



Metotreksat ile İndüklenmiş Sıçanlarda Böbrek Hasarı Üzerine Eritropoetin Etkisi: Biyokimyasal ve Histopatolojik Çalışma

The Effect of Erythropoietin on Methotrexate-Induced Renal Damage in Rats: Biochemical and Histopathological Studies

Betül Kabakcı¹, Ergül Belge Kurutaş¹, Sevgi Bakarış², Meltem Güngör¹

¹Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ²Patoloji Anabilim Dalı, KAHRAMANMARAŞ

Cukurova Medical Journal 2015;40(1):98-106.

ÖZET

Amaç: Metotreksat (MTX) çeşitli inflamatuvar hastalıklarda ve bazı kanserler de çok yaygın olarak kullanılan sitotoksik bir ajan olup folik asit antagonistidir. Etkili bir ilaç olmasına rağmen, sıklıkla yan etki ve toksik etkileri nedeni ile kullanımı kısıtlanmaktadır. Çalışmamızda, güçlü bir antioksidan madde olan Eritropoetin (EPO)'ün MTX'e bağlı olarak oluşan oksidatif hasara karşı etkisinin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metod: Yirmi dört adet dişi Sprague-Dawley sıçan üç gruba ayrıldı. Gruplar; % 0,9'luk NaCl'den 0,2 mL subkutan enjeksiyon uygulanan Sham grubu; subkutan MTX (5mg/kg) enjeksiyonu uygulanan grup ve subkutan MTX (5mg/kg) ile EPO (2000 IU/kg) enjeksiyonu uygulanan grup olarak belirlendi. İşlem günde bir kez olmak üzere 4 gün boyunca uygulandı. Beşinci günde sıçanlar öldürüldü, böbrek dokuları çıkarıldı. Böbrek dokularında katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Dokuların histopatolojik incelemesi ışık mikroskopisinde yapıldı.

Bulgular: Böbrek dokusunda MDA düzeyleri, Sham grubu ve MTX+EPO grubunda, MTX grubuna göre önemli ölçüde düşük bulundu ($p<0,05$). Buna karşın, Sham grubu ve MTX+EPO grubunda CAT ve SOD aktiviteleri anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). MTX+EPO grubunda hem karaciğer hem de böbrek doku hasarının MTX grubu ile kıyaslandığında önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$). Histopatolojik olarak sadece metotreksat verilen grupta belirgin tübül hasarı ve enflamasyon varken EPO uygulanan gruplarda bu hasarlar azalmıştı.

Sonuç: Bu veriler, EPO' nun kemoterapötik ilaçlara bağlı oluşan böbrek hasarına karşı koruyucu olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: eritropoetin, metotreksat, karaciğer, böbrek, oksidatif stres biyobelirteçleri

ABSTRACT

Purpose: Methotrexate (MTX), a folic acid antagonist, is widely used as a cytotoxic chemotherapeutic agent for several malignancies and various inflammatory diseases. However, the efficacy of this agent often is limited by severe side effects and toxic conditions. In our study, it was aimed to investigate the effect of erythropoietin (EPO) which is a potent antioxidant substance in oxidative damage induced-MTX.

Material and Methods: Twenty-four female Sprague-Dawley rats were equally divided into three groups: Sham animals were administered subcutaneous injections of 0.2 mL of 0.9% NaCl, group MTX were administered subcutaneous injections of methotrexate (5 mg/kg), and MTX+EPO-treated animals were administered subcutaneous injections of methotrexate (5 mg/kg) and EPO (2000 IU/kg) once daily for 4 consecutive days. At the fifth day, the

animals were sacrificed, and kidneys were excised. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in kidney tissue homogenates were measured as spectrophotometric. Tissues were evaluated as histopathologic with light microscope.

Results: MDA levels in the Sham and MTX+EPO groups were significantly lower than those in the MTX group of both tissues ($p<0.05$). CAT and SOD activities in the Sham and MTX+EPO groups were significantly higher than those in the MTX group ($p<0.05$). Both tissues damage was significantly less in the MTX+EPO group than that in the MTX ($p<0.05$). EPO treatment reduced these histological damages.

