

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**METOTREKSAT KAYNAKLI KARACİĞER VE
BÖBREK HASARINDA MİSOPROSTOLÜN
KORUYUCU ETKİSİ**

Dr. Halil AŞCI

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Kaya ÖZER

ISPARTA 2010

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**METOTREKSAT KAYNAKLI KARACİĞER VE
BÖBREK HASARINDA MİSOPROSTOLÜN
KORUYUCU ETKİSİ**

Dr. Halil AŞCI

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Kaya ÖZER

ISPARTA 2010

ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Mehmet Kaya ÖZER'e, uzmanlık eğitimim boyunca bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ekrem ÇİÇEK'e, laboratuvar çalışmaları kapsamında histolojik değerlendirme için Doç. Dr. Meral ÖNCÜ'ye, biyokimyasal değerlendirme için Yrd. Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU'na, istatistik analizlerinin yapılmasında katkıda bulunan Yrd. Dr. Esin KULAÇ'a kıymetli zamanlarını ayırdıkları için teşekkür ederim.

Deneylerin yapılması sırasında beni destekleyen Öğr. Gör. İbrahim ONARAN'a, Farmakoloji Anabilim Dalından Arş. Gör. Dr. Mehtap SAVRAN ve Arş. Gör. Şükriye YEŞİLOT'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Arş. Gör. Aydın CANDAN'a, Deney Hayvanları Laboratuvarından İbrahim ULUSOY'a teşekkürü bir borç biliyorum

Tüm bu tez aşamaları sürerken her an benim yanımda olan sevgili eşim Dr. Sanem AŞCI'ya da çok teşekkür ederim.

Dr. Halil AŞCI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER, TABLOLAR VE RESİMLER DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. ANTİNEOPLASTİK İLAÇLARIN SINIFLANDIRILMASI	2
2.1.1. Alkilleyici İlaçlar	2
2.1.2. Antimetabolitler	4
2.1.3. Vinka Alkaloidleri ve Bitkisel Kaynaklı Diğer İlaçlar	5
2.1.4. Sitotoksik Antibiyotikler	7
2.1.5. Sisplatin ve Karboplatin.....	8
2.1.6. L-Asparaginaz	9
2.1.7. Hormonlar ve Hormon Antagonistleri.....	10
2.1.8. Diğer Antineoplastik ilaçlar	12
2.2. METOTREKSAT	13
2.2.1. Etki mekanizması	13
2.2.2. Endikasyonları.....	14
2.2.3. Yan tesirler	15
2.3. MİSOPROSTOL	16
2.3.1. PGE1.....	16
2.3.2. Etki Mekanizması.....	19
2.3.3. Endikasyonları.....	19
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. MATERYAL	20
3.1.1. Deney Hayvanları	20
3.1.2. Kullanılan İlaçlar	20
3.1.3. Biyokimyasal Çalışma için Kullanılan Malzemeler	20
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler	21

3.2. METOD.....	22
3.2.1. Deney Planı.....	22
3.2.2. Biyokimyasal Çalışmalar.....	24
3.2.2.1. Dokuların biyokimyasal ölçümlere hazırlanması.....	24
3.2.2.2. SOD Aktivitesinin Ölçümü.....	24
3.2.2.3. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü.....	25
3.2.2.4. Lipid Peroksidasyonunun Tayini.....	26
3.2.3. Doku Takip Çalışmaları.....	27
3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Biyokimyasal bulgular.....	29
4.1.1. Biyokimyasal Karaciğer bulguları.....	29
4.1.2. Biyokimyasal Böbrek bulguları.....	30
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	32
4.2.1. Histopatolojik Karaciğer bulguları.....	32
4.2.2. Histopatolojik Böbrek Bulguları.....	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	40
ÖZET.....	42
SUMMARY.....	43
KAYNAKLAR.....	44

SİMGE VE KISALTMALAR

AST	Aspartat Transaminaz
Ca	Karsinom
CAT	Katalaz
H.E.	Hemotoksilen Eosin
INR	İnternational Normalised Ratio
KC	Karaciğer
MDA	Malondialdehid
MTX	Metotreksat
ROS	Reaktif Oksijen Radikalleri
SOD	Süperoksid Dismutaz
SSS	Santral Sinir Sistem
THF	Tetrahidrofolat

ŞEKİLLER, TABLOLAR VE RESİMLER DİZİNİ

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1:Metotreksat'ın Kimyasal Yapısı.....	14
Şekil 2: Misoprostol'ün Kimyasal yapısı.....	17

TABLolar

Tablo 1: Deney Planı.....	24
Tablo 2: Deney ve Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda MDA konsantrasyonlarının ve CAT ve SOD enzimlerinin aktivite düzeyleri	30
Tablo 3: Deney ve kontrol grubuna ait böbrek dokusunda MDA konsantrasyonlarının ile CAT ve SOD enzimlerinin aktivite düzeyleri	31
Tablo 4: KC dokusunda deney gruplarında gözlenen yapısal değişikliklerinin skorlanması.....	36
Tablo 5: Böbrek dokusunda deney gruplarında gözlenen yapısal değişikliklerinin skorlanması.....	40

GRAFİKLER

Grafik 1: Karaciğerde gruplara göre MDA konsantrasyonu ile SOD ve CAT aktivite düzeylerinin karşılaştırılması	31
Grafik 2: Böbrek dokusunda gruplara göre MDA konsantrasyonu ve SOD ve CAT aktivite düzeylerinin karşılaştırılması	32

RESİMLER

Resim 1: Kontrol grubuna ait sıçan KC dokusu.	33
Resim 2: Misoprostol grubuna ait sıçan KC dokusu.....	33
Resim 3: Metotreksat grubuna ait sıçan KC dokusu.....	34
Resim 4: Metotreksat + misoprostol grubuna ait sıçan KC dokusu.....	35
Resim 5: Kontrol grubuna ait sıçan böbrek dokusu.....	37
Resim 6: Misoprostol grubuna ait sıçan böbrek dokusu.....	37
Resim 7: Metotreksat grubuna ait sıçan böbrek dokusu. (H-E; x240).....	38
Resim 8: Metotreksat + Misoprostol grubuna ait sıçan böbrek dokusu.....	39

1. GİRİŞ VE AMAÇ

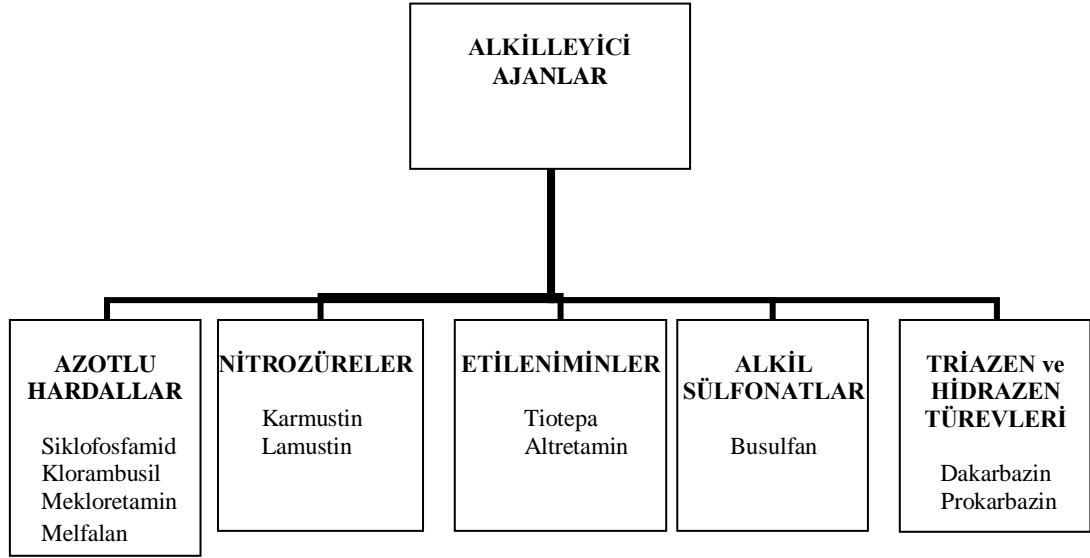
1950'li yıllarda Metotreksat (MTX), antifolat terapinin temeli olarak birçok kanser türünün tedavisinde aminopterinin yerini almıştır (1). MTX, folik asit antagonistidir ve yüksek dozlarda timidilat sentetazı inhibe ederek DNA oluşumunu engelleyen bir antineoplastik ilaçtır (2). Temelde antimetabolit özelliğinden başka antiinflamatuvar, antiproliferatif, immünosupresif, antipsöriatik etkinlikleri de bulunmakta ve klinikte halen bu endikasyonlarda kullanılmaktadır (3,4,5). Ne yazık ki ilaç kullanımını takiben başta hepatotoksisite ve nefrotoksisite olmak üzere meydana gelen yan etkiler, ilacın kullanımını sınırlandırmaya veya ilacın kesilmesine neden olmaktadır. Bu ilacın hepatotoksisite ve nefrotoksisite yan etkisinde çoğunlukla reaktif oksijen radikallerinin (ROS) meydana getirdiği oksidatif stres hasarı sorumlu tutulmaktadır (6). Günümüzde yapılan çalışmalarda oluşan oksidatif hasara karşı birçok kimyasal ajan denenmiştir (Melatonin, Cape) (6,7) . Ancak bu uygulamaların sonucu kliniğe yeterli yansımamıştır. Biz de, oksidatif stres hasarın yanında başka mekanizmaların da bu yan etkilerin oluşumunda rol oynayabileceğini düşünerek PGE₁ analogu olan MP' ü MTX' le birlikte çalışmayı planladık.

MP, aspirin gibi non-steroid antiinflamatuvar ilaçlara bağlı gelişen peptik ülser tedavisinde kullanılan ve yıkıcı enzimlere dayanıklı olan PGE₁ analogu bir ilaçtır. Mide asit salgılanmasını baskılar ve buna karşın bikarbonat salınımını da artırır (8). Ayrıca son zamanlarda sitoprotektif ve antiapoptotik özelliği de kanıtlanmıştır (9,10). İskemi reperfüzyon hasarı oluşturulmuş bir KC modelinde PGE₁'in intraportal infüzyonu transaminaz seviyelerinde düşmeye neden olmuştur (11). Aynı zamanda hepatik iskemi reperfüzyon hasarında, PGE₁, KC sinüzoidal endotel hücrelerini apoptozisten koruduğu görülmüştür (9). Ayrıca başka bir çalışmada CCl₄ ile oluşturulan KC hasarında MP'ün KC koruyucu etkisi kanıtlanmıştır (12). Asetaminofen uygulamasının öncesi ve sonrasında verilen MP mikrovasküler hasar alanını belirgin olarak azaltmıştır (13). Rat KC hücre kültüründe, MP toksik ajan olan D-Galaktozamin aracılığı ile oluşturulan hücre ölümünü engellemiştir (14). MP COX-2 defektif farelerde concanavalin-A ile oluşmuş immün aracılı KC hasarını azaltmıştır (15). MP ya da diğer PGE₁ analoglarının tedavi edici faydaları klinik çalışmalarda da gösterilmiştir (15,16)

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Antineoplastik İlaçların Sınıflandırılması

2.1.1 Alkilleyici Ajanlar



Alkilleyici ilaçlar özellikle G1 ve S olmak üzere hücre döngüsünün herhangi bir dönemine etki edebilir. Bunlar ön ilaç olup daha çok etilenimonyum türevlerine olmak üzere karbonyum türevlerine de dönüşürler. Karbonyum iyonu elektrofilik olduğu için DNA'nın ve diğer makromoleküllerin içerdiği amino, fosfat, tiyol vs. gibi nükleofilik gruplara (Guanin'in 17. pozisyonu) geridönüşsüz bağlanır ve alkillenme gerçekleşmiş olur. Bu alkillenme bazların çapraz bağlanmasına, anormal baz çiftlerine, ve DNA zincir kırıklarına yol açar. Sonuçta DNA replikasyonu ve transkripsiyonu bozulur. Bu ilaçların hücrede meydana getirdikleri değişiklikler hücrelerin X- ışınlarına maruz kalması durumunda ortaya çıkan değişikliklere çok benzediğinden, bu ilaçlara radyomimetik ilaçlar da denir. X- ışınlarına duyarlı tümörler bu ilaçlara da oldukça duyarlıdır (9).

