

Tekrarlayan Dozlarda Metotreksat Uygulamasının Sıçan Karaciğer Dokusu Üzerine Etkileri

Nevin KOCAMAN, Neriman ÇOLAKOĞLU^a

Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

ÖZET

Amaç: Metotreksat, antikanserojen, antiinflamatuvar özellikleri sayesinde kanser, romatoid artrit, psoriasis gibi çok sayıda hastalığın tedavisinde yaygın bir şekilde reçete edilmektedir. Bununla birlikte karaciğerde metabolize olmasından dolayı hepatotoksisite riski bulunmaktadır. Bu çalışma metotreksat kaynaklı muhtemel karaciğer hasarını belirlemek için planlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 18 adet Wistar Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Denekler 3 gruba ayrıldı. Grup I'deki sıçanlar kontrol olarak kullanıldı. Grup II'yi oluşturan sıçanlara deneyin 1.gününde tek doz 15mg/kg metotreksat intra peritoneal (ip) yolla, grup III'teki sıçanlara ise deneyin 1. ve 5. günlerinde metotreksat i.p. yolla uygulandı. Deneyin 8. gününde tüm gruplarda yer alan sıçanlar dekapite edildi. Midsagittal insizyon yapılarak karaciğer dokuları ışık mikroskopik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonuna alındı.

Bulgular: Yapılan ışık mikroskopik incelemelerde grup II'de vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon, periportal alanda mononükleer hücre infiltrasyonu ve az sayıda heterokromatik çekirdekli hepatositler dikkat çekiyordu. Grup III'te ise vasküler konjesyonun ve sinüzoidal dilatasyonun oldukça yaygın olduğu saptandı. Periportal inflamasyon, makroveziküler yağlanma ve çok sayıda heterokromatik çekirdekli hepatosit ayırt edilen diğer bulguları. Ayrıca bu grupta belirgin fibroblast aktivasyonu saptandı.

Sonuç: Bu çalışmanın sonucunda kliniklerde birçok hastalığın tedavisinde kullanılan metotreksatın doz ve süre ayarlamasının oldukça dikkatli yapılması gerektiği sonucuna varıldı. Uzun süreli hazırlanan tedavi protokolleri karaciğeri yapısal anlamda dolayısıyla fizyolojik olarak menfi yönde etkileyebilir.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, Toksikite, Karaciğer, Mikroskop.

ABSTRACT

Effects of Repeated Doses Administration of Methotrexate on Rat Liver Tissue

Objective: Methotrexate is a commonly prescribed drug to therapy many of disorders including cancer, rheumatoid arthritis, psoriasis thanks to anti cancer, anti inflammatory properties. Nevertheless, its use is associated with the risk of hepatotoxicity due to metabolized in liver. This experimental study was planned to determined possible hepatic injury caused by methotrexate.

Material and Method: Total of 18 adult Wistar Albino female rats were used. The animals were divided into 3 groups. The rats in the 1st group were used as control. The second group of rat were injected single dose methotrexate (15mg/kg) on 1st day of experimental study, whereas third group of rats were injected methotrexate 1st and 5th day of experimental study. All of rats were decapitated on 8th day of experiment. Midsagittal incision was performed and liver tissues were removed and fixed in 10% formaldehyde solution for light microscopy investigations.

Results: In light microscopic examination, there were vascular congestion, sinusoidal dilatation, mononuclear cell infiltration in periportal space in group II. In addition, limited number hepatocytes had heterochromatin nuclei. In group III, vascular congestion and sinusoidal dilatation were observed more expansive. The other microscopic evidences were periportal inflammation and macrovesicular steatosis. Moreover, fibroblast activation was detected prominently.

Conclusion: As a result of this study, physicians must be careful about adjustment of methotrexate, used to in the treatment of many diseases, dose and therapy time. Long-term prepared treatment protocols may impact on liver adversely as structural and physiological.

Key Words: Methotrexate, Toxicity, Liver, Microscopy.

