

**METHOTREXATE İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARINA  
KARŞI MOLSİDOMİNİN KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ  
ETKİSİNİN RATLARDA ARAŞTIRILMASI**

**Mustafa HÜZ**

**TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI  
DENEYSEL PATOLOJİ PROGRAMI**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Emine ŞAMDANCI  
Yüksek Lisans Tezi – 2017**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METHOTREXATE İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARINA  
KARŞI MOLSİDOMİNİN KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN  
RATLARDA ARAŞTIRILMASI**

**Mustafa HÜZ**

**Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı  
Deneysel Patoloji programı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Emine ŞAMDANCI**

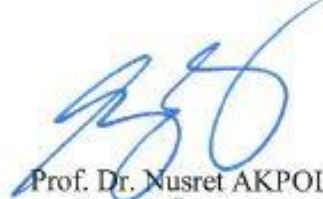
Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
Tarafından 2014/36 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA  
2017**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Deneysel Patoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Mustafa HÜZ'ün "Methotrexate ile Oluşturulan Karaciğer Hasarına Karşı Molsidominin Koruyucu ve Tedavi Edici Etkisinin Ratlarda Araştırılması"** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09/01/2018



Prof. Dr. Nusret AKPOLAT  
İnönü Üniversitesi  
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Adile Ferda DAĞLI  
Fırat Üniversitesi  
Üye



Doç. Dr. Emine ŞAMDANCI  
İnönü Üniversitesi  
Tez Danışmanı  
Üye



### ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../2018 tarih ve 2018/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Karaciğer Anatomisi.....	2
2.2. Karaciğer Mikro Anatomisi.....	5
2.3. Methotrexate .....	9
2.3.1. Methotrexate Nedir?.....	9
2.3.2. Methotrexate'ın Gelişimi .....	10
2.3.3. Tedavide Kullanım Alanları.....	10
2.3.4. Etki Mekanizması.....	11
2.3.5. Genetik Çalışmalardaki Yeri .....	14
2.3.6. Toksisitesi.....	15
2.4. Molsidomin.....	18
3. MATERYAL VE METOT .....	19
3.1. Deney Protokolünün Oluşturulması .....	19
3.2. Örneklerin Alınması ve Analiz Öncesi Hazırlık.....	20
3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçülmesi .....	20
3.4. Antioksidan Sistem ve Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analizi .....	21
3.4.1. SOD Enzim Aktivite Tayini .....	21
3.4.2. GSH Analizi .....	22
3.4.3. GSH-Px Enzim Aktivitesinin Tayini.....	23
3.4.4. KAT Enzim Aktivitesinin Tayini .....	24
3.4.5. MPO Enzim Aktivitesi Tayini.....	25
3.4.6. MDA Miktarının Tayini .....	25
3.5. Histopatolojik Değerlendirme Yöntemi .....	26
3.5.1. Histokimyasal Boyama.....	26

3.5.2. İHK Boyama.....	28
3.6. İstatistiksel Yöntem .....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Biyokimyasal Bulgular .....	30
4.2. Antioksidan Sistem ve Oksidatif Stres Belirteç Bulguları .....	31
4.3. Histopatolojik Bulgular .....	33
5. TARTIŞMA .....	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
7. KAYNAKLAR .....	50
EKLER .....	56
EK-1. Özgeçmiş.....	56
EK-2. Etik Kurul Onayı.....	57

## TEŞEKKÜR

İnönü üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında birlikte çalışma fırsatı bulduğum günden bu güne mesleğimin icrasında ve eğitim öğretim hayatım bu dönemde çok şey öğrendiğim, bilgi ile beraber görgü ve tecrübeme değerli katkıları olan, Anabilim Dalı başkanımız hocam Prof. Dr. Nusret AKPOLAT'a, lisansüstü eğitimim süresinde bilgi ve tecrübelerini paylaşan tez hazırlığı ve yazımında desteğini hep yanımda bulduğum teori ve uygulamaya yönelik eğitimimde çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam Tıbbi Patoloji Öğretim Üyesi Doç. Dr. Emine ŞAMDANCI'ya, projemizin gerçekleşmesine kaynak sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, eğitime destek olan ve katkı veren Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, laboratuvarında birlikte mesai yaptığım teknik ekipteki değerli arkadaşlarıma, ailemin uzak ve yakın üyeleri ile kızlarıma anlayış ve destekleri için teşekkür ederim.

## ÖZET

### **Methotrexate ile Oluşturulan Karaciğer Hasarına Karşı Molsidominin Koruyucu ve Tedavi Edici Etkisinin Ratlarda Araştırılması**

**Amaç:** Methotrexate (Mtx), bazı malignitelerde antineoplastik, bazı kronik hastalıklarda immünsüpresif olarak kullanılmaktadır. Yüksek doz veya uzun süreli düşük dozda kullanımı sonucu hepatotoksik etkiler gösterebilmektedir. Molsidomin (Mol) vazodilatasyon ve antioksidan etkileri nedeni ile angina başta olmak üzere tedavi edici olarak kullanılan nitrik oksit donörüdür. Burada, ratlarda Mtx ile oluşturulan hepatotoksik etkiyi Mol'ün düzeltip düzeltmediği araştırılmıştır.

**Materyal ve Metot:** Her grupta 8'er tane olmak üzere 40 adet *Vistar albino* rat kullanılmıştır.

Grup I (Kont grubu), Grup II (Mol grubu), Grup III (Mtx grubu), Grup IV (Mol-Mtx grubu), Grup V (Mtx-Mol grubu) şeklinde gruplara ayrılmıştır. Histopatolojik bulgular Roening fibrozis derecelendirmesi, BCL-2 için semikantitatif derecelendirme kullanıldı.

**Bulgular:** Mol ve Mtx grubundaki histomorfolojik bulgular benzer olup, hafif artmış safra duktus proliferasyonu, orta derecede kronik inflamasyon, hepatositlerde perisantral daha belirginleşen dağınık vakuoler dejenerasyon izlendi. Fibrozis ve yağlı değişiklik yoktu. Mol-Mtx grubunda diğer üç gruba göre inflamasyonda azalma saptandı (skor 1). Mtx grubunda BCL-2 antikoru ile skor 2 boyanma görüldü. Mol-Mtx grubunda BCL-2 antikoru ile boyanmada azalma izlendi. AST ve ALT düzeylerinde artış olmayıp gruplar arasında da anlamlı farklılık saptanmadı. GSH, Mol ile Mtx grupları arasında ve Mol-Mtx ile Mtx grupları arasında farklılık, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ). MDA, Kont grubu ile Mol grubu ve Kont grubu ile Mtx grubu arasında istatistiksel anlamlılık mevcuttu ( $p<0.001$ ). SOD, bütün gruplarda Mtx grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı izlendi ( $p<0.001$ ).

**Sonuç:** Yüksek doz Mtx kullanımında yağlanma, fibrozis izlenmemiş olup transaminaz seviyeleri de normal kalmıştır. Mtx ile oluşan histopatolojik hepatotoksikite bulguları, histopatolojik olarak ve MDA, SOD, KAT enzim düzeylerinde Mol ile azalma göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Metotreksat, molsidomin, hepatik fibrozis, karaciğer toksisitesi.

## ABSTRACT

### Investigating the Protective and Therapeutic Effect of Molsidomine on Methotrexate Induced Liver Damage in Rat

**Aim:** Methotrexate (Mtx) is used as antineoplastics in some malignancies, and as immunosuppressive in some chronic diseases. High doses or long-term low doses usage may cause hepatotoxic effects. Molsidomine (Mol) is a nitric oxide donor used as a therapeutic agent mainly for angina due to vasodilation and antioxidant effects. Herein, it was investigated whether Mol could improved the Mtx-induced hepatotoxic effect in rats or not.

**Material and method:** Forty vistar albino rats were used for the study. Rats were divided into five groups of 8 animals: Group I (control group), Group II (Mol group), Group III (Mtx group), Group IV (Mol-Mtx group), Group V (Mtx-Mol group). Roening fibrosis grading for histopathological findings and semiquantitative grading for BCL-2 were used.

**Results:** The histomorphological findings in the Mol and Mtx groups were similar. Slightly increased bile duct proliferation, moderate chronic inflammation, and patchy vacuolar degeneration which became more pronounced in the pericentral area of hepatocytes were seen. There wasn't fibrosis and fatty degeneration. Compared with the other three groups, a decrease in inflammation was determined in the Mol-Mtx group (score 1) . Score 2 staining of BCL-2 antibody was observed in the Mtx group. A decrease in staining with BCL-2 antibody was seen in the Mol-Mtx group. There was no increase in AST and ALT levels and no significant difference was found between the groups. GSH, the difference between the groups of Mol and Mtx and between the groups of Mol-Mtx and Mtx was statistically significant ( $p < 0.001$ ). There was statistical significance between control group and Mol group and between control group and Mtx group with MDA ( $p < 0.001$ ). SOD was statistically significant in all groups according to Mtx group ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** Steatosis and fibrosis were not observed with the use of high-dose Mtx, and the transaminase levels remained in normal limits. Mol treatment demonstrated histopathologic improvement in histopathological findings of Mtx-induced hepatotoxicity and decreased levels of MDA, SOD, KAT enzymes.

**Key words:** Methotrexate, Molsidomine, hepatic fibrosis, hepatotoxicity.



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AICAR</b>	: 5-aminoimidazol-4-carboksiamid ribonükleotit
<b>ALL</b>	: Akut lenfositik lösemi
<b>ALP</b>	: Alkalen fosfataz
<b>ALT</b>	: Alanin Aminotransferaz
<b>AST</b>	: Aspartat Aminotransferaz.
<b>DHFR</b>	: Dihidrofolat reduktaz
<b>DHFR</b>	: Dihidrofolat reduktaz
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>GGT</b>	: Gama Glutamil Transferaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSH</b>	: Redükte glutasyonun
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSSG</b>	: Okside glutasyon
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen-Eozin
<b>HSK</b>	: Hepatoselüler karsinom
<b>i.p</b>	: intraperitoneal
<b>İHK</b>	: İmmunohistokimya
<b>İNÜTF-DEHÜM</b>	: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi
<b>KAT</b>	: Katalaz

<b>Kont</b>	:Kontrol grubu
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>Mol</b>	: Molsidomin
<b>MPO</b>	: Myeloperoksidaz
<b>MT</b>	: Masson trikrom
<b>MTHF</b>	: Metilentetrahidrofolat
<b>MTHFR</b>	: Metilentetrahidrofolat redüktaz
<b>Mtx</b>	: Methotrexate
<b>Mtx-PG</b>	:Methotrexate polyglutamat
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<b>NBT</b>	: Nitroblue Tetrazoliyum
<b>NK</b>	: Natural killer
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>ORO</b>	:Oil Red O
<b>PIIINP</b>	: Prokollajen III aminopeptit
<b>ROS</b>	: Serbest oksijen radikalleri
<b>SNP</b>	:Tek nükleotit polimorfizm
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>TBA</b>	: Tiobarbitürik asit
<b>TCA</b>	: Triklorasetikasit
<b>THF</b>	: Tetrahidrofolat
<b>TS</b>	: Timidilat sentataz
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	: $\alpha$ -smooth muscle actin

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2-1: Karaciğerin ligamentleri, sağ ve sol lobları ile anatomik görünümü.....	3
Şekil 2-2: Karaciğer lobları .....	4
Şekil 2-3: Normal karaciğer histolojisi .....	6
Şekil 2-4: Karaciğer dokusunun mikroskopik yapısı. ....	7
Şekil 2-5: Karaciğer mikro anatomisi şematik olarak gösterilmesi. ....	8
Şekil 2-6: Karaciğer mikro anatomisinde safra kanalının şematik olarak gösterilmesi ..	8
Şekil 2-7: Mtx'in mekanizmasının şematik gösterimi .....	12
Şekil 2-8: Mtx'in mekanizması .....	13
Şekil 2-9: Folat-homosistein yolağı. ....	14
Şekil 2-10: Mtx ekstraselüler adenozin konsantrasyonunun artırma mekanizması .....	16
Şekil 4-1: Normal karaciğer histolojisi (Kont grubu, H&E, x100). ....	35
Şekil 4-2: ORO ile negatif boyanma (bütün gruplar, x100). ....	35
Şekil 4-3: Olağan bağ doku (MT, bütün gruplar, x100). ....	36
Şekil 4-4: Hafif inflamasyonun eşlik ettiği safra duktus proliferasyonu (Mol grubu, H&E, x100). ....	36
Şekil 4-5: Eozinofil lökositlerin eşlik ettiği orta derecede portal inflamasyon (Mol grubu, H&E, x200). ....	37
Şekil 4-6: Portal alanda inflamasyon, granülom varlığı (Mol grubu, H&E, x100). ....	37
Şekil 4-7: Orta derecede portal inflamasyon ve safra duktus proliferasyonu (Mtx grubu, H&E, x100). ....	38
Şekil 4-8: Vakuoler (hidropik) dejenerasyon alanları (Mtx grubu, H&E, x100). ....	38
Şekil 4-9: Düşük dereceli portal inflamasyon (Mol-Mtx grubu, H&E, x100). ....	39
Şekil 4-10: Portal inflamasyon (Mtx-Mol grubu, H&E, x200). ....	39
Şekil 4-11: Lobüler alanda granülom yapısı (Mtx-Mol grubu, H&E, x200). ....	40
Şekil 4-12: Safra duktus proliferasyonu (Mtx-Mol grubu, H&E, x100). ....	40
Şekil 4-13: BCL-2 antikoru ile negatif boyanma (Kont grubu, x100). ....	41
Şekil 4-14: BCL-2 antikoru ile perisantral tek sıra hepatositlerde pozitif boyanma (skor 1) (Mol grubu, x100). ....	41

<b>Şekil 4-15:</b> BCL-2 antikoru ile peri santral hepatositlerde pozitif boyanma (skor 2) (Mtx grubu, x100).....	42
<b>Şekil 4-16:</b> BCL-2 antikoru ile parankimde dağınık boyanma (skor 2) (Mtx grubu, x100). .....	42
<b>Şekil 4-17:</b> BCL-2 antikoru ile Mol-Mtx grubu örneklerinde perisantral hepatositlerde tek sıra ve seyrek boyanma (skor 1) (BCL-2, x100).....	43
<b>Şekil 4-18:</b> BCL-2 antikoru ile perisantral hepatositlerde pozitif boyanma (skor 2) (Mtx-Mol grubu, x200).....	43
<b>Şekil 4-19:</b> BCL-2 antikoru ile parankimde dağınık ve yaygın hepositer boyanma (skor 2) (Mtx-Mol grubu, x100).....	44

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 3-1:</b> Deney grupları.....	20
<b>Tablo 3-2:</b> SOD enzim aktivite tayininde kullanılan reaktifler .....	22
<b>Tablo 3-3:</b> GSH enzim aktivite tayininde kullanılan reaktifler .....	23
<b>Tablo 3-4:</b> GSH enzim aktivite tayininde kullanılan reaktifler .....	24
<b>Tablo 3-5:</b> KAT enzim aktivite tayininde kullanılan reaktifler .....	25
<b>Tablo 3-6:</b> MDA miktarının tayininde kullanılan reaktifler .....	26
<b>Tablo 3-7:</b> Roening derecelendirmesi .....	28
<b>Tablo 3-8:</b> BCL-2 boyama derecelendirmesi .....	29
<b>Tablo 4-1:</b> Deney başlangıcında ölçülen rat ağırlıkları.....	30
<b>Tablo 4-2:</b> Deney sonlandırıldığında ölçülen rat ağırlıkları .....	30
<b>Tablo 4-3:</b> Gruplara ait plazma ALT ve AST değerleri.....	31
<b>Tablo 4-4:</b> MPO analiz değerleri .....	31
<b>Tablo 4-5:</b> SOD, GSH, GSH-Px, KAT, MDA analiz değerleri.....	32
<b>Tablo 4-6:</b> Histopatolojik skorlama .....	34

# 1. GİRİŞ

Methotrexate (Mtx) bir immünsüpresif ve antineoplastik ajandır. Lösemi, lenfoma, solid tümör ve romatoid artrit tedavilerinde geniş kullanım alanına sahiptir(1, 2). Ayrıcapsöriyazis, Crohn Hastalığı, juvenil dermatomyozit, lokalskleroderma, vaskülit gibi diğer birçok hastalığın tedavisinde ve gebeliğin tıbbi nedenlerle sonlandırılması olmak üzere çok yönlü kullanımı mevcuttur (1-3).

Mtx'in yüksek dozlarında serumda aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerinde artış yaparken kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların tedavisinde uzun süreli kullanımına bağlı olarak karaciğer yağlanması, fibrozis, ve hatta siroza neden olduğuna dair bir çok çalışma bulunmaktadır (1, 3).

Vazodilatasyon etkisini nitrikoksit (NO) donörü olarak yapan Molsidomin (Mol), bu etkisinden dolayı, kronik anginanın semptomlarının azaltılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (4, 5). Ayrıca Mol'ün güçlü antioksidan etkisinin bulunduğunu belirten çalışmalarda, musküler distrofide satellit hücrelerin farklılaşması ve aktivasyonu ile birlikte tamir özelliğinin artmasında etkili olduğu bildirilmiştir (5, 6). Bunun yanı sıra nötrofil lökosit infiltrasyonunu azaltarak tamir edici etkiye de katkı sağlamaktadır (5).

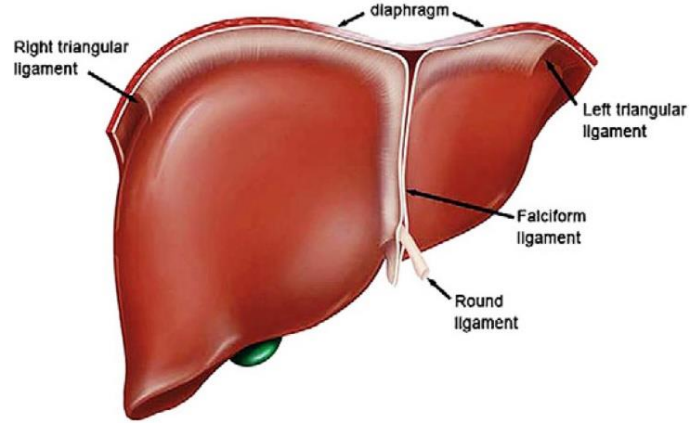
Bu çalışmada Mtxile oluşturulacak hepatotoksisitede Mol'ün koruyucu ve/veya tedavi edici etkisinin olup olmadığı araştırılacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer, deriden sonra vücudumuzun en büyük organıdır. Ağırlığı yaklaşık vücudumuzun %2-3'ü kadardır. Karaciğer temelde iki lobdan oluşmaktadır. Klasifikasyonu morfolojik anatomik veya fonksiyonel olarak değerlendirilmesine göre değişiklik gösterir. Abdominal bölgedeki izdüşümüne bakıldığında *hypochondriaca dextra* ve epigastrik bölgenin büyük bir bölümünü doldurur ve *hypochondriaca sinistra*'ya uzanarak üst kısımda lokalize olduğundan göğüs kafesi tarafından korunmaktadır (7, 8). Karaciğerin konveks üst yüzü, diyafragma kubbesinin alt yüzünün şekline uyar. Üst yüzeyi diyafram ile çevrelenmiş kalp ve perikardiumdan diyaframın santral tendonuyla ayrılmıştır. Karaciğerin anterior ucu ve medial, ventral, ve laterali Glisson kapsülü ile kaplıdır. Kapsülün etrafı ve diğer organlara yapıştığı yerler dışında kalan kapsülsüz kısımda koroner ligamentin süperior ve inferior tabakaları seröz bir kılıf olan visseral periton ile çevrelenmiştir. Bu periton, karaciğerin arka ve alt kısmında vena kava inferior ve hepatic venlere yakın bir kısmını örtmez. Kaudat lob, sağ ve sol da vena kava inferior arasında uzanan *ligamentum venosum* ile ayrılır ve lesser omentum'a tutunur (9).

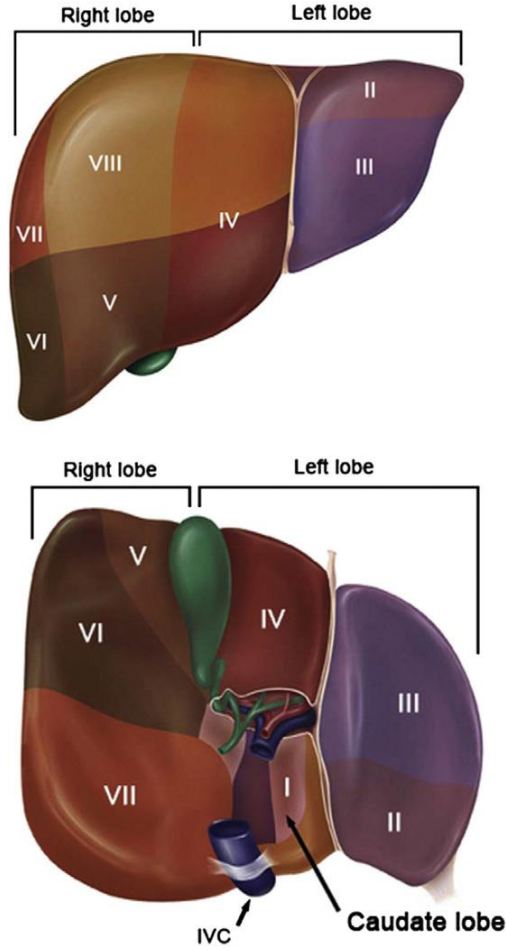
Karaciğer orta hat falsiform ligament ile belirginşekilde sağ ve sol loba ayrılmıştır. Ayrıca makroskopik incelmede kaudat ve kuadrat loblar da görülür. Daha kullanışlı ve önem arzeden karaciğerin segmental ayırımı, hepatic arterin dallanması, portal ven ve safra kanalı temel alınarak yapılmaktadır. Bu yapılar porta hepatisden karaciğer içlerine doğru takip edildiğinde porta hepatisin her bir kolunamenkimden köken alan ve üç dala ayrılan bağ dokusunun eşlik ettiği görülecektir (9).