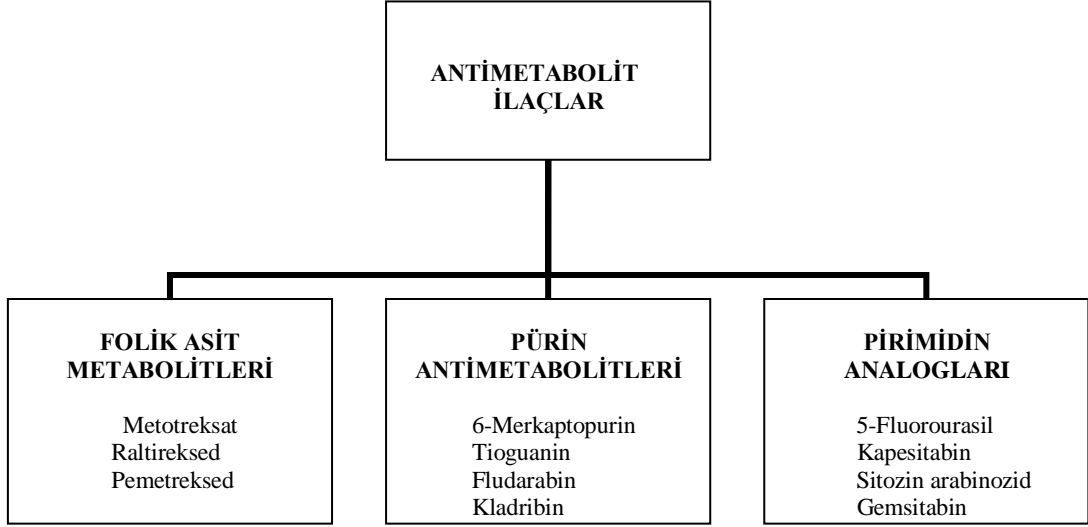
Başlıca kullanım alanları (17):

- Hodgkin Dışı Lenfoma,
- Akut Ve Kronik Lenfositik Lösemi,
- Küçük Hücreli Akciğer Kanseri,
- Hodgkin Hastalığı,
- Pediyatrik Solid Tümörler,
- Over, Meme, Testis, Endometriyum, Servix, Baş-Boyun Kanseri,
- Yumuşak Doku Sarkomları,
- Multiple Myeloma,
- Koryokarsinoma,
- Plevral ve Peritoneal Efüzyonlar,
- Lenfoma,
- Primer Beyin Tümörleri,
- Polistemia Vera

En önemli yan etkileri:

- Kemik iliği ve lenfoid dokuda baskılanma,
- Bulantı, Kusma, İştahsızlık gibi gastrointestinal bozukluklar,
- Periferik nöropati,
- Santral Sinir Sistemi disfonksiyonu,
- Nefrotoksisite,
- Hemorajik Sistit,
- Kardiyak disfonksiyon,
- Pulmoner toksisite

2.1.2 Antimetabolitler



Yapısal olarak DNA, RNA, proteinler ve diğer temel hücre komponentlerinin sentezinde kullanılan bazı substrat ve koenzimlerin analoglarıdır. Bu maddelere özgül bağlanma yerleri için onlarla yarışır ve dolaylı olarak bağlanmalarını engelleyerek inhibisyon yaparlar. Yani bu ilaçlar folikasit, pürin ve pirimidin antagonistleridir. Döneme özgü ilaçlar olup özellikle hücre döngüsünde “S” fazına etkilidirler. Buda şu demektir: kemik iliği, kıl kökleri ve spermatojenik hücreler gibi hızlı bölünen hücrelerde görülen çoğalma kapasitesi yüksek tümörlerde etkilidirler (18).

Başlıca kullanım alanları (17):

- Akut Lenfositik Lösemi
- Akut Mielojenik Lösemi
- Göğüs Kanseri
- Lenfoma
- Osteosarkom
- Ewing’s Sarkomu
- Hodgkin Ve Hodgkin Dışı Lenfoma
- Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

- Prostat Karsinoması
- Testiküler Karsinoma
- Wilm's Tümörü

En önemli yan etkileri

- Kemik İliği Supresyonu
- Hepatotoksisite
- Nefrotoksisite
- Nörotoksisite
- Fırsatçı Enfeksiyonlar
- Sindirim Sistemi İrritasyonu
- Alopesi
- Dermatit
- Konjunktivit

2.1.3 Vinka Alkaloidleri ve Bitkisel Kaynaklı Diğer İlaçlar



Bu grup ilaçlar Vinca Rosea, Podophyllum ve Taxus türü bitkilerin dimerik alkaloidleri ve yarı sentetik türevlerini içerir. Etopozid ve tenipozid hariç primer etkileri mitozun M fazında, mikrotübüllerin yapıtaşı olan tubulin moleküllerine

bağlanarak onları çöktürürler ve mitoz içcikleri oluşumunu engellerler. Sonuçta hücre bölünmesi metafazda durur ve hücre ölür. Nöron mikrotübüllerinin oluşmasını da engellediklerinden nörotoksik etkileri de vardır. Etopozid ve Tenopozid ise DNA'da topoizomeraz II enzimine bağlanarak DNA hasarı meydana getirir ve hücre siklusunu S veya G2 döneminde durdurur (9).

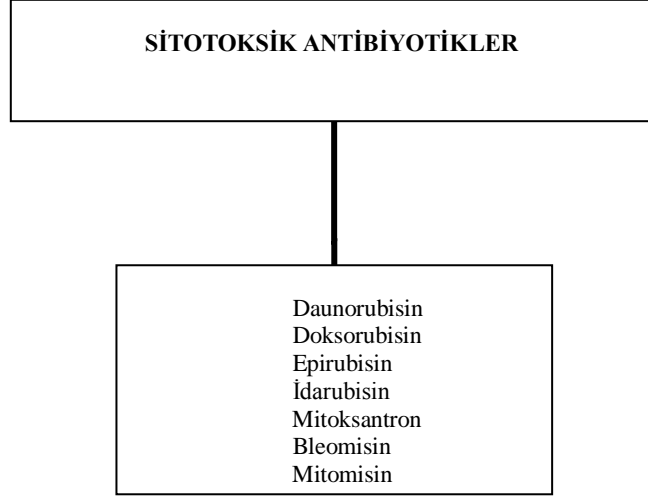
Başlıca kullanım alanları (17):

- Hodgkin ve Non –Hodgkin lenfoma
- Over, Kolon, Meme, Akciğer ve Testis kanserleri
- Akut Lenfositik Lösemi
- Akut Myelojenik Lösemi
- Nöroblastoma
- Rabdomyosarkom
- Kaposi Sarkomu

En önemli yan etkileri:

- Teratojenite
- Nörotoksisite
- Bulantı-kusma
- Anoreksi
- Alopesi
- Myelotoksisite
- Barsak mukozasında irritasyon
- Flebit
- Kardiyotoksisite

2.1.4 Sitotoksik Antibiyotikler



Bu gruptaki ilaçlar çeşitli mikroorganizmaların kültürlerinden üretilmişlerdir. Bunların çoğu radyomimetik olup radyoterapi ile birlikte verilmemelidir. DNA çift-zincirinde interkalasyon yaparak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozarlar. Ayrıca topoizomerez II enzimine bağlanıp inhibe ederek serbest radikaller aracılığıyla DNA hasarı meydana getirirler. Sadece bleomisin G2 dönemine özgü olup diğerleri herhangi bir döneme özgü ilaçlar değildir (9).

Başlıca kullanım alanları (17):

- Koryokarsinoma
- Wilm's Tümörü
- Rabdomyosarkoma
- Kaposi Sarkomu
- Akut Lenfositik Lösemi
- Akut Myelojenik Lösemi
- Hodgkin ve Non –Hodgkin lenfoma
- Meme, Genitoüriner, Tiroid, Akciğer ve Mide kanserleri
- Nöroblastoma
- Testis ve Servikal Kanserler

En önemli yan etkileri:

- Kardiyotoksisite
- Myelotoksisite
- Alopesi
- Bulantı-Kusma
- Akciğer Pnömoniti ve Fibrozisi
- Cilt lezyonları
- Mikroanjiopatik Hemolitik Anemi

2.1.5 Sisplatin ve Karboplatin

Yapısı organik platin türevidir. DNA çift zincirinde zincirler arası ve zincir içi çapraz bağlanmalar yaptığından etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ilaçlara benzer. Döneme özgü olmayan ilaçlardır. GIS'ten absorbe olmadığından sadece İV formu vardır. Geniş spektrumlu bir antineoplastik ilaçtır. Özellikle solid tümörlerin tedavisinde kullanılır. Myelosüpresif etkisi diğer antineoplastiklere nazaran biraz daha azdır. Karboplatin ise sisplatin analogu olup onun kadar güçlü antineoplastik etkiye sahip olmasına karşın emetik etki, renal toksisite, ototoksisite, nörotoksisite gibi yan etkileri daha düşük oranda yapar (18).

Başlıca kullanım alanları (17):

- Testis, Over, Prostat, Mesane kanserleri
- Nöroblastom
- Özefagus, Akciğer ve Kolon Kanserleri

En önemli yan etkileri

- Akut Böbrek Yetmezliği
- Bulantı-Kusma
- Ototoksisite
- Periferik Nöropati
- Allerjik Reaksiyonlar

- Hipomagnezemi, Hipokalsemi
- Myelotoksisite

2.1.6 L-Asparajinaz

L-Asparajinaz bir enzim olup asparajin aminoasidinin aspartik asid ve amonyağa hidrolizini katalizler. Bu yüzden canlılık ve DNA, RNA, protein sentezi için kandaki eksojen asparajine ihtiyaç duyan T hücre oksotrofik kanser türlerinin (Lösemi ve Lenfoma) tedavisinde kullanılır. Sadece G1 dönemine özgü bir ilaçtır. Diğer antineoplastik ilaçlara göre önemli bir üstünlüğü kemik iliğini baskılamamasıdır (9).

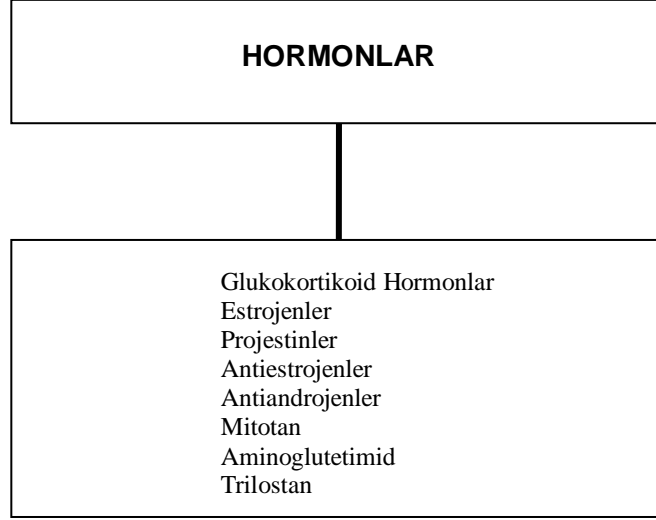
Başlıca kullanım alanları (17):

- Akut Lenfoblastik Lösemi
- Akut Lenfoblastik Lenfoma

En önemli yan etkileri:

- Pıhtılaşma bozuklukları, Tromboz ve kanama
- Pankreatit,
- Hiperglisemi, Hipoalbuminemi,
- Allerjik Reaksiyonlar

2.1.7 Hormonlar



Glukokortikodler:

Lenfoid dokuda proliferasyonu inhibe ederler ve böylece lenfolitik etki yaparlar. En çok kullanılan formu prednizondur. Akut ve Kronik Lenfositik Lösemi, Hodgkin hastalığı ve Non-Hodkin lenfoma, Multiple myeloma, Meme kanserinde kullanılır. Yüksek doz kullanımı gerektiğinden yan etkileride daha fazla gözlenir. Bunların başlıcaları su ve tuz tutulması, hiperglisemi, gastrik irritasyon, aydede yüz, osteoporoz, enfeksiyonlara yatkınlık ve hipertansiyondur (9).

Östrojenler:

Günümüzde özellikle meme kanseri tedavisinde tamoksifen ve selektif aromataz inhibitörleri ile prostat kanserinde ise GNRH analoglarıyla kullanılır (9).

Projestinler:

Endometriyumda proliferasyonu inhibe etmesi ve antiestrojenik etkileri nedeniyle endometriyum kanserinde kullanılır. Ayrıca kansere bağlı gelişen anoreksi ve kaşeksi tedavisinde de kullanılır. Kanser tedavisinde en sık kullanılan formları megestrol asetat ve medroksiprogesteron asetatdır (18).

Anti-östrojenler

Bu grup ilaçlar selektif östrojen reseptör modölatörleri (tamoksifen, toremifen), selektif östrojen reseptör downregulatuvarları (fluvestrant) ve aromataz inhibitörlerini (formestan, exemestan, anastrozol, lestrozol) içerir (16). İlerlemiş meme kanserinde kullanılırlar. En önemli yan etkileri bulantı, diyare, sıcak basması, kemik ve sırt ağrısıdır (18).

Antiandrojenler

Bu grup ilaçlar Siproteron Asetat, Flutamid, Bicalutamid, Nilutamid'tir. Testosteron reseptörlerini bloke ederek testis ve adrenal kaynaklı androjenlerin hedef hücrelerdeki etkisini ortadan kaldırır. Prostat Ca'da tek başına veya GNRH analoglarıyla birlikte kullanılır. En önemli yan etkileri vazomotor flushing, jinekomasti, mastodini ve libidoda azalmadır (17).

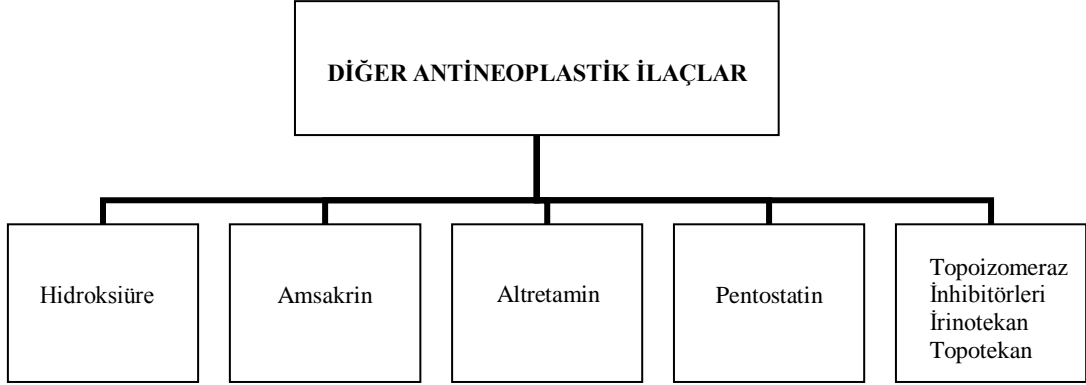
Aminoglutetimid ve Mitotan

Mitotan adrenal korteks hücrelerinde selektif toksisite yaparak, aminoglutetimid ise adrenal kortekte kolesterolden diğer hormonların sentez basamaklarını inhibe ederek etki gösterir. Başlıca kullanım alanları adrenal korteks tümörleri, cushing sendromu, östrojen reseptörü pozitif metastatik meme kanserlerinde kullanılırlar. Cilt döküntüleri, diyare, depresyon gibi belirtilerin yanında steroid eksikliğine bağlı semptomlar da gözlemlenebilir (9).

Trilostan

Adrenal kortekte 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimini inhibe ederek glukokortikoid ve mineralokortikoid sentezini durdurur. Cushing sendromu, primer aldosteronizm ve postmenapozal kadınlarda meme kanserinde kullanılır (9).

