

## Tekrarlayan Dozlarda Metotreksat Uygulamasının Sıçan Böbrek Dokusu Üzerine Etkileri

Nevin KOCAMAN, Neriman ÇOLAKOĞLU<sup>a</sup>

*Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye*

### ÖZET

**Amaç:** Metotreksat, antiproliferatif, antiinflamatuvar etkileriyle kliniklerde birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Yüksek dozlarda sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir. Biz bu çalışmada metotreksat kaynaklı muhtemel böbrek dokusu hasarını belirlemeyi amaçladık.

**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 (i.p.) 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. Böbrek dokuları ışık mikroskopik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonuna alındı. Rutin doku hazırlama prosedürü ile parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan TUNEL ve histokimyasal boyama tekniklerinin uygulanması için 5µm kalınlığında kesitler alındı.

**Bulgular:** Yapılan ışık mikroskopik incelemelerde grup II'de peritübüler vasküler konjesyon ve distal tübülde dilatasyon ayırt edildi. Bu grupta özellikle distal tübül hücrelerinde +2 şiddetinde TUNEL-pozitif hücreler gözlemlendi. Metotreksatın 2 doz uygulandığı grup III'te ise distal tübüldeki dilatasyon ve peritübüler vasküler konjesyon çok daha yaygın olarak tespit edildi. Bu grupta ayrıca köpüksü görünüme sahip tübül hücreler, renal korpuskül atrofi ve tubulointerstitial inflamasyon dikkat çekiciydi. TUNEL-pozitif hücreler +3 şiddetinde gözlemlendi.

**Sonuç:** Bu çalışmanın sonucunda kliniklerde birçok hastalığın tedavisinde kullanılan metotreksatın doz ve süre ayarlamasının oldukça dikkatli yapılması gerektiği saptandı. Uzun süreli, yüksek dozda hazırlanan tedavi protokollerinin böbreklerde yapısal hasar ve dolayısıyla renal fizyolojide bozulmalar meydana getirebileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Metotreksat, Nefrotoksisite, Mikroskop.

### ABSTRACT

#### Effects of Repeated Doses Administration of Methotrexate on Rat Kidney Tissue

**Objective:** Methotrexate is a commonly used drug to therapy many of disorders thanks to antiproliferative and anti-inflammatory properties. High dose methotrexate has cytotoxic effects. This experimental study was planned to determined possible kidney damage caused by methotrexate.

**Material and Method:** 18 adult Wistar Albino female rats were used in this study. 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. Kidney tissues were removed and fixed in 10% formaldehyde solution for light microscopy investigations. Paraffin blocks were prepared. The tissue blocks were sectioned at a thickness of 5µm to perform TUNEL and histochemical staining.

**Results:** In light microscopic examination, there were peritubular vascular congestion, dilatation in the distal tubule of group II kidney tissues. In this group, TUNEL(+2) - positive cells observed especially distal tubules. In group III, injected two dose methotrexate, dilatation in the distal tubules, peritubular vascular congestion were more expansive. In addition, there were noteworthy foamy appeared tubular cell, atrophy of renal corpuscle, tubulointerstitial inflammation in this group. TUNEL-positive cell detected in +3 severity.

**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 treatment time. Long-term high dose treatment protocols may cause structural damage and disrupt renal physiology.

**Key Words:** Methotrexate, Nephrotoxicity, Microscopy.

Neoplazilerden psoriasisize uzanan geniş yelpazede birçok hastalığın tedavisinde kullanılan metotreksat, bir folik asit antagonisti olup, dihidrofolat redüktaz enzimini bağlayıp DNA ve RNA sentezini inhibe ederek antiproliferatif etki gösteren bir ajandır (1, 2). Anti proliferatif özelliğinden dolayı yüksek dozlarda kanser tedavisinde kullanılır (3, 4). Meme tümörü hücresi üzerine yapılmış bir çalışmada metotreksatın Caspase 3 ekspresyonunu artırarak apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (5). Ayrıca antiinflamatuvar etkisiyle romatoid

artrit tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu etkisini adenozin seviyesini ve antiinflamatuvar sitokinleri artırıp proinflamatuvar sitokinleri (IL6 ve IL 1B) azaltarak yapmaktadır (6).

