

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

**RATLARDA METHOTREKSATA BAĞLI KARACİĞER  
TOKSİSİTESİNDE LEFLUNOMİDİN MUHTEMEL KORUYUCU  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI: DENEYSEL BİR ÇALIŞMA**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**DR. UFUK KUTLUANA**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. NADİR YÖNETCİ**

**DENİZLİ-2009**

**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

**RATLARDA METHOTREKSATA BAĞLI KARACİĞER  
TOKSİSİTESİNDE LEFLUNOMİDİN MUHTEMEL KORUYUCU  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI: DENEYSEL BİR ÇALIŞMA**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**DR. UFUK KUTLUANA**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. NADİR YÖNETCİ**

**DENİZLİ-2009**

## TEŐEKKÜR SAYFASI

Tüm çabalarım rahmetle andığım rahmetli babam Dr. Yaşar Kutluana'ya yakışır bir evlat olabilmek için...

Öncelikle beni bugünlere getiren biricik anneme, benden anlayış ve fedakarlığı esirgemeyen eşime, huzur ve mutluluk kaynağım kızlarım Ecem ve Nehir'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Bilgi ve deneyimlerini bana aktaran tez danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nadir Yönetci'ye teşekkürlerimi sunarım. Desteğini benden esirgemeyen Doç. Dr. Mustafa Yılmaz'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamızın histopatolojik değerlendirmesinde her türlü desteği sağlayan Prof. Dr. Neşe Çallı Demirkan'a, biyokimyasal işlemlerimizi gerçekleştiren Prof. Dr. Bünyamin Kaptanoğlu'na, istatistik konusunda Yard. Doç. Dr. Beyza Akdağ'a teşekkürlerimi sunarım. Deney Hayvanları Laboratuvarı Sorumlusu Barbaros Şahin'e ve genç meslektaşım Dr. Selma Dinçer Tekekoğlu'na da teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

<b>GİRİŞ</b> .....	8
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	10
<b>METHOTREKSAT</b> .....	10
Etki Mekanizması.....	10
Farmakolojik Özellikleri.....	11
Kullanım İndikasyonları.....	11
Kullanım Şekli ve Dozu.....	11
Emilim ve Dağılım.....	13
Toksosite.....	13
<b>KARACİĞER</b> .....	14
Karaciğerin Gelişimi.....	14
Karaciğerin Fonksiyonel Anatomisi.....	15
Karaciğerin Görevleri.....	17
<b>METHOTREKSATA BAĞLI TOKSİK KARACİĞER HASARI</b> .....	19
<b>LEFLUNOMİD</b> .....	21
Etki Mekanizması.....	21
Farmakolojik Özellikleri.....	22
Kullanım İndikasyonları.....	23
Kullanım Şekli ve Dozu.....	23
Toksosite.....	23
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	25
<b>BULGULAR</b> .....	30
<b>TARTIŞMA</b> .....	35
<b>SONUÇLAR</b> .....	46
<b>ÖZET</b> .....	47
<b>YABANCI DİL ÖZETİ</b> .....	49
<b>KAYNAKLAR</b> .....	51

## TABLÖLAR ÇİZELGESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo-1</b> Karaciğer oksidatif hasarında semikantitatif skörlama sisteminde kullanılan kriterler ve derecelendirme .....	28
<b>Tablo -2</b> Methotreksata bağlı karaciğer hasarında Roenigk Sınıflaması..	28
<b>Tablo -3</b> Çalışma gruplarında biyokimyasal ve histopatolojik sonuçlar.	33

## ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil-1</b> Methotreksatın yapısal formülü.....	10
<b>Şekil-2</b> Karaciğer ve komşu organları.....	15
<b>Şekil-3</b> Leflunomidin yapısal formülü.....	21
<b>Şekil-4</b> Roenigk Sınıflaması'na göre gruptaki evre farklılıkları.....	34
<b>Şekil-5</b> Kupffer hücre aktivasyonu üzerine leflunomidin etkisi.....	41
<b>Şekil-6</b> Semikantitatif skorlar üzerine leflunomidin etkisi.....	42

## KISALTMALAR

MTX	Methotreksat
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ROÜ	Reaktif oksijen ürünleri
NADP	Nikotin amid adenozin difosfat
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
TNF	Tümör nekrozitan faktör
RNA	Ribo nükleik asit
ATP	Adenozin trifosfat
NSAİİ	Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç
BOS	Beyin omurilik sıvısı
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
UGT	Üridin difosfat glukuronosil transferaz
FDA	Food and Drug Administration
DHODH	Dihidroorotat dehidrogenaz
rUMP	Ribonükleotid üridin monofosfat
IFN-γ	İnterferon gama
IL	İnterlokin
TFMA	Triflorometilalanin
DMARD	Hastalık modifiye edici anti romatizmal ilaç
AETNA	USA-based healthcare claims database
GİS	Gastrointestinal sistem
CMC	Karboksi metil selüloz
AST	Aspartat aminotransferaz
ALT	Alanin aminotransferaz
ALP	Alkalen fosfataz
MDA	Malondialdehid
SOD	Süperoksit dismutaz
MPO	Myeloperoksidaz
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

ICAM-1	İntrasellüler adezyon molekülü 1
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü 1
MHC	Major histokompatibilite kompleksi
İκB	İnhibitör kapa B
İKK	İ kappa B kinaz
CO2	Karbondioksit
HE	Hematoksilen eosin
IM	İntra muskuler
IV	İntra venöz
NO	Nitrik oksit



## GİRİŞ

Methotreksat (MTX) bir folik asit antagonisti olup 40 yılı aşkın bir süredir romatoid artrit, psöryazis, neoplazmalar, lösemiler ve bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (1, 2). Günümüzde sarkoidoz, inflamatuvar barsak hastalıkları ve vaskülitlerin tedavisinde de kullanılmaktadır (3, 4, 5). MTX bir dihidrofolik asit analogudur. Dihidrofolik asit redüktaz enzimini inhibe ederek pürin, pirimidin, deoksiribo nükleik asit (DNA) sentezini engeller ve apoptozise yol açar (6). İlaç ve diğer kimyasal ajanlara bağlı karaciğer hasarı akut ve kronik hepatit, safra yolu anomalileri, siroz ve neoplazmalar gibi geniş bir spektruma sahip karaciğer hastalıklarının %5'ini oluşturur (7). MTX'in düşük dozlarında bile görülebilen önemli bir yan etkisi hepatik fibrozis ve sirozdur. Psöryazis hastalarında düşük doz MTX kullanımında %7 siroz gelişebileceği bildirilmiştir (8). MTX'in klinik pratikteki geniş kullanım alanı nedeniyle ajanın karaciğer toksisitesi daha da önem kazanmaktadır.

MTX'in uzun süreli kullanımı ilacın poliglutamat formlarının karaciğerde birikimine ve sonuç olarak hepatosit nekrozuna yol açar (9). MTX reaktif oksijen ürünlerini (ROÜ) inhibe etmek için kullanılan önemli sitozolik antioksidanlar olan nikotin amid adenosin difosfat (NADP) dehidrojenaz ve NADP malik enzimlerini inhibe eder. MTX glutasyon düzeylerini azaltarak hepatositleri ROÜ'ne karşı daha hassas ve korumasız bırakır (10, 11, 12, 13, 14). Günümüzde MTX'e bağlı karaciğer hasarı ile ilgili yapılan çalışmalar apoptozis, proapoptotik gen ve faktörler üzerine yoğunlaşmıştır (15, 16).

Leflunomid (HWA-486) antiinflamatuvar, antiproliferatif ve immünmodülatör etkileri olan bir ajandır. Leflunomid romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde ve transplant rejeksiyonunun engellenmesinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar leflunomidin aktif formu olan A77 1726'nın nükleer faktör kapa B (NF-κB) aktivasyonunun potent bir inhibitörü olduğunu göstermiştir (17). Manna ve arkadaşlarının çalışmasında leflunomidin tümör nekrozitan faktör (TNF)'e bağlı ROÜ üretimini, lipid peroksidasyonunu, TNF tarafından indüklenen sitotoksisiteyi ve kaspaz aktivasyonunu engellediği saptanmıştır. Manna leflunomidin NF-κB ve

TNF ile ilişkili çeşitli hücrel yanıtı baskılaması nedeniyle karaciğer ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkisi olabileceğini bildirmiştir (18). Yao ve arkadaşlarının çalışmasında ratlarda CCl4 veya immünolojik yolla oluşturulan karaciğer hasarında leflunomidin proinflamatuvar sitokin düzeyinde azalma, malondialdehid (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeylerinde azalma ve antioksidan aktivitede artışa yol açtığı saptanmıştır (19). Karaman ve arkadaşları leflunomidin biliyer obstrüksiyonlu ratlardaki karaciğer hasarını iyileştirdiğini saptamışlardır (20).

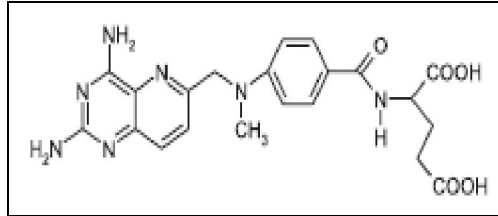
Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı ratlarda MTX ile oluşturulan toksik karaciğer hasarında leflunomidin muhtemel koruyucu etkisinin araştırılmasıdır.

## GENEL BİLGİLER

### METHOTREKSAT

MTX özellikle neoplazmalarda kullanılan, folik asiti antagonize eden ve DNA fonksiyonlarını etkileyen bir antimetabolittir. Antimetabolitler yapısal olarak pürin ya da pirimidinlere benzerler. Pürin ve pirimidin biyosentezinde görevli enzimleri bloke ederek DNA sentezini inhibe ederler. Hücre üzerinde en büyük toksisitesi S fazında oluşur ve toksisite derecesi maruz kalınan süre ile artar (21) .

Folik asit antagonistlerinin ilk defa Farber ve arkadaşları tarafından 1948’de tanımlanmasıyla kanser kemoterapisinde yeni bir dönem açılmıştır. Klinikte şimdiye kadar birçok folat analogu kullanılmıştır ancak MTX en yaygın kullanılanıdır ve MTX sodyum, MTX LPF, rheumatrex, amethopterin ve NSC-740 olarak da bilinir. Kimyasal olarak folik asitin 4-amino,N<sup>10</sup>-metil analogudur. Kimyasal MTX N-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridinyl)methylamino]benzoyl]-L-glutamic acid’dir (22). Şekil 1’de MTX’in yapısal formülü görülmektedir.



Şekil - 1 Methotreksatın yapısal formülü

Delfino RT, Filho OA, Villar JD. Type 2 Antifolates in the Chemotherapy of falciparum Malaria. J Braz Chem Soc 2002;13: 727-741.

### Etki Mekanizması

Folik asitin organizma için yararlı şekli folinik asit ve diğer tetrahidrofolat türevi koenzimlerdir. Bu koenzimler timidilatın, purinlerin, metionin ve glisinin sentezinde rol oynayan tek karbon transferi reaksiyonları için gereklidir. Folik asitin dihidrofolik asit üzerinden tetrahidrofolik asite dönüşmesi için dihidrofolik asit redüktaz enzimi gereklidir. MTX dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder (21). Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu timidilat ve purin nükleotidlerinin (adenin ve guanin) biyosentezinin durmasına yol açar. Bu yapı taşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve ribo nükleik asit (RNA) sentezini ve enerji üretimi için gerekli adenozin trifosfat (ATP) üretimini inhibe eder. Ayrıca

tetrahidrofolik asite dönüşmeden kalan dihidrofolik asit poliglutamam formaları şeklinde, MTX'e bağlı poliglutamam türevleri ile birlikte toksik inhibitör metabolitler şeklinde birikir. Timidilat sentazın ve purin sentezinde rol oynayan transformilaz enzimlerinin inhibisyonu, MTX'in kendisinden çok adı geçen iki poliglutamam metaboliti tarafından yapılır (23).

### **Farmakolojik zellikler**

MTX oral veya parenteral verilebilir. Oral biyoyararlanımı 10 mg'a kadar düşük dozlarda göreceli olarak yüksektir, yüksek dozlarda ise düşüktür. Bu nedenle 25 mg/hafta ve üzerindeki yüksek dozlara cevap vermeyen olgularda parenteral uygulama düşünülebilir. MTX romatoid artritli olgularda haftada bir uygulanır. Doz 7.5 mg/ hafta ile başlanır ve 25-30 mg/hafta'ya kadar yükseltilir. Toksikiteyi önlemek için folik asit veya folinik asit eklenir. MTX karaciğerde aktif poliglutamam ve inaktif 7-hidroksi methotreksat formlarına metabolize olur ve yaklaşık %60'ı albümine bağlanır. Eliminasyon yarı ömrü dozla artar ve 3-15 saat arasında değişir. MTX ve metabolitleri başlıca glomerüler filtrasyon ve proksimal tübüler sekresyonla atılır. Renal fonksiyonları etkileyen ilaçlar ile birlikte verildiğinde dikkatli olunmalıdır (24). Probenesid MTX'in tübüler sekresyonunu inhibe ettiği için kontrendikedir. Albümine daha yüksek afinite ile bağlanan aspirin, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ve sülfonamidler MTX'in serbest düzeyini artırır. Yüksek doz MTX ile birlikte NSAİİ kullanımı toksik ve sakıncalı olabilir (25).

### **Kullanım İndikasyonları**

MTX lösemi ve malignensilerde kemoterapötik ajan olarak ilk kez 1940'lı yıllarda kullanılmaya başlanmıştır (26). 1952'de psöryazis olgularında etkinliği saptanmıştır (27). Romatoid artrit ve diğer romatizmal hastalıkların tedavisinde yaygın ve etkin olarak kullanılmaktadır (28). MTX günümüzde sarkoidoz, refrakter inflamatuvar barsak hastalıkları ve vaskülitlerin tedavisinde de kullanılmaktadır (3, 4, 5).

### **Kullanım şekli ve Dozu**

MTX başlıca üç şekilde kullanılır:

1. Oral veya parenteral olarak verilen standart dozlarda
2. İntratekal uygulama ile
3. Lökoverin ile birlikte çok yüksek dozlarda

*1. Standart doz tedavisi:* Standart dozdaki sistemik MTX akut lösemi, gebelik trofoblastik neoplazisi, mukozis fungoides, meme kanseri, baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılır. Akut lenfositik lösemninin idame tedavisinde 5-25 mg/m<sup>2</sup> düşük dozda oral verilir. Haftada 2 kez 25 mg/m<sup>2</sup> intra muskuler (İM) veya intra venöz (İV) injeksiyon suretiyle de verilebilir. Aynı amaçla ayda 1- 2 gün 175-525 mg/m<sup>2</sup> dozunda İM verilebilir. Ağır psöriyaziste immünsupresif olarak haftada 5 gün oral yolla günde toplam 2.5 mg gibi düşük dozda veya haftada bir 10-25 mg İV verilir. Koryokarsinomaya karşı gün aşırı 1 mg/kg İM dört doz şeklinde enjekte edilir ve bu uygulama 3 haftada bir tekrarlanır. Ayrıca romatizmanın şiddetini azaltmak için de bu doz uygulanır (29).