2.1.8 Diğer Antineoplastik İlaçlar



Hidroksiüre

DNA sentezinde rol oynayan ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe ederek deoksinükleotid oluşumunu engeller. Hücre siklusunda S dönemine spesifiktir. Özellikle kronik myeloid lösemi olmak üzere diğer myeloproliferatif hastalıklarda da kullanılırlar. En önemli yan etkileri kemik iliği baskılanması, bulantı, kusma, stomatit ve alopesidir (17).

Amsakrin

DNA'nın interkalasyon yoluyla yeni DNA sentezini inhibe eder. Hücre siklusunda herhangi bir döneme özgü değildir. Temel olarak AML'de remisyon amacıyla kullanılır ve en önemli yan etkisi kemik iliği baskılanmasıdır (9).

Altretamin

Diğer tedavilerin başarısız olduğu ilerlemiş over kanseri tedavisinde kullanılır. En önemli yan etkileri bulantı-kusma, periferik ve santral nöropati, böbrek ve KC toksisitesidir (17).

Pentostatin

Bir nükleozid analogu olup adenozin deaminaz inhibitörüdür. Bu inhibisyon tümör hücrelerinde oksadenozin trifosfat (dATP) molekülünün birikmesine yol açarak hücre proliferasyonu engellenir. Özellikle saçaklı hücreli lösemide etkilidir (18).

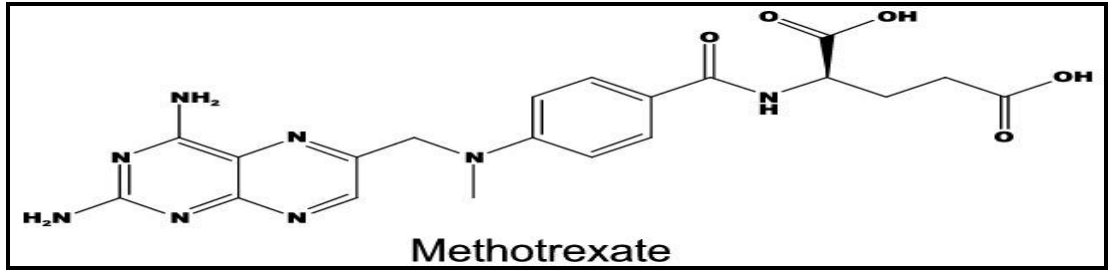
İrinotekan/Topotekan

Bu ilaçlar nükleer enzim olan topoizomerez I 'in inhibitörü olan camptothecin adlı sitotoksik antineoplastik ajanın analogudurlar (9).

2.2. Metotreksat

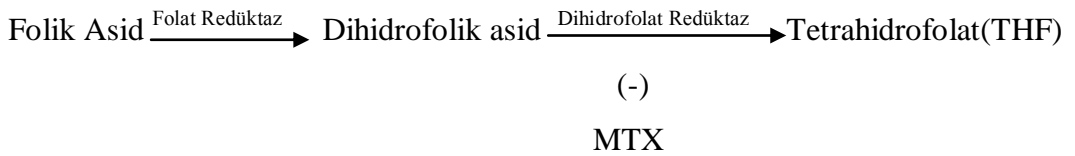
2.2.1. Etki Mekanizması

Antimetabolit grubunun halen kullanılan tek formudur. Folik asidin 4-amino-N¹⁰-metil analogudur (9). Kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir:



Şekil 1: Methotrexat'ın kimyasal Yapısı

Metotreksat, dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek DNA, RNA ve ATP sentezi için gerekli olan THF sentezini durdurur ki sonuçta timidilat, pürin nükleotidleri ve aminoasitlerin sentezinde azalmaya neden olurlar. Böylece nükleik asid ile protein metabolizmasını önlerler (18).



Hücre bölünmesini inhibe etmesi nedeni ile kanser tedavisinde uzun zamandan beri kullanılan bir kemoterapötik ilaçtır (20). MTX'in oral ve intravenöz uygulanması SSS hariç iyi doku dağılımını sağlar. MTX metabolize edilmez ve klerensi renal fonksiyonlara bağlıdır.

2.2.2. Endikasyonları

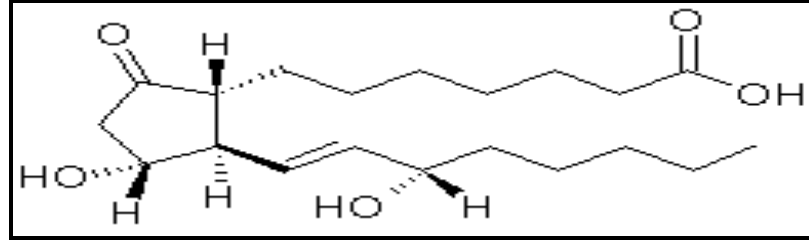
MTX'in romatizmal hastalıklardan kanser metastazına kadar oldukça geniş kullanım endikasyonları bulunmaktadır. Bunlar:

Çocuklarda gelişen ALL tedavisinde önemli bir ilaçtır. Hem remisyon indüksiyonunda hemde konsolidasyon sırasında yüksek dozda intramusküler kullanılır. Bu durumda kür şansı oldukça yüksektir Ancak erişkinlerde görülen lösemilerde, lösemik menenjitin önlenmesi ve tedavisi dışında MTX'in tedavi edici etkisi daha sınırlıdır. Meningeal karsinomatozis tedavisinde, meningeal lösemi ve lenfomanın profilaksi ve tedavisinde intratekal olarak kullanılır (17). Koryokarsinomada veya ilişkili trofoblastik tümörlerde düşük doz MTX tedavisi mitokondriyal membran potansiyelinde azalma yaparak, kaspaz 9 enzimini aktive ederek Bax/Bcl-2 gen ekspresyonunda up regülasyon yaparak hücrelerde apoptozisi indüklemiştir (21). Astımla ilgili yapılan bir klinik çalışmada MTX kullanımı bronkodilatatör kullanma ihtiyacını %22 oranında azaltmıştır, semptomların şiddetinde hafifleme (dispne, öksürük gibi) meydana getirmiştir. Fakat AC fonksiyonlarında (FEV1, PEF) değişiklik oluşturmamıştır (22). Antiinflamatuvar ve immunsupressif etkileri olan MTX'in düşük doz ve aralıklı kullanımı refrakter romatoid artrit tedavisinde remisyonu sağlamaktadır (17,18). Burkitt ve diğer non hodgkin lenfomaların kombinasyon tedavisinde faydalı etkileri gözlenmiştir. Ayrıca MTX göğüs, baş-boyun, ovaryum ve mesane kanserinde kullanılan tedavi rejimlerinde de yerini almıştır. Lökoverin kurtarma tedavisi ile birlikte uygulanan yüksek doz MTX, osteosarkomun adjuvan tedavisinde kullanılan standart protokolün bir parçasıdır (23). SSS lenfomalarında MTX'e yanıt oldukça yüksektir. Haftalık olarak kullanılan uzun süreli düşük doz MTX tedavisi ilacın immünsüpresif etkilerinden dolayı dirençli psöriazisli hastalarda tercih edilmektedir (24).

2.2.3. Yan Tesirler

MTX' in yaygın yan etkileri kemik iliği supresyonu ve cilt ile gastrointestinal mukozada (mukozitis) meydana gelen hasardır. Normal hücrelerdeki toksik etkileri Lökoverin (folinik asid) verilmesiyle azaltılabilir (Lökoverin Kurtarması).MTX'in uzun süre kullanımları ise hepatotoksisite, nefrotoksisite, pulmoner infiltrasyona ve fibrozise yol açar (18). Romatoid artrit tedavisinde kullanılan düşük doz MTX' e bağlı beklenmeyen en ciddi yan etki pansitopenidir ve bunun gelişmesinde mekanizma tam olarak bilinmemektedir (25). Bu nedenle özellikle risk gurubu hastalarda MTX'in haftalık dozajının verildiği gün NSAID'in kullanılmaması önerilmektedir (26). Lösemi, psöriazis ve romatoid artrit MTX ile tedavisi sırasında gelişen hepatotoksisite beklenen bir durumdur. Non spesifik yağlı değişiklikler, nükleer polimorfizm, hepatosit nekrozu, kronik portal inflamasyon, fibrosis ve siroz gibi patolojik lezyon ve durumlar gözlenir. Bu KC hasarı mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte intrasellüler MTX poliglutamat birikimi ve folat azalmasının sorumlu olabileceği düşünülmektedir (27). Yüksek dozda kullanılan MTX asidik idrarda presipite olup obstrüktif üropati nedeniyle oligo-anürik böbrek hasarını yapabilir (28). Dirençli psöriazis hastalarında özellikle hepatik ve hematolojik birçok yan etkiye rastlanmaktadır. MTX' e bağlı hematolojik yan etkilerin oluşumunda dihidrofolat redüktaz enziminin inhibisyonu sonucu DNA sentezindeki bozulma ve hızlı hücre değişimine sahip kemik iliğinin baskılanması sorumlu tutulmaktadır. Gastrointestinal yan etkilerin MTX' in hücre içinde biriken metabolitlerinin folat seviyelerini azaltmasına bağlı olduğunu ileri sürülmüştür. Folat santral sinir sistemindeki nörotransmitterlerin metabolizmasında ve sentezinde kullanılmaktadır. Bu bağlantıya dayanarak metotreksata bağlı gelişen gastrointestinal yan etkilerin santral sinir sistemine bağlı yan etkiler olduğu ve bunun hücre içindeki folat düzeyindeki azalma sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir (9). Ayrıca folat eksikliğinin metotreksat toksisitesi gelişmesinde bir risk faktörü olduğu belirtilmektedir. MTX verilen hastalarda tedaviye folik asit eklenmesi ile yan etkilerin azalabileceği veya önlenebileceği bildirilmiştir. Ancak tedaviye folik asit eklenmesi ile MTX etkinliğinin azalacağına dair görüşler de vardır.

2.3. Misoprostol



Şekil 2: Misoprostol'ün kimyasal yapısı

Misoprostol sentetik bir prostaglandin E1 (PGE₁) analogu olup gastrik ülser, non steroidal antiinflamatuar ilaçların yan etkisi sonucu meydana gelen gastrik hasarların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılır (29,30).

2.3.1. PGE₁

Eikozanoidler yirmi karbon atomlu yağ asidlerinden türeyen ve güçlü biyolojik etkinlik gösteren endojen maddelerdir. Eikozanoidler, prekürsör yağ asidlerinden oluşmalarında rol oynayan enzim türüne göre siklooksijenaz ürünleri, lipoksijenaz ürünleri ve Sit.450 monoksijenaz ürünleri şeklinde üç ana gruba ayrılırlar. Bu grupların fizyolojik ve patolojik olaylara katkıları ve çeşitli sistem ve organlara etkileri bakımından aralarında belirgin farklar vardır (9).

Prostaglandinlerin sentezi üç basamaklıdır (9):

- A)Membran fosfolipidlerinden serbest yağ asidlerinin (araşidonik asit) oluşması.
- B)Serbest yağ asidlerinin siklooksijenazlarla siklik endoperoksidlere (PGG₂, PGH₂) oksidlenmesi.
- C)Siklik endoperoksidlerden prostaglandinlerin oluşması.

Prostaglandinler sentez edildikleri dokularda depolanmaksızın salıverilirler. Herhangi bir etken tarafından sentezin artırılması, salıverilmenin artmasına neden olur. Sentezin inhibisyonu ise salıverilmeyi azaltır. Aspirin, indometasin ve diğer antiinflamatuar analjezik ilaçlar siklooksijenaz enzimini inhibe etmek suretiyle dokulardan prostaglandin salıverilmesini azaltırlar. Prostaglandin E ve F' ler sentez edildikleri dokuda bulunan enzimler tarafından veya dolaşan kan içinde akciğerden

ya da böbrek korteksinden geçerken, bu organlarda yerleşmiş olan enzimler tarafından süratle inaktive edilirler. Bu prostaglandinlerin inaktivasyonunda en önemli organ akciğerdir. Akciğerden ilk geçişleri sırasında %95'e kadar varan bir oranda inaktive edilirler. Bu nedenle dokudan dolaşıma salıverildiklerinde belirgin bir sistemik etki yapmazlar. Onların hormon rolü oynamaları söz konusu olmaz, sadece oluştukları yerde lokal etki meydana getirebilirler (9).

Prostaglandinlerin tümü gözönünde tutulduğunda çok sayıda ve oldukça değişik etkilere sahip oldukları görülür. PGE' ler ise bunların önemli bir miktarını oluşturmaktadır. PGE' ler kısaca (9) :

- 1- Kardiyovasküler sistemde güçlü vazodilatör etkinlik gösterirler; etki güçleri plazma kininlerinininkine yakın derecededir.
- 2- PGE₁ ve PGE₂ kapiler permeabilitesini artırır. İnsanda cilt içine injekte edilmeleri halinde histamin gibi Lewis'in üçlü cevabını oluştururlar
- 3- Üreme sisteminin çeşitli kısımlarında bol miktarda prostaglandin oluşur. Koitus esnasında sperma içinde vajinaya dökülen prostaglandinler kadının sistemik dolaşımına absorbe edilir. Absorbe edilen prostaglandinlerin, spermatozoidlerin uterusu ve tuba uterinaya geçmesini ve ovumu döllemesini kolaylaştırdıkları bir varsayım olarak ileri sürülmüştür. İnsanda intravenöz olarak verilen PGE' ler gebelik olsun veya olmasın, uterusu oksitosik etki yaparlar; tonusu artırır ve ritmik kasılmalara neden olurlar. Gebelik esnasında verilmeleri aborsiyona ve gebelik sonunda verilmeleri doğum eyleminin başlamasına neden olur.
- 4- Gastrointestinal kanalda PGE₁ ve PGE₂ insana i.v. olarak injekte edildiklerinde mide asid salgısını güçlü bir şekilde inhibe ederler. Mide asid salgısının azaltılmasında, adı geçen

PGE' lerin aşağıdaki iki etkisi rol oynar;

- i) Paryetal hücrelerde siklik AMP oluşumunu inhibe etmeleri (histamin sAMP oluşumunu artırarak asid salgısını artırır) ve
- ii) G hücrelerinden gastrin salıverilmesini suprese etmeleri. PGE₁ ve PGE₂'nin analogları (Rioprostil, Misoprostol ve Enprostil gibi), asid salgısını PGE₁ ve PGE₂den daha güçlü bir şekilde inhibe ederler. PGE' lerin ilk olarak midede gözlenen ve sonra diğer dokularda da saptanan diğer bir etkisi sitoprotektif (hücre-koruyucu) etkidir. Bu etki hücrenin zedeleyici ve öldürücü etkenlere karşı direncinin

arttırılmasıdır ve midede asid ve pepsin salıverilmesini inhibe edici (antisekretuar) etkiden bağımsızdır. Prostaglandinlerin antiülserojenik tesirinde her iki etki de rol oynar.

