

İlaçların Neden Olduğu Karaciğer Hasarı ve Hasarın Belirlenmesinde Kullanılan Biyogöstergeler

Drug Induced Liver Injury and Biomarkers Used for Its Determination: Review

Hatice Gül GÖKTAŞ,^{a,b}
Merve BACANLI,^a
Nurşen BAŞARAN^a

^aFarmasötik Toksikoloji AD,
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Ankara

^bFarmasötik Toksikoloji AD,
Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Adana

Geliş Tarihi/Received: 09.03.2014

Kabul Tarihi/Accepted: 22.05.2014

Yazışma Adresi/Correspondence:

Hatice Gül GÖKTAŞ
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Toksikoloji AD, Ankara,
TÜRKİYE/TURKEY
haticegul.goktas@hacettepe.edu.tr

ÖZET Karaciğer, ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizma ve detoksifikasyonundan sorumlu ana organ olması nedeniyle özellikle ilaçların neden olduğu toksisitede başlıca hedef organdır. Sadece ilaçlar değil bitkisel ilaçlar ve gıda takviyeleri de karaciğer hasarına neden olabilir. Bu tip hepatotoksisite, akut karaciğer yetmezliğine kadar gidebilen ağır karaciğer hasarına ve sonuçta ciddi mortalite ve morbiditeye yol açabilir. İlaçların neden olduğu karaciğer hasarı tespit edilmesi zor, çoklu mekanizmalara sahiptir. Bu nedenle, yeni ilaç geliştirme çalışmalarında önemli bir engeldir ve piyasadan ilaç çekilmesinin de en büyük nedenlerindedir. Karaciğer hasarı nedeniyle birçok ilaç piyasadan çekildiği gibi, bir kısmına da uyarı amacıyla kara kutu yerleştirilmiştir. İlaçların neden olduğu karaciğer hasarı riskini azaltmak için özellikle yaşlılar, kronik hastalığı olanlar ve çoklu ilaç kullanımı olan kişilerde ilaçların reçetelenmesi sırasında dikkatli olunması gerekmektedir. Karaciğer toksisitesi, günümüzde serum alkalen fosfataz, aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz gibi enzim aktivitelerinin ölçülmesi ve total bilirubin konsantrasyonunun tayin edilmesi ile belirlenebilmektedir. Ancak bu biyogöstergeler, ilaca bağlı hepatotoksisiteyi duyarlı ve özgül olarak belirleyebilmek için yetersizdir. Daha da önemlisi bu biyogöstergeler var olan hasarı gösterirken, gelecekte oluşabilecek bir hasar için uyarıcı özellikleri yoktur. Bu nedenlerle, yeni biyogöstergelerin geliştirilmesi gerekmektedir. Yeni biyogöstergelerin, hâlen kullanılan klasik biyogöstergeleri tamamlayıcı olarak kullanılması, tanı ve tedaviye daha çok yardımcı olacaktır. Bu derleme kapsamında, ilaçların neden olduğu karaciğer hasarının tipleri, tanısı, tanıda kullanılan ve gelecekte kullanılacak olan biyogöstergeler, sonuçları, tedavisi ve hepatotoksisiteye neden olan ilaç grupları incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İlaça bağlı karaciğer hasarı; biyobelirteçler, farmakolojik; zehirlilik

ABSTRACT Liver is primary target organ for drug toxicity since it is major organ responsible for metabolism and detoxification of xenobiotics; therefore major target organ of drug toxicity is liver. Not only drugs but also herbal medicines and food supplements can induce liver damage. This type of hepatotoxicity can cause severe liver damage which may progress to acute liver failure and ultimately can lead to serious morbidity and mortality. Drug induced liver injury has multiple mechanism which are difficult to detect. Thus drug induced liver injury is a significant impediment to the development of new therapies and is the biggest reason of removal of a drug from the market. Many drugs have been removed from the market due to liver damage and some have been assigned black box warning. In order to reduce the risk of drug induced liver injury, it is important to be careful in the prescription of drugs in elderly people and patients having polypharmacy and chronic diseases. Nowadays, hepatotoxicity can be determined by measuring the serum enzyme activities such as alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and determination of total bilirubin concentration. However these biomarkers are not sufficient for the sensitive and specific determination of drug induced hepatotoxicity. More importantly, these biomarkers indicate that the present damage and don't inform the future damage. For these reasons, it is necessary to develop new biomarkers. Using new biomarkers as a complement to classic biomarkers will contribute a lot to diagnosis and treatment. In this review, types of drug induced liver injury, its diagnosis, diagnostic biomarkers which are currently used and can be used in the future, treatment and results and drugs that cause hepatotoxicity were investigated.

Key Words: Drug-induced liver injury; biomarkers, pharmacological; toxicity

İlaçların neden olduğu karaciğer hasarı (İNOKH), tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar, bitkisel ürünler ve gıda takviyeleri nedeniyle oluşan karaciğer hasarını tanımlayan klinik bir durumdur.¹⁻³ İNOKH, hasta mortalite ve morbiditesinin en önemli nedenlerinden biri olduğu kadar, yeni ilaç geliştirme çalışmalarının önünde büyük bir engeldir ve bu nedenlerle, günümüzdeki ciddi sağlık sorunlarından biridir.⁴

Oral ilaç alımında ilk geçiş etkisi karaciğerde meydana gelir ve karaciğerin ksenobiyotik metabolize etme kapasitesi diğer organlara kıyasla fazladır. Bu nedenlerle, karaciğerin ilaç toksisitesinde ana hedef organ olduğu açıkça bilinmektedir.⁵ Normalde ksenobiyotiklerin taşınmasını veya detoksifiye edilmesini sağlayan, oksido-redüksiyon (Faz I), konjugasyon (Faz II) reaksiyonları ve taşıyıcıların doygunluğu (Faz III) sonucunda toksik metabolitler hepatositlerde meydana gelir ve birikir.^{5,6} Portal kan akımına bağımlı karaciğerin metabolik kapasitesi ve immün sistem, ilaç toksisitesine karşı karaciğerin duyarlılığında etkili olan faktörlerdir.⁴

İnsanlarda kullanılan, 10 000 ilacın 1000'den fazlasının karaciğer hasarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.⁷ İlaçların neden olduğu karaciğer hasarının, genel sıklığı yılda 100 000 hastada 10-15 olgu iken, klinikte tek bir ilaç kullanımına bağlı karaciğer hasarının sıklığı yılda 1/10 000 ila 1/100 000 arasındadır.^{8,9} Hafif karaciğer hasarı olgularının pek çoğu rapor edilmediği için; gerçekte çok daha fazla sayıda hastanın bu klinik durumdan zarar gördüğü düşünülmektedir.¹ Bir klinik çalışmada, tek bir İNOKH olgusunun bildirilebilmesi için, yaklaşık 30 000 hastayla çalışılması gerektiği kabul edilmektedir.⁷ İlaça bağlı karaciğer hasarının düşük insidanslı olması ve klinik araştırmalardaki hasta sayısının nadiren 2000-5000'den fazla olması gibi nedenlerle, klinik araştırmalar sırasında hepatotoksik ilaçların çoğu tespit edilememektedir.¹⁰ Bu nedenle, İNOKH piyasadan ilaç geri çekilmesinin de en yaygın nedenlerinden biridir.¹¹ Örneğin, İNOKH'ye bağlı mortalite ve morbidite vakalarının çokluğu sebebiyle Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA); bromfenak, troglitazon gibi birkaç ilacın piyasadan kaldırmasına karar vermiştir.¹²⁻¹⁴