*2. İntratekal Tedavi:* MTX menenjiyal lösemi veya lenfomaların profilaksisi ve tedavisi, menenjiyal karsinomatozisin tedavisi için 12 mg/m<sup>2</sup> (maksimum 15 mg/m<sup>2</sup> ) intratekal injekte edilir. Uygulama beyin omurilik sıvısında (BOS) tümör hücresi kaybolana kadar 2-5 günde bir tekrarlanır ve BOS tümörden temizlendiğinde de iki doz pekiştirme uygulaması yapılır (22).

*3. Yüksek doz kullanımı:* Osteosarkom, çocukluk çağı lösemileri, Hodgkin dışı lenfomalar gibi neoplazmlarda kalsiyum folinatla birlikte yüksek dozlarda kullanılır. Bu uygulamada 100-12.000 mg/m<sup>2</sup> dozda, 10-60 dakika süren İV infüzyonla, 3 haftada bir verilir. İnfüzyonun tamamlanmasından sonra 15 mg/m<sup>2</sup> kalsiyum folinat ağızdan 6 saatte bir 8 veya 10 kez verilir. Yüksek doz MTX ciddi nefrotoksik etki gösterdiği için uygulamadan önce hasta hidrate edilmeli ve idrar alkalileştirilmelidir. Kalsiyum folinat gün aşırı 0.1 mg/kg İM gibi daha küçük dozda MTX'in düşük dozları ile yapılan uygulamalarda da toksisiteyi azaltmak için kullanılabilir (22).

## **Emilim ve Dağılım**

MTX oral yolla 10 mg/m<sup>2</sup> gibi mutad dozda verildiğinde tama yakın bir oranda emilir. Plazma proteinlerine %50 gibi düşük bir oranda ve zayıf bir şekilde bağlanır. Sulfonamidler ve salisilatlarla birlikte verilir ise bağlanma oranı azalır ve MTX'in toksisitesi artabilir. MTX tümör hücrelerine, hepatositlere ve böbrek hücrelerine uzun süre bağlı kalır. Tümör hücrelerindeki bu durumun tedavi yönünden değeri vardır. Antimetabolitler istirahat halindeki hücrelerde sitotoksik etki yapmazlar. Fakat bu durumdaki hücrede uzun süre kalan MTX'in latent sitotoksik etkisi vardır. Hücre bölünmeye başladığı zaman bu etki belirgin hale geçer ve hücreyi öldürür. Standart doz uygulamalarında sinir sistemine ve BOS'a giremez. Menenjiyal tutulum yapan tümörlerde tedavi için intratekal verilmesi gerekir. MTX %90 oranında böbreklerden elimine edilir ve eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 8 saattir (30).

## **Toksisite**

MTX'in sitotoksik etkisi kanser hücrelerine selektif değildir. Bu nedenle yüksek proliferasyon özelliği gösteren hemopoetik sistem, kemik iliği ve gastrointestinal sistem mukozası gibi normal dokularda MTX'e bağlı toksisite görülür. MTX'e bağlı ince barsak hasarı malabsorbsiyon ve ishale yol açar (31).

Kemik iliği supresyonu yüksek doz MTX tedavisinin toksisitelerinden biridir. Nötropeni dozla ilişkilidir ve MTX ile tedavinin 7. ve 14. günleri arasında oluşur. Ondörtüncü ve 21. günler arasında normale döner. Trombositopeni genellikle nötropeniye paralel oluşur. Nadiren immün hemolitik anemi oluşabilir (22).

Ağız mukozasının etkilenmesiyle oluşan stomatit bazen tedavinin kesilmesini gerektirebilir. Yüksek dozlarda konjunktivit tarzında mukozitler görülebilir (32).

Doza bağlı olmaksızın akciğer hasarı ve interstisyel pnömonitis görülebilir. Bu tablo dispne, hipoksi ve akciğer grafisinde infiltrasyonlarla karakterizedir. Bu durumda MTX tedavisi kesilmelidir (33). Yüksek dozlarda nefrotoksisite, akut tubuler nekroz ve proteinüri gelişebilir (34).

Anaflaksi, vaskülit, kortikal körlük, lökoensefalopati, osteoporoz, oligospermi ve menstrual bozukluklar MTX'in nadir toksisiteleri arasındadır (22).

MTX'in bilinen en önemli yan etkilerinden biri de karaciğer toksisitesidir. MTX'e bağlı karaciğer toksisitesi ilerleyici fibrozis ve sirozla birliktelik gösterebilir (35). MTX'e bağlı karaciğer toksisitesi ayrı bir başlık altında anlatılacaktır.

## **KARACİĞER**

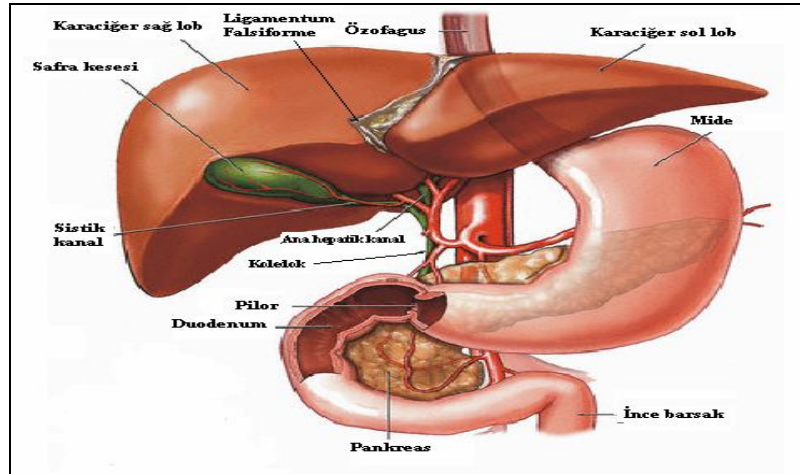
### **Karaciğerin Gelişimi**

Karaciğer gelişimi embriyonun 4. haftasının ilk günlerinde başlar. Ventral bölgede dışarıya doğru çıkıntı oluşturan karaciğer tomurcuğu ilk bu dönemde oluşur. Daha sonra hepatic divertikulum adını alan karaciğer tomurcuğu septum transversum hızlı proliferasyon gösteren hücre dizileri ile penetre eder. Karaciğer tomurcuğu ve ön barsak arasındaki bağlantının daralmasıyla safra kanalları oluşur. Karaciğer tomurcuğunun baş bölgesinde endodermal kökenli hücrelerin proliferasyonu sonrası karaciğer hücre kordonları oluşur. Karaciğer tomurcuğunun içerisinde yer alan endotel ile dōşeli boşlukların çevresinde karaciğer hücreleri yer alır. Bu yapılanma karaciğer sinüzoidlerini oluşturur. Kupffer hücreleri septum transversumun mezoderminden kaynaklanır (36).

Karaciğerin gelişim aşamalarında sağ lob sol lobdan fazla büyür. Karaciğer karın boşluğunun önemli bir kısmını kaplayacak kadar büyür. Karaciğerle karın ön duvarı arasındaki septum transversum küçük omentum ve falsiform ligamentini oluşturur. Karaciğerin prenatal dönemdeki en önemli fonksiyonlarından biri olan hemopoezis 6. haftada başlar. Doğuma doğru azalır. Doğumda karaciğer ağırlığı toplam vücut ağırlığının %5'ini oluşturur. Karaciğer hücrelerinde albumin üretimi 5. haftada, safra üretimi ise 12. haftada başlar (37).

## Karaciğerin Fonksiyonel Anatomisi

Karnın sağ üst kadranında yer alan karaciğer vücudun en büyük katı organı olup ağırlığı erişkinde 1200-1600 gramdır. Sağ böbrek, sağ kolon fleksurası, safra kesesi ve mide komşu organlarıdır. Karaciğer sağ ve sol lob olmak üzere iki lobdan oluşur. Sağ lob, sol lobun yaklaşık 6 katı büyüklüğündedir. Karaciğerin ön, arka ve alt olmak üzere üç yüzü vardır. Ön yüz diafragma, alt yüz karın boşluğuna ve arka yüz ise karın arka duvarına bakar. Karaciğer aynı anda hem arteriyel hem de venöz kanla beslenmesi nedeniyle diğer organlardan ayrılır. Afferent kan akımını portal ven ve hepatik arter sağlar. Hepatik arter karaciğere gelen kanın yaklaşık %25'ini sağlar. Portal ven sindirim kanalı, dalak, pankreas ve safra kesesinden gelen kanı karaciğere ulaştırır. Portal ven karaciğere gelen kanın yaklaşık %75'ini sağlar. Karaciğerin efferent kan akımı santral, sublobuler ve hepatik venlerle sağlanır. Karaciğer sinir pleksusu T 7-10 sempatik gangliyonlar, sağ-sol vagus ve sağ frenik sinirden gelen dalların çölyak pleksus ile birleşmesinden oluşur. Karaciğer vücudun en büyük lenf kaynaklarından birisi olup total volümünün yaklaşık %15-20'sini oluşturur.



Şekil-2 Karaciğer ve komşu organları

Greene GW. Anatomy of the Liver, Gallbladder and Biliary System - Medical Illustration, Human Anatomy Drawing. The Doe Report. Available from: URL: <http://www.courtroomexhibit.com/generateexhibit.php?ID=1976>. 04 Haziran 2009 tarihinde ulaşılmıştır.

Karaciğer lenfası oldukça yüksek protein ve hücre içerir. Disse aralığından başlayan karaciğer lenfası portal alanlarda gelişerek yüzeysel ve derin lenf yolları ile lenf düğümlerine taşınır. Karaciğeri örten yapıya Glisson Kapsülü denir. Kollajen liflerden oluşan bu kapsül kan ve lenf damarlarından zengindir. Kapsül karaciğer içindeki portal alanların bağ dokusu ile devamlılık gösterir. Karaciğer ligamentum



falsiform ile karın ön duvarına ve ligamentum koronarialar ile karın arka duvarına bağlanır. Ligamentum hepatoduodenale ve ligamentum gastrohepatika ise karaciğeri alt yüzünden tespit ederler (38). Şekil 2’de karaciğer ve komşu organları görülmektedir.

Hepatositler total karaciğer volümünün yaklaşık %80-88’ini oluşturur. Yaklaşık 30-40 mikron çapındadır. Hepatositin bazolateral yüzeyi Disse’nin perisinüsoidal aralığına uzanan mikrovilluslar içerir. Burada kan ile direkt temas sağlanır. Bu hepatositin oldukça yüksek olan emilim ve sekresyon aktivitesi için gereklidir. Hepatositin diğer iki yüzeyi ise kanaliküler ve lateral yüzeylerdir. Hepatosit nükleusu büyük olup hücre hacminin yaklaşık %5-10’unu oluşturur. Hepatositlerin yaklaşık %25’i çift nükleusludur (37). Hücrenin başlıca sitoplazmik organelleri endoplazmik retikulum, mitokondri, lizozomlar, peroksizomlar ve Golgi aygıtıdır. Granüllü endoplazmik retikulumda hücrenin yapısal proteinleri ve plazma proteinleri yapılır. Düz endoplazmik retikulum ise ksenobiotiklerin metabolizma yeridir. Ayrıca yağ asitleri, fosfolipidler ve trigliseridlerin metabolizmasında da rol oynar. Kolesterol ve safra asitleri de burada yapılır. Mitokondriler oksidatif fosforilasyon ve yağ asitleri oksidasyonunda önemli rol oynarlar. Sitrik asit ve üre siklusunu ile ilgili enzimleri de içerirler. Lizozomlar ilk tanımlanan organeller olup çeşitli eksojen ve endojen maddelerin katabolizma ve sindirimleri ile ilgili veziküllerdir. Peroksizomlar oksidazlar içerirler ve oksijen molekülünü kullanarak hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oluştururlar. Yağ asiti ve alkol metabolizmasına da katkıları vardır. Hepatositin sitoiskeletini mikroflamanlar, intermediate flamanlar ve mikrotubuller oluşturur. Mikroflamanlar aktin ve myozin içerirler, perikanaliküler ektoplazmada yer alırlar. Safra sekresyonu ve akımının düzenlenmesinde rol alırlar Sinüzoidal hücreler endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, perisinüzoidal hücreler ve pit hücrelerini içerir. Kupffer hücreleri mononükleer fagositer sistemin başlıca hücreleridir. Bir çok mediatör salgırlar. İmmün komplekslerin, lezyonlu eritrositlerin ve endotoksinlerin klirensini sağlarlar. Perisinüzoidal hücreler normal ve hasarlı karaciğerde ekstraselüler matriksin başlıca kaynağıdır. Pit hücreleri doğal ve lenfokinle aktive edilmiş katil hücre aktivitesi gösterirler (38).

## Karaciğerin Görevleri

Karaciğer vücuttaki tüm sistemleri ilgilendiren önemli görevler üstlenmiştir. Karaciğerin temel görevleri şu şekilde özetlenebilir (39):

1. *Vasküler rezervuar fonksiyonu:* Genişleyebilen bir organ olması nedeniyle hepatik venler ve sinüsler içinde normalde var olan 450 ml'lik kan rezervuarına 500 – 1000 ml daha kan ekleyebilir.

2. *Filtre fonksiyonu:* Portal sisteme barsaklardan gelen mikroorganizmalar hepatik sinüslerde bulunan Kupffer hücreleri aracılığı ile filtrelenir.

3. *Metabolik fonksiyonu:* Karaciğer karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında kritik görevler gerçekleştirir. Glukoz, fruktoz ve galaktoz barsakta absorbe olur. Fruktoz ve galaktoz karaciğerde glukozu çevrilir. Glukoz bütün hücreler tarafından enerji kaynağı olarak ATP sentezi için kullanılır. Karaciğer ve yağ dokusu fosfoglukonat yolunu kullanarak enerjinin yanı sıra yağ asitlerinin sentezini de gerçekleştirir. Glukoz önce glukojen olarak, glukojen kapasitesinin aşılması halinde ise yağ olarak depo edilir. Glukojen hemen glukozu dönüşebilir. Hücre içi osmolalitesine katkısı yoktur. Sadece karaciğer ve kas hücreleri glukojen depo edebilirler. Karaciğer glukojen deposu normalde 70 gr. kadardır. 24 saatlik açlıkta glukojen deposu tükenir. Bundan sonra yeni glukoz sentezine ihtiyaç vardır. Karaciğer laktat, piruvat, aminoasitlerden ve yağ metabolizması ürünü olan gliserolden glukoz üretebilir. Hepatik glukoneogenez kandaki glukoz konsantrasyonunu normal seviyede tutar. Karbonhidrat depoları dolduktan sonra karbonhidratların ve proteinlerin fazlasını yağa çevirir. Yağ asitleri ya hemen enerji kaynağı olarak kullanılır veya yağ dokusunda ve karaciğerde depo edilir. Hemen tüm hücreler, eritrositler ve böbrek medullası hariç, yağ asitlerini enerji kaynağı olarak kullanabilir. Nöronlar normalde glukozu uzayan açlıkta ise yağ asitlerini kullanabilir. Yağ asitleri önce asetil koenzim A' ya okside olur. Elde edilen sitrik asit siklusunda okside olarak ATP'yi oluşturur. Hepatositlerden salınan asetoasetat alternatif enerji kaynağını oluşturur. Asetil koenzim A hücre membranlarının sentezinde gerekli kolesterol ve fosfolipidlerin yapımı için kullanılır. Lipid transportu için lipoproteinlerin karaciğerdeki sentezi önemlidir. Karaciğer protein metabolizmasında

da önemli rol üstlenir. Aminoasitlerin karbonhidrat ve yağa dönmesi için deaminasyon gereklidir. Enzimatik yollar ile aminoasitler ketoasitlere dönüşür ve yan ürün olarak amonyak oluşur. Hepatik glukoneogenezde alanin deaminasyonu önemlidir. Karaciğer dallı olan aminoasitler hariç proteinlerdeki aminoasitlerin çoğunu deamine edebilir. Dallı olanlar iskelet kasında metabolize olur. Deaminasyon sonucunda oluşan amonyak barsakta bakteriler aracılığı ile rezorbe olur. Bir seri enzimatik işlem sonucunda karaciğer iki molekül amonyak ve karbondioksit (CO<sub>2</sub>)'den üre sentezini gerçekleştirir. Oluşan üre böbrekle atılır. Ketoasitlerin karaciğerde transaminasyonu non esansiyel amino asitleri oluşturur ve diyetle bunların eksikliğini karşılar. Esansiyel aminoasitlerin sentezi vücutta yapılamaz besinlerle alınması gerekir. Plazma proteinlerinin immün globulinler hariç tamamı karaciğerde sentez edilir. Bunların en önemlisi albümin ve koagülasyon faktörleridir. Albümin plazmanın onkotik basıncını sağlar, birçok ilaç ve hormonlar için taşıyıcı görev üstlenir. Albümin konsantrasyonunun azalması ile ilaçların serbest fraksiyonları artar. Faktör VIII ve von Willebrand faktörü hariç tüm koagülasyon faktörleri karaciğerde yapılır. Protrombin (FII), faktör VII , IX ve X 'un sentezi için K vitamini gereklidir.