Sitoprotektif etki şu temel etkilere dayanır (9)

- i) Mukus salgısının artması,
- ii) Mukozal HCO^{-3} salgısının artması,
- iii) Mukoza bariyerinin negatif elektrik potansiyelinin artırılması sonucu H^{+} 'nin geri difüzyonunun (backdiffusion) azaltılması,
- iv) Mukozadan geçen kan akımının arttırılması,
- v) Mukoza epitelinin rejeneratif kapasitesinin artırılması
- vi) Epitel hücrelerinin lizozom membranlarının stabilitesinin pekiştirilmesi.

Prostaglandinler ve bunların analoglarının sitoprotektif etkinliği oldukça yaygın ve kapsamlı bir olaydır; mide dışında da ortaya çıkar. Örneğin bu etkinlik sayesinde adı geçen myokard, pankreas, karaciğer, beyin ve lökositler dahil iskeminin zedeleyici etkisine karşı da koruyabilirler (9).

- 5- PGE_1 ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ (fakat PGI_2 değil), ince barsak mukozasında su ve sodyum absorpsiyonunu inhibe ederler, koleradakinine nitelik yönünden benzeyen bir şekilde sulu diyare yaparlar.
- 6- Bronşlarda oluşan prostaglandinler: PGE_1 ve PGE_2 bronş düz kaslarını gevşetirler ve bronkodilatasyon yaparlar.
- 7- PGE_1 trombositlerin agregasyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder.
- 8- Periferik sinir sisteminde PGE' ler, sempatik adrenerjik sinir uçlarından noradrenalin salıverilmesini, kullanılan doza göre genellikle inhibe ederler. Prostaglandinler, nöroefektör kavşaklarda, kolinerjik sinir uçlarından, asetilkolin salıverilmesini ise genellikle artırırlar. İnsanda cilt içine PGE' lerin injeksiyonu ağrıya neden olur. Bu ağrı bradikininin yaptığı kadar şiddetli değildir; geç başlar ve daha uzun devam eder.

2.3.2. Etki Mekanizması

Misoprostol sentetik bir prostaglandin E1 (PGE₁) analogu olduğundan (25,26) yukarıda bahsedilen şekilde etki etmektedir.

2.3.3. Endikasyonları

Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların yan etkisi sonucu meydana gelen gastrik hasarların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılır (29,30). Bunun dışında ise çalışmaları yapılmış ancak hala klinik kullanıma girmeyen birçok faydalı yanları bulunmaktadır. Bunlar; MP'nin diğer ajanların da (örn. interferon) kullanılmadığı bazı özel durumlarda yararlı olma olasılığı yüksektir. Hepatit B enfeksiyonlu hastalarda MP kullanımı akut fazda hepatik fonksiyonlarda iyileşme, serum bilirubin seviyelerinde ve enzim aktivitelerinde normale dönme gerçekleşmiştir (15). Sirozlu hastalarda MP kullanımı Nitrojen-N-Sentaz (iNOS) enzim oranını azaltarak pozitif nitrojen dengesini sağlamaktadır (31). PGE₁, KC transplantasyonu sonrası KC fonksiyonlarında iyileştirme, AST ve INR seviyesinde azalma yapmıştır (32,33) ve belkide çocuklarda allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu sonrası gelişen hepatik veno-okluzif durumlarda hasarı önlemek için profilaktik olarak kullanılabilir (34). Ratlarda MP, KC rezeksiyonu sonrası gelişen iskemik/reperfüzyon hasarını iyileştirmiştir (35), etanole bağlı gelişen KC hasarını geriletmiştir (36), concanavalin-A'ya bağlı gelişen otoimmün KC hasarını azaltmıştır (37).

3. MATERYAL METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı, Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada ağırlıkları 250–350 gram arasında değişen Wistar Albino cinsi toplam 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi. Sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat aydınlık), ısıda (25°C), yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) ile toplam 1 hafta süreyle beslendiler.

3.1.2. Kullanılan İlaçlar

Metotreksat

Misoprostol

3.1.3. Biyokimyasal Çalışma İçin Kullanılan Malzemeler:

Ekipmanlar

- | | |
|------------------------|-----------------------------|
| 1- Soğutmalı santrifüj | : Ependorf MR5415 (Almanya) |
| 2- Santrifüj | : Jouan B4İ (Fransa) |
| 3- Derin dondurucu | : Uğur (Türkiye) |
| 4- Hassas terazi | : Scaltec SPB 33 (İsviçre) |

5- Vorteks	: Nüve NM 100 (Türkiye)
6- Otomatik pipetler	: Ependorf (Almanya), Gilson(Fransa)
7- Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8- pH metre	: Hanna Instruments (Portekiz)
9- Manyetik karıştırıcı	: Nüve (Türkiye)
10-Biyokimya analizörü	: Roche/Hitachi Modular P80(Almanya)
11-UV Transilluminator 2000	: Biorad

Kimyasal Maddeler

❖ SOD Tayini İçin Kullanılanlar:

- Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya)
- CAPS, Sigma (Almanya)
- Iodonitrotetrazolyum violet, Sigma (Almanya)
- Ksantin, Merck (Almanya)
- Ksantin oksidaz, Sigma (Almanya)
- Titripleks III, Merck (Almanya)

❖ Katalaz Tayini İçin Kullanılanlar:

- Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya)
- Hidrojen peroksid, Merck (Almanya)

❖ Lipit Peroksidasyonu (MDA) İçin Kullanılanlar:

- Trikloroasetik asit (TCA), Merck (Almanya)
- Tiyobarbitürik asit (TBA), Merck (Almanya)

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler:

❖ SOD Tayini İçin Kullanılanlar:

• CAPS tamponu (pH: 10,2), 40 mM: 8,85 gr CAPS tartılıp 400 ml distile suda çözülüp pH'ı 10,2'ye ayarlandıktan sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. 0,94 mM EDTA (0,36 gr) tartılıp CAPS tamponuna katıldı.

- Ksantin çözeltisi (0,05 mM): 7,6 mg ksantin tartıldı ve hacmi 40 mM CAPS tamponu (0,94 mM EDTA içeren; pH: 10,2) ile 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti, 0,025 mM 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür (INT) içermektedir ve +2 / +8 °C'da muhafaza edildiğinde 10 gün süreyle kararlıdır.

- Ksantin oksidaz çözeltisi (80 U/L): 56 µl ksantin oksidaz standardından alınır, 10 ml distile su ile seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

❖ **Lipit Peoksidasyonu Tayini İçin Kullanılanlar:**

- TCA çözeltisi (% 10): 10 gr TCA tartılıp, bir miktar distile suda eritilir ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

- TBA çözeltisi (% 0,67): 0,67 gr TBA tartılıp, bir miktar distile suda eritilir ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

❖ **Katalaz Tayini İçin Kullanılanlar:**

- 50 mM fosfat tamponu: 2,7218 gr KH_2PO_4 ve 5,3397 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 500 ml distile suya tamamlanır.

- 30 mM hidrojen peroksit için: 0,34 ml % 30'luk hidrojen peroksit, 100 ml fosfat tamponu ile dilüe edildi.

3.2. Metod

3.2.1. Deney Planı

Çalışmamız 10'ar adet rat içeren 4 gruptan oluştu ve gruplar;

Sağlıklı Kontrol, Metotreksat, Metotreksat + Misoprostol ve Misoprostol şeklindedir

Tablo 1: Deney planı

Deney Grupları	1. GÜN	2. GÜN	3. GÜN	4. GÜN	5. GÜN
I (Kontrol)	-	-	-	-	-
II (MTX)	-	20 mg/kg, i.p, tek doz	-	-	-
III (MTX + MP)	200 µg/kg, oral MP	20 mg/kg, i.p, tek doz MTX + 200 µg/kg, oral MP	200 µg/kg, oral MP	200 µg/kg, oral MP	200 µg/kg, oral MP
IV (MP)	200 µg/kg, oral	200 µg/kg, oral	200 µg/kg, oral	200 µg/kg, oral	200 µg/kg, oral

- **Grup I (Sağlıklı kontrol grubu):** Bu gruba hiçbir madde verilmedi.
- **Grup II (Metotreksat grubu):** Hâlihazırda sıvı formda olan metotreksat, çalışmanın ikinci günü, 20mg/kg olacak şekilde tek doz i.p. olarak insülin enjektörü kullanarak uygulandı.
- **Grup III (Metotreksat + Misoprostol grubu):** Ratlara 20 ml' lik su içerisinde ufalandıktan sonra eritilen misoprostolü, hayvan başına 200µg/kg olacak şekilde 1. Günden itibaren 5 gün gavajla uygulandı. Buda kısaca Hayvan Ağırlığı x 0,1 ml/MP'e tekabül etti. Metotreksat uygulanması ise sadece 2. gün Grup II' deki gibi uygulandı.
- **Grup IV (Misoprostol grubu):** Ratlara 20 ml' lik su içerisinde eritilen misoprostolü ufalandıktan sonra, hayvan başına 200µg/kg olacak şekilde 1. Günden itibaren 5 gün gavajla uygulandı

Ratlar enjeksiyon uygulanmasını takiben 6.gün gruplar halinde İM. olarak uygulanan % 10'luk ketamin HCl (Ketalar) ve %2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında cerrahi ekzanguinasyon yapılarak deney sonlandırıldı.

Alınan KC ve böbrek dokuları histopatolojik incelemeler için %10'luk nötral formalin solüsyonuna konuldu. Biyokimyasal incelemeler için ise KC ve böbrek

dokuları -20°C ' ye konulup donduruldu ve daha sonra incelenmek amacıyla homojenize edildi. Elde edilen numuneler analizin yapılacağı tarihe kadar saklandı.

3.2.2. Biyokimyasal Çalışmalar

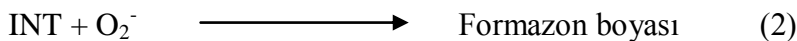
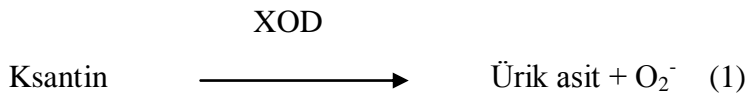
3.2.2.1. Dokuların biyokimyasal ölçümlere hazırlanması

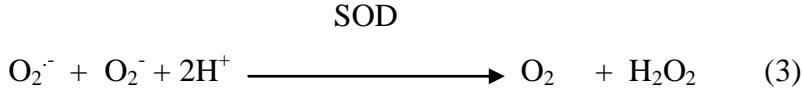
İntramüsküler olarak uygulanan % 10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.)-% 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında cerrahi ekzanguinasyon uygulanarak sakrifiye edilen ratlardan alınan KC ve böbrek dokuları, öncelikle donma işlemi için -20 derecede alüminyum folyo içerisinde saklandı. Ardından donan materyaller homojenize edilip biyokimyasal analizleri yapılmak üzere ilgili birimlere gönderildi.

3.2.2.2. SOD Aktivitesinin Ölçümü:

Deneyin prensibi Sun ve arkadaşlarının metoduna dayanmaktadır (38).

Deneyin Prensibi: SOD çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit (O_2^-) radikalinin H_2O_2 'ye dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. Ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen O_2^- radikallerinin (reaksiyon 1), 2-(4-iyodofenil)-3-4-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolyum klorit (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazon boyasının (reaksiyon 2), 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak, reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi.





Deneyin Yapılışı: 25 µl numuneden alındı ve % inhibisyonun % 30-60 arasında olması için örnekler dilüe edilmedi. 0.025 ml numuneye, 0.850 ml 0.05 mM ksantin çözeltisi (0.025 mM INT içeren) ve 40 mM'lık CAPS (0.94 mM'lık EDTA içeren) ilave edildi. 0.125 ml ksantin oksidaz (80 U/L) ilave edildikten hemen sonra 505 nm'de 37 °C'de 30 saniyelik gecikme fazının ardından, havaya karşı başlangıç absorbansı (A₁) ve 3 dakika sonra da son absorbans (A₂) okundu. Aynı işlemler köre karşı denemeye de tekrarlandı.

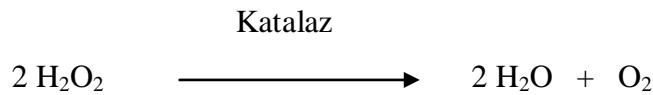
$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A(\text{numune})/\text{dk}}{\Delta A(\text{kör})/\text{dk}} \times 100$$

Standart (5.2 U/mL) çalışılarak hazırlanan % inhibisyon-konsantrasyon grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar saptandı. Enzim aktivitesi U/mg olarak bulundu.

3.2.2.3. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü:

Aebi metoduna dayalı olarak yapıldı (39).

Deneyin Prensipleri: Hidrojen peroksidin (H₂O₂) 240nm'de maksimum absorbans verir. Deney ortamına ilave edilen H₂O₂, CAT tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini UV spektrumda absorbans azalması şeklinde göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır.



