



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2022; 36 (1): 42 - 48
<http://www.fusabil.org>

Metotreksat Uygulanan Ratlarda Arjinin Silikat İnositol Kompleksinin Kemik Hasarı Üzerine Etkileri *

Zeynep TUZCU ^{1,a}
Beşir ER ^{1,b}
Tansel Ansal BALCI ^{2,c}
Mehmet ERDOĞAN ^{1,d}
Mehmet TUZCU ^{1,e}

¹ Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Elazığ, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Nükleer Tıp Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-5331-4893

^b ORCID: 0000-0002-9583-2218

^c ORCID: 0000-0002-7425-0534

^d ORCID: 0000-0001-6760-1941

^e ORCID: 0000-0002-1329-3143

Antineoplastik bir ilaç olan metotreksat (MTX), kemik deformasyonlarına neden olmaktadır. Arjinin-silikat-inositol (ASI) kompleksi, kemik sağlığı üzerinde faydalı etkileri olduğu gösterilen arginin, silikon ve inositolün bir bileşimidir. Bu çalışmada, ratlarda ASI uygulamasının MTX kaynaklı kemik hasarına karşı potansiyel koruyucu rolü araştırıldı. Bu amaçla toplam 28 adet Sprague-Dawley erkek rat dört gruba ayrıldı: i) Kontrol, ii) ASI; ratlara 15 gün boyunca 25 mg/kg/gün dozunda oral gavaj ile ASI verildi, iii) MTX; ratlara 8-12. günler arasında 5 gün boyunca subkutan olarak 0.75 mg/kg dozunda MTX enjekte edildi, iv) ASI+MTX; ratlara 15 gün boyunca 25 mg/kg/gün dozda oral gavaj ile ASI verildi ve 8-12. günler arasında 5 gün boyunca subkutan olarak 0.75 mg/kg dozunda MTX enjekte edildi. MTX; serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), üre (BUN) ve kreatin düzeylerini anlamlı derecede artırırken, tibia osteokalsin düzeyini azaltmıştır (P<0.001). ASI+MTX grubunda; ALT, AST, BUN ve kreatinin düzeyleri MTX grubuna göre belirgin olarak azalmıştır (P<0.001). MTX; kemik dokusunda nükleer faktör kappa-B (NF-κB), nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörü (RANKL), interlökin-1β (IL-1β), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) düzeylerini artırıp osteoprotegerin (OPG) ve tip 1 kollajen düzeylerini azaltmıştır (P<0.001). Ancak, ASI uygulaması NF-κB, RANKL, IL-1β, IL-6 ve TNF-α düzeylerini düşürürken, OPG ve tip 1 kollajen düzeylerini de artırmıştır (P<0.05). Benzer şekilde, ASI'nin MTX'e karşı koruyucu etkisi histolojik analizler ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak, ASI uygulaması ratlarda MTX'in kemik hasarı üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmıştır.

Anahtar Kelimeler: Arjinin silikat inositol, metotreksat, kemik hasarı

Effects of Arginine Silicate Inositol Complex on Bone Damage in Rats Treated with Methotrexate

Methotrexate (MTX), an antineoplastic drug, causes bone deformations. Arginine-silicate- inositol (ASI) complex is a combination of arginine, silicon and inositol that have been shown to have beneficial effects on bone health. In this study, it was investigated the potential protective role of ASI against MTX induced bone damage in rats. For this purpose, a total of 28 Sprague-Dawley male rats were divided into four groups: i) Control; ii) ASI, the rats were treated orally with 25 mg/kg/day of ASI for 15 days; iii) MTX, the rats were injected subcutaneously with 0.75 mg/kg of MTX on 8th and 12th days for 5 days, and iv) ASI+ MTX, the rats were treated orally with 25 mg/kg/day of ASI for 15 days and injected with MTX on 8th and 12th days for 5 days. MTX significantly increased aspartateaminotransferase (AST), alanineaminotransferase (ALT), urea (BUN) and creatine levels, while decreased tibia osteocalcin levels (P<0.001). In the ASI+MTX group; ALT, AST, BUN and creatinine levels were significantly decreased compared to the MTX group. MTX increased bone nuclear factor-kappa B (NF-κB), receptor activator of NF-κB ligand (RANKL), interleukin (IL)-1β, IL-6 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) levels and decreased the bone osteoprotegerin (OPG) and type1collagen levels (P<0.001). However, ASI administration reduced the levels of NF-κB, RANKL, IL-6 and TNF-α, while increased the levels of OPG and type1collagen levels (P<0.05). Similarly, the protective effect of ASI against MTX was confirmed by histological analysis. In conclusion, ASI application reduced the negative effects of MTX on bone damage in rats.

