



T.C.
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı



Sayı : E-72011914-604.01.03-270886
Konu : Düzenlenmiş Sonuç Raporu

19.12.2023

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİNE

Tarafımdan yürütülmekte olan 2021/2-34 M nolu projenin düzenlenmiş sonuç raporu yazı ekinde gönderilmektedir.

Bilgilerinize arz ederim.

Doç. Dr. Alper YALÇIN
Öğretim Üyesi

Ek: Düzenlenmiş Sonuç Raporu. (38 Sayfa)





T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİNE

Proje Numarası :	2021/2-34 M
Projenin Adı :	Metotreksata bağlı karaciğer hasarı üzerinde sumak (Rhus coriaria) ve D vitaminin etkilerinin araştırılması
Projenin Türü :	Münferit Proje (M)
Proje Yön. Unv.-Adı-Soyadı :	Doç.Dr. Alper YALÇIN
Görev Yeri :	Tıp Fakültesi
Bölümü :	Temel Tıp Bilimleri
Sözleşmeye Göre Projenin	
Başlangıç Tarihi :	20-05-2021
Bitiş Tarihi :	19-11-2022
Alınan Ek Süre :	12 Ay
Sonuç Raporu Tarihi :	13-12-2023
Proje Bütçesi :	42.897,60 TL
Alınan Ek Ödenek :	0,00 TL
Projenin Toplam Bütçesi :	42.897,60 TL
Harcanan Miktar :	40.596,56 TL
Proje Kalan Bütçesi :	2.301,04 TL
İşyeri Telefon Numarası :	(344)300-3386
Cep Telefon Numarası :	(543)582-8463
Proje Yöneticisinin İş Adresi :	Histoloji-Embriyolojî Anabilim Dalı-Bahçelievler yerleşkesi
Demirbaş[Taşınır Alımları	Proje Kapsamında Demirbaş Niteliğinde Taşınır Alınmamıştır.

Projemin sonuç raporunun kabulünü arz ederim./...../202..

Doç.Dr. Alper YALÇIN
(İmza)

Projemin Sonuç Raporunun, Üniversitemiz BAP/Kütüphane İnternet Sayfasında;

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1.Yayınlanmasına İzin Vermiyorum. | ☐ |
| 2.Sadece Özetin Yayınlanmasına İzin Veriyorum. | ☐ |
| 3.Tam Metin Yayınlanmasına İzin Veriyorum. | ☒ |
| 4. Tarihinden İtibaren Tam Metin Yayınlanmasına İzin Veriyorum. | ☐ |



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ
SONUÇ RAPORU

F-6

Proje Adı

Metotreksata bağlı karaciğer hasarı üzerinde sumak (Rhus coriaria) ve D vitaminin etkilerinin araştırılması

Proje No	Başlama Tarihi	Bitiş Tarihi	
2021/2-34 M	20-05-2021	19-11-2022	
Rapor Türü	Raporun Kapsadığı Dönemin Tarihleri		
Sonuç Raporu	20-05-2022	19-11-2022	
Bilimsel Araştırmalar Birimi Tarafından Sağlanan Destek Miktarı	Gelişme Raporu Döneminde Harcanan	Şimdiye Kadar Harcanan	Kalan
42.897,60 TL		40.596,56 TL	2.301,04 TL
Destek Sağlayan Diğer Kuruluşların Katkısı	Gelişme Raporu Döneminde Harcanan	Şimdiye Kadar Harcanan	Kalan

SAĞLANAN DESTEKTEN ŞİMDİYE KADAR YAPILAN HARCAMALARIN FASILLARA GÖRE DAĞILIMI

Fasıl	Harcanan	Kalan
TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	40.596,56 TL	531,04 TL
HİZMET ALIMLARI	0,00 TL	1.770,00 TL

RAPOR DÖNEMİNE AİT İLGİLİ YAYINLAR

No	Yayın
	Bulunmamaktadır

RAPOR DÖNEMİNE AİT İLGİLİ FİKRİ MÜLKİYETLER

No	Fikri Mülkiyet Adı	Fikri Mülkiyet No	Alındığı Ülke	Tescil Tarihi
				Bulunmamaktadır

RAPOR DÖNEMİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR VE ELDE EDİLEN SONUÇLAR

Sonuç Rapor Özeti :

ÖZET Metotreksat (MTX), kanser ve enflamatuar hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ajandır. Ancak karaciğer üzerinde ciddi toksik etkileri vardır. Sumak (Rhus coriaria L.) ve D vitamini (VD) her ikisi de güçlü antioksidanlar ve serbest radikal temizleyiciler olarak işlev görür. Buna rağmen, MTX aracılı karaciğer hasarları üzerindeki etkileri hala bilinmemektedir. Bu nedenle, mevcut çalışma sıçanlarda MTX'in neden olduğu hepatotoksiteye karşı sumak ve VD'nin olası hepatoprotektif potansiyelini belirlemek için tasarlandı. Altmış üç adet sıçan, her grupta eşit sayıda olacak şekilde; kontrol, sumak özü (SE) (500 mg/kg), VD (200 IU/kg), ayçiçek yağı (SO) (1 ml/kg), SE + VD, MTX (8. günde tek doz 20 mg/kg), MTX + SE, MTX + VD ve MTX + SE + VD olarak gruplandırılmıştır. MTX grubu, transmisyon elektron mikroskopunda kontrol grubuna kıyasla ciddi karaciğer hasarı gösterdi. İmmünohistokimyasal incelemelerde MTX grubunda, önemli ölçüde artmış geçici reseptör potansiyeli melastatin 2 (TRPM2), kaspaz-3 ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) ekspresyonu gözlemlendi. MTX uygulaması ayrıca, serum alanin transaminaz (ALT) ve doku malondialdehit (MDA) gibi karaciğer fonksiyon belirteçlerinde önemli artışlarla sonuçlandı. Dikkat çekici bir şekilde, SE ve VD'nin aynı anda uygulanması tüm değişiklikleri iyileştirdi. SE ve VD, sıçanlarda MTX'in neden olduğu karaciğer hasarı üzerinde sinerjik koruyucu etki gösterdi. Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, hepatotoksiste, methotrexate, sumak, vitamin D

Rapor içeriği için lütfen eke bakınız.

EK: [Proje Sonuç Kitabı.pdf](#)

Demirbaş[Taşınır Alımları

Proje Kapsamında Demirbaş Niteliğinde Taşınır Alınmamıştır.

Proje Yürütücü Unvanı, Adı SOYADI	İmzası	Tarih
Doç.Dr. Alper YALÇIN		13-12-2023



**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM
ÜNİVERSİTESİ**

**METOTREKSATA BAĞLI KARACİĞER HASARI
ÜZERİNDE SUMAK (*Rhus coriaria*) ve D
VİTAMİNİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**

2023 KAHRAMANMARAŞ

PROJE KONUSU

METOTREKSATA BAĞLI KARACİĞER HASARI ÜZERİNDE SUMAK (*Rhus coriaria*) ve D VİTAMİNİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Proje No: 2021/2-34 M

**Doç. Dr. Alper YALÇIN
Dr. Öğr. Üyesi Hasan AYDIN
Dr. Öğr. Üyesi Tuba ÖZCAN METİN
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet TÜRK
Doç. Dr. Aslı YAYLALI
Dr. Öğr. Üyesi Gülsen BAYRAK
Prof. Dr. Ebru BALLI**

2023 KAHRAMANMARAŞ

ÖNSÖZ

Bu çalışma, her biri, ayrı ayrı, güçlü birer antioksidan olan sumak ve D vitaminin, karaciğer dokusu üzerinde yıkıcı etkisi olduğu bilinen ve tıp alanında belli hastalıklara karşı yaygın olarak kullanılan metotreksat isimli ilacın, karaciğer üzerindeki olumsuz etkilerini azaltıcı rollerini, ayrı ayrı ve birlikte kullanımlarında ortaya koymak, çalışma sonunda her iki antioksidanın da karaciğer hasarını azaltıcı ya da tamir edici etkilerine dair olumlu sonuç elde edildiği takdirde, hayatlarının bir döneminde ya da hayat boyu metotreksat kullanmak zorunda kalan oldukça fazla sayıdaki hastanın, metotreksat isimli ilaç ile birlikte, sumak ve D vitamini kullanmalarının faydalı olabileceğine dair, literatüre katkı yapmak ve bu konu ile ilgili daha geniş kapsamlı çalışma yapılabilmesine öncü olmak amaçlanmıştır.

Bu bilimsel araştırma projesi Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi tarafından proje numarası 2021/2-34 M ile desteklenmiştir. Destekleri için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz.

Projenin başlama tarihi 20/05/2021 ve bitiş tarihi 13/12/2023'tür.

Proje Yürütücüsü
Doç. Dr. Alper YALÇIN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLOLAR DİZİNİ.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM (METOD)	3
2.1. Sumak Ekstratının Kaynağı ve Hazırlanışı	3
2.2. Deneysel Tasarım	3
2.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)	4
2.4. TRMP2, kaspaz-3 ve tümör nekroz faktörü alfanın (TNF- α) immünohistokimyasal boyaması.....	5
2.5. Karaciğer dokusunda malondialdehit (MDA) seviyesinin ölçümü.....	5
2.6. Serum örneklerinde ALT seviyesinin ölçümü.....	6
2.7. İstatistiksel analizler... ..	6
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	7
3.1. Ultrastrüktürel bulgular.....	7
3.2. TRPM2 ekspresyonuna yönelik bulgular.....	10
3.3. Kaspaz-3 ekspresyonuna yönelik immünohistokimyasal bulgular	11
3.4. TNF- α ekspresyonuna yönelik immünohistokimyasal bulgular.....	12
3.5. MTX, SE ve VD'nin, MDA düzeyine etkileri.....	13
3.6. MTX, SE ve VD'nin, serum ALT aktivitesi üzerine etkileri.....	14
3.7. Serum örneklerinde ALT seviyesinin ölçümü.....	15
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	18
KAYNAKLAR.....	19

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3-1 Deney gruplarında TRPM2, kaspaz-3 ve TNF- α immünoreaktivitelerinin histoskorları.....	11
Tablo 3-2 Deney gruplarının karaciğer MDA ve serum ALT düzeyleri.....	14

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3-1 Elektronmikroskopik mikrofotoğraf	8
Şekil 3-2 Elektronmikroskopik mikrofotoğraf	9
Şekil 3-3 Böbrek dokusunda TRPM2'nin immün işaretlemesi	10
Şekil 3-4 Böbrek dokusunda kaspaz-3'ün immün işaretlemesi	12
Şekil 3-5 Böbrek dokusunda TNF- α 'nın immün işaretlemesi	13