Deneyin Yapılışı: Hazırlanan doku hojenizatı, fosfat tamponuyla 10 kat dilüe (0,2 ml numune + 1,8 ml fosfat tamponu) edildi. 2 ml'lik bu dilüe numune üzerine taze hazırlanan ve 30 mM H₂O₂ içeren fosfat tampon çözeltisinden 1 ml eklendi. 240

nm'de ilk 30 saniye içinde 15'er saniyelik absorbans azalması bulunarak, k değeri aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$k = 2.3 / \Delta t \times (\log A_1/A_2) \times (a)$$

A₁: 240 nm'deki başlangıç absorbansı (t₁=0)

A₂: 240 nm'deki 15. sn'deki absorbansı (t₂=15)

a: dilüsyon faktörü

3.2.2.4. Lipid Peroksidasyonunun Tayini:

Lipit peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, Draper ve Hadley'in çift kaynatmalı tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanarak ölçüldü (40).

Deneyin prensibi: Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek, 532 nm'de maksimum absorbans veren renkli bir karmaşık oluşturur.

Deneyin yapılışı: 0,5 ml doku homojenizatu, üzerine 2,5 ml % 10'luk TCA eklenerek karıştırıldı. 15 dakika kaynatılıp soğutuldu. 5000 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edildi. 2 ml süpernatant alınıp, üzerine 1ml % 0.67'lik TBA eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 15 dakika kaynatıldı ve hemen soğutuldu. 532 nm'de absorbansları, numune yerine distile su konularak hazırlanan köre karşı okundu.

Sonuçlar, MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki ekstinsiyon katsayısından ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) yararlanılarak, $\mu\text{mol/g}$ olarak ifade edildi.

Sonuçlar aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$A = a \times b \times c$$

$$c = A / a \times b$$

$$c = \frac{A \text{ mol cm} \times 1 \times 10^6 \mu\text{mol} \times \text{L}}{1.56 \times 10^5 \text{ L cm mol}}$$

$$C (\mu\text{mol/ml}) = A \times 57.69$$

A = absorbans

a = ekstinsiyon katsayısı

b = ışık yolu

c = yoğunlaşma

3.2.3. Doku Takip Çalışmaları

Deney sonunda sıçanların KC ve böbrek dokuları alınarak loblara bölündü. Loblar %10'luk nötral formaldehitte tespit edildi. Dokular rutin ışık mikroskopik takip aşamalarından geçirildikten sonra parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan alınan 3–5 µm'lik kesitler hematoksilin-eozin (H-E) boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Bütün histopatolojik değerlendirmeler kör şartlar altında iki kez yapıldı.

A) Dehidratasyon

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
%70	1 gece
%80	1 saat
%90	1 saat
%100	1 saat
%100	1 saat

B) Şeffaflandırma

Ksilol	½ saat
Ksilol	½ saat

C) Emdirme

Ksilol+parafin (60°C etüvde)	15 dakika
Yumuşak parafin (60°C etüvde)	1 saat
Sert parafin (60°C etüvde)	4 saat

D) Gömme

Hazırlanan parafin bloklardan, Leica tipi kızaklı mikrotom kullanılarak 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Histolojik değerlendirme için preparatlar Hematoksilin-Eozin ve Verhoeff ile boyandı. Boyanan örnekler Olympus BX50 tipi binoküler mikroskopta incelendi ve fotoğraflar elde edilerek değerlendirildi

Değerlendirme:

Kontrol grubu ve deney grubuna ait KC ve böbrek dokularının kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının (41) yapmış oldukları skorlamaya göre değerlendirildi.

Deneysel parametrelerin histolojik (yapısal) değerlendirmesi skorlandı.

(-) skor (negatif skor): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,

(+) skor (1 pozitif skor): hafif derecede,

(++) skor (2 pozitif skor): orta derecede,

(+++) skor (3 pozitif skor): ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir (41)

3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS 11.0 for Windows” paket programı ve Epi Info Statcalc programları kullanılarak yapıldı. İki grup arasındaki ölçüm değerlerinin karşılaştırılmasında (biyokimyasal değerler) “Mann – Whitney U testi”; sayım değerlerinin karşılaştırılmasında (histolojik bulgular) “Pearson ki-kare testi” kullanıldı. Dört gözlü tablolarda beklenen değer 5 in altında olduğu durumlarda “Fisher’in ki-kare testi” kullanıldı. Anlamlılık değeri %95 Güven Aralığında $p < 0.05$ olarak alındı.

4.BULGULAR

4.1 Biyokimyasal Bulgular:

4.1.1 Biyokimyasal KC Bulguları

Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda KC' de lipid peroksidasyon ürünü olan MDA konsantrasyonlarında, kontrol grubuna göre, MTX kullanılan ratlarda anlamlı bir artış gözlemlendiği ve bu artışın MP kullanımı ile azaldığı saptandı. Antioksidan enzim olan CAT ve SOD aktivite düzeylerinde ise MTX kullanımına bağlı anlamlı olarak azalmış ve MP kullanımı da bu enzim düzeylerini arttırmıştır (Tablo 2, Grafik 1).

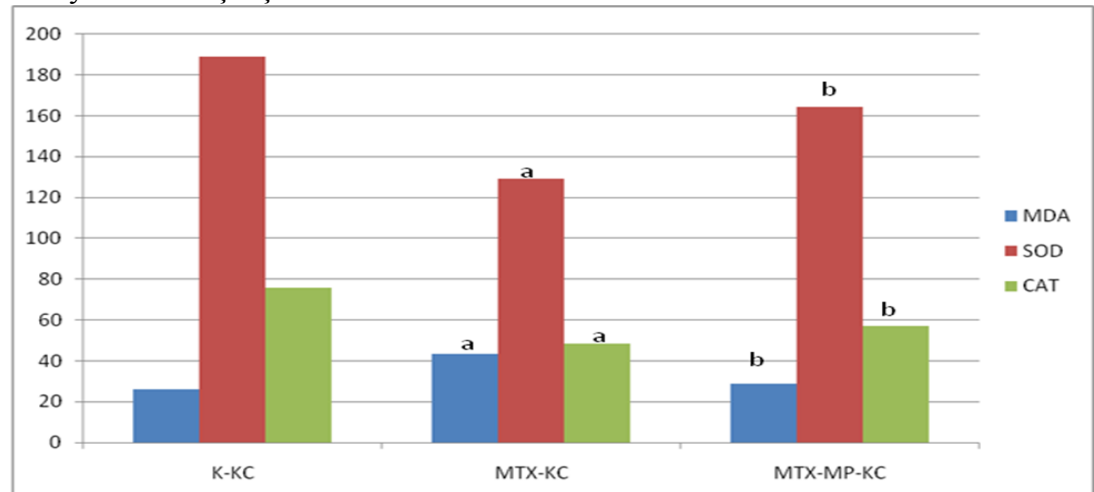
Tablo 2: Deney ve Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda MDA konsantrasyonlarının ve CAT ve SOD enzimlerinin aktivite düzeyleri

Gruplar (KC)	MDA ($\mu\text{mol/g}$)	SOD (U/mg)	CAT (U/mg)
Kontrol	26 + 1.7	189 + 13.5	76.4 + 8
Metotreksat	43.6 + 3.4 ^a	129.4 + 6.5 ^a	48.4 + 5.7 ^a
Misoprostol	32.3 + 2.8	156 + 9	68 + 5.6
Metotreksat+Misoprostol	28.7+ 1.9 ^b	164.5+ 6.9 ^b	56.9 + 7 ^b

a: MTX & C , p<0,05

b: MTX + MP & MTX , p<0,05

Grafik 1: Karaciğerde gruplara göre MDA konsantrasyonu ile SOD ve CAT aktivite düzeylerinin karşılaştırılması



a: MTX & C , p<0,05

b: MTX + MP & MTX , p<0,05

4.1.2. Biyokimyasal Böbrek Bulguları

Böbrek dokusunda ise biyokimyasal olarak Metotreksat'ın MDA konsantrasyonu arttırdığı, CAT ve SOD aktivite düzeylerini azalttığı bulundu. Buna karşın Misoprostol'ün MDA konsantrasyonunu anlamlı olarak azalttığı, CAT ve SOD aktivite düzeylerini düzelttiği gözlemlendi (Tablo 3, Grafik 2).

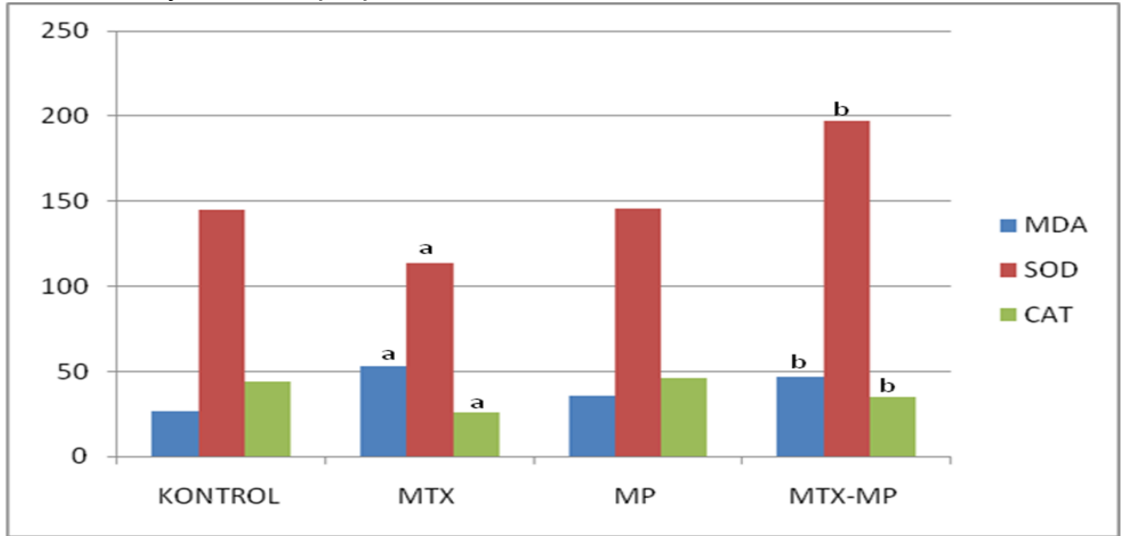
Tablo 3: Deney ve kontrol grubuna ait böbrek dokusunda MDA konsantrasyonlarının ile CAT ve SOD enzimlerinin aktivite düzeyleri

GRUPLAR	MDA ($\mu\text{mol/g}$)	SOD (U/mg)	CAT (U/mg)
KONTROL	27,1 \pm 6,7	144.5 \pm 28,6	43.9 \pm 11,3
MTX	53,4 \pm 8,5 ^a	113.7 \pm 26,3 ^a	26.4 \pm 6,5 ^a
MP	36,1 \pm 8,1	146.2 \pm 24,1	45.5 \pm 12,8
MTX-MP	47,1 \pm 4,7 ^b	197.4 \pm 28,2 ^b	35.2 \pm 2,6 ^b

a: MTX & C , p<0,05

b: MTX + MP & MTX , p<0,05

Grafik 2: Böbrek dokusunda gruplara göre MDA konsantrasyonu ve SOD ve CAT aktivite düzeylerinin karşılaştırılması

