



**ASETAMİNOFENE BAĞLI HEPATOTOKSİSİTESİNİN
ÖNLENMESİNDE CoQ10 VE MELATONİN ETKİSİ:
DENEYSEL ÇALIŞMA**

Osman AKAMAN

**TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI DENEYSEL PATOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nusret AKPOLAT**

Yüksek Lisans Tezi – 2018

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASETAMİNOFENE BAĞLI
HEPATOTOKSİSİTESİNİN ÖNLENMESİNDE
CoQ10 VE MELATONİN ETKİSİ: DENEYSEL
ÇALIŞMA**

Osman AKAMAN

**TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI
DENEYSEL PATOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nusret AKPOLAT**

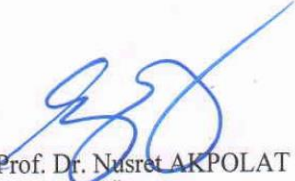
Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi Tarafından 2016/138
Proje numarası ile desteklenmiştir.


**MALATYA
2018**


KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Deneysel Patoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Osman AKAMAN**'ın "**Asetaminofene Bağlı Hepatotoksisitesinin Önlenmesinde CoQ10 ve Melatonin Etkisi: Deneysel Çalışma**" konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29/05/2018


Prof. Dr. Nusret AKPOLAT
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Hüseyin BÜYÜKBAYRAM
Dicle Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Hasan GÖKÇE
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

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

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-------------|
| ÖZET | vi |
| ABSTRACT | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| TABLolar DİZİNİ | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Karaciğer Histolojisi | 4 |
| 2.2. Asetaminofen | 6 |
| 2.2.1. Asetaminofenin Metabolizması | 7 |
| 2.2.2. Asetaminofenin Farmakokinetik Özellikleri | 7 |
| 2.2.3. Asetaminofenin Endikasyonları | 8 |
| 2.2.4. Asetaminofenin Ateş Düşürücü ve Ağrı Kesici Etkisi | 8 |
| 2.2.5. Asetaminofenin Yan Etkileri | 8 |
| 2.2.6. Asetaminofenin Doz Kullanım Bilgileri..... | 8 |
| 2.2.7. Asetaminofen Toksisitesi | 9 |
| 2.3. Melatonin | 9 |
| 2.3.1. Melatonin Sentezi | 10 |
| 2.3.2. Melatonin Farmakokinetiği | 10 |
| 2.3.3. Melatonin Antioksidan Etkileri | 11 |
| 2.4. Koenzim Q10.. | 11 |
| 2.4.1. Koenzim Q10'un Farmakokinetiği | 13 |
| 2.5. Nitrik Oksit..... | 13 |
| 2.6. Reaktif Oksijen Türevleri ve Oksidatif Hasar Mekanizması | 15 |
| 2.7. Antioksidan Savunma Sistemi | 16 |
| 2.7.1 Hücre Dışı (İn Vivo) Ortamda Antioksidan Savunma | 16 |
| 2.8. Hücre Hasarı: Nekroz ve Apoptoz Mekanizmaları | 17 |
| 3. MATERYAL VE METOT | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1. Materyal | 23 |
| 3.1.1. Deney Hayvanları | 23 |
| 3.1.2. Deneyde Kullanılan İlaçlar | 23 |
| 3.1.3. Serum ALT ve AST Çalışması İçin Kullanılan Kit ve Cihazlar | 23 |
| 3.1.4. Serum Nitrik Oksit Analizi İçin Kullanılan Kit ve Cihazlar: | 23 |
| 3.1.5. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Çalışmalar için Kullanılan Kit ve Cihazlar:..... | 24 |
| 3.2. Metot | 24 |
| 3.2.1. Deney Çalışma Planı | 24 |
| 3.2.2. Histopatolojik Çalışmalar | 25 |
| 3.2.3. İmmünohistokimyasal Çalışmalar | 25 |
| 3.2.4. Biyokimyasal Analiz | 26 |
| 3.2.5. Nitrik Oksit Analizi | 26 |
| 3.2.6. İstatiksel Analiz | 27 |
| 4. BULGULAR | 28 |
| 4.1. Histomorfolojik Bulgular | 28 |
| 4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular | 33 |
| 4.3. Biyokimyasal ve ELISA Analiz Bulguları | 39 |
| 5. TARTIŞMA | 40 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 45 |
| KAYNAKLAR | 46 |
| EKLER..... | 51 |
| EK-1. ÖZGEÇMİŞ | 51 |
| EK-2. Etik Kurul Onayı | 52 |

TEŐEKKÜR

Öncelikle beni Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Deneysel Patoloji yüksek lisans programına kabul eden, eğitimim boyunca ve tezimin bütün aşamasında desteklerini, bilgisini ve zamanını esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nusret AKPOLAT'a, ders dönemim boyunca zamanlarını ayıran değerli hocalarım Doç. Dr. Hasan GÖKÇE, Yrd. Doç. Dr. Ayşe Nur AKATLI, Yrd. Doç. Dr. Nurhan ŞAHİN'e, deney aşamasında bana yardımcı olan Turgut Özal Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlara, Tıbbi Biyokimya Bölümünde çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. M. Çağatay TAŐKAPAN ve Arş.Gör. H.Gül OTLU'ya, istatistik analizlerde yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Ömer SATICI'ya, çok değerli dostum kardeşim Dr.Servet ALTANA'a, İnönü Üniversitesi Projeleri Birimi tarafından 2016/138 proje numarası ile desteklerinden dolayı ve hayatım boyunca bana destek olan sevgili annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Asetaminofene Bağlı Hepatotoksisitesinin Önlenmesinde CoQ10 ve Melatonin Etkisi: Deneysel Çalışma

Amaç: Mevcut çalışmanın amacı: Asetaminofen (APAP) hepatotoksisitenin önlenmesinde koenzim Q10 (CoQ10) ve melatonin (MLT) etkisini araştırmayı amaçladık. Hepatotoksisite oluşan olgularda bu maddelerin antioksidan etkilerinin tedavide kullanılıp kullanılmayacakları ve koruyucu etkilerinin olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılacaktır. Ayrıca hepatotoksisitenin oluşum mekanizmalarında apoptozisin rolü değerlendirilecektir.

Materyal ve Metot: Her grupta 10'ar tane olmak üzere *Sprague Dawley* (N=40) cinsi rat kullanılmıştır. Grup I (Kontrol grubu), Grup II (Asetaminofen grubu), Grup III (Asetaminofen-Koenzim Q10 grubu), Grup IV (Asetaminofen-Melatonin grubu) şeklinde gruplara ayrılmıştır. Asetaminofen tek doz oral yoldan (1gr/kg) verildi. Asetaminofen verildikten 30 dk sonra melatonin (10 mg/kg) intraperitoneal uygulandı. Asetaminofen verildikten 30 dk sonra koenzim Q10 (10 mg/kg) intraperitoneal uygulandı. Histopatolojik parametreler ışık mikroskobunda semi-kantitatif olarak skorlandı. İmmünohistokimyasal (İHK) çalışmada her olguya ait preparatlarda caspase3 ve Bax antikoları için sitoplazmik boyanma esas alındı. Serum ALT ve AST ölçümü tam otomatik biyokimya cihazında yapıldı. Serum nitrik oksit düzeyi ELISA yöntemiyle çalışıldı.

Bulgular: Histopatolojik parametrelerde, İHK, biyokimyasal serum ALT ve AST çalışması sonrasında kontrol grubuyla asetaminofen verilen grup arasında anlamlı farklılıklar vardı. Gruplar arası serum NO düzeylerinde bir fark yoktu. Ayrıca serum NO ortalamaları birbirine yakın ve istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Koenzim Q10 ve melatonin verilen grup ile karşılaştırıldığında melatonin tedavi edici etkisi daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$).

Sonuç: Yüksek dozda asetaminofen karaciğerde sentrolobüler nekroza neden olmaktadır. Hepatotoksisite reversible olup tedaviye yanıt vermektedir. Melatonin verilen grup ile koenzim Q10 verilen grup karşılaştırıldığında melatonin koruyucu ve tedavi edici etkisi daha belirgindir.

Anahtar Kelimeler: Asetaminofen, hepatotoksisite, sentrolobüler nekroz, koenzim Q10, melatonin

ABSTRACT

The effect of CoQ10 and Melatonin for Prevention Hepatotoxicity Induced by Asetaminophen: An Study Experimental

Aim: With this study we aimed to the effect of coenzyme Q10 and melatonin for Prevention hepatotoxicity induced by asetaminophen. In cases of hepatotoxicity, antioxidant effects of these substances should be tried and used to determine whether they can be used therapeutically and whether they have protective effects. In addition, the role of apoptosis in the mechanisms of hepatotoxicity will be evaluated.

Material and method: The groups consisted of: In each group there were 10 *Sprague Dawley* rats (N=40). Group I (Control group), Group II (Acetaminophen group), Group III (Asetaminophen-Coenzyme Q10) and Group IV (Asetaminophen-Melatonin). Acetaminophen was single doze oral administration (1gr/kg). Melatonin treatment was given as intraperitoneal injections, 10 mg/kg each, at 30 minutes following acetaminophen administration. Coenzyme Q10 treatment was given as intraperitoneal injections, 10 mg/kg each, at 30 minutes following acetaminophen administration. The histopathological parameters were scored semi-quantitative using light microscope. For every slides related to each case in immunohistochemical (IHC) studies caspase3 and Bax antibody were used to cytoplasmic staining. The semi-quantitative scoring was done with 20 objective microscope. The ALT/AST measurement in blood serum was conducted with full-automatic biochemistr analyzer. The nitric oxide in blood serum was analyzed with ELISA method.

Results: There were significant differences between the groups, control group and the group with acetaminophen in histopathologic parameters, IHC, biochemical serum levels of ALT and AST studies. There was no difference between serum NO of the groups. Besides, the mean of serum NO of groups were close and it was not found to be statistically significant ($p>0,05$). When groups with coenzyme Q10 and melatonin was compared, melatonin was found to have statistically significant impact on healing ($p<0,05$).

Conclusion: Over doze of acetaminophen causes centrilobular necrosis. Heptatotoxicity was reversible and responded to treatment. When groups with melatonin and coenzyme Q10 were compared, melatonin was found to be protective and have more healing effects.

Key words: Acetaminophen, hepatotoxicity, centrilobular necrosis, coenzyme Q10, melatonin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------|--|
| AFMK | : N-asetil-N-formil-5-metoksi knüramin |
| ALT | : Alanin Transaminaz |
| APAP | : Asetaminofen |
| AST | : Aspartat Transaminaz |
| Ca | : Kalsiyum |
| eNOS | : Yapısal Nitrik Oksit Sentaz |
| CoQ10 | : Koenzim Q10 |
| COX | : Siklooksijenaz |
| CYP | : Sitokrom |
| eNOS | : Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz |
| FasL | : Fas Ligandı |
| GSH | : Glutasyon |
| GSHPx | : Glutasyon Peroksidaz |
| H.E. | : Hemotoksilen Eosin |
| HIOMT | : Hidroksiindol-o-metiltransferaz |
| IL | : İnterlökin |
| iNOS | : İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz |
| İHK | : İmmünohistokimya |
| KC | : Karaciğer |
| MLT | : Melatonin |
| MSS | : Merkezi Sinir Sistemi |
| NAC | : N-Asetil Sistein |
| NAPQI | : N-asetil-p-benzokinin imin |
| NAT | : N-asetiltransferaz |
| nNOS | : Nöronal Nitrik Oksit Sentaz |
| NO | : Nitrik Oksit |
| NSAİİ | : Non-steroidal Antiinflamatuvar İlaç |

| | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| OH | : Hidroksil Radikali |
| PGI | : Prostaglandin |
| ROT | : Reaktif Oksijen Türevleri |
| SOD | : Süperoksid Dizmutaz |
| TNF-α | : Tümör Nekroz Faktör Alfa |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil No | | Sayfa No |
|-----------------|---|-----------------|
| Şekil 2.1. | Karaciğer histolojisi..... | 5 |
| Şekil 2.2. | Asetaminofenin kimyasal yapısı..... | 6 |
| Şekil 2.3. | Asetaminofenin metabolizması..... | 7 |
| Şekil 2.4. | Melatonin Kimyasal Yapısı..... | 10 |
| Şekil 2.5. | Koenzim Q10 kimyasal yapısı..... | 12 |
| Şekil 2.6. | Koenzim Q10'un ATP sentezindeki rolü..... | 12 |
| Şekil 2.7. | Apoptozun mekanizması..... | 21 |
| Şekil 4.1. | Normal Karaciğer Histolojisi (<i>Kontrol grubu</i> , HE, x100)..... | 30 |
| Şekil 4.2. | Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sentrolobüler nekroz, vasküler konjesyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (<i>Asetaminofen grubu</i> , HE, x100)..... | 30 |
| Şekil 4.3. | Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede vasküler konjesyon, hepatositlerde hidropik dejenerasyonu ve konfluent nekroz (<i>Asetaminofen grubu</i> , HE, x200)..... | 31 |
| Şekil 4.4. | Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sentrolobüler nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatositlerde hidropik dejenerasyonu ve vasküler konjesyon (<i>Koenzim Q10 grubu</i> , HE, x200)..... | 31 |
| Şekil 4.5. | Sentrolobüler bölgede orta derecede hepatositlerde hidropik dejenerasyonu (<i>Melatonin grubu</i> , HE, x200)..... | 32 |
| Şekil 4.6. | Sentrolobüler bölgede orta derecede vasküler konjesyon (<i>Melatonin grubu</i> , HE, x200)..... | 32 |
| Şekil 4.7. | Sentrolobüler bölgede hafif derecede sitoplazmik caspase-3 boyanma (<i>Kontrol grubu</i> , İHK, x200)..... | 35 |
| Şekil 4.8. | Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sitoplazmik caspase-3 boyanma (<i>Asetaminofen grubu</i> , İHK, x200)..... | 35 |
| Şekil 4.9. | Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sitoplazmik caspase-3 boyanma (<i>Koenzim Q10 grubu</i> , İHK, x200)..... | 36 |
| Şekil 4.10. | Sentrolobüler bölgede hafif derecede sitoplazmik caspase-3 boyanma (<i>Melatonin grubu</i> , İHK, x200)..... | 36 |
| Şekil 4.11. | Sentrolobüler bölgede hafif derecede sitoplazmik Bax boyanma (<i>Kontrol grubu</i> , İHK, x200)..... | 37 |
| Şekil 4.12. | Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sitoplazmik Bax boyanma (<i>Asetaminofen grubu</i> , İHK, x200)..... | 37 |
| Şekil 4.13. | Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sitoplazmik Bax boyanma (<i>Koenzim Q10 grubu</i> , İHK, x200)..... | 38 |
| Şekil 4.14. | Sentrolobüler bölgede hafif derecede sitoplazmik Bax boyanma (<i>Melatonin grubu</i> , İHK, x200)..... | 38 |

TABLULAR DİZİNİ

| Tablo NO | | Sayfa No |
|-------------------|--|-----------------|
| Tablo 3.1. | İmmünohistokimya çalışmasında kullanılan antikorlar..... | 26 |
| Tablo 4.1. | Kontrol ve deney gruplarına ait histomorfolojik değişiklikler | 29 |
| Tablo 4.2. | Gruplar arasında histomorfolojik değişikliklerin Mann-Whitney U testine göre p değerleri..... | 29 |
| Tablo 4.3. | Kontrol ve deney gruplarına ait immünohistokimyasal boyanma..... | 34 |
| Tablo 4.4. | Kontrol ve deney grupları arasında immünohistokimyasal boyanmaların Mann-Whitney U testine göre p değerleri..... | 34 |
| Tablo 4.5. | Kontrol ve deney grupları arasında biyokimyasal bulguların Mann-Whitney U testine göre p değerleri..... | 40 |



1. GİRİŞ

Karaciğerin (KC) vücut için önemli bir yeri ve rolü vardır. Diyetle alınan aminoasitlerin, karbohidratların, lipidlerin ve vitaminlerin işlenmesini, splanknik kandan sistemik sirkülasyona giden mikropların ve toksinlerin atılmasını, birçok plazma protein sentezini, endojen atıkların ve zararlı ksenobiyotiklerin (yabancı maddelerin) detoksifikasyonunu ve safra ile atılmasını sağlayarak vücudun metabolik homeostazında görev alır (1). Karaciğer hasarının en sık nedenlerinden biri, ilaçlara bağlı oluşan toksisitedir. Bunun da nedeni birçok ilaç veya kimyasal ajan metabolizması için temel organ olmasıdır (2).

Asetaminofen (APAP; N-asetil-p-aminofenol), parasetamol olarak da bilinen ve tüm dünyada en yaygın olarak oral yoldan kullanılan analjezik ve antipiretikdir (3). Terapötik dozlarda kullanıldığında oldukça etkili ve güvenilir ancak yüksek dozlarda kullanıldığında deney hayvanları ve insanlarda hepatik nekroz, böbrek toksisitesi ve ölümle sonuçlandığı gösterilmiştir (4).

Asetaminofene bağlı toksisite mekanizmaları arasında, protein arilasyonu, oksidatif stres, kalsiyum dengesizliği, inflamasyonun başlamasına öncülük eden bir çok sinyal ve hücre ölüm yollarının aktivasyonu sayılmıştır (5).

APAP, karaciğer üzerindeki toksisitesi hepatik sitokrom P450 sistemi tarafından üretilen N-asetil-p- benzokinin imin (NAPQI) olan toksik metaboliti ile gösterir. Bu toksik metabolit antioksidan olan glutatyon (GSH) ile reaksiyona girerek etkisiz hale gelmektedir. Asetaminofenin aşırı doz alımı glutatyon (GSH) azalmasına yol açar ve bu durumda da GSH ortamdaki fazla NAPQI'ı bağlanamayacağından detoksifiye edilemez. Bu reaktif metabolit artışı hücresel makromoleküller ile özellikle mitokondriyal proteinlere kovalent olarak bağlanır ve sentrilobüler nekroza, karaciğer hasarı ve ölümle sonuçlanabilir (6). Günümüzde, GSH seviyesini yükselten ve karaciğer hasarı önlemede antidot olarak N- asetilsisteinin (NAC) kullanılmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, asetaminofene bağlı karaciğer hasarlanması NAPQI'nın doğrudan açığa çıkan etkilerine bağlanamaz. Bu çalışmalarda, bazı sitokinlerin ve nitrik oksidin (NO) de bu süreçte rol oynayabileceğine ilişkin veri de bulunmaktadır (7).

NO, otokrin ve parakrin bir hücrel moleköl olup normal fizyolojik koşullar ile birçok patofizyolojik durumda homeostazın sürdürülmesinde önemli bir etkidir. Nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla üretilen ve yüksek miktarda oksidan kapasiteye sahip bir bileşendir (8, 9). Karaciğerdeki NO'in etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, bu molekölün sitokrom P450'yi azalttığı, DNA sentezini baskıladığı, apoptozu ve nekrozu uyardığı gösterilmiştir (10, 11, 12). Öte yandan, NO'in karaciğer üzerinde koruyucu etkisi olduğu çalışmalar da bulunmaktadır (13). Bundan dolayı hastalık ve sonuçlarına ilişkin olarak NO'in zararlı veya yararlı etkileri gösterilebilir.

Melatonin (MLT), pineal bez, retina ve diğer vertebra dokular tarafından salgılanan bir indolamin aile üyesi olup, karanlık fazda en yüksek seviyesine ulaşır. Melatonin'in mevsimsel üreme kontrolü, termoregülasyon, enerji metabolizması, sirkadyen ritim düzenleme ve uyku kontrolü gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlar sergilediği gösterilmiştir. Melatonin (MLT) güçlü bir antioksidan olup serbest radikal oluşumunu engeller (14, 15).