Key Words: Arginine silicate inositol, methotrexate, bone damage

Geliş Tarihi : 24.12.2021
Kabul Tarihi : 11.01.2022

Yazışma Adresi Correspondence

Zeynep TUZCU
Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü
Elazığ – TÜRKİYE
ztuzcu@firat.edu.tr

Giriş

Kanser tedavisinde kemoterapötik ajanların uygulanması hastalarda kemik oluşumunu önemli ölçüde azaltarak kemik kaybı riskini artırır (1-5). Kemik kaybı riskinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi hastalığı önleyici tedavinin belirlenmesinde oldukça önemlidir (6, 7). Metotreksat (MTX), çocukluk çağı kanserlerinde özellikle akut lenfoblastik lösemide sıkça kullanılan anti-metabolit etkili bir kemoterapötiktir (8-10). Tedavide sıklıkla kullanılması ile birlikte kemik dokusuyla ilişkili yan etkileri nedeniyle MTX üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (11, 12). Yapılan çalışmalar (13, 14) deney hayvanlarında MTX uygulamasının kemik kütlelerinde kayba ve kemik iyileşmesinde olumsuzluklara neden olduğunu göstermiştir. Osteoblast sayısında azalma ve osteoklast sayısında artış MTX'in akut etkileri sonucu ortaya çıkmaktadır (2, 8, 15-17). Bunun yanı sıra, MTX uygulaması kemik yıkıcı sitokinlerin artışına sebep olmaktadır (11). Günümüzde MTX'in kemik üzerine olumsuz etkilerini azaltabilecek bir tedavi bulunmamaktadır (18) ve hayvan modellerinde yan etkilerin tedavisi için bir takım tedaviler denenmektedir (18-22). Kemoterapötik ajanlarla birlikte fitokimyasal

* Bu çalışma FÜBAP Koordinasyon Birimi tarafından (FÜBAP/ FF.17.30) desteklenmiştir.

maddelerin kullanılması tedavide ve yan etkileri en aza indirmede etkili olmaktadır (11, 23). Arjinin silikat inositol (ASİ) kompleksi arjinin (%43.8), silikat (%8.0) ve inositol (%24.0) bileşenlerinden oluşan biyoyararlanımı yüksek olan bir bileşimdir. Arjinin, tedavide kullanılabilen temel aminoasitlerdendir (24). Diyetle alınan arjininin osteoporoz oluşturulan deneklerde kemik mineral yoğunluğunu arttırdığı rapor edilmiştir (25, 26). Silikon, kemik dokusu üzerinde etkili önemli bir iz elementtir (27). Silikon eksikliğinin, ratlarda kollajen sentezinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (28). Arjinin ve silikon arasında hidrojen bağları oluşturarak ASİ kompleksini meydana getiren inositol, B vitamini ailesinin bir üyesidir (29). Arjinin silikat inositol kompleksinin kemik, kırıkta, bağ ve damar dokuları üzerine etkilerine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (30, 31). Bununla birlikte, bir rat modelinde ASİ'nin ratlarda MTX ile indüklenen kemik hasarı ve kemik nükleer faktör kappa-B (NF- κ B), nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörü (RANKL), osteoprotegerin (OPG), tip 1 kollajen, interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) düzeyleri üzerindeki etkilerini araştırarak deneysel bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, ASİ uygulamasının ratlarda MTX'in neden olduğu kemik hasarı üzerindeki potansiyel koruyucu etkileri ve bu etkilerin moleküler mekanizmaları araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvanlar ve Deneme Düzeni: Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM)'nden temin edilen 28 adet erkek Sprague-Dawley cinsi rat (yaş: 8 haftalık, ağırlık 200 $\pm$ 20 g) kullanıldı. Ratlar standart laboratuvar koşullarında (12/12 saat gün ışığı/karanlık döngüsü, %55 $\pm$ 5 bağıl nem ve 22 $\pm$ 2°C sıcaklık) tutuldu. Çalışma süresince ratlara standart pelet yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Deneyler, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (FÜHADEK) onayı alındıktan sonra (Tarih: 18.01.2017, Toplantı: 2017/02, Karar No:17), etik kurallara uygun bir şekilde yürütüldü. Bir hafta süre ile laboratuvar koşullarına uyum sağlandıktan sonra her grupta 7 rat olacak şekilde 4 grup oluşturuldu. Gruplar: **i)** Kontrol, **ii)** ASİ; ratlara 15 gün boyunca 25 mg/kg/gün dozunda oral gavaj ile ASİ (Nutrition 21 Inc., Purchase, NY) verildi (24), **iii)** MTX; ratlara 8-12. günler arasında 5 gün boyunca subkutan olarak 0.75 mg/kg dozunda MTX (KOÇAK 50 mg/5 mL enjektabl solüsyon içeren flakon) enjekte edildi (11), **iv)** ASİ+MTX; ratlara 15 gün boyunca 25 mg/kg/gün dozda oral gavaj ile ASİ verildi ve 8-12. günler arasında 5 gün boyunca subkutan olarak 0.75 mg/kg dozunda MTX enjekte edildi. Ratlar deneysel uygulamanın 15. gününde etik yönergelerine uygun biçimde dekapite edilerek kemik ve serum örnekleri elde edildi. Örnekler analiz edilinceye kadar -80°C'de, derin dondurucuda muhafaza edildi. Ayrıca histopatolojik analizler için kemik örnekleri hemen %10'luk formalin ile fikse edildi. Yirmi dört saat sonra formik asit bazlı kemik dekalsifikasyon solüsyonunda 4°C'de yedi gün dekalsifiye edildi ve parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 4 μ m'lik kesitler alınarak hematoksilen ile boyandı.