Metotreksatın sitotoksik etkisini gösterebilmesi için folil poliglutam sentaz enzimi tarafından poliglutamasyona uğratılması gerekmektedir. Poliglutamasyon, vücutta hem normal dokularda hem de malign dokularda yapılır. İşte bu poliglutamaların hücre için-

<sup>a</sup> Yazışma Adresi: Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye  
Tel: 0 424 2370000

Geliş Tarihi/Received: 29.05.2013

e-mail: nerimancoakoglu@yahoo.com

Kabul Tarihi/Accepted: 12.07.2013

de birikmesi folat metabolizmasını etkileyen enzimler üzerinde inhibitör etki gösterir (7). Burdan da anlaşılacağı gibi metotreksatin sitotoksik etkisi yalnızca kanser hücrelerine has olmayıp tüm vücut hücreleri üzerine olmaktadır. Özellikle gastrointestinal sistem mukozası gibi, hızlı proliferasyonun olduğu hücreler en fazla etkilenen hücrelerdir (8).

Metotreksatin terapötik etkinliği hastalar arasında değişkenlik göstermektedir. Tedaviye verilen cevap önceden belirlenemez. İlaç 24 saat içinde dolaşımdan elimine olduğu için, etkinliğini değerlendirmede serum metotreksat seviyeleri kullanılamaz. Metotreksat poliglutamatlarının (MTXPG) eritrosit ve polimorfonukleer lökositlerdeki seviyesi klinik etkinlikte korele bulunmuştur. Eritrositlerdeki MTXPG seviyesi <60 nmol/l ise klinik cevabın kötü olduğu düşünülür ki bu teknik, hem çok güçtür hem de çoğu merkezde yapılamamaktadır (9).

Metotreksat, böbrek yoluyla elimine edilir ve uygulanan dozun % 60-90'ı değişmemiş bir şekilde idrarda bulunur (10). Metotreksat, serum üre ve kreatinin seviyesinde artışa ve hematüriye neden olmaktadır. Metotreksata bağlı renal fonksiyonların bozulmasını önlemek için üriner alkalizasyon oluşturulması oldukça önemlidir. Yine metotreksat kaynaklı toksik etkileri folinik asid (N5-formil THF=Lökovorin) ile antagonize etmek mümkündür (11).

Kanser tedavisinde kullanılan metotreksatin da içinde bulunduğu belli ilaçlar nefrotoksisiteye yol açabilecek yan etkilere sahiptir. Nefrotoksisite glomerüller veya tübüler disfonksiyon, hipertansiyon ve renal endokrin fonksiyonda meydana gelebilecek bozukluklarla seyredebilir (12).

Biz bu çalışmada kliniklerde farklı hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan metotreksatin, elimine olduğu organ olan böbreklerde hasar oluşturup oluşturmadığını belirlemeyi amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

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.

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 sıçanların böbrek dokuları hızlıca çıkarılıp %10'luk formaldehit ile tespit edildi. Rutin histolojik doku hazırlama prosedürü ile parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan TUNEL ve histokimyasal boyama tekniklerinin uygulanması için 5µm kalınlığına kesitler alındı.

## Histokimyasal Boyama

Kesitlere Hematoksilen & Eozin (H&E) ve Mallory'nin üçlü boyama teknikleri uygulandı.

## TUNEL Boyama

Böbrek dokusunda meydana gelen apoptozisin belirlenmesi için TUNEL (terminal deoxynucleotidyl tranferase-mediated-UTP nick end labeling) boyaması yapıp gruplar arası fark semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Skorum; -, yok; +1, az; +2, orta; +3, şiddetli olarak değerlendirildi (Tablo 1).

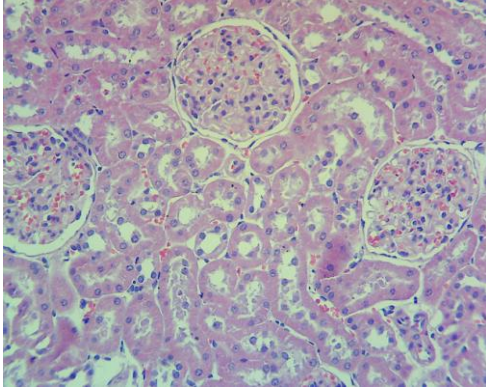
**Tablo 1.** TUNEL boyaması yapılan grupların değerlendirilmesi.