Koenzim Q10 (CoQ10), yağda çözünen endojen benzokinon olup mitokondriyal solunum zincirinde elektron taşıyıcısı olarak fonksiyon görür. Ayrıca serbest radikal oluşumunu engelleyen güçlü bir antioksidandır. Hücrel membranda lipid peroksidasyonunu önler ve α -tokoferol rejenerasyonuna yardım eder. CoQ10, birçok modelde oksidatif ve inflamatuvar hasarda koruyucu etkisi gösterilmiştir (16).

Alanin aminotransferaz (ALT) ve Aspartat aminotransferaz (AST) karaciğer hücreleri olan hepatositlerinden salgılanmaktadır (17). ALT, hepatosit sitozolünde, AST ise mitokondriyada üretilmektedir (17).

Yapılan çalışmada, asetaminofen hepatotoksitesinde ALT ve AST düzeylerinin belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir (18).

Hücreler, nekroz veya apoptoz yoluyla en sonunda ölmektedirler. Nekroz; mekanik hasar, oksijen yokluğu, toksik maddeler etkisiyle hücrelerin gruplar halinde aynı anda ölmeleri ile sonuçlanan patolojik bir süreçtir. Apoptoz; komşu hücreler hasarlanmadan veya inflamasyona neden olmadan bireysel hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan normal ve fizyolojik bir süreçtir. Apoptozis çok sayıda ve çeşitli mediatör tarafından düzenlenir. Bu mediatörler BCL-2 aile üyeleridir. Bir kısmının apoptozu indüklediği (Bax, Bad, Bcl-Xs), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-XL) geniş bir ailedir.

Kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsür) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir (19).

Mevcut çalışmanın amacı: Asetaminofen (APAP) hepatotoksisitenin önlenmesinde koenzim Q10 (CoQ10) ve melatonin (MLT) etkisini araştırmayı amaçladık. Hepatotoksisite oluşan olgularda bu maddelerin antioksidan etkilerinin tedavide kullanılıp kullanılmayacakları ve koruyucu etkilerinin olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılacaktır. Ayrıca hepatotoksisitenin oluşum mekanizmalarında apoptozisin rolü değerlendirilecektir.

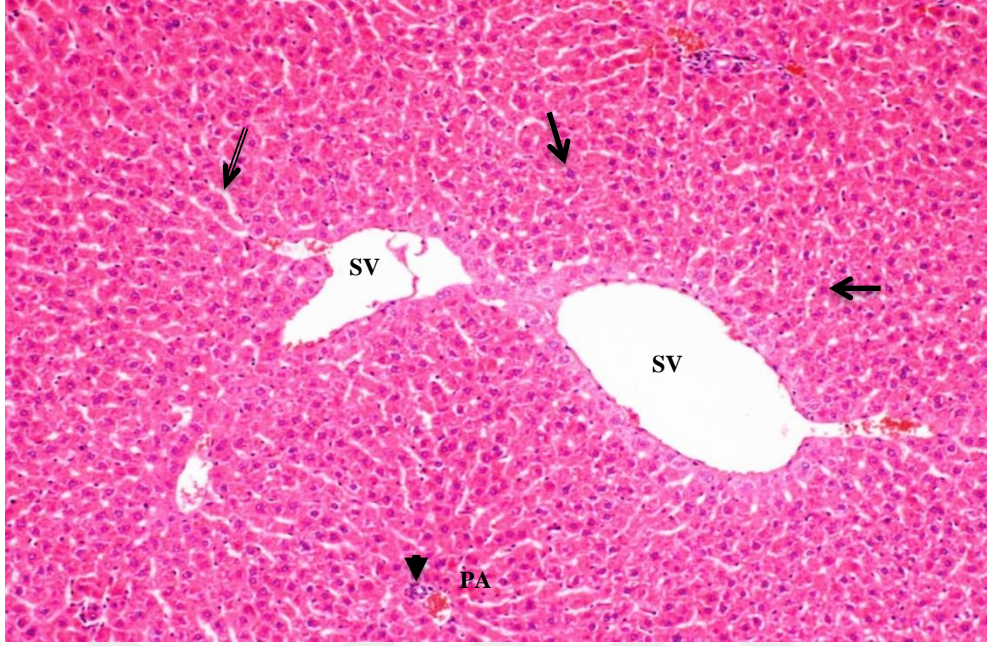


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer yetişkinlerde 1400-1600 gram ağırlığında olup vücut ağırlığının %2.5'ünü oluşturur. KC, ekzokrin ve endokrin sekresyon yapan önemli bir organdır. KC, gerektiğinde depoladığı maddeleri direkt kan dolaşımına salgıladığından dolayı endokrin bir organ olarak görev yapar. Ayrıca salgıladığı safrayı kanallar aracılığıyla duodenuma akıttığından dolayı da ekzokrin organ olarak görev yapmaktadır. KC, glisson kapsülü denilen fibröz bağ dokusu ile dıştan kuşatılmıştır. Glisson kapsülünden uzanan bağ dokusu uzantıları KC'yi lob ve lobüllere ayırır. Karaciğer lobülleri, KC'in yapısal ve fonksiyonel birimleridir. KC lobülü fonksiyonel olarak üç farklı şekilde tanımlanmıştır:

- **Klasik karaciğer lobülü:** En yaygın olarak kullanılan klasik tanımdır. Ortasında santral ven, periferde portal alanlarla sınırlı hegzagonal yapıdır. Bu yapı, santral venden başlayarak perifere radyal ve birbirlerine anastomozlaşarak ilerleyen hepatosit kordonlarını ve sinüzoid kapillerlerini içermektedir. Santral ven, kanı sinüzoidlerden alan bir damardır. Santral ven, hepatik ven, sublobuler ven yoluyla açılmaktadır. Lobüllerin köşelerinde (portal alanda), portal ven, hepatik arter, safra kanalı bulunmaktadır. Ayrıca lenf damarlarını ve sinirleri içeren bağ dokusundan oluşmaktadır (Şekil 1).



Şekil 2.1. Karaciğer histolojisi

SV: Santral ven, **PA:** Portal alan, **Oklar:** Hepatositler, **Ok başı:** safra kanalı, **Çift ok:** Sinüsoidler

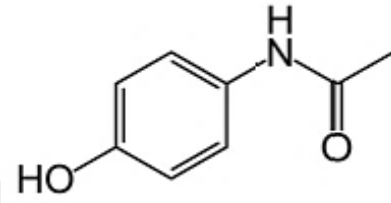
- **Portal lobül:** Üçgen şeklinde ve komşu üç santral ven arasında yer alan alanlardır. Portal alan üçgen şeklin tam orta kısımda bulunur. KC'in ekzokrin fonksiyonunu vurgulamak için bu tanımlama kullanılmıştır. Hepatositlerde üretilen safra, ekzokrin bir ürün olup, safra kanalikülleri ve safra kanalları yoluyla duodenuma akıtılır.

- **Karaciğer asinüsü:** Kısa eksen, iki portal alan ve uzun eksen iki santral ven arasında bulunan oval şeklindeki alandır. KC asinüsü üç zondan oluşur. Portal çevresine yakın alan zon 1, santral ven çevresi zon 3 ve her iki zon arasındaki alan ise zon 2 bölgesidir. Üçüncü zon bölgesindeki hücrelerin yerleşimleri beslenmelerini ve zararlı maddelere maruz kalma derecelerini etkiler. Ayrıca hücrelerin dejenerasyon ve rejenerasyon derecelerini önemli derecede etkilemektedir. İlk olarak birinci zon bölgesindeki hücreler, portal alandaki kan damarlarından besin maddelerini ve toksik ürünleri alır. Aynı zamanda ilk rejenerasyonun ve en son hücre ölümünün olduğu bölgedir. Yine bu bölgedeki hücreler, safra kanalı tıkanıklarının en hızlı etkilendiği ve morfolojik değişikliklere uğradığı bölgedir. İskemiden en çabuk üçüncü zondaki hücreler etkilenirler. Ayrıca yağ birikimi yine en erken bu zondaki hücrelerde olur. Aksine, üçüncü zon bölgesindeki hücreler, toksik etkilerden ve safra kanalı

tıkanıklarından en geç etkilenirler. Hücrelerin, zonlar arasındaki organel dağılımları, enzim aktiviteleri ve glikojen biriktirme kapasiteleri olarak farklılıklar bulunmaktadır (1, 20).

2.2. Asetaminofen

Asetaminofen (APAP; N-asetil-p-aminofenol) parasetamol olarak da bilinen ve günümüzde en sık kullanılan analjezik (ağrı kesici) ve antipiretik (ateş düşürücü) bir ilaçtır. Asetaminofen, non-steroidal antiinflatuvar ilaç (NSAİİ) grubu ilaçlardan fenasetinin etkin metabolitlerinden biri olan para-aminofenol türevidir.



Şekil 2.2. Asetaminofenin kimyasal yapısı (21)

APAP'ın kimyasal formülü $C_8H_9NO_2$ olup moleküler ağırlığı 151,17 g/mol'dur (Şekil 2). Yoğunluğu 1,263 g/cm³ ve erime noktası 169°C'dir. APAP yapısal olarak beyaz kokusuz kristal toz şeklindedir. Doymuş sulu çözelti pH derecesi 5.5-6.5 olup kararlı bir yapıdadır. Asit veya alkali ortamlarda bu kararlılığı azalmakta ve bu tür ortamlarda yavaş bir şekilde asetik aside ve para aminofenole dönüşmektedir (21).

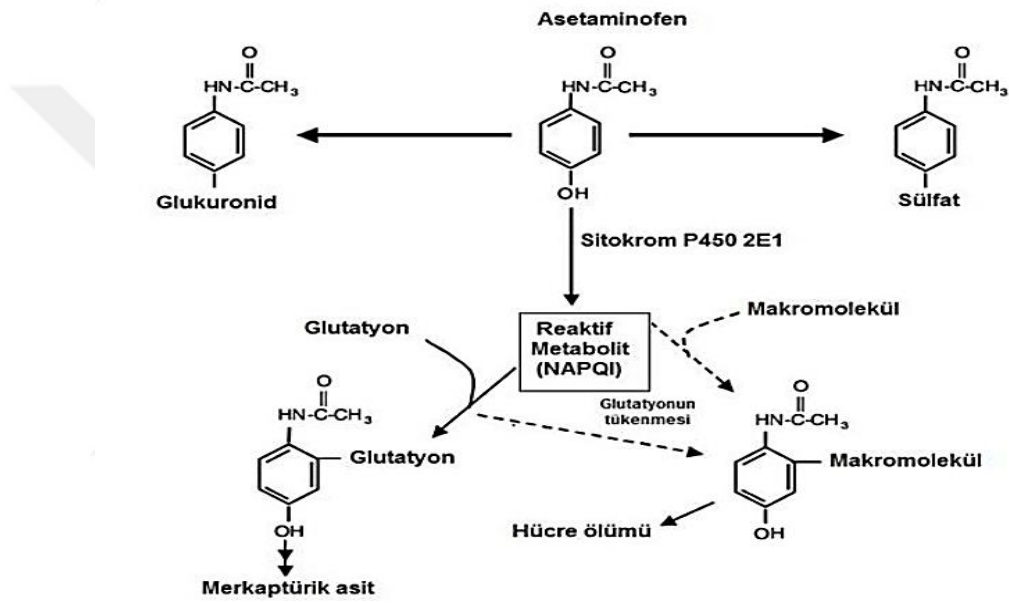
APAP, ağrı eşiğini yükseltmek yoluyla ağrı kesici olarak kullanılır. Ayrıca hipotalamustaki ısı düzenleyici merkez üzerindeki etkisi ile de ateş düşürücü bir etki gösterir (22).

APAP ilk kez klinik olarak Von Mering tarafından 1893 yılında kullanılmıştır. Ancak 1949 yılından sonra yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (23). Yetişkinlerde önerilen maksimum doz 4 g/gün'dür (24).

APAP, ateş düşürücü ve ağrı kesici etki yönüyle NSAİİ gibi düşünülmektedir. Ancak APAP, NSAİİ trombosit agregasyonu önleyici ve gastrotoksisite gibi tipik yan etkisi yoktur (25). APAP'ın ağrı kesici ve ateş düşürücü etkilerini, merkezi sinir sistemi (MSS) üzerinde santral siklooksijenaz-3 (COX-3) enzim inhibisyonu ve prostaglandin sentezini baskılayarak gösterir. APAP diğer NSAİİ gibi az miktarda COX-1 ve COX-2 inhibisyonu yapmakta fakat antiinflatuvar etkisi yoktur (26).

2.2.1. Asetaminofen Metabolizması

APAP'ın metabolizması glukuronidasyon ve sülfasyon yoluyla KC'de olmaktadır. Terapötik dozlarda alınan APAP'ın %80-85'i sülfat-glukronit konjugasyonu, %10-15'i sitokrom P450 enzim sistemi (CYP450; CYP2E1,1A2, 3A4 ve 2A6) ile bir reaktif metabolit ve hücre makromoleküllerine bağlanabilen oldukça toksik olan N-asetil-p-benzokinon imin (NAPQI)'e dönüştürülerek detoksifiye edilir. Glutasyon (GSH) hızlı bir şekilde NAPQI'a bağlanarak toksik olmayan sistein veya merkaptürik asit konjugatlarına dönüştürülerek detoksifiye edilir (Şekil 3, 27).



Şekil 2.3. Asetaminofen metabolizması (27)

2.2.2. Asetaminofen Farmakokinetik Özellikleri

APAP; vücuda alınmasından 30-60 dk sonra kandaki en yüksek yoğunluğuna ulaşır. Alınan ilk dozun analjezik etkisi 3-4 saat devam etmektedir. APAP'ın dolaşımdaki plazma proteinlerine hafif şekilde bağlanan % 95'lik kısmı, karaciğerdeki enzimler tarafından sülfat ve glukronit bileşenlerine çevrilir. APAP'ın geriye kalan % 5'i ise değişmeden atılmaktadır. APAP'ın plazmadaki yarı ömrü 2-3 saat olup, böbrek işlevlerinden göreceli olarak etkilenmez. Toksik dozlarda alındığında veya karaciğer rahatsızlıklarında, bu süre iki katına kadar çıkabilir (26, 28).

2.2.3. Asetaminofenin Endikasyonları

Baş ağrısı, kas ağrıları, sırt ağrısı, artrit, soğuk algınlığı, diş ağrısı, menstrüel kramplardan dolayı oluşan orta ve hafif ağrı ve ateşi düşürmede tedavi amaçlı kullanılmaktadır. İyi bir analjezik ve antipretik ilaçtır. APAP birçok analjeziklerle karşılaştırılmıştır ve aspirine (asetilsalisilik asit) eşdeğer kabul edilir. Ancak anti-inflamatuar etkisi bulunmamaktadır. Çocuklarda kullanım için oldukça uygundur. Aspirine kontrendikasyon (zıt etki) gösteren hemofili, peptik ülser ve viral enfeksiyon geçirmiş çocuklarda alternatif olarak tercih edilmektedir. Kanın pıhtılaşmasını engelleyici etkisi yoktur (29).

2.2.4. Asetaminofenin Ateş Düşürücü ve Ağrı Kesici Etkisi

APAP, çocuklarda yüksek ateşi düşürmek için en çok kullanılan ilaçtır. APAP'ın analjezik etkisinin etki mekanizması sıklıkla siklooksijenazların mobilize edilmesine ve daha yakın zamanlarda serotonerjik yollara dayalı olduğu düşünülmektedir (30).

APAP'ın ateş düşürücü, ağrı kesici ve inflamasyon (şişme ve kızarıklık) etki mekanizması prostaglandinlerin (PGI) yapımını engelleyerek gerçekleştirmektedir (31).

2.2.5. Asetaminofenin Yan Etkileri

APAP, non-steroid anti-antiinflamatuar (NSAİİ) ilaçlarla karşılaştırıldığında astımın kötüye gitmesine veya astım krizlerine neden olmasına daha az rastlanmaktadır. Deri döküntüleri, allerji belirtileri ve kan bozuklukları gibi yan etkileri nadirdir. Terapötik dozda alındığında; bazen karaciğer enzimlerinde ılımlı bir yükselmeye neden olabilir ve ilaca bağlı olan bu durum, geri dönüşlüdür. Yüksek dozlarda alınması durumunda; baş dönmesine, huzursuzluğa ve yönelim bozukluğuna neden olabilir. APAP'ın kronik olarak kullanılması böbrek sorunlarına neden olmaktadır. Yüksek dozlarda alınması karaciğerde sentrilobüler nekroz ve ölümle sonuçlanmaktadır. Karaciğerdeki hasarlanmanın erken belirtileri arasında; bulantı, kusma, ishal ve karın ağrısı yer almaktadır (28).

2.2.6. Asetaminofenin Doz Kullanım Bilgileri

APAP, günlük kullanımında tablet, sıvı süspansiyon, fitil veya flakon şeklinde bulunur. Yetişkinlerde önerilen doz her 4 saatte 500-1000 mg'dır. Ancak günlük 4000 mg üzerinde alınmamalıdır. Çocuklarda, 1-5 yaş aralığındakilere her 4 saatte 120-250 mg olup günlük 4 dozdan fazlası verilmemelidir. 6-12 yaş çocuklarda her 4 saatte 250-500 mg verilmelidir. 1 yaşın altındaki çocuklara doktor kontrolünde verilmelidir. APAP

tok karına alındığında biyoyararlanımı düşmektedir; bundan dolayı aç karna alınması önerilmektedir (31).

2.2.7. Asetaminofen Toksisitesi

APAP doz aşımı yaşayan hastalar ilk olarak asemptomatik olurlar çünkü uc organ toksisite klinik semptomları akut sindirim ardından 24-48 saate kadar kendini göstermeyebilir. Bu nedenle, klinisyenin hepatotoksisite riski taşıyan bir hastayı tanımlamak için APAP aldığı zamanı ve miktarını açık bir şekilde belirlemelidir. APAP'ın tek seferde alındığında ciddi hepatotoksisite dozları:

- Yetişkinlerde 7.5-10 gram (g)
- Sağlıklı 1-6 yaş çocuklarda 150-200 miligram/kilogram (mg/kg)

APAP toksisitesinin klinik gidişi genel olarak dört evreye ayrılır. Fiziksel bulgular, hepatotoksisite derecesine bağlı olarak değişebilir (3, 32).

1. Evre (ilk 0.5-24 saat): Hasta asemptomatik olabilir. Bulantı, kusma, iştahsızlık ve halsizlik görülebilir. ALT/AST enzimlerinde yükselme görülebilir (3, 32).

2. Evre (18-72 saat): Hastalar sağ üst kadranda karın ağrısı, iştahsızlık, mide bulantısı ve kusma geliştirir. Sağ üst kadranda hassasiyet mevcut olabilir. Taşikardi ve hipotansiyon görülebilir. Bazı hastalarda idrar çıkışında azalma (oligüri) görülür (3, 32)

3. Evre (72-96 saat): Hepatik evre: Hastalarda mide bulantısı, kusma ve karın ağrısı görülebilir. Hepatik nekroz, sarılık, koagülopati, hipoglisemi ve hepatik ensefalopati olarak ortaya çıkabilir. Bazı kritik hastalarda akut böbrek yetmezliği gelişir. Çoklu organ yetmezliği nedeniyle ölüm gerçekleşebilir (3,32).