Metotreksat, 2,4-diamino-N10-methyl propylglutamic acid, çok sayıda hematolojik rahatsızlıkların, romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. Ayrıca meme kanseri, akut lenfoblastik lösemi (ALL), osteojenik sarkom, akciğer kanseri ve mesane kanserinin tedavilerinde de kullanılmaktadır (1). Hücre bölünmesini inhibe etmesi nedeni ile kanser tedavisinde uzun zamandan beri kullanılan ilacın, santral sinir

sistemi hariç, oral ve intravenöz uygulamalarında, doku dağılımı iyidir (2). Kanser tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanımının dışında psoriasis, multiple skleroz gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (1).

Metotreksatın hem tedavideki etkinliği hem de toksik etkileri hastadan hastaya değişkenlik gösterebilir (3). Bu yüzden diğer antineoplastik ilaçlardan farklı

^a Yazışma Adresi: Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye
Tel: 0 424 2370000
Geliş Tarihi/Received: 03.04.2013

e-mail: nerimancolakoglu@yahoo.com
Kabul Tarihi/Accepted: 10.04.2013

olarak metotreksat geniş bir doz aralığında kullanılmaktadır. Akut lenfoblastik lösemi idame tedavisinde ve romatoid artrit, psöriazis gibi hastalıkların tedavisinde haftada 20 mg/m² dozda kullanılırken, onkolojik hastalıklarda 1000-33000 mg/m² gibi yüksek dozlarda uygulanmaktadır (4).

Metotreksat, sentez fazındaki hücreleri etkileyip hücre replikasyonunda anahtar enzim olan dihidrofolat redüktaza bağlanarak pürin ve primidin yapımı için gerekli tetrahidrofolat sentezini inhibe eder (5). Metotreksat, dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek DNA, RNA ve ATP sentezi için gerekli olan tetrahidrofolat sentezini durdurur, sonuçta timidilat, pürin nükleotidleri ve aminoasitlerin sentezinde azalmaya neden olur. Böylece nükleik asid ve protein sentezini önler (6).

Akut metotreksat toksisitesinde; metotreksat enjeksiyonunu takiben 2-4 saat içinde başağrısı, ense sertliği, bulantı, kusma ve ateş ortaya çıkar. Bazen bacaklara yayılan bel ağrısı, takiben duyu kaybı, parapleji, barsak veya mesane disfonksiyonu ile beyin ve spinal kordda demiyelinizasyon oluşabilir. Tranvers myelopati intratekal metotreksat tedavisinin nadir komplikasyonu olup genellikle birkaç enjeksiyondan sonra ortaya çıkar (7). Metotreksat pürin ve pirimidin sentezini inhibe ederek apoptozisle sonuçlanan DNA defektlerine yol açabilir (8). Metotreksat tedavisi alan romatoid artritli hastaların karaciğer biyopsisinde, hem folat eksikliği hem de metotreksat poliglutamalarının birikimi gösterilmiştir (9).

Biz bu çalışmada klinikte yaygın bir kullanım alanına sahip olan metotreksatın karaciğer üzerine olan etkilerini belirlemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel çalışmaya Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra başlandı. Çalışmamızda 18 adet ergin Wistar Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 22°C oda ısısında 12 saat ışık (7:00-19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00-7:00) özel olarak yaptırılan ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda (normal çeşme suyu) verildi.

Anabilim dalımızda daha önce yapılan bir çalışmada literatür taramaları sonucu tayin edilen 20mg/kg tek doz metotreksatın denekleri fizyolojik anlamda zorladığı gözlemlendi. Bu çalışma protokolüne göre 20 mg/kg metotreksatın 2. dozunun deneklerin yaşamlarını tehdit edebileceği öngörüsüyle dozun 15mg/kg olarak uygulanmasının daha uygun olacağı düşünüldü.

Denekler her biri 6 sıçan içeren 3 gruba ayrıldı.

I. Grup: Kontrol (n: 6)

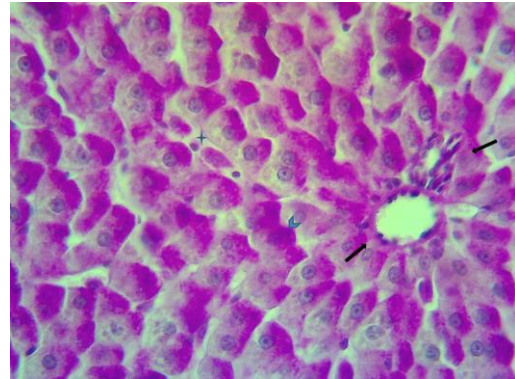
II. Grup: Deneyin 1. gününde 15 mg/kg intraperitoneal (i.p) metotreksat uygulanan sıçanlardan oluşturuldu (n: 6).