Grup	TUNEL Pozitifliği
Grup I	-
Grup II	+2
Grup III	+3

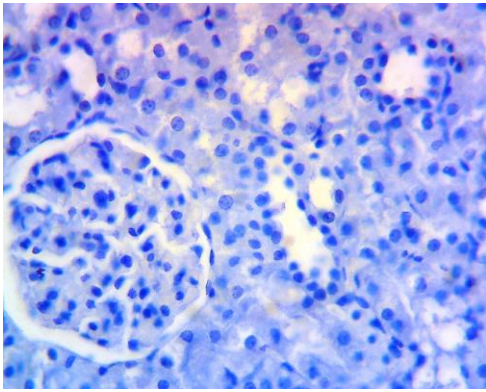
Histokimyasal ve TUNEL teknikleri ile boyanan preparatlar Olympus BH2 fotomikroskop ile incelenip fotoğraflandı.

## BULGULAR

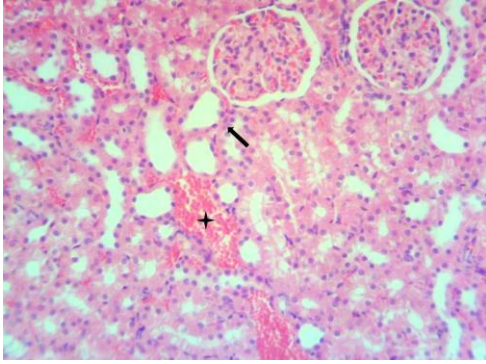
Kontrol grubuna ait doku kesitlerinde renal korpuskül, proksimal ve distal tübüller, toplayıcı ve henle kanalları normal yapıda izlendi. Bu grupta renal korpuskül yapılarında ve tübüler hücrelerde TUNEL (-)'lik hakimiydi (Resim 1, 2). Tek doz metotreksat uygulanan grup II'de distal tübüllerde dilatasyon, peritübüler vasküler konjesyon gözlemlendi (Resim 3). Bu grupta özellikle distal tübül hücrelerinde +2 şiddetinde TUNEL-pozitif hücreler ayırt edildi (Resim 4). Metotreksatin 2 doz uygulandığı grup III'te ise distal tübüllerdeki dilatasyon ve peritübüler vasküler konjesyon çok daha yaygın olarak tespit edildi (Resim 5). Bu grupta ayrıca köpüksü görünüme sahip tübüler hücreler, renal korpuskül atrofi ve tubulointerstisyel inflamasyon dikkat çekiciydi (Resim 6-8). TUNEL-pozitif hücreler +3 şiddetinde gözlemlendi (Resim 9).



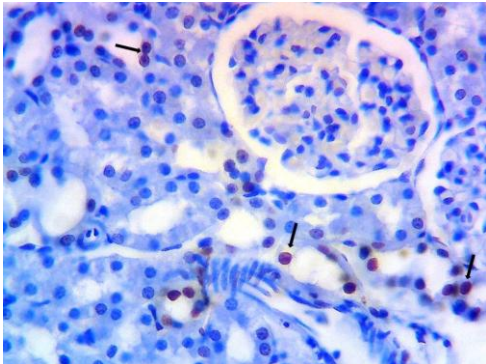
**Resim 1.** Grup I. Renal korpüskül ve tübüler yapılar normal olarak ayırt edilmekte. Hematoksilen & Eozin 200x



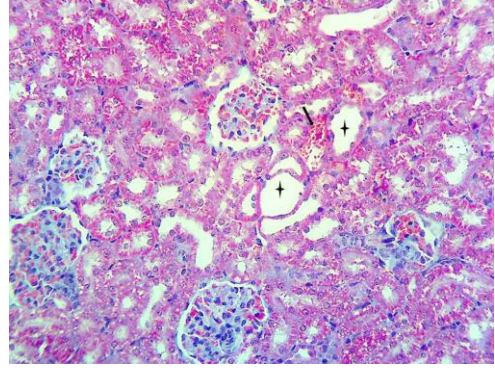
**Resim 2.** Grup I. TUNEL (-) 'lik ayırt edilmekte. 400 x



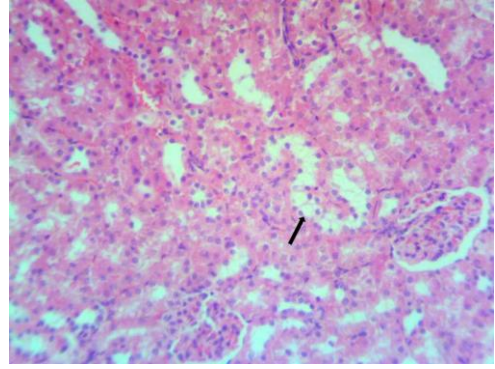
**Resim 3.** Grup II. Peritübüler vasküler konjesyon (\*) ve distal tübül dilatasyonu (ok). Hematoksilen & Eozin 200x



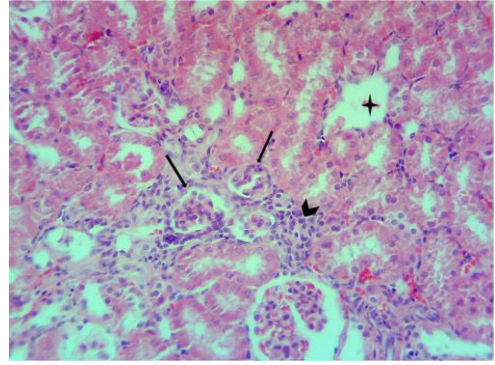
**Resim 4.** Grup II. TUNEL (+2) pozitifliklik gösteren tübüler hücreler. 400x



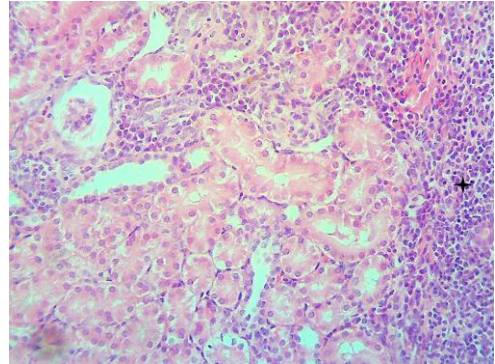
**Resim 5.** Grup III. Belirgin peritübüler vasküler konjesyon (ok) ve distal tübül dilatasyonu (\*). Mallory'nin üçlü boyaması. 200x



**Resim 6.** Grup III. Köpüksü görünüme sahip tübüler hücreler (ok). Hematoksilen & Eozin. 200x

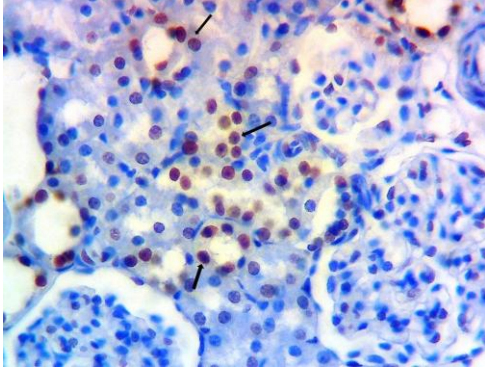


**Resim 7.** Grup III. Renal korpüskül atrofisi (ok), tübüler dilatasyon (\*) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (ok başı) dikkat çekmekte. Hematoksilen & Eozin. 200x



**Resim 8.** Grup III. Belirgin tubulointerstiyel inflamasyon (\*). Hematoksilen & Eozin 200x





**Resim 9.** Grup III. TUNEL (+3) pozitiflik gösteren tübüler hücreler. 400x

## TARTIŞMA

Renal toksisite metotreksatın en ciddi yan etkisidir (13). Metotreksat kaynaklı toksisitede; metotreksat ile yapılan tedavinin süresi ve doz şeması, hastalığın tipi ve hastanın risk faktörleri ile birlikte genetik ve moleküler apoptotik faktörler gibi birçok faktörün etkileşimi rol oynar (14).

Metotreksat tedavisi nedeniyle glutatyon seviyesinin azalması ile birlikte süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroklorik radikaller gibi reaktif oksijen radikallerine karşı hücreleri koruyan antioksidan savunma sisteminin etkinliğinin zayıflaması meydana gelmektedir (14). Metotreksata bağlı ince barsak hasarında oksidatif stresin, özellikle nötrofil infiltrasyonunun rol oynadığı gösterilmiştir (15).

Devrim ve ark. (16) da metotreksat nefrotoksitesinde oksidatif stresin rolü olduğunu ortaya koymuşlardır. Fagositik lökositler uygun şekilde uyarıldıkları zaman oksijen tüketimlerini artırır. Buna nötrofillerin respiratuvar/oksidatif patlaması denilir ki, aktive nötrofiller myeloperoksidaz, elastaz, proteaz gibi bazı enzimler salgırlar ve oksijen radikallerini açığa çıkarırlar (17). Myeloperoksidaz, nötrofil infiltrasyonunun bir belirleyicisi olup nötrofil fonksiyonları için önemlidir. Serbest radikaller dokulara olan doğrudan hasar yapıcı etkilerine ilaveten, lökositlerin hasarlı dokuya toplanmasını sağlayarak da doku hasarına neden olmaktadır (18). Metotreksat uygulanan ratların böbrek dokularında indüklenebilir nitrik oksit seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir (19).

Hemodiyaliz hastalarında metotreksat kullanımı düşük dozlarda bile ciddi ve fatal sonuçlar doğurduğundan romatoloji otoritelerince kontrendike kabul edilmektedir. Bu nedenlerle, romatoid artrit ve kanserli hastalarda ilacın kullanımı zorunlu ise dozun %75 azaltılarak ve yakın monitörizasyon ile verilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (10).

## KAYNAKLAR

1. Fridlington JL, Tripple JW, Reichenberg JS, Hall CS, Diven DG. Acute methotrexate toxicity seen as plaque psoriasis ulceration and necrosis: A diagnostic clue. *Dermatol Online J* 2011; 17: 2.
2. Hyoun SC, Običan SG, Scialli AR. Teratogen update: methotrexate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012; 94: 187-207.

Yapılan çalışmalarda metotreksat kristallerinin distal tübüle çökmesi sonucunda obstrüktif nefropatinin gelişebildiği gösterilmiştir (20). Metotreksat alan hastalarda probenesid ve salisilatlardan kaçınılmalıdır. Çünkü probenesid metotreksat klirensini % 60 oranında azaltır, aspirinin de diğer non steroid antiinflatuar (NSAİ)'larla kıyaslandığında daha belirgin olarak metotreksat klirensini azalttığı bilinmektedir. Salisilat veya NSAİ'la birlikte kullanım sonucunda yan etki gelişimi bildirilen olgular, genelde yüksek dozda metotreksat alan olgulardır. Metotreksat ve NSAİ toksisitesi genelde klinik belirti vermeden sublinik olarak seyredir. Stabil dozda metotreksat alan hastada NSAİ eklenmesi veya değiştirilmesi halinde serum kreatinin seviyelerinin değerlendirilmesi gereklidir. Yine kotrimoksazolün kendisi de bir folat antagonisti olduğu için metotreksat ile birlikte alındıklarında ciddi kemik iliği supresyonu yapabilirler (21).

Yüksek doz metotreksat alımının akut böbrek yetmezliğine neden olduğu bilinmektedir (13). Çeşitli önlemler alınmasına rağmen halen, bazı hastalarda yüksek doz metotreksat alımı ve sürekli artmış plazma metotreksat düzeylerine maruz kalınması sonucu, geç de olsa "high dose metotreksat" (HDMTX) nefrotoksitesisi gelişimi rapor edilmiştir (22).

Vardi ve ark. (23), yaptıkları çalışmada metotreksatın böbreklerde glomeruloskleroz ve apoptozis gibi önemli yapısal hasara yol açtığını yine Köse ve ark. (24) yaptıkları başka bir çalışmada metotreksata bağlı olarak tübülde deskuamasyon, proksimal tübülde fırçamsı kenar hasarı oluştuğunu bildirmişlerdir.

