



## Effect of Resveratrol on Total Oxidative-Antioxidative Status and DNA Damage in Rats Induced Methotrexate<sup>#</sup>

Mehmet Vadi<sup>1,a</sup>, Bahat Comba<sup>2,b,\*</sup>

<sup>1</sup> Turgut Özal Tıp Merkezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, Türkiye

<sup>2</sup> Laboratuvar Teknolojisi Programı, Teknik Bilimler MYO, Hitit Üniversitesi, Çorum, Türkiye

\*Corresponding author

### Research Article

#### Acknowledgment

<sup>#</sup> This study is a part of master's Thesis.

#### History

Received: 12/01/2022

Accepted: 23/05/2022

### ABSTRACT

In this study, the effects of resveratrol (RES) on leukocyte percentages, total oxidant (TOS) -antioxidant status (TAS) and DNA damage (8-OHDG) were investigated in rats induced by methotrexate (MTX). The rats used in the study were randomly divided into 4 groups each consisting of 10 rats. Control group, MTX group (20 mg / kg ip, once a week, for two weeks), RES group (40 mg / kg / day orally, for two weeks), MTX + RES group (20 mg / kg ip, once a week and 40 mg / kg / day orally for 2 weeks). At the end of the experiment, blood samples were taken from the hearts of the rats and the percentage of leukocyte (neutrophil, eosinophil, basophil, lymphocyte, monocyte) was examined by classical methods. The levels of TOS and TAS were measured by colorimetric kits and 8-OHDG level by ELISA kit. Neutrophil ( $p \leq 0.05$ ) and monocyte ( $p \leq 0.01$ ) percentages of MTX and MTX + RES groups were found to be statistically lower than control and RES groups. There was also a significant increase in TOS and OSI levels ( $p < 0.001$ ) and a significant decrease in TAS level ( $p < 0.05$ ) in the MTX group. In the MTX + RES group, the positive statistical significance of these parameters was determined. Changes in eosinophil, basophil, lymphocyte percentages were statistically insignificant. In conclusion, it can be said that the RES treatment for neutropenia and monocytopenia caused by MTX can not be effective but may be effective in reducing oxidative stress.

**Keywords:** Methotrexate, resveratrol, TOS, TAS, DNA damage, rat, neutropenia.

## Resveratrolün Metotreksat Uygulanan Ratlarda Total Oksidan-Antioksidan Durumuna ve DNA Hasarına Etkisi

#### Bilgi

<sup>#</sup> Bu çalışma yüksek lisans tezinin bir parçasıdır.

\*Sorumlu yazar

#### Süreç

Geliş: 12/01/2022

Kabul: 23/05/2022

### ÖZ

Bu çalışmada resveratrolün (RES) metotreksat (MTX) uygulanan ratlarda lökosit yüzdelerine, total oksidan (TOS)-antioksidan durumuna (TAS) ve DNA hasarına (8-OHDG) etkisi araştırıldı. Çalışmada kullanılan ratlar rastgele her biri 10 rattan oluşan 4 gruba ayrıldı. Gruplar, kontrol grubu, MTX grubu (20 mg/kg i.p., haftada 1 kez, iki hafta), RES grubu (40 mg/kg/gün oral, 14 gün) MTX+RES grubu (20 mg/kg i.p., haftada 1 kez, iki hafta ve 40 mg/kg/gün oral, 14 gün) olarak oluşturuldu. Deneme sonunda ratların kalplerinden kan örnekleri alındı, lökosit (nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfosit, monosit) yüzdelerine klasik yöntemlerle, TOS, TAS, değerlerine kolorimetrik kitlelerle, 8-OHDG seviyesine ELISA kiti ile bakıldı. MTX ve MTX+RES gruplarındaki nötrofil ( $p \leq 0.05$ ) ve monosit ( $p \leq 0.01$ ) yüzdeleri kontrol ve RES grubuna göre istatistiksel önemde daha düşük olduğu belirlendi. Ayrıca, MTX grubundaki, TOS ve OSI seviyelerinde anlamlı bir artış ( $p < 0.001$ ), TAS seviyesinde anlamlı bir azalma ( $p < 0.05$ ) bulundu. MTX+RES grubundaki ratlarda ise bu parametrelerin istatistiksel önemde iyileştiği belirlendi. Eozinofil, bazofil, lenfosit yüzdelerindeki değişimler istatistiksel olarak önemsizdi. Sonuç olarak, MTX in neden olduğu nötropeni ve monositopeninin iyileştirilmesinde RES' in etkili olamayacağını fakat oksidatif stresi azaltmada etkili olabileceğini söyleyebiliriz.

**Anahtar Kelimeler:** Metotraksat, Resveratrol, TOS, TAS, DNA hasarı, Rat, Nötropeni.

#### Copyright



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

<sup>a</sup> [mvadi85@hotmail.com](mailto:mvadi85@hotmail.com)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0207-1430>

<sup>b</sup> [bahatcomba@gmail.com](mailto:bahatcomba@gmail.com)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3419-4144>

## Giriş

Resveratrol; flavanoid olmayan (non-flavanoid) bir bileşen olup en çok siyah üzümün kabuğunda bulunur. Asmaların kökünde, sapında ve çekirdeğinde daha az oranda bulunmaktadır. Üzümü strese karşı koruduğu gibi insanı da koruduğu düşünülen resveratrol, soğuk hava koşullarında yetişen üzümlerde oran olarak daha yüksektir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, tüm bitkilerden resveratrolün üretilebildiği 72 türün olduğu belirlenmiştir. Bu bitkilerin başında; asma, yaban mersini, dut, yer fıstığı ve Antep fıstığı en başta gelenlerdir (Dong, 2003).

Resveratrol aktif formunu (trans-resveratrol) birçok yiyecek çeşidinde koruyabilmektedir. Bunu ısıya dayanıklı olmasıyla sağlamaktadır. Ağıza alındıktan sonra sindirimi ve kana karışması çok hızlıdır (Kuhnle ve ark., 2000).

Sitotoksik ilaçlar, kanser hücrelerinin özellikle hücre yapılarını veya metastazik ilerleme yollarını bozarak antitümör etkilerini göstermektedirler. Metotreksat sitotoksik ilaçların antimetabolitler grubunda yer alır (Block ve ark., 2007).

Metotreksat (MTX), antikanserojen, antiinflamatuvar, antimetabolit, antineoplastik etkilere sahip olan bir ilaç olup; lösemi, lenfoma, akciğer ve meme kanseri ile romatoid artrit gibi hastalıkların tedavisinde sık kullanılır. Yüksek dozda verildiğinde bilinç düzeyinde bozukluklarına neden olabilir. Gelişen yan etkilerin çoğunda metotreksat verilmesiyle tetiklenen oksidatif stresin rolü olduğu bildirilmektedir (Caron ve ark., 2009).