**Şekil 2-1:** Karaciğerin ligamentleri, sağ ve sol lobları ile anatomik görünümü (7).

Karaciğerin her bir yarısında bulunan portal venin primer dalları iki ana portal segmente buradanda karaciğer içine doğru ilerledikçe horizontal olarak ayrılmış inferior ve superior segmentleri beslemek üzere de ikiye ayrıldığı görülür. Aşağıda yer verilmiş olan şemaya göre karaciğerin sekiz segmentinden bahsetmek mümkündür. Şayet orta hat ve venakava inferiorun oluşu dorsal çıkıntıda (kaudat lob) sayılırsa dokuz lob olarak tasnif edilir (9).





**Şekil 2-2:** Karaciğer lobları (7).

Anterior ve posteriyor yüzeyinden fonksiyonel anatomik kaudal, sağ ve sol lobların görünümü ve lob numaralandırılması. Couinaud sistemi kullanılarak karaciğer; 1-kaudat, lob sol lobda; 2-medio superior, 3-medio inferior, 4a-latero superior, 4b-latero inferior, sağ lobda; 5-medio inferior, 6-latero inferior, 7-latero superior, 8-medio superior loblarına ayrılmış halde numaralandırılır (9).

Medialde falsiform ligament ve safra kesesi çukuru arasında, lateralde venakava inferior oluğunda uzanan 4b segmenti ayrıca kuadrat lob olarak da adlandırılır (8).

Hepatik segmentlerin her biri sahip oldukları arter, portal ven, ve lenfatığın oluşturduğu vasküler ve safra drenajıyla algılanır. Farklı hepatic segmentler arası vasküler anastomozların önemli derecede faydası olsa da sağ ve sol hepatic arterler ya da portal ven sistem arasında majör intrahepatik vasküler bağlantı yoktur (9).

Bütün hepatic arter ve portal ven dalları ve hepatic kanallar birlikte çalışır. Karaciğerin segmentlerini beslerken hepatic ven müstakil olarak intersegmental olarak

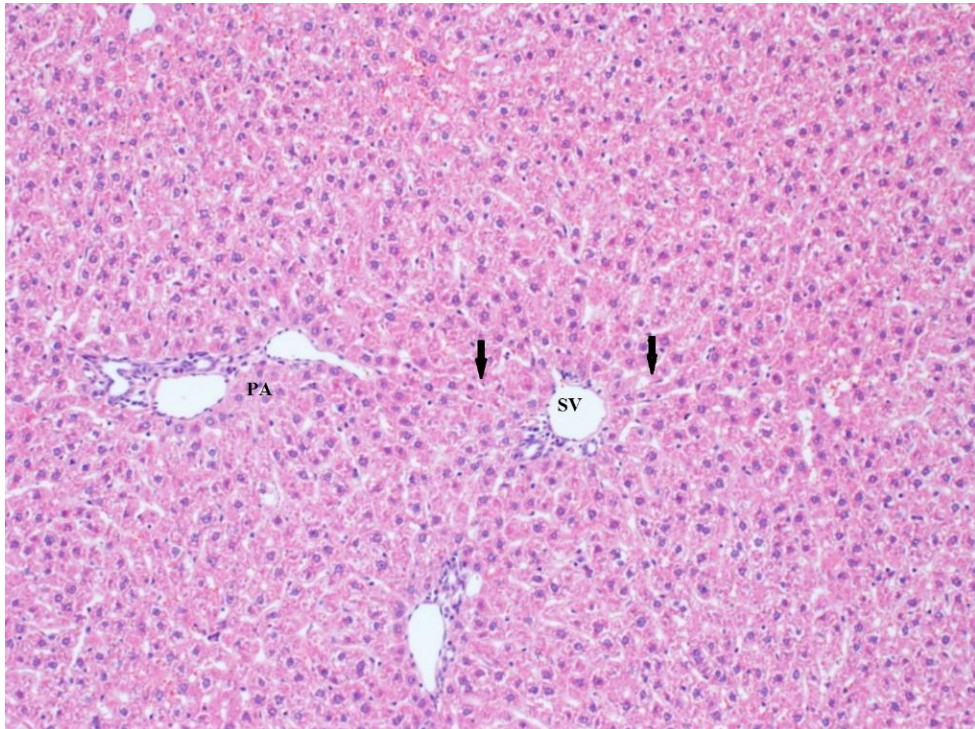
görev yapar. Sağ, sol ve orta olmak üzere üç büyük hepatik ven vardır. Orta ve sol hepatik ven sıklıkla başlangıçta ortaktır (9).

Karaciğer çok damarsal bir organdır ve dinlenme halinde kalbin pompaladığı kanın diğer organlara nazaran %25 daha fazlasını tutar. Benzersiz şekilde hepatik arter ve portal venden oluşan ikili damar sistemi ile çift yönlü besleme sağlanır. Karaciğeri besleyen kanın %25-30'u hepatik arter yoluyla olurken geriye kalan %75-80'i portal ven ile sağlanır. Arteriyel ve portal kan karaciğer hepatik sinüzoidlerinde birbirine karışır ve kan dolaşımına hepatik venöz sistem üzerinden tekrar döndürülür (7).

## 2.2. Karaciğer Mikro Anatomisi

Bir organın fonksiyonel birimi, yapısal açıdan en küçük ve kendine yetenbağımsız olarak organın tüm bilinen işlevlerine yardımcı olan birimşeklinde ifade edilebilir.

Karaciğerin yapısal ve fonksiyonel ünitesi bir yüzyıldan fazla süredir klasik ve portal lobüller olarak tanımlanmış durumdadır. İlk olarak merkezde bir hepatik venin yer aldığı altıgen yapı ve altıgen yapının üç köşesinde portal alan şeklinde klasik lobül tanımlanmıştır. Hücre plakları sinüzoidler gibi santral venden lobülün periferine doğru ışınal şekilde uzanırlar (9, 10, 11). Altıgenin köşelerinde portal triadların yer aldığı gevşek stromal bağ dokusu olan portal alanlar yer almaktadır (11). Klasik lobül tanımı sahip olduğu yapısal ve metabolik temelde porto-santral gradiyente vasküler akışı, safra drenajını ve metabolik işleyişi gösterebilirken lateral veya porto-portal gradiyenti tam açıklayamaz (10).



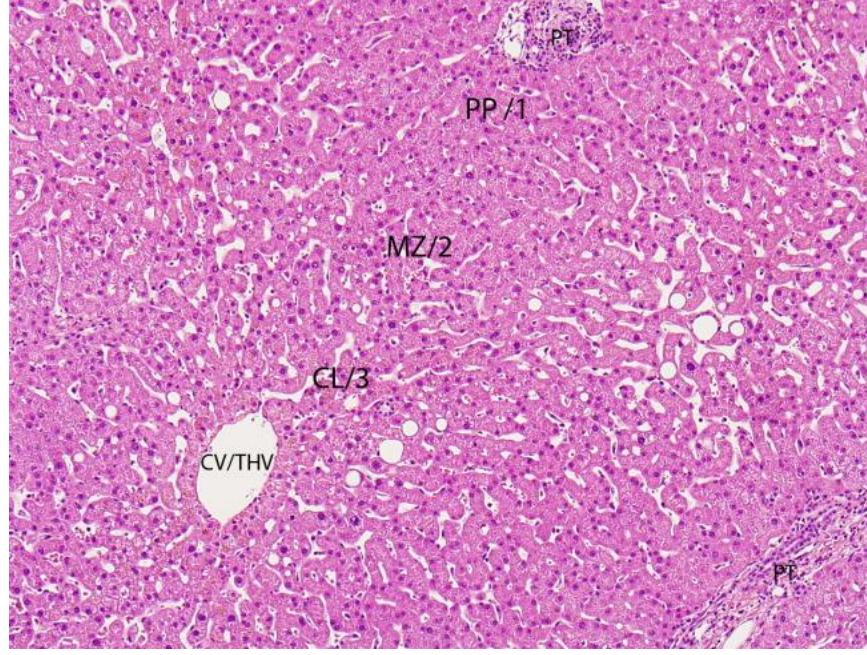
### Şekil 2-3: Normal karaciğer histolojisi

SV: Santral ven, PA: Portal alan, Oklar: Hepatositler santral venden lobülün periferine doğru ışınal şekilde uzanırlar (H&E x100).

Portal alan, hilusdan orjin alan ve karaciğer boyunca dallanma paterni gösteren kanallardır. Yapısında safra kanalı, hepatik arter, portal ven, lenfatik damarlar, sinir lifleri ve birkaç inflamatuvar hücre bulundurur. Başlıca Masson Trikrom (MT) boyama tekniğinde mavi/yeşil renge boyanan tip I kollajen içeren bağ doku ile desteklenir (12).

Portal lobül, karaciğerin başta safra salgılanması olmak üzere ekzokrin fonksiyonları öne çıkarılarak tanımlanır (11). Portal lobülde, portal alan merkezde santral ven ise periferde tanımlanmıştır (10). Portal lobülün dış kenarları, portal triada en yakın üç santral ven arasında çizilen sanal çizgilerdir. Böylece üç klasik primer lobülün safra üreten kısımlarını ve üretilen safranın drenajını tanımlar (11).

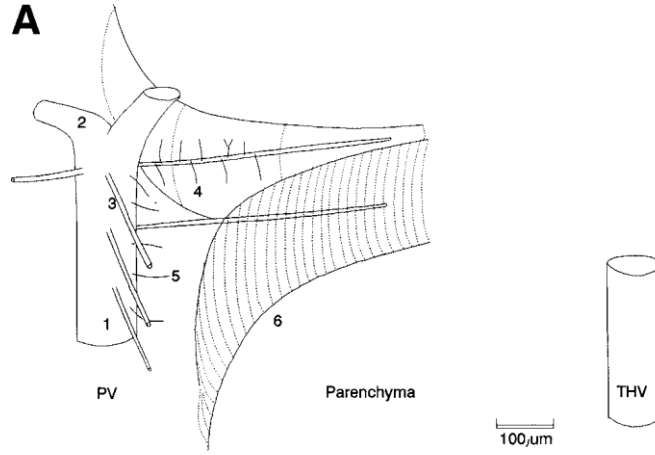
1954 yılında Rappaport ve arkadaşları karaciğerde mikrosirkülatur akış temelinde karaciğer asinüsü tanımlamıştır. Bu formüle göre asinüs bir eş kenar üçgen şeklindedir. Portal alan bu eşkenar üçgenin tabanını oluşturur, santral ven ise üçgenin tepesine denk gelir ve böylece altıgen klasik lobülde altı adet asinüs yer alır (9). Asinüs en küçük fonksiyonel ünitedir ve üç zona ayrılmaktadır (10). Zon 1 portal alanı çevrelerken zon 3 santral veni çevreler zon 2 ise bu iki zon arasındadır. Kan akışı portal alandan bu üç zonu geçerek santral vene doğru gerçekleşir (12). Portal alanı çevreleyen periportal zon glikogenezis ve yağ asidi metabolizmasında yüksek kapasiteye sahipken perivenöz hepatositler detoksifikasyonda yüksek kapasiteye sahiptir. Bu bağlamda karaciğer fizyolojisi ve metabolizmasının heterojenite sergilediği söylenebilir (9).



**Şekil 2-4:** Karaciğer dokusunun mikroskopik yapısı (12).

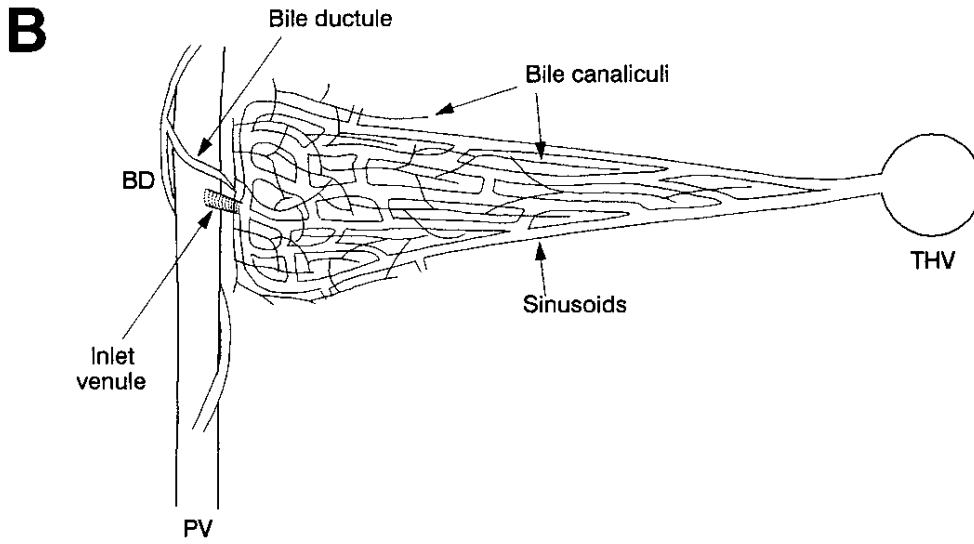
Genellikle bir- iki sıralı tabaka halinde hepatositlerin şekillendirdiği asinüsün üç zondan oluşan yapısı. Zon 1: Peri portal (PP), zon 2: Orta zon (MZ), zon 3: Sentrolobuler zon (CL). PT: Portal alan, CV: Santral ven (terminal hepatik venül) (H&E, x100).

Vasküler septum portal venin dağılan üçüncül kollarının sonlandığı, çevresinde neredeyse bağ dokusundan yoksun sinüzoidlerden hafif geniş yapılardır. Portal venin terminal kolların (portal venül) lobüller arasında bir bölme gibi sınır oluşturur. Böylece altıgen hepatik parankimayı altı-sekiz bölmeye ayırır. Bu iki yapı primer ve sekonder lobül olarak da adlandırılır. Her bir primer lobül portal ve septal zondan oluşan ve vasküler septa ile sınırları belirlenmiş konik şeklinde bir ünedir. Portal alan orak şeklindedir. En geniş yerinden yana doğru ilerledikçe zayıflayarak diğer bir portal alanın ucuna temas ederek sonlanır (10).



**Şekil 2-5:**Karaciğer mikro anatomisi şematik olarak gösterilmesi (10).

(A)PV: Portal venin terminal kollarına ve portal venüllere (septal) doğru iletim yolunu göstermektedir. 1: Portal ven, 2: Portal ven kolları, 3: Portal (septal) venül. Portal venüller parankimanın içlerine doğru ilerler ve sinüzoidlerde ağız verir. 4: Sinüzoid. Alternatif olarak inlet sinüzod dallarına doğrudan terminal portal venden ulaşabilir. 5:Terminal portal ven. THV: Terminal hepatik ven (santral ven).



**Şekil 2-6:** Karaciğer mikro anatomisinde safra kanalının şematik olarak gösterilmesi (10).

(B) Sinüzoidal kanallar yatay olarak, skill zon boyunca içe dönmeden önce yatay olarak yayılır ve sıralı sinüzoidal kanallar içe doğru dönüp konik zon oluşturmadan önce santral vene doğru yatay olarak uzanırlar. Terminal portal venden sinüzoidleri besleyen bir inlet sinüzoidi (inlet venül) oluşur. Safra kanalığı terminal safra kanalına, ordan hering kanalına ve safra kanaliküline bağlanır.



Hepatositlerin normal histolojik görünümü sinüzoidlerce ayrılmış tek ya da ikili kordonlar şeklinde dallanmalar gösterir ve portal alan ile sınırlanır (12). Bir hepatosit hücresi; büyüklüğü 25-40µ poligonal şekilli, eozinofilik sitoplazmalı ve oval veya yuvarlak santral yerleşimli çekirdeğe sahiptir. Hepatosit hücre zarının bazolateral kısmı sinüzoidlere bakarken kanaliküler yüzeyi isesafta kanaliküleri ile komşudur. Lateral yüzeyde ise özel bir bağlantı noktası ile komşu hepatosite tutunur (12). Hepatositlerin sahip olduğu iki yüzey; doğrudan madde transferi yapabilen sinüzoidal yüzey ile kanaliküler yüzey kıyaslandığında oldukça büyük bir polarizasyon gösterir (9). Hepatosit sitoplazması endoplazmik retikulum ve glikojence zengindir. Rutin çalışmalarda hepatositlerde bulunan glikojen *periodic acid-Schiff* boyama metodu ile gösterilir (12).

Sinüzoidler; portal alandan hepatic venüle doğru kan akışının gerçekleştiği kanallardır. Endotelial ve kupffer hücreleri ile astarlanmışlardır. Kupffer hücreleri özelleşmiş makrofajlardır. Sitoplazmik uzantıları makrofaj fonksiyonunu gerçekleştirmelerini sağlayacak şekilde düzensiz yapıdadırlar. Bu hücreler retikülinden bir tabaka üzerinde konulanırlar. Endotelial tabaka ise gözenekli yapısı ile kan ve hepatositler arasında madde alışverişine izin verir. Sinüzoid astarı endotel ya da kupffer hücreleri ile temas halindeki pit hücreleri ile ilişkiindedir (12). Pit hücreleri karaciğere özgü natural killer (NK) hücreleridir ve endotel, kupffer ve yağ depo hücreleri ile karaciğer sinüzoidlerinde bulunan hücre grubu içinde yer alırlar (13).

Disse mesafesi kan ve hepatositlerin madde değişiminde rol oynayan, hepatositler ile endoteller arasında mikro çevre oluşturan aralıktır. Bu aralık retiküler çerçeve ve stellat hücrelerinin şekillendirdiği plazma ve bağ dokusu içerir. Stellat hücreleri myofibroblast ailesinin bir üyesidir ve vitamin A depolanmasında, fibrogenesis ve sinüzoidal kan akışının kontrolünde önemli rol oynar (12).

İntrahepatik biliyer sistem safra kanalikülü komşu hepatositler arasında ilerleyen intraparankimal, poligonal bir ağ formundadır. Portal alan ara yüzünde kanalikül kısmen kolanjiyosit kısmında hepatositlerden oluşan hearing kanalına dökülür. Hearing kanalları safra duktusuna açılır. Periportal alandaki duktuslar interlobüler safra kanalına katılır ve daha büyük safra duktusları intrahepatik safra kanalı ile anastomoz yaparlar (10).

### **2.3. Methotrexate**

#### **2.3.1. Methotrexate Nedir?**

Mtx bir immünsupresif ve antineoplastik ajandır. Lösemi, lenfoma, solid tümör ve romatoid artrit tedavilerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir (1, 3). 1940'lı yıllarda

bir grup bilim adamı folik asidin kanser üzerine olan etkilerini araştırılmaya başlamıştır. 1947 yılında Subbarao tarafından bulunan ve folik asidin analogu olan aminopterin, çocuklarda lenfoblastik lösemiye tedavi edebileceğini göstermiştir. Bilim adamları; folik asit analogları üzerine yaptıkları çalışmaları, lösemide folik asit desteğinin durumu kötüleştirebileceği ve folik asit analoglarının folik asit düzeyini düşürerek tedavi edici etkisi olacağı temelinde devam ettirdiler (1, 3).

### **2.3.2. Methotrexate'ın Gelişimi**

1950'li yılların sonunda Sidney Farber ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarla toleransı daha iyi ve daha az toksik olan Mtx geliştirilerek aminopterin yerini almıştır (1, 3). 1956 yılında prelinik ve klinik çalışmaların ilk sonuçları yayınlandığında Mtx'in tedavi edici etkisinin aminopterin'den daha iyi olduğunu göstermiştir. Mtx'in geliştirilmesinden itibaren kullanımı diğer birçok kanser türlerinde ve birçok hastalıkta tek veya başka ilaçlarla kombine edilerek tedavide kullanımı gelişerek artmıştır (1).

1950'lerde akut lösemi tedavisinde kullanılmaya başlayan Mtx, yine aynı yıllarda solid tümörlerin tedavisinde, 1960'larda psöriatik lezyonların ve koryokarsinom'un tedavilerinde kullanım alanı bulmuştur. Mtx'in düşük doz kullanımının romatoid artrit üzerine etkileri ilk kez 1951 yılında yayımlanmış olmasına rağmen 1980'lere kadar kontrollü çalışmalara ait bulguların yayımlandığı görülmüştür (2). 1970'li yıllarda kanser dışı etkileri üzerine yapılan çalışmaların genişlemesi, Mtx ile romatoid artrit arasındaki ilişkiye ait çalışmalar nihayet 1988 yılında tamamlanabilmiştir. Mtx, 1988 ve 2002 yıllarında sırasıyla romatoid artrit ve Crohn Hastalığı tedavisinde *Food and Drug Administration* (FDA) onayı almıştır (2, 3).