Conclusion: These data indicate that EPO may be useful therapeutic use in preventing kidney injury in patients receiving chemotherapeutic agents.

Key words: Erythropoietin, methotrexate, liver, kidney, oxidative stress biomarkers

GİRİŞ

Folik asit antagonisti olan metotreksat (MTX) lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri ve bazı diğer kanser tiplerinde kemoterapötik ajan olarak kullanıldığı gibi psöriasis, dermatomyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda da yaygın şekilde kullanılmaktadır¹. MTX, dihidrofolatı tetrahidrofolata çeviren dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder². Tetrahidrofolat purin ve pirimidin sentezinin önemli bir parçası olan timidilatın sentezinde rol oynar³. MTX, tetrahidrofolat eksikliğine yol açarak purin, pirimidin metabolizması ve biyolojik aminlerin sentezini içeren birçok metabolik yolağı etkiler. Metabolik yollardaki bu değişiklikler MTX'in hem tedavi edici hem de toksik etkilerinden sorumludur^{4,5}.

MTX'in gastrointestinal, hepatik, renal ve kemik iliği toksisiteyi en sık görülen yan etkileridir. Hepatik toksisite MTX'in kullanımını kısıtlayan ciddi bir yan etkidir⁶. Yapılan çalışmalar, ilacın başta hepatotoksisite ve nefrotoksisite olmak üzere gelişen yan etkilerinde, çoğunlukla reaktif oksijen radikallerinin (ROS) meydana getirdiği oksidatif hasarın sorumlu olduğunu göstermiştir. Sıçanlara MTX verilmesinin; kan, karaciğer, böbrek ve ince barsakta glutasyon seviyelerini azalttığı, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz aktivitesini ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyelerini artırdığı bulunmuştur⁷⁻⁹.

Serbest radikaller, hücrel metabolizma sırasında veya ekzojen ajanlarla meydana gelen

ve antioksidan savunma sistemi tarafından düzenli olarak ortadan kaldırılan oldukça reaktif moleküllerdir. Antioksidan savunma mekanizmalarının (süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi) yetersiz kalması veya serbest radikal oluşumunun artması nedeniyle oksidatif dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir¹⁰⁻¹². Dokuda oksidatif hasar oluşumu ile radikal metabolitlerinin artması ve bunların oluşturduğu lipid peroksidasyonu ile protein ve DNA oksidasyonunun sonucu olarak hücre membranında kontrol kaybolur, geçirgenlik artar ve hücrel ölüm gelişir^{13,14}.

Eritropoetin (EPO), hematopoetik büyüme faktörü olup, 30.4 kDa molekül ağırlığında, glikoprotein yapısında bir hormondur¹⁵⁻¹⁷. EPO üretimi karaciğer ve böbrekte hipobarik hipoksi, iskemi ve anemi ile indüklenen oksijen eksikliğinin oluşturduğu uyarılar ile kontrol edilmektedir. Eritrosit üretimi yapan renal hormon olarak tanımlanan EPO'nun diğer bir çok doku tarafından lokal olarak fiziksel ve metabolik strese cevaben salınımının arttığı bilinmektedir¹⁸. EPO kronik böbrek yetmezliği, HIV virüsü enfeksiyonu ve kemoterapi alan hastaların anemilerinde kullanılmakta ve cerrahi hastalarında allojenik kan transfüzyonunu azaltmaktadır. Birçok çalışma EPO'nun eritrosit üretimini artırmasının yanında beyin, böbrek ve kalp gibi dokuların iskemi/reperfüzyona (İ/R) bağlı hasarlarını koruma yeteneğinde olduğunu göstermiştir¹⁹. Veriler EPO'nun bu koruyucu etkilerinin antiapoptotik, antioksidan, anjiyogenik ve nöroprotektif özelliğine

bağlı olduğunu göstermektedir²⁰. Yapılan literatür taramalarında MTX kaynaklı böbrek doku hasarı ile EPO ilişkisini içeren hiçbir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle çalışmamızda EPO'nun, MTX'e bağlı olarak oluşan böbrek hasarına karşı koruyucu ve/veya tedavi edici özellikleri olup olmadığının araştırılması amaçlandı.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada, ağırlıkları 210–230 gr arasında değişen Sprague-Dawley cinsi toplam 24 adet dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar 10 gün boyunca ışık (12 saat aydınlık/karanlık) ve ısı (21-23°C) kontrollü odalarda standart yem ve su verilmek üzere izlendi.