4. *Detoksifikasyon fonksiyonu:* Dışarıdan alınan ilaçların, dışarıdan alınan veya endokrin sistemde üretilen hormonların fazlasının veya kalsiyum gibi minerallerin fazlasının biyotransformasyonları karaciğerde gerçekleşir. Son ürünler ya inaktiftir ya da suda eriyen safra ve/veya idrarla atılması kolaylaşmış maddelerdir.

5. *Sekretuar fonksiyonu:* Karaciğerin safra asitlerinin üretilmesi ve gastrointestinal sisteme aktarılması işlevi vardır. Hepatositler tarafından kolesterolden sentezi yapılan safra asitleri barsakta yağların absorpsiyonunu kolaylaştırır. Safra asitleri kolesterol eliminasyonunda en önemli yolu oluştururlar. Kolik asit ve kenodeoksi kolik asit olmak üzere başlıca iki asitin tuzları oluşur. Safra ile çıkmadan önce glisin ve taurin ile konjuge olurlar. Safra tuzlarının oluşumu ve salgılanmasındaki aksamalarda, yağlar ve yağda eriyen vitaminlerin (A, D, E, K vitaminleri) emilimi bozulur.

6. *Bilirubin metabolizması:* Karaciğerin bilirubin metabolizmasında önemli işlevleri vardır. Hemoglobin metabolizmasının son ürünü olan unkonjuge bilirubin serum albuminine bağlanarak karaciğere taşınır. Sinüzoidlerde albuminden ayrılan bilirubin diffüzyonla hepatosit içine alınır. Alınan bilirubin sitoplazmada konjuge edileceği mikrozomlara taşınır. Üridin difosfat glukuronosil transferaz (UGT) enzimi aracılığıyla glukuronik asitle konjuge olur. Konjuge olan bilirubinler safra kanaliküllerinden ekskrate edilir (40).

Üstlendiği tüm bu önemli fonksiyonlar nedeniyle insan biyokimyası biliminin odağında karaciğer vardır (41).

## **METHOTREKSATA BAĞLI TOKSİK KARACİĞER HASARI**

MTX bir folik asit antagonisti olup 40 yılı aşkın bir süredir romatoid artrit, psöryazis, neoplazmalar, lösemiler ve bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (1, 2). Günümüzde sarkoidoz, inflamatuvar barsak hastalıkları ve vaskülitlerin tedavisinde de kullanılmaktadır (3, 4, 5). MTX kullanımındaki temel sorun hepatotoksitesidir. Romatoid aritri olan ve düşük doz MTX kullanan olguların yaklaşık %3'ünde ciddi karaciğer fibrozisi gelişmektedir (42). Psöryazisi olan olgularda MTX'e bağlı karaciğer fibrozisi görülme insidansı %8-23 arasındadır (43, 44). MTX'in karaciğer toksisitesine bağlı histolojik anormallikler; yağlı değişiklikler, fokal hücre nekrozu, portal traktüste inflamasyon, nükleer pleomorfizm, fibrosis ve özellikle perisnüzoidal aralıkta kollajen akümülyasyonu olarak özetlenebilir (45). MTX'e bağlı karaciğer toksisitesinin mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. MTX'e maruz bırakılan ratlarda hepatosit nekrozu, hücre ölümü ve Kupffer hücre aktivasyonu geliştiği saptanmıştır (46). MTX'in uzun süreli kullanımı ilacın poliglutamat formlarının karaciğerde birikimine ve sonuç olarak hepatosit nekrozuna yol açar. Hepatosit nekrozunun makrofaj stümülyasyonu, hepatik stellate hücre aktivasyonu ve ekstraselüler matriks ekskresyonundaki artışa neden olduğu saptanmıştır (47). Hepatik stellate hücre aktivasyonu ve myofibroblastlara farklılaşması fibrozisle kuvvetli korelasyon göstermektedir (48). MTX kullanımında hepatositte sitozolik NADP dehidrojenaz ve NADP malik enzimleri inhibe olur. NADP glutatyon redüktaz tarafından ROÜ'ni inhibe etmek için kullanılan önemli bir

sitozolik antioksidandır. MTX nedenli NADP düzeylerindeki azalma glutatyon düzeylerinde azalmaya neden olur. Glutatyon düzeylerindeki azalma hepatositleri süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hipoklorhidrid radikalleri gibi ROÜ'ne karşı daha hassas ve korumasız bırakır (10, 11, 12, 13, 14).

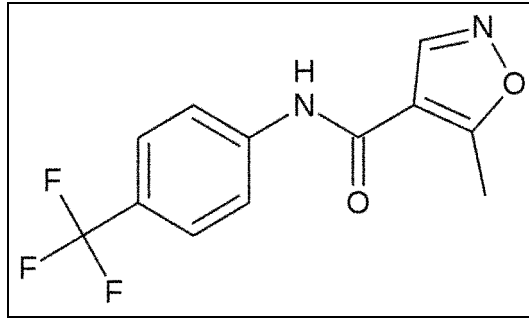
Günümüzde MTX'e bağlı karaciğer hasarı ile ilgili yapılan çalışmalar apoptozis, proapoptotik gen ve faktörler üzerine yoğunlaşmıştır (15, 16). Apoptozis DNA kırılması ve kromatin yoğunlaşması ile başlayan programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozise uğramış hücreler inflamatuvar yanıt oluşturmaksızın makrofajlar tarafından fagosite edilirler (49). Apoptozise yol açan birkaç mekanizma mevcuttur. Bu mekanizmalardan birisi kaspaz aktivasyonudur. Los ve arkadaşları kaspaz aktivasyonunun MTX'e bağlı apoptozis için gerekli olduğunu saptamışlardır (50). Bazı güncel çalışmalarda MTX'e bağlı karaciğer toksisitesi ve TNF- $\alpha$  aktivasyonu arasında bağlantı saptanmıştır. Neuman ve arkadaşlarının çalışmasında MTX'e bağlı karaciğer toksisitesinde TNF- $\alpha$ 'nın rol oynadığını saptamışlardır (51). Kobayashi ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı çalışmada rejenere hepatositlerde MTX'e bağlı apoptoziste TNF- $\alpha$ 'nın rol oynadığını saptamışlardır (52).

MTX'e bağlı toksik karaciğer hasarı uzun yıllar boyunca klinik olarak sessiz olabilir. Biyokimyasal bozukluk gelişmeyebilir. MTX'e bağlı karaciğer toksisitesini göstermenin en iyi yolu karaciğer biyopsisidir. On yılın üzerinde MTX kullanan ya da kümülatif dozu 1.5-2.5 gr'a ulaşan olgularda karaciğer biyopsisi ve histopatolojik değerlendirme önerilmektedir (53, 54).

MTX'e bağlı karaciğer toksisitesi genellikle 1.5-2.5 gr. ve üzeri dozlarda aşikar olmakla birlikte daha erken dönemde ve düşük dozlarda da toksisite görülebilmektedir. Deneysel çalışmalarda MTX'e bağlı toksik karaciğer hasarı oluşturmak için ratlarda 20 mg/kg tek doz MTX intraperitoneal uygulanmasının hepatik ve kolestatik tipte toksisite oluşturmak için yeterli olduğu, ayrıca bu uygulamayla daha yüksek dozlarda oluşan ciddi sistemik toksik etki ve erken ölümün görülmediği bildirilmiştir (55, 56).

## LEFLUNOMİD

Leflunomid (HWA-486) antiinflamatuvar, antiproliferatif ve immünmodülatör etkileri olan sentetik isoksazol derivativesidir. Hastalık modifiye edici ilaç özelliği ilk kez 1980'li yıllarda artrit ve otoimmünite ilişkili hayvan modellerinde gösterilmiştir. Sıçanlarda adjuvan artritini inhibe etmiş ve mitojenle indüklenmiş lenfositlerin proliferasyonunu düzeltmiştir. Leflunomid bir ön ilaçtır. Aktif metaboliti A77 1726 (3 siyano-3-hidroksi-N-[4-triflorometilfenil] crotonamid)'dır. Bu metabolit esas olarak leflunomidin tüm in vivo aktivitesinden sorumludur. Şekil 3'te leflunomidin yapısal formülü görülmektedir (17). Leflunomid 1999 yılında romatoid artrit tedavisinde Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanan bir ilaçtır (24).



Şekil – 3 Leflunomidin yapısal formülü (17)

### Etki Mekanizması

Leflunomidin etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Dihidroorotat dehidrogenaz (DHODH) inhibisyonu ve tirozin kinaz inhibisyonu in vitro olarak tanımlanan iki etki mekanizmasıdır. Leflunomid selektif olarak DHODH enzimini inhibe eder. Bu enzim ribonükleotid üridin monofosfat (rUMP) ve ribonükleotid üridin trifosfat gibi pirimidin nükleotidlerin de novo biyosentezinde önem taşır ve romatoid artrit patogenezinde yer alan aktif T lenfositler ve hızlı proliferasyon alan hücreler tarafından kullanılır. A77 1726 daha yüksek konsantrasyonlarda tirozin kinazı inhibe eder. Tirozin kinaz hücre büyümesi ve aktif hücrelerin diferansiasyonu için esastır (57). Lökositlerden ROÜ salınımını inhibe eden leflunomid aynı zamanda antioksidan etkinliğe de sahiptir (58).

Leflunomidin bir diğere önemli etkisi de NF-κB aktivasyonunu ve NF-κB bağımlı gen ekspresyonunu inhibe etmesidir. Leflunomid başta TNF olmak üzere, forbol esteri, okadaik asit, seramid, ROÜ ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile ilişkili NF-κB aktivasyonunu inhibe eder (17). Imose ve arkadaşları concanavalin A ile farelerde hepatit oluşturdukları deneysel çalışmada leflunomidin NF-κB inhibisyonu aracılığıyla plazma TNF-α, interferon gama (IFN-γ) ve interlokin 2 (IL-2) düzeylerinde azalmaya neden olduğunu saptamışlardır (59). Manna ve arkadaşlarının çalışmasında leflunomidin TNF'e bağılı ROÜ üretimini, lipid peroksidasyonunu, TNF tarafından indüklenen sitotoksisteyi ve kaspaz aktivasyonunu engellediğı saptanmıştır. Manna leflunomidin NF-κB ve TNF ilişkili çeşitli hücreseı yanıtı baskılaması nedeniyle karaciğere ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkisi olabileceğini belirtmiştir (18). Kaspaz ve TNF-α aktivasyonu MTX'e bağılı toksik karaciğere hasarına yol açan mekanizmalar arasındadır (50, 51, 52). Yao ve arkadaşlarının çalışmasında ratlarda CCl<sub>4</sub> veya immünolojik yolla oluşturulan karaciğere hasarında leflunomidin proinflatuar sitokin düzeyinde azalma, malondialdehid ve nitrik oksit düzeylerinde azalma ve antioksidan aktivitede artışa yol açtığı saptanmıştır (19). Karaman ve arkadaşları leflunomidin biliyer obstrüksiyonlu ratlarda karaciğere hasarını iyileştirdiğini saptamışlardır (20).

## **Farmakolojik Özellikler**

Leflunomidin hemen tamamı gastrointestinal sistemden emilir. İntestinal mukozada ve plazmada enzimatik olmayan dönüşüme uğrar, isoksazol halkası açılır ve hızla aktif metaboliti olan A77 1726'ya dönüşür. Leflunomid bir ön ilaçtır. Aktif metaboliti A77 1726'dır. A77 1726 enterohepatik sirkülasyona uğrar ve bu da yarı ömrünü uzatır. A77 1726 yüksek oranda proteine ve başlıca da albümine (%99.5) bağlanır. Bu nedenle klinik kullanımda yükleme dozu önerilir. Diyalizle uzaklaşmaz. Yarı ömrü insanlarda 15 gündür. Leflunomid bir çok minör metabolite dönüşerek metabolize edilir. Metabolizması tek bir enzimle kontrol edilemeyip mikrozomal ve sitozolik hücreseı fraksiyonlarda gerçekleşmektedir. Leflunomidin başlıca minör metaboliti triflorometilalanin (TFMA)'dır. Daha sonra biliyer ekskresyonla temizlenir. Leflunomidle ilişkili parametreler böbrek yetersizliğı olan hastalarda sağıklı gönüllülerdeki değıerlerle uyumlu bulunmuştur. Kolestiramin ve aktif kömür

leflunomidin aktif metaboliti A77 1726' ya bağlanır ve reabsorbsiyonu önleyerek yarı ömrünü 1-2 güne kısaltabilir (57).

### **Kullanım İndikasyonları**

Leflunomid kullanımı 1999 yılında romatoid artrit tedavisinde FDA tarafından onaylanmıştır (24). Leflunomid aktif romatoid artrit ve psöryatik artritli hastalarda MTX veya salozoprinin yeterli doz ve sürede kullanılmasına rağmen etki elde edilemeyen erişkin hastaların tedavisinde “hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç” (DMARD) olarak; belirti ve semptomların azaltılmasında, radyolojik erozyonlar ve eklem aralığı daralmasıyla belirgin yapısal hasarın inhibisyonunda ve fiziksel fonksiyonlarının düzeltilmesinde indikedir (57).

### **Kullanım Şekli ve Dozu**

Leflunomid oral kullanılır. Üç gün 100mg/gün yükleme dozunu takiben 10-20 mg/gün dozla kullanılır. Böylece sabit plazma konsantrasyonuna 2-3 haftada ulaşılır. Leflunomidin romatoid artrit tedavisinde geleneksel DMARD'lara karşı daha etkin ve güvenilir olduğunu gösteren klinik çalışmalar mevcuttur (60, 61).