### **2.3.3. Tedavide Kullanım Alanları**

Doz rejimleri çeşitlilik göstermekle beraber genelleme yapmak gerekirse; kısa süreli yüksek doz kanser tedavisinde uygulanırken, otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda ise 10-25 mg/m<sup>2</sup>/hafta gibi uzun süreli düşük doz kullanımı uygulanmaktadır (3, 14). Lösemi, lenfoma, solid tümörler gibi çeşitli malignitelerin tedavisi yanı sıra, psöriyazis, Crohn hastalığı, juvenil dermatomyozit, lokal skleroderma, vaskülit gibi diğer birçok hastalığın tedavisinde ve gebeliğin tıbbi nedenlerle sonlandırılması olmak üzere çok yönlü kullanımı mevcuttur (1-3, 14).

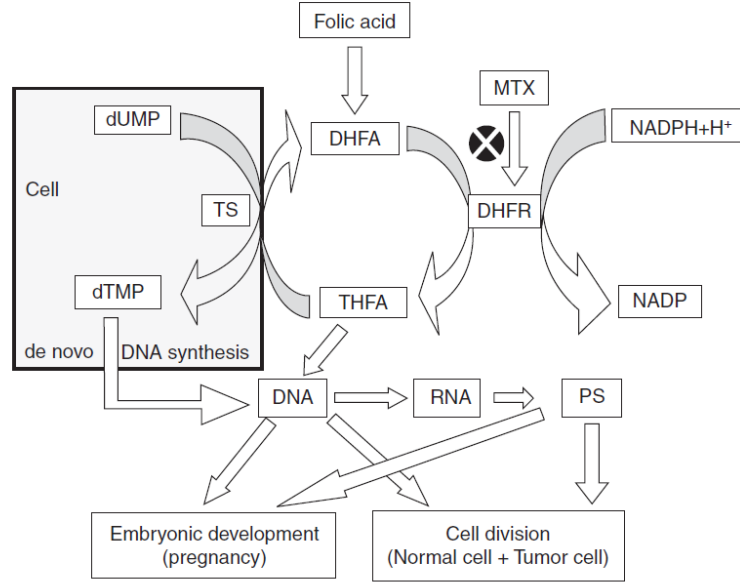
#### 2.3.4. Etki Mekanizması

Mtx biyofarmosötik sınıflandırmada sistemide, III. sınıfın bir ilacıdır. Suda zayıf çözünür ve düşük permeabiliteye sahiptir. Oral yolla alındığında intestinal sistemden emilimi folik asit ile kısmen paylaştığı yol olan proton bağlı aktif transport ile meydana gelir (1).

Folik asit doğal besinlerden izole edilmiş olduğu, yeşil yapraklı sebzelerde bol bulunduğundan yaprak anlamına gelen “folium” kelimesinden türetilmiştir. Suda çözünen amid türevi olan folik asidin en önemli görevi tek karbon transferi reaksiyonlarında koenzim rolü oynamasıdır (15). Tetrahidrofolat (THF) biyosentetik reaksiyonlarda çeşitli tek karbonlu üniteleri (metil, metilen, formil veya formimino) taşır. Tek karbonlu bu üniteler serin, metiyonin, glisin aminoasitlerinin, kolinin ve pürin nükleotidlerinin sentezinde kullanılır (15). Yani fosfolipidler, proteinler, DNA ve nörotransmitterleri içeren çeşitli temel biyolojik maddelerin metilasyonu için tek karbon ünitesi sağlamaktadır. Örneğin metil döngüsü aktive edildiğinde, folat, 5 N-methyltetrahydrofolate olarak homosisteine bir metil grubu ekleyerek metiyonine dönüştürür ve bu dönüşümden dolayı universal metil donörü olarak görev yapar (15, 16).

Mtx'in temel mekanizması insanlarda folatın aktif formu olan tetrahidrofolik asitin sentezi için gerekli dihidrofolat reduktaz (DHFR) enzimini inhibe etmesidir. Mtx'in DHFR enzimi ile karşılaştığında folik aside nazaran 1000 kat daha sıkı bağlandığı bildirilmiştir (14). Bu yönü ile özellikle kanser hücrelerinin de yer aldığı hızlı bölünen hücrelerin bölünme ve çoğalma sürecini negatif yönde etkilemektedir. Sentez için gerekli temel vitaminlerden biri olan folat DNA'nın metilasyonunda, tamirinde replikasyonunda oynadığı rol ile genomun ifade edilmesinde anahtar niteliğindedir (1, 14, 17).





**Şekil 2-7:** Mtx'in mekanizmasının şematik gösterimi (1).

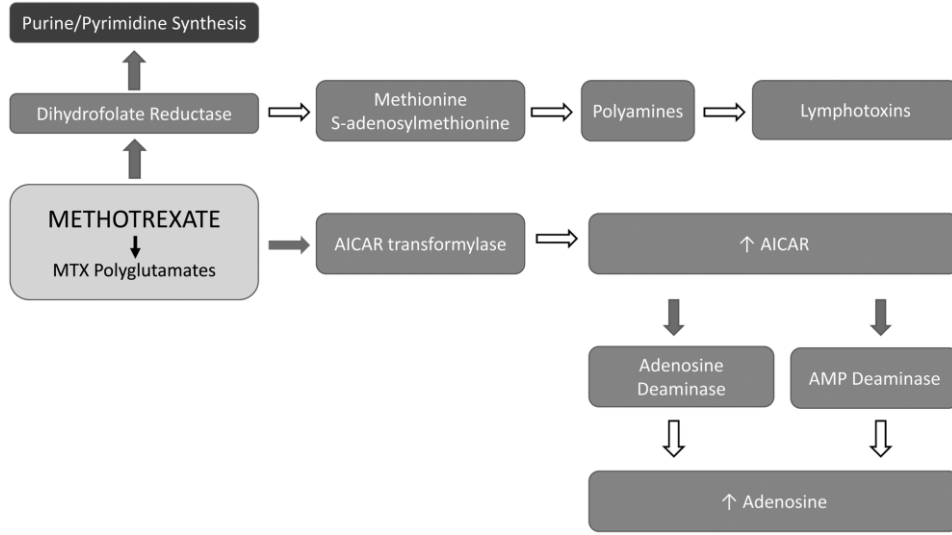
DHFA: Dihydrofolik asit, DHFR: Dihidro folat redüktaz, DNA: Deoksi ribonükleik asit, dTMP: Timidilat, dUTP: Deoksiuridilat, Mtx: Methotrexate, NADP: Nikotinamide adenin dinükleotid fosfat, NADPH+H+: İndirgenmiş NADP, PS: Protein sentezi; RNA: Ribonükleik asit, THFA: Tetrahidro folik asit, TS: Timidilat sentaz.

DHFR'nin inhibisyonu Mtx'in kanser tedavilerinde, yüksek doz kullanımında daha belirgindir. Düşük doz Mtx kullanımında ise purin metabolizmasını da içeren enzimleri baskılayarak hücre içinde adenozin birikimine neden olduğu ve böylelikle antiinflamatuvar etki gösterdiği yönünde çalışmalar mevcuttur. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada haftada tek, düşük doz Mtx tedavisi ile T lenfositler başta olmak üzere lenfoid dokuda proliferasyonun önemli ölçüde baskılandığı bildirilmiştir (14, 18). Mtx T hücrelerin aktivitelerine ket vurarak, T hücreleri tarafından eksprese edilen interselüler adezyon moleküllerinin ekspresyonunu değiştirerek antiinflamatuvar etki gösterdiği çalışmalarla ortaya konmuştur (14, 18).

Folik asit'in antagonisti olan Mtx, başta DHFR olmak üzere metabolizmada birçok kilit rol üstlenmiş enzimi inhibe ederek purin ve pirimidin sentezini bloke eder (19).

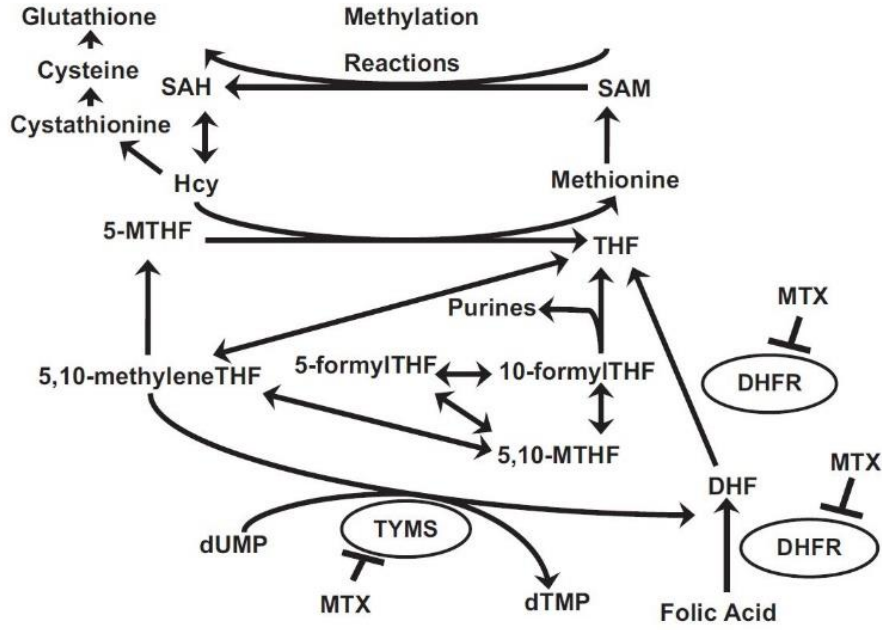
DHFR'nin inhibisyonu THF ve metilentetrahidrofolat (MTHF) seviyesinin azalmasına neden olarak DNA, protein, lipid metilasyonlarının yerine gelmemesi ile sonuçlanır (19, 20). DNA metilasyonu epigenetik mekanizmalardandır ve DNA üzerindeki CpG adalarındaki sitozin bazının 5' ucuna metil grubu takılarak genlerin ifade edilmesinde ya da susturulmasında hayati önem taşır (21).

Mtx yine metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimini inhibe ederek timidilat sentataz (TS) enzimine ket vurması ile DNA sentezi durdurulurken 5-aminoimidazol-4-carboksiamid ribonükleotiti (AICAR) bloke edilerek de novo purin sentezi bloke edilmiş olur (19, 22).



**Şekil 2-8:** Mtx'in mekanizması (20).

Gri oklar inhibe edilen yolları göstermektedir.



**Şekil 2-9:** Folat-homosistein yolağı (23).

5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolat, 5,10-MTHF: 5,10-metiltetrahidrofolat, DHFR: Dihidrofolatreduktaz, dTMP: Deoksitimidinmonofosfat, dUMP: Deoksiuridinmonofosfat, Hcy: Homosistein, Mtx: Methotrexate, SAH: S-adenozilhomosistein, SAM: S-adenozilmetyonin, THF: Tetrahidrofolat, TYMS: Timidilat sentetaz.

DHFR enzimi DNA sentezinde temel rol oynayan enzim olduğundan dolayı çeşitli kanserler, otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde hedef molekül özelliğindedir. Folat yerine Mtx'in DHFR enzimine sıkı bağlanarak onu inhibe etmesi akut lenfositik lösemi (ALL), non-Hodgkin lenfoma ve osteosarkom gibi kanserler üzerinde etkin tedavi edici özelliğe sahip olmasını sağlamaktadır (24, 25). Mtx'in etkinliğini sınırlayan doğal ve edinilmiş dirençlerin olması ve yüksek dozlarda toksisite görülmesi kullanımına sınırlama getirmektedir (1).

### 2.3.5. Genetik Çalışmalardaki Yeri

Mtx'in etkinliğinde en önemli rolü DHFR enzimini inhibe ederek DHF'ın THF'a dönüşmesine ket vurmaktır. Mtx, DHFR enzimini inhibe ederken bu enzimin metabolitleri içinde MTHFR de bulunduğu diğer folat enzimlerinin baskılanmasına neden olur (26). Genetik çalışmalar göstermiştir ki MTHFR geni üzerinde yer alan bazı tek nükleotit polimorfizmleri (SNP), Mtx tedavisindeki yanıtı değiştirebilmektedir (2). MTHFR enzimi 5,10-metilentetrahidrofolat'ı 5-metilentetrahidrofolata dönüştürür.

M1p36.3'de lokalize olmuş MTHFR enzimini kodlayan genin C677T mutasyonunda MTHFR enzim aktivitesinin diğer alellere göre daha az olduğu bildirilmiştir (21, 27). Bu durumda homosisteinin metilasyonu yeterince yapılamadığından bir taraftan metiyonin azalırken diğer taraftan homosistein seviyesinin önemli ölçüde artmasıyla, organizmayı homosisteinin aşırı birikmesinden doğan toksik etkilere maruz bırakır (21, 22, 25). Yine hematopoetik ve hepatik toksite riskinin diğer alellere göre daha yüksek olduğu sonucunun gösterildiği çalışmalar mevcuttur (22, 28).

Mtx'in yaygın olarak kullanılmaya başlandığı 1960 yıllardan itibaren hepatotoksik etkisi üzerine çok sayıda vaka bildirimini yapılmış ve birçok çalışma yürütülmüştür (29; 30). Yaptığımız literatür taramalarında gördüğümüz, son yıllarda Mtx'in sitotoksik etkisi üzerine yapılan çalışmaların sayısı ve çeşitliliğinin artmış olduğudur. Kemoteropik ajan olarak yüksek dozda veya otoimmün hastalıklarda ya da antiinflamatuvar özelliğinden dolayı düşük dozlarla uzun süreli tedavilerde ortaya çıkan etkileri üzerine olduğu gibi, bu çalışmalara Mtx'in MTHFR geni üzerindeki SNP'lerin Mtx'in tedavideki etkinliğini ve sitotoksik etkisi üzerine farklı popülasyonlar da çalışılmıştır. Yine SNP alleleri arasındaki farklılıkların hematopoetik ve hepatik toksite riskini etkilediği yönünde çalışmaların olduğu görülmüştür (20, 21, 26, 28, 30).

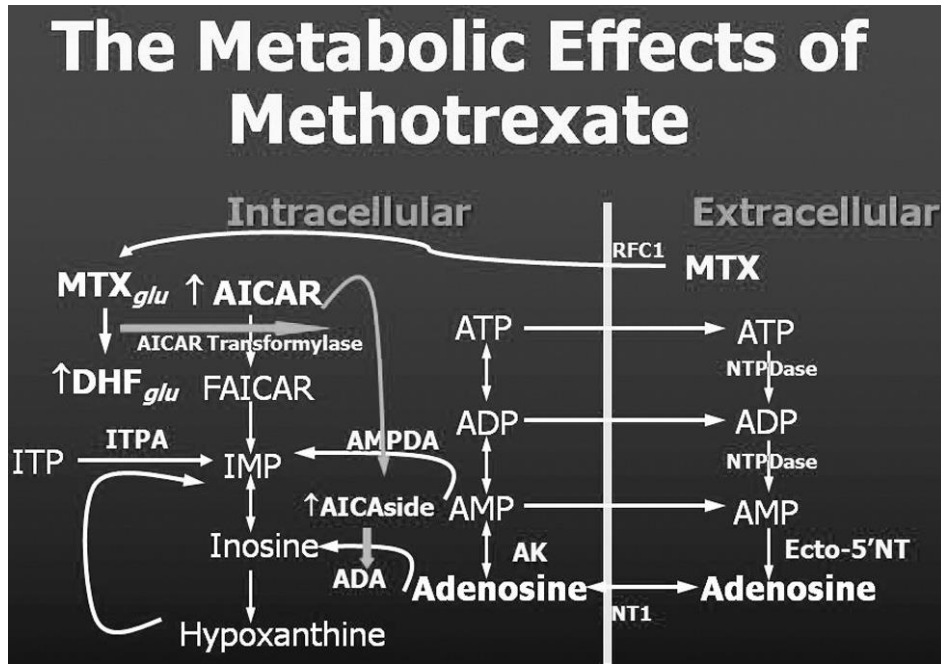
### **2.3.6. Toksisitesi**

Mtx'in serumda AST ve ALT artmasına neden olduğu ve kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların tedavisinde uzun süreli kullanımına bağlı olarak karaciğer yağlanması, fibrozis, ve hatta siroza neden olduğu geçmiş yıllarda yapılan birçok araştırma ile ortaya konulmuş ve iyi bilinen bir konudur (1, 3, 30, 31). Son zamanlarda Mtx'in neden olduğu karaciğer hasarının; alkol tüketimi, hepatit B, obezite ve diyabet hastaları gibi risk gruplarının doz farklılıkları, doz rejimi ve tedavi süresinin karaciğer hasarı üzerindeki etkilerini araştıran çalışmaların da yapılmış olduğu görülmüştür (1, 3, 32, 33).

Mtx tedavisinin yan etkilerinden biride karaciğerde fibrozis veya siroz gelişimidir. Farmakolojik konsantrasyona bağlı olarak Mtx hepatositlerden adenozin salınımını tetikler (20).

Folik asit yerine birçok biyokimyasal reaksiyonların merkezinde olan DHFR enzimi ile etkileşime giren Mtx'in önemli metabolitleri 7-hydroxymethotrexate ve Mtx'den türeyen Mtx-polyglutamatlardır (Mtx-PG). Mtx'in yarılanma ömrü 8 saat olmasına rağmen, bu metabolitler karaciğer eritrosit ve adipöz doku gibi dokulara

yerleşerek mevcudiyetlerini haftalarca koruyabilirler (19, 20). Mtx-PG, AICAR-transformilaz enzimini etkili bir şekilde inhibe eder. AICAR-transformilaz'ın baskılanmasıyla biriken AICAR ve metabolitleri adenozin deaminaz ve AMP-deaminazın inhibisyonunda içinde olduğu bir dizi olayı tetikler. Adenozin ve adenin nükleotitlerinin katabolizmasının azaltılmış olması doğrudan veya dolaylı olarak 5'-ekzonükleotidaz enzimi tarafından AMP'nin defosforilasyonu ile hücre içi adenozin seviyesinde etkili bir yükselişe ve serbest hale geçmesine neden olur (19, 20).



**Şekil 2-10:** Mtx ekstraselüler adenozin konsantrasyonunun artırma mekanizması (1).

Mtx: Methotrexate, MtxGlu: Methotrexate poliglutammat, DHFGlu: Dihidrofolat poliglutammat, AICAR: 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonükleotit, FAICAR: Formil AICAR, AMPDA: AMP deaminaz, AICAside: Aminoimidazol carboksamidoribonükleozid, ADA: Adenozin deaminaz, AK: Adenozine kinaz, RFC1: indirgenmiş folat taşıyıcı 1, NTPDase: Nükleozid trifosfat defosforilaz, Ecto-5'NT: ecto-5'-nucleotidaze, NT1:Nükleozid taşıyıcı 1.

Benzer bir etkiyle hepatositlerden adenozin salınımını etanol de yapar. Serbest kalmış adenozin karaciğer stellat hücreleri üzerinde yer alan adenozin A2A reseptörüne bağlanır. Karaciğer stellat hücreleri karaciğerdeki başlıca fibrojenik hücre tipidir ve kollajen tip I ve tip III'ünde yer aldığı matriks proteinlerinin üretimini desteklerken bazı matriks metalloproteinazların üretimini baskılar. Bu hipotez A2A adenozin

reseptörünebağlanmasının profibrinojenik etkiye katkı sağlamış olduğu, hepatik fibrozisin geri dönüşümlü ve geridönüşümsüz induksiyon modellerini içeren gen baskılama modelleri çalışılarak ve farmakolojik olarak ortaya konmuştur (20).

Romatoloji literatüründeMtx hepatotoksitesisi geniş bir şekilde yer almaktadır (30, 31) ALT, AST, alkalin fosfataz (ALP) değerlerinin üst limitin 2,5 katı veya daha yüksek ölçülmesi hepatotoksitesite bulgusu olarak değerlendirilir (22). Standart doz olan haftada 10-12,5 mg/m<sup>2</sup> uygulandığı tedavilerde hepatik trasaminazların artmasıyla karaciğer fibrozis gelişme olasılığının %15 dolaylarında olduğu bildirilmiştir. Psöriyazis tedavisinde 1996'dan itibaren Mtx kullanımının ana hatlarını içeren *Practice Guidelines*'da önemli karaciğer hastalıklarının gelişmesinde eşik değer olduğuna inanılan toplamda 1500 mg üzerine çıkıldığı takdirde rutin olarak karaciğer biyopsi yapılması önerilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan daha ileri araştırmalar invaziv girişimler için kümülatif dozun düşük olduğunu savunmakta ve toplamda Mtx'in 3,5-4grkümülatif doza ulaştığında ya da tedavinin kesilmesine rağmen serum karaciğer enzimlerinde azalma olmadığında invaziv girişime onay verilmesi gerektiği yönündedir (30).

Mtx'in karaciğer hasarı incelenirken birçok çalışmada Roening fibrozis derecelendirmesi kullanılmıştır (30, 32). Özellikle 2014 yılında yapılmış bir derlemede karaciğer biyokimyası uzun süre anormal seyretmesi ile karaciğer biyopsi anormallikleri arasında önemli bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (30).

Bununla birlikte toplam doz veya uzun dönem Mtx kullanımından kaynaklanan karaciğer fibrozisinin % 4 civarlarında olduğu, risk grupları dışarıda tutulduğunda Mtx ile karaciğer fibrozisi arasında doğrudan ilişki olmadığı yönünde bazı çalışmalar bulunmaktadır (34, 35).

