

Ratlarda metotreksata bağlı oksidatif intestinal hasarda leflunomidinin koruyucu etkisinin araştırılması

Effect of leflunomide on methotrexate-induced oxidative small intestinal injury in rats

Ufuk KUTLUANA¹, Nevin ORUÇ², Mustafa YILMAZ¹, Nadir YÖNETCİ¹, Bünyamin KAPTANOĞLU³, Ömer ÖZÜTEMİZ²

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Gastroenteroloji Bilim Dalı, ³Biyokimya Ana Bilim Dalı Denizli Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi ²Gastroenteroloji Bilim Dalı, İzmir

Giriş ve Amaç: Bu çalışmanın amacı metotreksata bağlı oksidatif ince barsak hasarında leflunomid tedavisinin etkisini araştırmaktır. **Gereç ve Yöntem:** 40 adet rat randomize olarak dört gruba ayrılmıştır. Metotreksata bağlı ince barsak hasarı 20 mg/kg metotreksatın tek doz intraperitoneal injeksiyonu ile oluşturulmuştur. İndüksiyon sonrası leflunomid 10 mg/kg/gün dozunda intra gastrik olarak 5 gün boyunca verilmiştir. İnce barsak dokuları, 6. gün superoksit dismutaz aktivitesi, myeloperoksidaz aktivitesi, glutatyon ve malondialdehit düzeylerinin ölçümü için homojenize edilmiştir. **Bulgular:** Leflunomid tedavisi doku myeloperoksidaz aktivitesi ve malondialdehit düzeylerini anlamlı ölçüde azaltmıştır (Sırasıyla 3.4±0.7, 1.9±0.4 p<0.05 ve 231±199, 94±80 p<0.05). Leflunomid tedavisi doku glutatyon düzeyleri ve süperoksit dismutaz aktivitesindeki azalmayı anlamlı ölçüde iyileştirmiştir (Sırasıyla 21±0.5, 25±3 p<0.05 ve 22±0.6, 25±2 p<0.05). **Sonuç:** Leflunomid tedavisi metotreksata bağlı ince barsak hasarındaki oksidatif parametreleri düzeltmektedir.

Anahtar kelimeler: Leflunomid, metotreksat, intestinal hasar

GİRİŞ

Metotreksat (MTX) bir folik asit antagonisti olup 40 yılı aşkın bir süredir romatoid artrit, psöriazis, neoplazmalar, lösemiler ve bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (1, 2). Günümüzde bunların yanı sıra sarkoidoz, inflamatuvar barsak hastalıkları ve vaskülitlerin tedavisinde de kullanım alanı bulmuştur (3-5). MTX bir dihidrofolik asit analogudur. Dihidrofolik asit redüktaz enzimini inhibe ederek pürin, pirimidin, deoksiribonükleik asit (DNA) sentezini engeller ve apoptozise yol açar (6). MTX'in sitotoksik etkisi kanser hücrelerine selektif değildir. Bu nedenle yüksek proliferasyon özelliği gösteren hemopoetik sistem, kemik iliği ve gastrointestinal sistem (GIS) mukozası gibi normal dokularda MTX'e bağlı toksite görülür. MTX'e bağlı major toksik etkilerden birisi de intestinal hasar ve enterokolittir. MTX'e bağlı ince barsak hasarı malabsorbsiyon ve ishale yol açar (7).

Background and Aims: The aim of this study was to investigate the effects of leflunomide treatment in methotrexate-induced oxidative small intestinal injury in rats. **Materials and Methods:** Forty rats were randomly divided into 4 groups. Methotrexate-induced intestinal injury was induced by single dose intraperitoneal injection of 20 mg/kg methotrexate. After induction, leflunomide (10 mg/kg/day) was administered intragastrically for 5 consecutive days. On the sixth day, homogenized small intestine tissues were examined for superoxide dismutase activity, myeloperoxidase activity, and glutathione and malondialdehyde levels. **Results:** Leflunomide treatment significantly decreased tissue myeloperoxidase activity and malondialdehyde levels (3.4±0.7, 1.9±0.4, p<0.05 and 231±199, 94±80, p<0.05, respectively). Leflunomide treatment significantly improved the decreased tissue levels of glutathione and superoxide dismutase activity (21±0.5, 25±3, p<0.05 and 22±0.6, 25±2, p<0.05, respectively). **Conclusions:** Leflunomide treatment ameliorated oxidative parameters of methotrexate-induced small intestinal injury.

Key words: Leflunomide, methotrexate, intestinal injury

Güncel çalışmalar MTX'e bağlı GIS hücre kaybında apoptozisin etkili olduğunu desteklemektedir (8). Reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) MTX'e bağlı ince barsak hasarında temel rol oynamaktadır (9). MTX; ROÜ'leri inhibe etmek için kullanılan önemli sitozolik antioksidanlar olan nikotin amid adenozin difosfat (NADP) dehidrojenaz ve NADP malik enzimlerini inhibe eder. MTX glutatyon düzeylerini azaltarak enterositleri ROÜ'lere karşı daha hassas ve korumasız bırakır (10, 11). Land ve arkadaşları MTX'e bağlı nükleer faktör kapa B (NF-κB) aktivasyonunun intestinal epitelyal hücrelerde proinflamatuvar sitokin ve kemokin üretimine yol açarak intestinal mukozal hasar oluşturduğunu in vivo ve in vitro olarak saptamışlardır (12).

Leflunomid (HWA-486) antiinflamatuvar, antiproliferatif ve immünmodülatör etkileri olan bir ajandır. Leflunomid

İletişim: Ufuk KUTLUANA

Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Endoskopi Ünitesi
Hacışaban Mh. Yeni Meram Yolu Üzeri 42090 Meram, Konya, Türkiye
Tel: + 90 332 323 67 09 - 2954 • Fax: + 90 332 323 67 23 • E-mail: drufukkana@yahoo.com

Geliş Tarihi: 24.02.2011 • **Kabul Tarihi:** 19.03.2011

romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde ve transplant rejeksiyonunun engellenmesinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar leflunomidin aktif formu olan A77 1726'nın NF- κ B aktivasyonun potent bir inhibitörü olduğunu göstermiştir (13). Manna ve arkadaşlarının çalışmasında leflunomidin tümör nekrozitan faktör (TNF)'e bağlı ROÜ üretimini, lipid peroksidasyonunu, TNF tarafından indüklenen sitotoksositeyi ve kaspaz aktivasyonunu engellediği saptanmıştır. Yao ve arkadaşlarının çalışmasında ratlarda CCl4 veya immünolojik yolla oluşturulan karaciğer hasarında leflunomidin proinflatuar sitokin düzeyinde azalma, ve antioksidan aktivitede artışa yol açtığı saptanmıştır (14).

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı ratlarda MTX ile oksidatif intestinal hasarda leflunomidin muhtemel koruyucu etkisinin araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

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

İlaçlar

MTX Onco-Tain Mayne Pharma Pty Ltd. Victorica Firması'ndan satın alınmıştır. Leflunomid Aventis İlaç Firması'ndan satın alınmıştır. Leflunomidin su ve serum fizyolojik içinde erimemesi nedeniyle %1 karboksi metil selüloz (CMC) taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

Metotreksata Bağlı İntestinal Hasar Oluşturulması

MTX'e bağlı intestinal hasar literatürde daha önceden belirtilen yayınlara uygun şekilde oluşturulmuştur (15). Ratlara intraperitoneal injeksiyon ile MTX 20 mg/kg tek doz uygulanmıştır. Ratlar 5 gün sonrasında dekapitasyonla kurban edilmiştir. Leflunomid dozu için Yao ve arkadaşlarının "Ratlarda CCL4 ile oluşturulan hepatik fibroziste leflunomidin inhibitör etkisi" isimli çalışması baz alınmıştır (16).

Deneysel Çalışma Grupları

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

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

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

Leflunomid grubu (3. Grup): Intraperitoneal injeksiyon ile serum fizyolojik 3 ml/kg tek doz uygulanmasını takiben leflunomid 9 mg/kg/gün %1 CMC içerisinde 3 ml/kg/gün intragastrik olarak verilmiştir. Beş gün sonra hayvanlar kurban edilmiştir.

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

Doku Örneklerinin Alınması

Sakrifikasyondan hemen sonra ince barsaklar pilordan çekuma kadar çıkartılmıştır. Çıkartılan ince barsak orta kısımdan alınan doku örnekleri biyokimyasal incelemeler için uygun koşullarda saklanmıştır.

Biyokimyasal İncelemeler

Doku malondialdehit (MDA) "asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbanasının ölçülmesi" prensibine dayanan Ohkawa ve arkadaşlarının yöntemi uygulanarak ölçülmüştür (17). Sonuçlar spesifik aktivite, nmol/gr doku olarak ifade edilmiştir.

Glutatyon ölçümü spektrofotometrik olarak yapılmıştır (18). Sonuçlar nmol/gr doku olarak ifade edilmiştir.

Myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçümü öncesinde doku homojenize edilmiştir. MPO ölçümü "hidrojen peroksitin homojenat tarafından oksitlenerek o-dianosidini redüklemesi ve redükte o-dianosidin 410 nm.'de ölçülmesi" prensibine dayanılarak yapılmıştır (19). Sonuçlar spesifik aktivite, U/gr doku olarak ifade edilmiştir.

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi "ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu indirgemesi" esasına göre ölçülmüştür (20). Sonuçlar U/mg protein yaş doku olarak ifade edilmiştir.

İstatistik

İstatistik analizler SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama ve standart deviasyon (SD) olarak verilmiştir. Çalışma gruplarının değerlendirilmesinde Kruskal Wallis varyans analizi ve Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel sonuçlarda $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

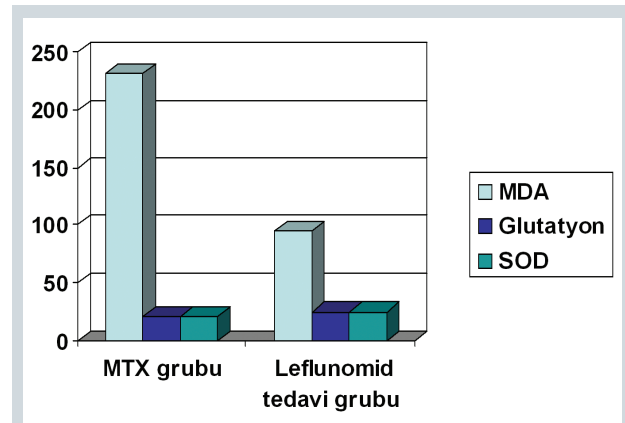
Çalışma gruplarında biyokimyasal oksidatif parametrelerin sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir.

MTX'in 20 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulaması intestinal doku MDA ve MPO değerlerinde artışa neden olmuştur. Doku MDA değerleri 1. Grupta 231 ± 199 nmol/gr doku, 4. Grupta 111 ± 112 nmol/gr doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). İnce barsakta MPO aktivitesi 1. Grupta 3.4 ± 0.7 U/gr doku, 4. Grupta 2.2 ± 0.6 U/gr doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). MTX'in 20 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulaması intestinal doku glutasyon ve SOD değerlerinde azalmaya neden olmuştur. Doku glutasyon değerleri 1. Grupta 21 ± 0.5 nmol/mgr, 4. Grupta 22 ± 0.7 nmol/mgr saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). İnce barsakta SOD aktivitesi 1. Grupta 22 ± 0.60 U/mg protein yaş doku, 4. Grupta 28 ± 0.80 U/mg protein yaş doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Leflunomid ile tedavi MTX'e bağlı intestinal hasarda rol oynayan oksidatif parametreleri düzeltmiş ve olumlu yönde etkilemiştir. MTX 20 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulanan ve 5 gün boyunca 9 mg/kg/gün leflunomid ile tedavi edilen ratlarda tedavi edilmeyen sadece MTX uygulanan ratlara göre intestinal doku MDA ve MPO değerlerindeki artış baskılanmıştır. Doku MDA değerleri 1. Grupta 231 ± 199 nmol/gr doku, 2. Grupta 94 ± 80 nmol/gr doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). İnce barsakta MPO aktivitesi 1. Grupta 3.4 ± 0.7

U/gr doku, 2. Grupta 1.9 ± 0.4 U/gr doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). MTX 20 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulanan ve 5 gün boyunca 9 mg/kg/gün leflunomid ile tedavi edilen ratlarda tedavi edilmeyen sadece MTX uygulanan ratlara göre intestinal doku glutasyon ve SOD değerlerindeki azalma engellenmiştir. Doku glutasyon değerleri 1. Grupta 21 ± 0.5 nmol/mgr, 2. Grupta 25 ± 3.0 nmol/mgr saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). İnce barsakta SOD aktivitesi 1. Grupta 22 ± 0.60 U/mg protein yaş doku, 4. Grupta 25 ± 2.0 U/mg protein yaş doku saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). MTX ile toksisite oluşturulan ve MTX ile toksisite oluşturulan ancak leflunomid ile tedavi edilen iki grup arasında MDA, glutasyon değerleri ve SOD aktivitelerinin değişikliği Şekil 1'de şematize edilmiştir. Yine aynı iki grup arasındaki MPO aktivitesi farklılığı Şekil 2'de şematize edilmiştir.

MDA değeri nmol/gr doku, glutasyon değeri nmol//mg, SOD aktivitesi U/mg protein şeklinde ifade edilmiştir. Leflunomid ile tedavi istatistiksel anlamlı biçimde ince bar-



Şekil 1. MTX ile toksisite oluşturulan ve MTX ile toksisite oluşturulan ancak leflunomid ile tedavi edilen iki grup arasında malondialdehit (MDA), glutasyon değerleri ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin değişikliği.

Tablo 1. Çalışma gruplarında oksidatif parametrelerin sonuçları

Gruplar	MDA (nmol/gr doku)	Glutasyon (nmol/mg)	MPO (U/gr doku)	SOD (U/mg protein)
1. grup	231±199*	21±0,5†	3.4±0.7‡	22±0.6§
2. grup	94±80	25±3	1.9±0,4	25±2
3. grup	157±183	22±1	3.2±1.9	28±0.9
4. grup	111±112	22±0,7	2.2±0.6	28±0.8

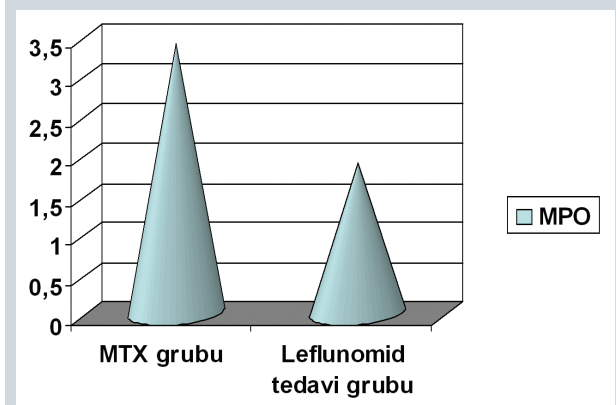
* Doku MDA değerleri 1. grupta 2. ve 4. gruplara göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

† Doku glutasyon değerleri 1. grupta 2. ve 4. gruplara göre istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur.

‡ Doku MPO değerleri 1. grupta 2. ve 4. gruplara göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

§ Doku SOD değerleri 1. grupta 2., 3. ve 4. gruplara göre istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).

sak MDA düzeylerindeki artışı baskılamış, glutasyon ve SOD düzeylerindeki azalmayı engellemiştir.



Şekil 2. MTX ile toksisite oluşturulan ve MTX ile toksisite oluşturulan ancak leflunomid ile tedavi edilen iki grup arasında myeloperooksidaz (MPO) aktivitelerinin değişikliği.

Doku MPO aktivitesi U/mg protein şeklinde ifade edilmiştir. Leflunomid ile tedavi istatistiksel anlamlı biçimde ince barsak MPO aktivitesi düzeylerindeki artışı baskılamıştır.

TARTIŞMA

Çalışmamız, leflunomidin MTX'e bağlı intestinal hasardaki oksidatif parametreleri düzelttiğini ortaya koymuştur.

Bir dihidrofolik asit analogu olan MTX'in sitotoksik etkisi kanser hücrelerine selektif değildir. Bu nedenle yüksek proliferasyon özelliği gösteren hemopoetik sistem, kemik iliği ve GIS mukozası gibi normal dokularda MTX'e bağlı toksisite görülür. MTX'e bağlı major toksik etkilerden birisi de intestinal hasar ve enterokolittir (7). MTX'e bağlı ince barsak hasarında ROÜ'ler temel rol oynamaktadır (9). MTX aynı zamanda glutasyon düzeylerini azaltarak enterositleri ROÜ'lere karşı daha hassas ve korumasız bırakmaktadır (10, 11). Güncel çalışmalar MTX'e bağlı intestinal hasarda NF-κB aktivasyonunun ve apoptozisin etkili olduğunu açığa çıkarmıştır (8, 12). GIS regülasyonunda antioksidan aktivite önemli rol oynamaktadır. Glutasyon ve glutasyon ilişkili enzimlerin GIS üzerindeki koruyucu rolü önceki çalışmalarda saptanmıştır (21). Deneysel çalışmalarda SOD'un lokal protektif etkisi saptanmıştır (22). MTX'e bağlı intestinal hasarda lokalize glutasyon, SOD

düzeylerinin ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA'nın artışı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (23). MTX'e bağlı intestinal hasarda nötrofil infiltrasyonu ve aktive nötrofiller tarafından salgılanan MPO oksidatif madde üretiminde önemli rol oynamaktadır (24). Literatürde MTX'e bağlı intestinal hasar üzerinde leflunomidin etkinliği ile ilgili herhangi bir veri ya da çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda leflunomid, MTX'e bağlı intestinal hasar patofizyolojisinde önemli rol oynayan glutasyon ve SOD düzeylerindeki azalmayı anlamlı ölçüde engellemiştir. Bu sonuç leflunomidin antioksidan etkinliğe sahip olması ve lökositlerden ROÜ'lerin salınımını inhibe etmesi ile ilişkili olabilir (25). Çalışmamız leflunomidin MTX'e bağlı intestinal hasarda önemli rol oynayan ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA artışını engellediğini göstermiştir. Çalışmamızın bir diğer önemli sonucu da leflunomidin MTX'e bağlı intestinal hasarda oksidatif mekanizmayı başlatan nötrofil aktivasyonunu ve MPO düzeylerindeki artışı engellemesidir.

NF-κB tüm vücutta yaygın olarak bulunan, inflamasyon, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, akut faz yanıtı, proliferasyon, apoptozis, doku hasarı ve doku tamiri ile ilişkili çok sayıda gen ekspresyonunda temel düzenleyici olarak görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. NF-κB fizyolojik ve patolojik durumlarda indüklenebilir transkripsiyon faktörü olması nedeniyle inflamatuvar ve immün yanıtla ilişkili bir çok durumda temel rol oynar (26). Leflunomidin aktif formu olan A77 1726 NF-κB aktivasyonunun potent bir inhibitörüdür. Leflunomidin NF-κB aktivasyonunu inhibe edici etkisi hücre spesifik değildir. Myeloid, epitelyal, glioma ve T hücrelerinin tümünde bu etki gözlenmektedir (13). Biz leflunomidin MTX'e bağlı oksidatif intestinal hasar üzerindeki koruyucu etkisinin NF-κB aktivasyonunun potent bir inhibitörü olması ile ilişkili olduğunu düşünüyoruz. MTX'e bağlı intestinal hasarda villüs kısalması, kripta ve epitelyal hücre kaybı, mononükleer hücre infiltrasyonu (27) gibi histopatolojik değişiklikler gözlemlense de; teknik nedenlerle histopatolojik değerlendirme yapılamaması çalışmamızın bir eksikliğidir.

Sonuç olarak leflunomid lipid peroksidasyonunu, nötrofil infiltrasyonunu engelleyici ve glutasyon ve SOD'un lokalize düzeyleri üzerinde olumlu etkileri nedeniyle MTX'e bağlı intestinal hasarda koruyucu etki gösterebilir. Konu ile ilgili daha detaylı deneysel çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Schilsky RL. Methotrexate: An effective agent for treating cancer and building careers. The polyglutamate era. *Stem Cells* 1996; 14: 29-32.
- Naldi L, Griffiths CE. Traditional therapies in the management of moderate to severe chronic plaque psoriasis: an assessment of the benefits and risks. *Br J Dermatol* 2005;152: 597-615.

3. Wu JJ, Schiff KR. Sarcoidosis. *Am Fam Physician* 2004; 70: 312-22.
4. Feagan BG, Alfadhli A. Methotrexate in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2004; 33: 407-20.
5. Langford CA. Management of systemic vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; 15: 281-97.
6. Friis H, Andreassen PB. Drug-induced hepatic injury: an analysis of 1,100 cases reported to the Danish Committee on Adverse Drug Reactions between 1978 and 1987. *J Intern Med* 1992; 232: 133-8.
7. Nagakubo J, Tomimatsu T, Kitajima M, et al. Characteristics of transport of fluoresceinated methotrexate in rat small intestine. *Life Sci* 2001; 69: 739-47.
8. Gibson RJ, Bowen JM, Cummins AG, Keefe DM. Relationship between dose of methotrexate, apoptosis, p53/p21 expression and intestinal crypt proliferation in the rat. *Clin Exp Med* 2005; 4: 188-95.
9. Gao F, Horie T. A synthetic analog of prostaglandin E1 prevents the production of reactive oxygen species in the intestinal mucosa of methotrexate treated rats. *Life Sci* 2002; 71: 1091-9.
10. Cody V, Luft JR, Pangborn W, et al. Understanding the role of Leu22 variants in methotrexate resistance: comparison of wild-type and Leu22Arg variant mouse and human dihydrofolate reductase ternary crystal complexes with methotrexate and NADPH. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2005; 61: 147-55.
11. ter Borg EJ, Seldenrijk CA, Timmer R. Liver cirrhosis due to methotrexate in a patient with rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 1996; 49: 244-6.
12. van't Land B, Blijlevens NM, Marteiijn J, et al. Role of curcumin and the inhibition of NF-kappaB in the onset of chemotherapy-induced mucosal barrier injury. *Leukemia* 2004; 18: 276-84
13. Manna SK, Aggarwal BB. Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF- dependent nuclear factor-kappaB activation and gene expression. *J Immunol* 1999; 162: 2095-102.
14. Yao HW, Li J, Jin Y, et al. Effect of leflunomide on immunological liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 320-3.
15. Jahovic1 N, Sener G, Çevik H, et al. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct* 2004; 22: 169-78.
16. Yao HW, Li J, Chen JQ, Xu SY. Inhibitory effect of leflunomid on hepatic fibrosis induced by CCl4 in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 915-20.
17. Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, et al. Neutrophils, lipid peroxidation, and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 494-502.
18. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Meth Enzymol* 1981; 77: 373-82.
19. Yagi K. Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal, and pancreatic diseases. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366: 165-9.
20. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1998; 34: 497-500.
21. Siegers CP, Riemann D, Thies E, Younes M. Glutathione and GSH dependent enzymes in the gastrointestinal mucosa of the rat. *Cancer Lett* 1988; 40: 71-6.
22. Jubeh TT, Antler S, Haupt S, et al. Local prevention of oxidative stress in the intestinal epithelium of the rat by adhesive liposomes of superoxide dismutase and tempamine. *Mol Pharm* 2005; 2: 2-11.
23. Ciralik H, Bulbuloglu E, Cetinkaya A, et al. Effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced small intestinal damage in rats. *Mt Sinai J Med* 2006; 73: 1086-92.
24. Zimmerman BJ, Granger N. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.
25. Bartlett RR, Anagnostopoulos H, Zielinski T, et al. Effects of leflunomid on immune responses and models of inflammation. *Springer Semin Immunopathol* 1993; 14: 381-94.
26. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3: 221-7.
27. Taminiau J, Gall DG, Hamilton JR. Response of the rat small-intestine epithelium to methotrexate. *Gut* 1980; 21: 486-92