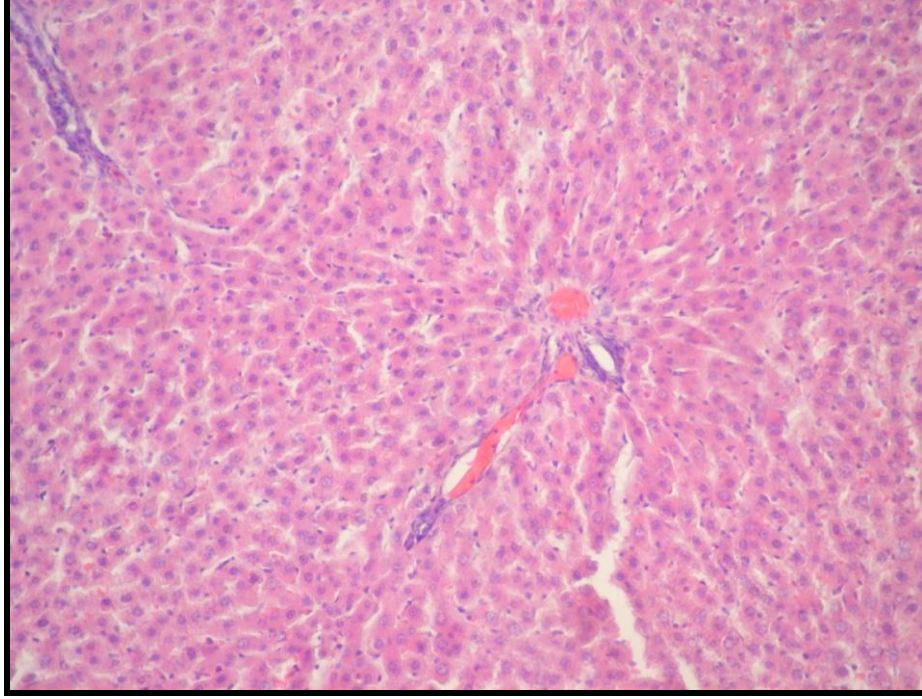


a: MTX & C , p<0,05

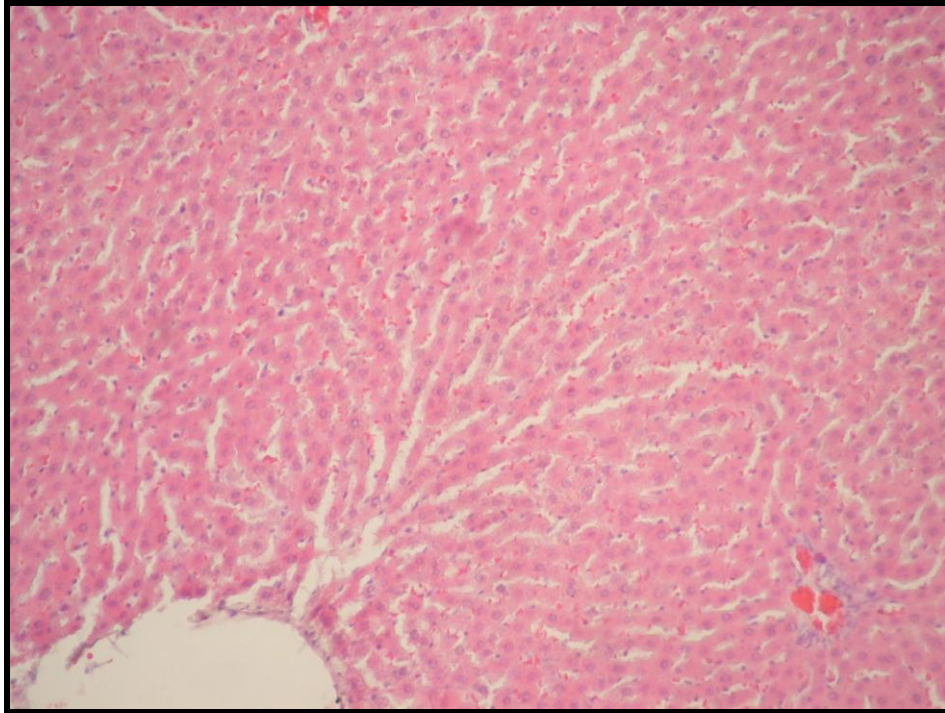
b: MTX + MP & MTX , p<0,05

4.2 Histolojik Bulgular

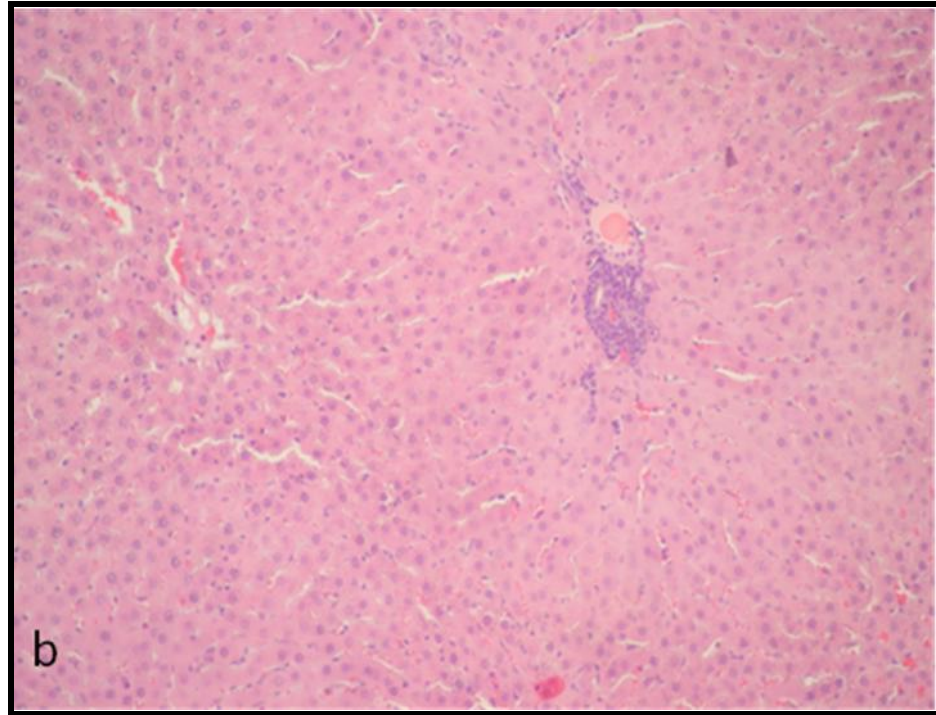
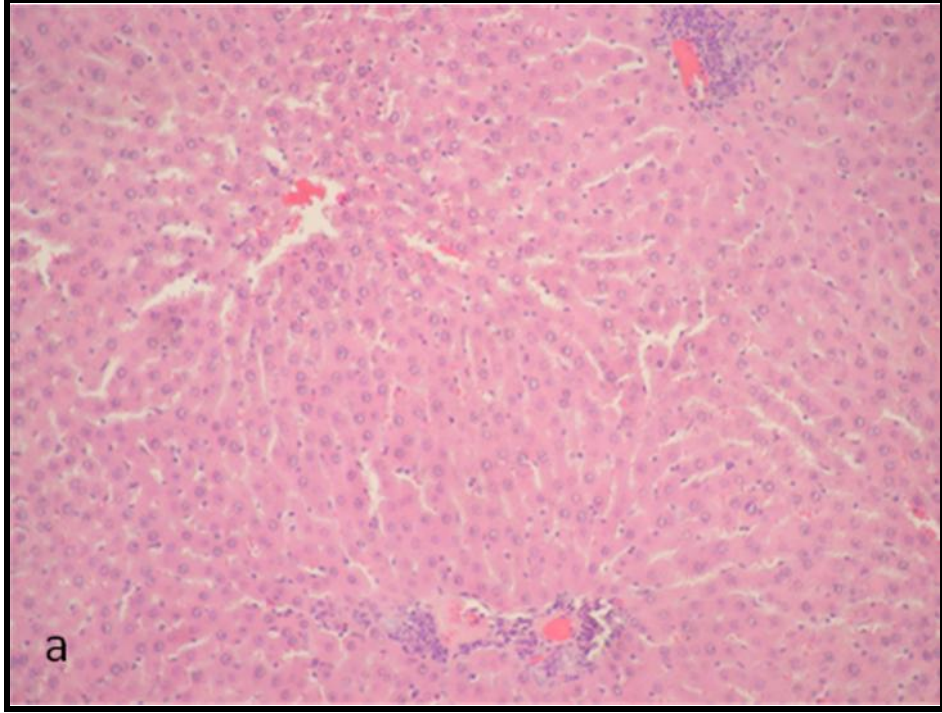
4.2.1. Histopatolojik Karaciğer bulguları:



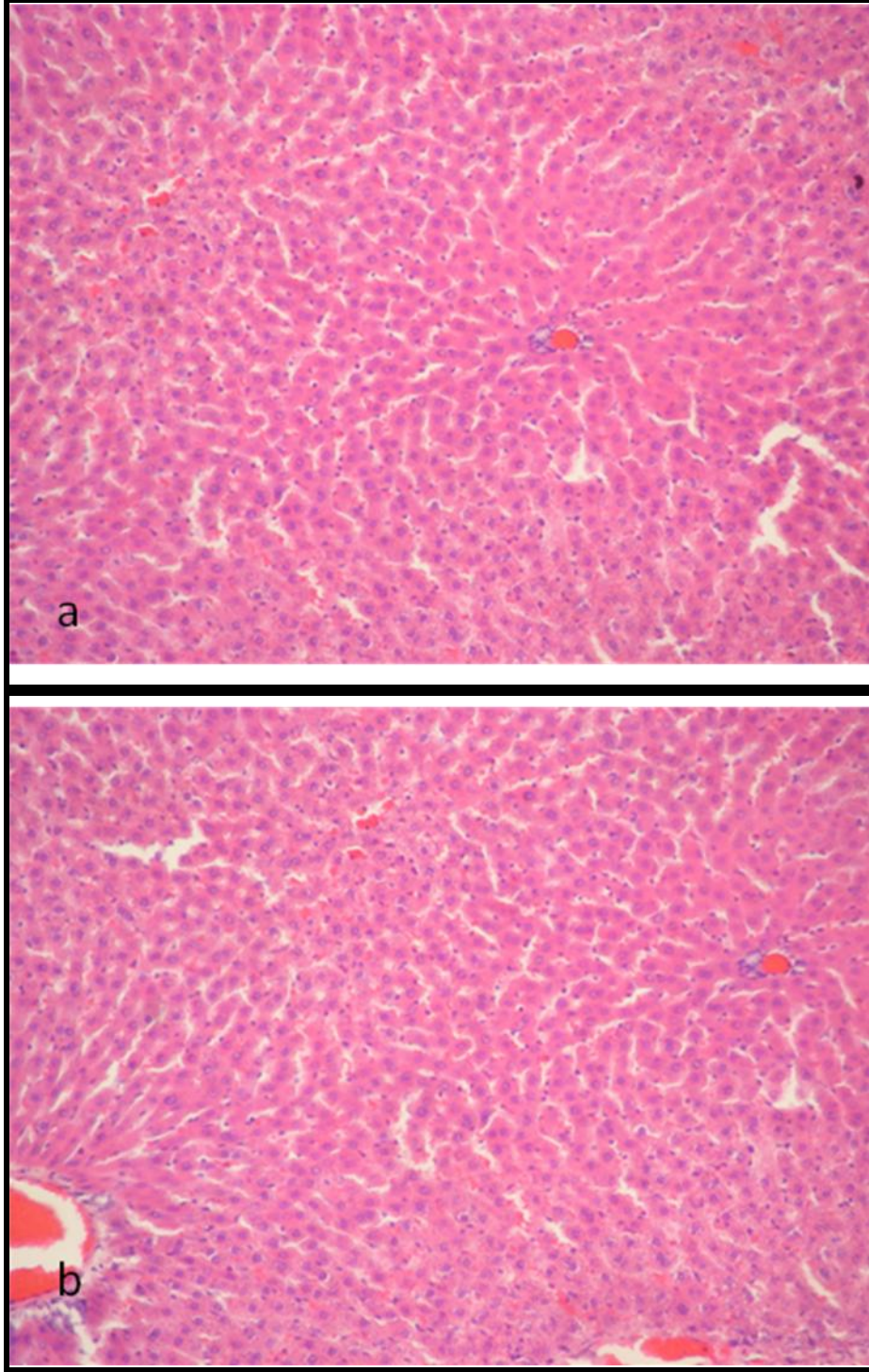
Resim 1. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. (H-E; x240)



Resim 2. Misoprostol grubuna ait sıçan karaciğer dokusu (H-E; x240).



Resim 3(a,b). Metotreksat grubuna ait sıçan karaciğer dokusu (H-E; x240).



Resim 4(a.b) : Metotreksat + Misoprostol grubuna ait sıçan karaciğer dokusu (H-E; x240).

Kontrol grubuna ait sıçan KC dokusunda, KC parankimi ve portal alanlar normal histolojik görünümde gözlenmekte (**Resim 1, Tablo 4**), Misoprostol grubuna ait sıçan KC dokusunda düşük düzeyde vasküler konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon gözlenmekte (**Resim 2, Tablo 4**), Metotreksat grubuna ait sıçan KC dokusunda

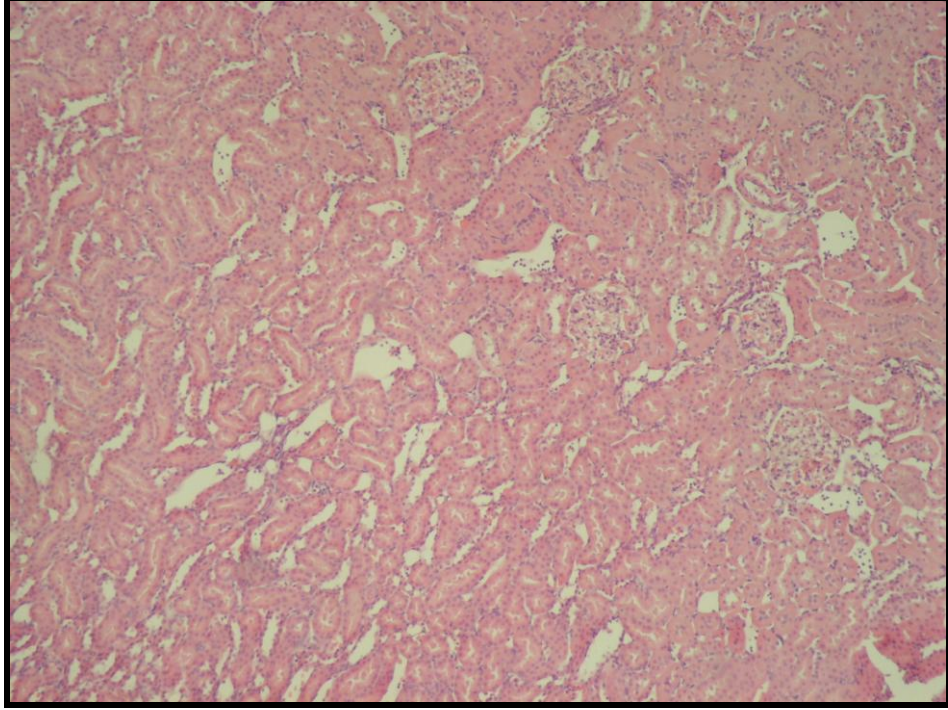
hepatositlerde dejenerasyon, piknotik çekirdekler ve parankimde mononükleer hücre infiltrasyonları, vasküler konjesyon gözlenmekte (**Resim 3 (a,b), Tablo 4**), Metotreksat + misoprostol grubuna ait sıçan KC dokusunda düşük düzeyde hepatositlerde dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyon gözlenmektedir (**Resim 4(a.b), Tablo 4**).

Tablo 4:KC' de deney gruplarında gözlenen yapısal değişikliklerin skorlanması.