Özellikle risk grubunda yer alan hastaların karaciğer biyopsisi yapılarak takip edilmesinin önemi vurgulanmış, normal karaciğer biyokimyasının normal karaciğer histolojisi anlamına gelmeyebileceği ifade edilmiştir (32). Yakın dönemde serumda AST ve ALT seviyelerinin takip edilmesi kadar belki daha fazla gama glutamil transferaz (GGT) ve yine karaciğer fibrozisi için bir belirteci olarak prokollajen III aminopeptit (PIIINP) seviyesinin takip edilmesinin karaciğerden biyopsi yapılma gereksinim azaltabileceği yönünde çalışmalar mevcuttur (14, 32). Her ne kadar siroz ve karaciğer fibrozisi için *transient elastography*, BT, MRkaraciğer siroz ve fibrozis tanısı için alternatif yollar olarak kabul edilse de biyopsi hala altın standarttır (33).

Normal karaciğer enzimi karaciğer hasarını ekarte ettirmeyeceği gibi yükselmiş karaciğer enzim düzeyleri deMtx ile ilişkili hepatotoksisiteyi göstermeyebilir. Bu bağlamda karaciğer enzimleri Mtx ile indüklenen karaciğerhasarını göstermede zayıf bir belirteçtir. GGT seviyesi ve düzenli PIINP ölçümleri karaciğer enzimlerine eklenmesinin yararlı olabileceğini savunan bir çalışma da mevcuttur (32).

#### **2.4. Molsidomin**

Mol, proilaç (prodrug) ve NO donörü olarak vazodilatasyon özelliğinden dolayı kronik angina'nın semptomlarının azaltılmasında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Mol enzimatik yolla karaciğerde linsidomine veya SON-1'e dönüştürülür (4).

Son yıllarda Mol'ün güçlü antioksidan etkisinin olduğu da bildirilmiştir (5). Bazı çalışmalarda; musküler distrofi patofizyolojisi ile NO sentezinin değişmesi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Kas hasarında satellit hücrelerin farklılaşması ve aktivasyonu ile birlikte tamir özelliğinin artmasında etkili olduğu bildirilmiştir (6).

Kronik karaciğer yaralanmalarında ise kupffer hücrelerinin bir cevap olarak aktive olmasıyla fibrojenik ve proinflamatuvar miyofibroblastik fenotip ile *α-smooth muscle actinin* (*α-SMA*) artmasıyla karakterizedir. Aktive olmuş kupffer hücreleri ekstraselüler matrikte tip I, tip III, fibronektin ve maktiks metalloproteinaz gibi ekstraselüler matriks proteinlerini sekrete eder. İlginç olarak kronik karaciğer hastalıklarında NO aşırı üretimi ve salınımı, *α-SMA*'nın düşmesine ve insan karaciğerinde kollajen tip I birikiminin azalmasına neden olduğu kanıtlanmıştır (36).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Deney Protokolünün Oluşturulması

Çalışmamıza İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Deney Hayvanları Etik Kurul 2014/A-63 protokol numarasıyla kayıtlı karar ile onay alınmıştır. Deney protokolü oluşturulmuş ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (İNÜTF-DEHÜM), Tıbbi Patoloji anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Fizyoloji Anabilim Dalının katkılarıyla yürütölmüştür.

Her grupta 8 adet olmak üzere toplam 40 adet erkek rat rastgele yöntemle gruplara dağıtıldı. Ağırlıkları 350-450 gram olan *Wistar albino* cinsi ratlar kullanıldı. Hayvanların temini ve bakımı İNÜTF-DEHÜM'de yapıldı. Deneyde kullanılan ratların beslenmesi standart yem ile sağlandı. Hayvanların gereksinim duyduğu su, kafeslerde özel bölümlere yerleştirilmiş ucunda damlalık bulunan özel şişeler ile verildi. Deney sırasında ve öncesinde hayvanlar 12 saat karanlık, 12 saat ışık foto periyodunda ve 22-24°C sıcak koşullarının sağlandığı odalarda, ikişerli gruplar halinde özel rat kafeslerinde barındırıldı. Deney; İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Etik Kurul yönergesinde belirtilen şartlara uygun olarak ve araştırma protokolüne uyularak gerçekteştirildi. Deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu.



**Tablo 3-1:** Deney grupları

<b>Gruplar</b>	<b>Uygulama</b>
<b>Grup I:</b> Kontrol grubu (Kont)	Çözücü (serum fizyolojik) uygulandı
<b>Grup II:</b> Molsidomin grubu (Mol)	Yedi gün boyunca intraperitoneal (i.p.) yolla günde tek doz 4 mg/kg Mol uygulandı.
<b>Grup III:</b> Methotrexate grubu (Mtx)	Tek doz i.p. olarak 20 mg/kg Mtx uygulandı.
<b>Grup IV:</b> Molsidomin-Methotrexate grubu (Mol-Mtx)	Mtx öncesi 7 gün boyunca i.p. yolla günde tek doz 4 mg/kg Mol uygulandı.
<b>Grup V:</b> Methotrexate-Molsidomin grubu (Mtx-Mol)	Mtx sonrası 7 gün boyunca i.p. yolla günde tek doz 4mg/kg Mol uygulandı

Deneye ilişkin uygulamalar başlamadan önce hayvanlar, darası alınmış uygun plastik kap içinde tartılarak ağırlıkları not edildi. Protokolde belirtilen günlük tekrarlayan dozlar günün aynı saatinde yapıldı (4, 37, 38).

### **3.2. Örneklerin Alınması ve Analiz Öncesi Hazırlık**

Sekizinci gün anestezi altındaki ratlarınvena kava inferiordan kan alındı. Kan örneği düz biyokimya tüplerine alınarak 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan serum etiketlenmiş eppendorf tüpüne transfer edilerek çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

Rat'larınkaraciğerleri İNÜTF-DEHÜM uygun steril cerrahi malzemeler kullanılarak çıkarıldı. Çıkarılan organlardan takriben bir loba karşılık gelen miktarı kadar ayrılarak alüminyum folyoya sarılıpsüperoksit dismutaz (SOD), glutasyon (GSH), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesi tayini, katalaz (KAT) enzim aktivitesi tayini, myeloperoksidaz (MPO) enzim aktivitesi tayini, malondialdehit (MDA) miktar tayini için ayrılarak çalışma gününe kadar -80°C da saklandı.

### **3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçülmesi**

AST ve ALT düzeylerinin analizi İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi merkez laboratuvarı biyokimya bölümünde yapıldı. Her iki parametre de Abbott C1600

(Abbott, Abbott Park, Illinois, U.S.A.) cihazında spektrofotometrik yöntem ile standart abbott kit (Abbott, Aeroset sistem, Abbott Park, Illinois, U.S.A) kullanılarak çalışıldı.

### **3.4. Antioksidan Sistem ve Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analizi**

#### **3.4.1. SOD Enzim Aktivite Tayini**

SOD superoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Her bir mol de iki birim bakır içeren bu enzim ile süperoksit radikali daha az zararlı olan hidrojen peroksite, daha sonra KAT ve GPx enzimleri ile su ve oksijene dönüştürülür. SOD'un başlıca iki formu vardır. Bakır ve çinko içeren birinci formu daha çok sitoplazmada görülür. Ağırlıklı olarak mitokondride görülen diğer formu ise mangan ihtiva eder. SOD aktivitesinin bazı hastalıklar ve klinik açıdan önemi vardır. Bakır ve çinko içeren SOD'un aktivitesi böbrek yetmezliğinde ve karaciğer hastalıklarında eritrosit ve serumda arttığı görülür (39; 40; 41).

SOD enzim aktivite tayininde; substrat solüsyonu [0,3 mmol/L ksantin, 0,6 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 g/L BSA] ksantin oksidaz (XO:167 U/L), 2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,8 mmol/L CuCl<sub>2</sub>reaktifler kullanıldı.

SOD aktivitesi Sun (41) ve arkadaşları tarafından tanımlanan, Durak ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Nitroblue Tetrazolium (NBT) indirgeme yöntemiyle çalışıldı (42). Bu metotta, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Reaksiyon ürünü olan bu renkli formazonlar 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır. Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir.

Daha önce elde edilen homojenat süpernatantının bir kısmı 1/1 oranında kloroform/etanol (3/5) karışımı içinde vortekslenip 1 saat süreyle 2200xg'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

**Tablo 3-2:** SOD enzim aktivite tayininde kullanılan reaktifler

Reaktif	Kör	Numune
Substrat solüsyonu	2.85 ml	2.85 ml
Kloroform-Etanol Ekstraktı	-	0.100 ml
Bidistile su	0.100 ml	-
XO (167 Ü/l)	0.050 ml	0.050 ml
25 C°'de 20 dakika inkübasyon süresi başlatıldı.		
CuCl <sub>2</sub>	1 ml	1 ml

Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm'de okundu.

SOD aktivitesinin hesaplanması: % İnhibisyon= (AK-AN)/AKx100

AK: Kör absorbansı

AN: Numune absorbansı

%50'lik inhibisyona 1 U denildiği için

Aktivite (U/ml)= [(% inhibisyon/50) x (1/0.1)] ml

Spesifik aktivite (U/mg protein)= [U/ml/mg/ml protein].

Sonuçlar, U/mg protein olarak ifade edildi.

### 3.4.2. GSH Analizi

GSH başlıca memeli karaciğer dokusunda görülen ve tam bir protein yapısında olmayan  $\gamma$ -L-glutamil-L-sistein-glisin den oluşan bir tripeptittir. GSH'ın antioksidan fonksiyonu büyük ölçüde GPx'in katalize ettiği reaksiyon yardımı ile gerçekleşir (43). GSH hücrede serbest veya bir proteine bağlı olarak bulunabilir. Esas olarak serbest GSH oksidatif stres sırasında oksitlenmiş forma dönüştürülebilir indirgenmiş formda bulunur. GSH glutatyon redüktazın etkisi ile indirgenmiş şekle geri döndürülür (44).

GSH analizinde reaktif olarak; 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (1,5 mg/ml), GSH redüktaz (6 U/ml), NADPH (4mg/ml), Ph:7 fosfat tamponu kullanıldı

GSH konsantrasyonu Beutler ve arkadaşları tarafından geliştirilen metoda göre ölçüldü (45) GSH seviyesi, 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellmann's solüsyonu) ile sülfhidril gruplarının sarı renk oluşturması ve bu rengin 412 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. GSH seviyesi  $\mu$ mol/ g protein olarak verildi.

**Tablo 3-3:** GSH enzim aktivite tayininde kullanılan reaktifler

<b>Kör</b>	<b>Numune</b>
1 ml tampon	1 ml tampon
10 µl numune	10 µl distile su
50 µl NADPH	50 µl NADPH
20 µl DTNB	20 µl DTNB
20 µl GSH redüktaz	20 µl GSH redüktaz

Vortexle karıştırılıp, 5 dakika beklendi. Numunelerin absorbansları 412nm’de spektrofotometrik olarak okundu.

Hesaplama: 2500-1000-500-250-100-10 µmol/L konsantrasyonlarda hazırlanan standart GSH solüsyonlarının konsantrasyonuna bağlı olarak vermiş oldukları absorbans değişim grafiğine göre sonuçlar hesaplanarak değerler µmol/L cinsinden verildi.

### **3.4.3. GSH-Px Enzim Aktivitesinin Tayini**

Reaktif oksijen radikallerinin elimine edilmesinde anti-oksidatif enzimler rol oynar. Bunların içinde GPx, hidrojen peroksidin su ve oksijene dönüştürülerek detoksifiye edilmesinde önemli role sahiptir (46).

GSH-Px enzim aktivitesi tayininde; 150 mM redükte GSH, 8 mM NADPH, 1 M NaN<sub>3</sub>, enzim [1,5 ml 3,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 50 µl GSH-redüktaz], 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fosfat tamponu (50 mM, pH:7,5) reaktifleri kullanıldı.

GSH-Px aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (47). GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG)’a yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px’in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) yardımı ile GSH’a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH’ın NADP<sup>+</sup>’ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm’de okunmasıyla hesaplanır. Enzim ünitesi; birim zamanda okside olan mikromol NADPH miktarıdır.

Dalga boyu 340nm’ye ayarlanan spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri 5 dakika boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

**Tablo 3-4:** GSH enzim aktivite tayininde kullanılan reaktifler

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>
Fosfat tamponu 5 mM EDTA'lı	2.65 ml
Redükte GSH (150 mM)	0.10 ml
NADPH (8 mM)	0.10 ml
Enzim (23,3 Ü/L)	0.01 ml
NaN3 (1 M)	0.01 ml
Süpernatant	0.02 ml
30 dakika oda ısısında inkübe edildi.	
H2O2 (2 mM)	0.100 ml

GSH-Px aktivitesinin hesaplanması:  $IU/L = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1/0.02)$

Spesifik aktivite IU/L mg protein =  $(IU/L) / (1000 \times W)$

W: gram protein miktarı

#### **3.4.4. KAT Enzim Aktivitesinin Tayini**

KAT enzim aktivitesinin hesaplanmasında; Fosfat tamponu (pH 7.0, 50 mM) ve fosfat tamponu kullanarak absorbansı 0.500nm'ye ayarlanmış olan H2O2 çözeltisi reaktif olarak kullanıldı.

KAT aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (48). 240 nm'de maksimum absorbans veren H2O2 deney ortamına ilave edilen katalaz aktivitesiyle su ve oksijene parçalanır. Bu durum uv spektrumunda absorbans azalmasına neden olup absorbanstaki azalma KAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Bir KAT ünitesi, birim zamanda bir mikromol H2O2'i suya çeviren enzim miktarıdır.

Deneyin yapılışı: Kör olarak fosfat tamponunun kullanıldığı uv spektrofotometrede 240nm dalga boyunda sıfır ayarı yapıldıktan sonra H2O2 çözeltisi 0.500 absorbans verecek şekilde aynı tampon ile dilüe edildi ve substrat olarak kullanıldı. Substrat içine numune ilavesiyle her 15 saniyede bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile absorbans azalması kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalması değerleri esas alındı.

**Tablo 3-5:** KAT enzim aktivite tayininde kullanılan reaktifler

Reaktif	Kör	Numune
Fosfat Tamponu (50 mM, pH=7)	3 ml	
H2O2 çözeltisi (A240=0.500)		2.99 ml
Süpernatant		0.01 ml

Sonuçlar, k/g protein olarak hesaplandı.

$$k=[2.3 \times \log (OD1/OD2)] / \Delta t \text{ (sn)}$$

$$k/g \text{ protein} = k / [(g/ml \text{ protein}) \times 1000]$$

k: reaksiyon hız sabiti

#### 3.4.5. MPO Enzim Aktivitesi Tayini

Çalışma dokularımızda yapılan Miyeloperoksidaz (MPO) ölçümü rat MPO elisa kit seti (Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd Catalog No:201-11-0575) kullanılarak Biotek HT Synergy Gen 5 yazılımlı immuno plate reader cihazı ile spektrofotometrik olarak değerlendirildi. 450 nm de okunan deney sonuçları kit setinde hazırlanan standart ölçümlerle kalibre edilerek ng/ml olarak hesaplandı.

#### 3.4.6. MDA Miktarının Tayini

Serbest radikallerin, özellikle doymamış yağ asitleri gibi karbon-karbon çift bağ yapan moleküllere oksijen eklenmesi lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Hücre zarının temel yapıtaşları olan glikolipid, fosfolipid ve kolesterol ölümcül peroksidaz modifikasyonunun potansiyel hedefleridir. Membran lipid peroksidasyonuna yanıt hücrenin metabolik koşulları ve tamir kapasitesine göre değişir. Oksidatif stresin hasarı tamir kapasitesini aştığı durumlarda hücreler apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü nekroz sürecini başlatır (49).

Tayin için; % 0,675 tiobarbitürik asit (TBA) çözeltisi, %10 triklorasetikasit (TCA) çözeltisi ve 20 mM/L 1,1,3,3-tetrametoksipropan (standart) reaktifler kullanılmıştır.

MDA tayininde Esterbauer ve Cheeseman'nin metodu ile çalışıldı (50). En çok kullanılan lipid peroksidasyon tayin yöntemidir. Asidik ortamdaki tiobarbitürik asit ile 90-95 C° de reaksiyona giren MDA ve diğer TBARS, pembe renkli kromojen meydana getirir. Onbeş dakika kaynatıldıktan sonra hızla soğutulan numunelerin absorbanları 532 nm de spektrofotometrik olarak okundu.

**Tablo 3-6:** MDA miktarının tayininde kullanılan reaktifler

<b>Reaktif</b>	<b>Numune</b>	<b>Kör</b>
Homojenat	0.5 ml	-
TCA %10	2.5 ml	2.5 ml
Deiyonize su	-	0.5 ml
90 C° 15 dakika bekletildikten sonra 3000×g 'de 10 dakika santrifüj edildi.		
Süpernatant	2 ml	2 ml
TBA %675	1 ml	1 ml

90 C° 15 dakika bekletilir, soğutulur ve köre karşı 532 nm 'de okundu.

Hesaplama: 20 mM/L stok standart çözeltisinden değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, numunelerle aynı şartlarda çalışıldı ve elde edilen sonuçlar ile standart grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen eğim sabiti numunelere uygulanarak MDA miktarı yaş gram doku başına nanomol olarak hesaplandı.

### **3.5. Histopatolojik Değerlendirme Yöntemi**

#### **3.5.1. Histokimyasal Boyama**

Karaciğer yağlanması için ayrılan taze doku, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarı frozen ünitesine gecikmeksizin ulaştırıldı ve Oil Red O (ORO) boyaması için, Leica marka CM 3050 model kryostat mikrotomda -16<sup>0</sup>C de dondurularak 8µ kalınlığında kesitler alındı. Doku kesitlerine aynı laboratuvarın histokimya ünitesinde literatürdeyer aldığışekliyle manüel olarak ORO boyama tekniği uygulandı (51).

8µ kalınlığında lam üzerine alınmış olan taze doku kesitleri distile su dolu dik cam şale içine sıralandı. Absolü propilen glikolde 2 dakika tutuldu ve ardından kesitler ORO boyama solüsyonunda 16 saat inkübe edildi. Boyama sonunda %85 propilen glikol solüsyonunda 1 dakika süreyle diferansiye edilerek renk olgunlaştırıldı. Zıt boyama için laboratuvarda hazırlanmış Mayer'in hematoksileni ile 1 dakika zıt boyama yapıldı. Dik şale içinde doku kesitleri içeren camlar distile su ile birkaç kez yumuşak bir şekilde çalkalandı. Kesitleremanüel olarak gliserin jel kapama solüsyonuyla lamel kapama işlemi yapıldı (51).

Kalan karaciğer dokusu hematoksilen-eozin (H&E), MT boyamaları ve immunohistokimyasal (İHK) yöntem ile BCL-2 çalışması yapmak üzere %10'luk

formaldehite kondu. Otuz altı saat tespit edilen örnekler İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında 14 saatlik doku takip işleminden sonra parafine gömülerek 4µ kalınlığında kesildi (Thermo Excelsior ES doku takip cihazı ve Leica RM 2255 mikrotom cihazı kullanıldı). Doku kesitlerinin H&E boyaması ve lamel ile kapatılması Leica ST 5020 boyama-kapama cihazında yapıldı. Deparafinizasyon işlemi 70<sup>0</sup>C da cihaz dâhili fırın ünitesinde 16 dakika ve 3 farklı ksilen solüsyonunda toplam 15 dakika tutularak yapıldı. Dehidratasyon işlemi %96 lık alkolden itibaren düşen alkol dereceleri ile 3 istasyonda toplam 9 dakika süre ile yapıldı. Kesitler hematoksilen istasyonundan önce 1 dakika musluk suyunda bekledi ve akabinde laboratuvarda hazırlanmış Mayer'in hematoksileninde 13 dakika inkübe edildi. Mavileştirme işlemi 4 dakika musluk suyu istasyonunda gerçekleştirildi. eozin solüsyonundan önce 1 dakika %70 alkol istasyonunda tutulan kesitler 4 dakika eozin boyasında tutuldu. Yükselen alkol derecelerinin ardından ksilene alınan kesitler yine tam otomatik Leica CV 5030 kapama cihazında lamel kapatılarak işlem tamamlandı.

MT boyamaları literatüre uygun olarak manüel yöntemle çalışılmıştır (51). Doku kesitleri 60<sup>0</sup>C etüvde bir saat tutuldu. Ksilen solüsyonunda 3 değişim ve toplam 15 dakika tutuldu. Her birinde 3 dakika olmak üzere %96'lık etil alkolden üç değişim yapılarak geçirildi. MT boyama işleminin yapılacağı kesitler 56<sup>0</sup>C etüvde boin fiksatifinde 1 saat süre ile tutuldu. Sürenin sonunda etüvden alınan kesitler 10 dakika soğumaya bırakıldı. Kesitler akan çeşme suyu altında renkleri açılana dek tutuldu. Manüel olarak hazırlanmış Waigert'in demirli hematoksileninde 3 dakika tutuldu. Süre sonunda musluk suyu altında 10 dakika yıkamaya bırakılan kesitler distile sudan geçirilerek biebrik skarlet asit fuksin solüsyonunda 15 dakika tutuldu. Fosfomolibdik-fosfotungstik asit solüsyonunda 10 dakika light green solüsyonunda 1 dakika tutulan kesitler %5 fosfotungstik asit solüsyonu ile diferansiye edildi. Artan alkol dereceleri ile dehidrate edilen kesitler ksilende 1 dakika tutuldu ve entellan kapama solüsyonu kullanılarak manüel olarak lamelle kapama işlemi yapıldı (51).

Karaciğer dokusundaki yağlanma, fibrozis ve inflamasyon bulguları, Roening derecelendirmesi kullanılarak yapıldı (32).