KISALTMALAR DİZİNİ

KISALTMALAR

MTX: Metotreksat

VD: Vitamin D

TRP: Transient reseptör potansiyel

TRPM2: Transient reseptör potansiyel melastatin 2

TNF- α : Tümör nekroz faktörü-alfa

ALT: Alanin transaminaz

MDA: Malondialdehit

ROS: Reaktif oksijen türleri

TEM: Transmisyon elektron mikroskobu

PBS: Fosfat tamponlu salin

ANOVA: Tek yönlü varyans analizi

ÖZET

Metotreksat (MTX), kanser ve enflamatuvar hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ajandır. Ancak karaciğer üzerinde ciddi toksik etkileri vardır. Sumak (*Rhus coriaria L.*) ve D vitamini (VD) her ikisi de güçlü antioksidanlar ve serbest radikal temizleyiciler olarak işlev görür. Buna rağmen, MTX aracılı karaciğer hasarları üzerindeki etkileri hala bilinmemektedir. Bu nedenle, mevcut çalışma sıçanlarda MTX'in neden olduğu hepatotoksisiteye karşı sumak ve VD'nin olası hepatoprotektif potansiyelini belirlemek için tasarlandı. Altmış üç adet sıçan, her grupta eşit sayıda olacak şekilde; kontrol, sumak özü (SE) (500 mg/kg), VD (200 IU/kg), ayçiçek yağı (SO) (1 ml/kg), SE + VD, MTX (8. günde tek doz 20 mg/kg), MTX + SE, MTX + VD ve MTX + SE + VD olarak gruplandırılmıştır. MTX grubu, transmisyon elektron mikroskopunda kontrol grubuna kıyasla ciddi karaciğer hasarı gösterdi. İmmünohistokimyasal incelemelerde MTX grubunda, önemli ölçüde artmış geçici reseptör potansiyeli melastatin 2 (TRPM2), kaspaz-3 ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ekspresyonu gözlemlendi. MTX uygulaması ayrıca, serum alanin transaminaz (ALT) ve doku malondialdehit (MDA) gibi karaciğer fonksiyon belirteçlerinde önemli artışlarla sonuçlandı. Dikkat çekici bir şekilde, SE ve VD'nin aynı anda uygulanması tüm değişiklikleri iyileştirdi. SE ve VD, sıçanlarda MTX'in neden olduğu karaciğer hasarı üzerinde sinerjik koruyucu etki gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, hepatotoksisite, methotrexate, sumak, vitamin D

ABSTRACT

Methotrexate (MTX) is a commonly used agent in treatment of cancer and inflammatory diseases. However, it has serious toxic effects on the liver. Sumac (*Rhus coriaria L.*) and vitamin D (VD) both function as powerful antioxidants and free radical scavengers. Despite this, their effects over MTX-mediated liver damages still remain unknown. Thus, the current study was designed to establish the possible hepatoprotective potential of sumac and VD against MTX-induced hepatotoxicity in rats. Sixty-three rats were grouped as: control, sumac extract (SE) (500 mg/kg), VD (200 IU/kg), sunflower oil (SO) (1 ml/kg), SE+VD, MTX (a single dose of 20 mg/kg on day 8), MTX+SE, MTX+VD, and MTX+SE+VD with equal numbers of animals. The MTX group showed severe liver damage on transmission electron microscopy compared to the control group. In the immunohistochemical examinations, the MTX group had significantly increased transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2), caspase-3, and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) expression. MTX administration also resulted in significant increases in liver function markers such as serum alanine transaminase (ALT) and tissue malondialdehyde (MDA). Noticeably, administering SE and VD concurrently improved all changes. SE and VD showed synergistic protective effect on liver damage induced by MTX in rats.

Keywords: Antioxidants, hepatotoxicity, methotrexate, sumac, vitamin D

1. GİRİŞ

Metotreksat (MTX), otoimmün ve dermatolojik hastalıkların tedavisinde en etkili ve yaygın kullanılan ilaçlardan biridir (Ezhilarasan 2021). Karaciğer, böbrek, kemik iliği, gastrointestinal sistem ve nöronlar üzerindeki sayısız olumsuz etkisi nedeniyle MTX düzenli olarak izlenmelidir (Pannu 2019). MTX'in hem akut hem de kronik kullanımda toksik etkileri vardır (Barak ve ark. 1984). Hücreleri oksidatif strese karşı koruyan antioksidan savunma sisteminin vücuttaki etkinliğini azaltır (Çetinkaya ve ark. 2006). Bunun nedeni, oksidanlar ve antioksidanlar arasında yer alan dengenin, oksidanlar lehine kaymasıdır. Dokulardaki antioksidan/oksidan dengesi korunmazsa, hücresel hasara neden olabilecek bazı patolojik değişiklikler meydana gelebilir (Akbulut ve ark. 2014). MTX'in en önemli yan etkilerinden biri hepatotoksisitedir (Malayeri ve ark. 2022), bu durum hayatı tehdit edici olabilir (Hafez ve ark. 2015) ve hatta ölüme neden olabilir (Barak ve ark. 1984).

Çeşitli çevresel değişiklikleri algılama ve bunlara uyum sağlama yeteneği, tüm hücrelerin hayatta kalması için kritik öneme sahiptir ve geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanalları bu algılama ve adaptasyon süreçlerinde önemli roller oynar (Yamamoto ve ark. 2010). TRPM2, reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından aktive edilen Ca^{2+} geçirgen seçici olmayan katyon kanalı oluşturan bir TRP protein süper ailesi üyesidir (Takahashi ve ark. 2011). Hücrelere Ca^{2+} akışına aracılık eder, lizozomal Ca^{2+} salım kanalı olarak işlev görür (Sumoza-Toledo ve Penner 2011) ve hücre ölümüne aracılık eder (Hara ve ark. 2002).

TNF- α , güçlü proinflamatuvar aktiviteye ve çeşitli proinflamatuvar mediatörlerin salgılanmasını teşvik etme yeteneğine sahip önemli bir proinflamatuvar sitokindir (Wang ve ark. 2020). Oksidatif stres, proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırarak oksidatif stres ve inflamasyon arasındaki etkileşime yol açar (Sayed ve Morcos 2007; Sayed 2008) ve bu da daha fazla doku hasarına sebep olur (Cüre ve ark. 2015). Oksidatif stres dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar (Tousson ve ark. 2014) ve TNF- α gibi enflamatuvar mediatörlerin salınması (Cetiner ve ark. 2005), MTX toksisitesinin olası nedenleri olarak gösterilmiştir.

Apoptozun en önemli belirteçleri, bir dizi yapısal ve düzenleyici protein bölünmesinde kısmen veya tamamen rol oynar (Peña-Llopis ve ark. 2003). Porter ve Janicke'ye (1999) göre kaspaz-3, apoptotik hücrelerdeki proteinlerin büyük kısmını parçalayan en etkili kaspaz ailesidir ve apoptozda da önemli bir rol oynar (Boeddeker ve Alexandra 2015). MTX'in oksidatif DNA hasarına ve apoptoz yollarının aktivasyonuna yol

açtığı bildirilmiştir (Prestigiacomo ve ark. 2017).

Sumak (*Rhus coriaria L.*), Akdeniz bölgesinde yaygın olarak kullanılan ve sağlıklı gıda bileşenlerine sahip olan bir baharattır (Khalil ve ark. 2021). Çeşitli çalışmalar, sumağın, içerdiği bileşiklere bağlı olarak, terapötik potansiyelini bildirmiştir (Batiha ve ark. 2022). Sumak, flavonoidler, tanenler, polifenoller, uçucu yağlar ve organik asitler dahil olmak üzere birçok fitokimyasal türünden zengindir (Elagbar ve ark. 2020). Karaciğer hasarını önleme özelliğinin yanı sıra, antioksidan, antiviral, antibakteriyel, antihemolitik, iltihap önleyici ve serbest oksijen radikal süpürücü özelliklere sahiptir (Korkmaz 2021). Sumak, kanser, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalığa karşı koruyucu potansiyele sahiptir (Alsamri ve ark. 2021).

Tipik olarak diyet yoluyla tüketilen D vitamini (VD), cildin güneş ışığına maruz kaldığında ürettiği steroid bir hormondur (Caprio ve ark. 2012). 7-dehidrokolesterol (pro-Vitamin D3), D3 (kolekalsiferol), 1,25-dihidroksikolekalsiferol ve D2 vitamini (ergokalsiferol) içerir (Wiseman 1993). Kolekalsiferol, vücudu besleyen ana VD formunu oluşturur ve besinsel takviye açısından, tek VD formu olarak düşünülmelidir (Vieth 2020). VD oksidatif stresi önler, kronik iltihabı azaltır ve mitokondriyal solunum fonksiyonunu sağlam tutmaya yardımcı olur. VD, çeşitli patolojik durumlarda olumlu etkileri olan güçlü bir antioksidan olarak insan sağlığını korumak için gereklidir (Wimalawansa 2019). Oksidatif stres, birçok hastalığın patolojisine katkıda bulunan VD yetersizliği ile şiddetlenir (Camara ve Brandão 2019).

Bu çalışmanın amacı, bir sıçan modelinde, SE ve VD'nin MTX aracılı karaciğer hasarına karşı koruyucu özelliklerini araştırmaktır. Bu amaçla transmisyon elektron mikroskobu ile tüm grupların karaciğer dokularındaki histopatolojik değişiklikleri değerlendirdik. Ayrıca, genellikle oksidatif hasarın bir göstergesi olarak bilinen malondialdehit (MDA) ve karaciğer hasarı için en spesifik belirteç olan serum alanin aminotransferaz (ALT) gibi biyokimyasal parametrelerle birlikte, karaciğer TRPM2, TNF- α ve kaspaz-3 ekspresyonundaki immünohistokimyasal değişiklikler araştırıldı.

2. MATERYAL VE YÖNTEM (METOD)

2.1. Sumak ekstraktının kaynağı ve hazırlanışı

Sumak meyveleri, Adıyaman'daki yerel bir pazardan taze ve temiz olarak temin edildi. Meyveler distile su ile temizlendikten sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında kurutuldu. Öğütülmüş kuru meyveler, -20°C'lik dondurucuda, analiz edilene kadar saklandı. Öğütülmüş malzeme beş kat konsantrasyonda damıtılmış su (g/ml) ile birleştirildi, iki saat boyunca oda sıcaklığında (22°C) yıkandı ve daha sonra, toplanan süpernatant kullanılarak, 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Döner bir buharlaştırıcı ve 40°C'de bir vakum kullanılarak süpernatantlardan gelen solvent buharlaştırıldı. İnce liyofilize toz oluşturmak için elde edilen fraksiyon, temiz suda çözüldü ve -51°C'de vakum altında dondurularak kurutuldu (Doğan ve Çelik 2016).