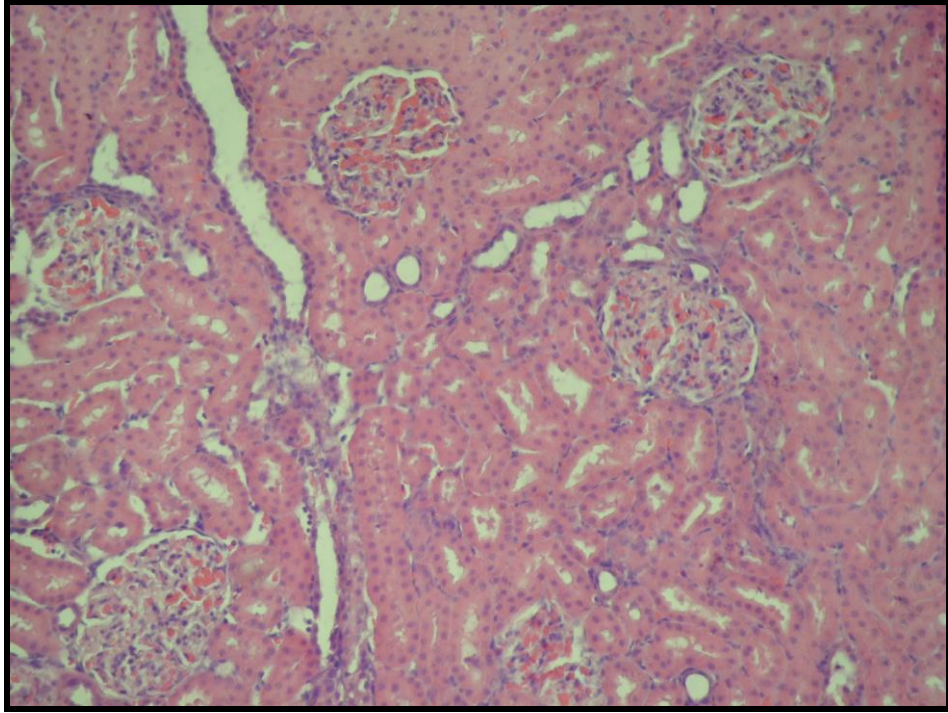
	Kontrol	MP	MTX	MTX + MP
Hepatositlerde dejenerasyon	-	-	+++	+
Piknotik çekirdekler	-	-	+	-
Nekroza giden hücreler	-	-	+	-
Sinüzoidal dilatasyon	-	+	+	+
Vasküler konjesyon	-	+	+	+
Mononükleer hücre infiltrasyonları	-	-	+++	-
Safra kanalı proliferasyonu	-	-	+	-
Hemoraji	-	-	+	-

(-) skor (negatif skor): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması, (+) skor (1 pozitif skor): hafif derecede, (++) skor (2 pozitif skor): orta derecede, (+++) skor (3 pozitif skor): ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir (41)

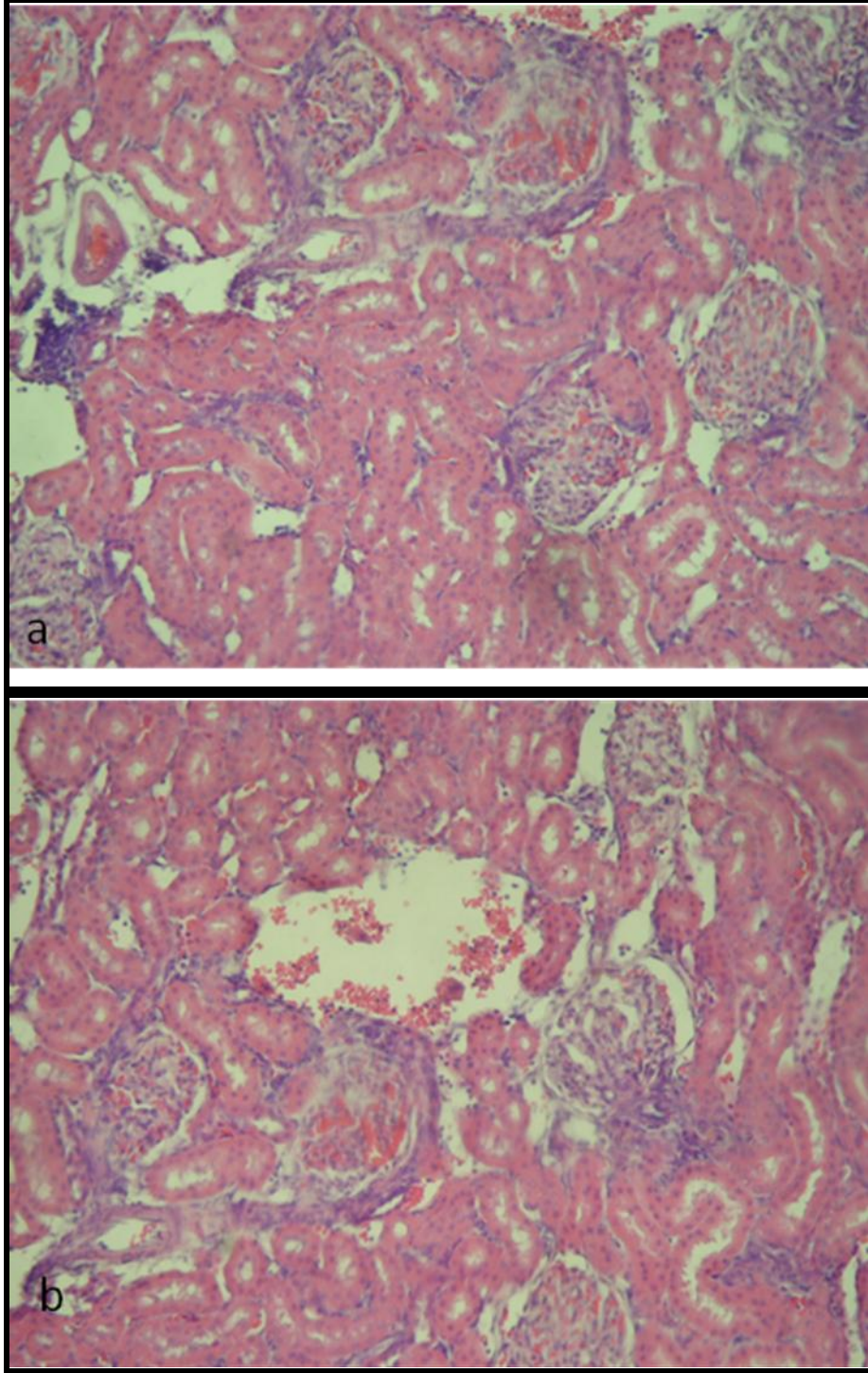
4.2.2. Histopatolojik Böbrek Bulguları



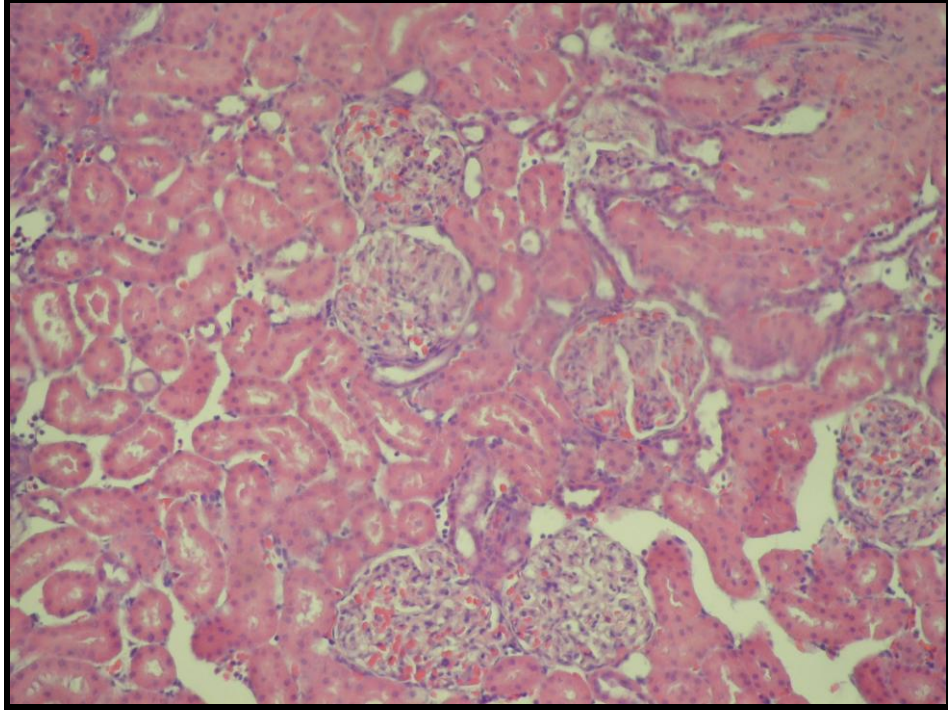
Resim 5: Kontrol grubuna ait sıçan böbrek dokusu. (H-E; x120).



Resim 6: Misoprostol grubuna ait sıçan böbrek dokusu. (H-E; x240).



Resim 7(a,b): Metotreksat grubuna ait sıçan böbrek dokusu (H-E; x240).



Resim 8: Metotreksat + Misoprostol grubuna ait sıçan böbrek dokusu (H-E;x240).

Kontrol grubuna ait sıçanların böbrek dokuları normal histolojik görünümde izlendi (**Resim 5, Tablo 5**), Misoprostol grubuna ait sıçanların böbrek dokularında düşük düzeyde tubuler dilatasyon gözlemlendi (**Resim 6, Tablo 5**), Metotreksat grubuna ait sıçanların böbrek dokularında, proksimal ve distal tubül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon ve peritubuler kapillerlerde konjesyon gözlemlendi. Kortekste peritubuler ve perivasküler alanlarda, glomerüller çevresinde ve ayrıca kortikomedüller bileşkede belirgin inflamatuvar hücre infiltrasyonları gözlemlendi. Ayrıca pekçok Bowman kapsülünde daralma, peritubuler vasküler konjesyon ve bazı hemoraji odakları gözlemlendi. (**Resim 7, Tablo 5**), Metotreksat + Misoprostol grubuna ait sıçanların böbrek dokularında ise, sadece düşük düzeylerde tubuler epitelial hücrelerde hidropik dejenerasyon ve sinüzoidal dilatasyon gözlemlendi (**Resim 8, Tablo 5**)

Tablo 5: Böbrek dokusunda deney gruplarında gözlenen yapısal değişikliklerinin skorlanması

	Kontrol	MP	MTX	MP + MTX
Tübüler epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon	–	–	++	+
Vasküler konjesyon	–	–	++	–
Tübuler dilatasyon	–	+	+	+
Parankimde inflamatuvar hücre infiltrasyonları	–	–	+++	–
Bowman kapsüllerinde daralma	–	–	+	–
Hemoraji odakları	–	–	+	–

(-) skor (negatif skor): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması, (+) skor (1 pozitif skor): hafif derecede, (++) skor (2 pozitif skor): orta derecede, (+++) skor (3 pozitif skor): ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir (41)

5-TARTIŞMA VE SONUÇ

Bir folat antimetaboliti olan MTX; ALL, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri gibi pek çok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılan sitotoksik bir ilaçtır. Bu yaygın kullanımına karşın, özellikle yüksek dozlarında başta karaciğer ve böbrek hasarı olmak üzere kemik iliği supresyonu, mukozit, pulmoner fibrozis gibi istenmeyen etkileri de bildirilmiştir. Bahsedilen yan tesirler ilaç kullanımında klinisyeni sıkıntıya sokmaktadır. Yapılan son çalışmalar MTX aracılı toksisite gelişiminin serbest oksijen radikalleri ve hidrojen peroksit ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna yönelik olarakta, dokuları MTX harabiyetinden korumak için melatonin, nikotinamid, metiyonin, E vitamini ve n-asetilsistein (42,43,44) gibi antioksidan ajanlar denenmiştir. Biz de bu hasarı önlemek için sitoprotektif ve antiapoptotik özelliği kanıtlanan MP 'yi kullandık. Prostaglandin E1 analogu olan MP pek çok etkenin hücre üzerinde oluşturduğu hasarın önlenmesinde etkili bir maddedir. MP non-steroid antiinflamatuvar ilaçların uzun süre kullanımı ile meydana gelen gastrointestinal mukozal lezyonlarının iyileşmesinde olumlu sonuçları gösterilmiştir. Bu sitoprotektif etkisi temel olarak mukus ve mukozal HCO^{-3} salgısını artırması, mukoza bariyerinin negatif elektrik potansiyelinin artırması sonucu H^{+} nin geri difüzyonunu (backdiffusion) azaltması, mukozadan geçen kan akımını artırması, mukoza epitelinin rejeneratif kapasitesini artırması, epitel hücrelerinin lizozom membranlarının stabilitesinin pekiştirmesi esasına dayandırılmaktadır (9). PGE' nin, hepatik-iskemi reperfüzyon kaynaklı hasarda transaminaz seviyelerini düşürdüğü (11) ve KC sinüzoidal endotel hücrelerini apoptozisten koruduğu görülmüştür (10). Bu çalışmalarda MP' nin karaciğer iskemi-reperfüzyon esnasında adenin nükleotid parçalanmasını inhibe etmesi ve ATP sentezini artırması, ayrıca indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve matriks metalloproteinaz (MMP) salınımlarını azaltması sorumlu tutulmuştur. Başka bir çalışmada, MP antioksidan etkisiyle CCl_4 (12) ve Asetaminofen (13) uygulanmasını takiben artan serbest oksijen radikallerini azaltarak KC hasarını engellemiştir. Rat KC hücre kültüründe, MP toksik ajan olan D-Galaktozamin aracılığı ile oluşturulan hücre ölümünü (apoptosis) engellemiştir (14). MP COX-2 defektif farelerde concanavalin-A ile

oluşmuş immün aracılı KC hasarını azaltmıştır (15). Cisplatin uygulanmasıyla sıçanlarda oluşan böbrek hasarında MP koruyucu olduğu kanıtlanmıştır (45). Başka bir çalışmada, non steroid antiinflamatuar bir ilaç olan İbuprofen' in uygulanmasını takiben meydana gelen böbrek hasarını misoprostol anlamlı bir şekilde engellemiştir (46). Renal arter oklüzyonu ile oluşturulmuş renal iskemi modelinde ve mercuric chloride ile oluşturulmuş toksik renal hasarda, MP hücre ölümünü sınırlandırmış ve sitoprotektif etki göstermiştir (47). MP ya da diğer PGE₁ analoglarının tedavi edici faydaları klinik çalışmalarda da gösterilmiştir (15,16).

Yapılan önceki çalışmaları destekler şekilde bizim çalışmamızda da MTX biyokimyasal olarak, karaciğer ve böbrekte lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyelerini, kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırdı. MP+MTX'in kullanıldığı ratlarda ise MDA seviyelerinde artış olmadığı görüldü. Ancak MP'nin bu olumlu etkisinin böbreğe göre karaciğerde daha fazla olduğunu gördük. Antioksidan enzimler olan CAT ve SOD seviyelerine baktığımızda ise, MTX'in her iki dokuda anlamlı olarak azalttığını ve MP+MTX grubunda bu enzim düzeylerinin arttığını gözledik. Bu bulguları destekler şekilde, histolojik olarak; MTX grubuna ait karaciğer ve böbrek dokularında, kontrol grubuna göre belirgin hasar izlenirken, MP+MTX grubunda ise sadece düşük düzeylerde hasar gözlemlendi. Bizim bu bulgularımız yapılan önceki çalışmaları destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, MTX karaciğer ve böbrek hasarını oksidatif hasar ile oluşturmaktadır. MP ise bu hasarı antioksidan ve diğer özellikleri ile önlemektedir. Bu sonuçlara dayanılarak ileri klinik çalışmalar yapıldıktan sonra rutin kullanıma geçebilir.