Risperidon, trovafloksasin, nefazodon gibi bazı hepatotoksik ilaçlara ise "kara kutu" yerleştirilmiştir.^{15,16} Batı ülkelerinde en sık gözlenen ilaca bağlı karaciğer hasarı olgusu asetaminofen (parasetamol, APAP)'ın aşırı doz alımı sonucundadır ki İngiltere'de 2010-2011 yılları arasında 38 000 kişinin, bu nedenle acile başvurmasına sebep olmuştur.⁴ 1998-2007 yıllarında rapor edilen akut karaciğer yetmezliği olgularının %46'sı APAP ile gelişen karaciğer hasarı iken, diğer ilaçların oranı %11'dir.¹⁷ Bu derleme kapsamında, ilaçların neden olduğu karaciğer hasarının tipleri, tanısı, tanıda kullanılan ve gelecekte kullanılabilecek olan biyogöstergeler, karaciğer hasarının sonuçları, tedavisi ve bu tip hepatotoksisiteye neden olan ilaç grupları incelenmiştir.

İLAÇLARIN NEDEN OLDUĞU KARACİĞER HASARININ MEKANİZMALARI

İNOKH'nin gerçek mekanizması açık olarak bilinmemese de, ilaçların doğrudan karaciğere toksik etkileri ve immün aracılıklı veya immün aracılıklı olmayan idiyosenkratik etkiler ile karaciğerde hasara neden olduğu var sayılmaktadır.¹⁰

İLAÇLA İNDÜKLENEN DOĞRUDAN HEPATOTOKSİSİTE

İlacın veya çoğunlukla reaktif metabolitinin hepatositlere karşı doğrudan toksik etkisinden meydana gelir.¹⁰ Doğrudan hepatotoksisite, doza bağımlıdır, öngörülebilir, kişisel farklılıklar göstermez ve ilaç alımından bir-iki gün gibi kısa bir süre sonrasında başlar.¹⁸⁻²⁰ Terapötik dozlarda güvenli, yaygın kullanılan ve pek çok ülkede reçetesiz satılabilen bir analjezik olan APAP, bu tip hepatotoksisiteye neden olan ve üzerinde çok çalışılmış, klasik bir ilaçtır. Ancak yüksek dozda, akut karaciğer yetmezliğine kadar gidebilen sentrilobüler hepatik nekroza neden olur.¹⁰ APAP'ın metabolizması sırasında elektrofilik metaboliti olan N-asetil-p-benzokinonimin (NAPQI) oluşur.²¹ Yüksek doz APAP alımı glutasyon depolarını tüketir ve hücrel proteinlere kovalent bağlanmayı başlatır.¹⁰ Bu olaylar kalsiyum homeostazında bozulmaya, mitokondriyal disfonksiyona ve oksidatif strese yol açar, hücrel hasar ve ölüm gözlenebilir.^{10,22,23}

İDİYOSENKRATİK HEPATOTOKSİSİTE

Doğrudan hepatotoksitenin aksine, ilaçların neden olduğu idiyosenkratik karaciğer hasarı doza bağımlı değildir, önemli kişisel farklılıklar gösterir ve orta (bir-sekiz hafta) veya geç (12 ay) bekleme süresi sonrasında başlar.^{10,19} Kadınlar idiyosenkratik karaciğer hasarına daha duyarlıdır ve bu tip olguların üçte ikisini kadınlar oluşturmaktadır.^{3,19}

İdiyosenkratik hepatotoksiste, klinik özelliklerine göre immün aracılıklı (allerjik) ve immün aracılıklı olmayan (allerjik olmayan) hepatotoksiste olarak ikiye ayrılır.

İmmün aracılıklı idiyosenkratik reaksiyonlarda görülen klinik özellikler;

- Eş zamanlı ateş, döküntü ve eozinofili,
- Başlangıç reaksiyonlarında gecikme (bir-sekiz hafta) veya şüpheli ilacın yeniden uygulanmasına gerek duyulması,
- İlaça tekrar maruziyette toksitenin hızla tekrarlanması,
- Doğal veya ilacın değiştirebildiği hepatik proteinlere karşı antikorların varlığıdır.²⁴

Halotan, tienilik asit, diklofenak, fenitoin, nitrofurantoin gibi ilaçların immün aracılıklı idiyosenkratik reaksiyonlara neden olduğu düşünülmektedir. İzoniazid, disulfiram, valproik asit, amiodaron, bromfenak, ketakonazol, rifampisin ve troglitazon gibi ilaçlar ise immün aracılıklı olmayan idiyosenkratik hepatotoksiste sebeb olur. Diklofenak hem immün aracılıklı hem de immün aracılıklı olmayan mekanizma ile karaciğerde hasar oluşturur.^{12,25}

İLAÇLARIN NEDEN OLDUĞU

KARACİĞER HASARININ KLİNİK MODELLERİ

İlaçların neden olduğu karaciğer hasarı, serum enzimlerindeki yükselmeye bağlı olarak, akut hepatit (hepatoselüler), kolestatik veya karma (hepatoselüler-kolestatik) olarak üçe ayrılır.^{24,26} Akut hepatitte, serum aminotransferaz düzeylerinde ciddi bir yükseliş ile birlikte hepatoselüler nekroz görülür.

Kolestatik tip; sarılık ile birlikte, alkalin fosfataz, konjuge bilirubin ve gama glutamil transpeptidaz düzeylerinde artış ile karakterizedir. Karma tip ise hem hepatoselüler hem de kolestatik hasarın klinik özelliklerini içerir.¹⁰

İNOKH'nin klinik fenotipi, serum alanin aminotransferaz (ALT) ve alkalin fosfataz (ALP) düzeylerinde başlangıçtaki göreceli yükselmenin oranına göre belirlenmektedir. "Upper limit of normal (ULN)", normal kabul edilen maksimum enzim seviyesini göstermek üzere, R değeri = (ALTxULN)/(ALPxULN) olarak hesaplanır.²⁷ Hepatoselüler hasarda R>5, kolestatik hasarda R<2 ve karma tipte R değeri 2 ile 5 arasında tanımlanmıştır.²⁶⁻²⁸ Valide edilmiş bir yöntem olmamakla ve yanlış kararlara neden olmakla birlikte, bu yöntemle karaciğer hasarının klinik modeli belirlenebilir. Ayrıca R oranı zamanla değişebilir, genellikle hasarın başlangıcında bu değer daha yüksektir. Bütün bunlar göz önüne alındığında, hasarın klinik modelini ve fenotipini belirlemede ortalama R değeri en güvenilir kriterdir. Bununla birlikte hastada kaşıntı belirtilerinin görülmesi, hasarı kolestatik olarak sınıflandırmaya yardımcı olacak bir kriterdir.²⁶

HEPATOTOKSİK İLAÇLAR

Birçok ilacın, karaciğerde hasar oluşturma potansiyeli vardır, ancak klinikte yaygın olarak kullanılmadıkları sürece, genellikle belirlenemezler.^{3,29} Antibiyotikler, antitüberküloz ilaçlar, nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar, asetaminofen, statinler, oral hipoglisemik ajanlar (tiazolidindionlar) çok yaygın kullanımı olan ve karaciğer hasarına neden olduğu tespit edilmiş ilaçlara örneklerdir.^{2,10} Ancak bu ilaçların yararları, risklerinden fazla olduğundan, istenmeyen sonuçlardan kaçınmak için kullanma talimatlarındaki kurallara uyularak ve karaciğer hasarı yönünden yakın gözetim altında bulundurularak kullanılmaya devam edilmektedir.³ Tedavide çeşitli amaçlarla kullanılan ilaçlar, oluşturdukları hasarın tipine (hepatik, kolestatik ve karma tip) göre gruplandırılmaktadır (Tablo 1).

TABLO 1: Hepatik, kolestatik ve karma tip karaciğer hasarı oluşturan ilaç grupları ve bu ilaç gruplarına örnekler.

Hasar Tipi	İlaç Grubu	Örnekler
Hepatoselüler	Analjezik/Antipiretik	Asetaminofen
	Antiaritmik	Amiodaron
	Antibiyotik	Tekrasiklin
	Antikonvülsan	Valproat
	Antidepresan	Bupropion, Fluoksetin, Paroksetin, Sertralin
	Antifungal	Ketokonazol
	Antihipertansif	Lisinopril, Losartan
	Antitüberküloz	İzoniazid, Pirazinamid, Rifampin
	Antiviral	Nükleozid Analogları
	Hipoglisemik	Akarboz
	Antilipidemik	Statinler
	Proton Pompası İnhibitörü	Omeprazol
	Ksantinoksidad İnhibitörü	Allopurinol
Kolestatik	Antibiyotikler	Amoksisilin/Klavulanat, Eritromisinler
	Antifungal	Terbinafin
	Antihipertansif	İrbesartan
	Antiinflatuar	NSAİİ'ler
	Antiplatelet	Klopidogrel
	Antipsikotik	Klorpromazin, Fenotiazinler
	Hormon	Östrojen, Oral Kontraseptifler
	Lipit Düşürücü	Ezetimib
Karma	Antibiyotik	Klindamisin, Nitrofurantoin,
	Antikonvülsan	Karbamazepin, Fenitoin
	Antihipertansif	Kaptopril
	Antidepresan	Trazodon, Amitriptilin
	Antihistaminik	Siproheptadin
	Antihipertansif	Enalapril, Verapamil
	Antitümör	Azatiopürin
	Hipoglisemik	Tiyazolidindion

İLAÇLARIN NEDEN OLDUĞU KARACİĞER HASARINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

İlaçların neden olduğu hepatotoksisite, ilacın kimyasal özelliklerine, çevresel ve genetik faktörlere, yaş, cinsiyet ve var olan hastalıklara bağlı olarak değişebilir.³⁰

Yaşlılarda çoklu ilaç kullanımı, ilaç-ilaç etkileşmeleri olasılığını artırmaktadır. Bununla birlikte yaşa bağlı olarak görülen bazı bozukluklar (çocuklarda aspirinin neden olduğu Reye sendromu, yaşlılarda izoniazidin neden olduğu kronik hepatit gibi) söz konusu olabilir.¹⁸

Kadınlar ilaçların neden olduğu hepatotoksisite bakımından daha fazla risk altındadır. Kadınlar

özellikle fluoksasilin, metildopa ve nitrofurantoinin ve erkekler de azatiopirin ve ko-amoksilavin neden olduğu kolestatik hepatite daha duyarlıdır.¹⁸

İrk da ilaçların neden olduğu karaciğer hasarına karşı bir risk faktörüdür.³¹ Örneğin; Afrikalılar ve Amerikalılar antikonvülsanların neden olduğu hepatotoksisiteye, beyaz ırk ise abakavir ve flukloksasilin neden olduğu hepatotoksisiteye daha duyarlıdır.¹⁸

Açlık veya alkolün neden olduğu glutatyon kaybı, hamilelikte intravenöz (i.v.) tetrasiklin ve APAP toksisitesi riskini artırabilir. Bununla birlikte, kronik alkol kullanımı, enzim indüksiyonu ve steatozis gibi ana hasar yolları ile toksisiteyi etkiler. Bu durumda metotreksata olan hassasiyet de artar.¹⁸

Sitokrom P450 sistemindeki genetik polimorfizmler ilaçlara bağlı hepatotoksisite gelişmesinde etkilidir. Bu sistemdeki enzimleri indükleyen (fenitoin, karbamazepin ve rifampisin) veya inhibe eden (eritromisin, paroksetin ve omeprazol) ilaçlar hepatik hasarı tetikleyebilir.¹⁸

İlaça bağlı immün reaksiyonların, insan lökosit antijeni (HLA) gen polimorfizmleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak bu ilişkiyi açıklamak için yapılan çalışmalarda, farklı ilaçlar için farklı sonuçlar elde edilmiştir.^{32,33} Sharma ve ark., antitüberküloz ilaçların neden olduğu hepatotoksisite riskinin HLA-DQB1*0201 polimorfizmi ile arttığını göstermiştir.³⁴ HLA-B*5701 polimorfizminin de abakavirin neden olduğu deri reaksiyonlarına yakınlığı arttırdığı iddia edilmektedir.^{35,36} Ko-amoksilavin neden olduğu karaciğer hasarı ile HLA gen polimorfizmleri arasında pozitif ilişki olduğu bazı çalışmalarla gösterilmiş olsa da, karşı görüşte çalışmalar da bulunmaktadır.^{37,38} HLA gen polimorfizmleri ile çeşitli ilaçların neden olduğu hepatotoksisite riski arasındaki ilişki tanımlanmış olmasına rağmen, bu polimorfizmlerin olası karaciğer hasarını öngörme gücü düşüktür. Bu nedenle klinikte biyogösterge olarak kullanımı kısıtlıdır.³⁹

İLAÇLARIN NEDEN OLDUĞU KARACİĞER HASARININ TESPİTİ

İNOKH'nin klinik tanısı zordur. Çünkü birçok hasta asemptomatik iken, bazı hastalarda akut ve kronik karaciğer hastalığının tüm formlarına benzeyebilen özgül olmayan belirtiler gözlenir.⁴⁰ Bu nedenle hastaneye başvuran kişilerden doğru öykü alınması çok önemlidir. Kullanılan reçeteli veya reçetesiz ilaçlar, bitkisel ürünler ve gıda takviyeleri; ürünün kullanılma nedeni, kullanılmaya ne zaman başlanıldığı ve ne zaman son verildiğinin, alkol alınıp alınmadığının açıklandığı detaylı bir öykü alınması gereklidir.^{1,2,18} İlaç geliştirmede klinik öncesi çalışmalarda hepatotoksisite tayini ise daha çok hepatik histolojik yorumlamaya bağlı olarak yapılır.⁴¹

İNOKH tanısı yedi kritere dayanılarak yapılır. Bunlar; başlangıç zamanı, iyileşme zamanı, klinik tablo, risk faktörleri, diğer sebepleri hariç bırakılma, ilaç, bitkisel ürün veya gıda desteğinin hepatotoksik potansiyeli, yeniden maruziyete karşı

verilen cevaptır. Bu faktörler ilaca bağlı karaciğer hasarının nedensellik değerlendirmesinde, ayrı ayrı kullanılır.⁴⁰ Örneğin; Roussel Uclaf Nedensellik Değerlendirme Metodu (RUCAM)'nda her biri için belirlenmiş bir skor vardır.^{1,2} İlaç kullanımı ile karaciğer hasarı başlangıç zamanı arasındaki ilişki ve ilaç kullanımının kesilmesinden sonra hasarın durduğu zaman arasındaki ilişki bu kriterler arasında en önemlileridir. Ancak bekleme süresi bir-dört gün (özellikle asetaminofen, makrolit grubu antibiyotikler, sulfonamid ve i.v. amiodaron gibi maddelere maruziyet ve tekrarlayan maruziyetlerde) gibi çok kısa olabileceği gibi bir yıl veya daha uzun süre (özellikle kronik hepatit ve yağlı karaciğer hastalığı oluşturan amiodaron, nitrofurantoin, tamoksifen ve minosiklin gibi maddelere maruziyette) de olabilir. Olguların birçoğu tedavi başlangıcından üç ay sonra ortaya çıkmaktadır.⁴⁰ Antibiyotikler gibi kısa süre kullanılan ilaçların, kullanımının bırakılmasından sonra karaciğer hasarı oluşturmaları ise dikkat çekicidir.²⁶

İlaçlardan kaynaklanan hepatotoksisitenin belirlenmesi, şüpheli olduğu bilinen çeşitli ilaçların potansiyel karaciğer hasarına karşı dikkatli olunmasını da gerektirir. Bu alanda çalışmış en önemli bilim adamlarından biri olarak kabul edilen hepatolog Hyman Zimmerman, şüpheli görülen serum ALT yüksekliğinde; aynı zamanda bilirubin seviyesi normal kabul edilen maksimum değerini iki katından daha büyükse; ilacın ciddi hepatotoksisiteye sebep olduğunu ve sarılığın eşlik ettiği yüksek serum ALT düzeylerinde, ölüm oranının %5 ila %50 arasında gerçekleşeceğini iddia etmiştir.^{27,42} Bu gözlem "Hy'nin kuralı" olarak adlandırılmıştır ve FDA tarafından yeni geliştirilen ilaçların hepatotoksisitesini değerlendirmede kullanılmaktadır.^{4,10} Ayrıca bu kural, günümüzde ilaçların neden olduğu akut hepatotoksisiteyi değerlendirmekte kullanılan, kabul edilmiş tek düzenleyici modeldir.⁴³⁻⁴⁵

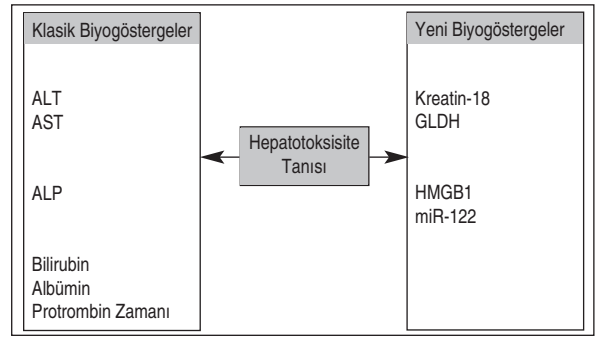
İLAÇLARIN NEDEN OLDUĞU KARACİĞER HASARININ TANISINDA KULLANILAN BİYOGÖSTERGELER

GÜNÜMÜZDE KULLANILAN BİYOGÖSTERGELER

Günümüzde İNOKH'nin değerlendirilmesi amacıyla klinikte kullanılacak oldukça az sayıda kan testi bulunmaktadır. Serumdaki total bilirubin konsant-

rasyonu (TBL), serumda ALP, ALT ve aspartat aminotransferaz (AST) aktivitesi, tanıda kullanılan klasik biyogöstergelelerdir.²⁷ Bu enzim aktivitelerindeki artış, hepatositlerde veya biliyer hücrelerindeki hasarı belirlerken; TBL konsantrasyonundaki artış karaciğer fonksiyonlarındaki azalmayı gösterir.⁴⁶ ALT aktivitesinin tayini, İNOKH'nin belirlenmesinde kullanılan ana tarama testidir, ancak bu test ile ilgili bazı sorunlar bulunmaktadır. Öncelikle enzim düzeyindeki değişme, ilaca bağlı hasara özgül değildir; viral hepatit, yağlı karaciğer hastalığı ve karaciğer kanseri gibi bazı hastalıklarda da artış gözlenir.⁴⁷ Diğer taraftan ALT aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan metotlar standardize değildir ve normal kabul edilecek değerler konusunda tartışmalar bulunmaktadır. Bu değerler popülasyona göre değişmekte ve ölçümde laboratuvarlar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Genel olarak, karaciğer hasarı oluştuğunda, hasarın tespitinde ALT duyarlı bir yöntem olarak kabul edilse de, ALT aktivitesinin prognostik değeri çok azdır, çünkü ancak karaciğer hasarı oluşuktan sonra enzim düzeyi yükselmektedir.⁴

Aminotransferaz düzeylerindeki artışlar da sadece İNOKH'ye özgül olmayabilir, çünkü dolaşımdaki AST ve ALT düzeylerinin artışı miyokard hasarı, kas hasarı ve çok yoğun egzersiz sonucunda da gözlenmektedir. ALP'deki artış da sadece biliyer hasara özgül değildir; hipertiroid ve kemik hastalıklarında da ortaya çıkabilir.⁴ Bütün bunlar göz önüne alındığında, günümüzde İNOKH'yi belirleyebilecek, duyarlı ve özgül bir biyogösterge yoktur. Yeni ilaç geliştirilmesinde hepatotoksiteyi doğru olarak öngörebilmek, İNOKH'yi erken teşhis ederek tedavi stratejileri geliştirebilmek ve ayrıca ilaçların karaciğer hasarına neden olan temel mekanizmalarını anlayabilmek açısından, yeni biyogöstergelelerin tanımlanmasına acilen gereksinim duyulmaktadır. Bu konuda Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çeşitli merkezlerde çalışmalar yapılmaktadır.⁴⁸ Özellikle kabul gören düşünce, yeni biyogöstergelelerin, hâlen kullanılanların yerini almaktan ziyade, bunları tamamlayarak, İNOKH'nin tanısına yardımcı olmasıdır (Şekil 1). Yeni geliştirilecek biyogöstergelelerin, hâlen kullanılan klasik biyogöstergeleler ile birlikte kullanılması, İNOKH tanısının daha doğru ve duyarlı biçimde yapılmasını sağlayacaktır.