Kemoterapilerin en sık görülen yan etkisi kemik iliğinin baskılanmasıdır ve bu durum ölümcül olabilir. Kemik iliği baskılanmasıyla anemi, trombositopeni ve lökopeni tabloları ortaya çıkar. Kemoterapi sonrası baskılanan kemik iliği nedeniyle hastalarda azalan nötrofil sayısı (nötropeni) nedeniyle oluşabilen enfeksiyon en ölümcül yan etkidir (Şenol, 2004).

Kanserli hastalarda verilen kemoterapi oral mukozitin en sık nedenidir. Metotreksat gibi bazı sitotoksik ilaçlar ağızdan anüse kadar gastrointestinal sistemin (GIS) epitelinin tamamında hasar oluşturur. Bunun sonucunda ülserasyon ve devamında yangı görülebilmektedir (Akkuş ve Şanlı, 2006).

Resveratrol enflamasyonda, aterosklerozda ve kanser oluşumunu engellemede önemli görev üstlenmektedir. Onun dışında resveratrolün antioksidanların, lipid ve lipoprotein metabolizmasında da düzenleyici etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Kirimlioğlu ve ark., 2006). Uguralp ve ark, (2005) tarafından yapılan bir çalışmada sıçan testislerinde iskemi reperfüzyonu oluşturularak testiste oksidatif hasara yol açılmış, fakat resveratrol verilmesi ile hasarın gözle görülür şekilde ortadan kalktığı gözlenmiştir.

Birçok eczacılık ve tıp literatürüne göre resveratrol, stresin yarattığı faktörlere karşı insanlarda koruyucu olabilmektedir. Resveratrolün başta kanser olmak üzere, koroner kalp hastalıkları, Alzheimer, diyabet, florozis gibi pek çok hastalığı iyileştirici etkisi belirlenmiştir (Aggrawal ve Shishodia; 2005; Yıldırım ve ark., 2017). Ancak yapılan literatür taramalarında MTX uygulanması sonrasında resveratrolün lökosit yüzdeleri, total oksidan (TOS)-antioksidan durum (TAS) ve DNA hasarı (8-OHdG) üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışma sayısı çok azdır. Bu nedenle

yapılan bu çalışma ile elde edilen veriler, bilimsel platforma ve klinik kullanıma sunulması bakımından önem taşımaktadır.

## Materyal ve Yöntem

### Hayvan Materyali

Bu çalışmada kullanılan ratlar, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edildi ve çalışmanın deneysel kısmı gerekli izinler alınarak (2016/11) bu ünite gerçekleştirildi. Toplam 40 adet, 8-9 haftalık, 250-300 g ağırlığında Wistar Albino rat kullanıldı. Ratlar deneme süresince 12 saat karanlık/aydınlık ve 22±2°C sıcaklık şartları sağlanan odalarda, önlerinde sürekli olarak taze su ve yem bulunan kafeslerde barındırıldı.

Bir haftalık adaptasyon süresinin sonunda her birinde 10 rat bulunan rastgele 4 gruba ayrıldı: Kontrol grubu (1.grup) , Metotreksat grubu (2.grup), Resveratrol grubu (3.grup), Metotreksat+Resveratrol grubu (4.grup).

1) *Kontrol grubu (10 rat)*: Kontrol grubuna intraperitoneal (i.p) olarak haftada bir kez toplamda 2 doz serum fizyolojik (0.5 ml) enjekte edildi.

2) *Metotreksat grubu (10 rat)*: Bu gruptaki ratlara haftada bir kez toplamda 2 kez 20 mg/kg dozunda Metotreksat (Methotrexate, Koçak Farma) (0.5 ml) i.p. yoldan uygulandı.

3) *Resveratrol grubu (10 rat)*: Bu gruptaki ratlara 40 mg/kg/gün dozunda resveratrol (Resveratrol, Solgar) içme sularına 14 gün boyunca ilave edildi ve i.p. olarak haftada bir kez toplamda 2 kez serum fizyolojik (0.5 ml) enjekte edildi.

4) *Metotreksat+Resveratrol grubu (10 rat)*: Bu gruptaki ratlara haftada bir kez toplamda 2 kez 20 mg/kg dozunda Metotreksat (0.5 ml) i.p. yoldan uygulandı ve 40 mg/kg dozunda resveratrol içme sularına 14 gün boyunca ilave edildi.

Çalışmanın son günü Metotreksat grubundan 2 ve Metotreksat+Resveratrol grubundan 1 adet olmak üzere toplam 3 rat ex oldu. Ex olan ratlar çalışmaya dâhil edilmedi.

### Kan örneklerinin alınması

Deneme sonunda 10mg/kg ksilazin HCl ve 75mg/kg ketamin HCl ile anestezisi altındaki ratların kalplerinden enjektör yardımı ile alınan kan örnekleri antikoagülanlı ve antikoagülanlı tüplere koyuldu. Antikoagülanlı (EDTA) tüplerden lam üzerindeki alınan bir damla kan ile yayma kan preparatı hazırlandı. Antikoagülanlı tüplere alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra elde edilen serumlar eppendorf tüplere alındı. Serumlar analizlerin yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda -20 0C'de muhafaza edildi. Tam kanda lökosit yüzdeleri klasik yöntemle; serumda TOS, TAS değerleri kolorimetrik kitlerle (Rel Assay Diagnostics) ve 8-OHdG değerleri ise ELISA kiti (Bioassay Technology Laboratory) ile belirlendi.

### Yayma kan preparatı (Froti) hazırlanması ve boyanması

Kan hücrelerinin incelenmesi, May Grünwald- Giemsa boyama yöntemi ile yapıldı. Sonrasında ışık mikroskopunda

100 lük objektifte immersiyon yağı kullanılarak sayımları yapıldı.

### **Total oksidan durum (TOS) ölçümü**

Serum TOS düzeyleri spektrofotometre (Shimadzu) de ilgili test kiti (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak tayin edildi.

*Prencip:* Örnekte bulunan oksidan varlığı, ferrus iyon şelat komplekslerini ferrik iyon okside eder. Oksidasyon reaksiyonu ortamda kendiliğinden bulunan arttırıcı moleküller (gliserol) tarafından uzatılır. Ferrik iyonu asidik ortamda kromajen (ksilenol) ile renkli bir kompleks oluşturur ve spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, örnekte bulunan oksidan moleküllerin miktarı ile doğru orantılıdır. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edilebilir ve sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  ekivalent/L olarak ifade edilir (Erel, 2005).