Laboratuvar Analizleri: Serum AST, ALT, üre ve kreatin konsantrasyonları ticari kitlelerle bir otoanalizör cihazı (Samsung Labgeo PT10, Samsung Electronics Co., Seoul, Kore) kullanılarak belirlendi. Kemik dokusu osteokalsin düzeyleri, rat Osteokalsin/Kemik gla protein ELISA kiti (YL Biotech Co., Ltd., Shanghai, Çin; Katalog No: YLA0302RA) ile ELISA sistemi (Elx-800; Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT, ABD) kullanılarak analiz edildi. NF- κ B, RANKL, OPG, tip 1 kollajen, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α proteinlerinin düzeyleri Western blot analizi ile belirlendi. Tibia dokusu sıvı nitrojen içinde havan ve tokmak ile ince bir toz haline getirildi ve numuneler proteaz inhibitörleri içeren RIPA tamponunda sonikasyon yoluyla homojenize edildi (32). Homojenatlar soğutmalı santrifüjde (+4°C) 15.000 rpm'de 1 saat santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant örneklerin içerisine eşit hacimde sample buffer ilavesi yapıldıktan sonra protein denatürasyonu için örnekler su banyosunda (100°C) 5 dakika bekletildi. Protein konsantrasyonlarının ölçülmesinden sonra, protein numuneleri sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıldı ve nitrosetülöz membranlara (Schleicher ve Schuell Inc, Keene, NH, ABD) aktarıldı. %1'lik siğir serum albumini ile bloke edildikten sonra membranlar, NF- κ B, RANKL, OPG, tip 1 kollajen, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α primer antikorları (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, ABD) ile inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra nitrosetülöz membranlar peroksidadla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünooglobulinle (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, ABD) inkübasyona bırakıldı. Bantların görüntülenmesi için diaminobenzidin (DAB) solüsyonu kullanıldı. Image Analyses System (Image J; National Institute of Health, Bethesda, ABD) yazılım programı kullanılarak bantların rölatif yoğunlukları analiz edildi. Kemik histopatolojisi için her bir deney hayvanından alınan tibia ve femur örnekleri 24 saat süreyle %10 formalinde fikse edildi. Ardından immünokal çözeltide yedi gün boyunca dekalsifikasyon işlemine tabi tutuldu ve parafine gömüldü. Bu işlemten sonra 4 μ m kalınlığa sahip kesitler elde edildi. Kesitler hematoksilin-eozin (H&E) ile boyanarak bir ışık mikroskobu yardımıyla incelendi. Kemikteki histopatolojik değişiklikleri incelemek için trabeküler kalınlık ve osteoklast sayısı ölçüldü (11).

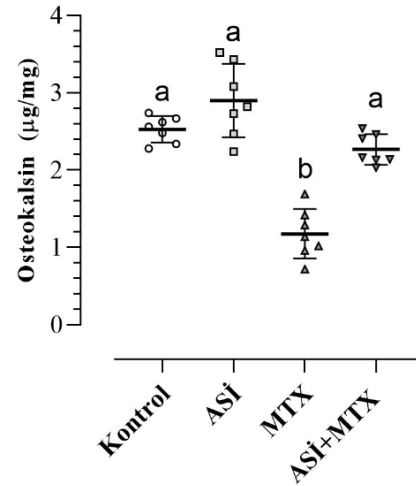
Verilerin analizinde SPSS 21 istatistik paket programı kullanıldı. Veriler normal dağılım gösterdiğinden tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gruplar karşılaştırıldı. Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık P<0.05 olarak kabul edildi (33).

Bulgular

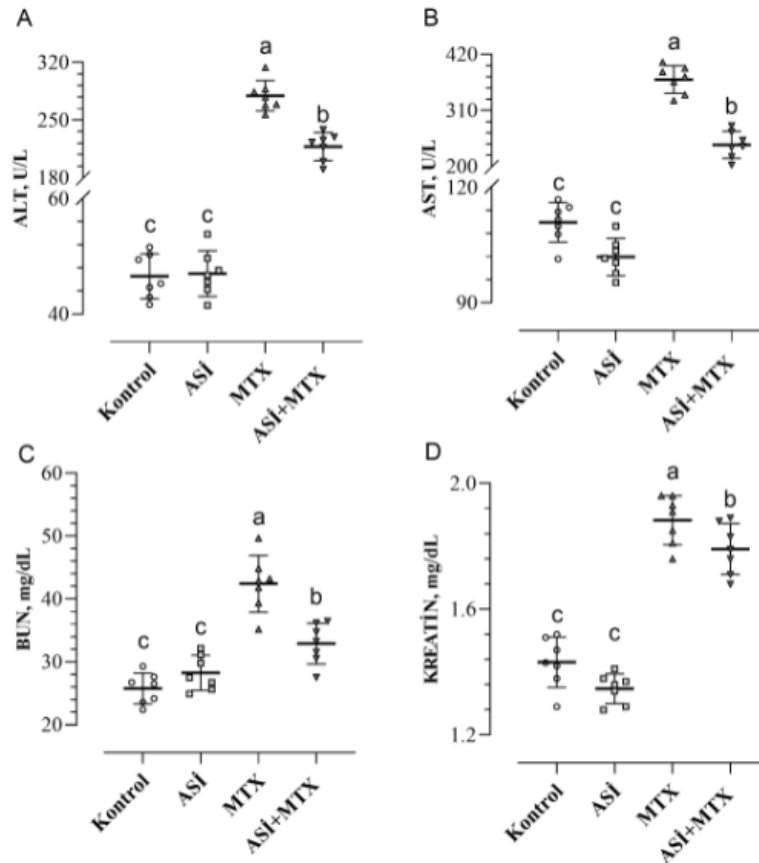
Kemik dokusu osteokalsin düzeyleri Şekil 1'de verilmiştir. Osteokalsin düzeylerine bakıldığında kontrol grubu ile MTX grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0.0001). Bununla birlikte, ASİ takviyesi, MTX grubuna göre kemik osteokalsin konsantrasyonunu önemli ölçüde arttırmıştır (P<0.001). MTX uygulanan ratların serum AST (P<0.0001) ve ALT (P<0.0001) aktiviteleri ile üre (P<0.005) ve kreatin (P<0.001) düzeylerinde artış tespit edilmiştir (Şekil 2). Kontrol ile ASİ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

