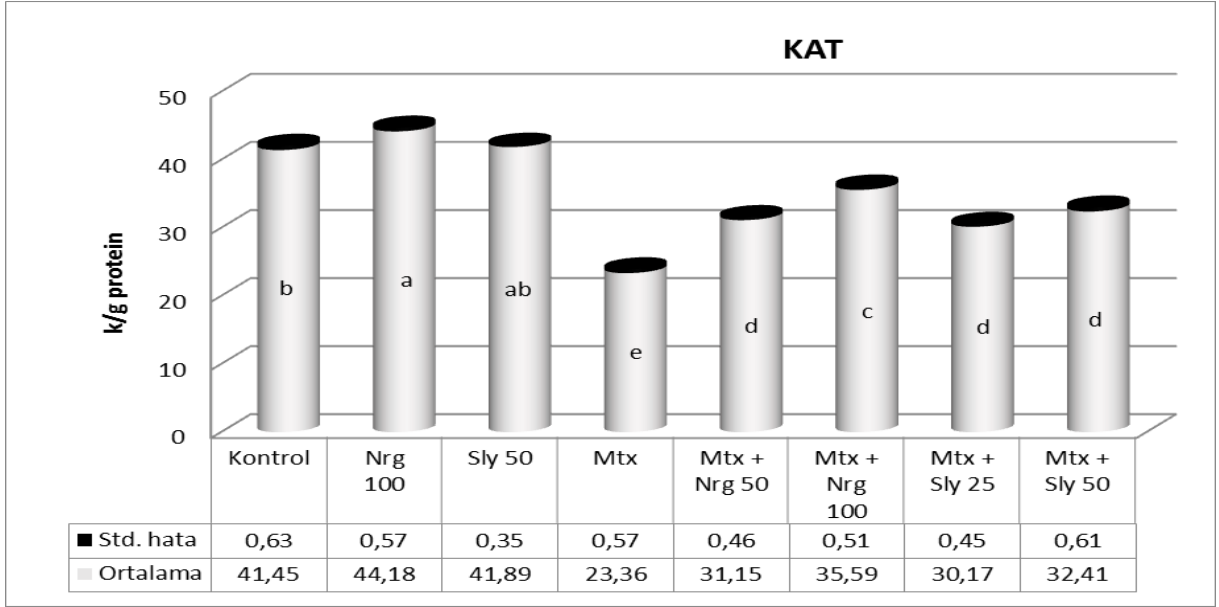
Şekil 5. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında glutasyon (GSH) seviyesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-g gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 5. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on glutathione (GSH) level in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-g indicated significant differences between groups ($P<0.05$).

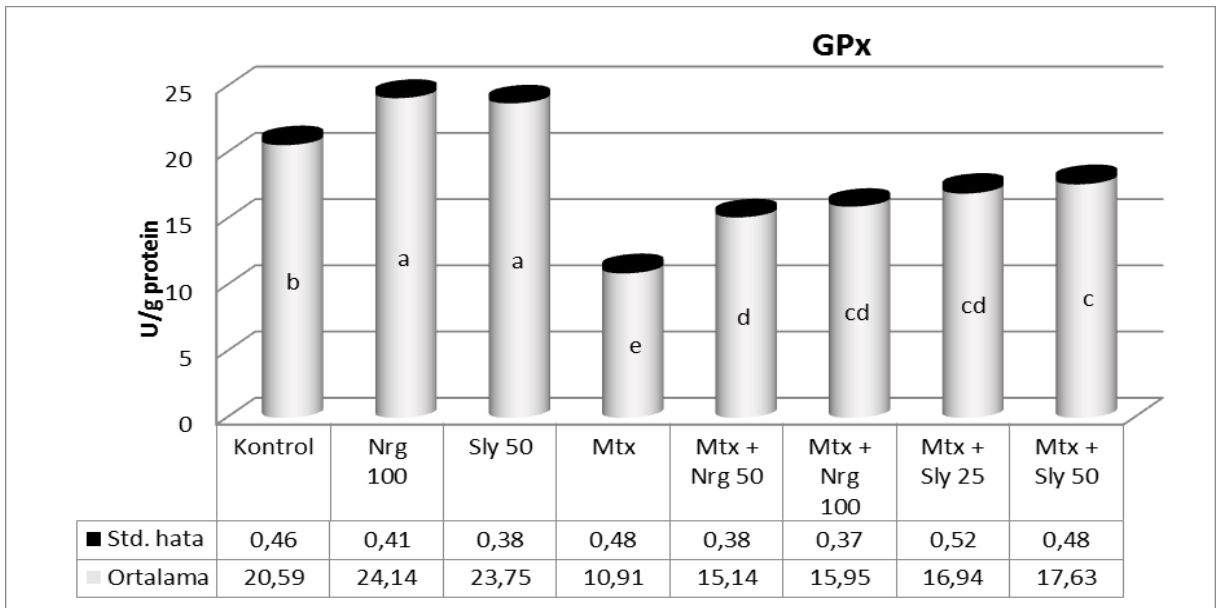


Şekil 6. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 6. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).