III. Grup: Deneyin 1. ve 5. gününde 15 mg/kg i.p metotreksat uygulanan sıçanlardan oluşturuldu (n: 6).

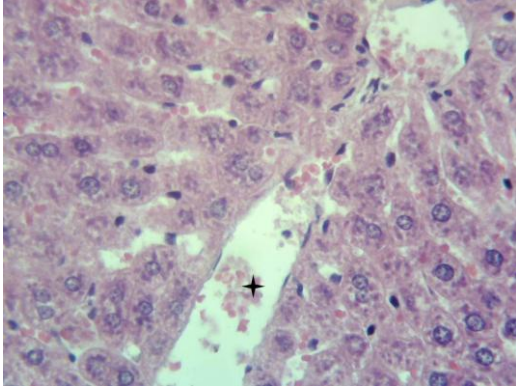
Deneyin 8. gününde tüm gruplardaki sıçanlar 75mg/kg ketamin + 10mg/kg xylazine i.p uygulanarak oluşturulan anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından midsagittal insizyon yapılarak sıçanların karaciğer dokuları hızlıca çıkarılıp %10'luk formaldehit ile tespit edildi. Rutin histolojik doku hazırlama prosedürü ile parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alındı ve kesitlere Hematoksilen & Eozin (H&E) ve Periodic acid Schiff (PAS) boyama teknikleri uygulandı. Hazırlanan preparatlar Olympus BH2 fotomikroskop ile incelenip fotoğraflandı.

BULGULAR

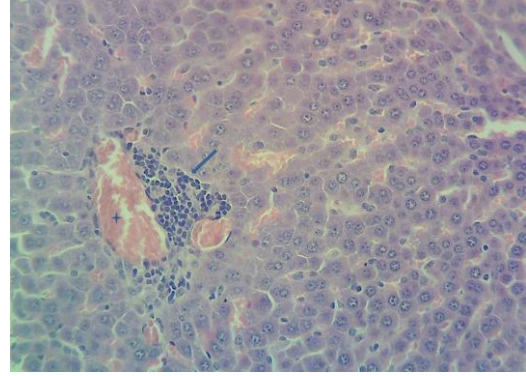
Kontrol grubuna ait kesitlerde hepatositler, sinüzoidler ve sinüzoidal hücreler, portal alan ve hepatositlerin glikojen içerikleri normal olarak gözlemlendi (Şekil 1). Tek doz metotreksat uygulanan grup II'de vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon, periportal alanda mononükleer hücre infiltrasyonu ve az sayıda heterokromatik çekirdekli hepatositlere rastlandı. Grup II'de ayrıca hepatositlerin glikojen içeriğinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 2-4). Grup III'te metotreksatın tekrarlayan dozunun karaciğerdeki yapısal değişiklikleri şiddetlendirdiği ayırt edildi. Bu grupta vasküler konjesyonun ve sinüzoidal dilatasyonun oldukça yaygın olduğu saptandı (Şekil 5). Belirgin periportal inflamasyon, makroveziküler yağlanma ve hepatositlerin glikojen içeriğinde tükenme gözlemlendi (Şekil 6-8). Ayrıca çok sayıda heterokromatik çekirdekli hepatosit ve özellikle portal alanlarda fibroblast aktivasyonu saptandı (Şekil 9, 10).



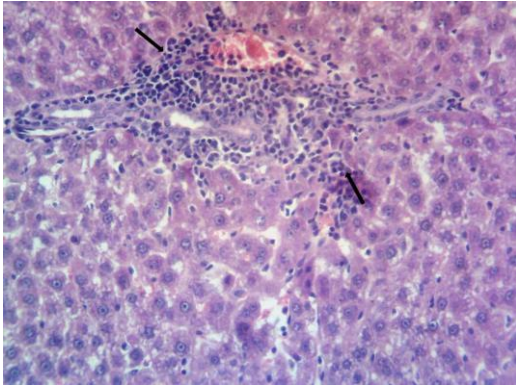
Şekil 1. Grup I. Hepatositler, sinüzoidler (*), portal alan (ok) ve hepatositlerin glikojen içeriği (ok başı) normal olarak ayırt edilmekte. PAS x 400