ŞEKİL 1: İNOKH'nin tanısında, yeni geliştirilecek biyogöstergelelerin, hâlen kullanılan klasik biyogöstergeleler ile birlikte kullanımı.

GELİŞTİRİLMEME ÇALIŞILAN BİYOGÖSTERGELER

Günümüzde, İNOKH'de biyogösterge olarak kullanılması en fazla önerilen keratin-18 (K18), sitokrom C, glutamat dehidrogenaz (GLDH), yüksek mobiliteli B1 protein grubu [High-mobility group protein B1, (HMGB1)], malat dehidrogenaz (MDH), pürin nükleozid fosforilaz (PNP) ve sorbitol dehidrogenaz (SDH) gibi moleküler proteinlerdir. Bu proteinler yapısal olarak eksprese edilirler ve hepatosit ölümü gerçekleştiğinde pasif olarak dolaşıma salınırlar. Bu proteinlerin kanda yüksek oranda olması, hepatositlerin ölüm mekanizması olarak nekrozu destekler.⁴⁹

K18; epitelyal hücrelerden açığa çıkan ve hücre yapısı ve bütünlüğünden sorumlu bir ara filament proteindir.⁵⁰ Tam uzunlukta K18 pasif olarak nekrotik hücre ölümü esnasında, parçalı K18 ise apoptozda salınır.⁵¹ Klinikte ilaca bağlı karaciğer hasarında ve akut karaciğer yetmezliğinde K18'in prognostik kullanımı gösterilmiştir.^{52,53} APAP aşırı dozunu takiben akut karaciğer hasarı gelişen hastalarda, nekrotik K18'in yükselişi kötü prognoz ve sonuç ile ilişkiliyken, apoptotik K18'in yükselişi ise hayatta kalma şansının artışı ile ilişkilidir. APAP aşırı dozunun verilmesini takiben kan örnekleri alınıp, günümüzde kullanılan hepatotoksite göstergeleri normal aralıkta çıkan, antidot tedavisi bile başlanmayan ancak daha sonra karaciğer hasarı gelişen bir grup hastada, K18 ve ayrıca mikroRNA-122 ve HMGB1 düzeyinin artmış olduğu gözlenmiştir.⁵⁴ Bununla birlikte, K18, mikroRNA-122 ve HMGB1 değerlerinin, ALT aktivitesi pik değeri ve Uluslararası Normalleştirilmiş Oran (INR)

pik değeri ile uyumlu olduğu gösterilmiştir.⁴ Bu bilgi, K18, HMGB1 ve mikroRNA-122 göstergelerinin önceden ölçülebilmesi söz konusu olduğunda, APAP aşırı dozu nedeniyle oluşan ve hayatı tehdit eden karaciğer hasarından kurtulmanın mümkün olabileceğini göstermesi açısından da değerlidir. Bununla birlikte, K18'deki mutasyonların, akut karaciğer hasarı ve hepatotoksisteye yakınlıkla ilişkili olduğu da gösterilmiştir.^{55,56}

GLDH; karaciğer mitokondrisinde matriksçe zengin bölgede bulunur. Beyin ve böbreklerde de bulunmakta ancak bu dokulardan salınan GLDH kan yerine sırasıyla beyin omurilik sıvısına ve tübüler lümenine geçmektedir.^{57,58} GLDH mitokondriyal matrikste yer aldığından ve büyük boyutlu (330 kDa) olduğundan, aminotransferazlar gibi diğer sitozolik enzimlere kıyasla, hepatik nekrozda dolaşıma salınması gecikir.⁴ Bu da hepatoselüler nekrozun gösterilmesinde, GLDH'nin özgüllüğünü arttırmaktadır. Çoklu karaciğer hasarına maruz bırakılan sıçanlarda yapılan bir çalışmada, GLDH artışının ALT artışına oranla 10 kez fazla ve üç kat daha kalıcı olduğu gösterilmiştir.⁵⁹ Ancak heparin ve kolestimamin verilen sağlıklı gönüllülerde, bu tedavilerin karaciğer hasarı ile ilişkisi olmamasına rağmen, kanda dolaşan GLDH düzeyinin artışı da görülmüştür.⁴ Bu nedenle, sadece GLDH ölçümünün, benign durumlar ile İNOKH'yi ayırt etme açısından yararlı olmadığı düşünülmektedir.

HMGB1; nekroza uğrayacak hücrelerce pasif olarak salınan, kromatin bağlayıcı bir proteindir. Klinikte ve APAP zehirlenmesinin klinik öncesi modellerinde hücre ölümü olaylarının erken göstergesi olduğu bildirilmiştir.^{54,60,61} APAP aşırı dozunu takiben akut karaciğer hasarı gelişen hastalarda, serum total HMGB1 düzeyleri ALT aktivitesi ve protrombin zamanı ile ilişki gösterir. APAP'ın aşırı doz alınması sonucu akut karaciğer hasarı gelişen hastalarda, artmış HMGB1 düzeyi kötü prognoz ve sonuç ile ilişkilidir.⁵² Ancak heparin verilen sağlıklı gönüllülerde, serum HMGB1 düzeyleri ve sonrasında asetillenmiş HMGB1 düzeyleri artmıştır; bu nedenle tek başına HMGB1 ölçümünün potansiyel karaciğer hasarını belirlemede güvenilir olmadığı ve ileri araştırmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.⁶²

MikroRNAlar (miRNA)'lar; küçük (yaklaşık 22-25 nükleotitden oluşan), düzenleyici ve kodlamayan RNA'lardır. Başlıca mRNA stabilitesinde ve protein translasyonunun başlangıç ve devamında etkilidirler.^{63,64} miRNA'ların biyolojik fonksiyonu henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da spesifik miRNA'ların doku düzeyleri ile kanser türleri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.^{65,66} Son zamanlarda, kandaki miRNA'ların kanserin tespitinde biyogösterge olarak kullanılabilmesi de öne sürülmektedir.^{67,68} MikroRNA-122 (miR-122) total hepatik miRNA içeriğinin %75'ini oluşturur. Farelerde APAP ile indüklenen akut karaciğer hasarında, miR-122'nin serum biyogöstergesi olarak zaman ve doza hassasiyetinin ALT'den daha yüksek olduğu gösterilmiştir.⁶⁹ Bu bilgi, kas hasarına bağlı olarak, ALT seviyesi yükselirken, miR-122'de yükselme gözlenmemiş olması ile de desteklenmektedir.⁷⁰ Farelerde olduğu gibi, insanda da APAP aşırı dozunu takiben kanda miR-122 düzeyinin arttığı ve bunun akut karaciğer hasarı olan hastalarda serum ALT düzeyleri ile uyumlu olduğu gösterilmiştir.⁴ Hatta miR-122'nin APAP hepatotoksitesini belirlemede şu anda kullanılan biyogöstergelerden daha duyarlı olduğu da söylenmektedir.^{4,54} Ancak miR-122'nin klinikte güvenle kullanılabilmesi için, standartlarının belirlenmesi ve miRNA izolasyonu ve kantitasyonu için valide edilmiş metotların geliştirilmesi gerekmektedir.⁷¹

İNOKH gelişmiş hastaların genetik analizlerini yaparak risk faktörlerini belirlemek ve buradan hareketle genomik biyogöstergeler geliştirmek de üzerinde çalışılan bir başka önemli konudur. Konuyla ilgili çeşitli veri tabanlarına kayıtlı hasta örneklerinin retrospektif analizi, biyogösterge bilgilerinin incelenmesi ve genomik DNA elde edilmesi ile bu strateji uygulanmaktadır. Günümüzde çalışmalar, ilaç metabolizması ve taşınımı, hücrel stres cevabı, adaptif ve doğal bağışıklık ile ilişkili genlerdeki varyasyonların, ilaçların neden olduğu karaciğer hasarına yakınlıkta etkili olduğunu göstermektedir.⁷² İNOKH'nin, genetik yakınlıktan etkilendiği belirlenmiş olsa da, bir tek flukloksasilin ile HLA-B*5701 arasındaki kuvvetli ilişki dışında, hepatotoksisteye riskini artıran belirli bir haplotipin odd oranı düşük bulunmuştur.⁷³

HLA ile ilgili varyasyonlara ek olarak, ilaç metabolizması ve taşınmasında görevli proteinler de İNOKH'de etkilidir. Örneğin; etnik kökene bağlı olabilen CYP2E1 ve N-asetil transferaz2'nin izoeniyazid ile ilişkili hepatotoksisite riskinde etkili olduğu gösterilmiştir.⁷⁴ Diklofenaktan reaktif metabolit oluşumundan sorumlu enzimlerdeki (UGT2B7 ve CYP2C8) ve safra itrah taşıyıcısı MRP2'deki polimorfizmler de diklofenak ile ilişkili hepatotoksisitede risk faktörleri olarak belirlenmiştir.⁷⁵

Günümüzde İNOKH'nin tespitinde kullanılabilen bir diğer test ise lenfosit proliferasyon testidir. İNOKH gelişmiş hastalar veya bu nedenle tedavi görmüş ve iyileşmiş hastalardan alınan kan örnekleri, şüpheli ilaca ex-vivo maruz bırakıldığında, lenfositlerde aktivasyon ve proliferasyon görülmektedir.⁷⁶ Bu lenfosit transformasyonu, çeşitli yollarla ölçülebilmektedir.⁷⁷ Japonya'da, bu test sorumlu ilacın belirlenmesinde ve ilaca bağlı hepatotoksisitenin tanısında yardımcı olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. 1977 ile 2006 yılları arasında Japonya'da görülen, ilacın neden olduğu 1676 karaciğer hasarı olgusunun %60'ına bu testin uygulandığı ve %33'ünde pozitif sonuç elde edildiği bildirilmiştir.⁷⁸

İLAÇLARIN NEDEN OLDUĞU KARACİĞER HASARININ OLASI SONUÇLARI VE TEDAVİSİ

İlaç kullanımının erken sonlandırılması, ilaca bağlı hepatotoksisitenin başlıca tedavisidir. Şüpheli ilaç kullanımının durdurulmasından sonra ALT düzeyleri birkaç hafta içinde yavaş yavaş düşer, serum enzimlerindeki yükselmenin birkaç ay devam etmesi nadir görülen bir durumdur.² APAP toksisitesi için N-asetilsistein ve kolestatik karaciğer hasarı için ursodeoksikolik asit gibi bu alanda kullanılabilir çok az sayıda antidot bulunmaktadır.^{79,80} Ağır hepatik reaksiyonları olan hastalar için, kısa süre yüksek doz kortikosteroid tedavisi de faydalı olabilir.⁴⁰ İNOKH gelişen vakalarının çoğu, ilaç kullanımının kesilmesinden bir ila üç ay sonra tamamen iyileşmektedir.²⁶ Kalıcı karaciğer hasarı-

nın var olup olmadığı ise ilaç kullanımının kesilmesinden 6-12 ay sonra tanımlanabilir. Ancak bu vakaların büyük bir kısmı kronik veya devam eden karaciğer hasarından ziyade yavaş iyileşme eğilimi göstermektedir.⁸¹ Akut karaciğer yetmezliği, siroz ve kaybolan safra kanalı sendromu [Vanishing bile duct syndrome (VBDS)] ilaçlara bağlı hepatotoksisitenin neden olabileceği en ciddi sonuçlardır. VBDS, genellikle ağır, akut kolestatik karaciğer hasarından sonra ortaya çıkar ve kalıcı sarılık, yüksek serum ALP düzeyleri, kaşıntı ve hiperlipidemi ile birlikte seyreder.²⁶ Sonuçta İNOKH gelişen vakaların çoğu tamamen iyileşirken bazıları, özellikle hepatoselüler sarılık ile birlikte akut karaciğer yetmezliği olan vakalar, kronik karaciğer yetmezliğine dönüşür. Bu durumda hastanın yaşama ve iyileşme şansını artırmak için karaciğer transplantasyonu yapılması gereklidir, aksi takdirde hastalık ölümleneticelenir.^{26,82,83}