2.2. Deneysel tasarım

Bu çalışma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (2021/03/03, karar no: 01). SE ve VD'nin MTX aracılı hepatotoksisite üzerindeki etkilerini incelemek için 8-10 haftalık, 200-300 g ağırlığında toplam 63 erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Ratlar (n=7) rastgele dokuz eşit gruba ayrılarak, sıcaklığı 22±2 °C ve 12 saat aydınlık-karanlık döngüsü olan ortamda, istenildiği kadar standart yem (Korkutelim Yem Gıda San. Tic., Antalya, Türkiye) ve su ile beslendi. Gruplar şu şekilde tasarlandı:

- Kontrol grubu: Herhangi bir ilaç verilmedi.
- Sumak ekstraktı (SE) grubu: 1 ml distile su içerisinde çözündürülmüş 500 mg/kg liyofilize SE, 21 gün boyunca günlük olarak oral gavaj (o.g.) ile verildi (Doğan A ve Çelik 2016).
- D Vitamini (VD) grubu: Ayçiçek yağında eritilmiş 200 IU/kg VD (DEVIT-3® Deva, Türkiye), 21 gün boyunca günlük olarak o.g. (Dabak ve ark. 2009) ile verildi.
- Ayçiçek yağı (SO) grubuna: 21 gün boyunca günlük 1 ml/kg SO o.g yoluyla uygulandı.

- SE+VD grubu: 500 mg/kg liyofilize SE ve 200 IU/kg VD, o.g. yoluyla günlük olarak uygulandı. 21 gün boyunca.
- MTX grubu; 8. günde 20 mg/kg'lık tek doz MTX (Methotrexate , Koçak Farma, Türkiye) intraperitoneal (ip) olarak verildi. Karaciğerin MTX'e maruz kalma süresi 14 gün olarak tasarlandı (Erdoğan ve Yalçın 2020).
- MTX+SE grubu; Liyofilize SE (500 mg/kg), 21 gün boyunca günlük olarak o.g.yoluyla verildi. 20 mg/kg MTX tek doz olarak 8. günde i.p. olarak verildi.
- MTX+VD grubu; VD (200 IU/kg) o.g. 21 gün boyunca her gün o.g yoluyla verildi. 20 mg/kg MTX tek doz olarak 8. günde i.p. olarak verildi.
- MTX+SE+VD; Liyofilize SE (500 mg/kg) ve VD (200 IU/kg), o.g. yoluyla verildi. 21 gün boyunca her gün. 20 mg/kg MTX tek doz olarak 8. günde i.p. olarak verildi.

Deney sonunda tüm gruplardaki hayvanlara ketamin (75 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) verildi ve sıçanlar anestezi altında iken intrakardiyal olarak kan alındı. Transmisyon elektron mikroskopunda (TEM) incelemek için karaciğer dokularının bazı kısımları alındı ve %2,5 glutaraldehit ile işleme tabi tutuldu. İmmunohistokimyasal inceleme için, kalan karaciğer dokuları, rutin laboratuvar işlemleri sonrasında parafin ile bloke edildikten sonra %10 formalin ile tespit edildi. Kanlar santrifüj edildikten sonra geri kalan karaciğer dokuları ve serum örnekleri biyokimyasal analizler için -80 o C'de saklandı.

2.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)

Elektron mikroskopunda kullanılmak üzere 1 mm³ doku örnekleri +4  C'de yeni yapılmış %2,5 glutaraldehit fiksatifine yerleştirildi, fosfat tamponunda durulandı ve ardından taze fosfat tamponuna yerleştirildi. %1 osmiyum tetroksit ile post-fiksasyon yapıldı. Dehidrasyonun ardından artan seride etil alkol ve doku parçaları epon içerisine gömüldü. Ultramikrotomla (UCT-125; Leica Microsystems GmbH, Wien, Avusturya) kesilen ultra ince kesitler, uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlandı ve bir TEM (JEM-1011; JEOL Ltd, Tokyo, Japonya) ile incelendi.

2.4. TRMP2, kaspaz-3 ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) immünohistokimyasal boyaması

Parafin bloklarından alınan kesitler Poli-L-Lizin slaytlarına aktarıldı, temizlendi, rehidre edildi ve daha sonra antijen geri kazanımı için sitrat tampon çözeltisinde (pH:6) yedi kez 5'er dakika mikrodalga fırında (750 W) kaynatıldı. Oda sıcaklığında 20 dakika soğutulduktan sonra kesitler, fosfat tamponlu salinle (PBS: P4417; Sigma Chemical Co.) her biri, 5 dakika boyunca üç kez yıkandı, ardından hidrojen peroksit blok çözeltisi (TA-125-HP; Lab Vision Corp. USA) ile endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 5 dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra kesitler, zemin boyamasını önlemek için 5 dakika boyunca Ultra V Block (TA-125-UB; Lab Vision Corp.) ile işleme tabi tutulmadan önce, her biri, 5 dakika süreyle PBS ile üç kez yıkandı. Daha sonra kesitler, sırasıyla; TRPM2, kaspaz-3 ve TNF- α immunboyaması için, sırasıyla primer antikörler olan, anti-TRPM2 (1:200, bs-2888R, Bioss), anti-kaspaz-3 (1:200, ab184787, Abcam) ve anti-TNF- α (1:200, ab220210, Abcam) ile, 60 dakika boyunca inkübe edildi. Bunu takiben kesitler, ikincil antikör (biyotinlenmiş keçi anti-fare/tavşan Ig G, TP-125-BN; Lab Vision Corp.) ve streptavidin peroksidaz (TS-125-HR; Lab Vision Corp.) ile 30 dakika boyunca inkübe edildi. Sonrasında kesitlerin üzerine AEC substrat+AEC kromojen solüsyonu (AEC substrat, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC; Lab Vision Corp.) döküldü. Kesitleri temizlemek için PBS kullanıldı. Daha sonra Mayer'in hematoksilin ile boyanan doku kesitleri, Large Volume Vision Mount (TA-125-UG; Lab Vision Corp) ile muamele edilmeden önce, PBS ve damıtılmış su içerisinde yıkandı. Hazırlanan slaytları değerlendirmek ve fotoğraflamak için bir Leica DM500 mikroskobu kullanıldı (Leica DFC295). Karaciğer dokusunda TRPM2, kaspaz-3 ve TNF- α immünoaktivitesinin prevalansını yansıtan histoskor, aşağıdaki derecelendirme ölçeği kullanılarak hesaplandı: 0,1, %25; %0,4, 26; %0,6, %51; 0,9, %76 ve immünoaktivitenin yoğunluğu: 0, boyanmamış; 0,5, az boyanma; 1, biraz lekelenme; 2, orta düzeyde boyanma; 3, güçlü boyanma. Histoscore şu şekilde hesaplandı: yaygınlık x yoğunluk (Yalçın ve ark. 2017).

2.5. Karaciğer dokusunda malondialdehit (MDA) seviyesinin ölçümü

Doku lipid peroksidasyonu (toplam MDA), küçük değişikliklerle, Ohkawa ve ark.'na uygun olarak ölçüldü. (1979), Ohkawa ve arkadaşlarının çalışmasında kullanılan reaksiyon bileşenleri (1979) ikiye ayrıldı ve bu çalışmada, 95°C'de 60 dakika ısıtılan reaksiyon karışımı

45 dakika ısıtıldı. MDA seviyeleri mililitre başına nanomol (nmol/ml) cinsinden ölçüldü.

2.6. Serum örneklerinde ALT seviyesinin ölçümü

Sıçanların serum ALT düzeyleri, Cobas 8000 C701 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) marka biyokimya otoanalizöründe orijinal kitler kullanılarak ölçüldü.

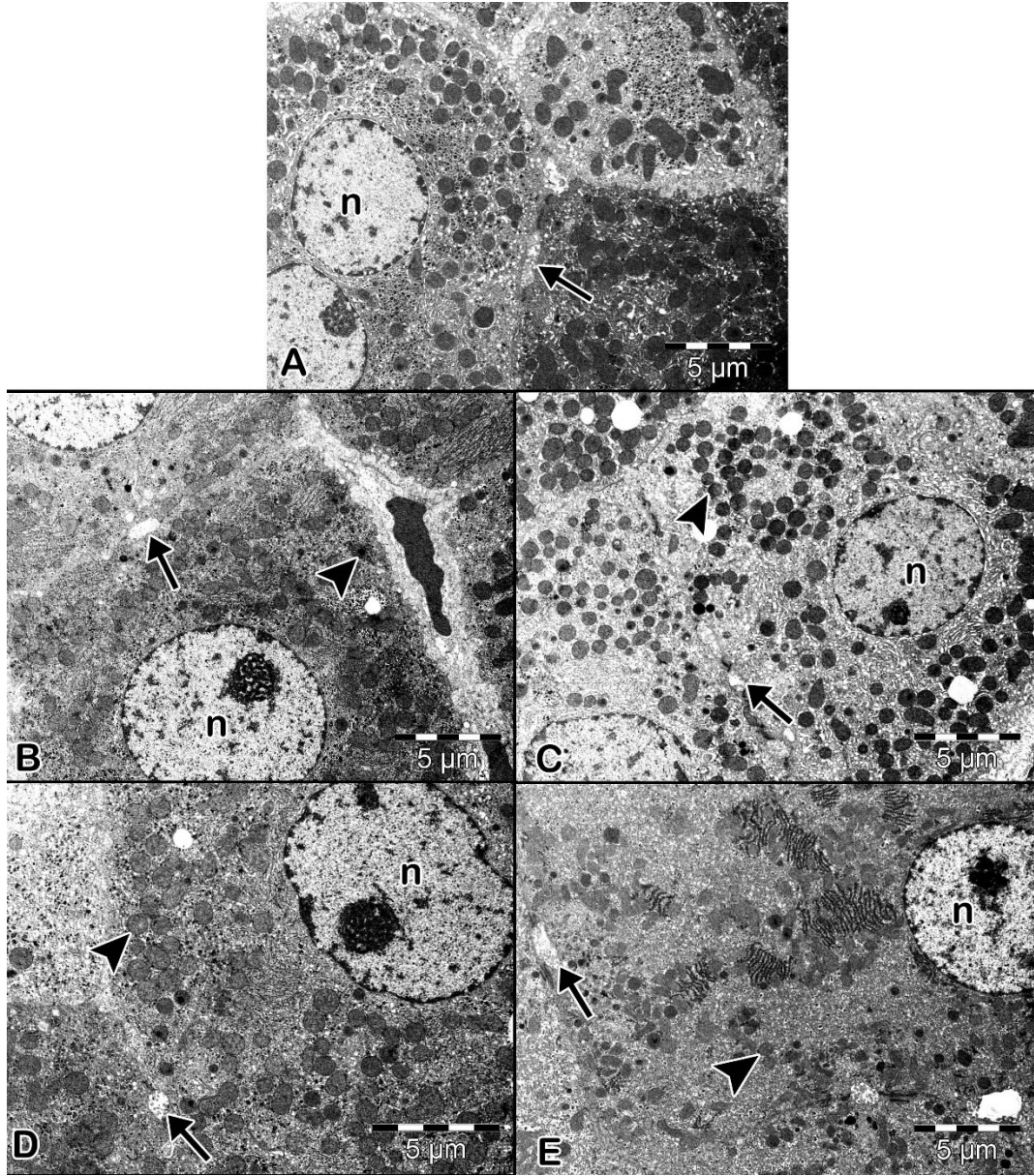
2.7. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SPSS yazılımı sürüm 25.0 (IBM Inc., Chicago, IL) kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılıp dağılmadığını belirlemek için Shapiro Wilk testi kullanıldı. Grupların TRPM2, kaspaz-3, TNF- α , MDA ve ALT bulgularını karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldı. Grup ortalamaları arasındaki anlamlılık Tukey'in çoklu aralık testi kullanılarak belirlendi. Ortalama farklar $p < 0.05$ 'te anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SS olarak rapor edildi.