4. Evre (4 gün ile 3 hafta arası): Kurtarma aşaması; Evre 3 hastalardaki hasar geri dönerse tam rezolüsyon, hasar geri dönmezse karaciğer nakli gerekebilir (3, 32).

İlk 10 saat içerisinde, GSH aktivitesini artıran N-asetil sistein (NAC) verilmesi etkili olabilir. Fulminan karaciğer yetmezliğine giren olgulara, KC transplantasyonu gerekebilir (3, 32).

2.3. Melatonin

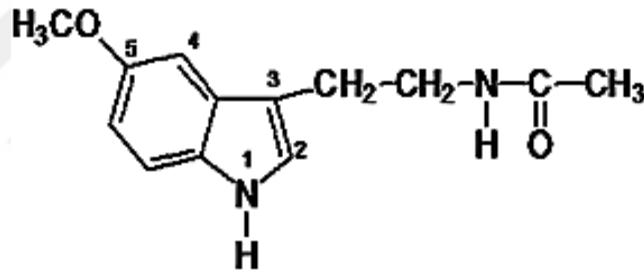
Melatonin ilk kez pineal bezden Lerner ve ark. (33) tarafından 1958'te keşfedildi. Melatonin bu ismini, kurbağa derisindeki **melanoforların** beyaz görünümüne neden olduğundan ve serotoninden türediği için almıştır (34). MLT hormonu, pineal

bezden, overden, retinadan, kemik iliği hücrelerinden, safra ve gastrointestinal sistemden sentezi yapılmaktadır (35).

Retinada sentezlenen MLT retinal pigment epitel fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca fotoreseptörlerdeki gece-gündüz varyasyonundan dolayı retinanın vereceği yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Deride sentezlenen MLT, güneşin zararlı etkilerine karşı cildi korumaktadır. Gastrointestinal kanalda enterokromofin hücrelerde sentezlenip ve dolaşıma postprandial (yemek sonrası) olarak verilmektedir. Safrada sentezlenen MLT, safra yolları mukozasını ve epitelini, okside kolesterol türevlerine ve safra asitinin oksidatif hasarına karşı korumaktadır (36).

2.3.1. Melatonin Sentezi

MLT (N-asetil-5-metoksitriptamin) sentezindeki ilk basamak triptofanın pinealositler içine alınmasıyla N-asetiltransferaz (NAT) enzimi tarafından N-asetil serotonine dönüştürülmesidir (Şekil 4).



Şekil 2.4. Melatonin kimyasal yapısı (37)

N-asetil serotoninin MLT'e dönüşümü hidroksiindol-o-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından olmaktadır. Sentezin düzenlenmesi karanlığa bağlıdır. Pineal bezdeki endokrin hücreleri olan pinealositler tarafından MLT hızlı bir şekilde sentezlenmektedir (37).

2.3.2. Melatonin Farmakokinetiği

Kısmen suda ve yağda çözünebilen MLT, kolaylıkla doku ve hücrelere girebilmektedir. Tablet ve jelatin kapsüller şeklinde oral olarak uygulanan MLT insanlarda yaklaşık 1 saatte plazma pik düzeyine ulaşmaktadır. Bifazik yarılanma ve eliminasyon ömrü 3-45 dakikadır. KC'de hızlı bir şekilde 6-hidroksidopamine dönüşür. Daha sonra bir dizi reaksiyonla N-asetil-5-metoksi-6-hidroksitriptamin'e ve sonra da

sülfat veya glukronidile konjuge bir şekilde 6-sülfatoksimeletonin'e dönüşerek idrar yoluyla atılır. İdrarda %1 değişmemiş şekilde bulunmaktadır (38).

2.3.3. Melatonin Antioksidan Etkileri

MLT güçlü bir antioksidan ve serbest radikal engelleyicisidir (15). MLT hidroksil (OH⁻) ve peroksit (ROO⁻) serbest radikallerin güçlü bir süpürücüsüdür. MLT, OH⁻ radikalini nötralize etkisi GSH'dan 5 kat daha etkilidir. Ayrıca ROO⁻ inaktivasyonunda ise E vitamininden 2 kat daha fazladır. Fakat MLT'in peroksi radikali üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar MLT, peroksil radikale karşı süpürücü etkisinin E vitamininden daha düşük olduğunu ve bundan dolayı lipoperoksil radikale karşı daha düşük nötralize etkisini olduğunu bulmuşlardır (39, 40).

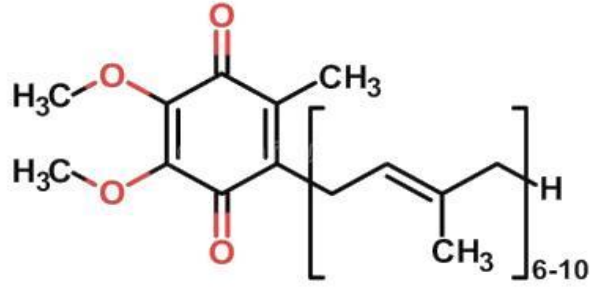
MLT inflamasyon sırasında makrofajlar tarafından salınan ve toksik bir oksijen türevi olan hipokloröz asit (HOCl)'e karşı da engelleyici etkisi vardır. MLT hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit radikali (O₂⁻) üzerine direkt engelleyici etkisi zayıftır. MLT'in H₂O₂ ile reaksiyon sonucunda N¹-asetil-N²-formil-5-metoksi knüramin (AFMK) oluşur. AFMK'nın ise katalaz ile N¹-asetil-5-metoksi knüramine dönüşür. Bu antioksidan metabolitler, MLT etkisini artırdığı gösterilmiştir (41).

MLT, glutatyon peroksit (GSH-Px) enzimini aktive ederek hidroperoksitleri metabolize eder. Ayrıca O₂⁻ radikalini H₂O₂'ye kataliz eden süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini artırır. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek NO oluşumunu önleyip antioksidan etki gösterir (42). MLT, sitokrom P450 enzim aktivitesini düşürür, serbest radikal oluşumunu ve dolayısıyla oksidatif hasarı engellemektedir (43, 44, 45).

MLT, APAP'a bağlı hepatotoksisite ve böbrek toksisitesine karşı ve NO, IL-6, nötrofil filtrasyonu ve lipid peroksidasyonunu önlediği rapor edilmiştir (15, 46).

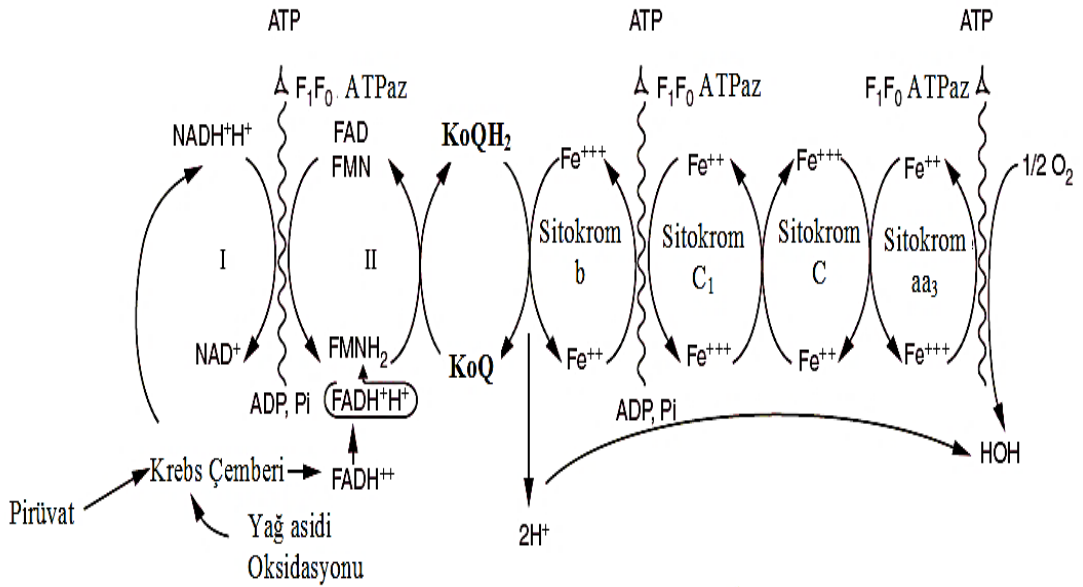
2.4. Koenzim Q10

Koenzim Q10 (CoQ10) enzimlerin aktivitesini artıran küçük moleküler yapılardır. CoQ10, protein ile bağlanan (apoenzim) ve aktif enzim (holoenzim) forma dönüştürülen non-protein molekülerdir. CoQ10, ubikinon, ubidekarenon ve mitokinon olarak da bilinmektedir. CoQ10 yapısındaki "Q" kinon grubunu ve "10"ise poliisopren zinciri ifade etmektedir (Şekil 5).



Şekil 2.5. Koenzim Q10 kimyasal yapısı (47)

İlk kez Dr. Fredrick L. Crane tarafından 1957’de keşfedilmiştir (47). Koenzim Q10 yaygın olarak tüm hücrel membranlarda bulunmaktadır. Lipofilik bir moleküldür. Bazı nadir istisnalar dışında CoQ10 hayati önem taşımaktadır. Koenzim Q10’nun yapısı halkasal bir kinon grup ile karakterizedir. Ancak farklı uzunlukta ve yapıda oluşmuş hidrofobik kuyruk mevcuttur. Karakteristik kinonun CoQ10’a elektron taşıyıcı özelliğini kazandırmıştır. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda rol alır. CoQ10, mitokondriyal elektron transfer zincirinde önemli rol almaktadır. Elektron transfer zincirinde kompleks I (nikotinamid adenin dinükleotid dehidrogenaz)-kompleks II (süksinat dehidrogenaz)’den kompleks III (ubikion - sitokrom c redüktaz)’e elektron aktarımını yapar. Sürekli olarak yükseltgenip indirgenmekte ve bu sırada ATP üretilmektedir (Şekil 6). Bundan dolayı CoQ10, hücrel enerji için hayati önem taşımaktadır.



Şekil 2.6. Koenzim Q 10’un ATP sentezindeki rolü (48)

Yapılan çalışmada (48), CoQ10'un reaktif oksijen türevlerinin (ROT) üretimini engellediği gösterilmiştir. Ayrıca serbest radikal engelleyicisi olup hücrel membran lipid peroksidasyonundan korumaktadır. Aynı zamanda güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmektedir. CoQ10'un yaşlanma ve bazı hastalıklarda düşük seviyelerde bulunması, antioksidan etkisinden dolayı yaygın bir şekilde gıda takviyesi olarak kullanılmasının gerekçesidir (48).

CoQ10, antiinflamatuvar özelliğe sahiptir. Ayrıca proinflamatuvar, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretilmesini azaltır. CoQ10, oksidatif stres ve inflamatuvar kaynaklı doku hasarını önlediği gösterilmiştir (47, 48).

CoQ10, APAP aşırı dozunun yarattığı hepatotoksisiteye karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (49).

2.4.1. Koenzim Q10'un Farmakokinetiği

Diyetle alınan CoQ10'un emilimi, hidrofobik kuyruğa sahip olması ve büyük moleküler kütesinden dolayı oldukça yavaş ve sınırlıdır. Biyoyararlılığı yaklaşık olarak 6 saattir ve yarılanma süresi ise yaklaşık olarak 33 saattir. Emilimi ince bağırsakta olur. CoQ10 yağla emilimi daha iyi olmaktadır (47).

2.5. Nitrik Oksit

Otokrin ve parakrin hücrel bir ajandır. Fizyolojik koşullar ve patofizyolojik durumlarda homeostazı sağlayan moleküldür. Daha önce endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak bilinirdi. Nitrik oksit (NO), azot monoksit olarak da bilinen renksiz ve toksik bir gazdır. İlk olarak memelilerde 1916 yılında keşfedilmiştir. NO sentezi, aktive olmuş makrofajlarda 1985'te bulunmuştur. NO, L-argininden sitrulin oluştuğu zaman, L-argininin guanidine nitrojen grubunun hidroksilasyonu ile oluşmuş bir ara üründür. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile bir dizi reaksiyonla katalizlenir. NOS enzimleri, yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) diye iki gruba ayrılmaktadır. Yapısal NOS vasküler endotelde, plateletlerde ve nöronlarda bulunmaktadır. Nöronlarda bulunanlara, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), endotelde bulunana endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) adı verilmektedir. İndüklenebilir NOS kardiyomiyositlerde, hepatositlerde, nöronlarda, microglial hücrelerde, nötrofillerde, vasküler endotelde ve düz kas hücrelerde bulunmaktadır. Yapısal NOS tarafından üretilen NO, hücreler arası ve hücre içi haberleşmede görev alır. iNOS ortamdaki kalsiyum konsantrasyondan etkilenmez ancak yapısal NOS

etkilenir. NO, suda ve yağda çözünebilen bir moleküldür. Solüsyon içerisindeki yarılanma ömrü 5-30 saniyedir. NO, renksiz ve stabil bir gaz olup nitrit ve nitrate okside olabilmektedir. Tiol gruplarıyla reaksiyona girerek depolanmaktadır. NO, pankreasın asiner hücrelerinde guanozin 3', 5'-siklik monofosfat (cGMP) sentezini düzenlemektedir (8).

Guanozin 3', 5'-siklik monofosfat, beyin ve böbreklerde atrial natriüretik faktör olarak düz kasların gevşemesini sağlar. Ayrıca retinadan fototransdüksiyon sağlar ve enterotoksinlerle ilişkili olarak ince bağırsağa sıvı salımını etkilemektedir. Arterlerde venlere oranla daha fazla NO üretilmektedir. NO konsantrasyonu, normal fizyolojik şartlarda endotoksin, α -interferon, IL-1 ve TNF- α gibi moleküllerle İNOS'un indüklenmesi sonucunda seviyesi artar. Hastalıklarda ve sonuçlarıyla ilişkili olarak NO zararlı ya da yararlı etkileri gösterilebilmektedir (8).

Nitrik oksit, NOS tarafından L-argininden sentezlenmektedir. NOS, sitokrom P450 enzimi gibi demir (Fe) içeren protoporfirin IX'a sahiptir. NO, nötr elektrik yüke sahip olduğundan, reseptöre bağımsız olmaksızın membranlardan kolayca geçebilir (8).

NO'nin nörotransmitter olarak, tümör hücre ölümünde ve inflamasyonda önemli rolü vardır. Makrofajlardaki NO'nin antitümöral ve antimikrobiyal etkisini tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrilleyerek göstermektedir. Ayrıca vazodilatasyona ve trombosit yapışmasının engellemesiyle mikrosirkülasyonunda rahatlama ile dokuların oksijenlenmesiyle vücuda katkı sağlamaktadır. Mitokondriyal elektron transport sisteminin aktivitesini azaltmaktadır. Tümör hücresindeki ribonukleotid reduktaz enzimini inhibe etmesiyle DNA sentezini engellemektedir (8).

NO, süperoksit ile reaksiyona girerek öncelikle peroksinitrit (ONOO^-) daha sonra nitrojen dioksit (NO_2^-) ve hidroksil radikali (OH) oluşturur. Bu reaksiyonda tirozin, 3-nitrotirozine (NO_2Tyr) dönüşür. Oksidatif hasarın olduğu durumlarda NO_2Tyr düzeyi armaktadır. Ayrıca aterosklerozisde, septik şokda, nörodejeneratif hastalıklarda, akut karaciğer hasarında, organ transplantasyonunda, yangısal bağırsak enfeksiyonlarında, romatoid artiritde, bakteriyel ve viral enfeksiyonlarda, yaşlanmada ve sigara içenlerde arttığı görülmüştür (6, 8).

Yapılan çalışmada, APAP hepatotoksitesinde NO ve nitrotirozin sentezinin arttığı gösterilmiştir (50).

NOS enziminin iki izoenzimi bulunmaktadır:

1. Yapısal (konstitüf) NOS (cNOS): Bu enzimin aktivitesi Ca^{++} bağımlıdır. İnsanlarda, damar endotel hücrelerinde, ürogenital sistem dokularında, santral ve periferik sistem nöronlarında, adrenal kortekste, trombositlerde ve barsak intersitisyumunda bulunmaktadır (8). Yapısal NOS iki kısımda incelenmektedir; nöronal (nNOS) ve endotelial (eNOS).

nNOS kaynaklı NO: Genel olarak sinir sisteminde; merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sisteminde bulunmaktadır.

eNOS kaynaklı NO: Düz kasları gevşeterek, kan basıncını ve akışını düzenlemektedir.

2. Uyarılabilir NOS (iNOS): İlk olarak makrofaj (monosit, histiyosit, kuppfer hücreleri) ve hepatositlerde bulunmuştur. Ca^{++} bağımlı değildir. Enzimin aktifleşmesi ve NO üretimi, yapısal NOS gibi kısa sürmemektedir. Nonspesifik immünitede rol oynamaktadır. Patojenlere karşı etki göstermektedir. Otoimmün ve yangısal hastalıklarda da rol oynamaktadır (8).

2.6. Reaktif Oksijen Türevleri ve Oksidatif Hasar Mekanizması

Serbest radikal, bir veya birden fazla eşleşmemiş elektronlara sahip atom ya da moleküllere verilen isimdir (51). Oksidan moleküller veya reaktif oksijen türevleri (ROT), yüksek aktiviteye sahip ve başka moleküller ile reaksiyona girerek onların kimyasal yapısını bozan moleküllerdir.

Reaktif oksijen türevleri (ROT), canlılarda neredeyse tüm biyomoleküller, nükleik asitler, serbest aminoasitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusuyla reaksiyona girerek geri dönüşlü ya da geri dönüşsüz etkiler yaratabilir. ROT'ların içerisinde oldukça reaktif ve yarı ömrü kısa olanı hidroksil (OH^-) radikalidir. Bu nedenle mitokondrilerde ve mikrozomlarda oluşmuş serbest radikaller direkt olarak DNA'yı etkilemez. Fakat serbest olan bir radikal molekülü, serbest olmayan bir molekül ile etkileşerek onun serbest bir radikale dönüştürebilir. Böylelikle serbest radikaller, oluştukları yerin uzağındaki sellüler komponentlere etki etmektedirler. Süperoksit molekülü (O_2^-) oldukça reaktif olmasına rağmen OH^- radikali kadar hasar verici değildir. O_2^- , hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında, geçiş metalleri aracılığıyla OH^- radikalini oluşturur. Bu nedenle oldukça hasar verici potansiyeli vardır.

H_2O_2 , hücreye direkt olarak hasar vermez. Ancak tüm hücrel membranlardan geçebilmektedir. O_2^- varlığında ise OH^- radikale dönüşebilmektedir. Bu nedenle de oldukça hasar verici olabilmektedir (8).

OH⁻ radikali ise etrafındaki tüm biyomolekül ile reaksiyona girebilmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonunu başlatır. OH⁻, DNA'da kırılmalara ve hasarlanmalara neden olmaktadır. Ayrıca enzimlerin aktif merkezlerindeki SH'nin oksitlenmesine ve polisakkaritlerin depolimerizasyonuna neden olmaktadır (8).

2.7. Antioksidan Savunma Sistemi

Antioksidan savunma, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engelleyerek ve canlı organizma üzerinde meydana getirdikleri zararı önlemek için oluşturulmuş bir sistemdir. Bu sistemi serbest radikal engelleyiciler ve bazı enzimler oluşturmaktadır (8).

Antioksidan Etki Çeşitleri:

1. Toplayıcı etki: ROT etkileyerek onları tutma ya da daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler buna örnek olarak gösterilebilir (8).