Biz yaptığımız bu çalışmada metotreksat uygulanan grup II ve grup III'te renal korpuskül atrofisi, peritübüler vasküler konjesyon, distal tübülde dilatasyon ve tübüler hücrelerde artmış apoptozis gibi önemli sayılabilecek yapısal değişiklikler gözlemledik. Bu değişiklikler doz artışına paralel olarak grup III'te daha şiddetli olarak ayırt edildi. Grup III'te grup II'den farklı olarak ilaveten tubulointerstisyel inflamasyon da gözlemlendi. Metotreksatın bu hasarı, sebep olduğu oksidatif stres üzerinden yaptığımızı düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, oksidatif strese bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin zayıflaması sonucu oluşan glomeruler ve tübüler hasar kanın filtrasyonunda ve reabsorbsiyon mekanizmalarında dolayısıyla renal fizyolojide önemli bozulmalar meydana getirebilir. Bu nedenle metotreksat kullanımının endike olduğu vakalarda doz ayarlamasının dikkatli ve kontrollü yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

3. 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. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 27: 277-92.
4. Kishi T, Tanaka Y, Ueda K. Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy. *Cancer* 2000; 89: 925-31.
5. Hattangadi DK, DeMasters GA, Walker TD. Influence of p53 and caspase 3 activity on cell death and senescence in response to methotrexate in the breast tumor cell. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1699-708.
6. Swierkot J, Szechinski J. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 473-92.
7. Chabner BA, Allegra A, Curt C. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* 1985; 76: 907-12.
8. Chabner B, Wilson W, Supko J. Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs. Editorial: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kipps TJ, Kaushansky K. In *Williams Hematology*. 7th Edition. Mc Graw Hill Company, United States 2007; 249-51.
9. Stamp L, Roberts R, Kennedy M, Barclay M, O'Donnell J, Chapman P. The use of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis-are we entering a new era of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics? *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 678-87.
10. Sarıkaya M, Yıldırım M, Sarı F. Hemodiyaliz uygulanan hastalarda kemoterapi. *ACU Sağlık Bil Derg* 2013; 4: 1-5.
11. Erkurt MA, Kuku İ, Kaya E, Aydoğdu İ. Kanser kemoterapisi ve böbrek. *İnönü Üniv Tıp Fak Derg* 2009; 16: 63-8.
12. Lameire N, Kruse V, Rottey S. Nephrotoxicity of anticancer drugs an underestimated problem? *Acta Clin Belg* 2011; 66: 337-45.
13. Çağlar Y, Özgür H, Matur I, Yenilmez ED, Tuli A, Gönülşen G, Polat S. Ultrastructural evaluation of the effect of N-acetylcysteine on methotrexate nephrotoxicity in rats. *Histol Histopathol* 2013; 28: 865-74.
14. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, et al. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit* 2006; 12: 274-78.
15. Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1119-27.
16. Devrim E, Cetin R, Kiliçoglu B, Ergüder BI, Avcı A, Durak I. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail* 2005; 27: 771-3.
17. Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 591-602.
18. Vaziri ND. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol* 2004; 24: 469-73.
19. Uz E, Oktem F, Yılmaz HR, Uzar E, Özgüner F. The activities of purinecatabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 2005; 277: 165-70.
20. Widemann BC, Balis FM, Kempf-Bielack B, et al. High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer* 2004; 100: 2222-32.
21. Güzel R. Romatoid artrit ve hastalığı modifiye edici antiromatizmal ilaçlar. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg* 2008; 1; 25-30.
22. Tuffaha HW, Al Omar S. Glucarpidase for the treatment of life-threatening methotrexate overdose. *Drugs Today* 2012; 48: 705-11.
23. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlu A. The protective effects of *Prunus armeniaca* L (apricot) against methotrexate-induced oxidative damage and apoptosis in rat kidney. *J Physiol Biochem* 2012; 69: 371-81.
24. Köse E, Beytur A, Vardi N, Türköz Y, Ekinci N, Ekincioglu Z. Metotreksat'ın neden olduğu akut böbrek hasarına karşı montelukast'ın etkileri. *İnönü Üniv Tıp Fak Derg* 2011; 18: 73-7.