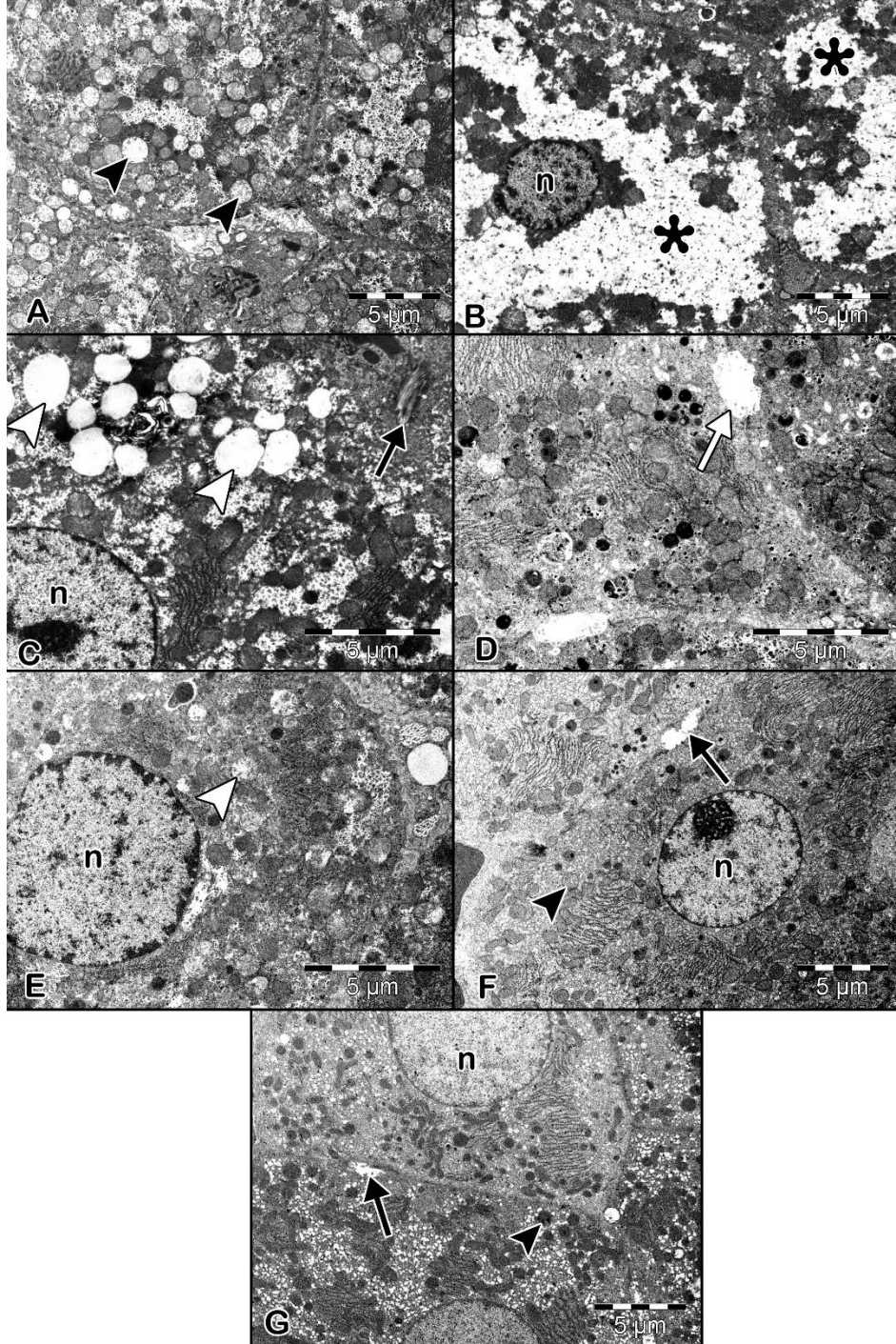
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. Ultrastrüktürel bulgular

Kontrol, SE, VD, SO ve SE+VD grupları normal hepatosit organelleri, safra kanalikülleri ve sinüzoidal morfoloji sergiledi (Şekil 1A-E). MTX grubunda belirgin krista kaybı, mitokondri genişlemesi ve hepatositlerde dejeneratif değişiklikler görüldü. Ek olarak parankimin bazı kısımlarında kollajen liflerinde, lipit vakuollerinde ve daha büyük safra kanaliküllerinde artış görüldü (Şekil 2A-D). MTX+SE grubunda bazı hepatosit mitokondrileri dejeneratif değişiklikler gösterirken diğer yapılar normaldi (Şekil 2E). Hepatositler, mitokondri, safra kanalikülleri ve diğer yapılar, MTX+VD (Şekil 2F) ve MTX+SE+VD (Şekil 2G) gruplarında tipik ultrastrüktürel özellikler sergiledi. Bu bulgular, SE ve VD'nin, MTX'in karaciğer dokusu üzerindeki sitotoksik etkilerini, kontrol grubunun histopatolojik bulgularıyla tutarlı bir şekilde azalttığını açıkça göstermektedir.



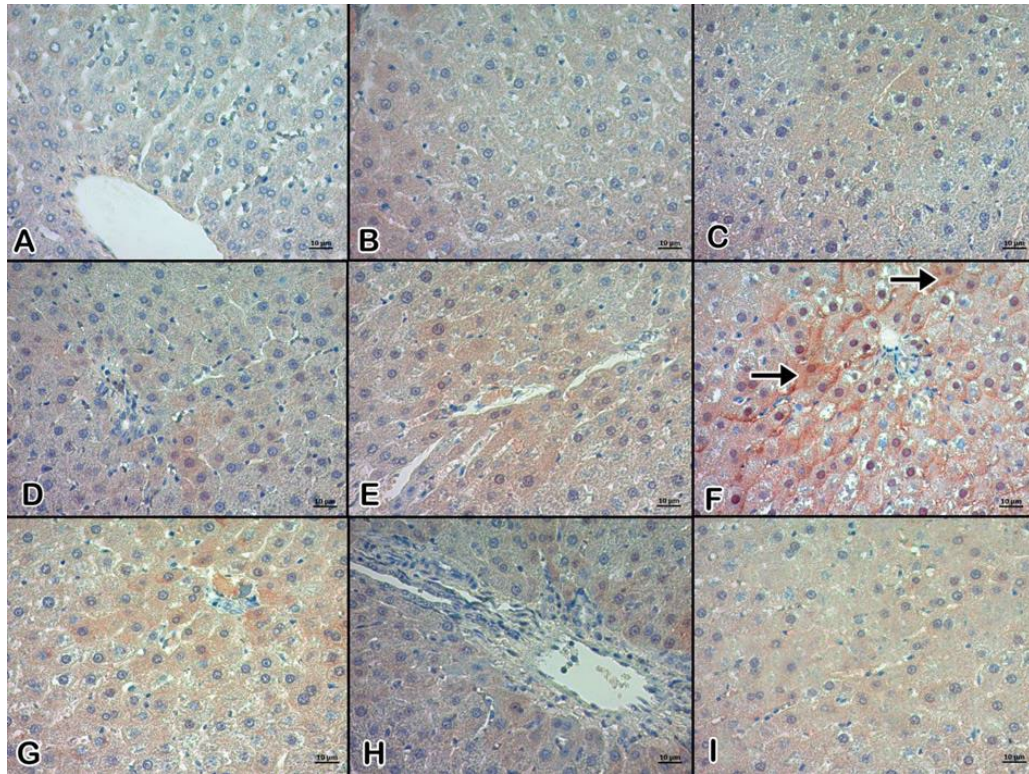
Şekil 3-1 Kontrol grubu (A), SE grubu (B), VD grubu (C), SO grubu (D) ve SE+VD grubu (E) gruplarındaki sıçan hepatositlerinin elektron mikrografları. Normal morfolojiye sahip hepatositler (n: çekirdek), mitokondri (siyah ok ucu) ve safra kanalikülleri (siyah ok). A, B, D ve E X5000, C X6000.



Şekil 3-2 MTX grubu (A,B,C,D), MTX+SE (E), MTX+VD (F) ve MTX+SE+VD (G) gruplarındaki sıçan karaciğerinin elektron mikrografları. A ve B X5000, C ve D X 7500. Hepatositlerde dejenerasyon (siyah yıldız), mitokondride krista kaybı (siyah ok ucu) ve lipit vakuollerinde artış (beyaz ok ucu). Parankimde kollajen artışı (siyah ok) ve kanaliküllerin genişlemesi (beyaz ok). n: çekirdek. E X7500, F ve G X5000. MTX+SE grubunun bazı hepatositlerinde mitokondriyal dejenerasyon (beyaz ok ucu). E, F ve G'de normal hepatosit çekirdeği (n), F ve G gruplarında mitokondri (siyah ok başı) ve safra kanalikülleri (siyah ok).

3.2. TRPM2 ekspresyonuna yönelik immünohistokimyasal bulgular

MTX uygulamasını takiben, özellikle, sıçanların hepatositlerinde TRPM2 immünoaktivitesi görüldü (Şekil 3 A-I). TRPM2 ekspresyonunu içeren grup karşılaştırmalarında kontrol, SE, VD, SO ve SE+VD grupları arasında, anlamlı olmayan bir fark görüldü ($p > 0,05$). TRPM2 ekspresyonu, MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0,05$). MTX grubuyla karşılaştırıldığında MTX+SE, MTX+VD ve MTX+SE+VD ile tedavi edilen sıçanların hepatositlerinde, TRPM2 immün boyaması önemli ölçüde azaldı ($p < 0,05$). TRPM2'nin ekspresyonu, özellikle MTX+SE+VD grubunda, MTX+SE ve +MTX+VD gruplarına göre oldukça düşük bulundu (Tablo 1, $p < 0,05$).