### **Toksisite**

USA-based healthcare claims database (AETNA) verilerine göre klinik pratikte Leflunomid'in yan etkilere bağlı başlıca ilacı kesme nedeni gastrointestinal sistem (GİS) yan etkileridir. ABD'de ilaç kesmeye neden olan en önemli yan etkiler transaminaz yüksekliği ve GİS yan etkileridir (62).

Leflunomide bağlı GİS yan etkilerinden ilaç kesmeyi gerektiren bulantı %1.3 oranında görülür. Diyare daha yaygındır ve leflunomid kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkidir. Klinik çalışmalarda %13-34 oranında bildirilmiştir. Karın ağrısı ve dispepsi plaseboya göre biraz daha siktir (62).

AETNA verilerine göre aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT)'ın normalin üst sınırının 3 katına çıkma şeklinde enzim



artışının kümülatif insidansının leflunomidle %5 olduğu saptanmıştır. Leflunomide bağlı hepatik yan etki saptanan olguların çoğunda hepatotoksik ilaç kullanımı, alkol alımı ve önceden varolan hepatik yetersizlik mevcuttur (63).

Leflunomide bağlı görülen tüm dermatolojik yan etkilerin oranı %28'dir. Reversibl alopesi gelişebilir (57).

Leflunomide bağlı görülen nadir yan etkiler arasında hipertansiyon da vardır. %3.4 oranında bildirilmiştir. Mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Sempatik uyarıda artış ve NSAİİ'lerin serbest fraksiyonunda artış nedeni olabileceği bildirilmiştir (57).

Meta analizlerde Leflunomide bağlı ciddi hematolojik yan etki belirtilmemiştir (64). Bir fatal olmayan sepsis olgusu dışında fırsatçı infeksiyon olgusu yoktur (57).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu Başkanlığı'nın 17.02.2009 tarih ve B.30.2.PAÜ.0.01.00.00.400-1/10 sayılı izni ile Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleti Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Erkek erişkin Wistar albino ratlar randomize olarak gruplara ayrılmıştır. Ratların beslenme ve takip koşulları hayvan çalışmalarında önerilen uluslararası kurallar göz önüne alınarak yapılmıştır. Deneyleti önce ratlar standart pelletlerle ve su ile beslenmiş, ayrı kafeslerde izlenmiştir. Oda sıcaklığı sabit tutularak normal gece gündüz döngüsü korunmuştur. Deneyleti 12 saat önce ratlara yemek verilmemiş ancak su içmelerine izin verilmiştir.

## İLAÇLAR

MTX Onco-Tain Mayne Pharma Pty Ltd. Victorica Firması'ndan satın alınmıştır. Leflunomid Aventis İlaç Firması'ndan (Arava 100 mg) satın alınmıştır. Karboksi metil selüloz (CMC) Uğur Selüloz Kimya Anonim Şirketi tarafından hediye edilmiştir. Distile su ile %1 oranında seyreltilmiştir. Leflunomidin su ve serum fizyolojik içinde erimemesi nedeniyle %1 CMC taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

## METHOTREKSATA BAĞLI TOKSİK KARACİĞER HASARI OLUŞTURULMASI

MTX'e bağlı toksik karaciğer hasarı literatürde daha önceden belirtilen yayınlara uygun şekilde oluşturulmuştur (55, 56). Ratlara intraperitoneal injeksiyon ile MTX 20 mg/kg tek doz uygulanmıştır. Ratlar 5 gün sonrasında dekapitasyonla sakrifiye edilmiştir. Leflunomid dozu için Yao ve arkadaşlarının "Ratlarda CCL4 ile oluşturulan hepatik fibroziste leflunomidin inhibitör etkisi" isimli çalışması baz alınmıştır (65).

## **DENEYSEL ÇALIŞMA GRUPLARI**

Çalışmamızda ağırlığı 185-254 gram arasında değişen 40 adet rat kullanılmıştır. Deneysel çalışma grupları aşağıda belirtilmiştir:

MTX grubu (1. grup): İntraperitoneal injeksiyon ile MTX 20 mg/kg tek doz uygulanmasını takiben taşıyıcı madde (%1 CMC) 3 ml/kg/gün intragastrik olarak verilmiştir. Beş gün sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

MTX + leflunomid grubu (2. grup): İntraperitoneal injeksiyon ile MTX 20 mg/kg tek doz uygulanmasını takiben leflunomid 9 mg/kg/gün suda erimediği için %1 CMC ile intragastrik olarak verilmiştir. Beş gün sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

Leflunomid grubu (3. grup): İntraperitoneal injeksiyon ile serum fizyolojik 3 ml/kg tek doz uygulanmasını takiben leflunomid 9 mg/kg/gün suda erimediği için %1 CMC ile intragastrik olarak verilmiştir. Beş gün sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

Kontrol grubu (4. grup): İntraperitoneal injeksiyon ile serum fizyolojik 3 ml/kg tek doz uygulanmasını takiben taşıyıcı madde (%1 CMC) 3 ml/kg/gün intragastrik olarak verilmiştir. Beş gün sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

## **DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI**

Bütün ratlardan intrakardiyak olarak kan örneği alınmıştır. Alınan kan örnekleri 3000 rpm de 10 dakika boyunca Nüve NF 800 cihazı kullanılarak santrifuj edilmiştir. Santrifuj sonrası serum örnekleri uygun koşullarda saklanmıştır. Alınan kan örneklerinden AST, ALT ve alkalin fosfataz (ALP) çalışılmıştır.

Kan örnekleri alındıktan hemen sonra karaciğer çevre dokulardan serbestleştirilerek bütün olarak çıkartılmıştır. Çıkarılan karaciğer örneğinden dokuda MDA ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ve doku myeloperoksidaz (MPO)

aktivitesi saptanması için örnekler alınmıştır. Histopatolojik değerlendirme için alınan karaciğer örnekleri, % 10 nötral tamponlu formaldehid içerisinde fikse edilmiştir.

## **BİYOKİMYASAL İNCELEMELER**

Serum AST ve ALT düzeyleri standart kitler kullanılarak Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda Abbott Architect C8000 cihazında enzimatik yöntemle ölçülmüştür. Sonuçlar U/L olarak ifade edilmiştir. Serum ALP düzeyleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda Abbott Architect C8000 cihazında kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür. Sonuçlar U/L olarak ifade edilmiştir.

Doku MDA düzeyleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda "asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi" prensibine dayanan Ohkawa ve arkadaşlarının yöntemi uygulanarak ölçülmüştür (66). Sonuçlar spesifik aktivite, nmol/gr doku olarak ifade edilmiştir.

MPO aktivitesi ölçümü öncesinde karaciğer dokusu homojenize edilmiştir. MPO ölçümü Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda "hidrojen peroksitin homojenat tarafından oksitlenerek o-dianosidini redüklemesi ve redükte o-dianosidin 410 nm.'de ölçülmesi" prensibine dayanılarak yapılmıştır (67). Sonuçlar spesifik aktivite, U/gr doku olarak ifade edilmiştir.

Karaciğer dokusunda SOD aktivitesi "ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu indirgemesi" esasına göre ölçülmüştür (68). Sonuçlar U/mg protein yaş doku olarak ifade edilmiştir.

## **HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER**

Histopatolojik değerlendirme için alınan karaciğer dokusu örnekleri hızla % 10 tamponlanmış formalin içine konarak saklanmıştır. Bu örnekler daha sonra parafinlenerek slaytlara alınmış ve hematoksilin eosin (HE) ile boyanmıştır.

Patolojik slaytlar Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda çalışma grupları hakkında bilgilendirilmeyen deneyimli bir patolog tarafından değerlendirilmiştir.

MTX'e bağlı toksik karaciğer hasarının değerlendirilmesinde iki farklı skorlama sistemi kullanılmıştır. Semikantitatif oksidatif karaciğer hasarı Demling ve arkadaşlarının geliştirdiği skorlama sistemine göre hesaplanmıştır (69, 70). Bu skorlama sisteminde değerlendirilen her bir kritere 0-3 arasında puan verilmiş ve minimum skor 0, maksimum skor 9 olarak hesaplanmıştır. Her örnekte en az 5 mikroskopik alan değerlendirilerek, kriterler için saptanan skorların toplamına göre mikroskopik skorlama yapılmıştır. Semikantitatif oksidatif skorlama sisteminde kullanılan kriterler ve derecelendirme Tablo 1'de gösterilmiştir. Diğer histopatolojik değerlendirmede MTX'e bağlı karaciğer hasarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan ve kabul gören Roenigk Sınıflaması esas alınmıştır (35). Roenigk Sınıflaması'na göre evreleme ve kriterler Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo-1** Karaciğer oksidatif hasarında semikantitatif skorlama sisteminde kullanılan kriterler ve derecelendirme

Kriter	Derece			
	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Hepatosit vakualizasyonu ve piknotik hepatosit nükleusu	0	1	2	3
Sinüzoidlerde genişleme	0	1	2	3
Kupffer hücre infiltrasyonu	0	1	2	3

**Tablo-2** Methotreksata bağlı karaciğer hasarında Roenigk Sınıflaması

Yağlı değişiklik	Nükleer pleomorfizm	Kriterler		Evre
		Fibrozis	Nekroinflamasyon	
Yok / hafif	Yok / hafif	Yok	Hafif / orta portal inflamasyon var ya da yok	<b>1</b>
Orta / ciddi	Orta / ciddi	Yok	Orta / şiddetli portal inflamasyon	<b>2</b>
Var / yok	Var / yok	Hafif	Var / yok	<b>3a</b>
Var / yok	Var / yok	Orta / ciddi	Var / yok	<b>3b</b>
Var / yok	Var / yok	Siroz	Var / yok	<b>4</b>

## İSTATİSTİK

İstatistik analizler SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama ve standart deviasyon (SD) olarak verilmiştir. Çalışma gruplarının değerlendirilmesinde Kruskal Wallis varyans analizi ve Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel sonuçlarda  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edilmiştir. Gruplarda Roenigk Sınıflaması'ndaki evre farklılıklarının değerlendirilmesinde  $\chi^2$  testi kullanılmıştır. Sonuçlar % olarak verilmiştir. Fakat denek sayısının sınırlı olması nedeniyle bulunan istatistiksel sonuç verilmemiştir.

## BULGULAR

### METHOTREKSATA BAĞLI BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

MTX'in 20 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulaması serum ALT ve ALP değerlerinde artışa neden olmuştur. Serum ALT değerleri 1. grupta  $56.77 \pm SD 9.1$  U/L, 4. grupta  $27.10 \pm SD 13.2$  U/L saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ). Serum ALP değerleri 1. grupta  $514.44 \pm SD 120.09$  U/L, 4. grupta  $103.30 \pm SD 121.7$  U/L saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ). Serum AST değerleri 1. grupta  $125.33 \pm SD 51.4$  U/L, 4. grupta  $98.60 \pm SD 25.7$  U/L saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ).

Karaciğer dokusunda MDA düzeyi 1. grupta  $247.3 \pm SD 25.7$  nmol/gr doku, 4. grupta  $219.2 \pm SD 32.5$  nmol/gr doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ). Karaciğer dokusunda MPO aktivitesi 1. grupta  $7.8 \pm SD 3.2$  U/gr doku, 4. grupta  $4.6 \pm SD 0.9$  U/gr doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ). Karaciğer dokusunda SOD aktivitesi 1. grupta  $5.24 \pm SD 0.60$  U/mg protein yaş doku, 4. grupta  $5.4 \pm SD 0.80$  U/mg protein yaş doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ).

MTX'in 20 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulaması histopatolojik olarak karaciğer Kupffer hücre proliferasyonunda ve semikantitatif oksidatif skorlarda yüksekliğe neden olmuş ve Roenigk evresinde artışa yol açmıştır. Kupffer hücre proliferasyonu 1. grupta  $2.5 \pm SD 1.01$ , 4. grupta  $0.9 \pm SD 1.1$  saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ). Semikantitatif oksidatif skor 1. grupta  $5.1 \pm SD 2.02$ , 4. grupta  $2.1 \pm SD 1.85$  saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ). Roenigk Sınıflaması'na göre 1. gruptaki ratların % 22.2'si evre 1, % 77.8'i evre 2 saptanmıştır. Roenigk Sınıflaması'na göre 4. gruptaki ratların tamamı (%100) evre 1 saptanmıştır. Çalışmada hiçbir grupta Roenigk Sınıflaması'na göre evre 3 ve evre 4 saptanmamıştır.

MTX grubunda deneysel protokol uygulanan ratlardan biri ex olmuştur. Diğer gruplarda mortalite izlenmemiştir. Mortalite açısından gruplar arasında istatistiksel farklılık gözlenmemiştir.

## **LEFLUNOMİDE BAĞLI BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER**

Leflunomid uygulaması ratlarda serum AST ve ALT değerlerinde yükselmeye yol açmamıştır. Fakat serum ALP değerlerinde yükselmeye yol açmıştır. Serum ALT değerleri 3. grupta  $33.8 \pm SD 12.4$  U/L, 4. grupta  $27.10 \pm SD 13.2$  U/L saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ). Serum ALP değerleri 3. grupta  $211.1 \pm SD 48.0$  U/L, 4. grupta  $103.30 \pm SD 121.7$  U/L saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ). Serum AST değerleri 3. grupta  $94.0 \pm SD 13.4$  U/L, 4. grupta  $98.60 \pm SD 25.7$  U/L saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ).

Karaciğer dokusunda MDA düzeyi 3. grupta  $289.9 \pm SD 36.4$  nmol/gr doku, 4. grupta  $219.2 \pm SD 32.5$  nmol/gr doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ). Karaciğer dokusunda MPO aktivitesi 3. grupta  $3.53 \pm SD 1.3$  U/gr doku, 4. grupta  $4.6 \pm SD 0.9$  U/gr doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ). Karaciğer dokusunda SOD aktivitesi 3. grupta  $4.7 \pm SD 0.27$  U/mg protein yaş doku, 4. grupta  $5.4 \pm SD 0.80$  U/mg protein yaş doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ).

Leflunomid uygulaması histopatolojik olarak karaciğer Kupffer hücre proliferasyonunda ve semikantitatif oksidatif skorlarda yüksekliğe yol açmamıştır. Roenigk evresinde kontrol grubuna göre belirgin farklılık gözlenmemiştir. Kupffer hücre proliferasyonu 3. grupta  $1.0 \pm SD 0.81$ , 4. grupta  $0.9 \pm SD 1.1$  saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ). Semikantitatif oksidatif skor 3. grupta  $1.7 \pm SD 0.94$ , 4. grupta  $2.1 \pm SD 1.85$  saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ). Roenigk Sınıflaması'na göre 3. gruptaki ratların % 90'ı evre 1, % 10'u evre 2 saptanmıştır. Roenigk Sınıflaması'na göre 4. gruptaki tamamı (%100) evre 1 saptanmıştır.



## LEFLUNOMİDİN METHOTREKSATA BAĞLI TOKSİK KARACİĞER HASARI ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİSİ

MTX'in 20 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulanmasını takiben 5 gün boyunca 9 mg/kg/gün oral leflunomidle tedavi edilen ratlarda tedavi edilmeyen ratlara göre serum ALT ve ALP değerleri değerleri belirgin düşük bulunmuştur. Fakat serum AST değerleri benzer saptanmıştır. Serum ALT değerleri 2. grupta  $40.68 \pm SD 13.6$  U/L, 1. grupta  $56.7 \pm SD 9.13$  U/L saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ). Serum ALP değerleri 2. grupta  $169.6 \pm SD 234.0$  U/L, 1. grupta  $514.44 \pm SD 120.09$  U/L saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ). Serum AST değerleri 2. grupta  $150.5 \pm SD 13.4$  U/L, 1. grupta  $125.3 \pm SD 51.4$  U/L saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ).