farklılık gözlenmemiştir ($P>0.05$). ASİ+MTX grubunda AST değerleri MTX grubuna göre azalmış olmakla birlikte, kontrol ve ASİ grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($P<0.001$). MTX grubu ile karşılaştırıldığında ASİ+MTX grubu ALT aktiviteleri azalırken ($P<0.001$) kontrol ve ASİ gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır ($P<0.001$). MTX uygulaması, kontrol ve ASİ gruplarına kıyasla NF- κ B, RANKL, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerini önemli ölçüde artırmış ve kemikteki OPG ve tip-1 kollajeni azaltmıştır (Şekil 3; $P<0.001$). Ancak ASİ takviyesi, ASİ+MTX grubunda NF- κ B, RANKL, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerini azaltmış ve OPG ve tip-1 kollajen düzeylerini artırmıştır ($P<0.01$). Kontrol ile ASİ grupları istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$).

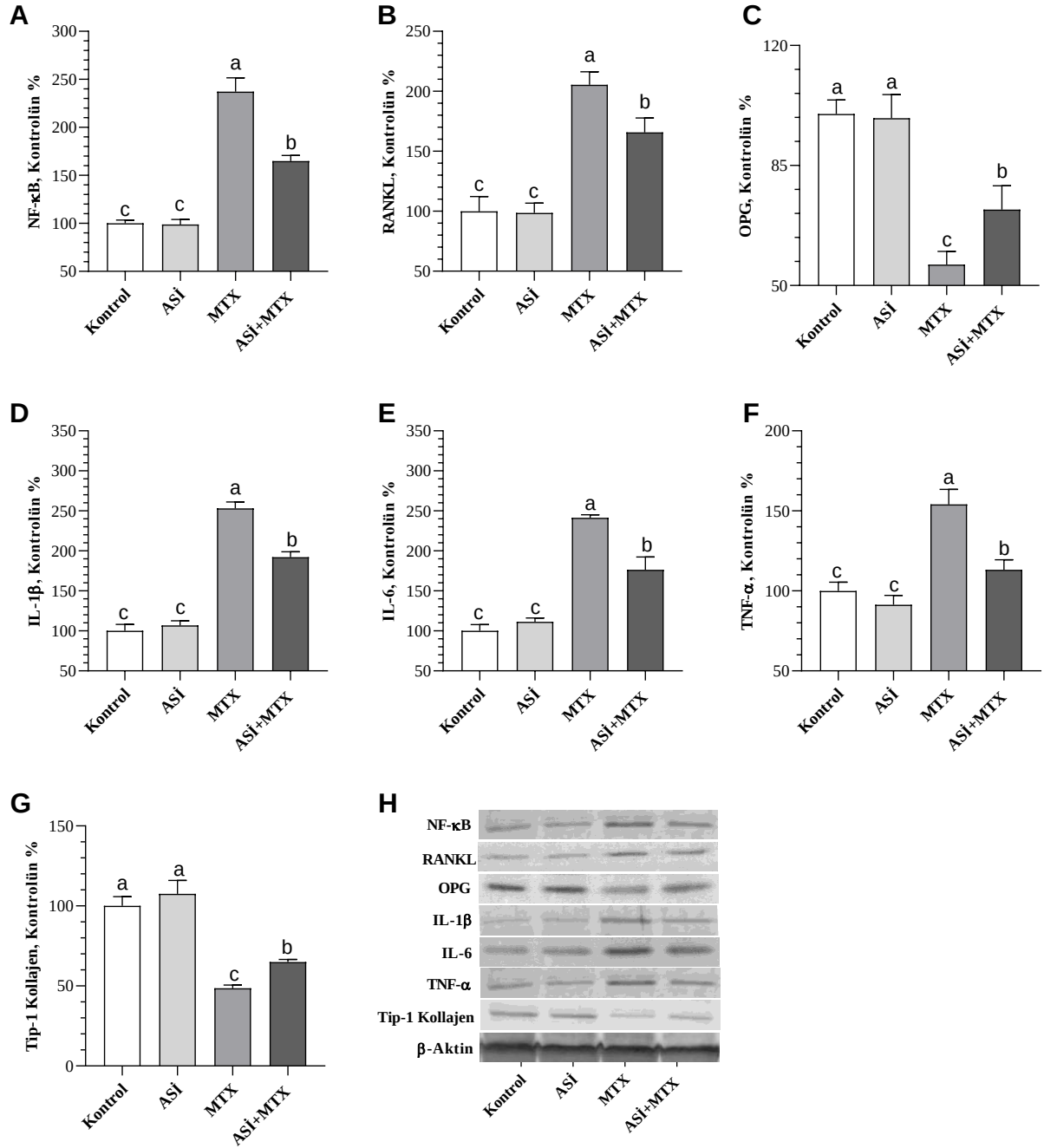
Çalışmada histopatolojik açıdan ASİ'nin olumlu etkileri olduğu görülmüştür. MTX grubu ratların kemik dokularında kemik trabeküllerinde belirgin incelme ve osteoklastlarda önemli artış gözlenmiştir (Şekil 4). ASİ+MTX grubunda, kemik dokularında trabeküller orta derecede incelmış ve osteoklast sayısında orta derecede artış tespit edilmiştir (Şekil 4).