### **Total antioksidan durum (TAS) ölçümü**

Serum TAS düzeyleri spektrofotometre (Shimadzu) de ilgili test kiti (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak tayin edildi.

*Prencip:* Örnekteki antioksidanlar koyu mavi yeşil renkli ABTS radikallerini renksiz ABTS formuna dönüştürür. 660 nm deki ABS değişimleri örneklerin total antioksidan seviyeleri ile ilişkilendirilir. Ölçüm bir Vitamin E analogu Trolox Ekivalent olarak isimlendirilen sabit standart antioksidan ile kalibre edilir. Ölçüm sonuçları mmol Trolox ekivalent/L olarak ifade edilir (Erel,2004).

### **Oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanması**

Oksidatif stres indeksi =  $(\text{TOS}/\text{TAS}) \times 0.1$  formülü ile hesaplandı ve Arbitrary Unit olarak ifade edildi (Erel, 2005).

### **DNA hasarı göstergesi (8-OHdG) belirlenmesi**

Serumda 8-OHdG düzeyi ELISA kiti (Bioassay Technology Laboratory) kullanılarak belirlendi. Kit, ELISA cihazında (Awareness Stat Fax 2100, USA) çalışıldı.

Testin prensibi: Bu kit rat 8-OHdG yi ölçmek için Biotin kaplı antikor sandwich teknolojisini temel alan ELISA'yı kullanır.

### **İstatistik Analizi**

Üzerinde durulan özellikler için tamamlayıcı istatistikler: Ortalama ve Standart Sapma olarak ifade edildi ve her bir ölçülen değişken için tek yönlü Varyans Analizi (ANOVA) sonuçları verildi. Dört grup arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunduğunda, hangi grubun farklı olduğunu belirlemek için 'Duncan' çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Hesaplamalar Statistical Analysis System (SAS) istatistik programı, University Edition sürümünde yapıldı.

### **Bulgular ve Tartışma**

Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat + resveratrol grubu ratlara ait nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfosit ve monosit yüzdeleri Çizelge 1 'de gösterildi. Buna göre;

*Resveratrolün nötrofiller ve monositler üzerine etkisi:* Resveratrol MTX in oluşturduğu nötropeniyi ve monositopeniyi iyileştiremedi. MTX ve MTX+Res gruplarındaki bu parametreler diğer gruplara göre önemli derece de düşüktü ( $p \leq 0,05$ )

*Resveratrolün eozinofil, bazofil ve lenfositler üzerine etkisi:* MTX ve resveratrol bu parametrelerde önemli bir değişikliğe neden olmadı. Bu yüzden bu parametreler bakımından, gruplar arasında önemli bir fark görülmedi ( $p \geq 0,05$ )

Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat + resveratrol grubu ratlara ait TOS, TAS, OSI ve DNA hasarı düzeyleri Çizelge 2 'de gösterildi. Buna göre;

*Resveratrolün TOS ve OSI üzerine etkisi:* MTX in TOS ve OSI değerlerini arttırıcı etkisini, resveratrol önemli düzeyde düşürdü ( $p \leq 0,001$ ).

*Resveratrolün TAS aktivitesine etkisi:* Resveratrol, MTX in azalttığı TAS aktivitesini istatistiksel önemde arttırdı ( $p \leq 0,05$ ). MTX+RES grubundaki bu değer kontrol grubuna yakın ölçüldü.

*Resveratrolün DNA hasarına etkisi:* MTX uygulaması ve RES takviyesi DNA hasarı oluşturmadı. Bu yüzden gruplar arasındaki 8OHdG düzeyleri değişmedi ( $p \geq 0,05$ ).

Resveratrol, doğal bir fitoaleksindir ve başta üzüm olmak üzere farklı birçok bitkide bulunur. Fitoaleksinler, bitkilerde enfeksiyonlara, fiziksel hasara ve ultra viole ışınına karşı oluşurlar (Aribal-Kocatürk ve ark., 2007) ve üzümde başka kırmızı şarap, yer fıstığı, asma yaprağı, keçiboynuzu ve yaban mersininde bulunan polifenolik bileşiklerdir (Signorelli ve Ghidoni, 2005).

Resveratrol üzerine yapılan çalışmalardan sonra, yaşamı uzatan ilaç olarak tanımlanmış ve farklı doku ve organlarda etkili olduğu belirlenmiştir. Resveratrolün antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser aktivitenin yanısıra, platelet agregasyonunu inhibe edici, kalbi koruyucu ve damar gevşetici etkilerinin de olduğu belirtilmiştir (Hung ve ark., 2000). Birçok laboratuvar çalışmasında; resveratrolün, bazı inflamatuvar enzimlerin aktivitesini engelleyici etkisinin olduğu belirlenmiştir (Kimura ve ark., 1985).

Metotreksat (MTX), lenfoma, lösemi, osteosarkom, akciğer ve meme kanserleri, baş ve boyun tümörleri, sedef, sarkoidoz, dermatomyozit, ve romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde yoğun bir şekilde kullanılan, antiinflamatuvar antikanserojen ve antimetabolit etkili bir ilaçtır (Cetinkaya ve ark., 2006).

Folik asit antagonisti olan MTX pürin ve pirimidinlerin sentezini inhibe etmek için klinikte kullanılır (Tian ve Cronstein, 2007). Aynı zamanda MTX akut lenfoblastik lösemi ve malign gestasyonel trofoblastik hastalıkların primer tedavisinde de kullanılmaktadır (Yarris ve ark., 2003). Fakat sitotoksik ve diğer yan etkileri, onun bir antiinflamatuvar olarak MTX in kullanımını sınırlandırır. MTX' in önemli yan etkileri birkaç organda tanımlanmıştır (Hempel ve ark., 2003).

İntestinal sistemde kemoterapi (KT) ve radyoterapi (RT) ile oluşturulan hasar mukozit olarak isimlendirilir. MTX kemoterapötik bir ajandır ve şiddetli mukozite sebep olması muhtemel yan etkilerden birisidir, mukoz membranın ağırlı enflamasyonu ve ülserasyonu şeklinde görülür (Sonis, 2007).