SONUÇ

İNOKH, multiselüler ve çoklu mekanizmalı, karmaşık bir hastalıktır. Karaciğer transplantasyonu gerektiren akut karaciğer yetmezliği, siroz gibi ciddi klinik tablolara neden olabilir. Günümüzde ilaçların neden olduğu hepatotoksisiteyi tespit edecek duyarlı ve özgül biyogöstergeler mevcut değildir. Üstelik hâlen kullanılan testlerde görülen değişken sonuçlar, gelecekte karaciğer hasarı için uyarıcı olmaz, sadece meydana gelmiş hasarı gösterir. Bu nedenle ilaca bağlı karaciğer hasarını doğru olarak tespit edebilecek yeni biyogösterlerin geliştirilmesine hem ilaç geliştirme çalışmaları hem de bu tip karaciğer hasarının mekanizmasının açıklığa kavuşturulması ve tedavisi açısından gerek duyulmaktadır. İNOKH riskini azaltmak için yaşlılar, kronik hastalığı olanlar, insan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV) taşıyan hastalar ve çoklu ilaç kullanan kişilerde ilaçlar reçetelenirken dikkatli olunmalıdır. Ayrıca İNOKH klasik biyogöstergeler ile değerlendirilirken, tek biyogösterge yerine bunların bileşimlerinin kullanılması ve karaciğerdeki fonksiyon kaybının da göz önüne alınması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Ghabril M, Chalasani N, Björnsson E. Drug-induced liver injury: a clinical update. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26(3):222-6.
- Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *J Clin Pathol* 2009;62(6):481-92.
- Watkins PB, Seeff LB. Drug-induced liver injury: summary of a single topic clinical research conference. *Hepatology* 2006;43(3):618-31.
- Antoine DJ, Harrill AH, Watkins PB, Park BK. Safety biomarkers for drug-induced liver injury -current status and future perspectives. *Toxicology Research* 2014;3(2): 75-85.
- Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, Williams DP. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:177-202.
- Park BK, Lavery H, Srivastava A, Antoine DJ, Naisbitt D, Williams DP. Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity. *Chem Biol Interact* 2011;192(1-2):30-6.
- Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003;349(5):474-85.
- Sgro C, Clinard F, Ouazir K, Chanay H, Allard C, Guilleminet C, et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology* 2002;36(2):451-5.
- Meier Y, Cavallaro M, Roos M, Pauli-Magnus C, Folkers G, Meier PJ, et al. Incidence of drug-induced liver injury in medical inpatients. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61(2):135-43.
- Holt MP, Ju C. Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J* 2006;8(1):E48-54.
- Temple RJ, Himmel MH. Safety of newly approved drugs: implications for prescribing. *JAMA* 2002;287(17):2273-5.
- Zimmerman HJ. Drug-Induced Liver Disease. *Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver*. 1st ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p.427-56.
- Hunter EB, Johnston PE, Tanner G, Pinson CW, Awad JA. Bromfenac (Duract)-associated hepatic failure requiring liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 1999;94(8): 2299-301.
- Kohroser J, Mathai J, Reichheld J, Banner BF, Bonkovsky HL. Hepatotoxicity due to troglitazone: report of two cases and review of adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *Am J Gastroenterol* 2000;95(1):272-6.
- Lasser KE, Allen PD, Woolhandler SJ, Himmelstein DU, Wolfe SM, Bor DH. Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications. *JAMA* 2002;287(17):2215-20.
- Thames G. Drug-induced liver injury: What you need to know. *Gastroenterology Nursing* 2004; 27(1):31-3.
- Lee WM, Squires RH Jr, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 2008;47(4):1401-15.
- Farmer AD, Brind A. Drug-induced liver injury. *Medicine* 2011;39(9):536-40.
- Andrade RJ, Agúndez JA, Lucena MI, Martínez C, Cueto R, García-Martín E. Pharmacogenomics in drug induced liver injury. *Curr Drug Metab* 2009;10(9):956-70.
- Liu ZX, Kaplowitz N. Immune-mediated drug-induced liver disease. *Clin Liver Dis* 2002; 6(3):755-74.
- Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1973;187(1): 185-94.
- Donnelly PJ, Walker RM, Racz WJ. Inhibition of mitochondrial respiration in vivo is an early event in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Arch Toxicol* 1994;68(2):110-8.
- Meyers LL, Beierschmitt WP, Khairallah EA, Cohen SD. Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988;93(3):378-87.
- Gunawan B, Kaplowitz N. Clinical perspectives on xenobiotic-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* 2004;36(2):301-12.
- Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4(6):489-99.
- Hoofnagle JH. Liver tox a website on drug-induced liver injury. In: Kaplowitz N, Laurie DD, eds. *Drug-Induced Liver Disease*. 3rd ed. London: Academic Press; 2013. p.725-32.
- Senior JR. 'Classic' biomarkers of liver injury. In: Goodsaid F, Mattes WB, eds. *The Path from Biomarker Discovery to Regulatory Qualification*. 3rd ed. Oxford: Academic Press; 2013. p.111-28.
- Teschke R, Schwarzenboeck A, Hennermann KH. Causality assessment in hepatotoxicity by drugs and dietary supplements. *Br J Clin Pharmacol* 2008;66(6):758-66.
- Li B, Wang Z, Fang JJ, Xu CY, Chen WX. Evaluation of prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *World J Gastroenterol* 2007;13(4):628-32.
- Chalasani N, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, Davern T, Serrano J, et al.; Drug Induced Liver Injury Network (DILIN). Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States. *Gastroenterology* 2008;135(6):1924-34, 1934.e1-4.
- Pauli-Magnus C, Meier PJ. Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis. *Hepatology* 2006;44(4):778-87.
- Verma S, Kaplowitz N. Diagnosis, management and prevention of drug-induced liver injury. *Gut* 2009;58(11):1555-64.
- Devarbhavi H. An update on drug-induced liver injury. *J Clin Exp Hepatol* 2012;2(3): 247-59.
- Sharma SK, Balamurugan A, Saha PK, Pandey RM, Mehra NK. Evaluation of clinical and immunogenetic risk factors for the development of hepatotoxicity during antituberculosis treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(7):916-9.
- Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomazic J, et al. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med* 2008;358(6):568-79.
- Alfirevic A, Park BK, Pirmohamed M, Naisbitt DJ. Explanation for HLA-B*57:01-linked immune-mediated abacavir-induced hypersensitivity. *Pharmacogenomics* 2012;13(14): 1567-9.
- Hautekeete ML, Horsmans Y, Van Waeyenberge C, Demanet C, Henrion J, Verbist L, et al. HLA association of amoxicillin-clavulanate-induced hepatitis. *Gastroenterology* 1999; 117(5):1181-6.
- Andrade RJ, Lucena MI, Alonso A, García-Cortes M, García-Ruiz E, Benitez R, et al. HLA class II genotype influences the type of liver injury in drug-induced idiosyncratic liver disease. *Hepatology* 2004;39(6):1603-12.
- Lucena MI, Molokhia M, Shen Y, Urban TJ, Aithal GP, Andrade RJ, et al.; Spanish DILI Registry; EUDRAGENE; DILIN; DILIGEN; International SAEC. Susceptibility to amoxicillin-clavulanate-induced liver injury is influenced by multiple HLA class I and II alleles. *Gastroenterology* 2011;141(1):338-47.
- Thanavaro JL. An overview of drug-induced liver injury. *J Nurse Pract* 2011;7(10): 819-26.
- Moggs J, Moulin P, Pognan F, Brees D, Leonard M, Busch S, et al. Investigative safety science as a competitive advantage for Pharma. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012;8(9):1071-82.
- Bessone F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage? *World J Gastroenterol* 2010;16(45): 5651-61.
- Watkins PB. Drug safety sciences and the bottleneck in drug development. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(6):788-90.
- Watkins PB, Desai M, Berkowitz SD, Peters G, Horsmans Y, Larrey D, et al. Evaluation of drug-induced serious hepatotoxicity (eDISH): application of this data organization approach to phase III clinical trials of rivaroxaban after total hip or knee replacement surgery. *Drug Saf* 2011;34(3):243-52.