Şekil 3-3 Karaciğer dokuları, TRPM2 immünoaktivitesi için Mayer Hematoksilen karşıt boyası ile Streptavidin biyotin peroksidaz kompleks yöntemiyle boyandı. Kontrol grubu (A), SE grubu (B), VD grubu (C), SO grubu (D) ve SE+VD (E) grupları. MTX grubunda (F) artmış TRPM-2 immünoaktivitesi (siyah ok). MTX+SE grubu (G), MTX+VD grubu (H) ve MTX+SE+VD (I) grupları

Tablo 3-1 Deney gruplarında TRPM2, kaspaz-3 ve TNF- α immünoaktivitelerinin histoskorları

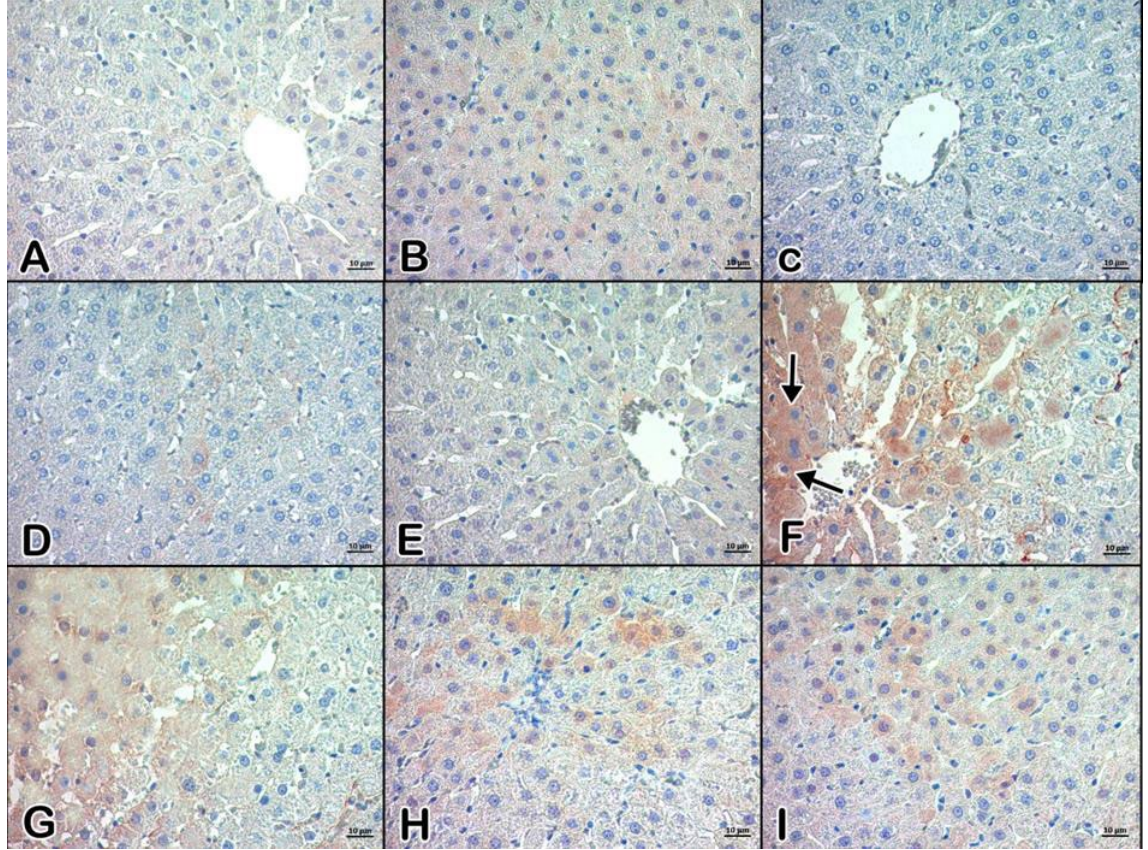
Gruplar	TRPM2	KaspaZ-3	TNF- α
Kontrol	0.220 ^d ±0.064	0.258 ^c ±0.109	0.287 ^d ±0.128
MTX	2.308 ^a ±0.467	2.755 ^a ±0.168	1.850 ^a ±0.072
SE	0.282 ^d ±0.053	0.340 ^e ±0.067	0.267 ^d ±0.090
VD	0.250 ^d ±0.038	0.283 ^e ±0.059	0.297 ^d ±0.050
SO	0.208 ^d ±0.033	0.255 ^e ±0.039	0.297 ^d ±0.098
SE+VD	0.192 ^d ±0.030	0.337 ^e ±0.048	0.300 ^d ±0.092
MTX+SE	1.493 ^b ±0.245	2.467 ^b ±0.099	1.010 ^b ±0.107
MTX+VD	1.232 ^b ±0.063	1.825 ^c ±0.110	0.678 ^c ±0.182
MTX+SE+VD	0.870 ^c ±0.078	1.462 ^c ±0.099	0.647 ^c ±0.147
P* values	<0.001	<0.001	<0.001

^{a b c d e} Aynı satırdaki farklı üst simgelere sahip sayısal değerler, önemli ölçüde farklılık gösterir (P <0.05, Tukey testi) *: Tek Yönlü ANOVA.

3.3. Kaspaz-3 ekspresyonuna yönelik immünohistokimyasal bulgular

Sıçanların karaciğerinde kontrol, SE, VD, SO ve SE+VD gruplarında benzer kaspaz-3 ekspresyonu görüldü (Şekil 4 A–I) (p>0,05). Kaspaz-3 immünoaktivitesi, MTX grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttı (p<0.05). Ancak MTX grubunun

aksine kaspaz-3 immünoaktivitesi, MTX+SE, MTX+VD ve MTX+SE+VD gruplarında önemli ölçüde azaldı ($p < 0.05$). Kaspaz-3 ekspresyonu, MTX+SE+VD grubunda, MTX+SE grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha az gözlenmesine rağmen, MTX+VD grubunda anlamlı ($p > 0.05$) bir azalma gözlenmedi (Tablo 1, $p > 0.05$).

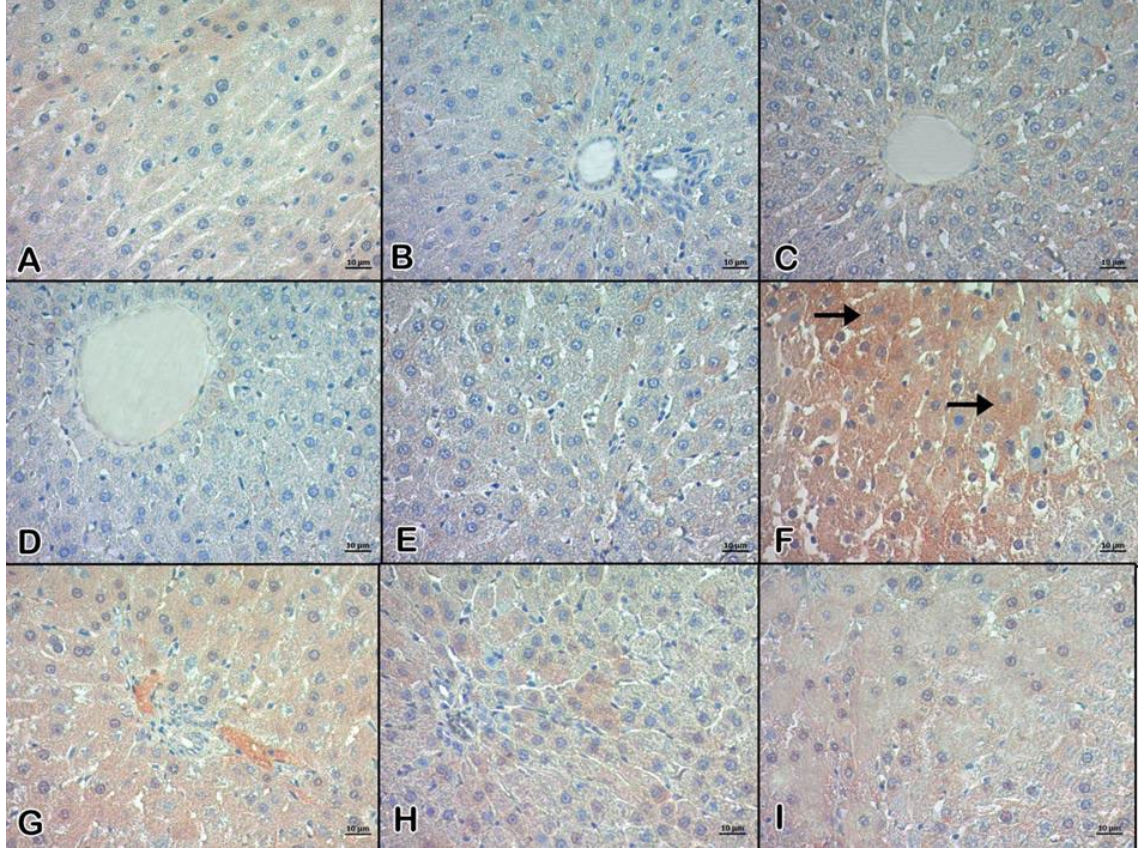


Şekil 3-4 Kaspaz-3 immünoaktivitesi için Streptavidin biyotin peroksidaz kompleksi yöntemi ve Mayer Hematoksilen karşıt boyası ile boyanmış karaciğer dokuları. A) kontrol grubu B) SE grubu C) VD grubu D) SO grubu E) SE+VD grubu F) MTX grubunda artmış kaspaz-3 immünoaktivitesi (siyah oklar) G) MTX+SE grubu H) MTX+VD grubu I) MTX+SE+VD grubu

3.4. TNF- α ekspresyonuna yönelik immünohistokimyasal bulgular

Karaciğer dokularında TNF-immünohistokimyası yapıldığında kontrol, SE, VD, SO ve SE+VD gruplarında benzer TNF- α ekspresyonları görüldü (Şekil 5 A-1) ($p > 0.05$). TNF- α ekspresyonu MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttı ($p < 0.05$), ancak MTX+SE, MTX+VD ve MTX+SE+VD gruplarında MTX grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Ancak MTX+VD ve MTX+SE+VD gruplarının karaciğer dokularında,

MTX+SE grubuna kıyasla, TNF- α ekspresyonu, belirgin şekilde daha düşüktü (Tablo 1, $p < 0,05$).