2. Bastırıcı etki: ROT ile etkileşerek ROT moleküllerine bir hidrojen ekleyerek aktivitelerini düşüren veya inaktif şekle dönüştüren etkidir. Bunlara örnek olarak, vitaminler, flavonoidler, trimetazin ve antasyonoidler verilebilir (8).

3. Zincir kırıcı etki: ROT moleküllerini kendine bağlayarak zincir kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkidir. Örnek olarak, hemoglobin, seruloplazmin ve minareller verilebilir (8).

4. Onarıcı etki: Enzim olanlar: Mitokondriyal sitokrom oksidaz, süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutamat oksaloasetat transaminaz (GOT; AST) ve hidroperoksidazlar (8).

Enzim olmayan antioksidanlar: α-tokoferol (E vitamini), β-karoten (A vitamini), askorbik asit (C vitamini), melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, myoglobin, ferritin, methionine, albumin, bilirubin, glutasyon (GSH) (8).

2.7.1 Hücre Dışı (İn Vivo) Ortamda Antioksidan Savunma

Hücre dışı (in vivo) ortamdaki antioksidan savunması sınırlıdır. Bu yüzden minör olarak enzimler, majör olarak E ve C vitaminleri, transferrinler, haptoglobinler, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β-karoten, ürik asit, glukoz, sistein, trakeobronşiyal mucus ve α-1 antitripsin gibi moleküller antioksidan savunmasından sorumludur

Canlı organizmadaki oksidan ve antioksidan seviyesi belirli bir düzeydedir. Reaktif maddelerin yani oksidanların seviyesi belirli bir düzeyin üzerinde olursa ya da

antioksidanlar seviyesi yetersiz olursa oksidanlar makromoleküllere; protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitlere zarar vererek oksidatif strese neden olmaktadır (51).

2.8. Hücre Hasarı: Nekroz ve Apoptoz Mekanizmaları

Hücre hasarı, hücreler ağır bir stresle ve uyum sağlayamayacakları durumla karşılaştıklarında ve intrinsik hasar oluşturuca etkenlere maruz kaldıklarında oluşur. Ayrıca DNA ve proteinlerdeki anormalik oluştuğunda da hücre hasarı meydana gelmektedir. Hücre hasarı, geri dönüşlü veya hücre ölümüyle sonlanabilir (52).

- Geri dönüşlü hücre hasarı: Hasarı oluşturan etken, erken dönemde ya da hafif şiddette ortadan kalkarsa, meydana gelen fonksiyonel ve morfolojik değişiklik geri dönüşlü olmaktadır. Ağır membran hasarı ve çekirdek dağılması olmamaktadır (52).

- Hücre ölümü: Hücrenin zedelenmesi ve hasarın devam etmesiyle geri dönüşsüz sürece girmektedir. İyileşmesi mümkün olmayan hücre sonunda ölmektedir (52).

İki tip hücre ölümü vardır; nekroz ve apoptoz

Nekroz: Nekroz, hücrelerin akut hasarı ya da hastalıkla tetiklenen patolojik bir süreçtir (18). Hücre membran yapısının bozulması ve hücre içindikilerini dışarıya salıvermesiyle hücrenin parçalanma sürecidir. Hücre içerisindeki mitokondri, enzimlerin ve diğer bileşenlerin dışarıya salıverilmesi inflamatuvar yanıtı tetikler. Bu da lokal konak reaksiyonuna yol açmaktadır. Bu reaksiyon, ölü hücreleri ortadan kaldırmayı ve bir sonraki onarım sürecini amaçlamaktadır. Ölmekte olan hücrelere ait lizozom enzimler ve oluşan inflamatuvar reaksiyondan dolayı toplanan lökositlerin lizozomları, hücrenin ölümünden sorumlu olabilir (52).

Nekroz Morfolojisi: Hasar görmüş hücrelerin sitoplazma ve çekirdeğindeki değişikliklerle karakterize olmaktadır.

- Sitoplazmik değişiklikler; Eozinofili (eozin boyasıyla pembe renge boyanma özelliğinin artması) artışı görülmektedir. Bu eozinofili artışı, kısmen denatüre plazma proteinlerine bağlanması ile kısmen de sitoplazmadaki ribonükleik asit (RNA) tarafından sağlanmış bazofilinin azalmasıyla olur. Nekroze hücre canlı bir hücreyle karşılaştırıldığında, glikojen partiküllerinin kaybolması sonucunda daha camsı ve homojen bir görünüme sahip olmaktadır. Nekrozlu hücrenin miyelin figürleri, geri dönüşlü hasara uğrayandan daha belirgindir. Sitoplazmadaki organeller enzimler

tarafından sindirildiğinden dolayı sitoplazma vakuollü ve 'güve yeniği' gibi görünmektedir. Elektron mikroskopisinde; plazma ve organel membran kesintili bir şekilde, mitokondriler büyük, şekilsiz dansiteler ortaya çıkmakta ve belirgin genişleme, lizozomlar parçalanmıştır (52).

- Hücre nükleusundaki değişiklikler; 3 olası durum söz konusu olabilir. Karyoliz, deoksiribonükleaz (DNAaz) aktivitesi sonucunda kromatinin bazofilisi matlaşır. Piknoz, nükleus, DNA büzülmüş, solid bir kitle halini almış ve bazofili sergiler. Karyoreksis, piknotik çekirdek parçalanır (52).

- Nekrotik hücreler; ya bir süre nekrotik hücreler kalır ya da enzimler tarafından sindirilmektedirler. Nekrotik hücreler, miyelin figürlerine dönüşürler. Bunlar ya fagositte edilirler ya da yağ asitlerine parçalanmaktadır. Yağ asitleri kalsiyum tuzlarıyla bağlanması sonucunda ölü hücreler kalsifiye olurlar (52).

Nekroz Tipleri: Nekroz tipleri makroskopik görünüm olarak farklılık gösterir ancak fibrinoid nekroz yalnızca histolojik incelemelerle ayırt edilebilmektedir.

Koagülasyon nekrozu; en sık görülen nekroz tipidir. Bu nekroz tipinde doku sertleşmektedir. Koagülasyon nekrozuna yol açan hasar, hem yapısal proteinleri hem de enzimlerin yapısını bozarak ölü hücrelerin ortadan kalkmasını önlemektedir. Sonuç olarak günlerce devam eden, nükleusu kaybolmuş eozonofilik hücreler kalmaktadır. Nekrozun olduğu yerde lökositlerin infiltrasyonu görülür. Ölmüş hücreler, lökositlerdeki lizozomal enzimler tarafından ortadan kaldırılır. Geriye kalan debris (hücre artığı) fagositte uzaklaştırılmaktadır. Bu nekroz tipi beyin dışında tüm solid organların iskemik nekroz (infarktüs) alanlarda bulunur (52).

Likefaksiyon nekrozu; bakteri ve mantar enfeksiyonlarında görülür. Likefaksiyon nekrozda mikroplar inflame hücrelerin o bölgeye toplanmasını uyarmakta ve lökositlere ait enzimler dokuyu 'sıvılaştırır, eritir'. MSS hücrelerinin bilinmeyen nedenlerden dolayı çoğu kez hipoksi ile ölmesi likefaksiyon nekrozuna yol açmaktadır. Fagositler tarafından, sindirilmiş doku uzaklaştırılır. Likefaksiyon nekroz sürecinde, bakteri enfeksiyonlarında olduğu gibi akut inflamasyonla başlamış ise oluşan sıvı madde krem sarısı renğinde olur ve pü (irin) olarak isimlendirilir (52).

Gangrenöz nekroz; bu nekroz tipi daha çok arteriel kanlanmasını kaybetmiş alt bacak ekstremiteelerde görülür. Bu nekroz, bir çok doku katmanıyla ilişkili olan koagülasyon nekrozunu anlatmaktadır. Buna bakteri enfeksiyonu da ilave edilirse

bakterilerin ve lökositlere ait enzimlerin sıvılaştırıcı etkisinden dolayı değişikliğe uğrayarak ‘yaş gangren’ ile sonuçlanır (52).

Kazeifikasyon nekrozu; ‘Peynirimsi’ anlamına gelmektedir. Bu nekroz en çok tüberküloz enfeksiyonu odaklarında karşımıza çıkmaktadır. Nekroz alanının kırılğan olması, sarımsı-beyaz rengini de tanımlamaktadır. Nekroz odağı, mikroskopik incelemede hematoksilen-eozin boyasıyla pembe renge boyanan, amorf (şekilsiz), granüler, parçalanmış ya da sıvılaşmış hücre toplulukları göze çarpar. Bu nekroz tipi, koagülasyon nekrozuyla karşılaştırıldığında doku yapısı tamamen silinmiş ve hücreler ayırdedilemez görünümündedir. Kazeifikasyon nekroz alanı belirgin bir inflamatuvar reaksiyonuyla sınırlanmıştır. Bu görünüm, granülom adı verilen bir inflamasyon odağı için karakterizedir (52).

Yağ nekrozu; yağ nekrozu tipik olarak pankreas dokusunun aktif pankreas lipazlarının periton boşluğuna yayılmasıyla gelişen yağ yıkımı olan bölgelerdeki nekrozdur. Bu nekroz akut pankreatit ve acil batın sorunu geliştiğinde görülmektedir. Pankreatik enzimler, hem asiner hücrelerden hem de duktuslardan dışarı salgılanır ve peritondaki yağ hücrelerin membranlarını sindirmektedir. Daha sonra pankreasdaki lipazlar, yağ hücrelerinde bulunan trigliserid esterlerini parçalar. Serbest hale gelen yağ asitleri kalsiyumla birleşir ve oluşan lezyonları cerrah ve patoloğun makroskopik olarak tanımasını sağlayan tebeşirimsi beyaz bölgeler oluşturur. Mikroskopik incelemelerde nekroz odaklarında inflamatuvar bir reaksiyonla kuşatılmış, sınırları belirgin olmayan ve nekrotik yağ hücreleriyle bazofilik kalsiyum birikimleri görülmektedir.

Fibrinoid nekroz; genellikle arter duvarında biriken antijen-antikor kompleksleri, bağışıklık reaksiyonlarında gelişen ve ışık mikroskopuyla görülebilen nekrozdur. Daha sonra damar dışına sızmış olan fibrin ile arter duvarındaki antijen-antikor kompleksi birleşir ve H.E. ile boyanmış preparatlarda fibrinoid (fibrinimsi, fibrin-benzeri) yapı görülür. Bu fibrinimsi yapı, parlak pembe renkte ve şekilsiz görünüm oluşturur. Bu tip nekroz, bağışıklık sistemi hastalıklarda (ör. Poliarteritis nodosa) görülür (52).

Apoptoz Mekanizmaları: Apoptoz, kaspaz denilen enzimlerin aktifleşmesiyle gerçekleşir. Kaspaz enzimleri, proteinleri aspartik residülerin ardından parçalayan sistein proteazlar olmalarından dolayı bu isim verilmiştir. Kaspazların aktivasyonu, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin üretim ve yıkımları arasındaki dengeye bağlıdır. Kaspaz aktivitesiyle sonuçlanan iki yolak, mitokondrial yolak ve ölüm reseptörü yolağı

mevcuttur. Bu iki yolak birbirleriyle kesişebilmelerine rağmen, genellikle farklı moleküllerin rol oynadığı ve fizyolojik ve hastalık durumunda farklı koşullar altında harekete geçen ve farklı roller oynayan yollardır (Şekil 7, 52).

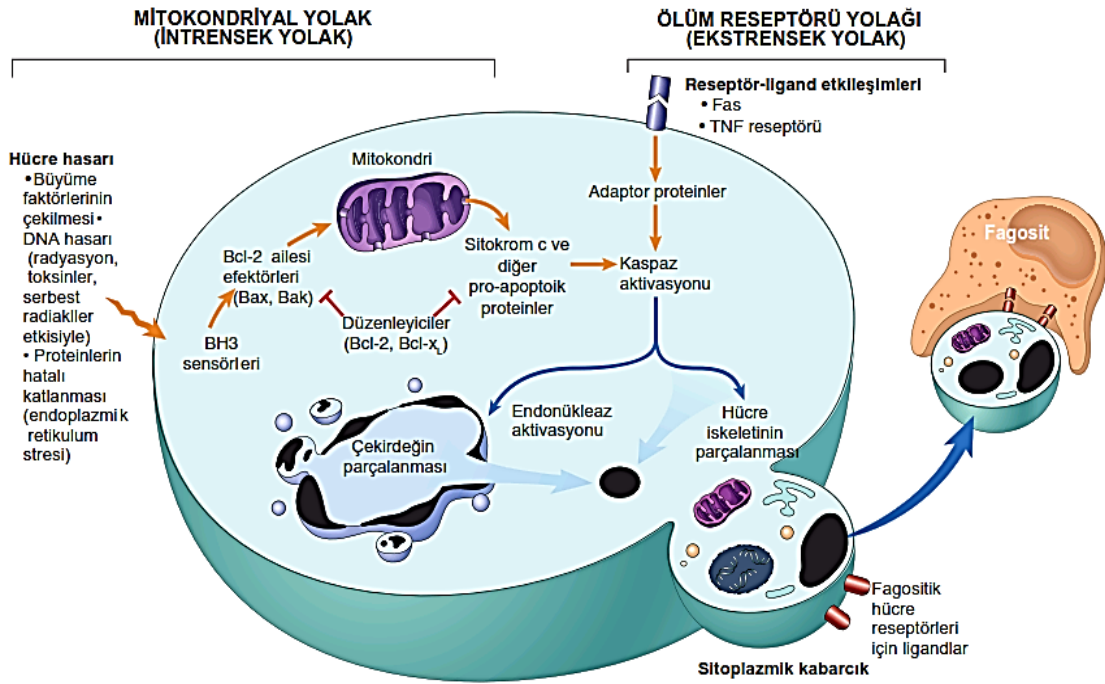
Apoptozun Mitokondri (İntrensek) Yolağı: Apoptoz, mitokondrilerdeki çeşitli proteinler tarafından başlatılır. Bu proteinler, endojen apoptoz inhibitörleri ve sitokrom c'yi nötralize ederler. Hücrenin ölüm ya da yaşamasına, prototipi Bcl-2 olan ve sayısı 20'den fazla olan protein tarafından denetlenen ve mitokondrial geçirgenlikle belirlenmektedir.

Hücreler büyüme faktörlerinden yoksun kaldıklarında, DNA'ya zarar verici etkenler ile karşılaştıklarında veya çok sayıda yanlış katlanmış proteinler biriktiğinde bir çok sensör aktif hale gelir. Bunlar Bcl-2 aile üyelerinin 'BH3 proteinleri'dir. Bu proteinler, Bcl-2 aile üyesine ait pro-apoptotik olan Bax ve Bak proteinlerini aktive eder. Bu proteinler dimerize olurlar ve sonra mitokondri membranına geçip sitokrom c gibi mitokondrial proteinlerin sitoplazmaya geçmesini sağlayan kanallar oluşturmaktadırlar. Yine aynı sensör tarafından anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ve Bcl-x_L genlerini inhibe ederek mitokondrial proteinlerin sitozole geçmesini sağlar. Sitozole geçen sitokrom c, diğer kofaktörler ile kaspaz-9'u aktif hale getirir. Fizyolojik apoptozun inhibitörleri olarak görev alan kaspaz antagonistleri, mitokondriden sitozole geçmiş diğer proteinler tarafından bloke edilirler. Bütün bu olayların sonucu, hücre nükleusunun parçalanması ile sonuçlanan kaspaz dizisinin aktive olmasıyla olmaktadır. Oysa ki, hücreler büyüme sinyalleri almayı sürdürürlerse Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerini sentez etmektedirler. Bu anti-apoptotik proteinlerden biri Bcl-2'nin kendisi diğeri ise Bcl-x_L'dir. Bunlar Bax ve Bak proteinlerin antagonisti olarak görev alırlar ve pro-apoptotik proteinlerin mitokondriden çıkışına engel olurlar. Büyüme sinyallerinden yoksun kalmış hücreler Bax ve Bak aktive etmekle kalmazlar (Şekil 7, 52).

Ayrıca, Bcl-2 ve Bcl-x_L seviyesini de azaltarak hücrenin ölümü yönde değişmesi ve dengenin sağlanmasında rol oynar (52).

Apoptozun Ölüm Reseptörü (Ekstrensek) Yolağı: Hücrelerin çoğunun yüzeyinde apoptozu tetikleyen, ölüm reseptör molekülleri bulunmaktadır. Bunların birçoğu, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin üyesidir. Bu moleküllerin sitoplazma bölgesinde, hücrenin ölümünde rol oynayan diğer proteinler ile etkileşime giren 'ölüm bölgesi' bulunduğundan dolayı bu ismi almışlardır. Tip 1 TNF ve Fas

(CD95), ölüm reseptör prototipleridir. Fas liganları (FasL), aktive olmuş T lenfositlerin membranlarında eksprese olurlar. T hücreleri, Fas taşıyan hedef molekülleri tanıyınca, Fas molekülleri FasL ile çapraz bağlar kurarlar. Fas-FasL, ölüm bölgeleri aracılığıyla adaptör proteinlere bağlanır. Bu çapraz bağlanma, kaspaz-8 enzimini aktive ederek bölgede toplanmasını sağlar. Birçok hücre tipinde, kaspaz-8, Bcl-2 aile üyesi olan pro-apoptotik Bid adlı proteinini bölerek aktive eder ve mitokondriyal apoptoz yolağını beslemektedir. Her iki apoptoz yolağın aktive olmasıyla, hücrelere ölümcül bir son hazırlar. Bazı hücre proteinleri, özellikle kaspaz antagonisti olan FLIP proteinleri, ölüm reseptörünün kaspaz tarafından aktive olmasını önler (Şekil 7, 52).



Şekil 2.7. Apoptoz Mekanizması (52)

Kaspazların Aktivasyonu ve Fonksiyonu: Kaspazlar, apoptoz sürecinde oldukça önemli proteaz enzim ailesinin üyesidir. Kaspaz enzimi, katalitik bölgesinde bulunan sistein aminoasit kalıntısına göre isimlendirilen bir sistein proteazdır. Kaspazlar proenzim şeklinde sentezlenirler. Ancak ihtiyaç olduğunda fonksiyonel proteazlara dönüşerek aktifleşirler (52).

Kaspazların Sınıflandırılması: İnsanlarda kaspaz ailesine ait onbir üye bulunmuştur. Bunların bir kısmı apoptoz sürecinde yer alırlar. Kaspaz 1, sitokin olgunlaşması sürecinde yer almaktadır. Kaspaz 4 ve kaspaz 5 inflamatuvar reaksiyonunda yer alır. Kaspaz 14, derinin gelişmesinde rol oynar. Kaspazların geride kalan kısmı ise apoptozda ya başlangıç ya da efektör grupları arasında yer alır.

Başlangıç kaspazları; 2, 8, 9 ve 10 kaspazlarını içerir. Kaspaz 2-9, kaspaz güçlendirme bölgeleri (CARD) bulunmaktadır. Kaspaz 8-10'da DED gibi karakteristik alanlara sahiptir. Başlangıç kaspazları, inaktif proenzim formları olan, efektör kaspazları bölerek onları aktif hale getirirler.

Efektör kaspazlar, kaspaz 3, 6 ve 7 formlarıdır. Efektör kaspazlar, protein substratlarını hücreyle birlikte proteolitik olarak bölerler. Böylece hücrenin apoptotik ölümüne neden olmaktadır (19).