Karaciğer dokusunda MDA düzeyi 2. grupta  $310.48 \pm SD 33.5$  nmol/gr doku, 1. grupta  $247.3 \pm SD 25.7$  nmol/gr doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ). Karaciğer dokusunda MPO aktivitesi 2. grupta  $5.65 \pm SD 1.9$  U/gr doku, 1. grupta  $7.8 \pm SD 3.2$  U/gr doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ). Karaciğer dokusunda SOD aktivitesi 2. grupta  $5.1 \pm SD 0.63$  U/mg protein yaş doku, 1. grupta  $5.2 \pm SD 0.60$  U/mg protein yaş doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ).

MTX'in 20 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulanmasını takiben 5 gün boyunca 9 mg/kg/gün oral leflunomidle tedavi edilen ratlarda tedavi edilmeyen ratlara göre histopatolojik olarak karaciğer Kupffer hücre proliferasyonunda ve semikantitatif oksidatif skorlarda belirgin iyileşme izlenmiştir. Kupffer hücre proliferasyonu 1. grupta  $2.5 \pm SD 1.01$ , 2. grupta  $0.2 \pm SD 0.6$  saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ). Semikantitatif oksidatif skor 1. grupta  $5.1 \pm SD 2.02$ , 2. grupta  $1.10 \pm SD 0.73$  saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ). Roenigk Sınıflaması'na göre 1. gruptaki ratların % 22.2'si evre 1, % 77.8'i evre 2 saptanmıştır. Roenigk Sınıflaması'na göre 2. gruptaki ratların tamamı (%100) evre 1 saptanmıştır. Çalışmada hiçbir grupta Roenigk Sınıflaması'na göre evre 3 ve evre 4 saptanmamıştır.

Çalışmadaki tüm gruplarda saptanan serum AST, ALT, ALP değerleri, dokuda MDA, MPO, SOD aktiviteleri ve semikantitatif oksidatif skorlar Tablo 3'te gösterilmiştir. Roenigk Sınıflaması'na göre gruplardaki evre farklılıkları Şekil 4'te gösterilmiştir.

**Tablo-3** Çalışma gruplarında biyokimyasal ve histopatolojik sonuçlar

Gruplar	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	MDA (nmol/gr doku)	MPO (U/gr doku)	SOD (U/mg protein)	Oksidatif Skor
<b>1. grup</b>	125 <sub>±</sub> 51	56 <sub>±</sub> 9†	514 <sub>±</sub> 120‡	247 <sub>±</sub> 25	7.8 <sub>±</sub> 3.2	5.2 <sub>±</sub> 0.6	5.1 <sub>±</sub> 2¶
<b>2. grup</b>	150 <sub>±</sub> 13*	40 +13	169 <sub>±</sub> 234	310 <sub>±</sub> 33	5.6 <sub>±</sub> 1	5.1 <sub>±</sub> 0.6	1.1 <sub>±</sub> 0.7
<b>3. grup</b>	94 <sub>±</sub> 13	33 <sub>±</sub> 12	211 <sub>±</sub> 48.0§	289 <sub>±</sub> 36	3.5 <sub>±</sub> 1.3	4.7 <sub>±</sub> 0.2	1.7 <sub>±</sub> 0.9
<b>4. grup</b>	98 <sub>±</sub> 25	27 <sub>±</sub> 13	103 <sub>±</sub> 121	219 <sub>±</sub> 32	4.6 <sub>±</sub> 0.9	5.4 <sub>±</sub> 0.8	2.1 <sub>±</sub> 1.8

\* Serum AST değerleri 2. grupta 3. ve 4. gruplara göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur.

† Serum ALT değerleri 1. grupta diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur (p < 0.01).

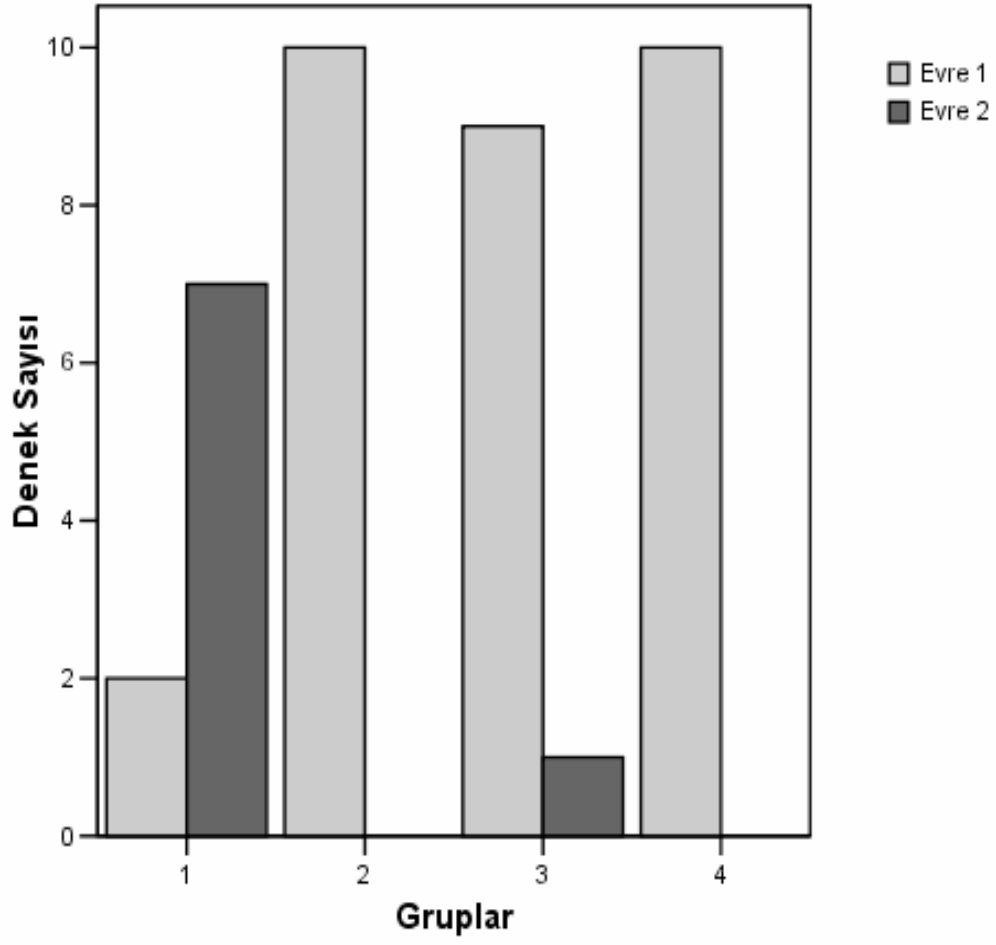
‡ Serum ALP değerleri 1. grupta diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur (p < 0.01).

§ Serum ALP değerleri 3. grupta 4. gruba göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur (p < 0.05).

|| Doku MDA değerleri 2. grupta 1. gruba göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur (p < 0.05).

¶ Semikantitatif oksidatif skor 1. grupta diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur (p < 0.01).

Kısaltmalar: AST (Aspartat aminotransferaz), ALT (Alanin aminotransferaz), ALP (Alkalen fosfataz), MDA (Malondialdehid), MPO (Myeloperoksidaz), SOD (Süperoksit dismutaz)



**Şekil – 4** Roenigk Sınıflaması'na göre gruptaki evre farklılıkları

Roenigk Sınıflaması'na göre 1. gruptaki ratların % 22.2'si evre 1, % 77.8'i evre 2 saptanmıştır. Roenigk Sınıflaması'na göre 2. gruptaki ratların tamamı evre 1'dir.

## TARTIŞMA

Çalışmamız, MTX'e bağlı toksik karaciğer hasarının engellenmesinde leflunomidin etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu koruyucu etki leflunomidin antioksidan etkisinden bağımsız görünmektedir. Bu koruyucu etki leflunomidin Kupffer hücre proliferasyonu üzerine olan inhibe edici etkisiyle ilişkili olabilir.

Karaciğer karnın sağ üst kadranında yer alan vücudun en büyük katı organıdır. Karaciğerin vasküler rezervuar fonksiyonu, filtre fonksiyonu, detoksifikasyon fonksiyonu, sekretuar fonksiyonu, bilirubin metabolizma fonksiyonu ve karbonhidrat, yağ, protein metabolizması ile ilişkili çok önemli fonksiyonları mevcuttur (39).

İlaç ve diğer kimyasal ajanlarla oluşan toksik karaciğer hasarı akut ve kronik hepatitler, safra yolu anomalileri, siroz ve neoplazmalar gibi geniş bir spektruma sahip karaciğer hastalıklarının %5'ini oluşturmaktadır (7). İlaçlara bağlı karaciğer hasarı değişik oranlarda hepatoselüler ve / veya kolestaz bulgularının söz konusu olduğu genellikle akut nadiren kronik gelişen hastalık tablolarıdır. Klinik tablo asemptomatik karaciğer enzim yüksekliklerinden akut karaciğer yetersizliğine kadar değişebilir. Ayrıca kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatobiliyer tümörler de gelişebilir (6).

MTX romatoid artrit, psöriyazis, neoplazmalar, lösemiler ve bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde 40 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. MTX oral veya parenteral verilebilir. MTX akut lösemi, gebelik trofoblastik neoplazisi, mukozis fungoides, meme kanseri, ağır psöriyazis, romatoid artrit, baş ve boyun kanserleri ve akut lenfositik lösemisinin idame tedavisinde standart dozlarda kullanılır (29). MTX osteosarkom, çocukluk çağı lösemileri, Hodgkin dışı lenfomaların tedavisinde ise yüksek dozlarda kullanılır. MTX menenjiyal lösemi, lenfomalar, menenjiyal karsinomatozisin tedavisi için intratekal injekte edilir (22). Günümüzde MTX'in sarkoidoz, inflamatuvar barsak hastalıkları ve vaskülitlerin tedavisinde de etkili olduğu saptanmıştır (1-5). MTX'in sitotoksik etkisi kanser hücrelerine selektif değildir. Bu nedenle yüksek proliferasyon özelliği gösteren hemopoetik sistem,

kemik iliği ve gastrointestinal sistem mukozası gibi normal dokularda MTX'e bağı toksisite görülür (31). Bununla birlikte MTX kullanımındaki en önemli sorun hepatotoksisite olup bu özellikle romatoid artriti ve psöryazisi olan hastalarda önem taşımaktadır (42, 43, 44). MTX'in klinik pratikteki bu geniş kullanımı nedeniyle ajanın karaciğer toksisitesi daha da önem kazanmaktadır.

MTX'e bağı karaciğer toksisitesini etkileyen bazı faktörler mevcuttur. Tedavinin dozu, süresi, altta yatan karaciğer hastalığı, uzun süreli alkol kullanımı, beraberinde asetaminofen kullanımı, genetik ve moleküler apoptotik faktörlerin varlığı bu faktörlerden bazılarıdır (51). MTX'e bağı karaciğer toksisitesinin mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. MTX'in uzun süreli kullanımı ilacın poliglutamit formlarının karaciğerde birikimine ve sonuç olarak hepatosit nekrozuna yol açar. Hepatosit nekrozunun makrofaj stümlasyonu, hepatik stellate hücre aktivasyonu ve ekstraselüler matriks ekskresyonundaki artışa neden olduğu saptanmıştır (47). Hepatik stellate hücre aktivasyonu ve myofibroblastlara farklılaşması fibrozisle ilişkilidir (48). MTX kullanımında hepatositte NADP dehidrojenaz ve NADP malik enzimleri inhibe olur. NADP glutatyon redüktaz tarafından ROÜ'ni inhibe etmek için kullanılan önemli bir sitozolik antioksidandır. MTX nedenli NADP düzeylerindeki azalma glutatyon düzeylerinde azalmaya neden olur. Glutatyon düzeylerindeki azalma hepatositleri ROÜ'ne karşı daha hassas ve korumasız bırakır (10-14). Günümüzde MTX'e bağı karaciğer hasarı ile ilgili yapılan çalışmalar apoptozis üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda MTX'e bağı hepatosit apoptozisi için kaspaz aktivasyonunun gerekli olduğu saptanmıştır (50). MTX'e bağı toksik karaciğer hasarı uzun yıllar boyunca klinik olarak sessiz olabilir. Biyokimyasal bozukluk gelişmeyebilir. MTX'e bağı karaciğer toksisitesini göstermenin en iyi yolu karaciğer biyopsisidir. On yılın üzerinde MTX kullanan ya da kümülatif dozu 1.5-2.5 gr'a ulaşan olgularda karaciğer biyopsisi ve histopatolojik değerlendirme önerilmektedir (53, 54).

Deneysel çalışmalarda MTX'e bağı toksik karaciğer hasarı oluşturmak için ratlarda 20 mg/kg tek doz MTX intraperitoneal uygulanmasının hepatik ve kolestatik tipte toksisite oluşturmak için yeterli olduğu saptanmıştır (55, 56). Çalışmamızda 20 mg/kg tek doz MTX intraperitoneal uygulanmasıyla kontrol grubuna göre serum

transaminaz ve ALP düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Serum transaminaz değerleri her zaman karaciğerin histopatolojik durumunu yansıtmayabilir (71, 72). MTX'e bağlı karaciğer toksisitesini saptamanın en kesin yolu karaciğer biyopsisi ve histopatolojik incelemedir (35, 44). Bu nedenle çalışmamızda iki farklı tip histopatolojik skorlama sistemine göre karaciğer histopatolojisindeki değişiklikleri inceledik. Oksidatif hasara bağlı semikantitatif skorlama özellikle deneysel çalışmalarda MTX'e bağlı organ hasarını ölçmede kullanılan bir değerlendirme yöntemidir (55, 56). Semikantitatif skorlama sisteminde başlıca hepatosit vakualizasyonu, sinüzoidlerde genişleme ve Kupffer hücre infiltrasyonu değerlendirilir. Roenigk Skorlama Sistemi MTX'e bağlı karaciğer toksisitesinin ve fibrozisin değerlendirilmesinde 1971 yılından beri kullanılan ve günümüzde halen kabul gören bir yöntemdir (35, 54). Bu yöntemde başlıca hepatositlerdeki yağlı değişiklik, nükleer pleomorfizm, fibrozis ve nekroinflamasyon değerlendirilir. Çalışmamızda 20 mg/kg MTX uygulanan grupta kontrol grubuna oranla semikantitatif oksidatif skorlar anlamlı oranda yüksek saptandı ( $p<0.01$ ). Semikantitatif oksidatif değerlendirmenin bir varyantı da karaciğer Kupffer hücre proliferasyonudur. Biz çalışmamızda karaciğer Kupffer hücre proliferasyonunu MTX uygulanan grupta anlamlı oranda yüksek bulduk ( $p<0.01$ ). Literatürde MTX'e bağlı karaciğer toksisitesinde Kupffer hücre proliferasyonu ile ilişkili çok az veri bulunmaktadır. Hall ve arkadaşları MTX'e maruz bırakılan ratlarda karaciğer histopatolojik incelemesinde Kupffer hücrelerinde artış olduğunu saptamışlardır (46). Rau ve arkadaşları çalışmalarında romatoid artrit nedeniyle uzun dönem MTX kullanan ve karaciğer biyopsisi yapılan olguları değerlendirmişlerdir. Bu olguların histopatolojik değerlendirmelerinde Kupffer hücre proliferasyonu saptamışlar fakat istatistiksel anlamlı farklılık gözlememişlerdir (73). Diğer histopatolojik değerlendirme Roenigk Sınıflaması'dır. Bu skorlama sistemine göre toplam 5 evre mevcuttur (Tablo 2) (35, 54). Çalışmamızda MTX uygulanan ratların %77.8'i evre 2 saptanmış olup bu farklılığın asıl sebebini nükleer pleomorfizm oluşturmaktadır.

Leflunomid antiinflamatuvar, antiproliferatif ve immünmodülatör etkileri olan ve romatoid artrit tedavisinde FDA tarafından onay alan bir ilaçtır. Hastalık modifiye edici ilaç özelliği ilk kez 1980'li yıllarda artrit ve otoimmünite ilişkili hayvan modellerinde gösterilmiştir. Sıçanlarda adjuvan artritini inhibe etmiş ve mitojenle

indüklenmiş lenfositlerin proliferasyonunu düzeltmiştir. Leflunomid bir ön ilaçtır. Aktif metaboliti A77 1726'dır. Bu metabolit esas olarak leflunomidin tüm in vivo aktivitesinden sorumludur (24). Leflunomidin etki mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. DHODH inhibisyonu ve tirozin kinaz inhibisyonu in vitro olarak tanımlanan iki etki mekanizmasıdır. Leflunomid selektif olarak DHODH enzimini inhibe eder. Bu enzim ribonükleotid rUMP ve ribonükleotid üridin trifosfat gibi pürimidin nükleotidlerin de novo biyosentezinde önem taşır ve romatoid artrit patogenezinde yer alan aktif T lenfositler ve hızlı proliferasyon alan hücreler tarafından kullanılır. A77 1726 daha yüksek konsantrasyonlarda tirozin kinazı inhibe eder. Tirozin kinaz hücre büyümesi ve aktif hücrelerin diferansiasyonu için esastır (57). Lökositlerden ROÜ salınımını inhibe eden leflunomid aynı zamanda antioksidan etkinliğe de sahiptir (58). Leflunomidin bir diğer önemli etkisi de NF-κB aktivasyonunu ve NF-κB bağımlı gen ekspresyonunu inhibe etmesidir (17).

Literatürde MTX dışında çeşitli deneysel karaciğer hasarı modellerinde leflunomidin etkinliğini araştıran çalışmalar mevcuttur. Yao ve arkadaşlarının çalışmasında ratlarda CCl4 veya immünolojik yolla oluşturulan karaciğer hasarında leflunomidin proinflatuar sitokin düzeyinde azalma, MDA ve NO düzeylerinde azalma ve antioksidan aktivitede artışa yol açtığı saptanmıştır (19). Karaman ve arkadaşları leflunomidin biliyer obstrüksiyonlu ratlardaki karaciğer hasarını iyileştirdiğini saptamışlardır (20). Imose ve arkadaşları concanavalin A ile farelerde hepatit oluşturdukları deneysel çalışmada leflunomidin NF-κB inhibisyonu aracılığıyla plazma TNF-α, IFN-γ ve IL-2 düzeylerinde azalmaya neden olduğunu saptamışlardır (59). Latchoumycandane ve arkadaşları leflunomidin aktif metaboliti olan A77 1726'nın stres aktive edici protein kinaz inhibisyonu aracılığıyla mitokondri aracılıklı hepatosit hücre ölümünü engellediğini saptamışlardır. Yaptıkları in vitro çalışmada leflunomidin stres aktive edici protein kinaz inhibisyonu aracılığıyla asetaminofene bağlı toksik karaciğer hasarını engellediğini saptamışlardır (74). Li ve arkadaşları yaptıkları in vitro çalışmada leflunomidin aktif metaboliti olan A77 1726 ile yapılan ön tedavinin hepatik stellate hücrelerde leptine bağlı metalloproteinaz 1 doku inhibitörü aktivitesini tamamen inhibe ettiğini saptamışlardır. Böylece leflunomidin leptine bağlı hepatik stellate hücre proliferasyonunu, hepatosit apoptozisini ve fibrojenik uyarıyı engellediğini

saptamışlardır (75). Literatürde MTX'e bağlı karaciğer toksisitesinin engellenmesinde leflunomidin etkinliğini araştıran herhangi bir çalışma yoktur. Bu çalışmada MTX'e bağlı toksik karaciğer hasarının engellenmesinde leflunomidin etkinliğini araştırmamızın nedenleri şunlardır:

- i. Glutasyon düzeylerinde azalmaya bağlı olarak hepatositlerin ROÜ'ne karşı hassas ve korumasız kalmaları MTX'e bağlı karaciğer toksisitesi oluşmasındaki önemli faktörlerden biridir (10-14). Leflunomid antioksidan etkinliğe sahiptir ve lökositlerden ROÜ'lerin salınımını inhibe eder (58).
- ii. MTX'e bağlı karaciğer toksisitesinde TNF- $\alpha$  rol oynamaktadır (51, 52). Leflunomid TNF- $\alpha$  düzeylerini azaltmakta ve TNF- $\alpha$ 'ya bağlı ROÜ'lerin salınımını inhibe etmektedir (18, 59).
- iii. Günümüzde MTX'e bağlı karaciğer hasarı ile ilgili yapılan çalışmalar apoptozis, proapoptotik gen ve faktörler üzerine yoğunlaşmıştır (15, 16). Apoptozise yol açan önemli mekanizmalardan birisi kaspaz aktivasyonudur (50). Leflunomid kaspaz aktivasyonunu engellemektedir (18).
- iv. Karaciğer hasarında temel olarak görev alan hücreler Kupffer hücreleridir. Kupffer hücrelerinin immünolojik fonksiyonlarının çoğu transkripsiyon faktörlerinden biri olan NF- $\kappa$ B üzerinde yüksek aktivite göstermesinden kaynaklanmaktadır (76). Leflunomid NF- $\kappa$ B aktivasyonunu ve NF- $\kappa$ B bağımlı gen ekspresyonunu inhibe etmektedir (17).

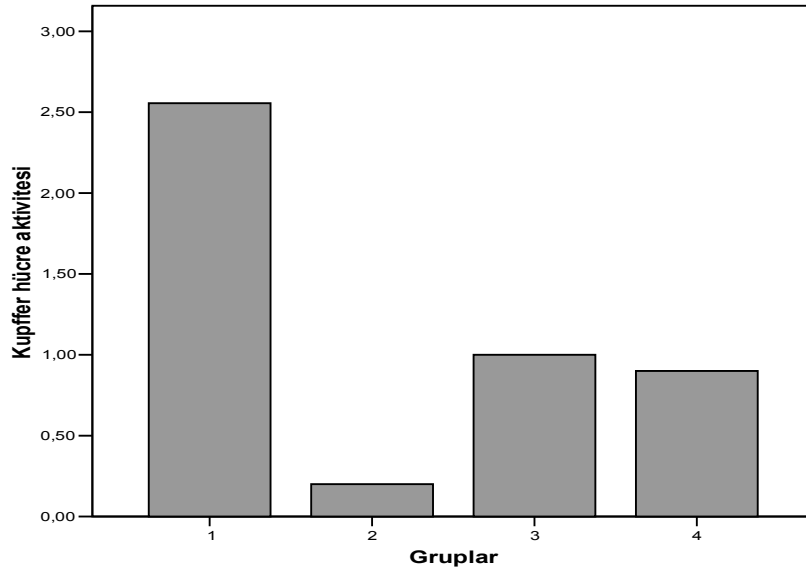
Çalışmamızda 2. grupta 20 mg/kg tek doz intraperitoneal MTX uygulamasını takiben 9 mg/kg/gün leflunomid 5 gün boyunca uygulanmıştır. Leflunomid dozu için Yao ve arkadaşlarının "Ratlarda CCL4 ile oluşturulan hepatik fibroziste leflunomidin inhibitör etkisi" isimli çalışması baz alınmıştır (65). Leflunomid ile tedavi MTX'e bağlı serum ALT ve ALP düzeylerindeki yükselmeyi istatistiksel anlamlı ölçüde azaltmıştır. Bununla birlikte serum AST düzeyleri benzer bulunmuştur. Bilindiği gibi ALT başlıca hepatosit sitozolunda bulunmakta ve diğer yapılarda çok düşük konsantrasyonda bulunmaktadır. AST'nin sitozolik ve



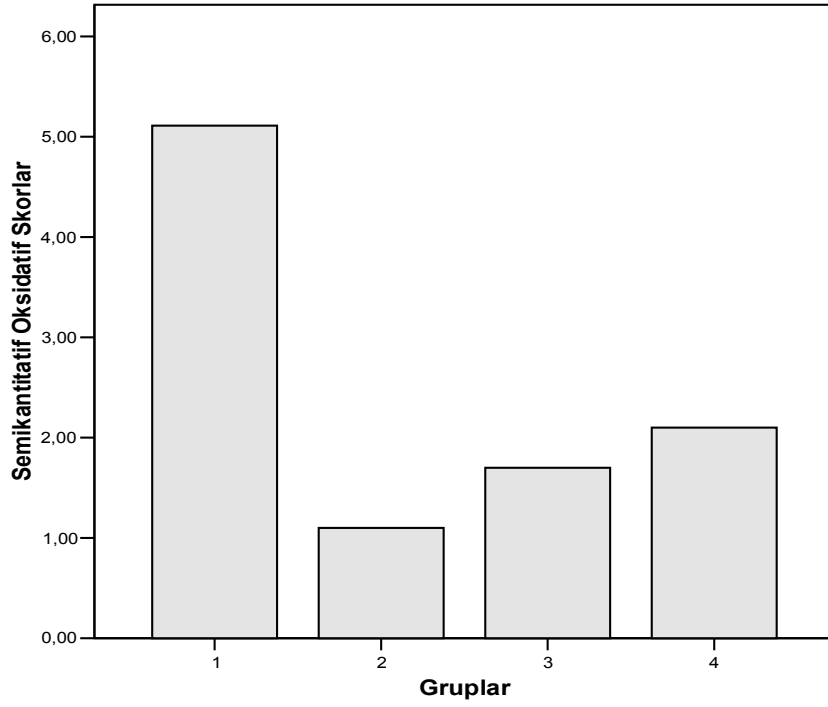
mitokondriyal formları mevcuttur. Karaciğer haricinde kalp, kas, böbrek, beyin, pankreas, akciğer, eritrosit ve lökosit yapısında da yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Bu nedenle ALT, karaciğer hasarı göstergesi olarak AST'den çok daha spesifiktir (77). Biz bu çalışmada leflunomid ile tedavi edilen grupta MTX uygulanan gruba göre ALT ve ALP değerlerinin daha düşük saptanmasını leflunomidin MTX'e karaciğer hasarını engellemesiyle ilişkili olduğunu düşünüyoruz. Buna rağmen serum AST düzeylerinin benzer saptanması AST'nin sitozolik ve mitokondriyal formlarının olması ve karaciğer dışı bir çok doku ve organda yüksek konsantrasyonda bulunmasıyla ilişkili olabilir. Leflunomid tedavisinin serum ALT ve ALP değerleri üzerindeki iyileştirici etkisine rağmen, transaminaz değerlerinin her zaman karaciğer histopatolojik durumunu yansıtmayacağı unutulmamalıdır (71, 72).

Çalışmamızda leflunomid ile tedavi grubu ve MTX uygulanan grup arasında doku MPO aktivitesi ve SOD düzeyleri benzer saptanmıştır. Bununla birlikte lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan doku MDA düzeyleri leflunomid uygulanan grupta anlamlı oranda yüksek saptanmıştır. Literatürde Karaman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ratlarda karaciğer iskemi reperfüzyon hasarının engellenmesinde leflunomidin etkinliği araştırılmıştır. Leflunomidin olumlu etkisi bulunmuş ve doku - MPO aktivitesi ve MDA düzeylerinde azalmaya yol açtığı saptanmıştır (78). Karaman ve arkadaşlarının bir diğer çalışmasında biliyer obstrüksiyonlu ratlarda leflunomidin karaciğer hasarı üzerinde iyileştirici etkisi bulunmuş ve yine doku MPO aktivitesi ve MDA düzeylerinde azalmaya yol açtığı saptanmıştır (20). Öztürk ve arkadaşlarının çalışmasında sepsise bağlı akut akciğer hasarının engellenmesinde leflunomidin etkisi araştırılmıştır. Leflunomidin akciğer MPO aktivitesi ve MDA düzeylerinde azalmaya yol açtığı saptanmıştır (79). Yao ve arkadaşlarının çalışmasında leflunomidin antioksidan etkinliği bildirilmiştir (19). Glutatyon düzeylerinde azalmaya bağlı olarak hepatositlerin ROÜ'ne karşı hassas ve korumasız kalmalarının MTX'e bağlı karaciğer toksisitesi oluşmasındaki önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir (10-14). Buna rağmen çalışmamızın sonuçlarına göre leflunomid, MTX'e bağlı karaciğer hasarında biyokimyasal olarak ölçülen oksidatif parametreler üzerinde herhangi bir olumlu etkide bulunmamaktadır.

MTX'e bağlı karaciğer toksisitesini saptamanın en kesin yolu karaciğer biyopsisi ve histopatolojik incelemedir (35, 44). Leflunomid ile tedavi MTX'e bağlı toksik karaciğer hasarını histopatolojik olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır. Semikantitatif oksidatif hasar skorları leflunomid ile tedavi edilen grupta tedavi edilmeyen gruba oranla anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ( $1.10 \pm SD 0.73$ ,  $5.1 \pm SD 2.02$ ,  $p < 0.01$ ). Bir diğer ilginç sonuçta leflunomid tedavisinin karaciğer Kupffer hücre proliferasyonunu MTX uygulanan gruba göre anlamlı derecede baskılamasıdır ( $0.2 \pm SD 0.6$ ,  $2.5 \pm SD 1.01$ ,  $p < 0.01$ ). Çalışmamızda leflunomid ile tedavi edilen gruptaki ratların tümü evre 1 saptanmış, MTX uygulanan ratların % 22.2'si evre 1, % 77.8'i evre 2 saptanmıştır. Bu farklılığın temel nedeni MTX uygulanan grupta histopatolojik değerlendirmede nükleer pleomorfizmin saptanmasıdır. Leflunomid histopatolojik olarak MTX'e bağlı nükleer pleomorfizmi azaltmıştır. Karaciğer Kupffer hücre aktivasyonu ve semikantitatif oksidatif skorlar üzerine leflunomidin etkisi şekil 5 ve şekil 6'da gösterilmiştir.



**şekil-5** Kupffer hücre proliferasyonu üzerine leflunomidin etkisi  
Leflunomid ile tedavi (2. grup), methotreksata bağlı Kupffer hücre proliferasyonunu (1. grup) belirgin şekilde azaltmıştır ( $p < 0.01$ ).