Çizelge 1. Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+ resveratrol grubu ratlara ait yüzdeleri  
Table1. Percentages of control, methotrexate, resveratrol and methotrexate + resveratrol group rats

Değişken	Kontrol grubu (n=10)	Metotreksat grubu (n=8)	Resveratrol grubu (n=10)	Metotreksat +Resveratrol grubu (n=9)	P
	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	
Nötrofil (%)	21.70±1.10a	16.00±1.40b	21.60±1.25a	15.00±1.10b	≤0.05
Eozinofil (%)	6.50±1.60	5.50±1.60	6.50±1.55	5.40±1.40	≥0.05
Bazofil (%)	1.40±0.50	1.20±0.30	1.50±0.40	1.40±0.50	≥0.05
Lenfosit (%)	66.00±7.10	75.00±8.10	65.50±6.10	76.50±7.40	≥0.05
Monosit (%)	4.40±0.60a	2.30±0.40b	4.90±0.80a	1.70±0.50b	≤0.01

a,b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

Çizelge 2. Kontrol, metotreksat, resveratrol ve metotreksat+resveratrol grubu ratlara ait TOS, TAS, OSI ve 8-OHdG düzeyleri

Table2. TOS, TAS, OSI and 8-OHdG levels of control, methotrexate, resveratrol and methotrexate+resveratrol group rats

Değişken	Kontrol grubu (n=10)	Metotreksat grubu (n=8)	Resveratrol grubu (n=10)	Metotreksat +Resveratrol grubu (n=9)	P
	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	
TOS (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv/L)	5.74±0.62c	17.65±1.66a	5.44±1.39c	11.38±0.42b	≤0.001
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	1.77±0.10 <sup>a</sup>	1.48±0.09 <sup>b</sup>	1.75±0.21 <sup>a</sup>	1.71±0.07 <sup>a</sup>	≤0.05
OSI (Arbitrary Unit)	0.33±0.06c	1.18±0.24a	0.32±0.09c	0.67±0.04b	≤0.001
8-OHdG (ng/mL)	4.05±0.34	4.71±0.34	3.97±0.30	4.04±0.25	≥0.05

a,b,c: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

Mukozit gelişiminin ilk adımı oksidatif stres gibi reaktif oksijen türleri (ROS) şekillenmesidir. Dahası inflamasyon ve bakteriyel kolonizasyon, mukozitin gelişmesinde önemli bir rol oynar (Blijlevens ve Sonis, 2007). KT ve RT alan hastalarda ROS' un uzaklaştırılması mukozitin gelişmesini azaltır.

Yapılan bir çalışmada (Kaynar ve ark., 2012) MTX (20mg/kg) terapisi yapılan ratlarda diyare olduğu gözlenmiş ve arı sütünün (royal jel) 50 ve 100 mg/kg dozlarının diyareye koruyucu etkisi tespit edilememiştir.

Bu çalışmada MTX grubunda 2, MTX+RES grubunda 1 ratın ölüm nedeninin mukozitten kaynaklanan diyare sonucunda aşırı sıvı kaybı ile şekillenmiş olabileceği gibi nötropeniye bağlı olarak şekillenen bir enfeksiyon neticesinde olabileceği ihtimalini düşünmekteyiz.

Kemoterapötik ajanların kullanımı sonucu en ölümcül olan ve en sık görülen yan etkisi kemik iliği baskılanmasıdır. Bunun en önemli sonuçları ise lökopeni, trombositopeni ve anemidir. Bunlar arasında nötrofil sayısında azalma (nötropeni) sonucu görülen enfeksiyon en yaygın ölüm nedenlerinden birisidir (Şenol, 2004).

Antineoplastik ilaçların kemik iliğini baskılaması sonucunda 7-14 gün gibi hızlı bir sürede nötrofillerin sayılarında azalması ile nötropeni görülebilir. Bunun sonucunda hastanın enfeksiyona yakalanma riski artar. Bu nedenle antineoplastik ajanların uygulanmadan önce ve sonra lökosit değerlerinin takip edilmesi oldukça önem arz etmektedir (Can, 2003).

MTX, tümörlerin gelişimini durdurmak için yüksek dozları yaygın bir şekilde inflamatuvar lökositlerin proliferasyonunu inhibe etmek için kullanılır (Widemann ve Adamson, 2006) Düşük doz MTX'e bağlı pansitopeni gelişse de bu durum nadir

görülen, yaşamı tehdit eden bir komplikasyondur ve hastaların sadece % 1.4'ünde meydana gelir (Ohasone ve ark., 1997). MTX toksisitesi, inflamatuvar yanıtın aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimindeki önemli artışı ile karakterizedir (Uzar ve ark., 2006).

Romatoid artrit tanısı koyulan bir hasta sabah akşam 2 tablet MTX tedavisinden bir hafta sonra ağız yaraları, halsizlik ve yutma güçlüğü görülmüş, ağız mukozasının muayenesinde plak şeklinde beyaz renkli ülserler tespit edilmiştir. Laboratuvar bulgularında ise lökopeni ve nötropeni belirlenmiştir (Duman ve ark., 2014). Nötropeni 1 haftadan kısa süreli olduğunda % 30 oranında enfeksiyon gelişirken, 1 haftadan uzun süren nötropenilerin tamamında enfeksiyon gelişmektedir (Çelebi, 2003).

Yapılan bir çalışmada (Çetin ve ark., 2008), üzüm çekirdeği ekstratı (ÜÇE) 100mg/kg dozunda 15 gün süre ile oral olarak ratlara verilip, çalışmanın 10. gününde 20mg/kg dozunda MTX i.p. yolla uygulanmıştır. Çalışma sonunda lökosit (WBC), lenfosit (LY) sayısında MTX ve MTX+ÜÇE grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel önemde bir azalma tespit edilmiştir (p<0,001). % LY değerindeki azalmanın ise istatistiksel olarak önemde olmadığını ifade etmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada, MTX ve MTX+RES grubunda, kontrol ve RES gruplarına göre lenfosit yüzdesinde artış, eozinofil ve bazofil yüzdelerinde azalma tespit edildi fakat gruplar arasında istatistiksel önem tespit edilmedi. Nötrofil (p<0.05) ve monosit (p<0.01) yüzdesinde azalmanın ise istatistiksel önemde olduğu belirlendi. MTX'in neden olduğu nötropeni ve monositopeni durumlarında belirtilen dozda oral uygulanan resveratrolün bu değerleri



iyileştirmede etkili olmadığı tespit edildi. Fakat farklı doz ve sürede resveratrol kullanımının bu durumu değiştirebileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte, kontrol grubu formül lökosit değerleri, ratlarda daha önce yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Taş ve ark., 2011; Comba ve ark., 2016a).

Emilia-Juan ve ark, (2002) yaptıkları çalışmada ratlarda trans-resveratrolün 20 mg/kg dozunda 28 gün boyunca kullanıldığında lökosit yüzdeleri ve total lökosit sayısında herhangi bir değişiklik olmadığını, dolayısıyla herhangi bir yan etkisinin bulunmadığını ifade etmişlerdir.

Haftada 3 gün 5mg/kg dozunda ve uzun süre MTX alınması ile oluşan pansitopeni durumunda granülosit koloni stimule edici ajan (G-CSF) ve folik asit uygulaması, dehidratasyon nedeniyle hidrasyon uygulaması sonucunda kısa sürede hematolojik parametrelerin düzeleceği bildirilmiştir. Bu nedenle eğer hastalar düzenli bir şekilde takiplere gelemeyecekse, MTX kontrollü bir şekilde verilmeli ya da farklı bir ajan tedavi seçeneği olarak kullanılmalıdır (Yoon ve Ng, 2001).

MTX immunsupresif etkisini lenfosit proliferasyonunda azalma, IL-1 aktivitesinde azalma, monositlerden IL-1 üretiminde azalma, LTB-4 düzeylerinde azalma yoluyla yapar. Ön planda antiinflamatuvar, ikinci planda ise immunsupresif etki oluşturur. MTX tedavisi ile birlikte folik asit verilmesi mukozal ülserasyonları GİS belirtileri ve sitopenik yan etkileri azaltır. MTX in yan etkileri arasında bulantı, hazımsızlık, karın ağrısı, ishal, hepatoksisite, hipersensivite, akciğerlerde fibröz yapının artışı, düşüklükler ve malformasyonlar sayılabilir (Dilek, 2002).

Normal şartlar altında, reaktif oksijen türleri (ROS) nin üretiminde ve yıkımında bir denge vardır. Oksidatif stres, koruyucu antioksidan savunma sistemi ile oksijen radikalleri arasında bir dengenin değişimi olarak belirlenir. RT ve KT tedavi sırasında ROS un oluşmasına sebep olur. ROS, DNA' ya, hücre membranına, dokuya hasar verir makrofajları uyarır, kritik biyolojik mekanizmaları, molekülleri ve yolları tetikler (Sonis, 2007).

Reaktif oksijen türleri, MTX' in patogeneziinde önemlidir. MTX serbest oksijen radikalleri üretir ve lipid peroksidasyonun yükselmesi ile sonuçlanır. Bu serbest radikaller mitokondrinin fonksiyon bozukluğuna ve apoptoze sebep olur (Miyazono ve ark., 2004) MTX uygulaması malondialdehit (MDA) üretimini artırır ve glutatyon (GSH) seviyelerini azaltır (Jahovic ve ark., 2003).

Metotreksat birçok organda oksidatif stresi artırır ve antioksidatif sistemi baskılar (Babiak ve ark., 1998). MTX, folik asidin dihidroksifolat redüktaz enzimi ile reaksiyona girmesinin engeller, böylece DNA ve RNA sentezi için gerekli timidilat oluşamaz (Dilek, 2002).

MTX, hücre içinde sitozolik nikotinamid adenin fosfatdehidrojenaz (NADPH)'nın azalmasına neden olur. Bu etkisini NADPDH ve NADP bağımlı malik enzimi inhibe ederek gösterir. NADPDH, glutatyon redüktaz (GSSG-R) enzimi için gerekmektedir. Bu enzim sitozolik antioksidan olan indirgenmiş GSH'nin devamlılığını sağlar. MTX tedavisi, GSH seviyesinin ve ROS' lara karşı hücreleri koruyan antioksidan savunma sisteminin etkinliğinin azalması ile sonuçlanmaktadır (Cetinkaya ve ark.,2006).

Bu durum hepatosit hasarına neden olmaktadır (Uraz ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada (Jahovic ve ark., 2003) MTX uygulanan sıçanların kan, karaciğer, böbrek ve ince barsak dokularında GSH seviyelerinin azaldığını, myeloperoksidaz aktivitesinin ve MDA seviyelerinin ise arttığını bildirmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada 8 hafta boyunca 0.25 mg/kg/gün intra musküler MTX enjeksiyonu yapılan tavşanların karaciğer SGOT, SGPT, ALP ve bilirubin seviyelerinin ve MDA'nın anlamlı derecede arttığı, total serum proteininin ise azaldığı bildirilmiştir (Hadi ve ark., 2012).

MTX'in karaciğer ve böbrek başta olmak üzere birçok doku ve organda oluşturduğu hasarda oksidatif stresin rolü bulunmaktadır. Bu nedenle MTX toksisitesini azaltabilmek için bazı antioksidan maddeler ile birlikte kullanması gerekmektedir (Armağan, 2015).

Tunalı-Akbay ve ark, (2010) yaptıkları çalışmada, 20 mg/kg dozunda metotreksat tek doz olarak i.p. yolla uygulamışlar ve 5 gün boyunca 10mg/kg dozunda resveratrolü oral yolla vermişler. Sonuçta kemoterapik bir ajan olan MTX in yan etkilerini azaltmak için resveratrolün kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Mokni ve ark, (2007) yaptıkları çalışmada resveratrolün antioksidan enzimler üzerine optimal etkisinin 12.5 mg/kgdozunda olduğunu tespit etmiştir. Yapılan başka bir çalışmada (Çetin ve ark., 2008) ise, MTX'in MDA seviyesini yükselttiği, SOD ve CAT seviyelerini düşürdüğünü, üzüm çekirdeği ekstresi tedavisinin bu değerleri iyileştirdiği bildirilmiştir.

Yapılan benzer bir çalışmada (Dalaklıoğlu ve ark., 2013) metotreksatin neden olduğu karaciğer hasarında, lipid peroksidasyon tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) ve hepatik antioksidan enzim olan katalaz (CAT) aktivitesi ve glutatyon-S-transferaz (GST) ürünleri araştırılmıştır. Çalışmada 20mg/kg dozunda resveratrol oral yolla 6 gün verilmiş ve son 3 gün boyunca 7mg/kg/gün dozunda metotreksat i.p. yolla uygulanmış. Sonuçta, metotreksatin karaciğerde TBARS, CAT, and GST seviyelerinin anlamlı derecede artırdığını bildirmişlerdir. Resveratrolün ise tedavi grubunda oksidatif stresi inhibe ederek bu parametrelerin azalttığını ve karaciğerde koruyucu etki gösterdiğini vurgulamışlardır.

Kaya ve Yılmaz (2020) ise, MTX i 7 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozunda i.p. olarak 9 gün boyunca 3 gün uygulanmıştır. MTX uygulanan grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA (P<0.001) düzeylerinde anlamlı artışlar saptanırken, GSH (P<0.001) düzeyleri ile KAT (P=0.001), GSH-Px (P=0.001) ve SOD (P<0.001) aktivitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı düşüşler gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçta, MTX'ın toksisiteye neden olduğunu belirtmişlerdir.