45. Senior JR. Alanine aminotransferase: a clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92(3):332-9.
46. Antoine DJ, Mercer AE, Williams DP, Park BK. Mechanism-based bioanalysis and biomarkers for hepatic chemical stress. *Xenobiotica* 2009;39(8):565-77.
47. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 2008; 245(3):194-205.
48. Matheis K, Laurie D, Andriamandroso C, Arber N, Badimon L, Benain X, et al. A generic operational strategy to qualify translational safety biomarkers. *Drug Discov Today* 2011;16(13-14):600-8.
49. Watkins PB. Biomarkers for drug-induced liver injury. In: Kaplowitz N, Laurie DD, eds. *Drug-Induced Liver Disease*. 3rd ed London: Academic Press; 2013. p.275-86.
50. Ku NO, Strnad P, Zhong BH, Tao GZ, Omary MB. Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology* 2007;46(5):1639-49.
51. Schutte B, Henfling M, Kölgen W, Bouman M, Meex S, Leers MP, et al. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res* 2004;297(1):11-26.
52. Antoine DJ, Jenkins RE, Dear JW, Williams DP, McGill MR, Sharpe MR, et al. Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. *J Hepatol* 2012;56(5):1070-9.
53. Bechmann LP, Jochum C, Kocabayoglu P, Sowa JP, Kassalik M, Gieseler RK, et al. Cytokeratin 18-based modification of the MELD score improves prediction of spontaneous survival after acute liver injury. *J Hepatol* 2010;53(4):639-47.
54. Antoine DJ, Dear JW, Lewis PS, Platt V, Coyle J, Masson M, et al. Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology* 2013; 58(2):777-87.
55. Ku NO, Michie SA, Soetikno RM, Resurrection EZ, Broome RL, Oshima RG, et al. Susceptibility to hepatotoxicity in transgenic mice that express a dominant-negative human keratin 18 mutant. *J Clin Invest* 1996;98(4):1034-46.
56. Strnad P, Zhou Q, Hanada S, Lazzaroni LC, Zhong BH, So P, et al. Keratin variants predispose to acute liver failure and adverse outcome: race and ethnic associations. *Gastroenterology* 2010;139(3):828-35, 835.e1-3.
57. William V. Cerebrospinal fluid. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. San Diego: Academic Press; 1989. p.769-819.
58. Stonard MD. Assessment of nephrotoxicity. In: Evans GO, ed. *Animal Clinical Chemistry*. 2nd ed. London: Taylor & Francis; 2010. p.67-86.
59. O'Brien PJ, Slaughter MR, Polley SR, Kramer K. Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Lab Anim* 2002;36(3):313-21.
60. Antoine DJ, Williams DP, Kipar A, Jenkins RE, Regan SL, Sathish JG, et al. High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis in vivo. *Toxicol Sci* 2009;112(2):521-31.
61. Craig DG, Lee P, Pryde EA, Masterton GS, Hayes PC, Simpson KJ. Circulating apoptotic and necrotic cell death markers in patients with acute liver injury. *Liver Int* 2011;31(8): 1127-36.
62. Harrill AH, Roach J, Fier I, Eaddy JS, Kurtz CL, Antoine DJ, et al. The effects of heparins on the liver: application of mechanistic serum biomarkers in a randomized study in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92(2): 214-20.
63. Ruvkun G. The perfect storm of tiny RNAs. *Nat Med* 2008;14(10):1041-5.
64. Tang G, Tang X, Mendu V, Tang X, Jia X, Chen QJ, et al. The art of microRNA: various strategies leading to gene silencing via an ancient pathway. *Biochim Biophys Acta* 2008;1779(11):655-62.
65. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:199-227.
66. Dillhoff M, Wojcik SE, Bloomston M. MicroRNAs in solid tumors. *J Surg Res* 2009;154(2): 349-54.
67. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(30):10513-8.
68. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18(10): 997-1006.
69. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(11):4402-7.
70. Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, Guo H, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem* 2010; 56(12):1830-8.
71. Sharkey JW, Antoine DJ, Park BK. Validation of the isolation and quantification of kidney enriched miRNAs for use as biomarkers. *Biomarkers* 2012;17(3):231-9.
72. Urban TJ, Shen Y, Stolz A, Chalasani N, Fontana RJ, Rochon J, et al. Drug-Induced Liver Injury Network; DILIGEN; EUDRAGENE; Spanish DILI Registry; International Serious Adverse Events Consortium. Limited contribution of common genetic variants to risk for liver injury due to a variety of drugs. *Pharmacogenet Genomics* 2012;22(11):784-95.
73. Daly AK, Donaldson PT, Bhatnagar P, Shen Y, Pe'er I, Floratos A, et al. DILIGEN Study; International SAE Consortium. HLA-B*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. *Nat Genet* 2009;41(7):816-9.
74. Cai Y, Yi J, Zhou C, Shen X. Pharmacogenetic study of drug-metabolising enzyme polymorphisms on the risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *PLoS One* 2012;7(10):e47769.
75. Daly AK, Aithal GP, Leathart JB, Swainsbury RA, Dang TS, Day CP. Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCB2 genotypes. *Gastroenterology* 2007;132(1): 272-81.
76. Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2004;59(8):809-20.
77. Merk HF. Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines. *Toxicology* 2005;209(2):217-20.
78. Takikawa H, Murata Y, Horiike N, Fukui H, Onji M. Drug-induced liver injury in Japan: An analysis of 1676 cases between 1997 and 2006. *Hepatol Res* 2009;39(5):427-31.
79. Makin AJ, Wendon J, Williams R. A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity (1987-1993). *Gastroenterology* 1995;109(6):1907-16.
80. Spagnuolo MI, Iorio R, Vegnente A, Guarino A. Ursodeoxycholic acid for treatment of cholestasis in children on long-term total parenteral nutrition: a pilot study. *Gastroenterology* 1996;111(3):716-9.
81. Andrade RJ, Lucena MI, Kaplowitz N, García-Muñoz B, Borraz Y, Pachkoria K, et al. Outcome of acute idiosyncratic drug-induced liver injury: Long-term follow-up in a hepatotoxicity registry. *Hepatology* 2006;44(6):1581-8.
82. Reuben A, Koch DG, Lee WM; Acute Liver Failure Study Group. Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology* 2010;52(6):2065-76.
83. Andrade RJ, Lucena MI, Fernández MC, Pelaez G, Pachkoria K, García-Ruiz E, et al.; Spanish Group for the Study of Drug-Induced Liver Disease. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology* 2005;129(2):512-21.