Şekil 3-5 TNF- α immünoaktivitesi için Streptavidin biyotin peroksidaz kompleksi yöntemi ve Mayer Hematoksilen karşıt boyası ile boyanmış karaciğer dokuları. A) kontrol grubu. B) SE grubu. C) VD grubu D) SO grubu E) SE+VD grubu F) MTX grubunda artan TNF- α immünoaktivitesi (siyah oklar). G) MTX+SE grubu H) MTX+VD grubu I) MTX+SE+VD grubu

3.5. MTX, SE ve VD'nin, MDA düzeyine etkileri

İstatistiksel analizde kontrol, SE, VD, SO ve SE+VD grupları arasında MDA düzeyleri açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$). MTX grubundaki MDA düzeyleri ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0,05$). MTX grubuyla karşılaştırıldığında MTX+SE, MTX+VD ve MTX+SE+VD gruplarında MDA düzeyleri anlamlı derecede düşüktü (Tablo 2, $p < 0,05$).

Tablo 3-2 Deney gruplarının karaciğer MDA ve serum ALT düzeyleri

Gruplar	Mean±Std. Deviation MDA (nmol/g)	Mean±Std. Deviation ALT (units/l)
Kontrol	1,67 ^b ±0,26	52.25 ^b ±2.76
MTX	3.58 ^a ±0.65	59.75 ^a ±3.11
SE	2.09 ^b ±0.51	52.70 ^b ±3.64
VD	2.06 ^b ±0.70	52.62 ^b ±3.20
SO	2.05 ^b ±0.21	50.95 ^{bc} ±3.70
SE+VD	2.12 ^b ±0.86	47.78 ^{bc} ±6.43
MTX+SE	2.15 ^b ±0.32	45.20 ^c ±6.40
MTX+VD	2.13 ^b ±0.65	54.00 ^b ±5.19
MTX+SE+VD	2.27 ^b ±0.96	48.80 ^{bc} ±7.39
P* values	<0.0001	<0.001

^{a b c} Farklı üst simgelere sahip aynı sütunlardaki sayısal değerler, önemli ölçüde farklılık göstermektedir (P<0.05, Tukey testi) *: Tek Yönlü ANOVA.

3.6. MTX, SE ve VD'nin, serum ALT aktivitesi üzerine etkileri

Serum ALT enzim aktivitesi ölçüldüğünde, kontrol, SE, VD, SO ve SE+VD gruplarının benzer sonuçlara sahip olduğu görüldü ($p > 0,05$). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, MTX grubunda ALT aktivitesinin anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi ($p < 0,05$). Ancak, MTX grubuyla karşılaştırıldığında, serumdaki ALT aktivitesindeki artış, MTX+SE, MTX+VD ve MTX+SE+VD gruplarında anlamlı derecede düşüktü (Tablo 2, $p < 0,05$).

TARTIŞMA

Karaciğer toksisitesi MTX'in önemli bir yan etkisi olarak rapor edilmiştir (Ewees ve ark. 2019). MTX'in toksisitesi oksidatif stres, apoptoz ve inflamasyonla ilişkilendirilmiştir (El-Sheikh ve ark. 2015). MTX, ROS üretimini artırır, enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan sistemi bozarak hepatoselüler oksidatif hasara neden olabilir (Vardi ve ark. 2010; Mehrzadi ve ark. 2018), daha düşük adenosin trifosfat üretimiyle sonuçlanacak şekilde, mitokondriyal disfonksiyona ve mitokondriyal elektron zinciri kompleksinin aktivitelerini azaltmaya yol açabilir (Kolli ve ark. 2014). Işık mikroskopik incelemede MTX uygulamasının sıçanların karaciğerinde önemli derecede anormal dejeneratif değişikliklere yol açtığı gözlemlenmiştir (Yücel ve ark. 2017; Bu ve ark. 2018; Türk ve ark. 2020). TEM bulgularımız, MTX'in neden olduğu hepatotoksisite bulgularının fibrozdan mitokondriyal hasara ve dejenere hepatositlere kadar değiştiğini gösterdi ve karaciğer hasarını, ultrastrüktürel düzeyde doğruladı (Al-Ali ve ark. 2005; Maha 2009; Elsayy ve ark. 2020). Mevcut çalışmanın ultrastrüktürel bulguları, sıçan karaciğer dokusuna ilişkin önceki bir raporda benzer şekilde bildirildiği gibi, MTX kaynaklı hepatotoksisite ile oksidatif stres arasında bir bağlantıyı açıkça göstermektedir (Erdoğan ve Yalçın 2020). Bazı bitkisel takviyelerin kullanımının, MTX'in neden olduğu karaciğer hasarının önlenmesi ve/veya tedavisinde önemli yararlı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Ali ve ark. 2014). VD, iskelet homeostazisindeki geleneksel rolüne ek olarak kritik bir fizyolojik düzenleyici olarak tanınmaktadır. Önceki çalışmalar VD'nin hepatoprotektif etkilerini ortaya koymuştur (Özerkan ve ark. 2017; Ahmed ve ark. 2019; Almasmoum ve ark. 2019). D vitamini veya eşdeğerlerinin karaciğer hastalıklarındaki terapötik potansiyeli Keane ve ark. 2018 tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada, SE ve VD'nin birlikte uygulanmasının karaciğer hasarını ultrastrüktürel seviyede açıkça iyileştirmesi, muhtemelen, SE (Bursali ve Köksal 2011; Korkmaz 2021) ve VD'nin (Wimalawansa 2019; Keles ve ark. 2022) antioksidatif potansiyeli nedeniyledir. Her iki antioksidanın karaciğer dokusu üzerindeki restoratif özellikleri, SE ve VD'nin karaciğer dokusunu iyileştirici özelliklerini gösteren önceki araştırmalarla tutarlıdır (Kazemi ve ark. 2020; Ghaeni Pasavei ve ark. 2021; Zhang ve ark. 2021).

Oksidatif stres, hücre içi Ca^{2+} düzeylerini yükselten (Fonfria ve ark. 2004) ve hücre ölümüne neden olan (Lange ve ark. 2009) TRPM2 kanalını aktive etmektedir. MTX grubundaki TRPM2 ekspresyonu, diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında, anlamlı derecede

yüksek bulundu. TRPM2 ekspresyonu, karaciğer dokusunun MTX aracılı oksidatif strese tepkisi olarak, TRPM2 kanallarının aktivasyonu yoluyla, yükselmiş olabilir. TRPM2 inhibisyonunun, hücre ölümünü önlemek ve hücrelerin oksidatif strese ve muhtemelen diğer zararlı uyaranlara karşı hayatta kalmasına izin vermek için potansiyel bir in vivo süreç olduğu belirlenmiştir (Miller 2004). TRPM2 inhibisyonunun akciğer dokusundaki oksidatif stresi azalttığı (Yalçın ve ark. 2020) ve karaciğer hasarını onardığı (Feng ve ark. 2019) gösterilmiştir. Antioksidan E vitamini, TRPM2 kanal aktivitesini inhibe ederek dorsal kök ganglionu üzerinde iyileştirici etki göstermiştir (Nazıroğlu ve Özgül 2013). Doğal bir antioksidan olan kurkumin, sıçan hepatositlerinde TRPM2 ve Ca²⁺ artışını önleyerek hepatoprotektif potansiyel göstermiştir (Kheradpezhohu ve ark. 2016). Bu çalışmada, yukarıda bildirilen literatürlerle uyumlu olarak (Yalçın ve ark. 2020; Feng ve ark. 2019; Nazıroğlu ve Özgül 2013; Kheradpezhohu ve ark. 2016), SE ve VD antioksidanlarının, MTX+SE, MTX+VD ve özellikle MTX+SE+VD gruplarında, ROS'u azaltarak, karaciğer dokularında TRPM2 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı belirlendi. Bu bulgu, Hong ve arkadaşlarının (2020), ROS'un baskılanmasının TRPM2 aktivasyonunu azalttığına dair çalışması ile uyumludur. SE ve VD'nin antioksidan, ROS temizleyici ve oksidatif stresi önleyici özellikleri, TRPM2 iyon kanallarının inhibe edilmesinde etkin rol oynamış olabilir.

Bu çalışmada MTX grubundaki sıçanların karaciğer dokularında kaspaz-3 ekspresyonunun, sıçanlarda (Fayez ve ark. 2018; Bu ve ark. 2018). 2018) ve farelerde (Al-khawalde ve ark. 2022) yapılan önceki çalışmalarla tutarlı olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. MTX grubunda kaspaz-3 ekspresyonunun daha yüksek olması, TRPM2 kanallarının, apoptoz ve kaspaz aktivasyonu indüklemesi nedeniyle olabilir (Sun ve ark. 2018). Çalışmamızda, MTX+SE, MTX+VD ve MTX+SE+VD gruplarında, MTX grubuna göre, apoptotik aktivitede anlamlı azalma tespit edildi. İstatistiksel analizlerde bu azalma özellikle MTX+SE+VD grubunda dikkat çekiciydi. SE (Işık ve ark. 2019) ve VD'nin (Yalçın ve ark. 2020) antiapoptotik özelliklerini ifade eden araştırmacıların bulgularına paralel olarak, SE ve VD ayrı ayrı anti-apoptotik özellikler sergiledi ancak bu etki, her iki antioksidanın da kullanıldığı grupta oldukça anlamlıydı.

MTX'in aracılık ettiği hücresel stres, proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α 'nın, artan seviyeleri ile tanımlanan inflamatuvar yanıtı yol açar (Hafez ve ark. 2015). Mevcut çalışmada, önceki çalışmalarla (Türk ve ark. 2020; Yücel ve ark. 2017) uyumlu olarak,

MTX'in, sıçan karaciğer dokularında TNF α ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı belirlendi. TNF α ekspresyonu, aşırı ROS oluşumuna bağlı olarak MTX'in neden olduğu karaciğer dokusu stresıyla ilişkili olabilir. Ancak SE ve VD tedavileri, MTX uygulamasına bağlı artan proinflamatuvar sitokin düzeylerini önemli ölçüde azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdi. Elde ettiğimiz bu bulgular, SE (Işık ve ark. 2019) ve VD'nin (Kitson ve ark 2016) antiinflamatuvar özelliklerine bağlanabilir.