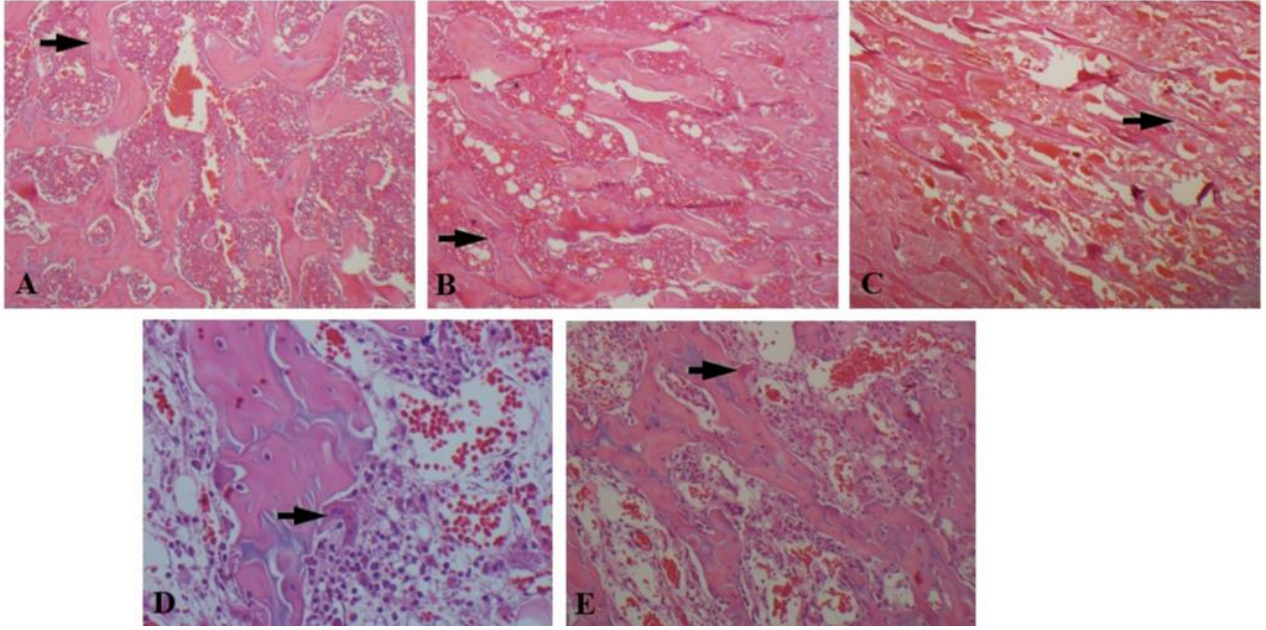
Şekil 1. Metotreksat (MTX) uygulanan ratlarda Arjinin silikat inositol (ASİ) kompleksinin osteokalsin düzeyleri üzerine etkileri. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. Farklı üst simgeler (a-b), grup ortalaması farklılıklarını gösterir ($P<0.05$).



Şekil 2. Metotreksat (MTX) uygulanan ratlarda Arjinin silikat inositol (ASİ) kompleksinin biyokimyasal parametreler üzerine etkileri. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. Farklı üst simgeler (a-c), grup ortalaması farklılıklarını gösterir ($P<0.05$).



Şekil 3. Metotreksat (MTX) uygulanan ratlarda Arjinin silikat inositol (ASI) kompleksinin kemik dokusu; NF-κB (A), RANKL (B), OPG (C), IL-1β (D), IL-6 (E), TNF-α (F), tip-1 kollajen (G) protein düzeyleri üzerindeki etkileri ve Western blot bantları (H). Tüm veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir. Farklı üst simgeler (a-c), grup ortalama farklılıklarını gösterir (P<0.05).



Şekil 4. Grupların kemik histopatolojik görünüşleri: **A.** Kontrol grubu; **B.** ASİ grubu; **C.** MTX grubu: kemik trabeküllerinde belirgin incelme (ok); **D.** MTX grubunun osteoklast oluşumu (ok); **E.** ASİ+MTX grubu: osteoklast sayısında azalma (ok) (H&E, x200).

Tartışma

Bu çalışma, MTX uygulanan ratlarda ASİ'nin serum AST, ALT, üre ve kreatin düzeyleri ile kemik dokusu osteokalsin, NF- κ B, RANKL, OPG, tip 1 kollajen, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α protein düzeyleri üzerine olan etkilerini değerlendirmek üzere tasarlanmıştır. Kemoterapi kanser tedavisinde ilk etapta düşünülen tedavi seçeneğidir (34, 35). Ancak kemoterapötik ajanlar, kemik dokusunda hasarlara neden olur (11). Deneysel araştırmalar bir kemoterapötik ajan olan MTX kullanımının kemik büyümesini azalttığı ve osteoklast aktivitesini artırdığı bilinmektedir (2, 4, 8, 11). Yan etkilere rağmen, MTX'in yan etkilerini azaltmak için kullanılan spesifik bir tedavi yoktur. Kemoterapötik ajanların yan etkilerinin azaltılması üzerine son yıllarda çok sayıda araştırma yapılmıştır (11, 23, 36). ASİ kompleksi, arginin, silikon ve inositolün bir karışımıdır. Argininin memelilerde immünolojik fonksiyonlar üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (37). Silikonun çeşitli rolleri, büyük ölçüde deneysel çalışmalara dayalı olarak tanımlanmıştır (38). Doğada bol miktarda bulunan bir eser mineral olan silikonun daha güçlü kemikler ve daha esnek eklemler için gerekli bir bileşen olduğu kanıtlanmıştır (39). Silikonun kemik dokusunda kalsiyum ve fosfor birikimi için düzenleyici bir faktör olarak hareket ettiği sonucuna varılmıştır (39). Son araştırmalar (28, 40), diyetdeki arginin ve silikonun uzun kemiklerin gelişimi, büyümesi ve modellenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenir ve plazma konsantrasyonu, kemik oluşum hızı ile korelidir (41). Yapılan çalışmalarda (17, 22, 36), osteokalsinin, MTX ile tedavi edilen ratlarda kontrol grubuna kıyasla arttığı görülmüştür. Çalışmada osteokalsin düzeyinin kontrol grubuna göre MTX grubunda bir düşüş gösterdiği, ancak ASİ+MTX

grubunda MTX grubuna göre ise artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 1). MTX'in kemoterapötik etkilerinin yanısıra, karaciğer, böbrek ve kemik iliği üzerine ciddi yan etkileri vardır (42). Yapılan çalışmalar (42-44), MTX'in serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimi sonucunda serum AST ve ALT düzeylerinde artış meydana geldiğini ortaya koymuştur. Çalışmada, MTX uygulanan ratların serum örneklerindeki AST ve ALT aktivitelerinde kontrol grubuna göre artış olduğu görülmüştür. ASİ+MTX grubunda ise AST ve ALT aktivitelerinde azalma görülmüştür (Şekil 2). MTX aracılı nefrotoksitenin, antioksidan tedaviyle azaldığı bildirilmiştir (45). Çalışmada MTX verilen ratlarda üre ve kreatin seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı ve ASİ+MTX grubunda ise azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 2).

Yapılan bir çalışmada (46) MTX uygulanan ratlarda muhtemel kemik oluşum mekanizmasının, yüksek hidrojen peroksit ve lipit peroksidasyonu ve azaltılmış antioksidan enzim aktiviteleri ile üretilen oksidatif strese bağlı olarak etkilendiğini gösterilmiştir. Başka bir çalışmada (47), TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinler, büyüme ve transkripsiyon faktörleri gibi çoklu mekanizmaların kemik rezorpsiyonu ve yoğunluğu üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak RANKL, kemik rezorpsiyondan sorumludur (48). RANKL osteoblastlar ve osteositler tarafından salgılanır ve osteoklastlar ve osteoklast öncülleri üzerinde eksprese edilen RANK'ın reseptör aktivatörüne bağlanarak osteoklastların farklılaşmasını ve aktivitesini düzenler. OPG RANKL'ın RANK ile etkileşimini bağlayıp inhibe edebilen çözünebilir bir reseptördür (49). Daha önceki çalışmalar (10, 22), MTX'in kanda ve kemikte osteoklast yoğunluğunu artırdığını göstermiştir. Tip 1 kollajen, kemik ekstraselüler matriksinin en önemli

bileşenlerinden biridir ve kemik kollajenin yaklaşık %95'ini ve toplam kemik proteinlerinin yaklaşık %80'ini temsil eder (50). Yapılan bir çalışmada (51), MTX tedavisinin tip 1 kollajeni önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Çalışmada MTX uygulamasının, kontrol ve ASI gruplarına kıyasla NF- κ B, RANKL, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerini arttırdığı ve kemikteki OPG ve tip-1 kollajeni azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 3). Ayrıca ASI takviyesinin, MTX grubunda NF- κ B, RANKL, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerini azalttığı ve OPG ve tip-1 kollajen düzeylerini arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 3). Histolojik bulgular, bu çalışmanın diğer sonuçlarıyla benzer şekilde tutarlıdır. Daha önceki çalışmalarla (10, 11) uyumlu olarak, MTX grubunda trabeküler kalınlıkta azalma,

osteoklast sayısı ve intratrabeküler alanda artma görülmektedir (Şekil 4). ASI+MTX grubunda ise trabeküller kısmi olarak incelmış ve osteoklast sayısında kısmi artış tespit edilmiştir (Şekil 4). Bununla birlikte, mevcut bulgular, muhtemelen inflamasyonu ve oksidatif stres artışını azaltarak ASI'nin kemikteki MTX toksisitesine karşı koruyucu etkisini doğrulamaktadır.