**Tablo 3-7:** Roening derecelendirmesi

<b>Derecendirme</b>	<b>Histopatolojik bulgu</b>
Grade 1:	Normal karaciğer dokusu, yağlı değişiklik hafif/yok, nükleer pleomorfizm hafif/yok, fibrozis yok, portal inflamasyon yok.
Grade 2:	Yağlı değişiklik orta/yüksek, nükleer pleomorfizm orta/yüksek, fibrozis yok, portal inflamasyon orta/yüksek.
Grade 3a:	Fibrozis orta derecede, portal fibrotik septa, lobül ler arasında açıklık (genişleme), portal alanda genişleme.
Grade 3b:	Fibrozis orta/ yüksek.
Grade 4:	Siroz, rejeneratif nodüller ve portal alanlar arasında köpülenmeler şeklinde skorlanmıştır.

### **3.5.2. İHK Boyama**

İHK boyaması BCL-2 antikorunu (Katolog no: NB100-56101. Rabbit polyclonal anti-rat antikor. (Novus Biologicals, LLC 8100 Southpark Way, A-8 Littleton, CO 80120, USA) ile yapıldı. Pozitif kontrol olarak normal timus dokusu kullanıldı. Boyama işlemi tam otomatik Ventana Benchmark XT İHK boyama cihazında yapıldı. Ventana antibody dilüent (katolog no: 251-018) ve Ventana UltraView Universal DAB görüntüleme kit (katolog no: 760-500 Ventana Medical Systems, Inc. A Member of the Roche Group 1910 Innovation Park Dr. Tucson, AZ 85755 USA) kullanıldı.

İHK boyama işlemine başlamadan önce doku kesitleri 70°C sıcak etüvde 1 saat tutuldu. Deparafinizasyon işlemi cihaz protokolünde yer aldığı şekliyle 72°C da EZ prep (Ref:950-102) reaktifini kullanılarak yapıldı. İHK boyama basamakları Ventana Benchmark otomatik boyama cihazında BCL-2 primer antikorunu için oluşturulan protokole göre uygulandı. Kesitler CC2 reaktifinde 68 dakika, BCL-2 primer antikor ile 1 saat inkübe edildi. Universal DAP görüntüleme kiti ile beraber Ventana hematoksin ve mavileştirici reaktif kullanıldı. Kesitlerin lamel ile kapama işlemi Leica CV 5030 otomatik lam kapama cihazı ile yapıldı.

Bütün boyamalar (H&E, MT, ORO, BCL-2), ışık mikroskopunda (Olympus BX53) değerlendirildi.

BCL-2 ilk olarak insanda B hücreli foliküler lenfoma orjinli bir onkogen olarak Tsujimoto ve arkadaşları tarafından 1984 yılında tanımlanmıştır. 1988 de Vaux ve arkadaşlarınca yürütülen çalışma ile bu proteinin interlekin-3 eksikliği tarafından

apoptozisin uyarıldığı bir sistemde anti-apoptatik aktivitesinin olduğu keşfedildi. Apoptoz istenmeyen hücrelerin uzaklaştırılmasında, doku homeostazında, yapısal inşaa süreci gibi çeşitli biyolojik olaylarda, hücrenin kendi kendisini yıkım mekanizmasıdır (52). BCL-2 ise mitokondrial ve mikrozomal mebranlarda proapoptotik ve anti-apoptotik faktörler olarak rol oynayan bir protein ailesidir (53).

BCL-2 boyanma derecelendirmesi, semikantitatif yapılmış olup dörde ayrılmıştır.

**Tablo 3-8:** BCL-2 boyama derecelendirmesi

<b>Derecendirme</b>	<b>Histopatolojik bulgu</b>
Grade 0:	Boyanma yok.
Grade 1:	Perisantral hepatositlerde (zon 3) 1-2 sıra hepatositte boyanma var.
Grade 2:	Perisantral hepatositlerde 1-2 sıra boyanma ve parankimal hepatositlerde boyanma var.
Grade 3:	Zon 2 (ara zon) ve zon 1 (periportal alan) hepatositlerde boyanma var şeklinde derecelendirilmiştir

### 3.6. İstatistiksel Yöntem

Verinin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics v.22.0 istatistik paket programında yapılmıştır. Verinin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiştir. Verinin tanımlayıcı istatistikleri, sürekli verilerde normal dağılım gösteren değişkenler için ortalama  $\pm$  standart sapma, normal dağılım göstermeyen değişkenler için [medyan (minimum-maksimum)] olarak sunulmuştur. Normal dağılım gösteren sürekli değişkenler için ikiden fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında ANOVA ve ikili karşılaştırma için homojen gruplarda LSD, homojen olmayan gruplarda Tamhane's T2 post hoc testleri kullanılmıştır.

Normal dağılmayan sürekli değişkenler için ikiden fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında ise Kruskal Wallis testi ve sonrasında ikili karşılaştırma için post hoc Dunn testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi  $\alpha=0.05$  olarak belirlenmiştir. Gruplar arası farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunanlar, tablo içerisinde *bold* (koyu) ile gösterilmiştir.

## 4. BULGULAR

Deney başlangıcında ve sonlandırıldığında gruplarda yer alan rat ağırlıkları aşağıda verilmiştir.

**Tablo 4-1:** Deney başlangıcında ölçülen rat ağırlıkları

Sıra No:	Kont (gr)	Mol (gr)	Mtx (gr)	Mol-Mtx (gr)	Mtx-Mol (gr)
1.	328	377	350	345	444
2.	408	305	336	314	298
3.	343	402	328	358	371
4.	331	370	324	332	358
5.	283	302	314	329	420
6.	341	405	293	349	350
7.	381	370	344	336	402
8.	357	290	340	399	340
<b>Ortalama Ağırlık</b>	346,5	352,625	328,625	345,25	372,875

**Tablo 4-2:** Deney sonlandırıldığında ölçülen rat ağırlıkları

Sıra No:	Kont (gr)	Mol (gr)	Mtx (gr)	Mol-Mtx (gr)	Mtx-Mol (gr)
1.	333	362	338	300	332
2.	421	334	323	293	401
3.	350	327	287	310	389
4.	341	300	284	390	308
5.	397	295	313	300	282
6.	354	299	273	290	429
7.	290	383	338	326	360
8.	364	361	345	290	369
<b>Ortalama Ağırlık</b>	356,25	332,625	312,625	312,375	358,75

### 4.1. Biyokimyasal Bulgular

Deney sonunda gruplarda yer alan hayvanların kan örneğinden elde edilen plazmada AST ve ALT parametrelerine bakılmıştır. AST ve ALT parametrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görüldü. AST ve ALT değerleri ile ilgili sonuçlar Tablo 4-3'de belirtilmiştir.

**Tablo 4-3:** Gruplara ait plazma ALT ve AST değerleri

Değişkenler	Kont -a (n=8)	Mol-b (n=8)	Mtx+Mol-c (n=8)	Mol+Mtx-d (n=8)	Mtx-e (n=8)	p*	p**
ALT (U/L) (Ort.±St.S.)	99,88±23,19	93,88±28,12	108,25±56,45	81,00±26,25	78,25±26,60	0,392	-
AST (U/L) (Ort.±St.S.)	216,63±53,33	259,75±828,32	189,00±104,97	163,13±29,84	190,25±59,45	0,106	-

*p\**:Çoklu karşılaştırma p-değeri (Anova ve Kruskal Wallis-H), *p\*\**:Post Hoc testleri (LSD, Tamhane's T2, Dunn) p değerleri

#### 4.2. Antioksidan Sistem ve Oksidatif Stres Belirteç Bulguları

Antioksidan sistem ve oksidatif stres belirteçlerinde MPO, SOD, GSH, GSH-Px, KAT, MDA parametreleri taze karaciğer doku örneği üzerinden analiz edilmiş olup sonuçlar Tablo 4-4 ve Tablo 4-5'de belirtilmiştir.

**Tablo 4-4:** MPO analiz değerleri

Değişkenler	Kont -a (n=8)	Mol-b (n=8)	Mtx+Mol-c (n=8)	Mol+Mtx-d (n=8)	Mtx-e (n=8)	p*	p**
MPO ng/ml [Medyan(Min- Maks)]	12,75(7,38- 19,77)	13,76(9,97- 17,37)	13,49(10,34-18,11)	13,86(12,93- 20,14)	14,65(13,46- 18,91)	0,259	-

*p\**:Çoklu karşılaştırma p-değeri (Anova ve Kruskal Wallis-H), *p\*\**:Post Hoc testleri (LSD, Tamhane's T2, Dunn) p değerleri

**Tablo 4-5:** SOD, GSH, GSH-Px, KAT, MDA analiz değerleri

Değişkenler	Kont -a (n=8)	Mol-b (n=8)	Mtx+Mol-c (n=8)	Mol+Mtx-d (n=8)	Mtx-e (n=8)	p*	p**
SOD (U/mg protein) (Ort.±St.S.)	0,03±0,008	0,02±0,008	0,03±0,008	0,03±0,010	0,02±0,005	<b>0,005</b>	a-b:0,122 a-c:0,793 a-d:0,523 <b>a-e:0,001</b> b-c:0,195 b-d:0,354 <b>b-e:0,044</b> c-d:0,705 <b>c-e:0,002</b> <b>d-e:0,005</b>
KAT (k/g protein) [Medyan(Min-Maks)]	0,22(0,11-0,30)	0,50(0,22-0,94)	0,32(0,21-0,74)	0,41(0,06-0,86)	0,22(0,07-4,38)	<b>0,046</b>	<b>a-b:0,046</b> a-c:0,870 a-d:0,516 a-e:1,000 b-c:1,000 b-d:1,000 b-e:0,351 c-d:1,000 c-e:1,000 d-e:1,000
GSH-Px (U/g protein) [Medyan(Min-Maks)]	0,83(0,62-1,50)	4,69(2,20-7,90)	1,24(0,66-5,84)	1,52(0,90-2,64)	0,96(0,36-5,86)	<b>&lt;0,001</b>	<b>a-b:&lt;0,001</b> a-c:1,000 a-d:0,467 a-e:1,000 b-c:0,127 b-d:0,325 <b>b-e:0,04</b> c-d:1,000 c-e:1,000 d-e:1,000
MDA (nmol/g protein) (Ort.±St.S.)	4,15±2,18	7,09±1,16	11,75±2,17	9,68±4,32	14,009±2,20	<b>&lt;0,001</b>	a-b:0,065 <b>a-c:&lt;0,001</b> a-d:0,083 <b>a-e:&lt;0,001</b> <b>b-c:0,003</b> b-d:0,780 <b>b-e:&lt;0,001</b> c-d:0,946 c-e:0,456 d-e:0,259
GSH (micromol/g wet tissue) (Ort.±St.S.)	1,95±0,82	2,39±0,32	2,03±0,63	2,39±0,23	1,53±0,29	<b>0,011</b>	a-b:0,881 a-c:1,000 a-d:0,866 a-e:0,909 b-c:0,874 b-d:1,000 <b>b-e:0,001</b> c-d:0,845 c-e:0,524 <b>d-e:&lt;0,001</b>

p\*:Çoklu karşılaştırma p-değeri (Anova ve Kruskal Wallis-H), p\*\*.:Post Hoc testleri (LSD, Tamhane's T2, Dunn) p değerleri.

SOD analizinde Mtx grubunda Kont'a göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (p=0,001). Diğer bütün gruplarda SOD Mtx grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (Tablo 4-5).

KAT değeri Kont grubunagöre Mol grubunda anlamlı farklılık izlenmiştir (p=0.046). Diğer gruplar arasında KAT açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

GSH-Px, Kont grubu ile Mol grubu arasında ve Mol grubu ile Mtx grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 4-5).

MDA için p değeri 0.001 den küçük olup Kont grubu ile Mol grubu ve Kont ile Mtx grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık göstermiştir ( $p < 0.001$ ). Yine MDA; Mol grubu ve Mtx grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılığa sahiptir ( $p < 0.001$ ).

GSH, Mol ile Mtx grupları arasında ve Mol-Mtx ile Mtx grupları arasında farklılık, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.001$ ).

### **4.3. Histopatolojik Bulgular**

Kontrol grubunda normal karaciğer histolojisi mevcuttu (Resim 1). Bütün grupların H&E ve ORO boyamalarında yağlanma görülmedi. Yine bütün gruplarda H&E ve MT boyalarında fibrozisizlenmedi (Resim 1, 2, 3).

Mol grubundaki histomorfolojik bulgular, Mtx grubu ile benzerlik göstermekle beraber, hafif artmış safra duktus proliferasyonu ve inflamasyona eşlik eden hafif artmış eozinofil lökositler içermekteydi (Resim 4, 5). Ayrıca gruptaki iki doku örneğinde granülom mevcuttu (Resim 6). Hepatositlerde perisantral ve lobüler alanda dağınık vakuoler dejenerasyon izlendi.

Mtx grubunda fibrozis ve yağlı değişiklik olmamakla birlikte orta derecede portal inflamasyon mevcut olup Roening derecelendirmesine göre skor 2 olarak değerlendirildi. İnflamasyonda artmış lenfositler ve seyrek plazma hücreleri mevcuttu (Resim 7). Perisantral hepatositlerde daha belirgin olmak üzere yer yer vakuoler dejenerasyon izlendi (Resim 8).

Mol-Mtx grubunda diğer üç gruba göre (Mtx, Mol, Mtx-Mol) inflamasyonda azalma saptandı ve skor 1 olarak değerlendirildi (Resim 9).

Mtx-Mol grubundaki morfolojik bulgular, ayrı ayrı Mtx ve Mol verilen gruptakilere benzer şekildeydi. Portal inflamasyon aynı derecede olup skor 2 olarak değerlendirildi (Resim 10). Bu grupta da diğer iki gruptakine (Mtx ve Mol) benzer şekilde vakuoler dejenerasyon, lobüler granülom yapıları, safra duktus proliferasyonu izlendi (Resim 11, 12).

Kont grubunda BCL-2 antikoruna ile boyanma saptanmadı (Resim 13).

Mol grubunda BCL-2 antikor boyanması skor 1 olup sadece perisantral hepatositlerde pozitif boyanma izlendi (Resim 14).

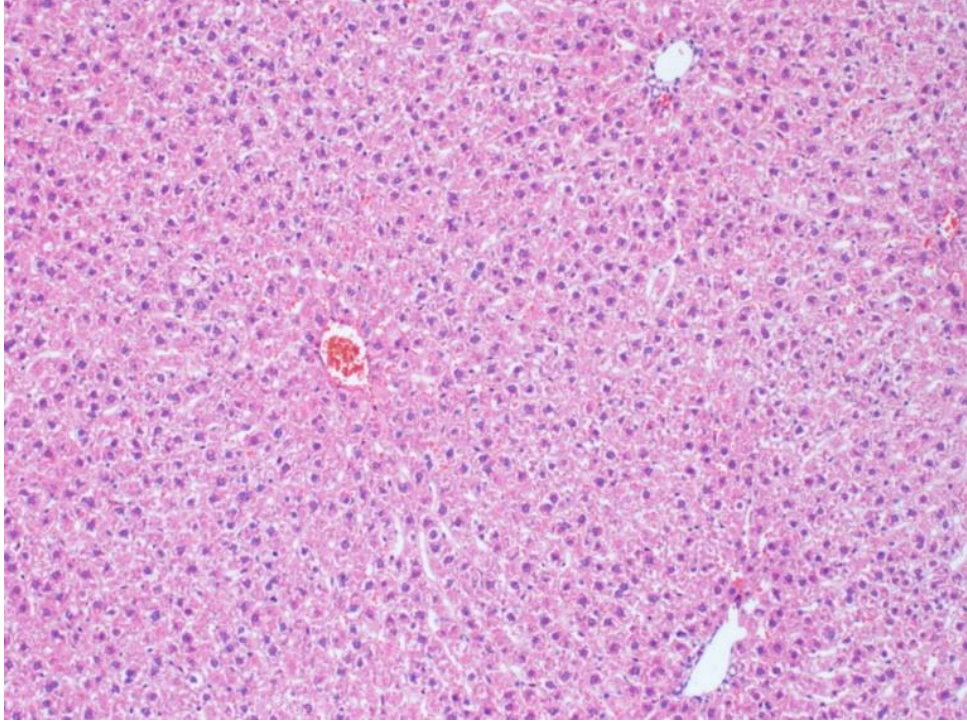
Mtx grubunda BCL-2 antikoru ile perisantral alandaki hepatositlerde ve lobüler alandaki hepatositlerde yer yer dağınık boyanmalar mevcut olup skor 2 olarak derecelendirildi (Resim 15, 16).

Mol-Mtx grubunda da BCL-2 antikoru ile iki hayvan dışındaki diğer hayvanlarda skor 1 şekilde boyanma mevcuttu (Resim 17).

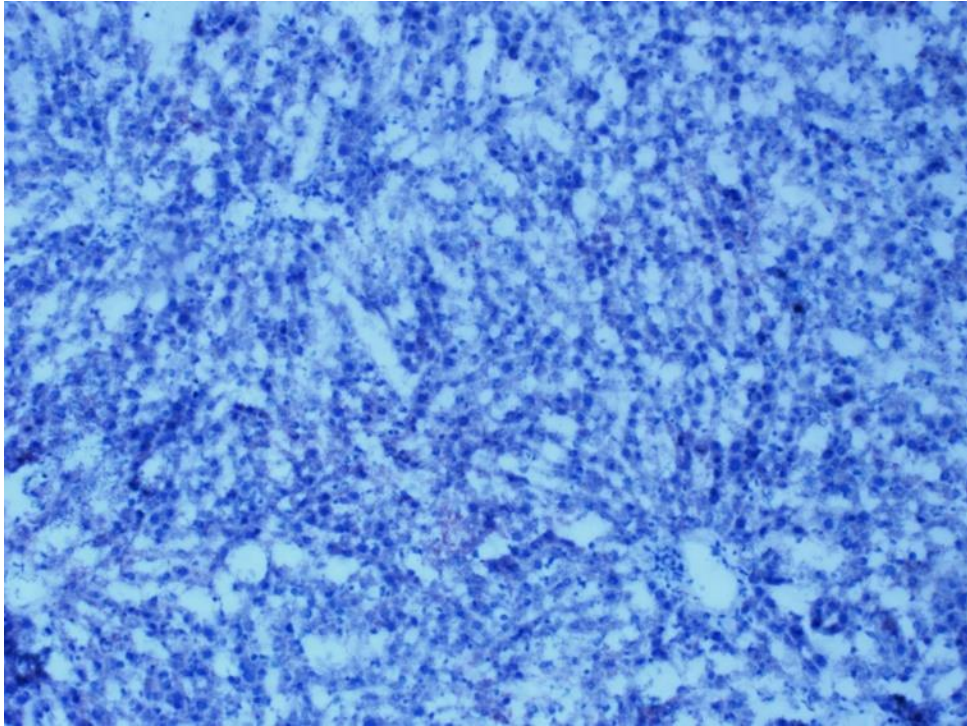
BCL-2 antikoru ile Mtx-Mol grubunda Mtx grubuna benzer şekilde boyanma mevcuttu (Resim 18, 19).