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif stres ve lipid peroksidasyon, MTX'in neden olduğu karaciğer toksisitesi ile ilişkilendirilmiştir (Uraz ve ark. 2008). MDA, genellikle oksidatif hasarın bir göstergesi olarak bilinen, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. MDA seviyesi, organizmalardaki ROS düzeylerini gösterebilir (Porter 1984). MTX kaynaklı oksidatif stresin, sıçan karaciğer dokusunda MDA düzeylerini yükselttiği rapor edilmiştir (Fayez ve ark. 2018; Türk ve ark. 2020; Mehrzadi ve ark. 2018; Savran ve ark. 2017). Bu çalışmada MTX'in neden olduğu oksidatif hasarı belirlemek amacıyla karaciğer dokusunda MDA ölçümü yapıldı ve MTX grubunda, kontrol grubuna göre, literatürle uyumlu olarak MDA düzeyinde anlamlı bir artış gözlemlendi. Artan MDA düzeyi, lipid peroksidasyonunun, MTX'in neden olduğu hepatotoksitenin gelişimine katkıda bulunan önemli bir sorun olduğunu göstermektedir. Öte yandan, SE ve VD, muhtemelen serbest radikal süpürücü yetenekleri sayesinde, MTX kaynaklı lipid peroksidasyonuna karşı ROS'u azaltarak, karaciğer dokusu MDA seviyelerini önemli ölçüde düşürerek, ultrastrüktürel ve immünohistokimyasal sonuçları iyileştirmiştir. İlaçlara bağlı oluşan karaciğer hasarının, son yıllarda, ilaç kullanımından vazgeçme nedenlerinden biri olduğu tespit edilmiştir (Holt ve Ju 2006). MTX toksisitesi genellikle karaciğer enzimlerindeki artışla ilişkilidir (Famurewa ve ark. 2017). ALT ve AST karaciğer hasarının yaygın biyobelirteçleridir. AST, aynı zamanda kalp kası, iskelet kası ve eritrositlerde de bulunduğu ALT, karaciğer hasarının en spesifik belirteçidir (Goorden ve ark. 2013). Artan serum ALT düzeyleri karaciğer hasarı açısından, yüksek bir özgüllüğe ve rasyonel duyarlılığa sahiptir (Wedemeyer 2010). Bu çalışmada, hepatik fonksiyon belirteci ALT'nin serum seviyeleri, MTX uygulamasından sonra karaciğer hasarını gösterecek şekilde, önemli ölçüde arttı. ALT seviyesindeki bu artış, MTX'in karaciğer için toksik olduğunu gösteren çeşitli çalışmalarla (Türk ve ark. 2020; Mehrzadi ve ark. 2018; Fayez ve ark. 2018) tutarlıdır. Çalışmamızda, MTX ile birlikte uygulandığında, SE ve VD'nin, serum ALT seviyeleri önemli ölçüde azaltarak karaciğer fonksiyonunu iyileştirdiği belirlendi.

ALT enziminin, karaciğer hücrelerinin membranı yoluyla salınmasının inhibisyonu, SE (Pourahmad ve ark. 2010) ve VD'nin (Wiseman 1993) lipid peroksidasyonundan membranı stabilize etme ve koruma etkisine atfedilebilir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular, SE ve VD'nin antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik mekanizmalar yoluyla, hem ayrı ayrı ve hem de birlikte kullanıldıklarında, MTX'in neden olduğu karaciğer hasarına karşı, sinerjik koruyucu bir potansiyele sahip olduğunu gösterdi. Tıp sahasında pek çok hastalığın tedavi edilmesinde ya da hastalıkların ilerlemesinin durdurulmasında yaygın bir kullanıma sahip olan MTX, kullanım dozu ve süresine bağlı olarak, hastaların farklı organları ve özellikle karaciğer dokusu üzerinde yan etki göstermektedir. Bu yan etkiye bağlı olarak hastaların, sağlıklı organları zarar görmekte, zarar gören organlar için ayrıca bir tedavi programını gündeme getirmek suretiyle hem ekonomik kayba (tedavi masrafı, iş gücü kaybı v.b) sebep olmakta, ayrıca, hastaların yaşam sürelerinin kısalmasına yol açabilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların ışığında, MTX kullanan fazla sayıdaki hastanın, bu ilaç ile birlikte, MTX'in karaciğer üzerindeki yan etkilerini azaltmak amacı ile, sumak ve VD kullanmalarının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Ahmed, EA., Abd-Eldayem, AM., Aboulhagag, NA. (2019). The possible protective effects of vitamin D and l-carnitine against used atorvastatin-induced myopathy and hepatotoxicity. *Comp Clin Path*, 28(6), 1751-1759.
2. Akbulut, S., Elbe, H., Eris, C., Dogan, Z., Toprak, G., Otan, E., Erdemli, E., Turkoz, Y. (2014). Cytoprotective effects of amifostine, ascorbic acid and Nacetylcysteine against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *World J Gastroenterol*, 20 (29), 10158-10165.
3. Al-Ali, SY., Hassan, IM., Sadek, S. (2005). Ultrastructural changes in rat livers perfused in vitro and in vivo with a high dose of methotrexate. *Histol Histopathol*, 20 (4), 1131-45.
4. Al-khawalde, AAMA., Abukhalil, MH., Jghef, MM., Alfwuaires, MA., Alaryani, FS., Aladaileh S H, Algefare, AI., Karimulla, S., Alasmari F, Aldal'in, HK., et al. (2022). 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*. 23 (20), 12334.
5. Almasmoum, H, Refaat B., Ghaith, MM., Almainani, RA., Idris, S., Ahmad, J., Abdelghany, AH., BaSalamah, MA., El-Boshy, M. (2019). Protective effect of Vitamin D3 against lead induced hepatotoxicity, oxidative stress, immunosuppressive and calcium homeostasis disorders in rat. *Environ Toxicol Pharmacol*, 72, 103246.
6. Alsamri, H., Athamneh, K., Pintus, G., Eid, AH., Iratni, R. (2021). Pharmacological and antioxidant activities of *Rhus coriaria* L. (Sumac). *Antioxidants*, 10 (1), 73.
7. Barak, AJ., Dean, JT., Harriet, CB. (1984). Methotrexate hepatotoxicity. *J Am Coll Nutr*, 3(1), 93-96.
8. Batiha, GES., Ogunyemi, OM., Shaheen, HM., Kutu, FR., Olaiya, CO., Sabatier, JM., De Waard, M. (2022). *Rhus coriaria* L. (Sumac), a Versatile and Resourceful Food Spice with Cornucopia of Polyphenols. *Molecules*, 27(16), 5179.
9. Boeddeker, SJ., Alexandra, PH. (2015). The role of apoptosis in human embryo implantation. *J Reprod Immunol*, 108, 114-122.
10. Bu, T., Wang, C., Meng, Q., Huo, X., Sun, H., Sun, P., Zheng, S., Ma, X., Liu, Z., Liu, K. (2018). Hepatoprotective effect of rhein against methotrexate-induced liver toxicity. *Eur J Pharmacol*, 834, 266-273.
11. Bursalı, E., Köksal, E. (2011). Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.). *Food Res Int*, 44(7), 2217-2221.
12. Câmara, AB., Brandão, IA. (2019). The relationship between vitamin D deficiency and oxidative stress can be independent of age and gender. *Int J Vitam Nutr Res*, 1-16.
13. Caprio, M., Mammi, C., Rosano, GM. (2012). Vitamin D: A novel player in endothelial function and dysfunction. *Arch Med Sci*, 8(1), 4-5.

14. Cetiner, M., Şener, G., Şehirli, AÖ., Ekşioğlu-Demiralp, E., Ercan, F., Şirvancı, S., Gedik, N., Akpulat, S., Tecimer, T., Yeğen, BÇ. (2005). Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol*, 209 (1), 39-50.
15. Cetinkaya, A., Bulbuloglu, E., Kurutas, EB., Kantarceken, B. (2006). N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit*, 12: BR274-BR278.
16. Cüre, E., Kırbaş, A., Tümkaya, L., Cure, MC., Kalkan, Y., Yilmaz, A., Yuce, S. (2015). Protective effect of infliximab on methotrexate-induced liver injury in rats: Unexpected drug interaction. *J Cancer Res Ther*, 11 (1), 164-169.
17. Dabak, DO., Kuloglu, T., Ozercan, MR. (2009). Effects of vitamin D3 (cholecalciferol) on adriamycin-induced nephrotoxicity. *Ren Fail*, 31(5), 400-405.
18. Doğan A, Çelik İ. (2016). Healing effects of sumac (*Rhus coriaria*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol*. 54(10): 2092-2102.
19. Elagbar, ZA., Shakya, AK., Barhoumi, LM., & Al-Jaber, HI. (2020). Phytochemical diversity and pharmacological properties of *Rhus coriaria*. *Chem Biodivers*, 17(4), e1900561.
20. Elsaywy, H., Algefare, AI., Alfwuaires, M., Khalil, M., Elmenshawy, OM., Sedky, A., Abdel-Moneim, AM. (2020). Naringin alleviates methotrexate-induced liver injury in male albino rats and enhances its antitumor efficacy in HepG2 cells. *Biosci Rep*, 40(6).
21. El-Sheikh, AA., Morsy, MA., Abdalla, AM., Hamouda, AH., Alhaider, IA. (2015). Mechanisms of thymoquinone hepatorenal protection in methotrexate-induced toxicity in rats. *Mediators Inflamm*, 2015:859383.
22. Erdogan, MA., Yalcin, A. (2020). Protective effects of benfotiamine on irisin activity in methotrexate-induced liver injury in rats. *Arch Med Sci*, 16 (1), 205-211.
23. Ewees, MG., Abdelghany, TM., Abdel-Aziz, AAH., Abdelbakky, MS. (2019). Enoxaparin prevents fibrin accumulation in liver tissues and attenuates methotrexate-induced liver injury in rats. *Naunyn Schmiedeberts Arch Pharmacol*, 392 (5), 623-631.
24. Ezhilarasan, D. (2021). Hepatotoxic potentials of methotrexate: Understanding the possible toxicological molecular mechanisms. *Toxicology*, 458, 152840.
25. Famurewa, AC., Ufebe, OG., Egedigwe, CA., Nwankwo, OE., Obaje, GS. (2017). Virgin coconut oil supplementation attenuates acute chemotherapy hepatotoxicity induced by anticancer drug methotrexate via inhibition of oxidative stress in rats. *Biomed Pharmacother*, 87, 437-442.
26. Fayez, AM., Zakaria, S., Moustafa, D. (2018). Alpha lipoic acid exerts antioxidant effect via Nrf2/HO-1 pathway activation and suppresses hepatic stellate cells activation induced by methotrexate in rats. *Biomed Pharmacother*, 105, 428-433.
27. Feng, Q., Liu, C., Gao, W., Geng, XL., Dai, N. (2019). Salidroside-mitigated inflammatory injury of hepatocytes with non-alcoholic fatty liver disease via inhibition trpm2 ion channel activation. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther*, 12: 2755–2763.