ÖZET

Metotreksat folat antagonisti olan bir antineoplastik ilaçtır. Metotreksata bağlı hepatoksisite ve nefrotoksisite daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Bilimsel kanıtlar PGE₁ analogu olan Misoprostol'un doku koruyucusu olduğunu göstermektedir. Bu bilgilere dayanarak Metotreksata bağlı oluşan karaciğer ve böbrek hasarını önlemede Misoprostol'un alternatif bir profilaktik seçenek olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda 24 adet Wistar albino erkek rat kullanıldı. Her bir grupta 6'şar adet rat olmak üzere 4 gruptan oluşturuldu. Gruplar; Kontrol, Metotreksat (20 mg/kg, i.p, tek doz), Metotreksat (20 mg/kg, i.p, tek doz) + Misoprostol (200µg/kg, oral, 5 gün) ve Misoprostol (200µg/kg, oral, 5 gün) olacak şekilde planlandı. Deney sonunda karaciğer ve böbrek dokusunda MDA, SOD ve CAT gibi biyokimyasal parametrelere bakıldı. Ayrıca dokuda histopatolojik incelemeler yapıldı.

Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda karaciğerde lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyelerinde, MTX kullanılan ratlarda, kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın gözleendiği ve bu artışın MP kullanımı ile azaldığı saptandı. Antioksidan enzim olan CAT ve SOD seviyeleri, MTX kullanımına bağlı anlamlı olarak azalırken, MP kullanımı bu enzim düzeylerini arttırmıştır. Böbrek dokusunda ise biyokimyasal olarak MTX' in MDA seviyesini artırdığı, CAT ve SOD değerlerini azalttığı bulundu. Buna karşın MP' nin MDA seviyesini anlamlı olarak azalttığı, CAT ve SOD değerlerini düzelttiği gözleendi ancak sadece CAT anlamlı çıktı. Biyokimyasal bulgularımıza paralel olarak, MTX grubuna ait karaciğer ve böbrek dokularının histolojik incelemelerinde oksidatif hasarın göstergesi olabilecek bulgular gözleendi. MTX ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, her iki dokuda, bu bulgular anlamlı ($p < 0,05$) iken, MP verilmiş MTX grubunda ise, bu histopatolojik değişikliklerde anlamlı ölçüde azalma izlenmiştir. Sonuç olarak, Metotreksat'ın rat karaciğer ve böbrek dokusu üzerine olan toksik etkilerinin literatürdeki Misoprostol'un dozu ile düzeltilebileceği sonucuna ulaştık.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, Misoprostol, Oksidatif doku hasarı, Antioksidan

SUMMARY:

Methotrexate, a folat antagonist, is an antineoplastic drug. Methotrexate-induced hepatotoxicity has been reported in previous studies. Scientific evidence achieved from previous studies suggests that Misoprostol has had a tissue protective effect in such toxic damage cases; thereby Misoprostol could be an alternative prophylactic agent against methotrexate-induced hepatotoxicity.

A total of twenty-four male Wistar albino rats were included in this study. Animals were equally divided into four groups as follows: Controls, only MTX (20 mg/kg, i.p, single dose) given group, MTX (20 mg/kg, i.p, single dose) plus Misoprostol (200µg/kg, orally, 5 days) administered group and only Misoprostol (200µg/kg, orally, 5 days) given group. At the end of the study, liver tissues and blood samples were collected for biochemical and histopathological analysis.

According to the biochemical findings, a lipid peroxidation marker, MDA levels were significantly increased in MTX treated group to control and by the use of MP, this increase was found reduced. Antioxidant enzymes, CAT and SOD levels were significantly decreased with MTX and increased with MP. According to the biochemical findings of kidney tissue, MDA levels were increased; CAT and SOD levels were decreased in MTX group. Unlikely, MDA levels were significantly decreased, CAT and SOD levels were raised but only CAT levels were significantly increased in MP treated group. Parallel to biochemical findings, in histological examinations of liver and kidney tissues, there were evidences as the indicator of oxidative damage. The changes in MTX group were significant to control, and these changes were decreased in MTX group treated with MP.

As a result, MP can be effective in liver and kidney injury in MTX treated rats.

Key Words: Methotrexate, Misoprostol, Oxidative tissue damage, Antioxidant

KAYNAKLAR:

1. Pui CH, Treatment of Acute Leukemias, New Directions for Clinical Research, New Jersey: Humana Press, 2003: Chapter 25,339-357
2. Martin SA, McCarthy A, Barber LJ, Burgess DJ, Parry S, Lord CJ, Ashworth A. Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene MSH2. *EMBO Mol Med.* 2009 Sep; 1(6-7):323-37.
- 3- Fiehn C. Methotrexate in rheumatology *Z Rheumatol.* 2009 Nov; 68(9):747-56; quiz 757.
- 4- Sathasivam S Steroids and immunosuppressant drugs in myasthenia gravis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008 June; 4(6):317-27. Epub 2008 May 20.
- 5- Salim A, Tan E, Ilchysyn A, Berth-Jones J. Folic acid supplementation during treatment of psoriasis with methotrexate: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Br J Dermatol* 2006; 154:1169-74.
- 6- Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yeğen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res.* 2003 May; 34(4):282-7.
- 7- Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, Bas O, Kilbas S, Yilmaz HR, Yurekli VA, Kucuker H, Songur A. The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology.* 2006 Feb 1; 218(2-3):125-33. Epub 2005 Dec 2.
- 8- Graham DY, White RH, Moreland LW, Schubert TT, Katz R, Jaszewski R, Tindall E, Triadafilopoulos G, Stromatt SC, Teoh LS. Duodenal and gastric ulcer prevention with misoprostol in arthritis patients taking NSAIDs. Misoprostol Study Group. *Ann Intern Med.* 1993 Aug 15; 119(4):257-62.
- 9- Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1. Cilt. 11. Baskı. Ankara. Hacettepe-Taş Yayıncılık 2005. 317-343,
- 10- Yang H., Majno P., Morel P. et al. Prostaglandin E(1) protects human liver sinusoidal endothelial cell from apoptosis induced by hypoxia reoxygenation. *Microvasc. Res.* (2002) 64 94–103
- 11- Hafez T., Moussa M., Nesim I., Baligh N., Davidson B., Abdul-Hadi A. The effect of intraportal prostaglandin E1 on adhesion molecule expression, inflammatory modulator function, and Histology in canine hepaticischemia/reperfusioninjury.*J. Surg. Res.* (2007) 138 88–99.
- 12- Salam OM, Sleem AA, Omara EA, Hassan NS. Hepatoprotective effects of MP and silymarin on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009 Mar
- 13- Lim S.P., Andrews F.J., O'Brien P.E. Acetaminophen-induced microvascular injury in the rat liver: protection with MP. *Hepatology* (1995) 22 1776–1781.

- 14- Ranchal I., Gonzalez R., Lopez-Sanchez L.M. et al. The differential effect of PGE₁ on D-galactosamine-induced nitrosative stress and cell death in primary culture of human hepatocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2006) 79 245–259.
- 15- Flisiak R., Prokopowicz D. One year follow-up of patients treated with MP in acute phase of viral hepatitis B. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2000) 60 161–165.
- 16- Bianchi G., Brizi M., Manini R. et al. Effects of long-term oral MP administration on hepatic amino acid-nitrogen metabolism in patients with cirrhosis. *J. Hepatol.* (2002) 37 15–21.
- 17- Goodman and Gillman, *Tedavinin Farmakolojik Temeli*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009: 1315-1405
- 18- Bertram G. *Katzung, Basic and Clinical Pharmacology*, 9. Edition, Singapore: The McGraw-Hill Companies, 2004: 898-931
- 19- Heisig P. Type II topoisomerases--inhibitors, repair mechanisms and mutations. *Mutagenesis.* 2009 Nov; 24(6):465-9. Epub 2009 Sep 17
- 20- Ayça Işık, Levent Işılay, Esra Atabekli Erdemli, Canan Akbay, Kadri Anafarta. Sıçan Testisinde Metotreksat'ın Işık Ve Elektron Mikroskop Düzeyinde Etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 50, Sayı 3*, 1997
- 21- Chen YX, Lv WG, Chen HZ, Ye F, Xie X. Methotrexate induces apoptosis of human choriocarcinoma cell line JAR via a mitochondrial pathway. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Apr; 143(2):107–11. Epub 2009 Jan 31.
- 22- J. Hedman, P. Seideman, F. Albertoni, B. Stenius-Aarniala. Controlled trial of methotrexate in patients with severe chronic asthma, *Eur J Clin Pharmacol* (1996) 49:34-39
- 23- Jolivet JJ, Cowan KH, Clendennin Nj, Chabner BA, The pharmacokinetics and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 1983;309:1094-104
- 24- Ayşe Pınarbaşı, Ayşe Akman, Ertan Yılmaz, Erdal Başaran, Metotreksat Verilen Psöriazis Vulgaris Hastalarına Folik Asit Desteği Gerekli mi? *Türk Dermatoloji Dergisi* 2008; 2: 39–42
- 25- Ohasone Y, Okano Y, Kameda H, Hama N, Matsumura M, Nojima T, et al. Toxicity of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis –clinical characteristics in patients with MTX-induced pancytopenia and interstitia pneumonitis. *Ryumachi* 1997; 37(1):16-23.
- 26- Franc H, Rau R, Herborn G. Thrombocytopenia in patients with rheumatoid arthritis on long-term treatment with low dose methotrexate. *Clin Rheumatol* 1996; 15(3):266-70.
- 27- Kevat S, Ahern M, Hall P. Hepatotoxicity of methotrexate in rheumatic diseases. *Med Toxicol Adverse Drug Exp.* 1988 May-Jun; 3(3):197–208
- 28- *Pharmacotherapy- A Pathophysiologic Approach*, 7th ed, 2008, 007147899X
- 29- Graham D.Y., White R.H., Moreland L.W. et al. Duodenal and gastric ulcer prevention with misoprostol in arthritis patients taking NSAIDs. *Ann. Int. Med.* (1993) 119 257–262.
- 30- Park S.H., Cho C.S., Lee O.Y. et al. Comparison of prevention of NSAID-induced gastrointestinal complications by rebamipide and misoprostol: a randomized, multicenter, controlled trial-Storm Study. *J. Clin. Biochem. Nutr.* (2007) 40 148–155
- 31- R. et al. Effects of long-term oral misoprostol administration on hepatic amino acid-nitrogen metabolism in patients with cirrhosis. *J. Hepatol.* (2002) 37 15–21.

- 32- Kornberg A., Schotte U., Kupper B., Hommann M., Scheele J Impact of selective prostaglandin E1 treatment on graft perfusion and function after liver transplantation. *Hepatogastroenterology* (2004) 51 526–531.
- 33- Gatta A., Dante A., Del Gaudio M. et al. The use of prostaglandins in the immediate postsurgical liver transplant period. *Transplant. Proc.* (2006) 38 1092–1095.
- 34- Song J.S., Seo J.J., Moon H.N., Ghim T., Im H.J. Prophylactic low-dose heparin or prostaglandin E1 may prevent severe venoocclusive disease of the liver after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Korean children. *J. Korean Med. Sci.* (2006) 21 897–903.
- 35- Hardy K.J., Tancheroen S., Shulkes A. Hepatic ischemia reperfusion injury modification during liver surgery in rats: pretreatment with nifedipine or misoprostol. *Liver Transpl.Surg.* (1995) 1 302–310.
- 36- Flisiak R., Prokopowicz D., Lapinski W. Effect of misoprostol in ethanol-induced liver injury. *Pol. J. Pathol.* (1995) 46 187–190.
- 37- Yin H., Cheng L., Langenbach R., Ju C. Prostaglandin I(2) and E(2) mediate the protective effects of cyclooxygenase-2 in a mouse model of immune-mediated liver injury. *Hepatology* (2007) 45 159–169.
- 38- Sun Y, Larry WO, Ying Li. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 34(3): 497-500, 1988.
- 39- Aebi H. Catalase in vitro. *Enzymol.* 105: 121-126, 1984.
- 40- Drapper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186: 421-431, 1990.
- 41- A. Abdel-wahhab, s. A. Nada and m. S. Arbid, Ochratoxicosis: Prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats m. *Journal of applied toxicology, J. Appl. Toxicol.* 19, 7–12 (1999)
- 42- Muralikrishnan G, Amalan Stanley V, Sadasivan Pillai K. Dual role of vitamin C on lipid profile and combined application of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil treatment in fibrosarcoma-bearing rats. *Cancer Lett.* 2001 Aug 28; 169(2):115-20.
- 43 - Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. Oktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzare E, Uz E. *Toxicol Ind Health.* 2006 Jul; 22(6):241-7.
- 44- Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yeğen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res.* 2003 May; 34(4):282-7.
- 45- Ozer MK, Asci H, Oncu M, Yesilot S, Savran M, Bayram D, Cicek E. Effects of Pentoxifylline on Amikacin-Induced Nephrotoxicity in Rats *Renal Failure* . 2009, Vol. 31, No. 2, Pages 134–139
- 46- Ackerman Z, Cominelli F, Reynolds TB. Effect of misoprostol on ibuprofen-induced renal dysfunction in patients with decompensated cirrhosis: results of a double-blind placebo-controlled parallel group study. *Am J Gastroenterol.* 2002 Aug;97(8):2033–9.
- 47- Paller MS, Manivel JC. Prostaglandins protect kidneys against ischemic and toxic injury by a cellular effect. *Kidney Int.* 1992 Dec;42(6):1345–54.