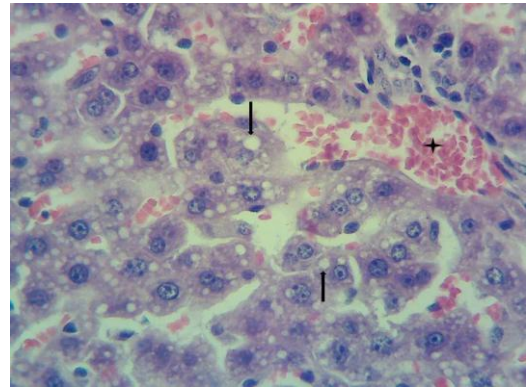
Şekil 2. Grup II. Sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon (*). H&E x 400



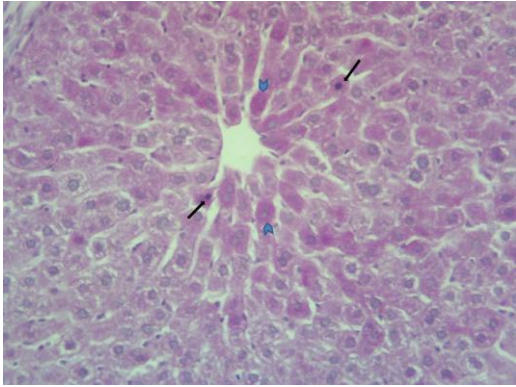
Şekil 6. Grup III. Periportal mononükleer hücre infiltrasyonu (ok) ve vasküler konjesyon (*). H&E x 200.



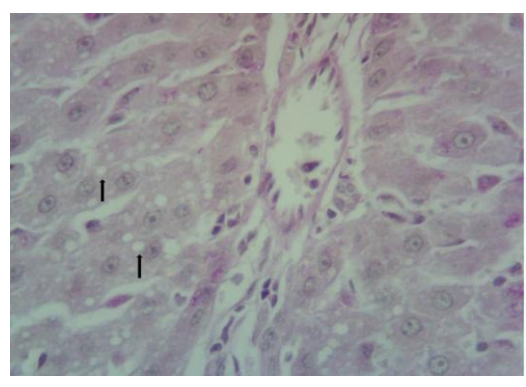
Şekil 3. Grup II. Periportal mononükleer hücre infiltrasyonu (ok). H&E x 200.



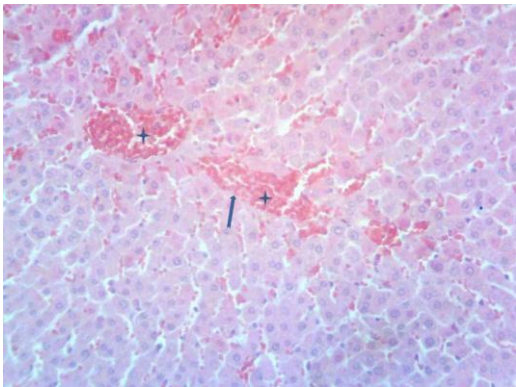
Şekil 7. Grup III. Periportal alanda yer alan hepatositlerde belirgin makroveziküler yağlanma (ok) ve vasküler konjesyon (*). H&E x 400.



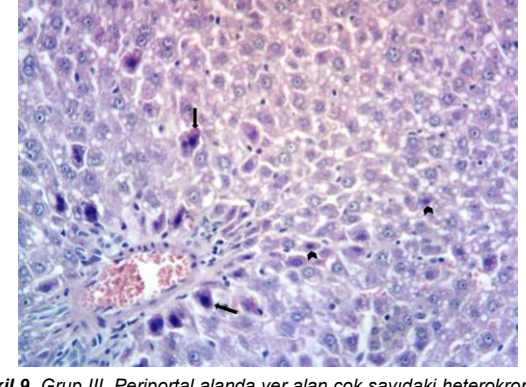
Şekil 4. Grup II. Heterokromatik çekirdekli hepatositler (ok) ve metotreksat uygulamasına bağlı olarak az sayıda glikojen içeren hepatositler (ok başı). PAS x 200.