Kaspaz Kaskadı: Bu süreç, apoptozun başlamasıyla bir kaspazın diğer bir kaspazın ardından proteolitik olarak aktive olmasıdır. Bu prosesi kaspaz inhibitörleri düzenlemektedir. Kaskad; apoptozom, ölüm reseptörleri ve sitotoksik T hücrelerinden salınan granzim B gibi uyarımlarla aktive olabilir. Apoptozom ve ölüm reseptörleri başlangıç kaspazları aktive ederler. Ölüm reseptörleri kaspaz 8 ve kaspaz 10'u aktive ederler. Apoptozom kaspaz 9'u aktive eder. Granzim B, kaspaz 3 ve kaspaz 7 gibi efektör kaspazları aktive eder (19).

Kaspazların Hedefleri: Kaspazların hedefleri, çekirdek ve sitoplazmik proteinlerdir. Çekirdek laminaları ve çekirdekte bulunan yapısal fibröz proteinler kaspazların hedeflerindedir. DNaz, kaspaz tarafından aktive olur. Aktive olan DNaz, çekirdek ve DNA parçası içine girer. DNA, bir endonükleazla parçalara ayrılır ve 'çorap söküğü' modeli meydana gelir. Poli ADP riboz polimerazı da kaspazlar tarafından proteolitik olarak bölünür (19).

Yapılan çalışmalarda, APAP'ın aşırı doz uygulanan farelerde, H&E boyanmış KC kesitlerinde, apoptotik hepatositler morfolojik kriterlerine göre; hücrenin büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve marjinasyonu ve apoptotik cisimler olduğu gösterilmiştir (53).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Hayvan Etik Komitesinden 2016/A-97 nolu onay alındıktan sonra Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen 2016/138 numaralı başvurusu ile İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, 4 aylık *Sprague Dawley* cinsi ve ağırlıkları yaklaşık olarak 300-350 gram arasında değişen 40 erkek rat çalışmaya alındı. Ratlar tel kafeste 12 saat karanlık 12 saat aydınlık siklusu sağlandı. Deneye başlamadan 1 hafta önce, ratlar standart laboratuvar şartları olan 23 ± 2 °C sabit oda sıcaklığında, %50-60 nem oranında ve standart yem ve su verilerek beslendi.

3.1.2. Deneyde Kullanılan İlaçlar

Çalışmamızda asetaminofen hazırlamak için 60 mL distile suda 9 g toz asetaminofen (Sigma, katalog no: A3035, USA) çözdürüldü. Koenzim Q10 (CHEM-IMPEX INT'L INC, katalog no: 00077, USA) uygulanacak grup için 50 µL Tween 80 ve 5mL serum fizyolojik içinde 30 mg koenzim Q10 çözdürüldü. Melatonin (Santa Cruz, katalog no: SC-207848, USA) çözeltisi hazırlamada öncelikle 250 µL etanol içerisinde 30 mg melatonin çözdürüldü daha sonra bu çözelti 5 mL serum fizyolojik içerisinde çözdürüldü.

3.1.3. Serum ALT ve AST Çalışması İçin Kullanılan Kit ve Cihazlar

Rat kanlarına ait serum ALT ve AST tayini için Abbott hazır kit (Abott laboratories IL, USA) kullanılarak Abbott Architect C16000 (Abott laboratories IL, USA) cihazında ölçümü yapıldı.

3.1.4. Serum Nitrik Oksit Analizi İçin Kullanılan Kit ve Cihazlar:

Rat kanlarına ait serum NO ELISA tayini için Rat nitric oxide ELISA Kit (Rel Assay Diagnostics, katalog: EA0703Ra) kullanılarak numuneler hazırlandı ve SYNERGY H1 microplate reader (BioTek, Winooski, USA) ELISA cihazında ölçümü yapıldı.

3.1.5. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Çalışmalar için Kullanılan

Kit ve Cihazlar:

Histokimyasal ve immünohistokimyasal çalışmalar için doku takip cihazı (LEİCA ASP3005), mikrotom cihazı (LEİCA RM2255), H&E boyaması için tam otomatik boyama cihazı (LEİCA ST5020) ve tam otomatik immünohistokimya cihazı (Ventana, Benchmark ULTRA) kullanıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Deney Çalışma Planı

Ratlar, rastgele ve eşit sayıda (n=10) dört gruba ayrıldı. İlaçlar kodlanmış enjektörler ile bütün gruplara intraperitoneal ve gavaj yoluyla uygulandı.

1. Grup (Kontrol): Kontrol grubuna 2 mL/kg distile su gavaj verildi ve 0,5 cc serum fizyolojik (%0,9 NaCl) intraperitoneal uygulandı.

2. Grup (APAP): Hepatotoksisite oluşturulan bu grup için distile suda çözdürülmüş toz asetaminofen tek doz 2 mL/kg gavaj uygulandı.

3. Grup (APAP + CoQ10): Tedavi amaçlı koenzim Q10 verilen grup için öncelikle distile suda çözdürülmüş toz asetaminofen tek doz 2 mL/kg gavaj verildi ve 30 dk sonra serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ve tween 80 çözdürülmüş toz koenzim Q10 tek dozda 0,5 cc intraperitoneal uygulandı.

4. Grup (APAP + MLT): Tedavi amaçlı melatonin verin bu grup için, distile suda çözdürülmüş toz asetaminofen tek doz 2 mL/kg gavaj uygulandıktan 30 dk sonra toz halindeki melatonin önce %5 etanol daha sonra serum fizyolojik (%0,9) çözdürüldükten sonra 0,5 cc intraperitoneal uygulandı.

Gruplara ilaç uygulandıktan 24 saat sonra tüm gruptaki ratlara 0.5 cc'lik enjektöre, 0,1 cc ksilazin ve 0,4 cc ketamine hazırlanıp intraperitoneal uygulanarak genel anestezileri sağlandı.

Batın ve göğüs duvarı açılarak, 5 cc'lik enjektörle intrakardiyak kan alındıktan hemen sonra heparinli tüplere aktarıldı. Tüplere aktarılan kan örnekleri 4000 rpm 7 dk santrifüj edilerek serum kısımları alındı. Serumlar kodlanan ependorf tüplere aktarıldı ve -80 °C'de saklandı. Ratların açılan karın boşluğundan total karaciğerleri alındı. Alınan karaciğer dokuları serum fizyolojik ile yıkandı. Karaciğer dokuları tit kaplarında bulunan %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Daha sonra ratlar sakrifiye edildi.

3.2.2. Histopatolojik Çalışmalar

Karaciğer örneklerinin bulunduğu %10'luk formalin içeren plastik tit kaplarında örnekler 24 saat tespit edildi. Kaplardan çıkarılan karaciğer örnekleri makroskopi laboratuvarında örneklendi. Her bir karaciğer lobundan 2 mm kalınlığından kesitler alındı. Alınan kesitlerin yüzeyi kodlanmış kasetlerin alt yüzüne gelecek şekilde bırakılıp kaset kapağı kapatıldı. Kasetler %10'luk formaldehit içeren kaplara alındı. Kasetlenen dokular, doku takip chazına konuldu. Takip cihazından alınan kasetlenmiş rat karaciğer dokuları parafine gömüldü. Parafin bloklar tam otomatik mikrotom cihazı kullanılarak 3-5µm kalınlığından kesitler alındı. Kesitler tam otomatik boyama cihazında H&E ve Masson Trichrome ile boyandı.

Morfolojik Değerlendirme: Kontrol ve deney gruplarına ait rat karaciğer doku kesitlerindeki histomorfolojik değişiklikler incelendi. Tüm gruplarda sentrolobüler nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve vasküler konjesyon gibi histopatolojik parametreler ışık mikroskopunda semi-kantitatif olarak skorlandı. Bu skorlama, skor 0: yok (Hiçbir yapısal değişikliğin olmaması), skor 1: hafif, skor 2: orta, skor 3: şiddetli olarak değerlendirildi.

3.2.3. İmmünohistokimyasal Çalışmalar

Rat karaciğer doku örnekleri, %10'luk formalin solüsyonunda 24 saat olacak şekilde bekletildi. Doku takip işlemlerinden sonra karaciğer örnekleri parafine gömüldü. İmmünohistokimyasal çalışmanın sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesi için öncelikli olarak kontrol blokları belirlendi. Bölümümüzde caspase3 ve Bax için değerlendirilmiş tonsil dokusuna ait parafin bloklar kontrol bloğu olarak seçildi. Bu kontrol blokları kullanılarak antikorların dilüsyon oranları belirlendi (Tablo 1).

Tablo 3.1. İmmünohistokimya çalışmasında kullanılan antikorlar

| Antikor | Klon | Katalog no | Sellüler lokalizasyon | Dilüsyon | İnkübasyon | Firma |
|----------|------------|-------------------|-----------------------|----------|------------|------------|
| Caspase3 | Poliklonal | (CPP32) Ab-4 | Sitoplazmik | 1:2400 | 32 dk | Thermo |
| Bax | Monoklonal | (B-9): sc-7480 | Sitoplazmik | 1:100 | 1 saat | Santa Cruz |

Rat karaciğerlerine ait parafin bloklara gömülü dokular immünohistokimyasal boyamalar için mikrotomla 3µm kalınlığında kesildi ve pozitif şarjlı lamlara alındı. Kesitler etüvde 70 °C’de 30 dk bekletilerek lamlara yapışması sağlandı.

Caspase3 primer antikorların boyanması tam otomatik immünohistokimya cihazında boyandı. Caspase3 boyama protokolü, deparafinizasyon aşamasında slaytlar 72 °C’den orta sıcaklıklara kadar ısıtıldı, hücre iyileştirme aşamasında ultra conditioner (slaytlar 95 °C’e kadar ısıtıldı ve 8 dakika (hücre iyileştirici) inkübe edildi, 36 dk ULTRA CC1’de çalışıldı, caspase3 primer antikoru 1:2400 oranında dilüe edilerek lamlara damlatıldı ve 32 dk inkübe edildi, ultraWash, arka plan boyama (Bir damla Hematoxylin) 16 dk süreyle inkübe edildi, arka plan boyamasını ilet (Bir damla Blung reagent) 8 dk süreyle inkübe edildi ve tam otomatik immünohistokimya cihazında boyandı.

Bax primer antikorların boyanması tam otomatik immünohistokimya cihazında boyandı. Bax boyama protokolü, deparafinizasyon aşamasında slaytlar 72 °C’den orta sıcaklıklara kadar ısıtıldı, hücre iyileştirme aşamasında, ultra conditioner (slaytı 95 °C’e kadar ısıtın ve 8 dakika (hücre iyileştirici) inkübe edildi, 52 dk ULTRA CC1’de çalışıldı, bax primer antikoru 1:100 dilüe edilerek lamlara damlatıldı ve 1 saat inkübe edildi, arka plan boyama (Bir damla Hematoxylin) 16 dk süreyle inkübe edildi, arka plan boyamasını ilet (Bir damla Blung reagent) 8 dk süreyle inkübe edildi ve tam otomatik immünohistokimya cihazında boyandı.

Değerlendirme: İmmünohistokimyasal boyamalar ışık mikroskopisi (Nikon, ECLİPSE Nİ-U 941264, TOKYO, JAPAN) ile değerlendirildi. Her olguya ait preparatlarda caspase3 ve Bax antikorları için sitoplazmik boyanma esas alındı. Semi-kantitatif skora 20’lik objektifte, skor 0: yok (sitoplazmik immün boyanmanın olmaması), skor 1 (<%25): hafif, skor 2 (%26-50): orta, skor 3 (>%50): şiddetli derece olarak belirlendi.

3.2.4. Biyokimyasal Analiz

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında Abott Architect C16000 cihazı kullanılarak serumda ALT ve AST ölçümleri yapıldı.

3.2.5. Nitrik Oksit Analizi

Rat kanlarına ait kan serum NO analizi ELISA yöntemi ile Rat nitric oxide ELISA Kit (Rel Assay Diagnostics, katalog: EA0703Ra, Türkiye) kullanılarak yapıldı. Anti-rat NO antikorları micro-plate kuyucuklara absorbe edilmiştir. Serumdaki veya

standarttaki NO, micro-plate kuyucuklara absorbe olmuş antikorlara bağlanır. İlk antikorla konjuge olmuş NO, biyotinle konjuge NO antikorlarına bağlanır. Daha sonra yıkama işlemi ile bağlanmamış antikorlar uzaklaştırıldı. Bu ortama Streptavidin-HRP eklenir. Bu kompleks biyotinle konjuge anti-rat NO antikorlarına bağlanır. Daha sonra ortama substrat olarak H₂O₂ ve renk reaktifi ise 4-aminoantiprin ve fenol karışımı eklendi. Ortama asit eklenmesiyle reaksiyon sonlandırılır ve oluşan renk 450'nm'de absorbanlarının ölçümü ile ilgili parametrenin seviyesi belirlendi. NO düzeyi tayini için; 640, 320, 160, 80, 40 ve 20 µmol/L konsantrasyonlarında standartlar hazırlanarak standart grafiği oluşturuldu. Daha sonra SYNERGY H1 microplate reader (BioTek, Winooski, USA) cihazında ölçümleri yapıldı.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS 24.0 for Windows” programı kullanılarak yapıldı. İkili gruplar arasındaki, histomorfolojik bulguların, immünohistokimyasal boyamaların ve biyokimya çalışmalarının ve ELISA analizinde “Mann Whitney U testi” kullanılarak değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi %95 güven aralığında $p < 0,05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Histomorfolojik Bulgular

Çalışmamızın kontrol ve deney gruplarına ait karaciğer dokusunun histomorfolojik (semi-kantitatif) değerlendirme tablo 1’de verilmiştir. Gruplar arasında gözlenen histomorfolojik değişimlerin p değerleri tablo 2’te verilmiştir.

Tablo 4.1. Kontrol ve deney gruplarına ait histomorfolojik değişiklikler

| Gruplar | n | SN | | | | İHİ | | | | HHD | | | | VK | | | |
|-------------------|----|----|---|---|---|-----|---|---|---|-----|---|---|---|----|---|---|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Skor | | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Kontrol | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 9 | 1 | 0 | 0 |
| APAP | 10 | 4 | 4 | 0 | 2 | 4 | 4 | 0 | 2 | 2 | 5 | 3 | 0 | 0 | 6 | 1 | 3 |
| APAP+CoQ10 | 10 | 5 | 2 | 0 | 3 | 4 | 2 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 |
| APAP+MLT | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 9 | 1 | 0 | 0 | 8 | 2 | 0 | 0 |

SN: Sentrolobüler nekroz, İHİ: İnflamatuar hücre infiltrasyonu, HHD: Hepatositlerde hidropik dejenerasyonu, VK: Vasküler konjesyon

Tablo 4.2. Gruplar arasında histomorfolojik değişikliklerin Mann-Whitney U testine göre p değerleri

| Deney Grupları | SN | İHİ | HHD | VK |
|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|
| Kontrol-APAP | p<0.007 | p<0.007 | p<0.001 | p<0.001 |
| APAP- APAP+CoQ10 | p>0.510 | p>0.872 | p>0.574 | p>0.575 |
| APAP- APAP+MLT | p<0.028 | p<0.028 | p<0.015 | p<0.008 |
| APAP+CoQ10- APAP+MLT | p>0.131 | p>0.063 | p<0.011 | p<0.026 |

SN: Sentrolobüler nekroz, İHİ: İnflamatuar hücre infiltrasyonu, HHD: Hepatositlerde hidropik dejenerasyonu, VK: Vasküler konjesyon

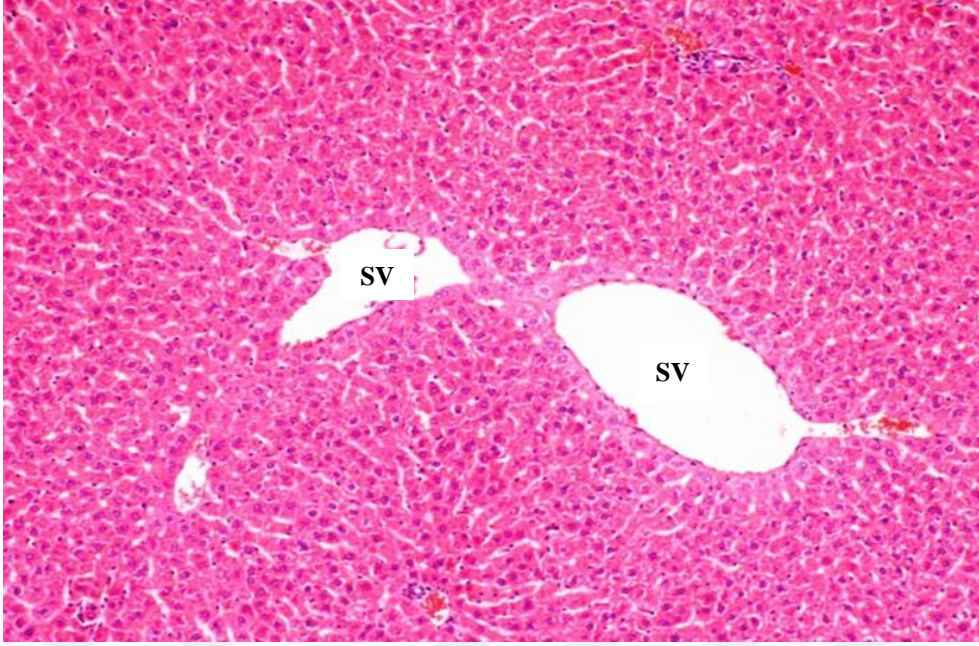
H&E ile boyanmış kontrol grubuna ait rat karaciğer kesitlerinde 1 olguda hafif derecede vasküler konjesyon ve 2 olguda hafif derecede konfluent nekroz dışında başka bir histopatolojik değişiklik izlenmedi (Resim 1).

Asetaminofen verilen gruba ait karaciğer kesitlerinde 4 olguda hafif derecede ve 2 olguda şiddetli derecede sentrolobüler nekroz, 4 olguda hafif derecede ve 2 olguda

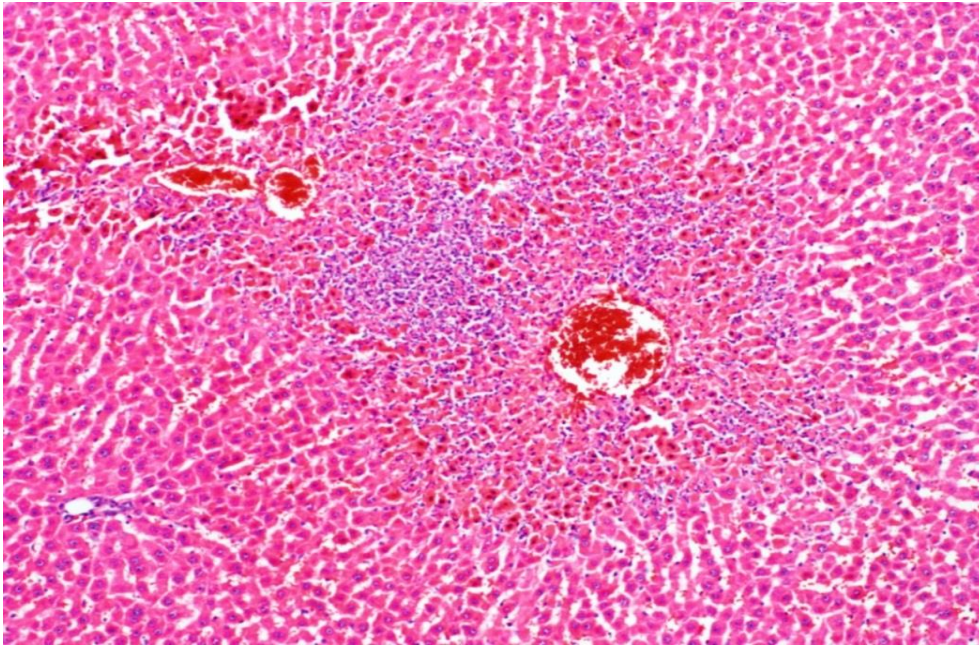
şiddetli derecede inflamatuvar hücre infiltrasyonu, 5 olguda hafif ve 3 olguda orta derecede hepatosit hidropik dejenerasyonu, 6 olguda hafif derecede, 1 olguda orta ve 3 olguda şiddetli derecede vasküler konjesyon ve ayrıca 1 olguda konfluent nekroz görüldü (Resim 2, 3).