Resveratrolün bu parametreler üzerine etkileri onun yapısındaki polifenolik bileşikler ile ilişkilendirilebilir (Kolouchova-Hanzlikova ve ark., 2004). Polifenolik bileşiklerin kabiliyeti ve antioksidan durumları, onların fenolik hidroksil gruplarının redoks özellikleri ile belirlenir (Ignatowicz ve Bear-Dubowska, 2001). Bununla birlikte resveratrolün yüksek hidrofilik ve lipofilik içeriği

Vitamin C ve E gibi diğer antioksidanların karşılaştırılmasında önemli bir rol oynar (Kasdallah-Grissa ve ark., 2007). Resveratrolün antioksidan etkisi 3 mekanizma ile ilişkilendirilebilir; 1, serbest oksijen türlerinin oksidatif zincir reaksiyonlarının azalması ile 2, mitokondrideki süperoksit radikallerinin nötralize edilmesi, 3, fenton reaksiyon ürünleri ile lipid peroksidasyonun korunması (Zini ve ark., 1999).

Kocaman ve Çolakoğlu (2013) ise çalışmalarında ratlara 1. ve 5. günlerde 15 mg/kg dozunda i.p. tekrarlayan 2 MTX uygulaması sonucunda 8. gün karaciğer hasarını histopatolojik olarak incelemişlerdir. Sonuçta, MTX' in kliniklerde kullanılırken doz ve süre ayarlamasının çok iyi yapılmasının gerektiği ifade edilmiştir. Aksi durumda MTX' in karaciğerde yapısal ve fizyolojik anlamda ciddi bozukluklar meydana getirebileceği sonucuna varmışlardır.

Oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması nedeniyle, oksidan hasara duyarlı karbonhidrat, protein, lipid yapısındaki moleküller ve DNA zarar görebilir. Organizmanın her hücresinde DNA'nın bir günde 1000 kez oksidatif hasara maruz kaldığı bildirilmiştir (Wildburger ve ark., 2009). Bununla birlikte resveratrol DNA sentezinde iki anahtar enzim olan ribonükleotid redüktaz ve DNA polimeraz aktivitesini (Fontacave ve ark.,1998) ve ağız kas hücre kültürlerinde DNA sentezlenmesini inhibe edebileceği bildirimler arasındadır (Zou ve Van, 1999).

Serbest oksijen radikallerinin DNA hasarı yaptığı bilirse de resveratrolün bu radikaller üzerindeki etkisi net değildir. Resveratrolün potent hidroksil radikal süpürücü etkisi ile DNA kırılmalarını azalttığını bildiren çalışmalar olduğu gibi (Burkitt ve Duncan, 2000), bu etkisinin anlamlı olmadığını bildiren çalışmalar (Murcia ve Martinez-Tome, 2001) da vardır.

Abdel-Wahab ve Abdel-Wahab (2016) resveratrolün 5 ve 10 mg/kg dozlarını 6 haftalık anksiyete üzerine etkilerini incelemişler. Uyku apnesinin karakteristik durumu olan intermitten hipoksinin GSH seviyesinde, GSH-Px aktivitesinde ve 8-OHdG seviyesinde artışa neden olduğunu; resveratrolün her iki dozunda bu parametreleri antagonize ettiğini ve bu amaçla yakın gelecekte kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Alturfan ve ark. (2011) ratlarda resveratrolün etkisini farklı dokularda incelemişler. oksidatif DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG seviyesinin ve MDA, MPO aktivitesinin resveratrol grubunda önemli derecede geri dönüştüğünü bildirmişlerdir.

Atmaca ve ark. (2014) resveratrolün TOS, 8-OHdG ve TAS değerleri kontrol grubuna yakın olduğu belirtilmiştir ve resveratrolün florid intoksikasyonunda oksidatif stresi önlemede faydalı olabileceği sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde in vivo (Tatlidede ve ark., 2009) ve in vitro (Yan ve ark., 2012) çalışmalarda resveratrolün oksidatif DNA hasarının korunmasında önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir.

Bozkurt ve ark. (2014) yaptıkları benzer çalışmada kontrol grubuna göre, MTX grubunda MDA, TOS ve OSI

değerleri önemli derecede yüksek, TAS düzeyi önemli derecede düşük olarak belirlenmiştir.

Mevcut çalışmada ise, MTX grubundaki, TOS ve OSI seviyelerinde anlamlı bir artış, TAS seviyesinde anlamlı bir azalma tespit edildi. MTX+RES grubundaki ratlarda ise bu parametrelerin istatistiksel önemde iyileştiği belirlendi. RES ve kontrol gruplarındaki değerler birbirine yakın bulundu. Bu değerler literatürde belirtilen değerler ile uyumlu olduğu belirlendi (Comba ve ark., 2016b; Comba ve ark., 2020)

Bununla birlikte 8-OHdG seviyesi en yüksek MTX grubunda bulunsa da diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel önemde değildi. Benzer şekilde böbrek yetmezliği (Comba ve ark., 2017; Mis ve ark., 2019), diyabet (Mis ve ark.,2018) gibi metabolik hastalıklar üzerine yapılan çalışmalarda da oksidatif DNA hasarı (8-OHdG) tespit edilemediği bildirilmiştir. Bunun muhtemel nedeni, düşük seviyelerdeki oksidatif DNA hasarının sirkadiyen kontrol mekanizmalarında görev alan bazı enzimler ile etkili bir şekilde onarılabilmesi (Sancar ve ark., 2010) yada, O<sub>2</sub> gibi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de DNA' da doğrudan hasar oluşturmaması olabilir. Nitekim OH radikallerinin DNA üzerine etkisini gösterebilmesi için ya DNA'da ya da onun çok yakınında şekillenmesi gerekmektedir.

## Sonuç

Sonuç olarak, klinikte antiinflamatuar ve immunsupresif özelliğinden dolayı oldukça yoğun bir şekilde kullanılan ve kemoterapik bir ajan olan MTX' in dozu iyi ayarlanmalı ve yan etkileri en az düzeye indirilmelidir. Bu çalışma ile haftada 1, toplamda 2 kez kullanılan 20 mg/kg dozunda MTX in neden olduğu nötropeni ve monositopeninin iyileştirilmesinde 40 mg/kg/gün dozunda 14 gün boyunca RES' in etkili olmadığı ancak mevcut durumu da kötüleştirmediği sonucuna varıldı. Bununla birlikte, MTX in DNA hasarı oluşturmadığı, fakat oksidatif stres oluşturduğu belirlendi. Bu amaçla MTX'in neden olduğu oksidatif stresi azaltmak için antioksidan özelliğinden dolayı resveratrolün tedavi protokolüne ek olarak kullanılabileceği kanısındayız.