Sonuç olarak, ASI'nin ratlarda MTX uygulamasını takiben oluşabilecek bir kemik hasarında, osteokalsin ve NF- κ B, RANKL, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerini azaltarak ve OPG ve tip-1 kollajen proteinlerinin modülasyonunu düzenleyerek MTX'in olumsuz etkilerini azaltılabileceği tespit edilmiştir.

Kaynaklar

- Chen J, Chen X, Yang Z, et al. Preparation and characterization of folic acid functionalized bioactive glass for targeted delivery and sustained release of methotrexate. *J Biomed Mater Res A* 2018; 1: 1-11.
- Fan C, Cool JC, Scherer MA, et al. Damaging effects of chronic low-dose methotrexate usage on primary bone formation in young rats and potential protective effects of folic acid supplementary treatment. *Bone* 2009; 44: 61-70.
- Fan C, Foster BK, Hui SK et al. Prevention of bone growth defects, increased bone resorption and marrow adiposity with folic acid in rats receiving long-term methotrexate. *PLoS One* 2012; 7: e46915.
- Fan C, Garcia M, Scherer M, et al. Potential roles of metallothioneins I and II in protecting bone growth following acute methotrexate chemotherapy. *J Chemotherapy* 2014; 26: 37-48.
- Gao Q, Zhou G, Lin SJ, et al. How chemotherapy and radiotherapy damage the tissue: comparative biology lessons from feather and hair models. *Exp Dermatol* 2018; 1: 1-18.
- Athanassiadou F, Tragiannidis A, Rousso I, et al. Bone mineral density in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Turk J Pediatr* 2006; 48: 101-104.
- Brufsky AM. Cancer treatment-induced bone loss: Pathophysiology and clinical perspectives. *The Oncologist* 2008; 13: 187-195.
- Fan J, Su YW, Hassanshahi MH, et al. β -Catenin signaling is important for osteogenesis and hematopoiesis recovery following methotrexate chemotherapy in rats. *J Cell Physiol* 2021; 236: 3740-3751.
- Nadhanan RR, Fan CM, Su YW, et al. Fish oil in comparison to folic acid for protection against adverse effects of methotrexate chemotherapy on bone. *J Orthop Res* 2014; 32: 587-596.
- King TJ, Georgiou KR, Cool JC, et al. Methotrexate chemotherapy promotes osteoclast formation in the long bone of rats via increased pro-inflammatory cytokines and enhanced nf-kappab activation. *Am J Pathol* 2012; 181: 121-129.
- King TJ, Shandala T, Lee AM, et al. Potential effects of phytoestrogen genistein in modulating acute methotrexate chemotherapy-induced osteoclastogenesis and bone damage in rats. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 18293-18311.
- Al Maruf A, O'Brien PJ, Naserzadeh P, et al. Methotrexate induced mitochondrial injury and cytochrome c release in rat liver hepatocytes. *Drug and Chem Toxicol* 2017; 1: 1-11.
- Crofton PM, Ahmed SF, Wade JC, et al. Effects of intensive chemotherapy on bone and collagen turnover and the growth hormone axis in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3121-3129.
- Crofton PM, Ahmed SF, Wade JC, et al. Bone turnover and growth during and after continuing chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Res* 2000; 48: 490-496.
- Georgiou KR, Hui SK, Xian CJ. Regulatory pathways associated with bone loss and bone marrow adiposity caused by aging, chemotherapy, glucocorticoid therapy and radiotherapy. *Am J Stem Cells* 2012; 1: 205-224.
- Georgiou KR, King TJ, Scherer MA, et al. Attenuated Wnt/ β -catenin signalling mediates methotrexate chemotherapy-induced bone loss and marrow adiposity in rats. *Bone* 2012; 50: 1223-1233.
- Georgiou KR, Scherer MA, Fan CM, et al. Methotrexate chemotherapy reduces osteogenesis but increases adipogenesis potential in the bone marrow. *J Cell Physiol* 2012; 227: 909-918.
- Garg A, Leitzel K, Ali S, et al. Antiresorptive therapy in the management of cancer treatment-induced bone loss. *Curr Osteoporos Rep* 2015; 13: 73-77.
- Boquete-Castro A, Gomez-Moreno G, Calvo-Guirado JL, et al. Denosumab and osteonecrosis of the jaw. A systematic analysis of events reported in clinical trials. *Clin Oral Implants Res* 2015; 27: 367-375.
- Domschke C, Schuetz F. Side effects of bone-targeted therapies in advanced breast cancer. *Breast Care* 2014; 9: 332-336.
- Raghu Nadhanan R, Skinner J, Chung R, et al. Supplementation with fish oil and genistein, individually or in combination, protects bone against the adverse effects of methotrexate chemotherapy in rats. *PLoS One* 2013; 8: e71592.
- Xian CJ, Cool JC, Scherer MA, et al. Folic acid attenuates methotrexate chemotherapy-induced damages on bone growth mechanisms and pools of bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 2008; 214: 777-785.