**Tablo 4-6:** Histopatolojik skorlama

Gruplar	H&E boyaması (Roening skor) Rat (her grupta 8 adet)								Bcl-2 boyaması Rat (her grupta 8 adet)							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Kont	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Mol	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
Mtx	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mol-Mtx	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2
Mtx-Mol	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2

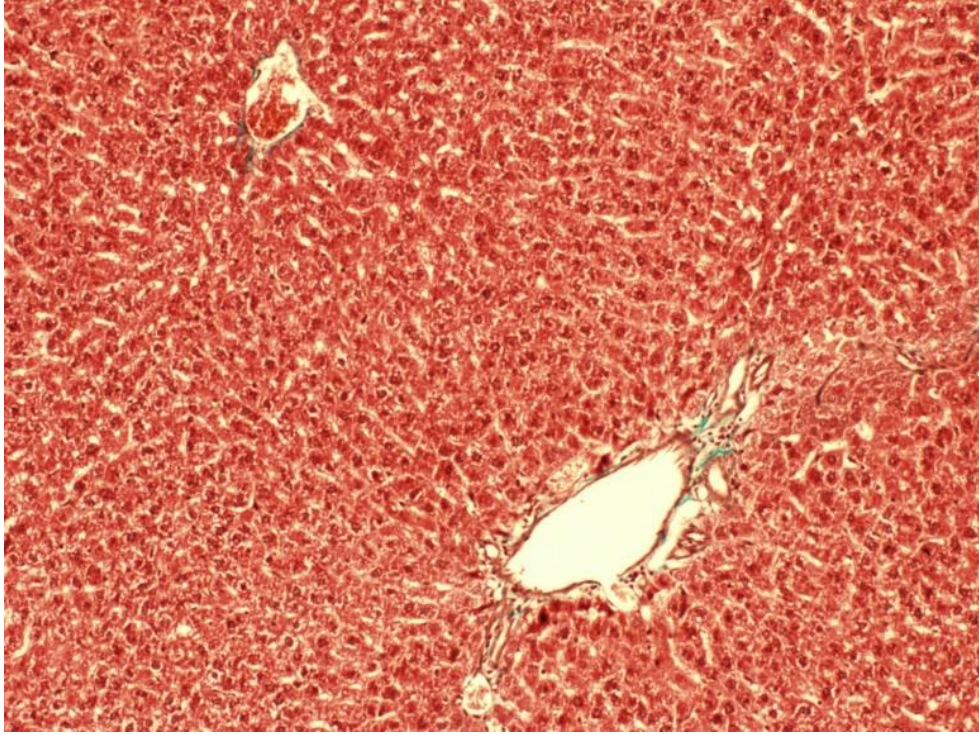


**Şekil 4-1:** Normal karaciğer histolojisi (Kont grubu, H&E, x100).

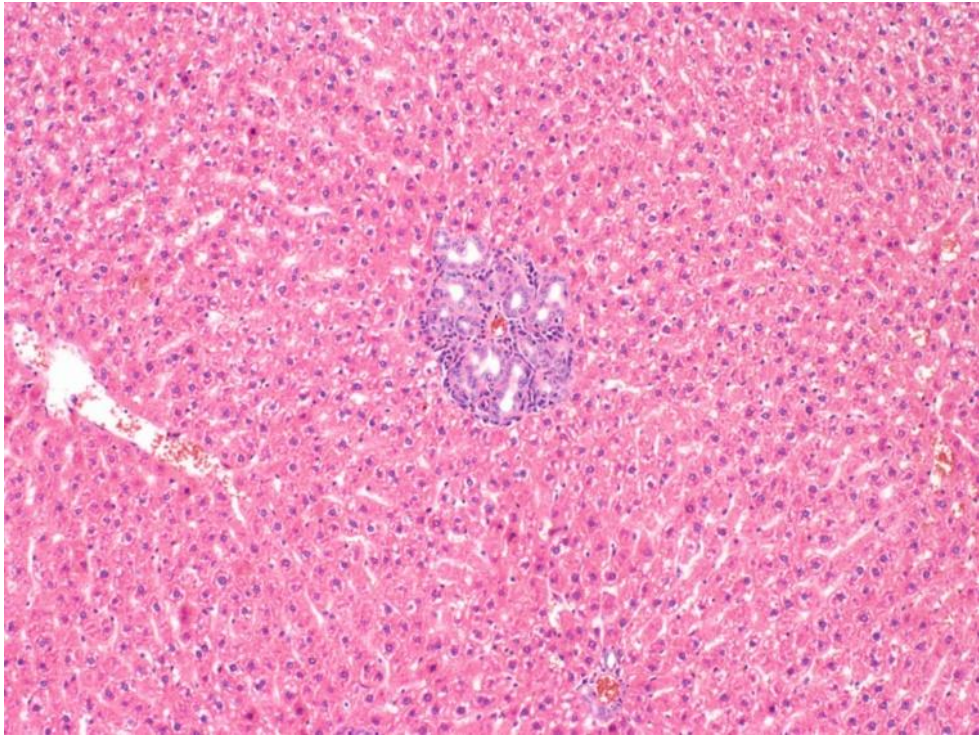


**Şekil 4-2:** ORO ile negatif boyanma (bütün gruplar, x100).



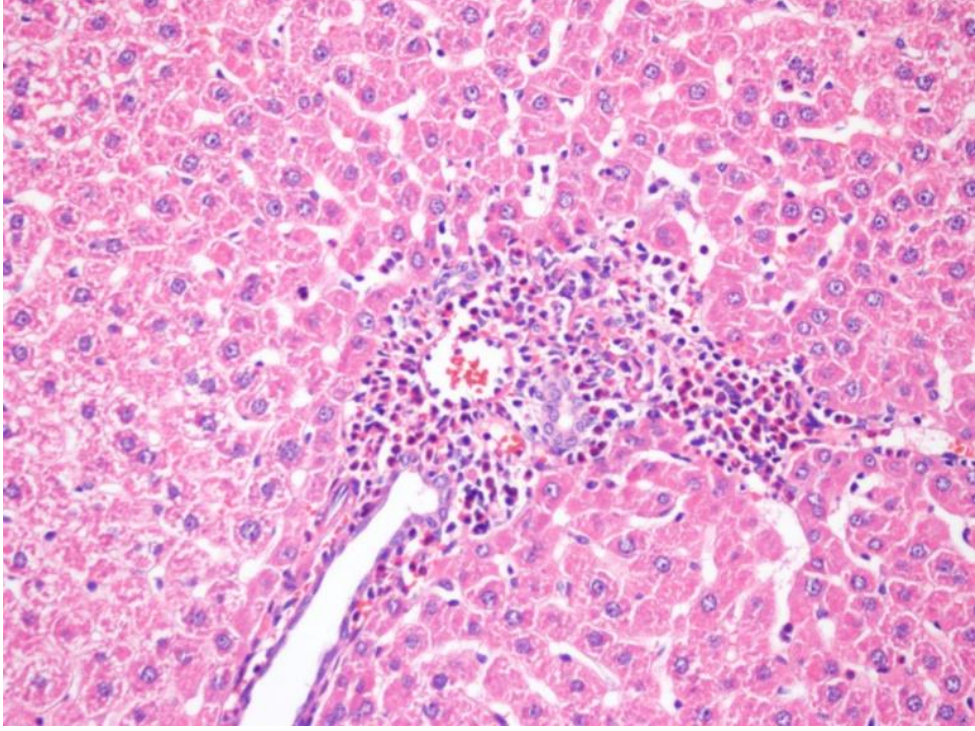


**Şekil 4-3:** Olağan bağ doku (MT, bütün gruplar, x100).

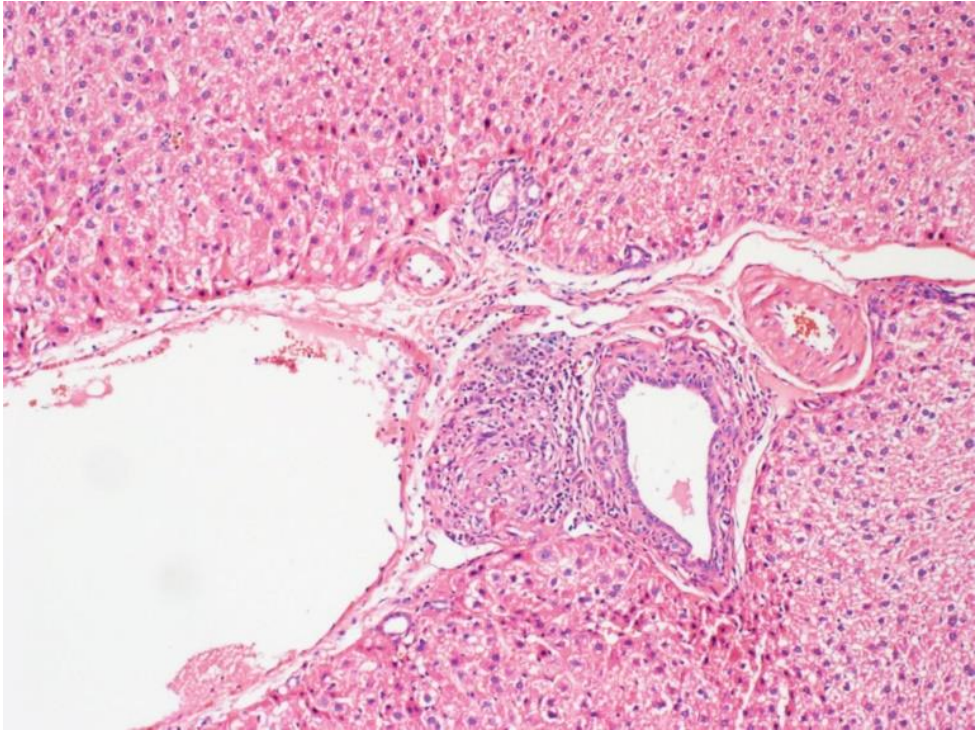


**Şekil 4-4:** Hafif inflamasyonun eşlik ettiği safra duktus proliferasyonu (Mol grubu, H&E, x100).



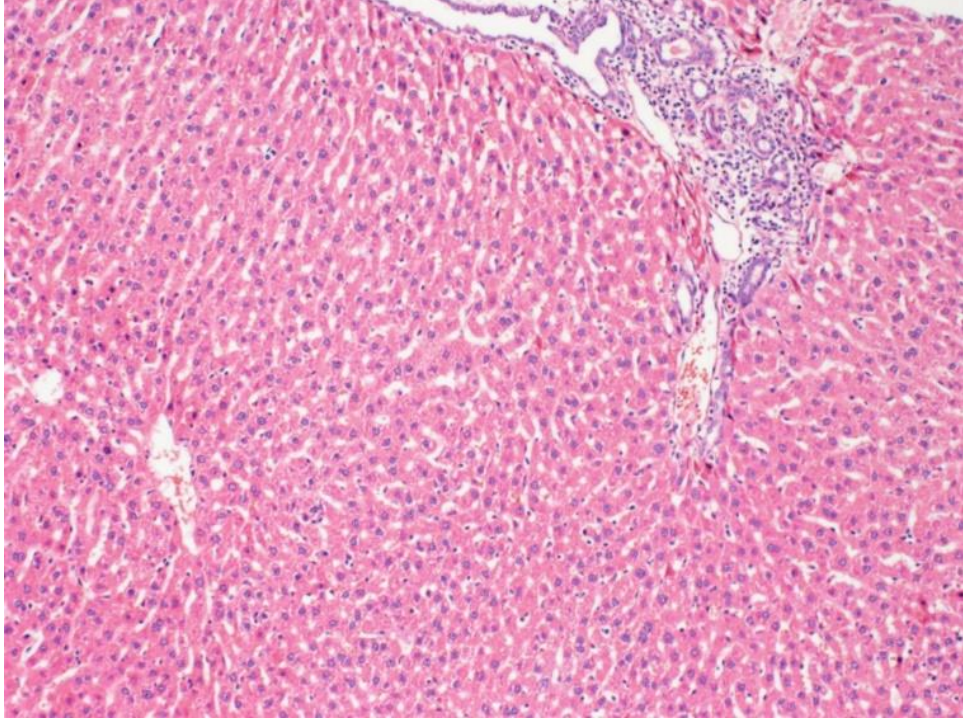


**Şekil 4-5:** Eozinofil lökositlerin eşlik ettiği orta derecede portal inflamasyon (Mol grubu, H&E, x200).

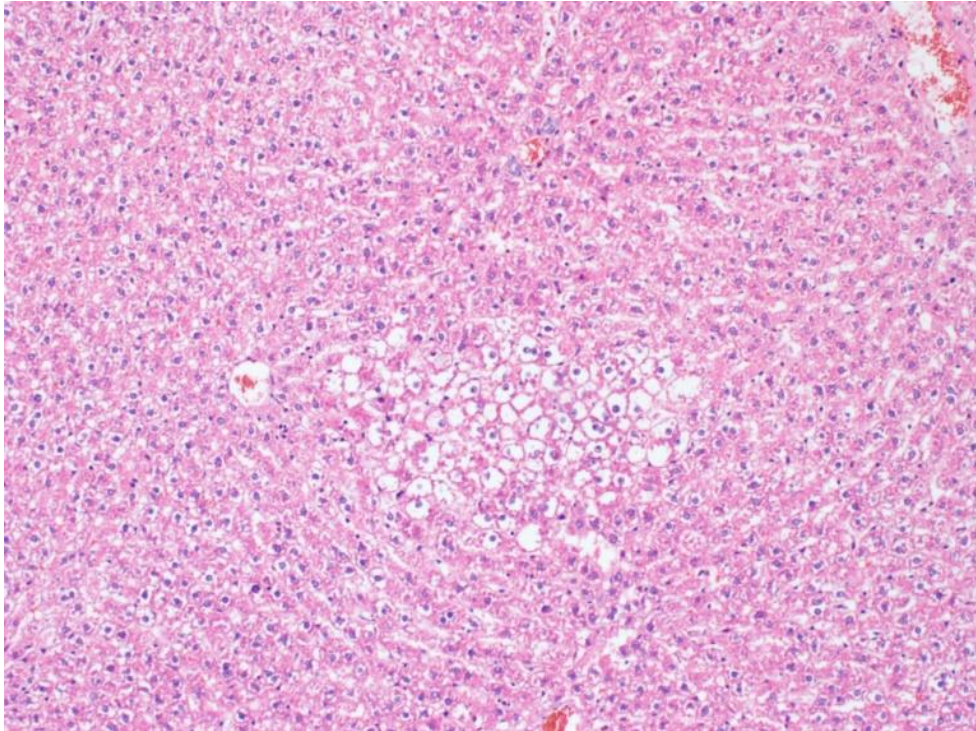


**Şekil 4-6:** Portal alanda inflamasyon, granülom varlığı (Mol grubu, H&E, x100).



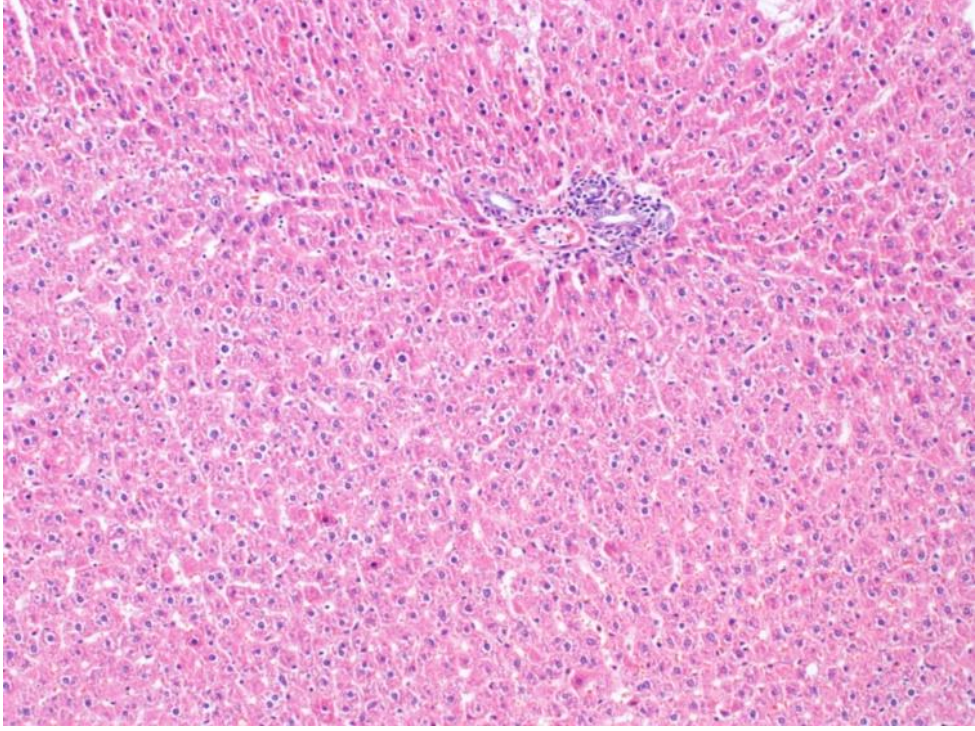


**Şekil 4-7:** Orta derecede portal inflamasyon ve safra duktus proliferasyonu (Mtx grubu, H&E, x100).

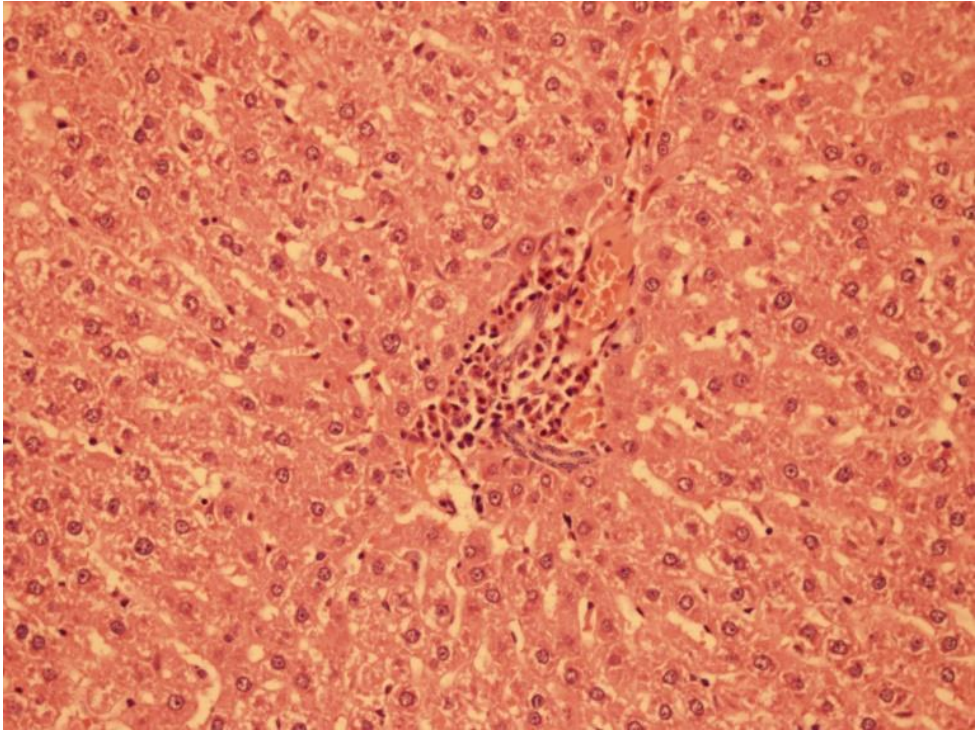


**Şekil 4-8:** Vakuoler (hidropik) dejenerasyon alanları (Mtx grubu, H&E, x100).



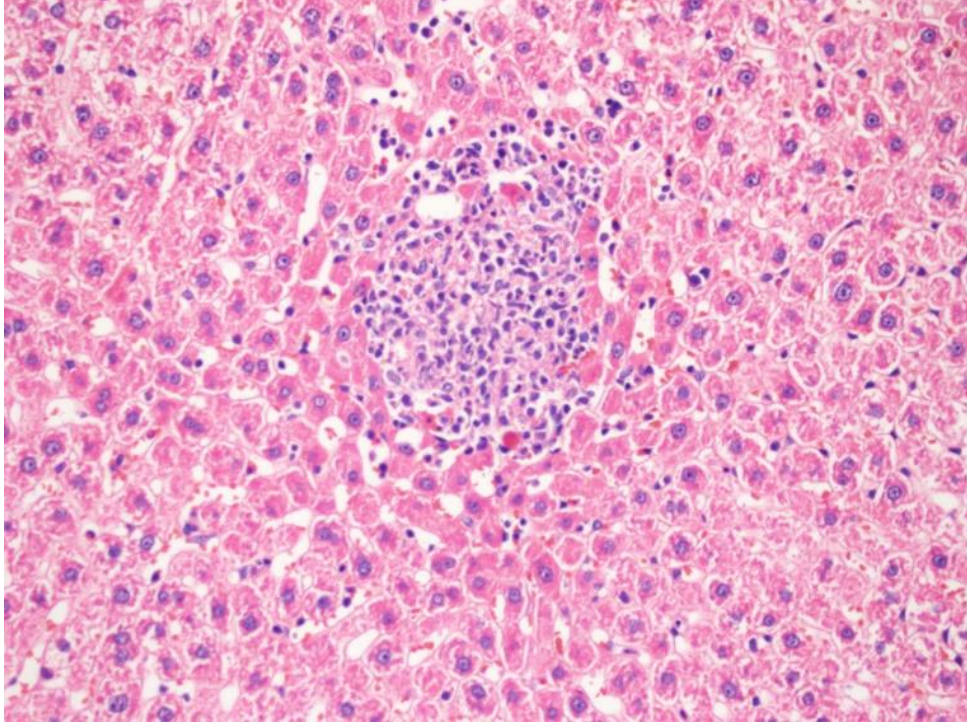


**Şekil 4-9:** Düşük dereceli portal inflamasyon (Mol-Mtx grubu, H&E, x100).

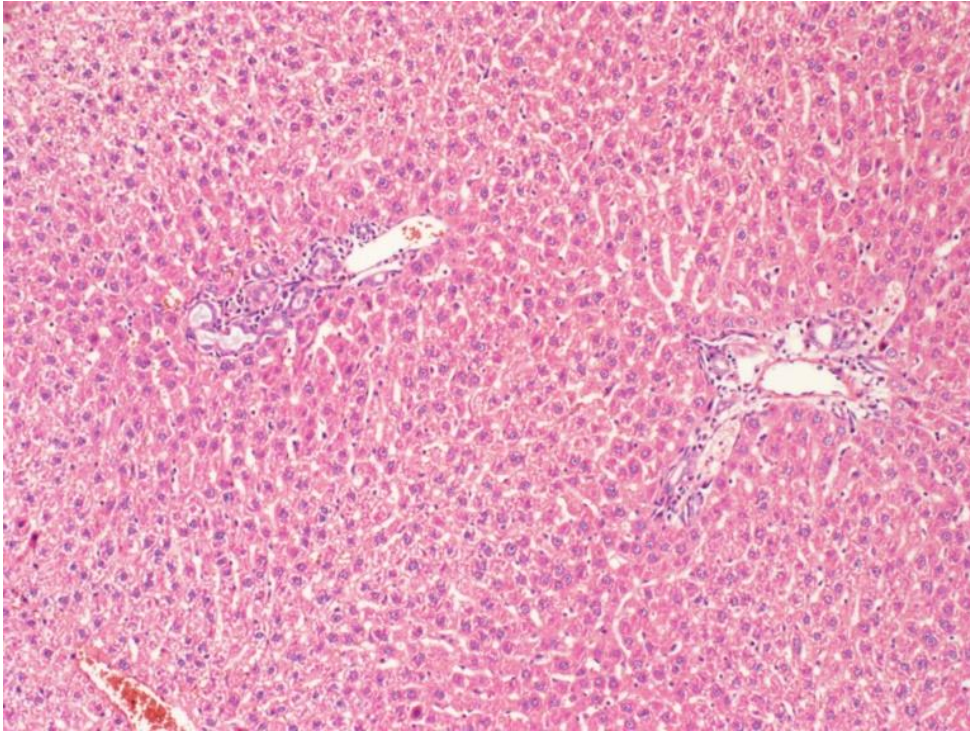


**Şekil 4-10:** Portal inflamasyon (Mtx-Mol grubu, H&E, x200).



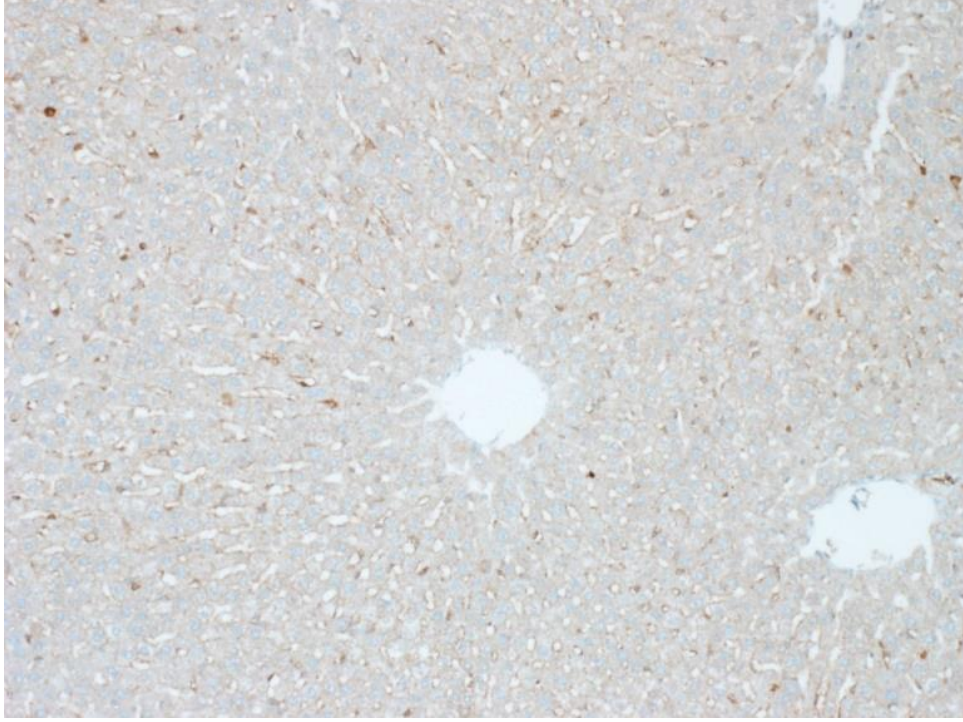


**Şekil 4-11:** Lobüler alanda granülom yapısı (Mtx-Mol grubu, H&E, x200).

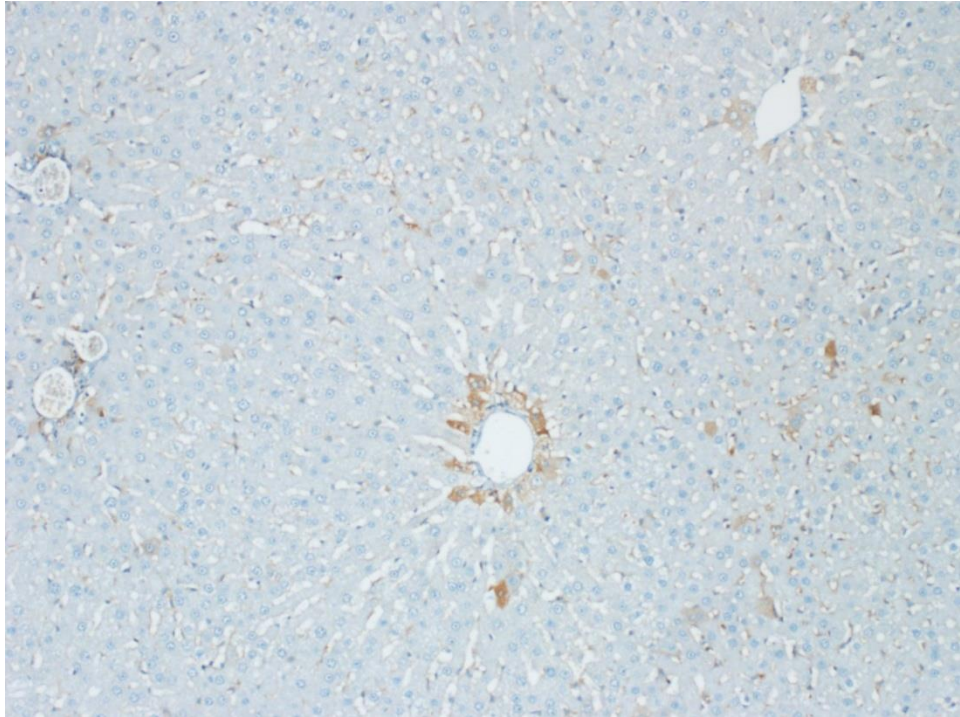


**Şekil 4-12:** Safra duktus proliferasyonu (Mtx-Mol grubu, H&E, x100).





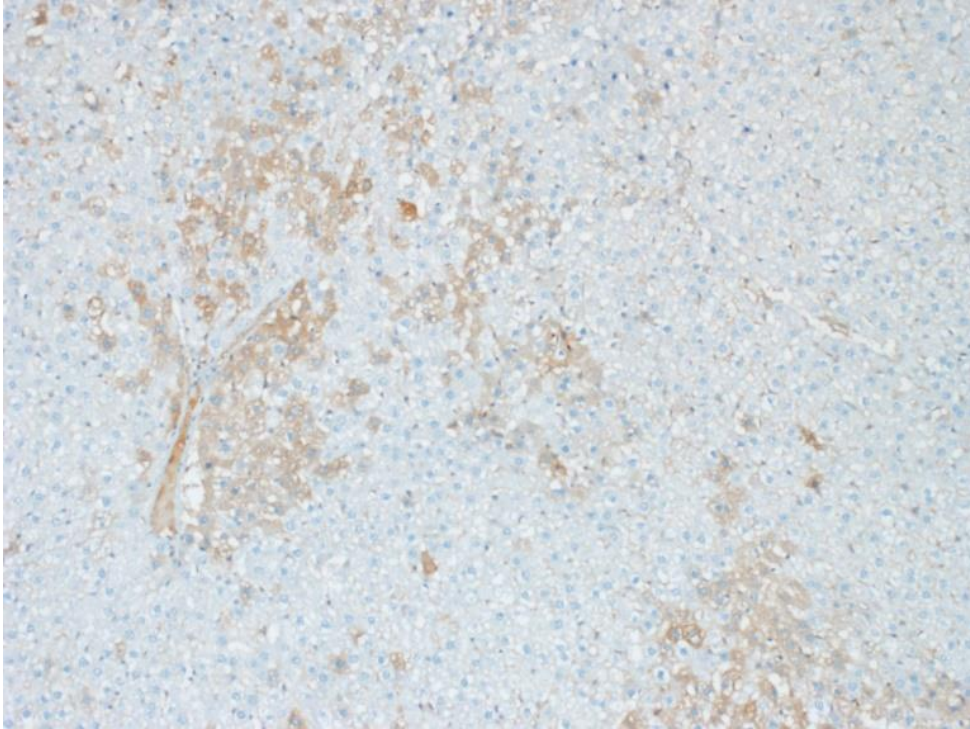
**Şekil 4-13:** BCL-2 antikoruna ile negatif boyanma (Kont grubu, x100).



**Şekil 4-14:** BCL-2 antikoruna ile perisantral tek sıra hepatositlerde pozitif boyanma (skor 1) (Mol grubu, x100).

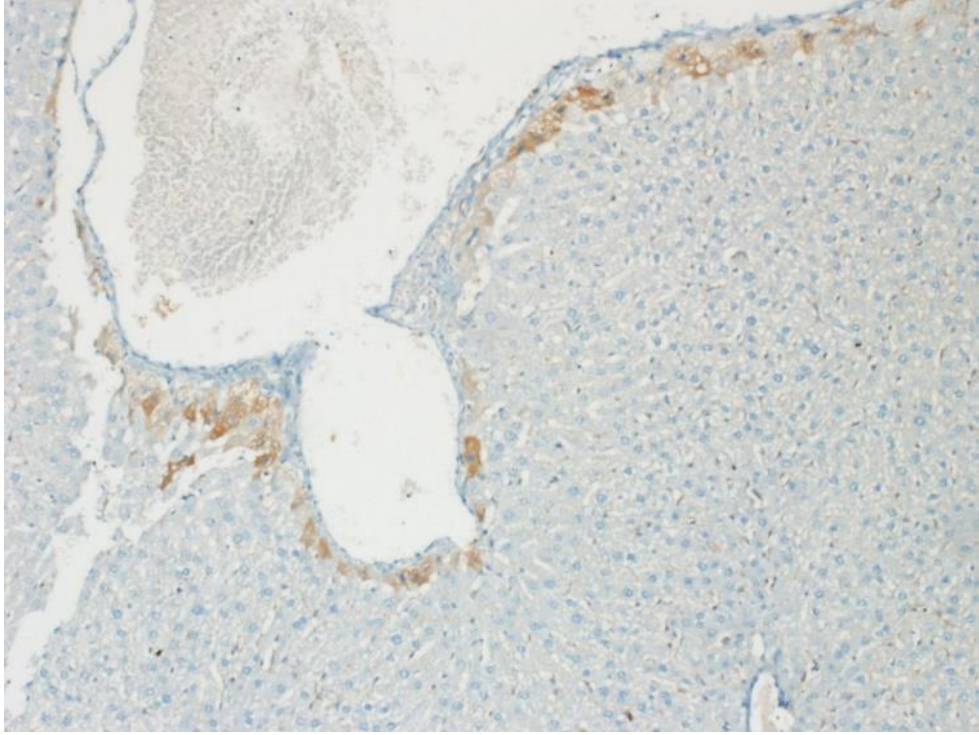


**Şekil 4-15:** BCL-2 antikoru ile peri santral hepatositlerde pozitif boyanma (skor 2) (Mtx grubu, x100).

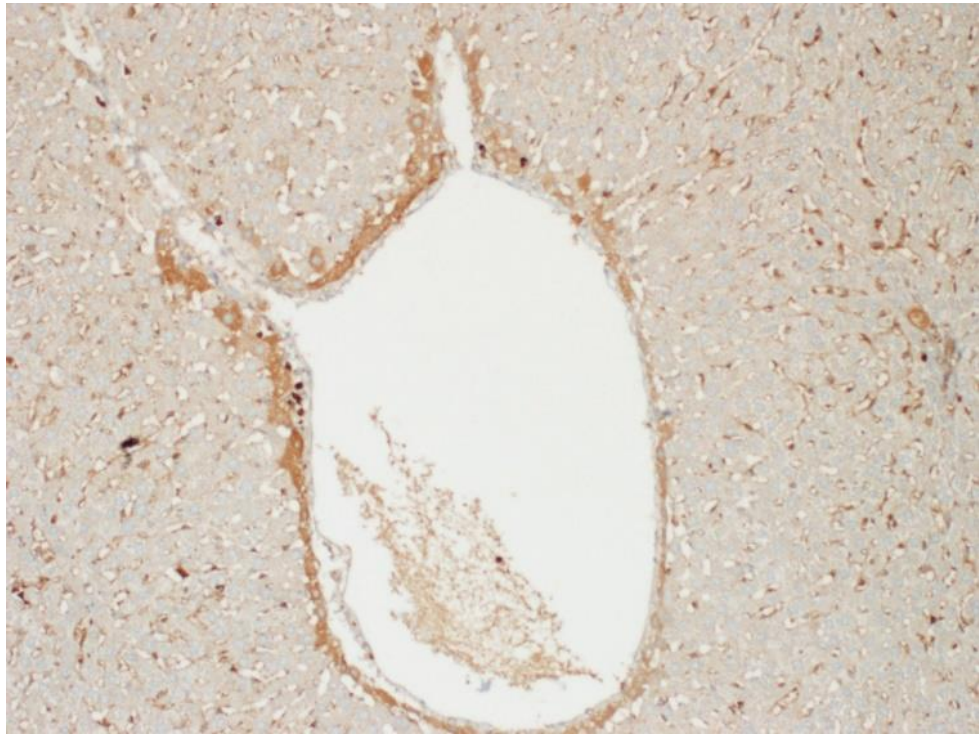


**Şekil 4-16:** BCL-2 antikoru ile parankimde dağınık boyanma (skor 2) (Mtx grubu, x100).



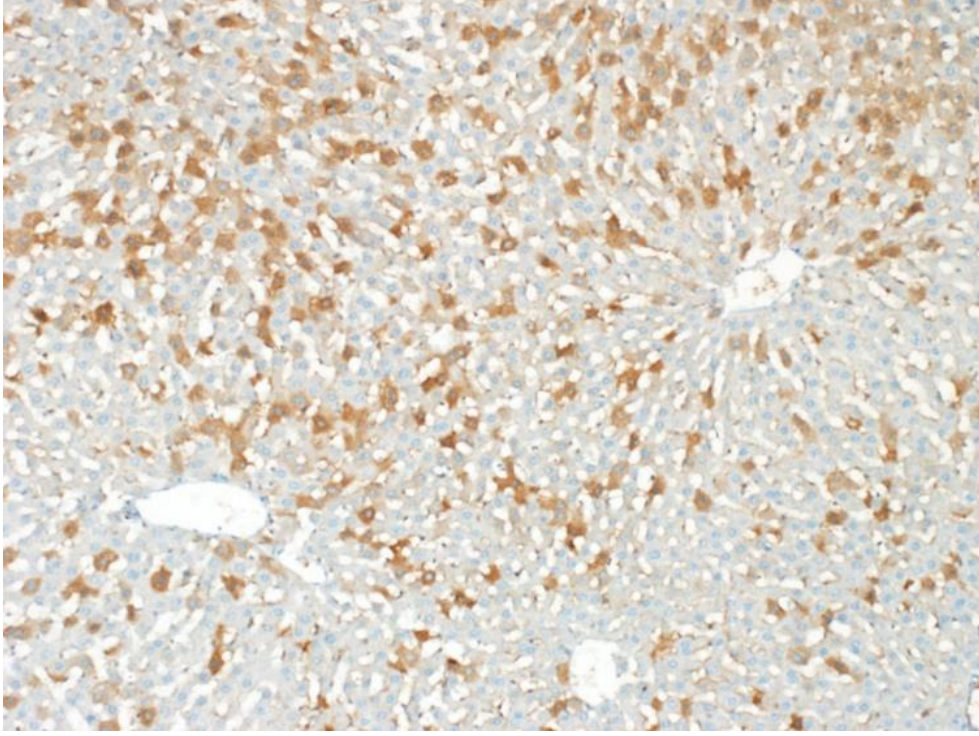


**Şekil 4-17:** BCL-2 antikoru ile Mol-Mtx grubu örneklerinde perisantral hepatositlerde tek sıra ve seyrek boyanma (skor 1) (BCL-2, x100).



**Şekil 4-18:** BCL-2 antikoru ile perisantral hepatositlerde pozitif boyanma (skor 2) (Mtx-Mol grubu, x200).





**Şekil 4-19:** BCL-2 antikoru ile parankimde dağınık ve yaygın hepositer boyanma (skor 2) (Mtx-Mol grubu, x100).

## 5. TARTIŞMA

Mtx lösemi, solid tümörler, lenfoma gibi malignitelerde antineoplastik; romatoid artrit, psöriyazis, Crohn hastalığı, juvenil dermatomyozit, ve vaskülit gibi non-tümöral bir çok hastalığın tedavisinde immünsüpresif olarak, tıbbi nedenlerle gebeliğin sonlandırılması için de kullanılmaktadır (1-3).

Düşük doz ve uzun süre kullanım (özellikle immünsüpresif olarak) sonrasında hepatik fibrozisin hatta sirozun oluşabileceği ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (1, 3). Yüksek doz kullanımlarda serum transaminaz seviyelerinde artış, kolestaz, hepatositlerde vakuoler dejenerasyon, inflamasyon gibi toksisite bulgularına yol açmaktadır (54, 55). Bizim çalışmamızda Mtx'in hepatotoksik dozu kullanılmış olup karaciğerdeki histomorfolojik değişiklikler değerlendirilmiştir. Literatür ile uyumlu olarak çalışmamızdaki karaciğer dokularında portal alanlarda eozinofillerin eşlik ettiği hafif-orta derecede kronik inflamasyon, hafif düzeyde safra duktus proliferasyonu, özellikle perisantral hepatositlerde daha belirginleşen vakuoler (hidropik) dejenerasyon ve seyrek tek hücre nekrozları (asidofilik cisimcik) saptanmıştır. Hepatositlerdeki değişikliklerin daha çok perisantral alanda görülmüş olması, karaciğerdeki kan akımı nedeni ile toksik maddeye ilk ve en çok maruz kalınan alan olmasından kaynaklanmaktadır (11). Çalışmamızda, hem histomorfolojik hem de İHK olarak patolojik değişiklikler, perisantral alanda saptanmıştır. BCL-2 antikoru ile apoptoza giden hepatositler perisantral alanda izlenmiş olup Mtx ile etkilenimin daha fazla olduğu örneklerde perisantral alan yanı sıra lobüler alanda da yaygın hepatositer boyanmalar görülmüştür. BCL-2 antikoru ile Mtx grubunda ve Mtx-Mol gruplarında benzer boyanma skorları (Skor2) mevcut olup Mol'ün Mtx'den sonra uygulanmış olmasının, koruyucu etki sağlamadığı yönünde değerlendirilmiştir. Bunun aksine Mtx'den önce Mol verilen grupta hücresel düzeyde karaciğer hasarının daha az olduğu (Skor1) saptanmıştır.

Mtx'in etki mekanizması, folatın aktif formu olan tetrahidrofolik asit in sentezi için gerekli olan dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe etmesidir. Mtx, DHFR enzimine folik aside göre 1000 kat daha sıkı bağlandığı bildirilmekte olup folatın antagonisti gibi etki etmektedir (14, 19). Böylece özellikle kanser hücrelerinin de yer aldığı hızlı bölünen hücrelerin bölünme ve çoğalma sürecini olumsuz etkilemektedir. Sentez için gerekli temel vitaminlerden biri olan folat, DNA'nın metilasyonunda,

tamirinde ve replikasyonunda oynadığı rol ile genomun ifade edilmesinde anahtar niteliği taşıdığındadır (1, 3, 17). Mtx'in kanser tedavilerindeki yüksek doz kullanımında DHFR'nin inhibisyonu daha belirgindir. Düşük doz Mtx kullanımında ise purin metabolizmasını da içeren enzimleri baskılayarak hücre içinde adenozin birikimini sağlayarak antiinflamatuvar etki gösterdiği yönündedir. Literatürdeki bir çalışmada haftada bir defa düşük doz Mtx tedavisi ile T lenfositler başta olmak üzere lenfoid dokuda proliferasyonun önemli ölçüde baskılandığı bildirilmiştir (14, 18).

Yüksek doz Mtx kullanımından sonra transaminaz seviyelerinde artış olduğu, bir veya iki hafta sonra enzim seviyelerinin normale döndüğü bildirilmektedir (56). Non-Hodgkin lenfoması olan ve tedavide intermediyer doz Mtx (1g/m) kullanılan çocuklarda yapılan bir çalışmada, serum AST ve ALT seviyelerinde artış saptanmış olup bir olgu dışındaki diğer çocuklarda 2-11 gün içerisinde enzim seviyeleri normale dönmüştür. Enzim seviyesi yüksek seyreden hastada kronik hepatit C saptanmış. Ayrıca aynı çalışmada olguların serum Mtx değerleri ile karaciğer hasarı arasında anlamlı bir korelasyon da gösterilememiştir (56). Ancak Mtx kullanılması gereken durumlarda zeminde karaciğer hastalığı olan olgularda karaciğerde kronik hasarın tetiklenebileceği veya akut yetmezlik gelişimine katkıda bulunabileceğinden Mtx'in dikkatli kullanılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. Bizim çalışmamızda Mtx'in toksik dozda verildiği Mtx grubunda, AST ve ALT düzeylerinde belirgin artış saptanmamış olup, gruplar arasında da istatistiksel farklılık izlenmemiştir. Bu bulgu, literatürdeki eski bazı çalışmalardan farklılık göstermiş olmakla birlikte güncel çalışmalarda Mtx kullanımının zaten transaminaz düzeylerini yükseltmediği yönündedir (57). Ancak Mtx kullanımı hepatotoksisite açısından alkol tüketimi, kronik hepatit ve diyabetes mellitus risk gruplarını oluşturmakta ve dolayısıyla bu hastalarda dikkatli olunmalıdır (57). Yine kronik hastalıklarda karaciğer fonksiyonlarında bozulmaların olabileceği bilinen bir durumdur (58).

Oksidatif stres belirteci olan MDA'nın artışı, Mtx'in hücre membranındaki ansatüre yağ asitlerinin hasarı sonucunda aktif oksijen radikalleri ile karaciğer hasarında sebep olmaktadır. MDA, Mtx grubunda serum düzeyleri artmıştı. Mtx-Mol grubunda Kont ve Mol gruplarına göre ve Mtx grubunda Mol grubuna göre anlamlı istatistiksel fark saptandı ( $p<0.001$ ). MPO lökositler tarafından salınan bir metalloprotein ailesinden heme proteindir. Oksidatif stresde önemli bir rol oynar. MPO nun başlıca aktivitesi kloridi ve hidrojen peroksidi enzimatik çevrimle antimikrobiyal potansiyeli yüksek hipokloride

dönüştürmektir (59). Çalışmamızda MPO'nun hem serum düzeylerinde hem de gruplar arasında istatistiksel anlamlılık yoktu.