## Çıkar çatışması bildirim

Yazarların makalede sunulan veriler ve/veya makalenin konusu ile ilgili olarak herhangi bir kişi ya da kuruluş ile çıkar ilişkisi bulunmamaktadır.

## Teşekkür

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje başkanlığı tarafından 2015-SBE-YL235 numaralı proje olarak desteklenmiştir. Maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

Abdel-Wahab, B. A., & Abdel-Wahab, M. M. (2016). Protective effect of resveratrol against chronic intermittent hypoxia-induced spatial memory deficits, hippocampal oxidative DNA damage and increased p47Phox NADPH oxidase expression in young rats. *Behavioural brain research*, 305, 65-75.

- Akkuş, Ö., Şanlı K. (2006). Kanserli çocuklarda hemşirelik bakımı ve desteğinin önemi. Uyar M, Uslu R, Yıldırım YK, editör. Kanser ve palyatif bakım. İzmir: Meta Basım Matbaacılık, 309-19.
- Alturfan, A. A., Tozan-Beceran, A., Şehirli, A. Ö., Demiralp, E., Şener, G., & Omurtag, G. Z. (2012). Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Molecular biology reports*, 39(4), 4589-4596.
- Aribal-Kocatürk, P., Öznel Kavay, G., & İren Büyükkağnici, D. (2007). Pretreatment effect of resveratrol on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biological Trace Element Research*, 118(3), 244-249.
- Armağan, İ. (2015). Metotreksat'ın karaciğer ve böbrekte neden olduğu hasarda oksidatif stresin rolü. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 22(4).
- Atmaca, N., Atmaca, H. T., Kanici, A., & Anteplioglu, T. (2014). Protective effect of resveratrol on sodium fluoride-induced oxidative stress, hepatotoxicity and neurotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 70, 191-197.
- Babiak, R. M., Campello, A. P., Carnieri, E. G., Oliveira, M. B. (1998). Methotrexate: Pentose Cycle And Oxidative Stres. *Cell Biochem Funct*, 16, 283-93.
- Blijlevens, N., & Sonis, S. (2007). Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy-and radiotherapy-induced mucositis. *Annals of Oncology*, 18(5), 817-826.
- Block, K. I., Koch, A. C., Mead, M. N., Tothy, P. K., Newman, R. A., & Gyllenhaal, C. (2008). Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *International journal of cancer*, 123(6), 1227-1239.
- Bozkurt, M., Em, S., Oktayoglu, P., Turkcü, G., Yuksel, H., Sariyıldız, M. A., ... & Kuyumcu, M. (2014). Carvacrol prevents methotrexate-induced renal oxidative injury and renal damage in rats. *Clinical and Investigative Medicine*, E19-E25.
- Burkitt, M. J., & Duncan, J. (2000). Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Archives of biochemistry and biophysics*, 381(2), 253-263.
- Can, G. (2003). Kanser kemoterapi rehberi ve uygulamaya yönelik öneriler. Editörler; Durna Z, Aydın A, Nobel tıp Kitapevleri. İstanbul,
- Caron, J. E., Krull, K. R., Hockenberry, M., Jain, N., Kaemingk, K., Moore, I. M. (2009). Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood and Cancer*, 53(4), 551-556.
- Cetinkaya, A., Kurutas, E. B., Bulbuloglu, E., & Kantarceken, B. (2007). The effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced oxidative renal damage in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(1), 284-285.
- Comba, A., Oto, G., Comba, B., Ozdemir, H., Keskin, S., & Akveran, G. A. (2020). Effects of boric acid on proinflammation cytokines, total oxidativeantioxidative status and hematological parameters in rats applied benzo (a) pyrene. *Feb Fresenius Environmental Bulletin*, 3599.
- Comba, B., Cinar, A., Comba, A., & GENCER, Y. G. (2016). Effects of ACTH application on kidney function tests, the electrolytes and hematological parameters in rats. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 63(3), 229-233.
- Comba, B., Mis, L., Uslu, S., & Comba, A. (2017). The effect of barley grass on antioxidant capacity and DNA damage in rat with renal failure. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(10), 6135-6140.
- Comba, B., Oto, G., Mis, L., Özdemir, H., & Comba, A. (2016). Effects of borax on inflammation, haematological parameters and total oxidant-antioxidant status in rats applied 3-methylcholanthrene. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22(4), 539-544.
- Çelebi, S. (2003). Çocuklarda Febril Nötropeni. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 29(2), 35-41.
- Çetin, A., Kaynar, L., Kocyigit, I., Hacıoglu, S. K., Saraymen, R., Ozturk, A., ... & Sagdic, O. (2008). Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. *The American journal of Chinese medicine*, 36(05), 861-872.
- Dalaklioglu, S., Genc, G. E., Aksoy, N. H., Akcıt, F., & Gumuslu, S. (2013). Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Human & experimental toxicology*, 32(6), 662-671.
- Dilek, K. (2002). Günümüzde en sık kullanılan antisyupresif ajanların özellikleri. *Ankem Derg*, 16, 3, 199-202.
- Dong, Z. (2003). Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 145-150.
- Duman, T. T., Üstün, C., Şavlı, H. (2014). Hatalı Metotreksat Kullanımı Sonucu Gelişen Nötropenik Ateş. *Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, Bodrum. Ankem Derg*, 28 (Ek 1)
- Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 37(2), 112-119.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111.
- Fontecave, M., Lepoivre, M., Elleingand, E., Gerez, C., & Guittet, O. (1998). Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS letters*, 421(3), 277-279.
- Hadi, N. R., Al-Amran, F. G., & Swadi, A. (2012). Metformin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 3(3), 248-253.
- Hempel, L., Misselwitz, J., Fleck, C., Kentouche, K., Leder, C., Appenroth, D., ... & Zintl, F. (2003). Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. *Medical and Pediatric Oncology: The Official Journal of SIOP—International Society of Pediatric Oncology (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique)*, 40(6), 348-354.
- Hung, L. M., Chen, J. K., Huang, S. S., Lee, R. S., & Su, M. J. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular research*, 47(3), 549-555.
- Ignatowicz, E., & Baer-Dubowska, W. (2001). Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Polish journal of pharmacology*, 53(6), 557-570.
- Jahovic, N., Çevik, H., Şehirli, A. Ö., Yeğen, B. Ç., & Şener, G. (2003). Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *Journal of pineal research*, 34(4), 282-287.
- Juan, M. E., Vinardell, M. P., & Planas, J. M. (2002). The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *The Journal of nutrition*, 132(2), 257-260.
- Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, M., El May, M., Gharbi, N., ... & El-Fazaâ, S. (2007). Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life sciences*, 80(11), 1033-1039.
- Kaya, E., & Yılmaz, S. (2020). Deneyisel Olarak Metotreksat Uygulanmış Ratlarda Oksidatif Stres ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Enginar Uygulamasının Etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 34(1), 43-48.