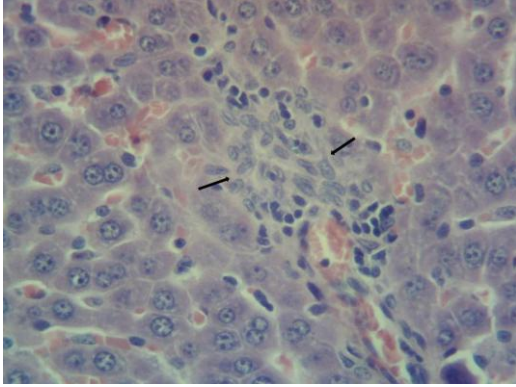
Şekil 8. Grup III. Periportal alanda yer alan hepatositlerin glikojen içeriğinin boşaldığı ve hepatositlerdeki makroveziküler yağlanma (ok) ayırt edilmekte. PAS x 400.



Şekil 5. Grup III. Belirgin sinüzoidal dilatasyon (ok) ve vasküler konjesyon (*). H&E x 200.



Şekil 9. Grup III. Periportal alanda yer alan çok sayıda heterokromatik (ok) ve piknotik (ok başı) çekirdekli hepatositler ve hepatositlerdeki makroveziküler yağlanma. H&E x 200.



Şekil 10. Grup III. Portal alanda belirgin fibroblast aktivasyonu (ok) ve vasküler konjesyon. H&E x 200.

TARTIŞMA

Metotreksat, antikanserojen, antiinflamatuvar, antimetabolit etkili bir ilaç olup lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer ve meme kanserlerinin yanısıra psöriasis, dermatomyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (10). Klinikte geniş kullanım alanları olmasıyla birlikte, karaciğer üzerine olan toksik etkisinden dolayı da dikkat çekmektedir (8). Kronik düşük doz metotreksat kullanımı, fibrozis ve siroza neden olurken yüksek doz metotreksat, karaciğer fonksiyon testlerinde ani bozulmalara neden olmaktadır (11).

Metotreksatın neden olduğu hepatotoksitenin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte toksisiteyi açıklayacak birkaç mekanizma öne sürülmüştür. Metotreksat temel metaboliti olan 7-hidroksimetotreksat'a karaciğerde dönüşmekte ve karaciğer hücrelerinde poliglutamit formunda depolanmaktadır. Uzun süre metotreksat tedavisinde, poliglutamit formunun birikimi ve folat seviyesinin azalması hepatotoksitenin sebeplerindedir (10).

Yine metotreksat, sitozolik NADPDH (nikotinamid adenin fosfatdehidrojenaz) ve NADP bağımlı malik enzimi inhibe ederek hücre içi NADPH'ın azalmasına neden olmaktadır. NADPH, sitozolik antioksidan olan indirgenmiş glutatyon (GSH)'nun devamlılığını sağlayan glutatyon redüktaz (GSSG-R) enzimi için gerekmektedir. Metotreksat tedavisi nedeniyle GSH seviyesinin azalması, reaktif oksijen radikallerine karşı hücreleri koruyan antioksidan savunma sisteminin etkinliğinin azalması ile sonuçlanmaktadır (10). Metotreksat kullanımına bağlı olarak azalan NADPH seviyeleri, hepatositleri reaktif oksijen radikallerine karşı koruyan redükte glutatyon seviyelerinin düşmesine, bu da hepatosit hasarına neden olmaktadır (8).

Bir çalışmada metotreksat verilen sıçanların kan, karaciğer, böbrek ve ince barsak dokularında GSH seviyelerinin azaldığı, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz aktivitesinin ve lipid peroksidas-

yonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) seviyelerinin ise arttığı rapor edilmektedir (12). Bu durum steatozis (vücutta aşırı yağ toplanması), kolestazis (safra akımının kesilmesi), fibrozis ve sonuç olarak siroz gibi karaciğer hasarı yanında böbrek hasarı, kemik iliği supresyonu, mukozit, pulmoner fibrozis gibi ciddi yan etkilerin de sebebi olabilmektedir (10). Kronik metotreksat kullanımında karaciğerde histolojik olarak, yağ infiltrasyonu, inflamasyon, hücresel nekroz ve bunların sonucunda da fibrozis gelişebileceği gibi klinik ve biyokimyasal bulgular yıllarca görülmeyebilir (8). Yapılan bir başka çalışmada, romatoid artritli hastaların metotreksat ile tedavisi sonunda karaciğer enzimlerinde geçici yükselme, 4 yıllık tedavinin sonunda ortadan şiddetliye değişen derecede fibrozis olduğu rapor edilmektedir (13).