Şekil 7. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında katalaz (KAT) enzimi aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).
Figure 7. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on catalase (CAT) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).



Şekil 8. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).
Figure 8. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on glutathione peroxidase (GPx) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada methotrexate kaynaklı karaciğer toksisitesine karşı silymarin ve naringin'in yararlı etkileri sergilenmiştir. Methotrexate; romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklar ve birçok kanser türünün tedavisinde sıklıkla tercih edilen bir ilaçtır (1). Karaciğer, böbrek ve nörotoksisite gibi istenmeyen birçok yan etkilere sahip olduğundan klinik kullanımı sınırlıdır (2). Methotrexate kaynaklı karaciğer toksisitesinin mekanizması henüz aydınlatılmamıştır. Önerilen bir mekanizmada, hücredeki methotrexate'ın hepatotoksisiteye neden olan folat seviyesinde tükenmeye yol açarak poliglutam formunda biriktiği düşünülmektedir. Bir başka mekanizma ise, oksidatif stresin, methotrexate ile uyarılan hepatotoksisitede önemli rol oynadığı düşünülmektedir (23,24). Karaciğer hastalıklarının teşhisinde en önemli biyomarker olan ALT, AST ve ALP enzimlerinin plazma ya da seruma geçişi karaciğer hasarı ya da yaralanmasının en önemli belirtisidir. Bu enzimlerin serumdaki seviyelerinin yükselmesi hepatositlerin yapısal bütünlüğünün hasar görmesi sonucu kana karışmalarından dolayı kaynaklanır (25). Yapılan bir çalışmada methotrexate kaynaklı karaciğer hasarı sonucunda serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiştir (26). Mevcut çalışmada methotrexate grubunda serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinin kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır. Tedavi amacıyla verilen silymarin ve naringin'in, bu enzimlerin aktivitelerini methotrexate grubuna göre azalttığı belirlenmiştir.

Artan reaktif oksijen türleri (ROS) hücre membranlarına zarar vererek lipid peroksidasyonunun gerçekleşmesine neden olur. Lipid peroksidasyonu sonucunda, lipid peoksidasyonun son ürünü olan MDA seviyesi artar. MDA seviyesinin artması hücrelerin oksidatif hasara uğradığının en önemli bir göstergesidir (2). Yapılan çalışmada methotrexate ile toksikasyona uğramış gruptaki MDA seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir. Methotrexate'ın dokuda oksidatif hasara neden olduğu daha önce yapılan birkaç çalışmayla desteklenmiştir (27,28).

Methotrexate ile birlikte verilen silymarin ve naringin ise MDA seviyesini kontrol grubuna yaklaştırmıştır. Silymarin ve naringin'in sırasıyla parasetamol ve CCl₄ gibi ajanların neden olduğu hepatotoksisite sonucu artan MDA seviyesini azalttığı bazı çalışmalar sonucunda rapor edilmiştir (29,30).

Düşük moleküler ağırlıklı bir tripeptit olan GSH, hücrel antioksidan görevi gören önemli bir bileşiktir. GSH peroksi radikalleri ve singlet oksijen gibi çeşitli serbest radikallerle reaksiyona girerek diğer disüflürlere ve indirgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşür (2). Oksidatif stres, muhtemelen GSH içeriğindeki azalmadan ötürü methotrexate ile indüklenen hepatotoksisitenin patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (5). Aşırı serbest radikallerin üretimi sonucunda organ hasarı gelişerek hücre membranlarının parçalanmasına neden olur. Böylece sitozolik nikotinamid adenosin difosfat (NADP) bağımlı dehidrogenazlar ve NADP malik enzimleri methotrexate tarafından inhibe edilerek hücrelerdeki mevcut NADPH miktarında azalmaya neden olur. Normal şartlar altında NADPH hücrel glutatyonu indirgenmiş glutatyona dönüştüren glutatyon redüktaz enzimi tarafından kullanılır. İndirgenmiş glutatyon ise ROS'e karşı koruyucu etki sağlayan önemli bir non-enzimatik sitozolik antioksidandır. Bu yüzden methotrexate, glutatyon seviyesini düşürerek hücrenin oksidatif hasara karşı daha savunmasız hale getirir (31,32). Yapılan çalışmada tedavi amacıyla verilen silymarin ve naringin'in methotrexate ile indüklenen gruba göre GSH seviyesini artırması önceki yapılan çalışmaları desteklemektedir. Silymarin ve naringin'in yararlı etkileri antioksidan özellikleriyle ilişkilidir, dolayısıyla reaktif türlerini nötralize edebilme kapasitesine sahip olduğu kanısına varılmıştır.

Artmış oksidatif stres, hücrel savunma mekanizmaları ile hücre içi serbest radikallerin ürünleri arasındaki dengesizliği temsil eder. Hem SOD hem de KAT, hücreyi hasardan korumanın en etkili yolu olan H₂O₂'yi parçalayıp ve O₂'i indirgeyerek oksidatif hasarı azaltırlar. Bu enzimler aktif oksijen türlerini ortadan kaldırmak için birlikte çalışırlar ve

fizyolojik konsantrasyonlarda aktivite veya miktarlarındaki azalma sonucu hücrel lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif hasara karşı olumsuz etkilenmesine neden olurlar (33,34). GPx enzimi GSH vasıtasıyla H₂O₂'nin su ve oksijene dönüşümünü katalize ederek dokuları oksidatif hasara karşı korur (2). Yapılan literatür araştırmaları sonucu methotrexate'ın karaciğer, böbrek ve barsak gibi farklı dokularda antioksidan özellik gösteren SOD, KAT ve GPX enzim aktivitelerini azalttığı bildirilmiştir (7,27,35). Mevcut çalışmanın sonuçları ise önceki yapılan çalışmaları destekleyerek, methotrexate toksikasyonu sonucu bu antioksidan enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre azalış tespit edilmiştir. Silymarin ve naringin tedavisi, methotrexate grubu ile kıyaslandığında antioksidan enzim aktivitelerini artırmıştır. Bir başka çalışmada farelerde etanol kaynaklı karaciğer toksisitesine karşı tedavi amacıyla verilen silymarin, antioksidan enzim aktivitelerini ve GSH seviyesini arttırdığı rapor edilmiştir (36). Diğer bir çalışmada ise nikel kaynaklı karaciğer toksisitesine karşı naringin'in antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı bildirilmiştir (37).

Sonuç olarak, bu çalışmada methotrexate'ın neden olduğu karaciğer hasarını silymarin ve naringin'in antioksidan etkileri ile azalttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla karaciğer toksisitesini azaltmak için silymarin ve naringin kullanımının klinik açıdan yararlı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Khan ZA., Tripathi R., Mishra B., 2012. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. *Expert Opin Drug Deliv*, 9, 151-169.
2. Ali N., Rashid S., Nafees S., Hasan SK., Sultana S., 2014. Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 385, 215-223.
3. Mukherjee S., Ghosh S., Choudhury S., Adhikary A., Manna K., Dey S., Chattopadhyay S., 2013. Pomegranate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf2-NF-κB pathways. *J Nutr Biochem*, 24, 2040-2050.
4. Şener G., Ekşioğlu-Demiralp, E., Cetiner M., Ercan F., Şirvancı S., Gedik N., Yeğen BC., 2006. L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *Cell Biol Toxicol*, 22, 47-60.
5. Uraz S., Tahan V., Aygun C., Eren F., Unluguzel G., Yuksel M., Hulagu S., 2008. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci*, 53, 1071-1077.
6. Olayinka ET., Ore A., Adeyemo OA., Ola OS., 2016. Ameliorative effect of gallic acid on methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rat. *J Xenobiotics*, 6(1).
7. Vardi N., Parlakpınar H., Ates B., 2012. Beneficial effects of chlorogenic acid on methotrexate-induced cerebellar Purkinje cell damage in rats. *J Chem Neuroanat*, 43, 43-47.
8. Ueki M., Ueno M., Morishita J., Maekawa N., 2013. Curcumin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting renal inflammation in mice. *J Biosci Bioeng*, 115, 547-551.
9. Kiruthiga PV., Karutha PS., Pandima DK., 2014. Silymarin prevents the toxicity induced by benzo (a) pyrene in human erythrocytes by preserving its membrane integrity: An in vitro study. *Environ. Toxicol*, 29, 165-175.
10. Köksal E., Gülçin İ., Beyza S., Sarıkaya Ö., Bursal E., 2009. In vitro antioxidant activity of silymarin. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 24, 395-405.
11. Al-Rasheed N., Faddah L., Al-Rasheed N., Bassiouni YA., Hasan IH., Mahmoud AM., Yacoub HI., 2016. Protective effects of silymarin, alone or in combination with chlorogenic acid and/or melatonin, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Pharmacogn Mag*, 12(Suppl 3), S337.
12. Pari L., Amudha K., 2011. Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *Eur J Pharmacol*, 650, 364-370.

13. Gürsul C., Ekinci Akdemir FN., Akkoyun T., Can İ., Gül M., Gülçin İ., 2016. Protective effect of Naringin on experimental hindlimb ischemia/reperfusion injury in rats. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31, 56-61.
14. Erboga M., Aktas C., Erboga ZF., Donmez YB., Gurel A., 2015. Quercetin ameliorates methotrexate-induced renal damage, apoptosis and oxidative stress in rats. *Renal Failure*, 37, 1492-1497.
15. Ghaznavi H., Mehrzadi S., Dormanesh B., Tabatabaei SM., Vahedi H., Hosseinzadeh A., Pazoki-Toroudi H., Rashidian A., 2016. Comparison of the protective effects of melatonin and silymarin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Evid Based Complementary Altern Med*, 21, NP49-55.
16. Sahu BD., Tatireddy S., Koneru M., Borkar RM., Kumar JM., Kuncha M., Sistla R. 2014. Naringin ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated mitochondrial dysfunction, apoptosis and inflammation in rats: possible mechanism of nephroprotection. *Toxicol Appl Pharmacol*, 277, 8-20.
17. Placer ZA., Cushmanni LL., Johnson BC., 1966. Estimation of products of lipid peroxidation (as malondialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem*, 16, 359-364.
18. Aebi H., 1983. Catalase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods in Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press, 276-286.
19. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193, 265-275.
20. Sun Y., Larry WO., Ying LA., 1988. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34, 497-500.
21. Sedlak J., Lindsay RHC., 1965. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal Biochem*, 25, 192-205.
22. Lawrence RA., Burk RF., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 71, 952-958.
23. Sathiavelu J., Senapathy GJ., Devaraj R., 2009. Hepatoprotective effect of chrysin on prooxidant-antioxidant status during ethanol-induced toxicity in female albino rats. *J Pharm Pharmacol*, 61, 809-817.
24. Prey S., Paul C., 2008. Effect of folic or folinic acid supplementation on methotrexate associated safety and efficacy in inflammatory disease: a systematic review. *Br. J. Dermatol*, 160, 622-628.
25. Hadi NR., Al-Amran FG., Swadi A., 2012. Metformin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Pharmacother*, 3, 248-253.
26. Hafez HM., Ibrahim MA., Ibrahim SA., Amin EF., Goma W., Abdelrahman AM., 2015. Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol*, 768, 1-12.
27. Dalaklioglu S., Genc GE., Aksoy NH., Akcıt F., Gumuslu S., 2013. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol*, 32, 662-671.
28. Kelleni MT., Ibrahim SA., Abdelrahman AM., 2016. Effect of captopril and telmisartan on methotrexate-induced hepatotoxicity in rats: impact of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Toxicol Mech Methods*, 26, 371-377.
29. Hamza RZ., Al-Harbi MS., 2015. Amelioration of paracetamol hepatotoxicity and oxidative stress on mice liver with silymarin and *Nigella sativa* extract supplements. *Asian Pac J Trop Biomed*, 5, 521-531.
30. Dong D., Xu L., Yin L., Qi Y., Peng J., 2015. Naringin prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *J Funct Food*, 12, 179-191.
31. Çakır T., Özkan E., Dulundu E., Topaloğlu Ü., Şehirli AÖ., Ercan F., Şener G., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pharm Pharmacol*, 63, 1566-1571.

32. Abdel-Raheem IT., Khedr NF., 2014. Renoprotective effects of montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor antagonist, against methotrexate-induced kidney damage in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 387, 341-353.
33. Nagi MN., Almakki HA., 2009. Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Phytother Res*, 23, 1295-1298.
34. Ince S., Keles H., Erdogan M., Hazman O., Kucukkurt I., 2012. Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Drug Chem Toxicol*, 35, 285-292.
35. Sukhotnik I., Nativ O., Roitburt A., 2013. Methotrexate induces germ cell apoptosis and impairs spermatogenesis in a rat. *Pediatr Surg Int*, 29, 179-184.
36. Das SK., Vasudevan DM., 2006. Protective effects of silymarin, a milk thistle (*Silybium marianum*) derivative on ethanolinduced oxidative stress in liver. *Indian J Biochem Biophys*, 43, 306-311.
37. Pari L., Amudha K., 2011. Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *Eur J Pharmacol*, 650, 364-370.