- Kaynar, L., Cetin, A., Hacıoğlu, S. K., Eser, B., Kocyyigit, I., Canöz, Ö., ... & Silici, S. (2012). Efficacy of royal jelly on methotrexate-induced systemic oxidative stress and damage to small intestine in rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 9(3), 412-417.
- Kirimlioglu, V., Ara, C., Yilmaz, M., Ozgor, D., Isik, B., Sogutlu, G., ... & Yologlu, S. (2006). Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, protects gastric tissue against the oxidative stress in cholestatic rats. *Digestive diseases and sciences*, 51(2), 298-302.
- Kocaman, N., & Çolakoğlu, N. (2013). Tekrarlayan dozlarda metotreksat uygulamasının siçan karaciğer dokusu üzerine etkileri. *Fırat Tıp Dergisi*, 18(3), 141-145.
- Kolouchová-Hanzlíková, I., Melzoch, K., Filip, V., & Šmidrkal, J. (2004). Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chemistry*, 87(1), 151-158.
- Kuhnle, G., Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., ... & Hahn, U. (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and biophysical research communications*, 272(1), 212-217.
- Mis, L., Comba, B., Basbugan, Y., Yasar, S., & Comba, A. (2019). Assessment of the wheatgrass effects on antioxidant capacity and DNA damage in rats with experimental renal failure. *Feb-Fresenius Environmental Bulletin*, 2876.
- Mis, L., Comba, B., Uslu, S., & Yeltekin, A. (2018). Effect of wheatgrass on DNA damage, oxidative stress index and histological findings in diabetic rats. *International journal of morphology*, 36(4).
- Miyazono, Y., Gao, F., & Horie, T. (2004). Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 39(11), 1119-1127.
- Mokni, M., Elkahoui, S., Limam, F., Amri, M., & Aouani, E. (2007). Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. *Neurochemical research*, 32(6), 981-987.
- Murcia, M. A., & Martinez-Tome, M. (2001). Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives. *Journal of food protection*, 64(3), 379-384.
- Ohosone, Y., Okano, Y., Kameda, H., Hama, N., Matsumura, M., Nojima, T., ... & Ikeda, Y. (1997). Toxicity of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis—clinical characteristics in patients with MTX-induced pancytopenia and interstitial pneumonitis. *Ryumachi.[Rheumatism]*, 37(1), 16-23.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Kang, T. H., Reardon, J. T., Lee, J. H., & Ozturk, N. (2010). Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *FEBS letters*, 584(12), 2618-2625.
- Shishodia, S., & Aggarwal, B. B. (2005). Resveratrol: a polyphenol for all seasons. In *Resveratrol in health and disease* (pp. 1-15). CRC Press.
- Signorelli, P., & Ghidoni, R. (2005). Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(8), 449-466.
- Sonis, S. T. (2007). Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. *J Support Oncol*, 5(9 Suppl 4), 3-11.
- Şenol, E. (2004). Son bir yılda febril nötropenide ne oldu? etkenler epidemiyoloji (literatür değerlendirilmesi). Üçüncü Febril Nötropeni Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. 27-29 Şubat. Bilkent Otel, Ankara.
- Taş, A., Karasu, A., Comba, B., Aksu, D., Düz, E., & TANRITANIR, P. (2011). Effects of sildenafil citrate on the hematological parameters in the early phase of wound healing in diabetic rats. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(3).
- Tatlidede, E., Şehirli, Ö., Velioglu-Öğünç, A., Çetinel, Ş., Yeğen, B. Ç., Yarat, A., ... & Şener, G. (2009). Resveratrol treatment protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Free radical research*, 43(3), 195-205.
- Tian, H., & Cronstein, B. N. (2007). Understanding the mechanisms of action of methotrexate. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 65(3), 168-173.
- Tunalı-Akbay, T., Şehirli, O., Ercan, F., & Şener, G. (2010). Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 303-310.
- Uguralp, S., Usta, U., & Mizrak, B. (2005). Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *European Journal of Pediatric Surgery*, 15(05), 333-336.
- Uraz, S., Tahan, V., Aygun, C., Eren, F., Unluguzel, G., Yuksel, M., ... & Tozun, N. (2008). Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Digestive diseases and sciences*, 53(4), 1071-1077.
- Uzar, E., Koyuncuoglu, H. R., Uz, E., Yilmaz, H. R., Kutluhan, S., Kilbas, S., & Gultekin, F. (2006). The activities of antioxidant enzymes and the level of malondialdehyde in cerebellum of rats subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Molecular and cellular biochemistry*, 291(1), 63-68.
- Widemann, B. C., & Adamson, P. C. (2006). Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *The oncologist*, 11(6), 694-703.
- Wildburger, R., Mrakovcic, L., Stroser, M., Andrisic, L., Sunjic, S. B., Zarkovic, K., & Zarkovic, N. (2009). Lipid peroxidation and age-associated diseases—cause or consequence. *Turk Klin Tip Bilim Derg*, 29, 189-193.
- Yan, Y., Yang, J. Y., Mou, Y. H., Wang, L. H., Zhou, Y. N., & Wu, C. F. (2012). Differences in the activities of resveratrol and ascorbic acid in protection of ethanol-induced oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Food and chemical toxicology*, 50(2), 168-174.
- Yarris, J. P., & Hunter, A. J. (2003). Roy Hertz, MD (1909–2002): the cure of choriocarcinoma and its impact on the development of chemotherapy for cancer. *Gynecologic oncology*, 89(2), 193-198.
- Yildirim, S., Oto, G., Comba, B., Ekin, S., & Cinar, D. A. (2017). An investigation of the protective effects of resveratrol on some biochemical parameters and histopathological findings in experimentally-induced chronic flurosis in rats. *Fluoride*, 50(3), 365-373.
- Yoon, K. H., & Ng, S. C. (2001). Early onset methotrexate-induced pancytopenia and response to G-CSF: a report of two cases. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*, 7(1), 17-20.
- Yoshiyuki, K., Hiromichi, O., & Shigeru, A. (1985). Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 834(2), 275-278.
- Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A., & Tillement, J. P. (1999). Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under experimental and clinical research*, 25(2-3), 87-97.
- Zou, Y., & Van Houten, B. (1999). Strand opening by the UvrA2B complex allows dynamic recognition of DNA damage. *The EMBO journal*, 18(17), 4889-4901.