İlaçların metabolizmasından sorumlu temel organ olan karaciğerin metotreksat uygulamasından etkilendiği tavşanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada da saptanmıştır. Sekiz hafta süresince 0.25 mg/kg /gün intra musküler metotreksat enjeksiyonu yapılan tavşanların karaciğer SGOT, SGPT, ALP ve bilirubin düzeylerinin ve MDA'nın anlamlı derecede yükseldiği, total serum proteininin ise azaldığı gözlenmiştir (14).

Dalaklıoğlu ve ark. (15) yaptıkları çalışmada üç gün 7mg/kg/gün dozda uyguladıkları metotreksatın serum AST, ALT, ALP düzeylerini anlamlı derecede artırdığını rapor etmişlerdir. Tedavi grubunda kullanılan resveratrolün ise oksidatif stresi inhibe ederek karaciğerde koruyucu etki gösterdiğini vurgulamışlardır.

Biz yaptığımız bu çalışmada metotreksat uygulamasına bağlı olarak hepatositlerdeki glikojen depolarında azalma, sinuzoidlerde dilatasyon, vasküler konjesyon ve özellikle portal alanlarda daha yaygın olmakla birlikte mononükleer çekirdekli hücre infiltrasyonu gözlemledik. Metotreksatın özellikle tekrarlayan uygulamasından sonra ayrıca çok sayıda piknotik çekirdekli hepatosit, makroveziküler yağlanma ve hiperkromatik çekirdekli hepatositler ayırtedildi. Bir başka göze çarpan bulgumuz ise, yer yer fibroblast aktivasyonunun gözlenmesi idi. Piknotik ve hiperkromatik çekirdekli hepatositlerin sıkça gözlenmesi metotreksatın DNA hasarına, mononükleer çekirdekli hücre infiltrasyonları ise inflamasyona yol açtığını işaret etmektedir. Yine belirgin sıklıkta fibroblast aktivasyonu, metotreksat kullanımının uzun vadede fibrozise neden olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, kliniklerde bir çok hastalığın tedavisinde kullanılan metotreksatın doz ve süre ayarlamasının çok iyi yapılması gerektiği belirlenmiştir. Aksi halde metotreksat uygulaması karaciğerde yapısal ve fizyolojik anlamda ciddi bozukluklar meydana getirebilir.

KAYNAKLAR

1. Abolmaali SS, Tamaddon AM, Dinarvand R. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71: 1115-30..
2. Işık A, Işlay L, Erdemli EA, Akbay C, Anafarta K. Sıçan testisinde metotreksat'ın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 1997; 50: 125-29.
3. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* 2006; 11: 694-703.
4. Bruton L, Chapner B, Knollman B. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12 th Edition, USA: The McGraw-Hill Companies, 2011; 1665-771.
5. Chabner BA, Allegra A, Curt C. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* 1985; 76: 907-12.
6. Bruton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman's tedavinin farmakolojik temeli. Süzer Ö (Çeviri Editörü). 1. Baskı, İstanbul: Nobel, 2009.
7. Brock S, Jennings HR. Fatal acute encephalomyelitis after a single dose of intrathecal methotrexate. *Pharmacotherapy* 2004; 24: 673-76.
8. Uraz S, Tahan V, Aygun C, et al. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1071-77.
9. Kremer JM, Maini RN, Romain PL. Major side effects of low-dose methotrexate. *Uptodate* 2009; 53: 17-21.
10. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit* 2006; 12: 274-78.
11. Şahan C, Öztürk M. Kanser kemoterapisi ve karaciğer. *OMÜ Tıp Dergisi* 2003; 20: 47-60.
12. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 2003; 34: 282-87.
13. Albrecht K, Müller-Ladner U. Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: 95-101.
14. Hadi NR, Al-Amran FG, Swadi A. Metformin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Pharmacother* 2012; 3: 248-53.
15. Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcıt F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol* 2013; 32: 662-71.