23. Liao GS, Apaya MK, Shyur, LF. Herbal medicine and acupuncture for breast cancer palliative care and adjuvant therapy. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 1-17.
24. Sahin K, Ojalvo SP, Akdemir F, et al. Effect of inositol - stabilized arginine silicate on arthritis in a rat model. *Food Chem Toxicol* 2019; 125: 242-251.
25. Bellati U, Liberati M. Experience regarding the use of arginine-lysine-lactose treatment in menopausal osteoporosis. *Minerva Med* 1994; 85: 327-332.
26. Clementi G, Fiore CE, Mangano NG, et al. Role of soy diet and L-arginine in cyclosporin-A-induced osteopenia in rats. *Pharmacol Toxicol* 2001; 88: 16-19.
27. Jugdaohsingh R. Silicon and bone health. *J Nutr Health Aging* 2007; 11: 99-110.
28. Seaborn CD, Nielsen FH. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. *Biol Trace Elem Res*, 2002; 89: 251-261.
29. Juturu V, Ferry D, Komorowski JR. United States Patent: Arginine silicate inositol complex and use thereof. United States Patent, 2009.
30. Sahin K, Onderci M, Sahin N, et al. Dietary arginine silicate inositol complex improves bone mineralization in quail. *Poult Sci* 2006; 85: 486-492.
31. Onderci M, Sahin N, Sahin K, et al. Dietary arginine silicate inositol complex during the late laying period of quail at different environmental temperatures. *Br Poult Sci* 2006; 47: 209-215.
32. Erten F, Tuzcu M, Orhan C, et al. Mango ginger supplementation may protect bone damage induced by methotrexate in rats. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 2019; 76: 305-312.
33. Hair JF, Black WC, Babin BJ, et al. *Multivariate Data Analysis*. 7th Edition, Prentice Hall: Pearson Education Upper Saddle River, 2014.
34. Corrie PG. Cytotoxic chemotherapy: Clinical aspects. *Medicine* 2008; 36: 24-28.
35. Verweij J, de Jonge MJA. Achievements and future of chemotherapy. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1479-1487.
36. Lee AMC, Shandala T, Soo PP, et al. Effects of resveratrol supplementation on methotrexate chemotherapy-induced bone loss. *Nutrients* 2017; 9: 1-15.
37. Park KG. The immunological and metabolic effects of L-arginine in human cancer. *Proc Nutr Soc* 1993;52:387-401.
38. Schwarz K, Milne DB. Growth promoting effects of silicon in rats. *Nature* 1972; 239: 333-334.
39. Carlisle EM. Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science* 1970; 167: 279-780.
40. Proctor SD, Kelly SE, Vine DF. Metabolic effects of a novel silicate inositol complex of the nitric oxide precursor arginine in the obese insulin-resistant JCR: LA-cp rat. *Metabolism* 2007; 56: 1318-1325.
41. Sahin N, Onderci M, Balci TA, et al. The effect of soy isoflavones on egg quality and bone mineralisation during the late laying period of quail. *Br Poult Sci*, 2007; 48: 363-369.
42. Armagan I, Bayram D, Candan IA, et al. Effects of pentoxifylline and alpha lipoic acid on methotrexate-induced damage in liver and kidney of rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol* 2015; 39: 1122-1131.
43. Ali N, Rashid S, Nafees S, et al. Protective effect of chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: an experimental approach. *Chem Biol Interact* 2017; 272: 80-91.
44. Mehrzadi S, Fatemi I, Esmaeilzadeh M, et al. Hepatoprotective effect of berberine against methotrexate induced liver toxicity in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; 97: 233-239.
45. Lin Y, Sheng M, Weng Y, et al. Berberine protects against ischemia/reperfusion injury after orthotopic liver transplantation via activating Sirt1/FoxO3alpha induced autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 483: 885-891.
46. Hussan F, Ibraheem NG, Kamarudin TA, et al. Curcumin protects against ovariectomy-induced bone changes in rat model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 1-7.
47. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005; 115: 3318-3325.
48. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342.
49. Rachner TD, Kasimir-Bauer S, Göbel A., et al. Prognostic value of RANKL/OPG serum levels and disseminated tumor cells in non-metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2018; 1: 1-22.
50. Russo C, Lazzaro V, Gazzaruso C, et al. Proinsulin C-peptide modulates the expression of ERK1/2, type I collagen and RANKL in human osteoblast-like cells (Saos-2). *Molecular and Cellular Endocrinology* 2017; 442: 134-141.
51. Nabai L, Kilani RT, Aminuddin F, et al. Methotrexate modulates the expression of MMP-1 and type 1 collagen in dermal fibroblast. *Mol Cell Biochem* 2015; 409: 213-224.