**Şekil-6** Semikantitatif Skorlar üzerine leflunomidin etkisi  
 Leflunomid ile tedavi (2. grup), methotreksata bağlı histopatolojik semikantitatif oksidatif skor yüksekliğini (1. grup) belirgin şekilde azaltmıştır ( $p < 0.01$ ).

Çalışmamızda leflunomid ile tedavi uygulanan grupta MTX uygulanan gruba göre doku MPO aktivitesi ve SOD düzeyleri benzer bulunmuştur. Bununla birlikte doku MDA düzeyleri istatistiksel anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Leflunomidin MTX'e bağlı histopatolojik karaciğer hasarını istatistiksel anlamlı şekilde iyileştirmesine rağmen doku MPO ve SOD düzeylerinin benzer, hatta MDA düzeylerinin yüksek saptanması leflunomidin MTX'e bağlı toksik karaciğer hasarındaki iyileştirici etkisinin antioksidan etkisinden bağımsız olabileceğini düşündürür niteliktedir.

Literatüre bakıldığında MTX dışında farklı nedenlere bağlı karaciğer hasarında leflunomidin etkinliğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Yao bir çalışmasında immünolojik karaciğer hasarında leflunomidin etkinliğini araştırmıştır. Leflunomidin TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi sitokin düzeyleri ve transaminaz düzeyleri üzerine olumlu etkisini saptamıştır. Karaciğerde TNF- $\alpha$ 'nın major kaynağının Kupffer hücreleri olması nedeniyle leflunomidin Kupffer hücre inhibisyonu aracılığıyla iyileştirici etki gösterdiğini bildirmiştir (19). Yao diğer bir çalışmasında CCL4 ile oluşturulan hepatik fibroziste leflunomidin inhibitör etkisi olduğunu saptamıştır. Bu

etkinliğin leflunomidin NF-κB aktivasyonu üzerine olan inhibitör etkinliği ile ilişkili olabileceğini bildirmiştir (65). Yao inflamatuvar karaciğer hasarında leflunomidin etkinliğini araştıran in vitro bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada leflunomidin karaciğer Kupffer hücreslerinden proinflamatuvar sitokin salınımını inhibe ederek etki gösterdiğini ortaya koymuştur (80). Li ve arkadaşları leptine bağlı hepatik fibrozis üzerinde leflunomidin etkinliğini araştırmışlardır. Leflunomidin hepatik stellate hücre proliferasyonunu inhibe ederek hepatik fibrozisi engellediğini saptamışlardır (75). Tang ve arkadaşları güncel bir çalışmalarında leflunomidin karaciğer fibrozisinde anti-fibrotik etkisi olduğunu saptamışlardır. Leflunomidin Kupffer hücreleri tarafından indüklenen ve aktive olan hepatik stellate hücrelerde apoptozise yol açarak fibrozisi engellediğini saptamışlardır (81). Tüm bu çalışmalardan anlaşıldığı gibi nedeni ne olursa olsun karaciğer hasar mekanizmasında ve fibrozisinde Kupffer hücre aktivasyonu büyük bir önem taşımaktadır.

Bilindiği gibi Kupffer hücreleri karaciğer makrofajlarıdır ve karaciğer non parankimal hücrelerinin %20'sini oluşturmaktadır. Kupffer hücrelerinin immünolojik fonksiyonlarının çoğu transkripsiyon faktörlerinden biri olan NF-κB üzerinde yüksek aktivite göstermesinden kaynaklanmaktadır (82). Yapılan bir çok alışma NF-κB aktivasyonunu inhibe eden ilaçların karaciğer hasarı üzerine iyileştirici etkisi olduğunu göstermiştir (83).

NF-κB tüm vücutta yaygın olarak bulunan, inflamasyon, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, akut faz yanıtı, proliferasyon, apoptozis, doku hasarı ve doku tamiri ile ilişkili çok sayıda gen ekspresyonunda temel düzenleyici olarak görev alan bir transkripsiyon faktörüdür (76). İnflamatuvar bir uyarıya yanıt olarak gelişen sitokin ve kemokin ekspresyonu temel olarak transkripsiyon faktörleri ile düzenlenmektedir. Sitokin indüksiyonunun temel düzenleyicisi hücre içi sinyalizasyon yolağında görev alan bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB'dir (84). NF-κB NF-κB/Rel ailesine ait dimerik yapıda alt ünitelerden oluşmuştur. Bu alt üniteler NF-κB1 (p50 ve öncüsü p105), NF-κB2 (p52 ve öncüsü p100), p65 (RelA), RelB ve RelC'den oluşmaktadır (85). NF-κB fizyolojik ve patolojik durumlarda indüklenebilir transkripsiyon faktörü olması nedeniyle inflamatuvar ve immün yanıtla ilişkili bir çok durumda temel rol

oyun. Normalde NF- $\kappa$ B hücre sitoplazmasında  $\kappa$ B inhibitörleri (İ $\kappa$ B) ile birlikte sekestre halde ve inaktif formda bulunmaktadır. Hücreler sitokin, lipopolisakkarid ve ROÜ gibi herhangi bir uyararla stümüle oldukları zaman İ $\kappa$ B'ler (İ $\kappa$ B $\alpha$  ve İ $\kappa$ B $\beta$ ) İ $\kappa$ B kinaz (İKK) ile hızla fosforilize edilir. İ $\kappa$ B'lerin fosforilize ve degrade olmalarının sonucunda nükleer translokasyon sinyali maskelenmekten kurtulur. Böylece NF- $\kappa$ B hücre nükleusuna transloke olur ve hedef gen transkripsiyonlarını aktive eder. NF- $\kappa$ B IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi proinflamatuvar moleküllerin, E-selectin, intrasellüler adezyon molekülü 1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1) gibi hücre yüzey adezyon moleküllerinin ve major histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I ve II gibi hücre yüzey mediatörlerinin gen transkripsiyonlarında görev almaktadır (84).

NF- $\kappa$ B aktivasyonu için İ $\kappa$ B $\alpha$ 'nin fosforilize olarak proteolitik degradasyona uğraması ve p65 subünitesinin nükleusa transloke olması gerekmektedir. Leflunomid İ $\kappa$ B $\alpha$ 'nin fosforilize olarak proteolitik degradasyona uğramasını engellemektedir. Böylece NF- $\kappa$ B aktivasyonu için esas olan p65 subünitesinin hücre translokasyonu inhibe olmaktadır (17). Leflunomidin NF- $\kappa$ B aktivasyonunu inhibe edici etkisi hücre spesifik değildir. Myeloid, epitelyal, glioma ve T hücrelerinin tümünde bu etki gözlenmektedir. Leflunomidin NF- $\kappa$ B aktivasyonunu inhibe edici etkisi DHODH inhibisyonundan bağımsız olup daha kısa sürede ve daha düşük konsantrasyonlarda gerçekleşmektedir (18).

Sonuç olarak çalışmamız leflunomidin MTX'e bağı toksik karaciğer hasarını hem histopatolojik hem de biyokimyasal olarak engellediğini ortaya koymuştur. Sonuçlarımız leflunomidin bu etkisinin antioksidan özelliğinden bağımsız olduğunu düşündürür niteliktedir. Literatürde MTX'e bağı karaciğer toksisitesinde Kupffer hücre aktivasyonu ile ilişkili çok az veri bulunmaktadır. Üstelik mevcut çalışmaların sonuçları istatistiksel anlamlı farklılık göstermemektedir (46, 86). Çalışmamızın sonuçlarına göre MTX'e bağı karaciğer toksisitesinde Kupffer hücre proliferasyonunu kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Leflunomid ile tedavi MTX'e bağı artmış Kupffer hücre proliferasyonunu istatistiksel anlamlı olarak baskılamaktadır.

Leflunomidin MTX'e bağlı toksik karaciğer hasarı üzerindeki iyileştirici etkisinin en muhtemel nedenleri NF-κB aktivasyonu üzerine olan inhibitör etkisi ve Kupffer hücre proliferasyonunu baskılamasıdır. Leflunomidin MTX'e bağlı toksik karaciğer hasarı üzerindeki iyileştirici etkisinin muhtemel diğer nedenleri aktif metaboliti olan A77 1726'nın stres aktive edici protein kinaz inhibisyonu aracılığıyla mitokondri aracılıklı hepatosit hücre ölümünü engellemesi, kaspaz aktivasyonunu engellemesi, hepatik stellate hücre proliferasyonunu, hepatosit apoptozisini ve fibrojenik uyarıyı inhibe etmesi olabilir. Karaciğer dokusunda NF-κB aktivasyonunun ve diğer belirtilen parametrelerin teknik nedenlerle değerlendirilememesi çalışmamızın eksikliğidir. Leflunomidin MTX'e bağlı karaciğer hasarını kesin olarak hangi mekanizma ile engellediğini gösteren, karaciğerde NF-κB aktivasyonunun, kaspaz aktivasyonunun, apoptozis derecesinin, stres aktive edici protein kinaz aktivitesinin, hepatik stellate hücre proliferasyonunun değerlendirildiği yeni deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada ratlarda MTX ile oluşturulan toksik karaciğer hasarında leflunomidin muhtemel önleyici etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

20 mg/kg intraperitoneal tek doz MTX uygulamasını takiben ratlarda biyokimyasal olarak ALT, ALP yüksekliği ve histopatolojik karaciğer değişiklikleri ile karakterize toksisite oluşturuldu.

MTX'e bağlı karaciğer toksisitesinde Kupffer hücre proliferasyonda artış gözlemlendi.

Leflunomid MTX'e bağlı serum ALT ve ALP seviyelerindeki yükselmeyi engelledi. Bununla birlikte serum AST seviyeleri benzer bulundu.

Leflunomid MTX'e bağlı hepatik MPO ve SOD seviyelerinde değişikliğe neden olmamakla birlikte MDA düzeylerinde artışa neden oldu.

Leflunomid MTX'e bağlı karaciğerin histopatolojik hasarını semikantitatif oksidatif skorlama sistemine göre anlamlı oranda baskıladı.

Leflunomid MTX'e bağlı Kupffer hücre proliferasyonunu anlamlı oranda baskıladı.

Leflunomid Roenigk Sınıflaması'na göre MTX'e bağlı karaciğerin histopatolojik hasar evresini gerilettili.

Sonuç olarak bulgularımız bize leflunomidin MTX'e bağlı karaciğer toksisitesini engellediğini düşündürmüştür. Bu etki muhtemelen leflunomidin antioksidan etkisinden bağımsız görünmektedir. Leflunomidin Kupffer hücre proliferasyonunu engellemesi bu iyileştirici etkinin bir nedenidir. Leflunomidin NF- $\kappa$ B üzerine olan etkisi bu iyileştirici etki ile ilişkili olabilir.

## ÖZET

### **RATLARDA METHOTREKSATA BAĞLI KARACİĞER TOKSİSİTESİNDE LEFLUNOMİDİN MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI: DENEYSEL BİR ÇALIŞMA**

DR. UFUK KUTLUANA

Methotreksat (MTX)'e bağlı karaciğer toksisitesi bu immunsupresif ilacın klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Bu çalışmada MTX'e bağlı karaciğer toksisitesinde leflunomidin muhtemel koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık

Wistar tip ratlar (n = 40) 4 gruba ayrıldı. Birinci grup MTX , 2. grup MTX + leflunomid, 3. grup leflunomid, 4. grup kontrol ( ya da taşıyıcı) grubunu oluşturmaktaydı. MTX intraperitoneal olarak injekte edildi. Tek doz MTX uygulamasını takiben (serum fizyolojik içinde 20 mg/kg), ya leflunomid (9 mg/kg, MTX + leflunomid grubu) ya da taşıyıcı (MTX grubu) intragastrik olarak 5 gün boyunca verildi. Leflunomidin su içinde erimemesi nedeniyle %1 karboksi metil selüloz (CMC) taşıyıcı olarak kullanıldı. Diğer ratlarda tek doz intraperitoneal serum fizyolojik uygulamasını takiben ya CMC (kontrol grubu) ya da leflunomid (9 mg/kg, leflunomid grubu) 5 gün boyunca intragastrik olarak uygulandı. Ardışık 5 günün sonunda ratlar dekapitasyonla sakrifiye edildi. Dekapitasyon sonrası intrakardiyak kan örneği alındı ve hepatik doku örnekleri çıkartılarak malondialdehid (MDA) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ve myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi değerlendirilmesi amaçlı muhafaza edildi. Karaciğer doku örnekleri aynı zamanda histopatolojik olarak değerlendirildi. Serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve alkalen fosfataz (ALP) değerleri ölçüldü.

Leflunomid tedavisinin, tedavi uygulanmayan MTX grubu ile karşılaştırıldığında hepatik histopatolojik skoru anlamlı ölçüde iyileştirdiği görüldü. Serum ALT ve ALP seviyeleri MTX + leflunomid grubunda MTX grubuna göre anlamlı ölçüde düşük bulundu. Hepatik MPO ve SOD seviyeleri MTX + leflunomid ve MTX gruplarında benzer düzeylerde bulundu. Hepatik MDA düzeyleri MTX + leflunomid grubunda MTX grubundan yüksekti. Bu sonuçlar bize leflunomidin



MTX'e baęlı karacięer toksisitesi üzerindeki iyileřtirici etkisinin antioksidan etkisinden baęımsız olduęunu dūřündürdü. Leflunomidin MTX'e baęlı karacięer toksisitesini önleyici etkisinin nükleer faktör kappa B (NF-κB) üzerine olan etkisiyle baęlantılı olduęunu dūřündük.

Sonuç olarak leflunomid MTX'e bağlı histolojik karaciğer hasarını anlamlı ölçüde iyileştirdi. Leflunomid MTX'e bağlı karaciğer toksisitesini önleyebilir.

## SUMMARY

### **THE INVESTIGATION OF POSSIBLE PROTECTIVE AFFECT OF LEFLUNOMIDE ON METHOTREXATE INDUCED LIVER TOXICITY: AN EXPERIMENTAL STUDY**

UFUK KUTLUANA MD

Methotrexate (MTX) induced hepatotoxicity restricts the clinical use of this immunosuppressive drug. In this study, we aimed to research the possible protective effect of Leflunomide on MTX induced hepatotoxicity.

Wistar type rats (n = 40) were divided into four groups; group 1 as the MTX , group 2 as the MTX + leflunomide, group 3 as the leflunomide, group 4 as the control ( or vehicle). MTX was injected intraperitoneally. Following a single dose of MTX (in physiological saline, 20 mg/kg), either leflunomide (9 mg/kg, MTX + leflunomide group) or vehicle (MTX group) was administered intragastrically for the consecutive 5 days. Leflunomide was insoluble in water therefore 1% sodium carboxymethylcellulose (CMC) was used as a vehicle. In other rats, CMC (control or vehicle group) or leflunomide (9 mg/kg, leflunomide group) was was administered intragastrically for 5 days, following a single dose of saline injection. After 5 days, all the rats were sacrificed by decapitation. After decapitation of the rats, intracardiac blood was collected and hepatic tissue samples were carefully dissected and stored for the determination of tissue malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) levels, myeloperoxidase (MPO) activity. Tissue samples were also examined histopathologically. Levels of serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) were measured.

Leflunomide treatment significantly ameliorated histopathological score compared to untreated MTX group. The serum ALT and ALP levels in MTX + leflunomide group were significantly lower than MTX group. The hepatic SOD and MPO levels were similar between MTX + leflunomide and MTX groups. The hepatic MDA level in MTX + leflunomide group was higher than MTX group. These results suggest that the ameliorative affect of leflunomide on MTX induced liver toxicity was independent from its antioxidant activity. We thought that the preventive affect

of leflunomide on the MTX induced liver toxicity may be related to its affect on nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B).