Hayvanlar üç gruba ayrıldı. Sham grubuna (n=5) 4 gün boyunca % 0,9'luk NaCl' den 0,2 mL subkutan tek doz enjeksiyon uygulandı, MTX grubuna (n= 7) tek doz subkutan MTX (5 mg/kg) enjeksiyonu uygulandı, MTX+EPO grubuna (n= 7) tek doz ayrı ayrı subkutan MTX enjeksiyonu (5 mg/kg) ve EPO (2000 IU/kg, Recormon, Roche Diagnostics GmbH, 90 Mannheim, Germany) uygulandı. Beşinci günde sıçanlar sakrifiye edildi ve böbrek dokuları çıkarılarak biyokimyasal ve histopatolojik incelemesi yapıldı.

Bu çalışma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylandı.

Biyokimyasal Analiz

Sakrifiye edilen sıçanlar'dan alınan böbrek doku örnekleri tartılarak %1,15 M KCl ile homojenize edildi ve 14.000 x rpm'de +4°C'de 30 dakika soğuk santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Süpernatant'da oksidatif stres biyobelirteçleri olan, CAT ve SOD enzim aktiviteleri ile MDA düzeyleri değerlendirildi.

CAT enzim aktivitesinin tayini: CAT aktivitesi Beutler yöntemiyle saptandı (21). CAT, katalitik aktivitesi ile hidrojen peroksidi suya ve moleküler oksijene çevirir. Katalaz tayini için 240 mn dalga boyunda maksimum absorbans veren hidrojen peroksitin azalan absorbansı ölçülerek, katalaz

aktivitesi hesaplandı. Katalaz sonuçları Ü/mg protein olarak verildi.

SOD enzim aktivitesinin tayini: SOD aktivitesi Fridovich yöntemiyle ölçüldü (22). Oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan süperoksit radikalleri dismutasyona uğratarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülür. Bu yöntemde, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit (O₂⁻) radikallerinin 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorür (piyodonitrozolium violet: INT) ile oluşturduğu kırmızı renkli formazon boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin okunması esas alınmaktadır. Doku örneklerinde bulunan SOD, süperoksit radikalini ortamdaki uzaklaştırarak formazon reaksiyonunu inhibe etmektedir. Sonuçta oluşan kırmızı renkteki azalmanın tespiti ile SOD aktivitesi ölçülmektedir. Kırmızı rengin şiddeti ile SOD aktivitesinin büyüklüğü arasında ters bir ilişki mevcuttur. SOD enzim sonuçları Ü/mg protein olarak verildi.

MDA düzeyinin ölçümü: MDA düzeyi doku örneklerinde Ohkawa ve ark. tarafından tanımlanan tiobarbitürik asit yöntemi kullanılarak ölçüldü (23). Thiobarbitürik asidin ile lipid peroksidasyon yıkılım ürünlerinin reaksiyonu sonucu oluşan renk spektrofotometrik olarak 532 nm'de ölçüldü. 1, 1, 3, 3-tetraetoksipropan kullanılarak standart eğri oluşturuldu. MDA sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

Protein tayini: Doku örneklerinde protein düzeyleri Lowry metoduyla ölçüldü (24).

Histopatolojik Değerlendirme

Sıçanların böbrekleri alınarak, %10 formaldehit solüsyonu içinde tespit edildi. Rutin doku takibi sonrasında, parafine gömülen dokulardan alınan 5 µm'lik kesitlere hematoksilin-eosin boyası yapıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizin yapılmasında SPSS 15.0 programı kullanıldı. İkili grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. p < 0,05 düzeyi anlamlı olarak kabul edildi.