Oksidatif stres lipid peroksidasyonu ile GSH'nin de dâhil olduğu düzenleyici sistem arasındaki dengesizliktir (60, 61). Çalışmamızda GSH ve GSH-Px düzeyleri Mol grubu ile Mtx ve Mol grubu ile Mol-Mtx gruplarında artmış olup istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi ( $p < 0.001$ ). Bu bulgu, koruyucu dozda uyguladığımız Mol'un, oksidatif stres ürünlerini temizleyici etkiye sahip GSH etkinliğini arttırdığı şeklinde değerlendirildi. Başka bir çalışmada SOD ve KAT enzim aktivitesinin hasarın akut fazında arttığını gösterilmiştir (61). Bizim çalışmamızda Kont grubuna göre Mtx grubunda ve diğer bütün Mtx uygulanmış gruplara göre anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ( $p < 0.005$ ). Toksik dozda uygulanmış Mtx grubunda, SOD ve KAT enzim aktivitesindeki artış, literatür ile uyumlu değerlendirilmiştir.

Mtx'in non-tümöral hastalıklarda düşük doz ve uzun süre kullanımı ile ilişkili olarak karaciğerde oluşan yağlanma ile ilgili çalışma ve olgu bildirimleri bulunmaktadır (62-64). Yağlanmanın, pürinler, timidin ve metionin gereksinimi yüksek olan ve yüksek hücrel bölünme yeteneğine sahip hepatik dokularda folat antagonizması ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (65). Romatoid artrit hastalarından alınan karaciğer biyopsi örneklerinde hepatik folat eksikliği ve Mtx-poliglutamat birikiminin gösterilmiş olması da bu teoriyi desteklemektedir (66). Yağlanma ile ilgili diğer suçlanan mekanizma, muhtemelen purin metabolizması, poliamin sentezi ve homosistein metabolizmasının inhibisyonudur (65). Mtx'e bağlı karaciğer yağlanmasını tespit edecek biyokimyasal bir parametre olmamakla birlikte ultrasonografi ve biyopsi materyallerinde yağlanma kolaylıkla gösterilebilmektedir (62). Çalışmamızdaki bütün grupların hiçbir olgusunda yağlanma saptanmamıştır. Bu durum, kullandığımız Mtx'in kısa süreli kullanımı ile ilişkili olarak yorumlanmıştır.

Antioksidan etkisi nedeniyle serbest oksijen radikallerini (ROS) temizleme özelliğine sahip GSH ve GSH-px seviyeleri çalışmamızdaki MOL grubunda ve MTX grubunda belirgin artış göstermiştir. Bu bulgunun doku düzeyinde yansması portal inflamasyon, safra duktus proliferasyonu ve BCL-2 ile gösterilen apoptozun azalması şeklinde olmuştur. ROS'ları detoksifiye etme özelliğine sahip SOD, KAT enzim aktivite seviyeleri, akut faz hasarında artmaktadır (5, 34, 54). KAT seviyesi çalışmamızda sadece Mol uygulanan grupta artmış olup MOL'un antioksidan etkisini destekler niteliktedir. Ancak diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmayışı hakkında net değerlendirme yapılamamış olmakla birlikte Mtx kaynaklı hasar oluşturulan hayvanlarda yeterli

antioksidan etki göstermediği şeklinde yorumlanmıştır. SOD enzim aktivitesi MTX kaynaklı hasar oluşturulan grupta kontrol grubuna göre azalmış, Mol verilen grupta Mtx grubuna göre artmış, Mol-Mtx grubunda yine Mtx grubuna göre artış saptanmıştır. Böylece Mol'ün antioksidan etkisini ve ROS'u temizleyen (scavenger) etkisini desteklediğini ortaya koymuştur.

Romatoloji literatüründe ALT, AST, ALP değerlerinin üst limitin 2,5 katı veya daha yüksek ölçülmesi hepatotoksisite bulgusu olarak değerlendirilmektedir (22, 30, 31). Standart doz (haftada 10-12,5 mg/m<sup>2</sup>) uygulaması sonucu artmış hepatik trasaminaz sonrasında hepatik fibrozis gelişme olasılığı %15 oranındadır (30). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda toplam doz veya uzun dönem Mtx kullanımından kaynaklanan karaciğer fibrozisinin % 4 civarlarında olduğu, risk grupları (kronik hepatit, alkol kullanımı, diyabetes mellitus) dışarıda tutulduğunda Mtx kullanımı ile karaciğer fibrozisi arasında doğrudan ilişki olmadığı yönündedir (34, 35). Bizim çalışmamızda da risk faktörü taşımayan rat'larda sadece Mtx kullanımı (kısa dönem- uzun dönem, toksik doz) karaciğerde fibrozis oluşturmamıştır. Fibrozis, karaciğerin uzun süreli ve kronik olarak hasarlandığı durumlarda daha sıklıkla ortaya çıktığından, çalışmamızdaki Mtx'in kısa dönem kullanımı ile de fibrozisin oluşmayabileceği şeklinde de yorumlanmıştır.

NO üzerinden vazodilatasyon yapan Mol, bu etkisinden dolayı, kronik angininin semptomlarının azaltılmasında yaygın olarak kullanılan bir proilaçtır (4, 5). Ayrıca son yıllarda Mol'ün güçlü antioksidan etkisinin yanı sıra musküler distrofide satellit hücrelerin farklılaşması ve aktivasyonu ile birlikte tamir özelliğinin artmasında etkili olduğu bildirilmiştir (5, 6). Ayrıca tamir edici etkiye nötrofilik infiltrasyonu azaltarak da katkı sağlamaktadır (5). Kronik karaciğer hasarında aktive olmuş kupffer hücrelerinden ekstraselüler matriks proteinleri (tip I, tip III, fibronektin ve matriks metalloproteinaz gibi) sekrete edilir. Bu da hepatik fibrozisin oluşumunda kaynak görevi görmektedir (36). İlginç olarak kronik karaciğer hastalıklarında NO aşırı üretimi ve salınımı,  $\alpha$ -SMA'nın düşmesine ve insan karaciğerinde kollajen tip I birikiminin azalmasına neden olduğu kanıtlanmıştır (5). Çalışmamızdaki grupların hiçbirisinde fibrozis saptanmamıştır. Dolayısı ile Mol'ün hepatik fibrozise nasıl etki ettiği veya edebileceği konusunda ileri yorum yapılamamış olup bu konuda başka çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mtx'in yüksek doz kullanımında histomorfolojik olarak da tespit edilebilen ve daha çok ilaç etkisi ile uyumlu hepatotoksisite bulguları ortaya çıkmaktadır. Ancak fibrozis ve yağlanma görülmemektedir. Bu bulgular, daha çok düşük doz ve uzun süre kullanımlarda (kronik hastalıklarda immünsüpresif olarak) tanımlanmıştır. Dolayısıyla kısa süreli ve yüksek doz uygulama yaptığımız çalışmamızda da bu bulgular saptanmamıştır.

Akut hepatotoksisite bulgusu olarak değerlendirilen karaciğer transaminazlarının (AST, ALT) serum düzeylerinde artışsaptanan bazı çalışmalarda enzim seviyelerinin yaklaşık iki haftada normale geri döndüğü bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda transaminaz düzeyinde artış saptanmamıştır. Bununla birlikte çalışmamızda, H&E düzeyinde seyrek apoptotik hücreler ve BCL-2 antikoru ile de apoptozun arttığı görülmektedir. Fakat bu artışlar enzim seviyesinde bulgu vermemektedir. Dolayısı ile bu bulgular saptanmış olsa da Mtx kullanımını kısıtlayıcı görünmemektedir. Mtx kullanılırken karaciğer hasarına katkıda bulunabilecek, etiyolojiler (kronik hepatit, diyabet, alkol kullanımı gibi) açısından olguların değerlendirilmesi gerektiği akılda bulundurulmalıdır.

Mol, vazodilatasyon, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilere sahip olup Mtx'e bağlı karaciğer toksisitesini azaltmış olup, histomorfolojik bulgular hem H&E boyamasında hem de BCL-2 antikoru ile yapılan boyamalarda saptanmıştır. Ayrıca serum transaminaz düzeyleri ve doku oksidan-antioksidan (SOD, GSH, GSH-Px, KAT, MDA) düzeyleri ile de destekleyici sonuç vermiştir.

Ancak koruyucu etkisinin kanıtlanması ve rutin uygulamada yer alabilmesi için başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

- 1.Khan ZA, Tripathi R, Mishra B. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects.*Expert Opin Drug Deliv*2012, 9: 151-69.
2. Hashkes PJ, Becker ML, Cabral DA, Laxer RM, Paller AS, Rabinovich CE, TurnerD, Zulian F. Methotrexate: new uses for an old drug.*J Pediatr*2014, 164: 231-6.
3. National Institutes of Health. Livertox. <https://livertox.nlm.nih.gov/DrugCategory.html> 06 Şubat 2014.
- 4.Messin R, Comparative short-term effect of once-daily molsidomine on chronic angina in general practitioners' versus cardiologists' coronary patient populations. *Adv Ther* 2014, 31: 91-106.
- 5.Bentli R, Parlakpınar H, Polat A, Samdancı E, Sarihan ME, Sagir M. Molsidomine prevents cisplatin-induced hepatotoxicity. *Arch Med Res* 2013, 44: 521-8.
- 6.Zordan P, Sciorati C, Campana L, Cottone L, Clementi E, Querini PR, Brunelli S. The nitric oxide-donor molsidomine modulates the innate inflammatory response in a mouse model of muscular dystrophy. *Eur J Pharmacol* 2013, 715: 296-303.
- 7.Abdel-Misih SRZ, Bloomston M. Liver Anatomy. *Surg Clin N Am* 2010, 90: 643-53.
- 8.Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister LH.*Gray's anatomy*.Edinburg: Churchill Livingstone Inc. 1989. 1384-93.
- 9.Crawford J, Burt A. Anatomy, pathophysiology and basic mechanisms of disease. İn: Portmann B, Ferrel L. Burt A. *MacSween's Pathology of the Liver*. 6<sup>nd</sup>ed. Churchill Livingstone, Elsevier 2012: 1-73.
- 10.Saxena R, Theise ND, Crawford JM. Microanatomy of the human liver-exploring the hidden interfaces. *Hepatology* 1999, 30: 1339-46.
- 11.Özoğlu C, Sindirim sistemi III: Karaciğer, Safra kesesi ve pankreas. İçinde Histoloji Konu Anlatımı ve Atlası, Baykal B, (çevri Editörü). *Histology: A Text and Atlas*, Ross MH, Pawlina W, 6. baskı, Ankara, Palme Yayıncılık 2014: 632-3.
- 12.Krishna M, Microscopic anatomy of the liver. *Clin Liver Dis* 2013, 2: 4-7.
- 13.Wisse E, Luo D, Vermijlen D, Kanellopoulou C, De Zanger R, Braet F. On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Semin Liver Dis* 1997, 17: 265-86.

14. Prodanovic E M, Korman NJ. Traditional systemic therapy I: methotrexate and cyclosporine. in: Weinberg JM, *Treatment of Psoriasis*, Springer, Science & Business Media 2008: 103-20.
15. Hazar S.E. Yenidoğan ve Süt Çocukluğu Döneminde B 12 Vitamini, Demir, Folik Asit Eksikliğinin Sıklığı Ve Maternal Düzeylerle Olan İlişkisi. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi, 2010.
16. Reynolds E. Vitamin B12, Folic Acid, and The Nervous System. *Lancet Neurol* 2006, 5:949-60.
17. Jacob RA. Folate, DNA methylation, and gene expression: factors of nature and nurture. *Am J Clin Nutr.* 2000, 72: 903-4.
18. Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Ludviksson BR, Valdimarsson H. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol* 2005, 114: 154-63.
19. Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007, 65: 168-73.
20. Chan ES, Cronstein BN. Mechanisms of action of methotrexate. *Bull Hosp Jt Dis* 2013, 71: 5-8.
21. İzmirli M, Aldemir O, Gogebakan B, Alptekin D. MTHFR 677 C>T Polimorfizmi ile ilintili olduğu düşünülen hastalıklara dair Türk popülasyonundaki çalışmalar. *Dicle tıp derg* 2014, 41: 244-56.
22. Suthandiram S, Gan GG, Zain SM, Bee PC, Lian LH, Chang KM, Ong TC, Mohamed Z. Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies. *Pharmacogenomics* 2014, 15: 1479-94.
23. Summers CM, Hammons AL, Arora J, et al. Methotrexate modulates folate phenotype and inflammatory profile in EA.hy 926 cells. *Eur J Pharmacol* 2014, 732: 60-67.
24. Hsieh YC, Tedeschi P, Adebisi Lawal R, Banerjee D, Scotto K, Kerrigan JE, Lee KC, Johnson-Farley N, Bertino JR, Abali EE. Enhanced degradation of dihydrofolate reductase through inhibition of NAD kinase by nicotinamide analogs. *Mol Pharmacol* 2013, 83: 339-53.



25. Celtikci B, Leclerc D, Lawrance AK, Deng L, Friedman HC, Krupenko NI, Krupenko SA, Melnyk S, James SJ, Peterson AC, Rozen R. Altered expression of methylenetetrahydrofolate reductase modifies response to methotrexate in mice. *Pharmacogenet Genomics* 2008, 18: 577-89.
26. Cáliz R, del Amo J, Balsa A, Blanco F, Silva L, Sanmarti R, Martínez FG, Collado MD, Ramirez Mdel C, Tejedor D, Artieda M, Pascual-Salcedo D, Oreiro N, Andreu JL, Graell E, Simon L, Martínez A, Mulero J. The C677T polymorphism in the MTHFR gene is associated with the toxicity of methotrexate in a Spanish rheumatoid arthritis population. *Scand J Rheumatol* 2012, 41: 10-14.
27. Dikmen M, Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enziminin Moleküler Biyolojisi ve Hastalıklarla İlişkisi. *Kocatepe Tıp Derg* 2004, 5: 9-16.
28. Tantawy AA, El-Bostany EA, Adly AA, Abou El Asrar M, El-Ghouroury EA, Abdulghaffar EE. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Egyptian children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010, 21: 28-34.
29. Talerman A, Thompson RB. Hepatic fibrosis in a child possibly due to prolonged methotrexate. *J Clin Pathol* 1966, 19: 81-82.
30. Valentino PL, Church PC, Shah PS, Beyene J, Griffiths AM, Feldman BM, Kamath BM. Hepatotoxicity caused by methotrexate therapy in children with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2014, 20: 47-59.
31. Uptodate, Therapeutic use and toxicity of high-dose methotrexate. <https://www.uptodate.com/contents/therapeutic-use-and-toxicity-of-high-dose-methotrexate> 10 11 2015
32. Berends MA, Snoek J, de Jong EM, van de Kerkhof PC, van Oijen MG, van Krieken JH, Drenth JP. Liver injury in long-term methotrexate treatment in psoriasis is relatively infrequent. *Aliment Pharmacol Ther* 2006, 24: 805-11.
33. Schmitt J, Singh JA, (2014), Methotrexate use and liver disease - a causal relationship? *Br J Dermatol* 2014, 171: 6-7.
34. Park SH, Choe JY, Kim SK. Assessment of liver fibrosis by transient elastography in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *j.jbspin* 2010, 77: 588-92.
35. Quintin E, Scoazec JY, Marotte H, Miossec P. Rare incidence of methotrexate-specific lesions in liver biopsy of patients with arthritis and elevated liver enzymes. *Arthritis Res Ther* 2010, 12: R143.
36. Mòdol T, Natal C, Pérez de Obanos MP, Domingo de Miguel E, Iraburu MJ, López-Zabalza MJ. Apoptosis of hepatic stellate cells mediated by specific protein nitration. *Biochem Pharmacol* 2011, 81: 451-8.

37. Kocaman N, Çolakoğlu N. Tekrarlayan Dozlarda Metotreksat Uygulamasının Sıçan Karaciğer Dokusu Üzerine Etkileri. *Fırat Tıp Derg/Fırat Med J* 2013, 18: 141-5.
38. Aşcı H, Özer MK. Metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında misoprostolün koruyucu etkisi. *S.D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2011, 2: 125-6.
39. McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 1969, 244: 6049-65.
40. Mercan U, Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *YYU Vet Fak Derg.* 2004, 15: 91-6.
41. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988, 34: 497-500.
42. Durak I, Akyol O, Es MU, Canbolat O, Akpoyraz M. Element structure in stenotic mitral valves. *Am J Cardiol* 1993, 71: 355.
43. Lu SC. Glutathione Synthesis. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1830: 3143-53.
44. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification, *Clin Chim Acta* 2003, 333: 19-39.
45. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963, 61: 882-8.
46. Wiedenmann T, Dietrich N, Fleming T, Altamura S, Deelman LE, Henning RH, Muckenthaler MU., Nawroth PP, Hammes HP, Wagner AH, Hecker M. Modulation of glutathione peroxidase activity by age-dependent carbonylation in glomeruli of diabetic mice. *J Diabetes Complications* 2017, 22: 31094-2.
47. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967, 70: 158-69.
48. Aebi H, Wyss SR, Scherz B, Skvaril F. Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. *Eur J Biochem* 1974, 48: 137-45.
49. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 2014: 360438.
50. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990, 186: 407-21.

51. Prophet EB. *Laboratory methods in histotechnology*. Washington, D.C: American Registry of Pathology 1992: 132, 177.
52. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 1998, 3: 697-707.
53. Susnow N, Zhang L, Margineantu D, Hockenbery DM. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Semin Cancer Biol* 2009, 19: 42-9.
54. Kose E, Sapmaz HI, Sarihan E, Vardi N, Turkoz Y, Ekinci N. Beneficial Effects of Montelukast Against Methotrexate-Induced Liver Toxicity: A Biochemical and Histological Study. *Scientific World Journal* 2012, 2012: 987508.
55. Vonen B, Morland J. Isolated rat hepatocytes in suspension: potential hepatotoxic effects of six different drugs. *Arch Toxicol* 1984, 56:33-37.
56. Oğuz, A, Hasanoğlu A, Ezgü FS, Timlioğlu Ö, Biberoğlu G, Uluoğlu C. Methotrexate related acute hepatotoxicity. *Gazi Med J* 2002, 13: 69-72.
57. Laharie D, Seneschal J, Schaeffer T, Doutre MS, Longy-Boursier M, Pellegrin JL, Chabrun E, Villars S, Zerbib F, de Lédinghen V. Assessment of liver fibrosis with transient elastography and FibroTest in patients treated with methotrexate for chronic inflammatory diseases: a case-control study. *J Hepatol.* 2010, 53:1035-40.
58. Mendes FD, Levy C, Enders FB, Loftus Jr EV, Angulo P, Lindor KD. Abnormal hepatic biochemistries in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007, 102: 344-50.
59. Anatoliotakis N, Deftereos S, Bouras G, Giannopoulos G, Tsounis D, Angelidis C, Kaoukis A, Stefanadis C. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem* 2013, 13: 115-38.
60. Ciftci O, Aydin M, Ozdemir I, Vardi N. Quercetin prevents 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced testicular damage in rats. *Andrologia* 2012, 44: 164-73.
61. Ciftci O, Ozdemir I, Tanyildizi S, Yildiz S, Oguzturk H. Antioxidative effects of curcumin,  $\beta$ -myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicol Ind Health* 2011, 27: 447-53.
62. Sakthiswary R, Chan GYL, Koh ET, Leong KP, Thong BYH. Methotrexate-Associated Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Transaminitis in Rheumatoid Arthritis. *Scientific World Journal* 2014, 2014: 823763.
63. 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: 489-93.

64. Adams LA, Angulo P, Treatment of non-alcoholic fatty liver disease, *PostgradMed J* 2006, 82: 315-22
65. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum* 1998, 27: 277-92
66. Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum* 1986, 29: 832-5.

## **EKLER**

### **EK-1. Özgeçmiş**

1974 yılında Malatya’da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Malatya’da tamamladım. 1993-1995 yılları arasında Marmara Üniversitesi SHMYO Patoloji Laboratuvarı bölümünde öğrenim görerek mezun oldum. 1996 yılında Harran Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesinde göreve başladım. Aynı hastanede Patoloji laboratuvarı kurulumu ve faaliyete geçmesinde aktif çalıştım. 2000 yılında kurum değişikliği ile halen görev yaptığım İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde çalışmaya başladım. 2008-2011 yılları arasında Fırat Üniversite Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde öğrenim gördüm ve 2011 yılında onur öğrencisi olarak mezun oldum. 2014 yılında İnönü Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Deneysel Patoloji Programında yüksek lisansına başladım. Orta düzeyde İngilizce bilmekteyim. Evli ve iki kız çocuğu babasıyım.

## EK-2. Etik Kurul Onayı



### İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

#### DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 14-08-2014  
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
Araştırma Protokol no.su : 2014/A-63  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Sığan  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : Wistar Albino  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40 Adet  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : Yetişkin, 210-310 gr arası ağırlıkta

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç Dr. Emine Şamdancı'nın yürütücüsü olduğu "Methotrexate ile Oluşturulan Karaciğer Hasarına Karşı Molsidominin Koruyucu ve Tedavi Edici Etkisinin Ratlarda Araştırılması" isimli 2014/A-63 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Başkan	 Prof.Dr. Nigar VARDI Üye	 Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ Üye
 Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	 Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye Katılmadı
 Salih AVCI Sivil Üye Katılmadı	 Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye Katılmadı	