Finally, leflunomide significantly ameliorated MTX induced histologic hepatic injury. Leflunomide can inhibit MTX induced liver toxicity.

## KAYNAKLAR

1. Schilsky RL. Methotrexate: An Effective Agent for Treating Cancer and Building Careers. The Polyglutamate Era. *Stem Cells* 1996;14: 29-32.
2. Naldi L, Griffiths CE. Traditional therapies in the management of moderate to severe chronic plaque psoriasis: an assessment of the benefits and risks. *Br J Dermatol* 2005;52: 597–615.
3. Wu JJ, Schiff KR. Sarcoidosis. *Am Fam Physician* 2004;70: 312–322.
4. Feagan BG, Alfadhli A. Methotrexate in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2004;33: 407–420.
5. Langford CA. Management of systemic vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15: 281–297.
6. Friis H, Andreassen PB. Drug-induced hepatic injury: an analysis of 1,100 cases reported to the Danish Committee on Adverse Drug Reactions between 1978 and 1987. *J Intern Med* 1992;232: 133–138.
7. Tsurusawa M, Saeki K, Fujimoto T. Differential induction of apoptosis on human lymphoblastic leukemia Nalm-6 and Molt- 4 cells by various antitumor drugs. *Int J Hematol* 1997;66: 79–88.
8. Kremer JM, Alarcon GS, Lightfoot RW Jr, Willkens RF, Furst DE, Williams HJ. et al. Methotrexate for rheumatoid arthritis: suggested guidelines for monitoring liver toxicity. *Am Coll Rheumatol Arthritis Rheum* 1994;37: 316–328.
9. Kamen BA, Nylén PA, Camitta BM, Bertino JR. Methotrexate accumulation and folate depletion in cells as a possible mechanism of chronic toxicity to the drug. *Br J Haematol* 1981;49: 355–360.
10. Cody V, Luft JR, Pangborn W. Understanding the role of Leu22 variants in methotrexate resistance: comparison of wild-type and Leu22Arg variant mouse and human dihydrofolate reductase ternary crystal complexes with methotrexate and NADPH. *Acta Cryst* 2005;61: 147-155.
11. Borg EJ, Seldenrijk CA, Timmer R. Liver cirrhosis due to methotrexate in a patient with rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 1996;49: 244–246.

12. Videla LA, Correa L, Rivera M, Sir T. Zymosan-induced luminol-amplified chemiluminescence of whole blood phagocytes in experimental and human hyperthyroidism. *Free Radic Biol Med* 1993;14: 669–675.
13. Van Dyke K, Patel S, Vallyathan V. Lucigenin chemiluminescence assay as an adjunctive tool for assessment of various stages of inflammation: a study of quiescent inflammatory cells. *J Biosci* 2003;28: 115–119.
14. Lucas M, Solano F. Coelenterazine is a superoxide anionsensitive chemiluminescent probe: its usefulness in the assay of respiratory burst in neutrophils. *Anal Biochem* 1992;206: 273–277.
15. Manuela GN, Ross GC, Julia AH, Gady GK, Izabella MM, Neil HS. Inducers of Cytochrome P450 2E1 Enhance Methotrexate-Induced Hepatocytotoxicity *Clinical Biochemistry* 1999;32: 519–536.
16. Kobayashi K, Terada C, Tsukamoto I. Methotrexate-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy. *European Journal of Pharmacology* 2002;438: 19–24.
17. Manna SK, Aggarwal BB. Immunosuppressive Leflunomide Metabolite (A77 1726) Blocks TNF- dependent Nuclear Factor-kB Activation and Gene Expression. *The Journal of Immunology* 1999;162: 2095–2102.
18. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Leflunomide Suppresses TNF-Induced Cellular Responses: Effects on NF-kB, Activator Protein-1, c-Jun N-Terminal Protein Kinase, and Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 2000;165: 5962–5969.
19. Yao HW, Li J, Jin Y. Effect of leflunomide on immunological liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 2003;9: 320–323.
20. Karaman A, Iraz M, Kirimlioglu H, Karadag N, Tas E, Fadillioglu E. Hepatic damage in biliary-obstructed rats is ameliorated by leflunomide treatment. *Pediatr Surg Int* 2006;229: 701-708.
21. Sausville EA, Longo DL. *Kanser Tedavisinin Prensipleri*. Editör: Sağlıkker Y. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul, 2004: 530-547.
22. Jollivet J, Cowan, K. The Pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Eng J Med* 1999;309: 1094-1104.

23. Bram J, Allegra CJ, Fine RL, Chabner BA. Effects of methotrexate on intracellular folate pools in purified myeloid precursor cells from normal bone marrow. *J Clin Invest* 1987;79: 692-697.
24. Bodur H. Romatoid Artrit Tedavisinde Methotreksat ve Leflunomid. *Romatizma*; 2006;21: 60-66.
25. O'Dell JR. Methotrexate, leflunomide, and combination therapies. In: Harris ED, Budd RC, Firestein GS, Genovese MC, Sergent JS, Ruddy S, Sledge CB Kelley's Textbook of Rheumatology. Seventh edition. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2005: 900-919.
26. Heinle W, Welsh AD. Experiments with pteroylglutamic acid and pteroylglutamic acid deficiency in human leukemia. *J Clin Invest* 1948;27: 539.
27. Sheldon JR, Quintero CE. Advancements in the Treatment of Psoriasis: Role of Biologic Agents. *J Manag Care Pharm* 2004;10: 318-325.
28. Doan T, Massarotti E. Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies. *J. Clin. Pharmacol* 2005;45: 751–762.
29. Bannwarth, B, Labat L, Moride Y, Schaeffer T. Methotrexate In rheumatoid arthritis. *Drugs* 1994;47: 25-50.
30. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and Managing Methotrexate Nephrotoxicity *The Oncologist* 2006;1: 694–703.
31. Nagakubo J, Tomimatsu T, Kitajima M, Takayama H, Aimi N, Horie T. Characteristics of transport of fluoresceinated methotrexate in rat small intestine. *Life Sci* 2001;69: 739–747.
32. Sotos GA., Liebmann JE, Kohler DR, Longo DL. Reactivation of thermal burn by methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 1992;84: 1936-1938.
33. Schoenfeld, A, Mashiach R, Vardy M, Ovadia J. Methotrexate pneumonitis in nonsurgical treatment of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol* 1992;80: 520-521.
34. Kovacs GT, Paal C, Somlo P. Proteinuria due to suboptimal hydration with high-dose methotrexate therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;33: 262-263.
35. Lindsay K, Fraser AD, Layton A, Goodfield M, Gruss H, Gough A. Liver fibrosis in patients with psoriasis and psoriatic arthritis on long-term, high cumulative dose methotrexate therapy. *Rheumatology* 2009;48:569–572.

36. Arbak S. Karaciğer Safra Kesesi ve Safra Kanal Sistemi'nin Gelişmesi. Editörler: Tözün N, Şimşek H, Özkan H, Şimşek İ, Gören A. Klinik Gastroenteroloji ve Hepatoloji Ankara MN Medikal, Nobel 2007: 301-303.
37. Wanless IR. Anatomy, Histology, Embryology, and Developmental Anomalies of the Liver. Feldman: Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 8th edition 2006:1543-1549.
38. Ökten A. Karaciğerin Fonksiyonel Anatomisi. Editör: Ökten A. Gastroenterohepatoloji İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları Nobel Tıp Kitabevleri 2001: 311-314.
39. Sherlock S, Dooley J. Anatomy and Function. Disease of Liver and Biliary System. 10th edition Blackwell Science Ltd. 1997: 1-15.
40. Ökten A. İkterler. Editör: Ökten A. Gastroenterohepatoloji İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları Nobel Tıp Kitabevleri 2001: 329-336.
41. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. The liver As An Organ. 9th edition, Philadelphia: WB Saunders Company, 1996: 883-888.
42. Beyeler C, Reichen J, Thomann SR, Lauterburg BH, Gerber NJ. Quantitative liver function in patients with rheumatoid arthritis treated with low-dose methotrexate: A longitudinal study. Br. J. Rheumatol 1997;36: 338-344.
43. Boffa MJ, Chalmers RJ, Haboubi NY, Shomaf M and Mitchell DM. Sequential liver biopsies during long-term methotrexate treatment for psoriasis: A reappraisal. Br J Dermatol 1995;133: 774-778.
44. Malatjalian DA, Ross JB, Williams CN, Colwell SJ, Eastwood BJ. Methotrexate hepatotoxicity in psoriatics: Report of 104 patients from Nova Scotia, with analysis of risks from obesity, diabetes and alcohol consumption during long term follow-up. Can J Gastroenterol 1996;10: 369-375.
45. Richard S, Guerret S, Gerard F, Tebib JG, Vignon E. Hepatic fibrosis in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate: Application of a new semi-quantitative scoring system. Rheumatology (Oxford) 2000;39: 50-54.
46. Hall PD, Jenner MA, Ahern MJ. Hepatotoxicity in a rat model caused by orally administered methotrexate. Hepatology 1991;14: 906-910.

47. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;1: 98–105.
48. Levy MT, McCaughan GW, Marinos G, Gorrell MD. Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection. *Liver* 2002;22: 93–101.
49. Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 1992;11: 121–139.
50. Los M, Herr I, Friesen C, Fulda S, Schulze OK, Debatin KM. Cross-resistance and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases). *Blood* 1997;90: 3119–3129.
51. Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkiewicz IM, Shear SH. Inducers of Cytochrome P450 2E1 Enhance Methotrexate-Induced Hepatocytotoxicity. *Clinical Biochemistry* 1999;32: 519–536.
52. Kobayashi K, Terada C, Tsukamoto I. Methotrexate-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy. *European Journal of Pharmacology* 2002;438: 19–24.
53. Gawkrödger DJ. Current management of psoriasis. *J Dermatol Treat* 1997;8: 27-55.
54. Roenigk HH, Auerbach R, Maibach HI, Weinstein G, Lebwohl M. Methotrexate in psoriasis: consensus conference. *J Am Acad Dermatol* 1998;38: 478–485.
55. Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M. et al. Role of Ursodeoxycholic Acid in Prevention of Methotrexate-induced Liver Toxicity. *Dig Dis Sci* 2008;53: 1071–1077.
56. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit* 2006;12: 274-278.
57. Li EK, Tam LS, Tomlinson B. Leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clinical Therapeutics* 2004;26: 447-459.
58. Bartlett RR, Anagnostopoulos H, Zielinski T. Effects of Leflunomid on immune responses and models of inflammation. *Springer Semin Immunopathol* 1993;14: 381–394.



59. Imose M, Nagaki M, Kimura K, Takai S, Imao M, Naiki T. et al. Leflunomide Protects From T-Cell–Mediated Liver Injury in Mice Through Inhibition of Nuclear Factor Kappa B. *Hepatology* 2004;40: 1160 –1169.
60. Cohen S, Cannon GW, Schiff M. Two-year, blinded, randomized, controlled trial of treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide compared with methotrexate. Utilization of Leflunomide in the Treatment of Rheumatoid Arthritis Trial Investigator Group. *Arthritis Rheum* 2001;44: 1984–1992.
61. Scott DL, Smolen JS, Kalden JR. Treatment of active rheumatoid arthritis with Leflunomid: two year follow up of a double blind, placebo controlled trial versus sulfasalazine. *Ann Rheum Dis* 2001;60: 913–923.
62. O'Dell JR. Methotrexate, Leflunomide, and combination therapies. Editors: Harris ED, Budd RC, Firestein GS, Genovese MC, Sargent JS, Ruddy S. et al. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Seventh edition. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2005: 900-919.
63. Simon LS. The treatment of rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2004;18: 507-38.
64. Madison P, Kiely P, Kirkham B, Lawson T, Moots R, Proudfoot D. Leflunomide in rheumatoid arthritis: recommendations through a process of consensus. *Rheumatol* 2005;44: 280-286.
65. Yao HW, Li J, Chen JQ, Xu SY. Inhibitory effect of Leflunomide on hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25: 915-920.
66. Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, Yagi N, Arai M, Nakamura Y. et al. Neutrophils, Lipid Peroxidation, And Nitric Oxide In Gastric Reperfusion Injury In Rats. *Free Radical Biology & Medicine* 1998;24: 494–502.
67. Yagi K. Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal, and pancreatic diseases. *Adv Exp Med Biol* 1994;366: 165-169.
68. Oberly LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1998;34: 497-500.
69. Demling R, Lalonde C, Knox J, Youn Y, Zhu D, Daryani R. Fluid resuscitation with deferoxamine prevents systemic burn-induced oxidant injury. *J Trauma* 1991;31: 38– 44.

70. Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kacmaz A. et al. Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today* 2005;35: 52– 59.
71. Ahern MJ, Smith MD, Roberts-Thomson PJ. Methotrexate hepatotoxicity: what is the evidence? *Inflamm Res* 1998;47: 148–151.
72. Moix FM, Raufman JP. The role of liver biopsy in the evaluation of liver test abnormalities. *Clinical Cornerstone* 2001;3: 13-23.
- 73 . Rau R, Karger T, Herborn G, Frenzel H. Liver biopsy findings in patients with rheumatoid arthritis undergoing longterm treatment with methotrexate. *J Rheumatol* 1989;16: 489-493.
74. Latchoumycandane C, Seah QM, Tan RC, Sattabongkot J, Beerheide W, Boelsterli UA. Leflunomide or A77 1726 protect from acetaminophen-induced cell injury through inhibition of JNK-mediated mitochondrial permeability transition in immortalized human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006;217: 125–133.
75. Li J, Si HF, Lü X, Guo A, Jiang H. Suppressive effects of leflunomide on leptin-induced TIMP-1 production involves on hepatic stellate cell proliferation and apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 2008;580: 63–69.
76. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol* 2002;3: 221–227.
77. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med* 2000;342: 1266-1271.
78. Karaman A, Fadilloğlu E, Türkmen E, Taş E, Yılmaz Z. Protective effects of Leflunomide against ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Pediatr Surg Int* 2006; 22: 428–434.
79. Öztürk E, Demirbilek S, Bege EZ, Sürücü M, Fadilloğlu E, Kırımlıoğlu H. et al. Does Leflunomide attenuate the sepsis-induced acute lung injury? *Pediatr Surg Int* 2008;24: 899–905.
80. Yao HW, Li J, Chen JQ, Xu SY Leflunomide attenuates hepatocyte injury by inhibiting Kupffer cells. *World J Gastroenterol* 2004;10: 1608-1611.

81. Tang X, Yang J, Li J. Accelerative effect of Leflunomide on recovery from hepatic fibrosis involves TRAIL-mediated hepatic stellate cell apoptosis. *Life Sciences* 2009;84: 552–557.
82. Mackay IR. Hepatoimmunology: a perspective. *Immunol. Cell Biol* 2002;80: 36–44.
83. Muriel P. NF- $\kappa$ B in liver diseases: a target for drug therapy. *J Appl Toxicol* 2009;29: 91-100.
84. Barnes PJ, Karin M. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Engl J Med* 1997;336: 1066-1071.
85. Baldwin AS Jr. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14: 649-683.