Asetaminofen+koenzim Q10 verilen gruba ait karaciğer kesitlerinde 2 olguda hafif ve 3 olguda şiddetli derecede sentrolobüler nekroz, 2 olguda hafif derecede, 1 olguda orta derecede ve 3 olguda şiddetli derecede inflamatuvar hücre infiltrasyonu, 4 olguda hafif derecede, 2 olguda orta derecede ve 3 olguda şiddetli derecede hepatositlerde hidropik dejenerasyonu ayrıca 3 olguda hafif derecede, 3 olguda orta derecede ve 2 olguda şiddetli derecede vasküler konjesyon ve 1 olguda konfluent nekroz izlendi (Resim 4).

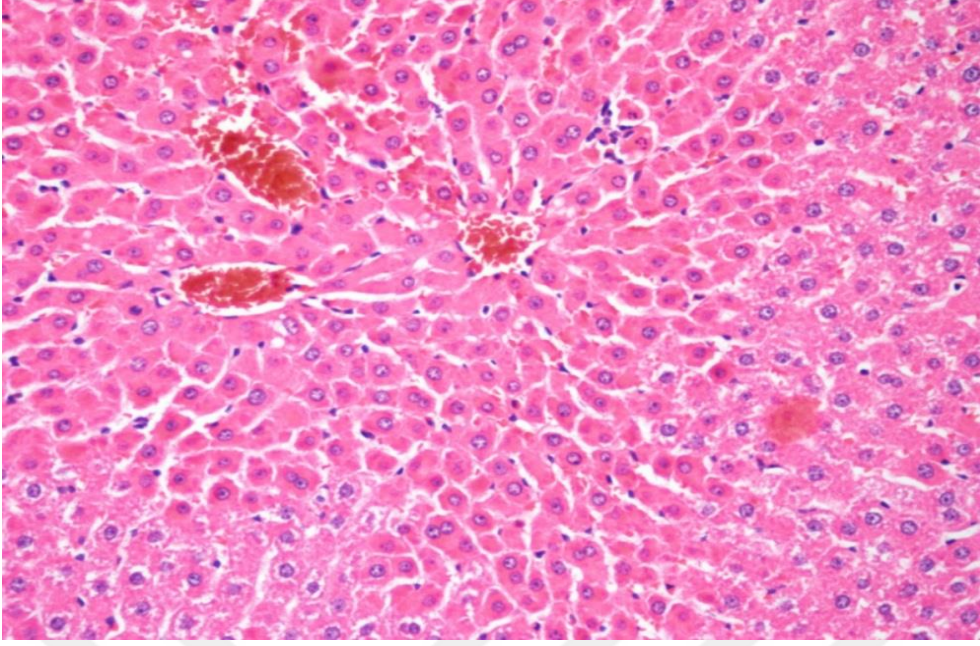
Asetaminofen+melatonin verilen gruba ait karaciğer kesitlerinde 1 olguda hafif derecede hepatositlerde hidropik dejenerasyonu ve 2 olguda hafif derecede vasküler konjesyon ve 1 olguda tek hücre nekrozu dışında başka bir histomorfolojik değişiklik izlenmedi (Resim 5, 6).



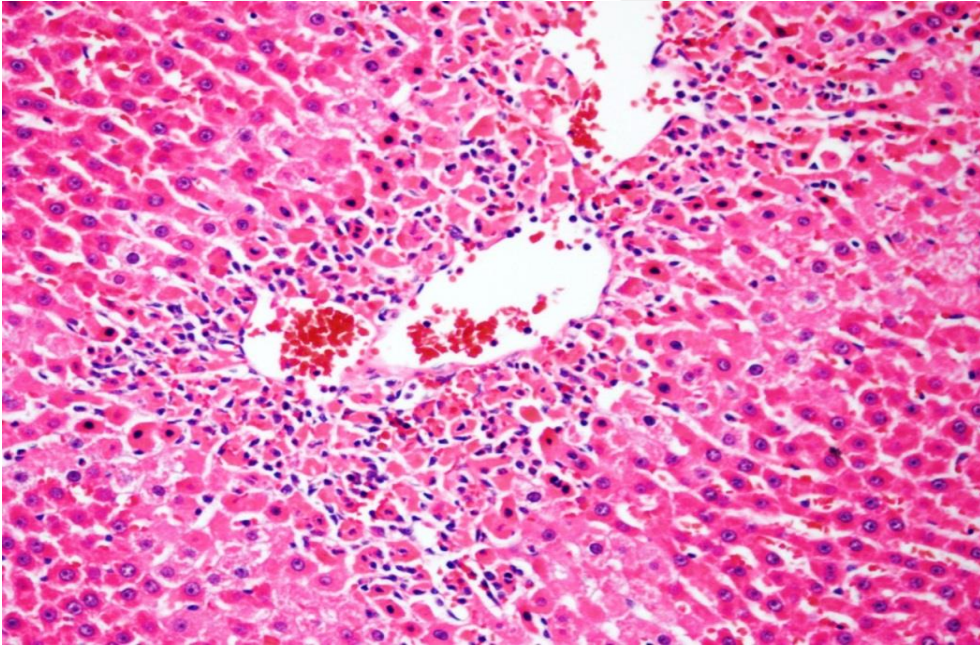
Şekil 4.1. *Kontrol grubu:* Normal KC histolojisi. **SV:** Santral ven (HE, x100).



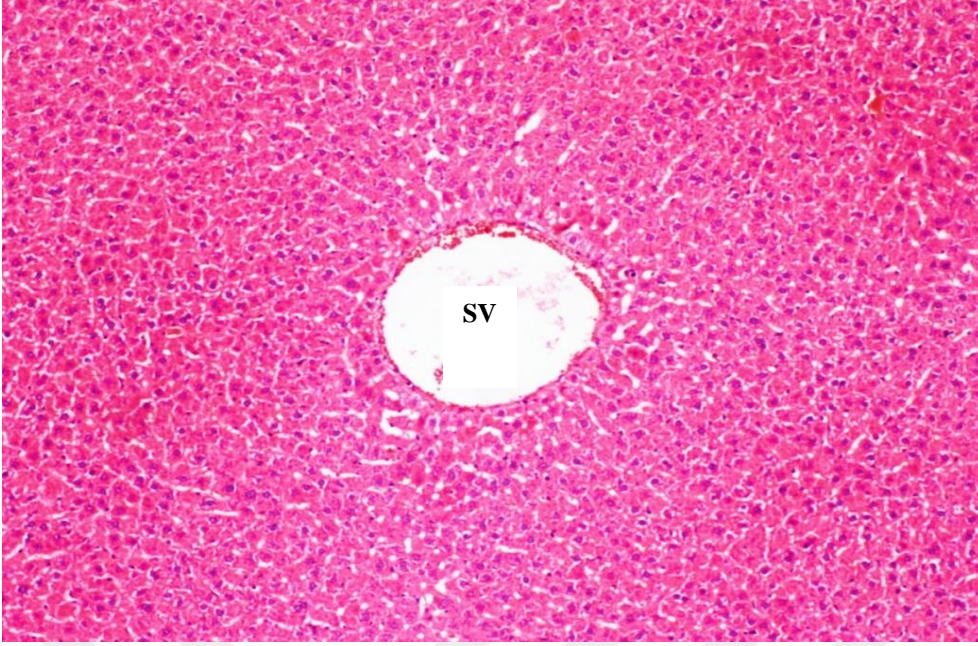
Şekil 4.2. *Asetaminofen grubu:* Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sentrolobüler nekroz, vasküler konjesyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülmektedir (HE, x100).



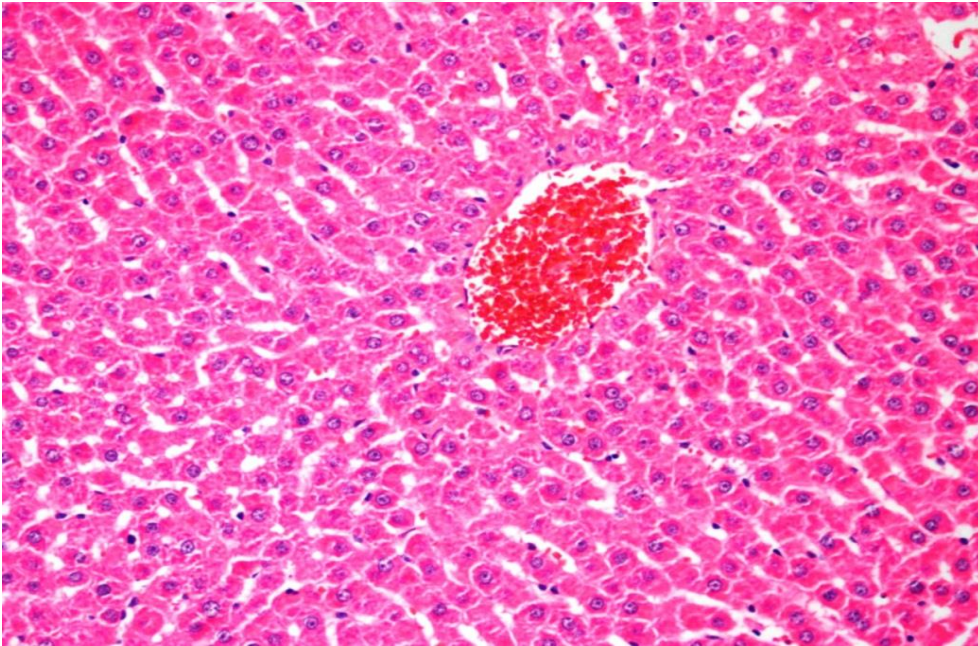
Şekil 4.3. *Asetaminofen grubu*: Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede vasküler konjesyon, hepatositlerde hidropik dejenerasyonu ve konfluent nekroz mevcuttur (HE, x200).



Şekil 4.4. *Koenzim Q10 grubu*: Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sentrolobüler nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatositlerde hidropik dejenerasyonu ve vasküler konjesyon görülmektedir (HE, x200).



Şekil 4.5. *Melatonin grubu:* Sentrolobüler bölgede orta derecede hepatositlerde hidropik dejenerasyonu mevcuttur. **SV:** Santral ven (HE, x200)



Şekil 4.6. *Melatonin grubu:* Sentrolobüler bölgede orta derecede vasküler konjesyon görülmektedir (HE, x200).

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal caspase3 ve Bax antikor boyamaları ışık mikroskopisi ile 20'lik objektife göre değerlendirildi. Hepatositlerde sitoplazmik boyanma esas alındı. İmmünohistokimyasal boyanmaların semi-kantitatif skor değerlendirilmesi tablo 3'te verilmiştir. Gruplar arası immünohistokimyasal boyanmaların p değeri tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Kontrol ve deney gruplarına ait İmmünohistokimyasal boyanma

| Gruplar | N | Caspase3 | | | | Bax | | | |
|------------|----|----------|---|---|---|-----|---|---|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Kontrol | 10 | 3 | 5 | 0 | 2 | 6 | 4 | 0 | 0 |
| APAP | 10 | 0 | 7 | 0 | 3 | 0 | 5 | 4 | 1 |
| APAP+CoQ10 | 10 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 4 | 2 | 3 |
| APAP+MLT | 10 | 2 | 4 | 4 | 0 | 2 | 6 | 2 | 0 |

Tablo 4.4. Kontrol ve deney grupları arasında Mann-Whitney U testine göre p değerleri

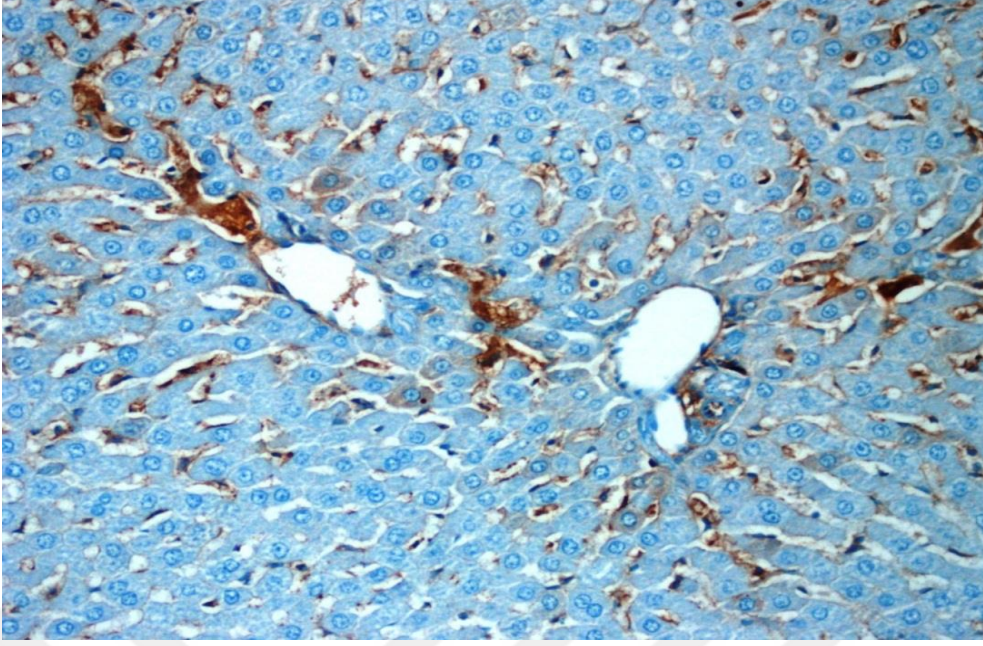
| Gruplar | Caspase3 | Bax |
|---------------------|----------|---------|
| Kontrol-APAP | p>0.181 | p<0.001 |
| APAP-APAP+CoQ10 | p>0.565 | p>1.000 |
| APAP-APAP+MLT | p>0.505 | p<0.033 |
| APAP+CoQ10-APAP+MLT | p>0.178 | p>0.104 |

Caspase3 ile yapılan İHK çalışmada, kontrol grubuna ait rat karaciğer hepatositlerin santral ven çevresinde 5 olguda hafif derece sitoplazmik boyanma, 2 olguda şiddetli derece olarak izlendi. Ayrıca 1 olguda orta kaba granüler boyanma izlendi. Asetaminofen verilen rat karaciğer hepatositlerin 7 olguda santral ven çevresinde caspase3 boyanması hafif, 3 olguda şiddetli sitoplazmik boyanma gözlemlendi. Ayrıca 2 olguda hafif, 1 olguda orta ve 2 olguda şiddetli kaba granüler izlendi. Asetaminofen+Koenzim Q10 verilen rat karaciğer hepatositlerde, 3 olguda hafif, 3 olguda orta ve 3 olguda şiddetli sitoplazmik boyanma izlendi. Asetaminofen+Melatonin

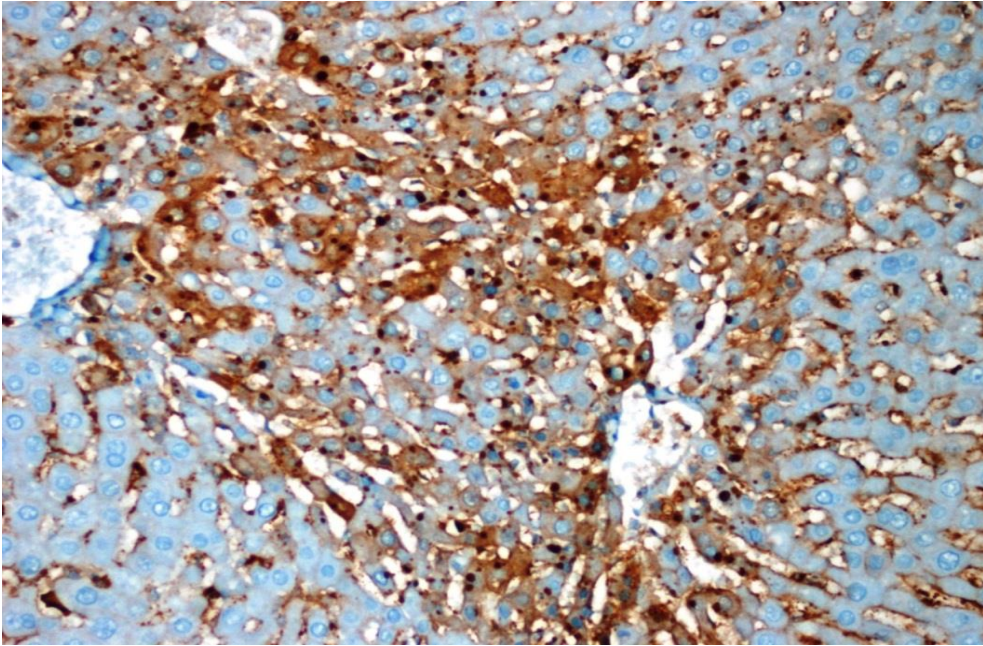
verilen rat karaciğer hepatositlerinde 4 olguda hafif, 4 olguda orta sitoplazmik boyanma görüldü.

Bax ile yapılan İHK çalışmada, kontrol grubuna ait karaciğer dokularında 4 olguda hafif derecede santral ven çevresinde sitoplazmik boyanma izlenmiştir. Asetaminofen verilen rat karaciğer dokularında santral ven çevresinde Bax sitoplazmik boyanması, 4 olguda hafif, 4 olguda orta ve 2 olguda şiddetli olarak izlendi. Asetaminofen+Koenzim Q10 grubuna ait karaciğer örneklerin santral ven çevresinde Bax sitoplazmik boyanma, 4 olguda hafif, 1 olguda orta ve 4 olguda şiddetli olarak gözlemlendi. Asetaminofen+Melatonin grubuna ait rat karaciğer örneklerin 6 olguda hafif ve 2 olguda orta derecede santral ven çevresinde Bax sitoplazmik boyanma izlendi.