28. Fonfria, E., Marshall, IC., Benham, CD., Boyfield, I., Brown, JD., Hill, K., McNulty, S. Hughes, JP., Skaper, SD., McNulty, S. (2004). TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly (ADP-ribose) polymerase. *Br J Pharmacol*, 143 (1), 186-92.
29. Ghaeni Pasavei, A., Mohebbati, R., Jalili-Nik, M., Mollazadeh, H., Ghorbani, A., Nosrati Tirkani, A., Jamshidi, ST., Hashemy, SI., Miri, HH., Soukhtanloo, M. (2021). Effects of *Rhus coriaria* L. hydroalcoholic extract on the lipid and antioxidant profile in high fat diet-induced hepatic steatosis in rats. *Drug Chem Toxicol*, 44 (1), 75-83.
30. Goorden, SM., Buffart, TE., Bakker, A. (2013). Liver disorders in adults: ALT and AST. *Ned Tijdschr Geneesk*, 157(43), A6443-A6443.
31. 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.
32. Hara, Y., Minoru, W., Masakazu, I., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J, et al. (2002). LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol cell*, 9 (1), 163-173.
33. Holt, MP., Ju, C. (2006). Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J*, 8 (1), E48-E54.
34. Hong, DK., Kho, AR., Lee, SH., Jeong, JH., Kang, BS., Kang, DH., Park, MK., Park, KH., Lim, MS., Choi, BO, et al. (2020). Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) inhibition by antioxidant, n-acetyl-l-cysteine, reduces global cerebral ischemia-induced neuronal death. *Int J Mol Sci*, 21 (17), 6026.
35. Isik, S., Tayman, C., Cakir, U. (2019). Sumac (*Rhus coriaria*) for the prevention and treatment of necrotizing enterocolitis. *J Food Biochem*, 43(12), e13068.
36. Kazemi, S., Shidfar, F., Ehsani, S., Adibi, P., Janani, L., Eslami, O. (2020). The effects of sumac (*Rhus coriaria* L.) powder supplementation in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Complement Ther Clin Pract*, 41, 101259.
37. Keane, JT., Elangovan, H., Stokes, RA., Gunton, JE. (2018). Vitamin D and the liver—correlation or cause? *Nutrients*, 10(4), 496.
38. Keles, H., Yalcin, A., Aydin, H. (2022). Protective effect of Vitamin D on imidacloprid-induced testicular injury in rats. *Arch Med Sci*, 18 (6), 1659-1665.
39. Khalil, M., Hayek, S., Khalil, N., Serale, N., Vergani, L., Calasso, M., De Angelis, M., Portincasa, P. (2021). Role of Sumac (*Rhus coriaria* L.) in the management of metabolic syndrome and related disorders: Focus on NAFLD-atherosclerosis interplay. *J Funct Foods*, 87, 104811.
40. Kheradpezhough, E., Barritt, GJ., Rychkov, GY. (2016). Curcumin inhibits activation of TRPM2 channels in rat hepatocytes. *Redox Biol*, 7, 1–7.
41. Kitson MT, Pham A, Gordon A, Kemp W, Roberts SK. (2016). High-dose vitamin D supplementation and liver histology in NASH. *Gut*. 65(4): 717-718.

42. Kolli, VK., Natarajan, K., Isaac, B., Selvakumar, D., Abraham, P. (2014). Mitochondrial dysfunction and respiratory chain defects in a rodent model of methotrexate-induced enteritis. *Hum Exp Toxicol*, 33 (10), 1051-65.
43. Korkmaz, H. (2021). Could sumac be effective on COVID-19 treatment? *J Med Food*, 24 (6), 563-568.
44. Lange, I., Yamamoto, S., Partida-Sanchez, S., Mori, Y., Fleig, A., Penner, R. (2009). TRPM2 functions as a lysosomal Ca^{2+} -release channel in beta cells. *Sci Signal*, 2 (71), ra23-ra23.
45. Maha, E. (2009). Evaluation of the possible protective role of folic acid on the liver toxicity induced experimentally by methotrexate in adult male albino rats. *Egypt J Histol*, 32 (1), 118-128.
46. Malayeri, A., Badparva, R., Mombeini, MA., Khorsandi, L., Goudarzi, M. (2022). Naringenin: a potential natural remedy against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol*, 45 (2), 491-498.
47. Mehrzadi, S., Fatemi, I., Esmailizadeh, M., Ghaznavi, H., Kalantar, H., Goudarzi, M. (2018). Hepatoprotective effect of berberine against methotrexate induced liver toxicity in rats. *Biomed Pharmacother*, 97, 233-239.
48. Miller, BA. (2004). Inhibition of TRPM2 function by PARP inhibitors protects cells from oxidative stress-induced death. *Br J Pharmacol*, 143 (5), 515-6.
49. N, Ali., 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 (1–2), 215–223.
50. Nazıroğlu, M., Özgül, C. (2013). Vitamin E modulates oxidative stress and protein kinase C activator (PMA)-induced TRPM2 channel gate in dorsal root ganglion of rats. *J Bioenerg Biomembr*, 45(6), 541–549.
51. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351–358.
52. Özerkan, D., Özsoy, N., Akbulut, K., Güney, Ş., Öztürk, G. (2017). The protective effect of vitamin D against carbon tetrachloride damage to the rat liver. *Biotech Histochem*, 92 (7), 513-523.
53. Pannu, AK. (2019). Methotrexate overdose in clinical practice. *Curr Drug Metab*, 20 (9), 714-719.
54. Peña-Llopis, S., Ferrando, MD., Peña, JB. (2003). Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat Toxicol*, 65 (4), 337-360.
55. Porter, AG., Janicke, RU. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6, 99–104.
56. Porter, NA. (1984). Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 105:273-82.

57. Pourahmad, J., Eskandari, MR., Shakibaei, R., Kamalinejad, M. (2010). A search for hepatoprotective activity of aqueous extract of *Rhus coriaria* L. against oxidative stress cytotoxicity. *Food Chem Toxicol*, 48(3), 854-858.
58. Prestigiacomo, V., Weston, A., Messner, S., Lampart, F., Suter-Dick, L. (2017). Pro-fibrotic compounds induce stellate cell activation, ECM-remodelling and Nrf2 activation in a human 3D-multicellular model of liver fibrosis. *PLoS One*. 12 (6), e0179995.
59. Savran, M., Cicek, E., Doguc, DK., Asci, H., Yesilot, S., Candan, IA., Dagdeviren, B., Cankara, FN., Oncu, M., Uguz, AC., et al. (2017). Vitamin C attenuates methotrexate-induced oxidative stress in kidney and liver of rats. *Physiol Int*, 104 (2), 139-149.
60. Sayed, AAR., Morcos, M. (2007). Thymoquinone decreases AGE-induced NF- κ B activation in proximal tubular epithelial cells. *Phytother Res*, 21 (9), 898– 899.
61. Sayed, AAR. (2008). Thymoquinone protects renal tubular cells against tubular injury. *Cell Biochem Funct*, 26 (3), 374–380.
62. Sumoza-Toledo, A., Penner, R. (2011). TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *J Physiol*, 589 (7), 1515-1525.
63. Sun, Y., Sukumaran, P., Selvaraj, S., Cilz, NI., Schaar, A., Lei, S., Singh, BB. (2018). TRPM2 promotes neurotoxin MPP+/MPTP-induced cell death. *Mol Neurobiol*, 55, 409-420.
64. Takahashi, N., Kozai, D., Kobayashi, R., Ebert, M., Mori, Y. (2011). Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell calcium*, 50 (3), 279-287.
65. Tousson, E., Zaki, ZT., Abu-Shaeir, WA., Hassan, H. (2014). Methotrexate-induced hepatic and renal toxicity: Role of L-carnitine in treatment. *Biomed Biotechnol*, 2 (4), 85-92.
66. Türk, E., Güvenç, M., Cellat, M., Uyar, A., Kuzu, M., Ağgöl, AG., Kırbaş, A. (2020). Zingerone protects liver and kidney tissues by preventing oxidative stress, inflammation, and apoptosis in methotrexate-treated rats. *Drug Chem Toxicol*, 45(3), 1054-1065.
67. Uraz, S., Tahan, V., Aygun, C., Eren, F., Unluguzel, G., Yuksel, M., Senturk, O., Avsar, E., Haklar G, Celikel C, et al. (2008). Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci*, 53 (4), 1071-1077.
68. Vardi, N., Parlakpınar, H., Cetin, A., Erdogan, A., Cetin, Ozturk. (2010). Protective effect of β -carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol Pathol*, 38 (4): 592-597.
69. Vieth, R. (2020). Vitamin D supplementation: cholecalciferol, calcifediol, and calcitriol. *Eur J Clin Nutr*, 74 (11): 1493-1497.
70. Wang, Y., Che, M., Xin, J., Zheng, Z., Li, J., Zhang, S. (2020). The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration. *Biomed Pharmacother*, 131, 110660.
71. Wedemeyer, H., Hofmann, WP., Lueth, S., Malinski, P., Thimme, R., Tacke, F., Wiegand J. (2010). ALT screening for chronic liver diseases: scrutinizing the evidence. *Z Gastroenterol*, 48 (1), 46-55.

72. Wimalawansa, S.J. (2019). Vitamin D deficiency: Effects on oxidative stress, epigenetics, gene regulation, and aging. *Biology (Basel)*, 8 (2), 30.
73. Wiseman, H. (1993). Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS let*, 326 (1-3), 285-288.
74. Yalcin, A., Aydin, H., Turk, A., Dogukan, M., Eser, N., Onderci, M., Yoldas, A., Yilmaz, E., Keles, H. (2020). Vitamin D: An effective way to combat methotrexate-induced testis injury. *Med Sci*, 9(4), 998-1003.
75. Yalcin, A., Yumrutas, O., Kuloglu, T., Elibol, E., Parlar, A., Yilmaz, İ., Pehlivan, M., Dogukan, M., Uckardes, F., Aydin, H., et al. (2017). Hepatoprotective properties for *Salvia cryptantha* extract on carbon tetrachloride-induced liver injury. *Cell Mol Biol*, 63, 56–62.
76. Yalçın, A., Türk, A., Aydın, H., Yılmaz, E., Çelik, İ.S., Üçkardeş, F. (2020). Effects of Vitamin D on doxorubicin-induced lung injury and TRPM2 immunoreactivity in rats. *J Surg Med*, 4 (12), 1236–1239.
77. Yamamoto, S., Takahashi, N., Mori, Y. (2010). Chemical physiology of oxidative stress-activated TRPM2 and TRPC5 channels. *Prog Biophys Mol Biol*, 103 (1), 18-27.
78. Yucel, Y., Oguz, E., Kocarslan, S., Tatli, F., Gozeneli, O., Seker, A., Sezen, H., Buyukaslan, H., Aktumen, A., Ozgonul, A., et al. (2017). The effects of lycopene on methotrexate-induced liver injury in rats. *Bratisl Lek Listy*, 118 (4), 212-216.
79. Zhang, X., Shang, X., Jin, S., Ma, Z., Wang, H., Na, A.O., Yang, J., Du, J. (2021). Vitamin D ameliorates high-fat-diet-induced hepatic injury via inhibiting pyroptosis and alters gut microbiota in rats. *Arch Biochem Biophys*, 705, 108894.