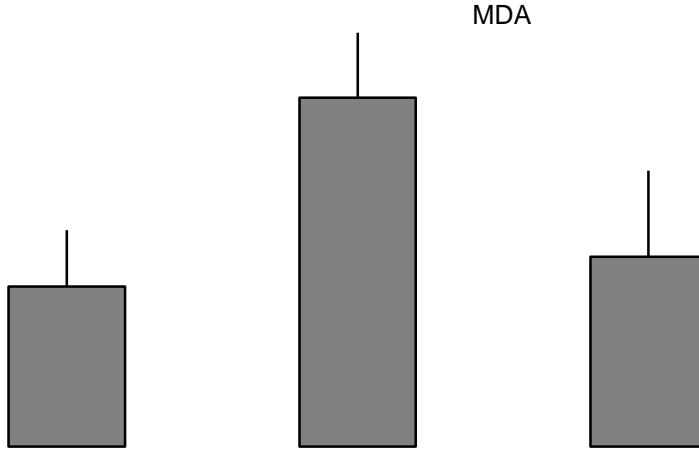
BULGULAR

Biyokimyasal Sonuçlar

Çalışmamızda böbrek dokusunda MDA düzeyleri, Sham grubu ve MTX+EPO grubunda, MTX grubuna kıyasla önemli ölçüde düşük bulundu ($p<0,05$). Buna karşın, Sham grubu ve MTX+EPO grubunda CAT ve SOD aktiviteleri anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). MTX+EPO grubunda böbrek doku hasarı MTX grubu ile kıyaslandığına önemli ölçüde azdı ($p<0,05$) (Şekil 1-3).

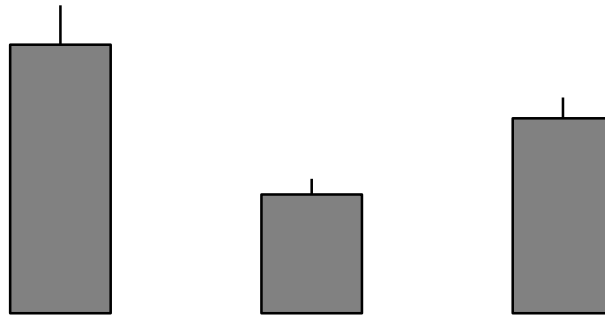
Histopatolojik Sonuçlar

Sham grubuna ait proksimal ve distal tübüller normal histolojik görünümdeydi. (Resim 1). Sadece metotreksat uygulanan grupta tübül epitelini de infiltre eden belirgin intertisyenel enflamasyon (2A), tübüller dilatasyon ve belirgin hidropik dejenerasyon izlendi (2B) (Resim 2). MTX +EPO uygulanan grupta, tübüllerde hafif hidropik dejenerasyon ve hafif dilatasyon gözlemlendi (3A) İnterstisyumdaki enflamasyonda da azalma mevcuttu (Resim 3B).

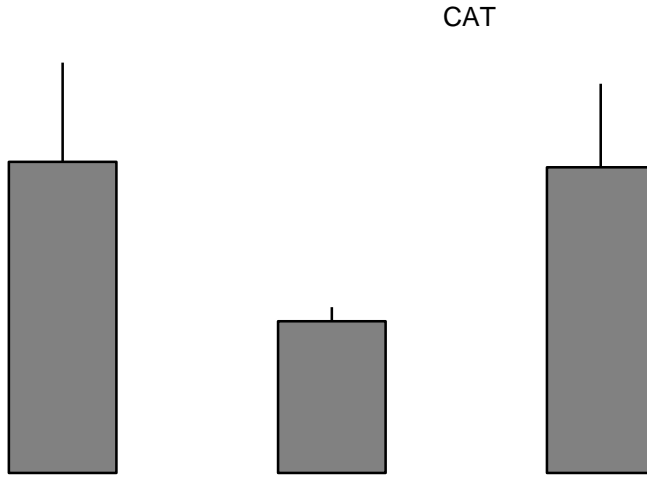


Şekil 1. Böbrek dokusunda MDA düzeyi

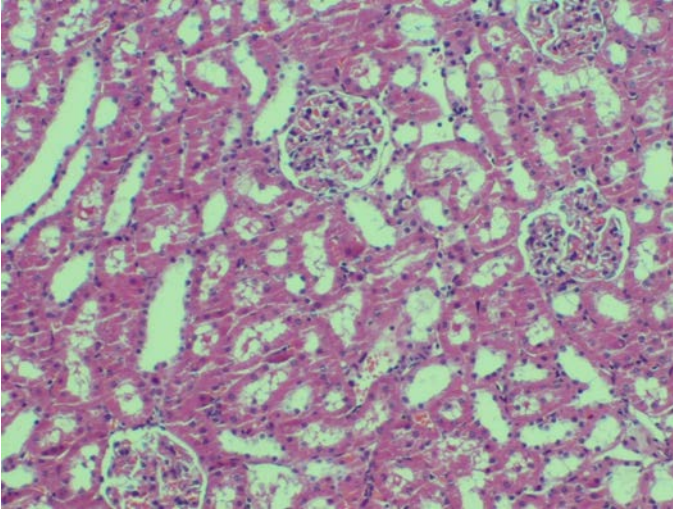
SOD



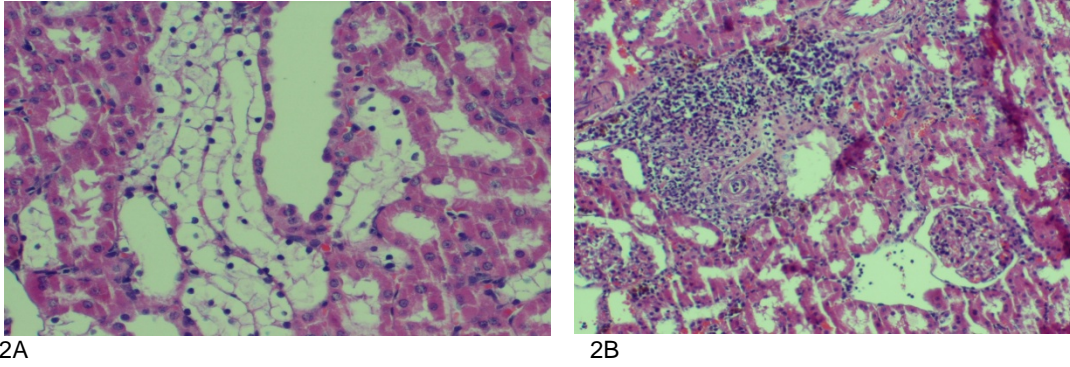
Şekil 2. Böbrek dokusunda SOD enzim aktivitesi



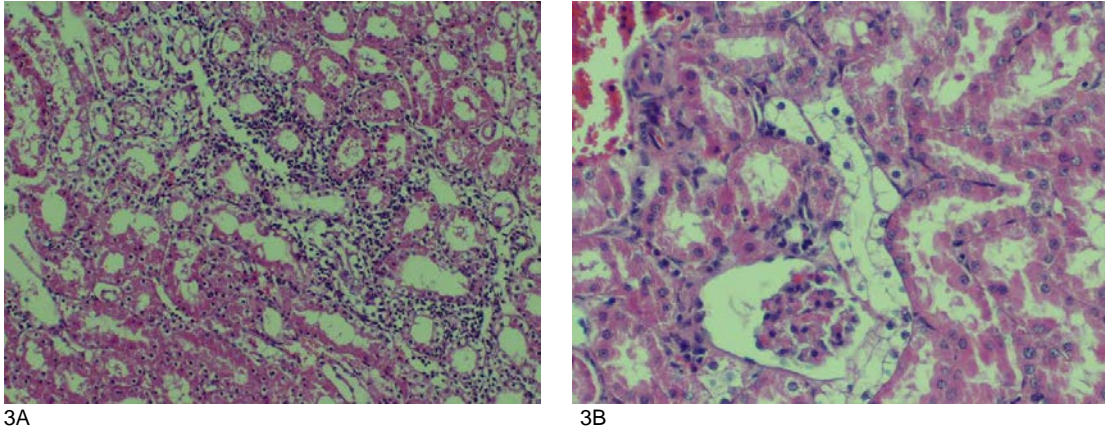
Şekil 3. Böbrek dokusunda CAT enzim aktivitesi



Resim1. Sham grubu (HE X20)



Resim 2. MTX uygulanan grup (HE X20).



Resim 3. MTX +EPO uygulanan grup (HE X20)

TARTIŞMA

MTX folik asit anti-metaboliti olup, kanserden inflamatuvar hastalıklara kadar geniş bir alanda kullanılmaktadır. MTX'in hepatotoksik etkisinin mekanizması henüz tam olarak açıklanamayan karmaşık bir sistemdir¹. Bazı çalışmalarda karaciğer, böbrek, ince barsak ve merkezi sinir sistemi üzerindeki MTX toksisitesinden oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır²⁵⁻²⁸. Babiak ve ark. MTX'in HeLa hücrelerinde glutatyon seviyelerini azalttığını, SOD ve CAT seviyelerini değiştirmedini göstermişlerdir²⁹. Jahovic ve ark. 20 mg/kg tek doz MTX i.p. uygulanan sıçanların kanında, karaciğer ve böbrek dokularında

myeloperoksidaz aktivitesinde artma, glutatyon seviyelerinde azalma ve MDA miktarında belirgin artışa yol açtığını göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar melatonin ile MTX'i birlikte uyguladıklarında ise, artan oksidan parametrelerin normal seviyelere düştüğünü göstermişlerdir. Miyazono ve ark. MTX'in yan etkisi olarak sıçanların ince barsağında SOD ve CAT aktivitelerinde artma, glutatyon seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX'in yol açtığı ince barsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdir. Üstelik aynı araştırmacılar, antioksidan madde olan N-asetilsisteinin sıçan ince barsağında oksidatif stresi önlediğini göstermişlerdir⁹. Biz de çalışmamızda

güçlü bir antioksidan madde olan EPO'nun, EPO'nun MTX kaynaklı nefrotoksik etkilerini azaltıp azaltamayacağını araştırdık.

Bilindiği gibi EPO'nun bir çok doku tarafından lokal olarak fiziksel ve metabolik strese cevaben salınımı artmaktadır. EPO'nun iskemiye karşı antiapoptotik, antioksidan, anjiyogenik ve nöroprotektif etkiler gibi çok sayıda koruyucu etkileri hücre kültüründe ve hayvan modellerinde gösterilmiştir^{20,30,31}. EPO antioksidan etkisini nitrik oksit ve MDA düzeylerini azaltarak ayrıca glutatyon peroksidaz, SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini de artırarak gerçekleştirmektedir^{32,33}. İlk defa yapılan bu çalışmamızda, MTX kullanımına bağlı gelişen böbrek toksisitesini engellemek için, güçlü bir antioksidan olan EPO kullanıldı. Yapılan önceki çalışmaları destekler şekilde bizim çalışmamızda da MTX, böbrekte lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerini, Sham grubuna göre önemli ölçüde artırdı. MTX+EPO uygulanan sıçanlarda ise MDA düzeyleri, MTX grubuna göre önemli ölçüde azaldı (Şekil 1). Ayrıca MTX'in CAT ve SOD enzim düzeylerini, kontrol grubuna göre böbrek dokusunda anlamlı olarak azalttığını ve MTX+EPO grubunda ise bu enzim düzeylerinin MTX grubuna göre anlamlı olarak arttığını gözlemledik (Şekil 2, 3). Çalışmamızda biyokimyasal sonuçların histopatolojik olarak desteklendiğini gözlemledik. MTX verilen grupta böbrekte ciddi morfolojik hasar bulunurken EPO ve MTX'in birlikte verildiği grupta mevcut hasarda daha az hasar saptandı. Sonuç olarak; MTX, antioksidan enzim aktivitelerini düşürerek ve lipid peroksidasyonunu artırarak sıçan böbrek dokusunda oksidatif hasara neden olmaktadır. MTX'in neden olduğu doku hasarına karşı EPO'nun koruyucu etkisini, lipid peroksidasyon düzeyini düşürerek ve antioksidan enzim düzeylerini artırarak gösterdiği saptandı. Bu veriler, EPO'nun kemoterapötik ilaçlara bağlı oluşan karaciğer ve böbrek hasarına karşı koruyucu olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak, bu hususta daha çok moleküler ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

***Bu çalışma: XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi. 29 Aralık-2 Kasım 2011, Adana'da sözlü olarak sunulmuştur.**

KAYNAKLAR

1. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliosıçanes methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit.* 2006;12:BR274-78.
2. Dutz JP, Ho VC. Immunosuppressive agents in dermatology. An update. *Dermatol Clin.* 1998;16:235-51.
3. Flores F, Kerdel FA. Other novel immunosuppressants. *Dermatol Clin.* 2000;18:475-83.
4. Madhyastha S, Somayaji SN, Rao MS, Nalini K, Bairy KL. Hippocampal brain amines in methotrexate induced learning and memory deficit. *J Physiol Pharmacol.* 2002;80:1076-84.
5. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 1983;309:1094-104.
6. Sener G, Eksioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Yegen BC. Beta-glucan ameliosıçanes methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol.* 2006;542:170-8.
7. Jahovic N, Cevik H, Sehirli Ao, Yeğen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res.* 2003;34:282-7
8. Kolli VK, Abraham P, Isaac B, Selvakumar D. Neutrophil infiltrasyon and oxidative stress may play a critical role in methotrexate-induced renal damage. *Chemotherapy.* 2009;55:83-90.
9. Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2004;39:1119-27.
10. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengesi etkileyen koşullar. *Klinik gelişim.* 1998;1:336-41.
11. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and

- disease: Is the Total Antioxidant Capacity the right tool?. *Redox Rep.* 2004;9:145-52.
12. Hermes-Lima M, Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol pharmacol.* 2002;133:537-56.
 13. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med.* 1989;82:747-52.
 14. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982;47:412-26.
 15. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood.* 1988;71:524-27.
 16. Krantz SB. Erythropoietin. *Blood.* 1991;77:419-34.
 17. Wang FF, Kung SC, Goldwasser E. Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology.* 1985;116:2286-92.
 18. Fisher JW: Erythropoietin, in *Textbook of Nephrology* (vol 3), edited by Massry SG, Glasscock RJ, New York, Williams and Wilkins, 1989;1:175-180.
 19. Baker JE. Erythropoietin mimics ischemic preconditioning. *Vascul Pharmacol.* 2005;42:233-41.
 20. Ates E, Yalcin AU, Yilmaz S, Köken T, Tokyol C. Protective effect of erythropoietin on renal ischemia and reperfusion injury. *ANZ J Surg.* 2005;75:1100-5.
 21. Beutler E. *Red Cell Metabolism.* New York, Grune and Stratton. 1975.
 22. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1983;23:239-57.
 23. Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.
 24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265.
 25. Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M, Pasvogel A, Hutter J, Krull K, Moore IM. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs.* 2005;6:187-95.
 26. Jahovic N, Sener G, Cevik H, Ersoy Y, Arbak S, Yegen BC. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct.* 2004;22:169-78.
 27. Devrim E, Cetin R, Kiliçoglu B, Ergüder BI, Avci A, Durak I. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail.* 2005;27:771-3.
 28. Uz E, Oktem F, Yilmaz HR, Uzar E, Özgüner F. The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 2005;277:165-70.
 29. Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct.* 1998;16:283-93.
 30. Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Ribaut C. Erythropoietin and myocardial protection: what's new? *Fundam Clin Pharmacol.* 2005;19:439-46.
 31. Sepodes M et al. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int.* 2006;19:919-26.
 32. Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U, Yilmaz O, Duman N, Uysal N, Ozkan H. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2005;160:146-56.
 33. Genc S, Koroğlu TF, Genc K. Erythropoietin as a novel neuroprotectant. *Restor Neurol Neurosci.* 2004;22:105-19.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Dr. Ergül Belge Kurutaş
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı
Hastane cad., Yörükselim mah.
KAHRAMANMARAŞ
E-mail: ergulkurutas@gmail.com

Geliş tarihi/Received on : 14.08.2014

Kabul tarihi/Accepted on: 22.09.2014