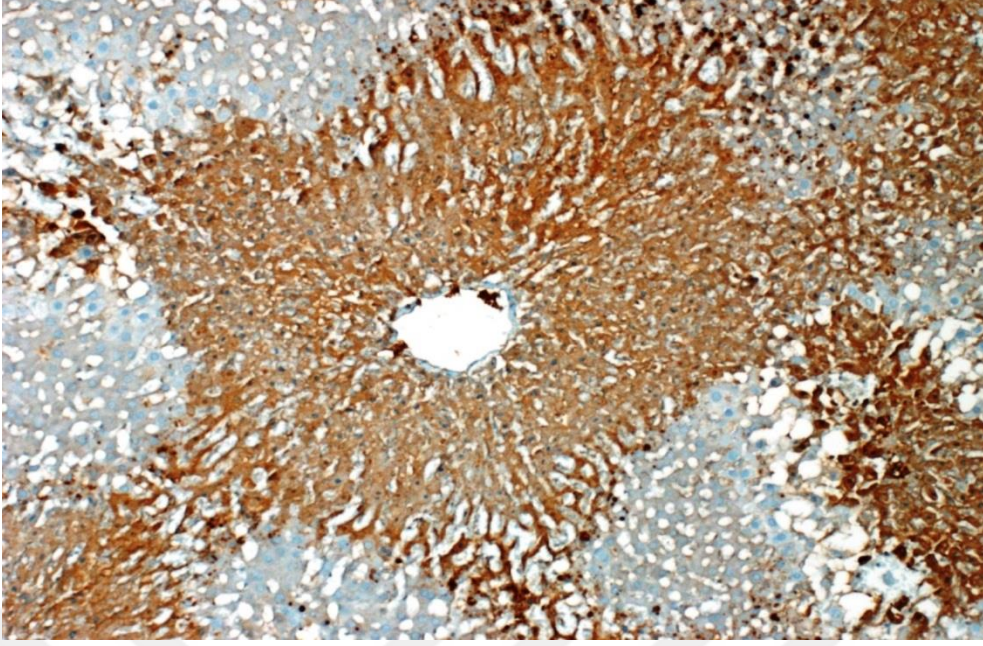




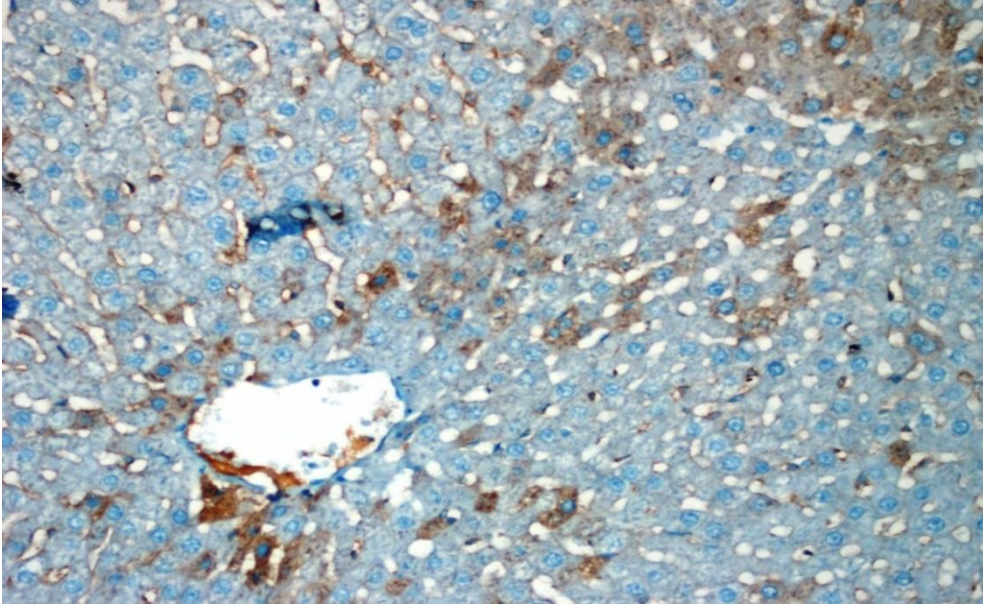
Şekil 4.7. *Kontrol grubu:* Sentrolobüler bölgede hafif derecede sitoplazmik caspase3 boyanma görülmektedir (İHK, x200).



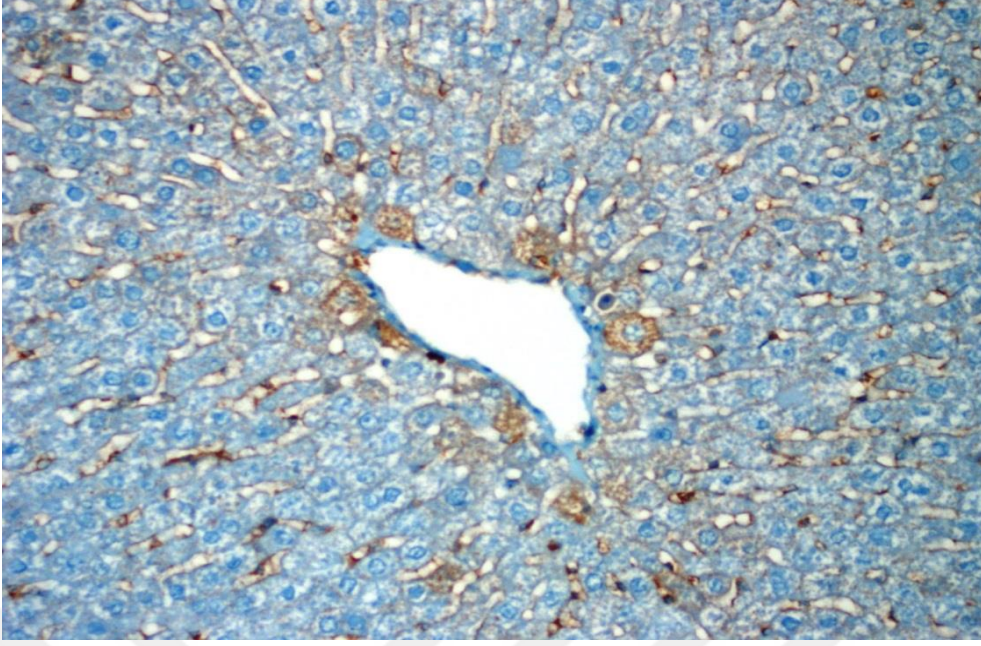
Şekil 4.8. *Asetaminofen grubu:* Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sitoplazmik caspase3 boyanma mevcuttur (İHK, x200).



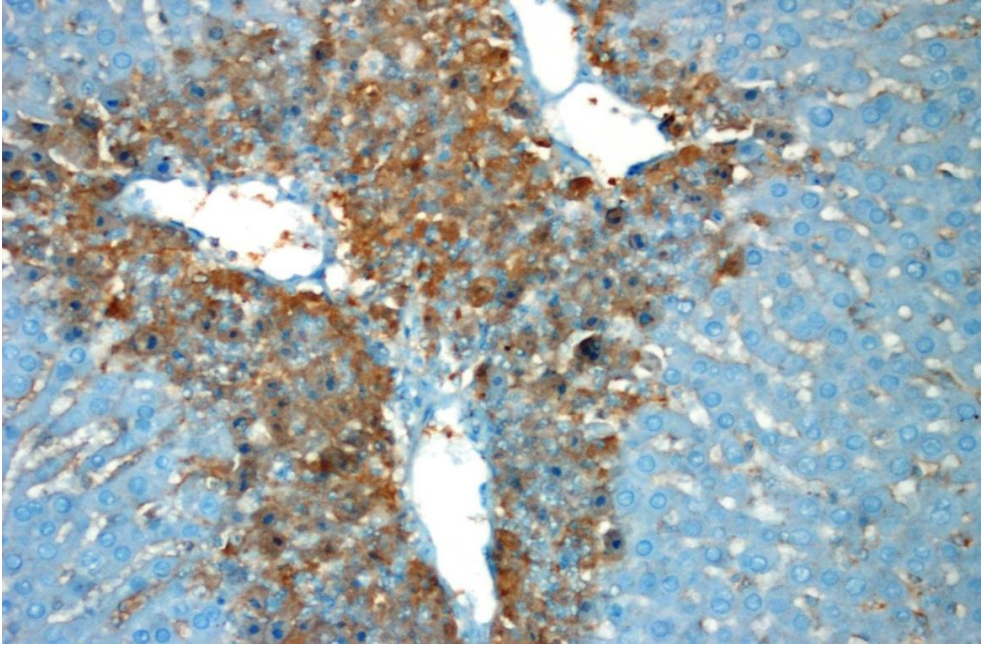
Şekil 4.9. *Koenzim Q10 grubu:* Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sitoplazmik caspase3 boyanma mevcuttur (İHK, x200).



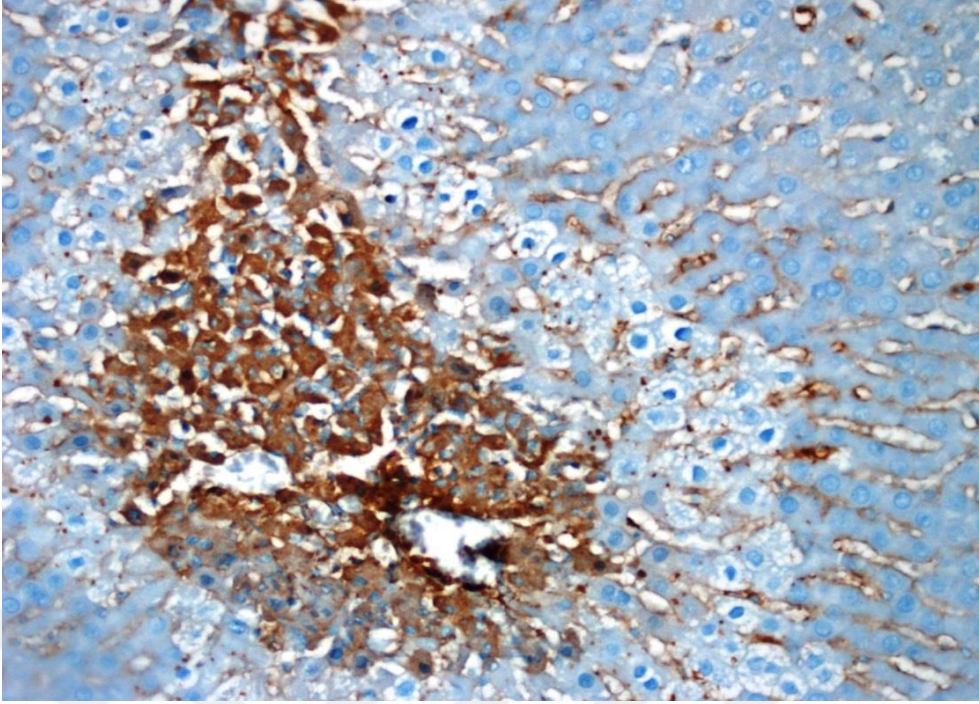
Şekil 4.10. *Melatonin grubu:* Sentrolobüler bölgede hafif derecede sitoplazmik caspase3 boyanma görülmektedir (İHK, x200).



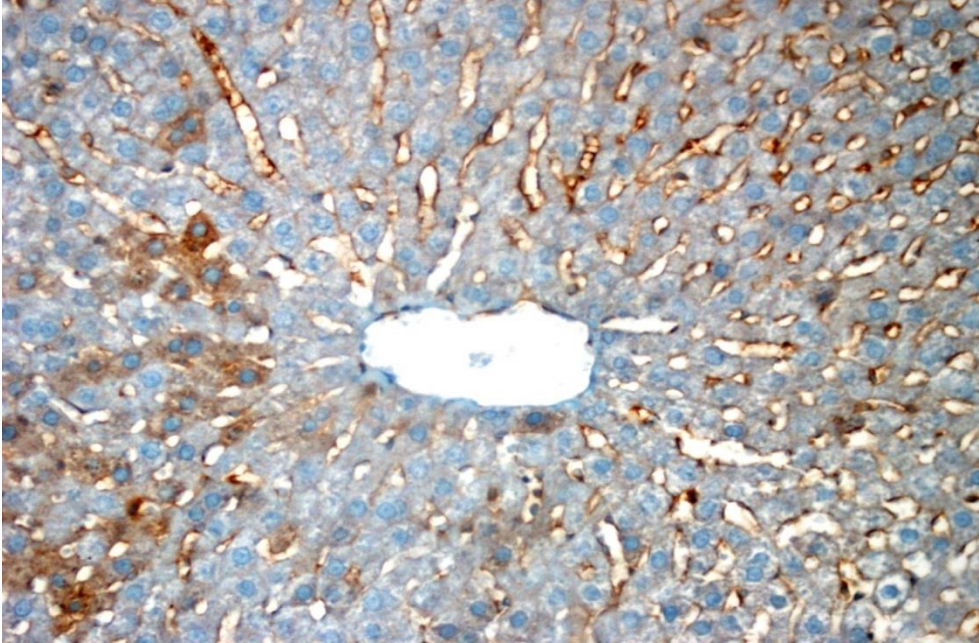
Şekil 4.11. *Kontrol grubu:* Sentrolobüler bölgede hafif derecede sitoplazmik bax boyanma mevcuttur (İHK, x200).



Şekil 4.12. *Asetaminofen grubu:* Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sitoplazmik bax boyanma görülmektedir (İHK, x200).



Şekil 4.13. *Koenzim Q10 grubu:* Sentrolobüler bölgede şiddetli derecede sitoplazmik bax boyanma mevcuttur (İHK, x200).



Şekil 4.14. *Melatonin grubu:* Sentrolobüler bölgede hafif derecede sitoplazmik bax boyanma görülmektedir (İHK, x200).

4.3. Biyokimyasal ve ELISA Analiz Bulguları

Kontrol ve deney gruplarına ait serum örneklerin ALT/AST ve NO p değerleri tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 4.5. Kontrol ve deney grupları arasında Mann-Whitney U testine göre p değerleri

| Gruplar | ALT | AST | NO |
|----------------------------|---------|---------|---------|
| Kontrol-APAP | p>0.744 | p>0.967 | p>0.821 |
| APAP-APAP+CoQ10 | p>0.597 | p>0.940 | p>0.880 |
| APAP-APAP+MLT | p<0.002 | p<0.010 | p>0.070 |
| APAP+CoQ10-APAP+MLT | P<0.049 | p>0.190 | p>0.218 |

ALT: Alanin aminotransferaz, **AST:** Aspartat aminotransferaz, **No:** Nitrik oksit

Biyokimya analizler sonucunda kontrol ve asetaminofen verilen gruplara ait serum örneklerin ALT/AST ve NO düzeyleri karşılaştırıldığında Mann-Whitney U testine göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Asetaminofen ve asetaminofen+koenzim Q10 verilen gruplara ait serum ALT/AST ve NO sonuçları karşılaştırıldığında Mann-Whitney U testine göre istatistiksel olarak anlamlı değildi. Asetaminofen ve asetaminofen+melatonin verilen gruplar karşılaştırıldığında Mann-Whitney U testine göre istatistiksel olarak ALT/AST anlamlı bir fark bulunup ancak NO anlamlı bir fark olmadığı bulundu. Asetaminofen+koenzim Q10 ve asetaminofen+melatonin gruplara ait serum ALT/AST ve NO karşılaştırıldığında Mann-Whitney U testine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

5. TARTIŞMA

A) Serum ALT, AST ve NO düzeyleri

Alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) karaciğer hücreleri olan hepatositlerden salgılanmaktadır (17). ALT, hepatosit sitozolünde, AST ise mitokondriyada üretilmektedir (17).

NO, otokrin ve parakrin bir hücresele molekül olup normal fizyolojik koşullar ile birçok patofizyolojik durumda homeostazın sürdürülmesinde önemli bir etkidir. Nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla üretilen ve yüksek miktarda oksidan kapasiteye sahip bir bileşendir (8). Karaciğerdeki NO'nin etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, bu molekülün sitokrom P450'yi azalttığı (10), DNA sentezini baskıladığı (11), apoptozu ve nekrozu uyardığı (12) gösterilmiştir. Öte yandan, NO'nin karaciğer üzerinde koruyucu etkisi olduğunu gösteren çalışma da bulunmaktadır (13). Bundan dolayı hastalık ve sonuçları ile ilişkili olarak NO'nin zararlı veya yararlı etkileri gösterilebilir.

Literatürde (18) serum ALT ve AST ile NO düzeyleri karaciğer hasarını göstermekte de kullanılabilir. Mevcut çalışmada, kontrol ile asetaminofen grupları karşılaştırıldığında, asetaminofen grubu kontrol grubuna göre serum ALT ve AST düzey ortalamaları 5-6 kat daha yüksek bulundu. Ancak istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Mevcut çalışmada, gruplar arasında serum NO düzeylerinde bir fark yoktu. Ayrıca serum NO ortalamaları birbirine yakın ve istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Yapılan çalışmalarda (16, 18), mevcut çalışmadan farklı olarak, asetaminofen hepatotoksitesinde ALT, AST ve NO düzeylerinin belirgin bir şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir. Ozhasenekler ve ark. (54)'nin yaptıkları çalışmada, mevcut çalışma ile benzer asetaminofen (1gr/kg) tek doz oral yoldan verildi. Asetaminofen grubun serum ALT ve AST düzeyleri arttığı gözlemlendi.

Asetaminofen ile oluşturulan hepatotoksitede serum ALT, AST ve NO düzeyleri düzeltmede çeşitli antioksidanlar kullanılmıştır (54, 55). Mevcut çalışmada antioksidan olarak koenzim Q10 ve melatonin kullanıldı. Bu çalışmada; asetaminofen ile asetaminofen+koenzim Q10 grupları karşılaştırıldığında, asetaminofen+koenzim Q10

grubu asetaminofen grubuna göre serum ALT ve AST düzeyleri 7-8 kat daha yüksek bulundu. Ayrıca istatistiksel olarak da anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Mevcut çalışmadan farklı olarak, Fouad ve Jresat (16) yaptığı çalışmada; asetaminofen ile oluşturulan toksisitede günde iki doz koenzim Q10 verilerek serum ALT, AST ve NO düzeylerinde belirgin bir şekilde azalma olduğu rapor edildi.

Kandil ve ark. (56)'nın parasetamol ile oluşturulan hepatorenal toksisitede koenzim Q10'nun koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada; koenzim Q10 verilen grubun serum ALT, AST ve NO düzeyinde azalma olduğu belirtilmektedir.

Amimoto ve ark. (57)'nin yaptığı deneysel rat çalışma modelinde, asetaminofenin intraperitoneal (400 mg/kg) verildikten 3 saat sonra koenzim Q10 intravenöz (5 mg/kg) verilerek serum ALT düzeyinin azaldığı rapor edilmiştir.

Mevcut çalışmada, asetaminofen ile asetaminofen+melatonin grupları karşılaştırıldığında, asetaminofen grubu asetaminofen+melatonin grubuna göre serum ALT ve AST düzey ortalama değeri 5-6 kat daha yüksek bulundu. Ayrıca istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p<0,05$) ve yapılan çalışmalarla (15, 58) uyumluydu. Asetaminofen+koenzim Q10 grubu ile asetaminofen+melatonin grupları karşılaştırıldığında, asetaminofen+koenzim Q10 grubu asetaminofen+melatonin grubuna göre serum ALT ve AST düzey ortalama değeri 46-59 kat daha yüksek bulundu. Ancak istatistiksel olarak ALT düzeyinde anlamlı fark vardı ($p<0,05$).

B) Histopatolojik Bulgular

Mevcut çalışmada karaciğer dokusunda perisantral alanda histopatolojik olarak sentrolobüler nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve vasküler konjesyon bakıldı. Mevcut çalışmada; kontrol grubu ile asetaminofen verilen grubun histopatolojik parametreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p<0,05$). Bu sonuç, asetaminofenin hepatotoksisite için yeterli dozun kullanıldığını göstermektedir.

Aktaş ve ark. (55)'nin asetaminofen ile oluşturulan deneysel toksik hepatit çalışmasında; parankimal mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu gözlemlendi.

Tsung ve ark. (59)'nin yaptığı çalışmada; asetaminofen verilen grupta hepatik nekroz ve perivenüler inflamasyon saptandığı belirtildi.

Tıpta uzmanlık tez (60) çalışmasında; asetaminofen ile oluşturulan akut karaciğer toksisitesinde hepatositlerde belirgin granüler dejenerasyon, santral ven

çevresinde belirgin nekroz, önemli ölçüde vasküler konjesyon, perivasküler ve portal alanlarda orta düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu gördükleri belirtilmektedir. Ayrıca mevcut çalışmayla uyumluydu.

Kandil ve ark. (56)'nın parasetamol ile oluşturulan hepatorenal toksisitede, parasetamol verilen grubun, kontrol grubuna göre daha fazla nekrotik hücre, piknotik çekirdek ve dejenere yağlı karaciğer hücreleri olduğu rapor edilmiştir.

Ozhasenekler ve ark. (54)'nın yaptıkları deneysel rat çalışmasında; asetaminofen ile oluşturdukları hepatik toksisitede histopatolojik olarak, sentrolobüler nekroz ve inflamasyon saptandığı belirtildi ve mevcut çalışmayla uyumluydu.

Asetaminofen toksisitesinde oluşan hepatik hasarı önlemede çeşitli antioksidanlar kullanılmıştır (54, 55, 61). Mevcut çalışmada koenzim Q10 ve melatonin antioksidan olarak kullanılmıştır. Asetaminofen verilen grup ile asetaminofen+koenzim Q10 verilen grubun histomorfolojik parametreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Hatta asetaminofen+koenzim Q10 grubun karaciğer dokusunda sentrolobüler nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatositlerde hidropik dejenerasyonu ve vasküler konjesyon parametrelerde hepatotoksisitenin arttığı saptandı. Sonuç olarak, asetaminofen ile oluşturduğumuz hasarın koenzim Q10'nun önlemediği gösterildi.

Fouad ve Jresat (16) asetaminofen ile oluşturulan toksisitede koenzim Q10'nin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada; asetaminofen verildikten sonra günde iki doz koenzim Q10 verilerek karaciğer dokusunda sentrolobüler nekroz, balon dejenerasyon, sitoplazmik vakuolizasyon ve sinüozoidal konjesyonu engellediği belirtilmektedir. Mevcut çalışmayla literatür (16) karşılaştırıldığında, asetaminofen ile oluşan toksisitede günde iki doz koenzim Q10'un daha etkili olabilirliğini düşündürmektedir.

Amimoto ve ark. (57)'nin yaptıkları çalışmada; asetaminofen (400 mg/kg) intraperitoneal uygulandıktan 3 saat sonra koenzim Q10 (5 mg/kg) intravenöz uygulanarak karaciğer hasarını önlediği rapor edildi.

Kandil ve ark. (56)'nın yaptığı çalışmada; iki hafta boyunca günde tek doz parasetamol (200 mg/kg) intraperitoneal verildikten sonra koenzim Q10 (40 mg/kg) intraperitoneal olarak verildi. Çalışma sonucunda, parasetamol verilen rat karaciğer dokusunda hasar oluştu. Ancak parasetamol+koenzim Q10 uygulanan rat grubun karaciğer dokusu normal görünüme döndüğü belirtilmektedir. (56). Mevcut çalışmada; asetaminofen verilen grup ile asetaminofen+melatonin verilen grubun histopatolojik parametreler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p<0,05$). Bu

bulgular da gösteriyor ki; asetaminofen ile oluşturulan karaciğer hasarının, melatonin ile geri dönüşlü ve normal karaciğer görünümüne dönebilmektedir. Aynı zamanda serum transaminaz seviyeleri de bu iyileştirici etki ile korele olarak normal seviyelerde tespit edildi.

Hagar ve ark. (62)'nin asetaminofen ile oluşturulan hepatotoksisitede melatonin etkisi çalışmasında; asetaminofen tek doz oral (750 mg/kg) yoldan 7 gün boyunca verildikten sonra melatonin tek doz oral (30 mg/kg) yoldan 7 gün boyunca verildi. Asetaminofen verilen grup ile asetaminofen+melatonin verilen grubun karaciğer kesitleri karşılaştırıldığında perisantral alanda oluşan histopatolojik; nekroz ve hidropik değişikliklerin normale döndüğü belirtildi.

Matsura ve ark. (15)'nin yaptığı çalışmada; asetaminofen (750 mg/kg) tek doz oral yoldan verildikten 4 saat sonra 3 farklı gruba melatonin (10, 50 ve 100 mg/kg) oral yoldan verildi. Asetaminofen ile oluşan hepatik nekrozun, melatonin (100 mg/kg) uygulanan grupta %88, melatonin (50 mg/kg) uygulanan grupta %56 azaldığı izlendi. Ancak melatonin (10 mg/kg) uygulanan grupta nekrozun önlenmediği gösterildi.

Tıpta uzmanlık tez (60) çalışmasında; asetaminofen (1gr/kg) uygulandıktan 20 dk sonra melatonin (10 mg/kg) periton içine enjeksiyon yoluyla verildi. Asetaminofen+melatonin uygulanan grubun karaciğer kesitlerinde düşük düzeylerde hepatositlerde granüler dejenerasyon ve vasküler konjesyon gördüğü belirtilmektedir.

C) İmmünohistokimyasal Bax ve Caspase-3

Asetaminofen toksisitesinde pro-apoptotik Bax ve caspase-3 aktifleşerek apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir (63). Asetaminofen ile oluşturulan hepatotoksisitede apoptoz mekanizmasını belirlemede farklı biyobelirteçler kullanılmıştır (63, 64). Mevcut çalışmada, asetaminofen toksisitesi ile uyarılan apoptozu belirlemede Bax ve caspase-3 kullanıldı. Mevcut çalışmada, kontrol grubu ile asetaminofen grubunun perisantral hepatositlerde Bax boyanması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p=0,001$). Bu mevcut veri ile ilişkili olarak asetaminofenin toksisitesi pro-apoptotik Bax proteini aktive ettiği ve hepatosellüler apoptozu uyardığı gösterildi. Mevcut çalışmada, asetaminofen ile asetaminofen+melatonin grupların Bax boyanması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p=0,03$). Bu bulgular ile ilişkili olarak; melatonin pro-apoptotik Bax proteinin aktivitesini engellediği göstermektedir.

Sun ve ark. (64)'nin asetaminofen ile oluşturdukları hepatotoksisitede, perisantral alanda Bax ve caspase-3 aktivitesinde artış olduğu belirtildi.

Fouad ve Jresat (16) yaptıkları çalışmada; kontrol grubu ile asetaminofen (700 mg/kg) tek oral doz verilen grubun karaciğer kesitleri karşılaştırıldı. Sonuç olarak, asetaminofen verilen grubun sentrolobüler hepatositlerde caspase-3 aktivitesinde artış olduğu göstermektedir.

Fadda ve ark. (65)'nin yaptıkları çalışmada; kontrol grubu ile Asetaminofen verilen grubun karaciğer kesitleri karşılaştırıldı. Kontrol grubunda perisantral alanda Bax boyanması izlenmedi. Ancak asetaminofen verilen grubun perisantral alanda şiddetli Bax boyanması olduğu saptandı.

Lorz ve ark. (67)'nin yaptıkları invitro çalışmada; tübüler epitelyal hücre kültüründe parasetamol ile oluşturulan hasarda Bax ve caspase-3 aktivitesi izlendi (66). Yıang ve ark.'nin yaptıkları invitro hücre kültürü çalışmasında; yüksek dozlarda asetaminofenin caspase-3'ü aktive ettiği rapor edildi.

Liang ve ark. (68)'nin yaptıkları çalışmada; asetaminofen (300mg/kg) intraperitoneal uygulanarak 30 dk sonra farklı dozlarda melatonin (1,25, 5 ve 20 mg/kg) intraperitoneal verildi. Yaptıkları analizler sonucunda, asetaminofen verilen grupta Bax artışı izlendi. Ancak melatonin verilen grupta Bax artışı olmadığı gösterildi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, asetaminofen hepatotoksisiteye neden olmaktadır. Yaptığımız çalışmada histomorfolojik, İHK ve biyokimyasal çalışma sonucunda:

1. Asetaminofen yüksek dozlarda karaciğerde sentrolobüler nekroz oluşturmaktadır.
2. Oluşan hepatik toksisite reversibledir ve tedaviye yanıt vermektedir.
3. Melatonin asetaminofenin neden olduğu hepatotoksisiteyi önlemektedir.
4. Asetaminofen toksisitesini önlemede koenzim Q10'nin koruyucu etkisi yoktu.

Bu veriler göstermektedir ki, asetaminofenin toksisitesini önlemede melatoninin tedavi protokolüne eklenmesi yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Crawford JM, Karaciğer ve Safra Yollar. İçinde: *Hastalığın Patolojik Temeli*, Sav A, Özdamar ŞO, Bahadır B, (Çeviri editörleri). *Robbins and Cotran Pathologic Basis Of Disease*, Kumar V, Abbas AK, Fausto N.7, Ankara, Ayrıntı Basımevi 2009, 878.
2. Arıcı S. Toksik Hepatit, *Pamukkale Tıp Dergisi* 2008, 1: 113-9.
3. <http://emedicine.medscape.com/article/820200-overview> 18 Mayıs 2017
4. Mirhosseini M. A Review on the Most Important Medicinal Herbs Native to Iran with Anti-Acetaminophen Toxicity. *Journal of Global Pharma Technology* 2017, 12-6.
5. Gibson JD, Pumford NR, Samokyszyn VM, Hinson JA. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress. *Chemical research in toxicology* 1996, 9: 580-5.
6. Sumioka I, Matsura T, Yamada K. Acetaminophen induced hepatotoxicity: Still an important issue. *Yonago Acta Med* 2004, 47: 17-28.
7. Wallace JL. Acetaminophen hepatotoxicity: NO to the rescue. *Br J Pharmacol* 2004, 143: 1-2.
8. Gözükar EM. *Biyokimya*, 5. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri 2011: 886-7.
9. Wang JF, Greenberg SS, Spitzer JJ. Chronic alcohol administration stimulates nitric oxide formation in the rat liver with or without pretreatment by lipopolysaccharide. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1995, 19: 387-93.
10. Hodgson PD, Renton KW. The role of nitric oxide generation in interferon-evoked cytochrome P450 down-regulation. *Int J Immunopharmacol* 1995, 17: 995-1000.
11. Nussler AK, et al. Nitric oxide, hepatocytes and inflammation, *Research in immunology* 1995, 146: 671-7.
12. Shinagawa T, et al. Apoptosis in cultured rat hepatocytes: the effects of tumour necrosis factor α and interferon γ . *J Pathol Clin Res* 1991, 165: 247-53.
13. Laskin JD, et al. Prooxidant and antioxidant functions of nitric oxide in liver toxicity. *Antioxid Redox Signal* 2001, 3: 261-71.
14. Elbe H, et al. Therapeutic effects of melatonin and quercetin on carbon tetrachloride-induced cardiac damage in rat, *J Turgut Ozal Med Cent* 2016. 23: 171-6.
15. Matsura T, et al. Mechanisms of protection by melatonin against acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Pineal Res* 2006, 41: 211-9.

16. Fouad AA, Jresat I. Hepatoprotective effect of coenzyme Q10 in rats with acetaminophen toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012, 33: 158-67.
17. H Şentürk , Canbakan B , Hatemi İ. Karaciğer enzim yüksekliklerine klinik yaklaşım, *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*, Gastroenteroloji Klinik Yaklaşım Sempozyum Dizisi, İstanbul 2004, 38: 9-13.
18. Bektur NE, et al. Protective effects of silymarin against acetaminophen-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in mice. *Toxicol Ind Health* 2016, 32: 589-600.
19. Chandar N, Viselli S. Lippincott's Illustrated Reviews: Cell and Molecular Biology. Çeviri: Yanık B. *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Hücre ve Moleküler Biyoloji*, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri 2012: 215-221
20. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*, 2. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitapevi 2016: 147-9
21. <http://chemicaland21.com/lifescience/phar/acetaminophen.htm> 14 Mayıs 2017
22. <https://saglikdanisma.net/tedavi-yontemleri-tedavi-onerileri-saglik-haber/ilaclar/agri-kesiciler/parasetamol.html> 14 Mayıs 2017
23. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (çeviri: Ö. Süzer). *Goodman & Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli*, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri 2009, 21: 1045-50
24. Farrell GC. The hepatic side effects of drugs. *Med J Aust* 1986, 145: 600-4.
25. Botting RM. Mechanism of action of acetaminophen: Is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis* 2000, 31: 202-10.
26. Kayaalp OS. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 11. Baskı. Ankara, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. 2005: 849-50
27. James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Asetaminophen-Induced Hepatotoxicity, *Drug Metabolism and Disposition* 2003, 31: 1499-506
28. Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology 10th Ed. *New York: McGraw Hill Companies Inc* 2007: 591-2.
29. <https://www.infomed.ch/100drugs/paraind.html> 19 Mayıs 2017
30. Mallet C, Eschalier A, Daulhac L. Paracetamol: Update on its Analgesic Mechanism of Action, *InTechOpen* 2017
31. <http://www.familydoctor.co.nz/categories/medication/paracetamol-a-patients-guide> 19 Mayıs 2017

32. Satar S. *Acilde Klinik Toksikoloji*, 1. Baskı. Ankara, Nobel Tıp Kitapevi 2009; 5: 353-65.
33. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Amer Chem Soc* 1958, 80: 2587
34. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 2006, 38: 313-6
35. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Castroviejo DA. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant, *J Pineal Res* 1995, 19: 149-65
36. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Cześnikiewicz-Guzik M, Kwiecień S, Brzozowski T, Bubenik GA, Pawlik WW. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol* 2007, 58: 381-405
37. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh C-S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm. Metab. Res.* 1997, 29: 363-72
38. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007, 42: 28-42
39. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994, 55: 271- 6
40. Reiter RJ, Tan D-X, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 2000, 7: 444- 58
41. Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol* 2007, 54: 1-9
42. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009, 44: 175-200
43. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 917: 376-86
44. Wichmann MW, Zelleneger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Melatonin administration attenuates depressed immune functions after trauma-hemorrhage. *J SurgRes* 1996, 63: 256-62

45. Maestroni GJM. T-Helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res* 1995, 18: 84-9
46. Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Somay A, Ozcan L, Otüncetmur A, Simsek A, Mete F. Melatonin prevents acetaminophen-induced nephrotoxicity in rats. *Int Urol Nephrol* 2009; 41: 695-702
47. Pahari SK, Ghosh S, Halder S, Jana M. Role of Coenzyme Q10 in human life. *Research J. Pharm. and Tech* 2016, 9: 635-40
48. Gueven N, Woolley K, Smith J. Border between natural product and drug: Comparison of the related benzoquinones idebenone and coenzyme Q10. *Redox Biol* 2015, 4: 289-95
49. Fouad AA, Jresat I. Hepatoprotective effect of coenzyme Q10 in rats with acetaminophen toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012, 33: 158-67
50. Hinson JA, et al., Effect of inhibitors of nitric oxide synthase on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Nitric Oxide* 2002, 6: 160-7
51. Halliwell B. Drug antioxidant effects. *Drugs* 1991, 42: 569-605
52. Tuzlalı S, Güllüođlu M. Hücre hasarı, hücre ölümu ve adaptasyonlar. İçinde: *Robbins Temel Patoloji*, Tuzlalı S, Güllüođlu M, Çevikbař U (Çeviri editörleri). *Robbins Basic Pathology*, Kumar V, Abbas A, Aster J. 9. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2013: 6-20
53. Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci.* 2002, 67: 322-8
54. Ozhasenekler A, et al. The efficiency of L-ornithine L-aspartate in hepatic injury due to acetaminophen poisoning in rats. *Healthmed* 2013, 7: 2712-9
55. Aktaş Ö. ve ark. Asetaminofen ile toksik hepatit oluşturulan ratlarda L-karnitinin etkisi. *Turk Biyokim Derg* 2013, 38: 475-82
56. Kandil EI, et al. Attenuation of Hepatorenal Toxicity Induced By Paracetamol and Gama Irradiation with Coenzyme Q10 Co-Supplementation in Male Albino Rats. *Egy. J. Pure & Appl. Sci.* 2015, 53: 35-43
57. Amimoto T. et al. Acetaminophen-Induced Hepatic Injury in Mice: The Role of Lipid Peroxidation and Effects of Pretreatment with Coenzyme Q10 and α -tocopherol. *Free Radic Biol Med* 1995, 19: 169-76

58. Şener G, et al. Protective effects melatonin, vitamin E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. *J Pineal Res* 2003, 35: 61-8
59. Yao HT, et al. Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against acetaminophen-induced liver injury in rats). *BioMedicine* 2015, 5: 15
60. Fedakar Ö. Karnozin ve Melatonin Asetaminofen Aracılı Akut Karaciğer Toksisitesi Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi 2010
61. Şener G, Şehirli AÖ, Dülger GA. Protective effects of melatonin, vitamin E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. *J Pineal Res* 2003, 35: 61-8
62. Hagar HH, Asker ME, El-Gharbawy AS. Effect of melatonin on acetaminophen-induced oxidative stress and hepatotoxicity. *ResearchGate* 2000, 1-11
63. El-Hasan H, et al. Involvement of mitochondria in acetaminophen-induced apoptosis and hepatic injury Roles of cytochrome c, Bax, Bid and caspases. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003, 191: 118-129
64. Sun J, et al. Immunohistochemical Detection of Polyunsaturated Fatty Acid Oxidation Markers in Acetaminophen-Induced Liver Injury in Rats. *J Vet Med Sci* 2012, 74: 141-7
65. Fadda LM, et al. Bax and CD68 Expression in Response to Liver Injury Induced by Acetaminophen: The Hepatoprotective Role of Thymoquinone and Curcumin. *Pak J Zool* 2017, 44: 85-93
66. Lorz C, et al. Role of Bcl-xL in paracetamol-induced tubular epithelial cell death. *Kidney Int* 2005, 67: 592-601
67. Yiang GT, et al. Acetaminophen induces JNK/p38 signaling and activates the caspase-9-3-dependent cell death pathway in human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med* 2015, 36: 485-92
68. Liang LY, et al. Melatonin Protects against Apoptosis-Induced Factor (AIF)-Dependent Cell Death during Asetaminophen-Induced Acute Liver Failure. *PLoS ONE* 2012, 7: 1-11

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Diyarbakır'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Diyarbakır'da tamamladım. 2009-2013 yılları arasında Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden öğrenim görerek mezun oldum. 30 Haziran 27 Eylül 2012 yılında Erasmus Under the Lifelong Learning Programı ile Palacký Üniversitesi, Olomouc, Çek Cumhuriyetinde moleküler sistematik laboratuvarında staj yaptım. 2014 yılından beridir Dicle Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı, Histokimya ve moleküler patoloji laboratuvarında görev yapmaktayım. 2015 yılında İnönü Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Deneysel patoloji yüksek lisans programına başladım.



EK-2. Etik Kurul Onayı



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 28-07-2016
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2016/A-97
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Sprague Dawley
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 200-250gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof.Dr. Nusret AKPOLAT 'ün yürütcüsü olduğu "Asetaminofene bağlı hepatotoksitesinin önlenmesinde CoQ10 ve melatonin etkisi:Deneyssel çalışma." isimli 2016/A-97 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

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

| | | |
|---|--|---|
| Doç.Dr. Mustafa ALADAĞ Başkan | Prof.-Dr. Nigar VARDI Üye | Prof. Dr. Yılmaz ÇİGREMİŞ Üye |
| Vet.Hek.M. Zafer BOZDAĞ Üye | Yrd.Doç.Dr. Mehmet KARATAŞ Üye | Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye |
| Katkılmadı Salih AVCI Sivil Üye | Katkılmadı Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye | |