



**SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE SAğLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA ASETAMİNOFEN İLE OLUŞTURULMUŞ
KARACİğER TOKSİSİTESİNDE MİTOKONDRI
TRANSPLANTASYONUNUN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Öner Ülger

**Tez Danışmanı
Doç.Dr. Mehmet ÖZLER**

**Fizyoloji Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ**

**Bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğünce desteklenmiştir.
Proje numarası: 2019/040**

TEMMUZ / 2019

TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Fizyoloji Ana Bilim Dalında/Programında Öner ÜLGER
tarafından hazırlanan
“Ratlarda asetaminofen ile oluşturulmuş karaciğer toksisitesinde
mitokondri transplantasyonunun etkisinin araştırılması”
başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ /~~OY ÇOKLUĞU~~ ile
DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Gonca AKBULUT
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD.
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum.~~

İMZA



Danışman: Doç.Dr. Mehmet ÖZLER
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD.
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum.~~

İMZA



Üye: Prof.Dr. Necdet KOCABIYIK
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Anatomi AD.
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum.~~

İMZA



Üye: Doç.Dr. Şevin GÜNEY
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD.
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum.~~

İMZA



Üye: Dr.Öğr.Üyesi Ayşe Şebnem İLHAN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Diş Hek. Fak., Fizyoloji AD.
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum.~~

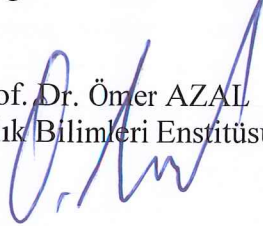
İMZA



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 26/07/2019

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ömer AZAL
Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Tezin Teslim Edildiği Tarih: 26/07/2019

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Öner ÜLGER

26.07.2019

ÖZET

Amaç: Asetaminofen (APAP) günümüzün en yaygın olarak kullanılan ilaçlarından birisidir. Aşırı doz APAP kullanılması karaciğer yetmezliği ve ölüme kadar gidebilen ciddi karaciğer hasarına neden olabilmektedir. APAP toksisitesinin hasar mekanizmalarından bazıları mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, hepatosit nekrozu ve oksidatif strestir. Çalışmamızda bu hasar odaklarına karşı kök hücrelerden izole edilen canlı ve fonksiyonel mitokondriler hasarlı dokulara nakledilerek etkileri incelenmiştir. Bu çalışma ile karaciğer ilaç toksisitesinde üzerinde yeterli çalışma yapılmamış olan mitokondri uygulamasının APAP toksisite tedavisine katkıda bulunup bulunmayacağı araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 42 adet “Sprague-Dawley” cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar basit rastgele örnekleme ile Sham, Kontrol 1, APAP, Kontrol 2, APAP+Mitokondri, APAP+NAC grupları olmak üzere toplam 6 gruba ayrıldı. Hastalık modelini uygulamak için oral gavaj yoluyla toksik dozda (1g/kg) APAP uygulandı. Mitokondri naklinin etkinliği klinik tedavide kullanılan n-asetilsistein (NAC) uygulaması ve kontrol gruplarıyla kıyaslanarak değerlendirildi. Değerlendirme aşamasında histolojik analiz (hematoksilen eozin boyaması), kan örneklerinin biyokimyasal analizleri (AST, ALT, LDH ve ALP) ve oksidatif stres analizleri (MDA, SOD, TAS, TOS ve GSH) ile yapıldı. Ayrıca izole edilen mitokondrilerin canlılık ve fonksiyonelliği değerlendirilmesinin (Mitotracker Red CMXRos” ile Mitokondri Boyaması ve ATP ölçümü) yanında nakledilen mitokondrilerin hedef hücrelere dağılımı da gösterildi.

Bulgular: Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre mitokondrilerin canlı ve fonksiyonel olarak izole edildiği ve nakledildikten sonra hedef hücre içerisine girdiği gösterilmiştir. Toksik doz APAP uygulamasının karaciğer sentriolbüler alanlarında hepatosit nekrozu, dejenerasyon ve inflamasyona neden olduğu, AST, ALT ve LDH seviyelerini artırdığı, GSH miktarını azalttığı ve bu yolla ciddi hasar oluşturduğu görülmüştür. Mitokondri naklinin ise histolojik olarak doku hasarını tamamen engellediği, APAP grubuna göre serum ALT miktarını azaltırken AST ve LDH

seviyelerini anlamlı olarak azaltmadığı, ancak enzim seviyelerinin Sham grubuyla benzer olduğu görülmüştür. NAC uygulaması ise APAP grubuna göre hepatosit nekrozunu engellerken, dejenerasyonu ve inflamasyonu azaltamamış, bunun yanında GSH miktarını önemli ölçüde korumuştur. Mitokondri grubunda inflamasyon NAC grubuna göre anlamlı olarak daha az bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızda mitokondri izolasyon ve nakil sürecinin başarıyla uygulandığı, nakledilen mitokondrilerin hedef hücre içerisine girerek etkinlik gösterdiği değerlendirilmiştir. Toksik doz APAP uygulamasının ciddi doku hasarına yol açtığı, mitokondri naklinin bu doku hasarını önemli ölçüde tamir ettiği ve mitokondri grubuyla karşılaştırıldığında NAC uygulamasının kısmi bir iyileşme sağlayabildiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: APAP, Asetaminofen, karaciğer toksisitesi, mitokondri transplantasyonu, mitokondri nakli, N-asetilsistein, NAC

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MITOCHONDRIAL
TRANSPLANTATION IN ACETAMINOPHEN-INDUCED LIVER
TOXICITY IN RATS
(ABSTRACT)**

Aim: Acetaminophen (APAP) is one of the most widely used drugs today. Overdose APAP intake could cause severe liver damage which could lead liver failure and death. Some of the damage mechanisms of APAP toxicity are mitochondrial dysfunction, hepatocyte necrosis and oxidative stress. In our study viable and functional mitochondria that was isolated from stem cells were transplanted to damaged tissue against those damage mechanism and its effects were examined. With this study it was aimed to search if mitochondrial transplantation that had not studied enough would contribute to APAP toxicity treatment or not.

Materials and Methods: In our study, a total of 42 “Sprague-Dawley male rats were used. The rats were randomly divided into 6 groups. The groups were; Sham, Control 1, APAP, Control 2, APAP+Mitochondria, APAP+NAC. To administer the disease model, toxic doses of APAP (1g/kg) was applied with oral gavage. Efficacy of mitochondrial transplantation was evaluated by comparing with n-acetylcysteine (NAC) treatment used in clinic and with control groups. In the evaluation phase histological analysis (hematoxylin eosin staining), biochemical analysis of blood samples (AST, ALT, LDH and ALP) and oxidative stress analysis (MDA, SOD, TAS, TOS and GSH) were performed. In addition, it was shown that the evaluation of viability and functionality of isolated mitochondria (Mitochondria Staining with Mitotracker Red CMXRos” and ATP measurement) as well as the distribution of transplanted mitochondria to target cells.

Results: According to the results obtained in our study, it was seen that mitochondria were isolated viable and functionally and they were entered into the target cell after transplantation. It was concluded that giving toxic dose of APAP caused severe damage by creating hepatocyte necrosis, degeneration and inflammation in liver

centrilobular areas, increasing AST, ALT and LDH levels and reducing GSH supply. Mitochondria transplantation completely prevented histological tissue damage. While decreasing the serum ALT level, it did not significantly decrease AST and LDH levels according to the APAP group. But it was seen that the enzyme levels were similar to Sham group. NAC administration prevented hepatocyte necrosis according to the APAP group, but could not reduce degeneration and inflammation, besides increased GSH level. Inflammation was found statistically less in mitochondria group according to NAC group.

Conclusion: In our study, it was evaluated that mitochondria isolation and transplantation process was applied successfully and transplanted mitochondria entered the target cell and showed efficacy. It was found that toxic dose APAP caused severe tissue damage, mitochondria transplantation significantly repaired this tissue damage and NAC administration could provide a partial recovery compared to mitochondria group.

Key Words: Acetaminophen, APAP, liver toxicity, mitochondrial transplantation, N-acetylcysteine, NAC

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca değerli bilgi ve engin tecrübeleriyle yol gösteren, eğitim sürecinin her aşamasında sabırla katkıda bulunan ve hiçbir desteği esirgemeyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım değerli Doç.Dr. Mehmet ÖZLER' e,

Tez jürimde yer alan, kıymetli bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum sayın hocalarım Prof.Dr. Gonca AKBULUT, Prof.Dr. Necdet KOCABIYIK, Doç.Dr. Şevin GÜNEY ve Dr.Öğr.Üyesi Ayşe Şebnem İLHAN' a,

Tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan, aynı yolda yürüdüğümüz ve laboratuvar bilgileriyle ışık tutan değerli ağabeyim Gökhan B. KUBAT' a

Tez çalışmamın histolojik değerlendirmesini yapan sayın Uzm.Dr. Ertuğrul Çelik' e

Tez çalışmamın her aşamasında hiçbir şekilde desteklerini esirgemeyen ve büyük katkıda bulunan sayın Uzm.Dr. Zehra Çiçek' e, Serpil Suvay' a, Barbaros Ulusoy' a, Meral SARPER' e ve Hakan YILDIZ' a

Tezimin istatistiklerini yapan ve yorumlanmasına katkıda bulunan sayın Özbeyen ATALAY' a,

Herzaman yanımda olan, öğrenim hayatım boyunca arkamda duran ve destek olan değerli eşim Ceylan ÜLGER' e

Sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Öner ÜLGER
Fizyoloji Doktora Öğrencisi
2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
TABLolar DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. APAP TOKSİSİTESİ.....	4
2.1.1. APAP Kaynaklı Karaciğer Toksisitesi.....	4
2.1.2. APAP Metabolizması ve Toksik Hasar Oluşumunda Metabolizmanın Önemi.....	5
2.1.3. APAP Toksisitesinde Oksidatif Stres.....	6
2.1.4. APAP Toksisitesinde Mitokondriyal Hasar.....	7
2.1.5. APAP Toksisitesinde Hücre Ölümü.....	9
2.1.6. APAP Toksisitesinde Tamir Mekanizmaları.....	10
2.2. APAP TOKSİSİTE TEDAVİSİ.....	11
2.2.1. APAP Toksisitesinde GSH' nin Rolü.....	11
2.2.2. NAC Etki Mekanizması.....	12
2.2.3. İntravenöz NAC Tedavisi.....	13
2.2.4. NAC Tedavisinin Yan Etkileri.....	13
2.2.5. NAC Tedavisi İle İlgili Sorunlar.....	14
2.3. MİTOKONDRI NAKLİ.....	15
2.3.1. Hücrelerarası Doğal Mitokondri Transferi.....	16

1. Hücreler arasında doğal mitokondri transferi	
Mekanizmaları	17
2. Vücutta fizyolojik süreçlerde mitokondri tranferi	18
2.3.2. Mitokondri Nakli Çalışmaları	20
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	23
3.1. DENEY HAYVANLARI	23
3.2. DENEY GRUPLARI	23
3.3. CERRAHİ PROSEDÜR	24
3.4. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ	28
3.5. MİTOKONDRI İZOLASYONU	28
3.6. MİTOKONDRI MEMBRAN BÜTÜNLÜĞÜ ANALİZİ.....	28
3.6.1. Mezenkimal Kök Hücre İçi “Mitotracker Red CMXROS” ile Mitokondri Boyaması ve Konfokal Mikroskop Analizi	29
3.6.2. İzole Edilmiş Mitokondrilerin “Mitotracker Red CMXROS” ile Boyanması ve Konfokal Mikroskop Analizi	29
3.7. İZOLE MİTOKONDRİLERİN HEDEF HÜCREDE DAĞILIMININ GÖSTERİLMESİ.....	29
3.8. MİTOKONDRI ATP ÖLÇÜM ANALİZİ	30
3.9. HİSTOLOJİK ANALİZLER	30
3.10. BİYOKİMYASAL ANALİZLER	31
3.10.1. Kan Örneklerine Ait Ölçümler	31
3.10.2. Karaciğer Doku Örneklerine Ait Ölçümler	32
1. Dokuların Homojenizasyonu	32
2. Protein Ölçümü	32
3. Lipid Peroksidasyonu Düzeyinin Ölçümü (Malondialdehit-MDA).....	33

4. Total Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD).....	33
5. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) Ölçümleri	34
6. Glutasyon (GSH) Düzeyinin Ölçülmesi.....	34
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	34
4. BULGULAR	36
4.1. İZOLE MİTOKONDRI BÜTÜNLÜK VE FONKSİYON ANALİZLERİ.....	36
4.1.1. Mezenkimal Kök Hücre İçi “Mitotracker Red CMXRos” ile Mitokondri Boyaması ve Konfokal Mikroskop Analizi Sonuçları.....	36
4.1.2. İzole Edilmiş Mitokondrilerin “Mitotracker Red CMXRos” ile Boyaması ve Konfokal Mikroskop Analizi Sonuçları.....	37
4.1.3. Mitokondri ATP Ölçüm Sonuçları	38
4.2. İZOLE MİTOKONDRIYERİN HEDEF HÜCRELERE DAĞILIMININ GÖSTERİLMESİ.....	39
4.3. HİSTOLOJİK BULGULAR	40
4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	44
4.4.1. Kan Örneklerine Ait Ölçümlerden Elde Edilen Bulgular....	44
1. AST Ölçümü Bulguları	45
2. ALT Ölçümü Bulguları.....	46
3. LDH Ölçümü Bulguları	46
4. ALP Ölçümü Bulguları	47
4.4.2. Oksidatif Stres Analizlerine Ait Bulgular.....	48
1. MDA Ölçümü Bulguları	49
2. SOD Ölçümü Bulguları	50
3. TAS ve TOS Ölçümleri Bulguları	50

4. GSH Ölçümü Bulguları	54
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇLAR	65
KAYNAKLAR	67



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1: ATP ölçümü standart eğrisi.....	38
Şekil 4.2: Hepatosit nekrozu grafiği.....	42
Şekil 4.3: Dejenerasyon grafiği	43
Şekil 4.4: İnflamasyon grafiği	43
Şekil 4.5: Toplam doku hasarı grafiği	44
Şekil 4.6: Serum AST düzeyleri grafiği	45
Şekil 4.7: Serum ALT düzeyleri grafiği	46
Şekil 4.8: Serum LDH düzeyleri grafiği.....	47
Şekil 4.9: Serum ALP düzeyleri grafiği	48
Şekil 4.10: MDA düzeyleri grafiği.....	49
Şekil 4.11: SOD düzeyleri grafiği	50
Şekil 4.12: TAS düzeyleri grafiği.....	51
Şekil 4.13: TOS düzeyleri grafiği.....	52
Şekil 4.14: GSH düzeyleri grafiği	54

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1: Deney süreci ve mitokondri nakli	26
Resim 3.2: Deneyin sonlandırılması ve doku örneklerinin toplanması	27
Resim 4.1: Mitokondri izolasyonu için kaynak olarak kullanılan kök hücre içi mitokondrilerin konfokal mikroskop ile gösterilmesi.....	36
Resim 4.2: İzole edilmiş mitokondrilerin konfokal mikroskop ile gösterilmesi	37
Resim 4.3: İzole edilmiş mitokondrilerin hedef hücre içerisine girişinin konfokal mikroskop ile gösterilmesi	39
Resim 4.4: Hematoksilen Eozin Boyama Görüntüleri	40

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1: Histopatolojik skorlama tablosu	31
Tablo 4.1: İzole mitokondri ATP miktarları	38
Tablo 4.2: Grupların histolojik skorlaması	42
Tablo 4.3: Karaciğer enzim değerleri	44
Tablo 4.4: Oksidatif stres ölçümlerine ait değerler.....	48
Tablo 4.5: Oksidatif stres derecelendirme tablosu (Rel Assay DiagnoSquare ®)	53



KISALTMALAR

AİF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
APAP	: Asetaminofen
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
BSA	: Bovine Serum Albumin
CAP	: Kloramfenikol
CAT	: Katalaz
CuSO₄	: Bakır Sülfat
CuCl₂	: Bakır-II-Klorür
CYP450	: Sitokrom P450
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DMM	: Dış Mitokondri Membranı
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EF	: Efrapeptin
FGF-2	: Fibroblast Büyüme Faktörü-2
GCS	: γ -Glutamilsistein Sentaz
GİS	: Gastrointestinal Sistem
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
g/L	: Gram/Litre
IL-6	: İnterlökin-6
İMM	: İç Mitokondri Membranı

JNK	: c-Jun N-Terminal Kinaz
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
i.m.	: İntramüsküler
i.v.	: İntravenöz
M	: Mol
MDA	: Malondialdehit
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
ml	: Mililitre
mmol	: Milimol
mmol/g-protein	: Milimol/Gram Protein
mmol/L	: Milimol/Litre
MPT	: Mitokondri Permeabilite Transisyonu
mRNA	: Haberci RNA
miRNA	: Mikro RNA
mtDNA	: Mitokondriyal Deoksiribo Nükleik Asit
NAC	: N-asetilsistein
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF-κB	: Nükleer Faktör-Kappa B
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NAPQI	: N-acetyl-p-benzoquinone imine
Na₂CO₃	: Sodyum Karbonat
Na₂HPO₄	: Disodyum Fosfat
Na₃Sitrat	: Trisodyum Sitrat
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium Klorür
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik Oksit
OH	: Hidroksil Radikali
PBS	: Fosfat Buffer Saline

RAGE	: Receptor For Advanced Glycation Endproducts
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RNA	: Ribozomal Ribonukleik Asit
RNT	: Reaktif Nitrojen Türlerinin
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
S100A4	: S100 Calcium Binding Protein A4
SOD	: Süperoksit Dismutaz
STAT3	: Sinyal Dönüştürücü Ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TCA	: Triklorasetik Asit
TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
TNFR1	: TNF- α Reseptör 1
U/L	: Ünite/Litre
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
XO	: Ksantin Oksidaz
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum Sülfat
μm	: Mikrometre
μmol/L	: Mikromol/Litre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Asetaminofen (parasetamol, APAP) analjezi ve anti-piretik amacıyla günümüzde en yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biridir (1). Amerika Birleşik Devletlerinde insanların %79'unun düzenli olarak APAP kullandığı rapor edilmiştir (2). APAP uygun dozda alındığında son derece güvenli bir ilaç olmasına rağmen, yüksek dozlarda hayatı tehdit eden ciddi karaciğer hasarına neden olabilmektedir (3). Amerika Birleşik Devletleri ve İngiltere'de tüm akut karaciğer yetmezliği vakalarının yaklaşık olarak yarısından sorumlu olduğu bildirilmiştir (4). Bu kadar yaygın bir sorun olmasına bağlı olarak tedavi için kullanılan kaynakların maliyeti de yüksek olmaktadır (5).

APAP toksisitesinde en çok hasar gören organ karaciğerdir. Yüksek doz APAP kullanımına bağlı oluşan karaciğer hasarı karmaşık mekanizmalar sonucu gerçekleşir. Normal koşullarda APAP karaciğerde etkin bir şekilde zararsızlaştırılarak vücuttan atılır. Bu sırada çok az miktarda proteinlerle kovalent bağ kuran zararlı APAP reaktif metabolik ürünü oluşur. Toksik olmayan dozlarda APAP alındığında bu metabolitler glutatyon (GSH) tarafından hızla bağlanarak zararsız hale getirilir. Toksik dozda APAP alındığında ise bu zararlı metabolitler fazla miktarda oluşur ve hepatik GSH'nin tükenmesine neden olur. Bu durum serbest haldeki metabolik ürünlerin diğer hücresel proteinlere (özellikle mitokondriyal proteinler) kovalent olarak bağlanmasına açar. Sonuç olarak hücresel GSH'nin tükenmesi, oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu nedeniyle karaciğer hasarı meydana gelir (6).

APAP toksisitesi tüm dünyada akut karaciğer hasarına bağlı ölüm ve karaciğer yetmezliklerinin en önemli nedeni olmasına rağmen tedavisinde halen eksik noktalar bulunmaktadır. Günümüzde bu toksisitenin klinik tedavisinde en yaygın olarak n-asetilsistein (NAC) kullanılmaktadır. NAC'ın tedavi edici özelliği GSH donörü olarak etki göstermesi ve APAP reaktif metabolik ürününü tamponlaması şeklinde gerçekleşmektedir. Ayrıca NAC elektron donörü olması nedeniyle antioksidan etki göstererek oksidatif hasarı da engellemektedir. Ancak NAC kullanımı ile ilgili tedavi protokolünün net olarak belirlenememiş olması (ekoller arası farklılık), etki mekanizmasının tam olarak ortaya konulamamış olması, yüksek

dozda NAC uygulamasının sebep olduğu yan etkiler gibi bazı sorunlar tedavide kısıtlamalara sebep olmaktadır. Bu sebeple günümüzde halen APAP toksisitesi üzerinde yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (7).

Mitokondri, hücrelerin hemen hepsinde enerji ihtiyacının karşılanması ve homeostatik dengenin sürdürülmesinin yanında daha birçok hücresel aktivitede önemli görevler üstlenir. Vücuttaki bu kritik görevleri nedeniyle, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu geliştiğinde ciddi hastalıklar görülebilmektedir. Kanser, yaşlanma, kardiyovasküler, nörodejeneratif ve metabolik hastalıkları gibi hastalıkların mitokondri fonksiyon bozukluğuyla ilgili olduğu düşünülmektedir (8). Bu nedenle son yıllarda sağlıklı hücrelerden alınmış fonksiyonel mitokondrilerin hasarlı dokuya nakledilmesinin bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir. Hastalıkların tedavisinde mitokondri naklinin etkinliğinin araştırıldığı çalışma sayısı hızla artmaktadır (9-11). APAP toksisitesinde de en önemli mekanizmalarından birisi mitokondriyal hasar ve fonksiyon bozukluğu olduğu için (12), toksik karaciğere fonksiyonel mitokondrileri naklederek doku hasarının önlenilebileceği düşünülmektedir.

Literatür incelendiğinde APAP toksisitesinde mitokondri naklinin etkisi üzerine yok denecek kadar az bilgi olduğu görülmektedir. Biz yaptığımız bu çalışma ile karaciğer APAP toksisitesinde önemli bir hasar odağı olan mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna karşı işlevsel mitokondri naklederek etkilerini incelemeyi amaçladık. Bu amaçla toksik dozda APAP uygulayarak karaciğer hasarı oluşturduğumuz deney hayvanlarında bozulan karaciğer fonksiyonlarını düzeltmek ve doku hasarını tamir etmek için sıçan mezenkimal kök hücrelerinden izole ettiğimiz canlı mitokondrileri naklettik. Canlı mitokondrileri naklederek yaygın ve ciddi tıbbi sorunlara sebep olan ve tedavisinde önemli sorunlar yaşanan APAP toksisitesinde yan etkisiz ve ucuz bir alternatif tedavi yolunun ilk basamağını oluşturmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

Günümüzün en yaygın olarak kullanılan ilaçlarından birisi olan APAP, yan etkileri az olan ve çocuk ve gebelerde güvenle kullanılabilen bir ajandır. Etkileri aspirin ve ibuprofen gibi benzer amaçlarla kullanılan ilaçlar gibidir, ancak anti-inflamatuar özelliği bu ilaçlara göre daha azdır (13).

APAP ilk olarak 1893 yılında von Mering tarafından analjezik bir madde olarak tanımlanmıştır. Ancak 1960' lı yıllara kadar yaygın kullanım alanı bulamamıştır. Çünkü o yıllarda fenasetin isimli anpiretik ve analjezik etkili bir ilaç daha yaygın olarak kullanılmaktaydı. APAP, fenasetinin uzun süreli kullanımda toksik etkilerinin tespit edilmesinden sonra daha çok kullanılmaya başlanmıştır (14). İlerleyen yıllarda yine benzer amaçlarla kullanılan aspirinin gastrointestinal sistem (GİS) kanamaları ve Reye sendromuna neden olduğunun belirlenmesi APAP' ın kullanım alanının yaygınlaşmasına neden olmuştur. Günümüzde Amerika Birleşik Devletleri' nde her hafta 50 milyon yetişkin insanın APAP içerikli ürünler kullandığı ve insanların %79'unun düzenli olarak APAP kullandığı rapor edilmiştir (2,7). Ayrıca İngiltere' de doğum sonrası ilk 6 ayda annelerin %84' üne APAP reçete edildiği bildirilmiştir (15).

APAP' ın son derece yaygın olarak kullanılması ve kolay ulaşılabilir bir ilaç olması, toksik hasara neden olma riskini arttırmaktadır. APAP uygun dozda alındığında (<4g/gün) son derece güvenli bir ilaç olmasına rağmen, yüksek dozlarda karaciğer, böbrek ve beyin gibi organlarda toksik hasara neden olabilmektedir (16). Çocuklarda tek doz 150 mg/kg ya da 250 mg/kg/gün üzeri ve erişkinlerde tek doz 7,5 g/kg veya 12 g/kg/gün üzeri alımlarda APAP toksisitesi gelişebilmektedir (17). Toksik dozda APAP kullanımının karaciğer hasarına ve ölümcül karaciğer yetmezliğine neden olduğu 1960' lı yıllarda tespit edilmiştir (18). Yüksek doz APAP maruziyeti karaciğer sentrilobüler alanlarında nekroza yol açarak ciddi doku hasarı oluşturmaktadır (19). Amerika Birleşik Devletleri ve İngiltere' de tüm akut karaciğer yetmezliği vakalarının yaklaşık olarak yarısından APAP toksisitesinin sorumlu olduğu rapor edilmiştir (4). Bu kadar yaygın bir sorun olmasına bağlı olarak tedavi için kullanılan kaynakların maliyeti de son derece yüksek olmaktadır (20). Amerika

Birleşik Devletlerinde APAP toksisitesinin tedavisinin doğrudan maliyetinin en az 87 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (5).

2.1. APAP TOKSİSİTESİ

2.1.1. APAP Kaynaklı Karaciğer Toksisitesi

İlaçların çoğunun karaciğerde metabolize edilmesi karaciğeri ilaç kaynaklı toksik hasara en açık organ haline getirmektedir. Yüksek dozda APAP alımının karaciğer toksisitesine neden olduğunun ilk defa tespit edildiği vakalardan alınan karaciğer kesitlerinde fulminan tipte karaciğer nekrozu geliştiği görülmüştür. Nekrozun primer olarak sentrilobüler alanlarda geliştiği ve buralarda sınırlı kaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca lökosit infiltrasyonu, eozinofilik hasar ve buna eşlik eden nükleer materyal piknozu meydana geldiği rapor edilmiştir (18).

Tespit edilen bu ilk vakaları takiben ilerleyen dönemde birçok APAP toksisite vakası daha bildirilmiştir. İlk klinik bulgular olarak ilacın alımından 2-3 saat sonra oluşan bulantı, kusma ve sağ üst kadranda karın ağrısı geliştiği görülmüştür. 24 saat içinde karaciğer fonksiyon bozukluğu meydana geldiği ve 3-4 gün içerisinde en üst seviyeye çıktığı bildirilmiştir. Biyokimyasal bulgular ise serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) seviyelerinde ciddi yükseliş, orta şiddette hiperbilirubinemi ve protrombin zamanında artış şeklinde özetlenmiştir. Bunlara ek olarak bazı vakalarda eşlik eden nefrotoksisite görülmüştür (21,22).

APAP kaynaklı hepatotoksisite kemirgenlerde de meydana gelmektedir (23). Fare ve hamster cinslerinin toksisiteye karşı çok hassas, ratların ise daha az hassas olduğu tespit edilmiştir (24). APAP toksisite çalışmalarında ratlar sık olarak kullanılan deney hayvanlarıdır. Ancak metabolizmalarının farklı olmasına bağlı karaciğer metabolizmaları farklılık göstermektedir. Bu nedenle ilaçların toksik olan dozları ratlarda insanlara göre daha farklıdır. Toksik karaciğer hasarı histolojik olarak glikojen kaybı, sentrilobüler hepatositlerde vaküolizasyon ve yaygın nekroz ile karakterizedir. Bu durum sentrilobüler alanların karaciğerin diğer bölgelerinden belirgin bir şekilde ayrılmasına neden olmaktadır. Ayrıca bunlara hepatik konjesyon da eşlik etmektedir (25).

2.1.2. APAP Metabolizması ve Toksik Hasar Oluşumunda Metabolizmanın Önemi

APAP metabolizması karaciğerde karmaşık mekanizmalar sonucu gerçekleşir. APAP, ilaç metabolizma sisteminin faz II reaksiyonları ile detoksifiye edilir. Bu reaksiyonlar sırasında büyük oranda glukuronik asit, sülfat ya da GSH ile konjuge edilerek (glukuronil transferaz, sülfotransferaz ve glutasyon S-transferaz (GST) enzimleri aracılığıyla) idrar yoluyla uzaklaştırılır. Küçük oranda APAP ise sistein ile konjuge edilerek ya da serbest olarak yine idrar yoluyla atılır (26). Çok az miktarda APAP ise fizyolojik koşullarda N-hidroksilaz ya da sitokrom P450 (CYP450) enzimleri ile arile edici reaktif bir son ürün olan “N-acetyl-p-benzoquinone imine” (NAPQI)’ e dönüştürülür (27). NAPQI hücrel proteinlerle kovalent bağ kurarak onlara hasar veren bir metabolittir. Bu molekül CYP450 tarafından APAP’ ın iki elektron oksidasyonu ile oluşturulur (28). APAP metabolizmasında önemli olan CYP450 izoformları CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4 ve CYP2D6’ dır. Bunlar arasında özellikle CYP2E1 önemlidir (29).

Toksik olmayan dozlarda APAP kullanıldığında oluşan bu az miktardaki NAPQI metaboliti GSH tarafından etkin bir şekilde detoksifiye edilir ve safra yoluyla uzaklaştırılır (30). NAPQI’nin GSH ile reaksiyonu çok hızlı bir şekilde kendiliğinden ya da enzim aracılı (GST enzimi) olarak gerçekleşir (31). Toksik dozlarda APAP alındığı zaman ise aşırı miktarda NAPQI oluşur. Fizyolojik koşullarda GSH ile tamponlanarak vücuttan uzaklaştırılan bu metabolit, yüksek miktarda üretildiğinde zararsız hale getirilemez. Çünkü hızla bağlandığı hepatik GSH’ yı tüketir ve hücrel tampon mekanizması bozulur. Bu duruma GSH sentezi inhibisyonu ve sitozolik GST aktivite azalışı da eşlik eder (32). GSH tamponlama mekanizmasının çalışamaz hale gelmesine bağlı olarak serbest halde bulunan NAPQI diğer hücrel yapılara, özellikle de proteinlere kovalent olarak bağlanmaya başlar. Sonuçta oluşan bu kovalent bağlanma karaciğer hasarına ve buna bağlı ölüme kadar giden sorunlara yol açar (33).

APAP toksisitesinde GSH azalması ve NAPQI’ nin mitokondriyal proteinlere bağlanarak mitokondri hasarı oluşturması esas hasar mekanizmasıdır (1). Mitokondriyal hasar oluşması sonucu hücrel enerji ihtiyacı karşılanamaz, mitokondrielerde aşırı reaktif oksijen türleri (ROT) üretilir ve hücre ölüm yolları

aktive olur. GSH azalmasına bağlı olarak ise hücrel antioksidan mekanizmaları yetersiz kalır, ROT süpürülemez ve oksidatif hasar meydana gelir (34,35).

2.1.3. APAP Toksisitesinde Oksidatif Stres

Yüksek doz APAP alımı oksidatif stres kaynaklı doku hasarına neden olabilir. Bu hasar lipid peroksidasyonunda artış, enzimatik antioksidanların (süperoksit dismutaz (SOD) gibi) inhibisyonu ve enzimatik olmayan antioksidanların (GSH gibi) tükenmesi ile kendini gösterir. Vücutta ROT' u süpürmek ve oksidatif stresi engellemek için birçok antioksidan mekanizma bulunur. Bu mekanizmalar karaciğer hasarının engellenmesinde çok önemlidir. Örneğin SOD enzimi temel antioksidan enzimlerden biridir ve oksidatif stresin engellenmesi için gereklidir. SOD enziminin etkinliğinin APAP toksisitesinde azaldığı bilinmektedir. Buna süperoksit üretiminde meydana gelen artışın sebep olduğu ifade edilmektedir (36). Bu yüzden APAP' ın NAPQI' ye dönüştürülmesi sırasında olduğu gibi süperoksit miktarında artışa yol açan enzimatik reaksiyonlar lipid peroksidasyonuna ve oksidatif hasara neden olabilmektedir.

APAP toksisitesinde NAPQI üretimine bağlı olarak hücrel yapıların, özellikle de mitokondrilerin hasarlanması nedeniyle ROT üretimi artar, antioksidan mekanizmalar yetersiz kalır ve oksidatif hasar oluşur. NAPQI, GSH' nın tiyol gruplarını okside ederek disülfid bağları oluşturur. Proteinlerin ise sistein tiyol gruplarını okside ederek proteinler arası çapraz bağ kurar. Bu nedenle hem hücrel yapıların fonksiyonları bozulur hem de önemli bir hücrel antioksidan mekanizma bileşeni olan GSH miktarı azalır (37). Ek olarak glutatyon redüktaz (GR), γ -glutamilsistein sentaz (GCS), katalaz (CAT), SOD ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi çeşitli antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaya neden olduğunu iddia eden araştırmalar vardır (38). Sonuç olarak süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri gibi ROT ve peroksinitrit ve nitrik oksit gibi reaktif nitrojen türlerinin (RNT) üretiminde artış olması ve tampon mekanizmalarının bozulması nedeniyle karaciğerde toksik hasar meydana gelir.

APAP toksisitesinde oksidatif stresin rolünün araştırıldığı ilk çalışmalar Fenton reaksiyonu olarak da bilinen demir içerikli oksidatif stres mekanizması üzerine yapılmıştır. Bu mekanizma süperoksit oluşumuyla başlar ve hidrojen peroksit

oluşumuyla devam eder. Süperoksitler, mitokondride üretilbileceği gibi CYP2E1 ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz gibi bazı enzimler aracılığıyla da üretilir (39,40). Normalde oluşan bu peroksitler GPx enzimi sayesinde GSH ile tamponlanarak zararsız hale getirilir. APAP toksisitesinde hücrel GSH tükendiği için oksidatif moleküller tamponlanamaz. Ayrıca bu süreçlerde peroksitlerin ferroz iyonları ile redükte edilmesi sonucu yüksek derecede reaktif moleküller olan hidroksil radikalleri oluşur. Bu serbest radikaller ise lipid peroksidasyonu, protein ve nükleik asit oksidasyonu gibi olaylar sonucu ciddi ölçüde hasar oluşturabilirler.

Oksidatif stres yalnızca klasik Fenton mekanizması sonucu gerçekleşmez. Aynı zamanda nitrik oksit kaynaklı da oluşabilir. Nitrik oksit çok hızlı bir şekilde süperoksitle tepkimeye girerek peroksinitrit oluşturur. Peroksinitrit, okside edici bir ajan olmasının yanında aynı zamanda nitratlayıcı bir ajandır. Bu ajan da GSH tarafından detoksifiye edilmektedir (41). APAP toksisitesinde peroksinitritler de zararsız hale getirilemez. Sonuç olarak nitrozatif stres ve protein hasarı oluşur (42). APAP kaynaklı toksik hasar gelişmiş olan karaciğerde özellikle sentrilobüler alanlarda nitratlanmış proteinler olduğu tespit edilmiştir. Nitrozatif stres ile karaciğer nekrozu oluşumu arasında pozitif korelasyon vardır (43). Bu nedenle APAP toksisitesinde oksidatif ve nitrozatif stres önemli rol oynamaktadır.

2.1.4. APAP Toksisitesinde Mitokondriyal Hasar

APAP toksisitesinde oluşan kritik değişimlerden birisi de mitokondride meydana gelmektedir. Toksik hasara uğramış hücre mitokondrilerinde morfolojik değişim meydana geldiği elektron mikroskop analiziyle belirlenmiştir (25). APAP'ın arile edici metabolik ürünü olan NAPQI mitokondrilere bağlanarak hasara neden olur. Hasarlanmış mitokondrilerde arilasyona uğramış proteinlerin bulunduğu tespit edilmiştir (35). Bu mitokondrilerin kalsiyum uzaklaştırma fonksiyonunun bozulduğu (44), mitokondriyal solunum zinciri kompleks I ve II'nin inhibe olduğu (45) ve adenosin trifosfat (ATP) seviyesinin azaldığı (46) belirlenmiştir. Benzer bir tablo hepatositlere NAPQI verilmesiyle de oluşturulabilmektedir (47). Bu durum toksik hasar nedeninin NAPQI olduğu bilgisini desteklemektedir.

APAP toksisitesinde mitokondri permeabilite transisyonu (MPT) bir diğer hasar mekanizması olarak belirlenmiştir (48). MPT iç mitokondri membranındaki (İMM) porların açılması ve membranın depolarize olması ile karakterize olan bir tablodur. MPT iç membranın iyonlara ve küçük molekül ağırlıklı maddelere olan geçirgenliğinde ani artışa neden olur. Peroksit gibi bazı oksidanlar ve kalsiyum iyonları MPT' yi artırmaktadır. Toksik hasara uğramış hepatositlerde peroksit ve kalsiyum gibi çeşitli maddelerin arttığı bilinmektedir (49,50). Mitokondriyal membran geçirgenlik değişimlerine İMM depolarizasyonu, eşlenmemiş oksidatif fosforilasyon, mitokondri içindeki iyon ve metabolitlerin dışarı salınması, mitokondriyal ödem ve ATP sentezinde azalma eşlik eder. Sonuç olarak oksidatif stres MPT oluşumuna yol açarken, MPT ise daha fazla oksidatif strese neden olur (7). MPT porlarında 3 çeşit protein olduğu düşünülmektedir. Bunlar adenin nükleotid translokaz, siklofilin-D ve voltaj bağımlı anyon kanallarıdır. Ancak MPT gelişiminde etkin olan esas proteinin siklofilin-D olduğu iddia edilmektedir (51). Siklofilin-D' ye bağlanarak porların açılmasını engelleyen siklosporin A kullanılmasıyla MPT engellenebilmektedir (52). MPT inhibitörlerinin APAP toksisitesindeki etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlardan birinde yine siklosporin A kullanılarak APAP toksisitesinin engellendiği gösterilmiştir. Bu çalışmada siklosporin A' nın GSH azalmasını engelleyemediği, bu nedenle koruyucu etkisinin APAP metabolizması üzerinden olmadığı bildirilmiştir (53). Benzer şekilde NAC kullanımıyla da MPT' nin engellendiği, mitokondri membran potansiyeli kaybının önüne geçildiği ve oksidatif hasarın azaltıldığı rapor edilmiştir (37).

Peroksinitrit, APAP kaynaklı MPT gelişiminde önemli bir oksidandır. Bu molekül NAC gibi tiyoller ile hızla reaksiyona girmektedir. Buna bağlı olarak NAC kullanımı ile APAP kaynaklı MPT' nin engellenebileceği görülmüştür (37). Toksik hasar oluşan hepatosit mitokondrilerinde nitrasyon meydana geldiği de düşünüldüğü zaman bu süreçte peroksinitritin etkili olduğu görülmektedir (54). Hasara uğramış hücrelerde peroksinitrit oluşumunda rol alan nitrik oksit sentaz (NOS) izofromunun indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) değil mitokondriyal nitrik oksit sentaz (mtNOS) olduğu düşünülmektedir (55).

Hücrelerde mitokondri iç membranında MPT porlarının açılmasına bağlı olarak meydana gelen ATP üretim yetersizliği nedeniyle nekroz oluşmaktadır. Ancak

bu süreçte mitokondri dış membranında mitokondriyal apoptozu uyaran kanallar gibi bazı kanalların açılmasıyla apoptotik süreçler de aktif rol alabilmektedir. Bu kanalların sitokrom C, endonükleaz G ve apoptoz indükleyici faktör (AİF) gibi proapoptotik faktörlerin sitozole salınmasına neden olduğu düşünülmektedir (56,57). Mitokondriyal apoptotik kanallar Bcl-2 protein ailesi tarafından hassas bir şekilde düzenlenmektedir. Bu süreçte proapoptotik Bax ya da antiapoptotik Bcl-2 proteinleri gibi çeşitli proteinler önemli rol oynamaktadır (58).

2.1.5. APAP Toksisitesinde Hücre Ölümü

APAP toksisitesinde hücre ölümünün hangi mekanizma üzerinden gerçekleştiği tartışmalıdır. Esas mekanizma olarak nekroz ya da programlı nekroz gösterilmesine rağmen apoptozun da etkin bir mekanizma olduğu ifade edilmektedir (59). Yapılan bir çalışmada hepatositlerin %40' ının apoptoza, %60' ının ise nekroza uğradığı gösterilmiştir (60). Ancak başka bir çalışmada hücre ölümünün esasen nekroz yoluyla olduğu, apoptotik hücre miktarının yok denecek kadar az olduğu ve apoptoz efektörü olan kaspaz 3 miktarının artmadığı gösterilmiştir (61). Sinyal yolağı ve düzenleyici mekanizmalar açısından apoptoz ile nekroz arasında yakından ilişki bulunmaktadır. Bu nedenle hücre ölüm mekanizmasının daha iyi anlaşılmasında mitokondride meydana gelen değişiklikler belirleyici rol oynamaktadır.

APAP kaynaklı hücre ölümüne neden olan mekanizmalar ve sinyal yolları ile ilgili yapılan çalışmalarda önemli bilgilere ulaşılmıştır. Bu çalışmalardan birisinde AİF' in kritik rol oynadığı rapor edilmiştir. APAP toksisitesi sırasında AİF' in mitokondriden nükleusa geçerek deoksiribonükleik asit (DNA) fragmentasyonunu başlattığı ve hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (62). Bir başka çalışmada c-Jun N-Terminal Kinaz (JNK) uzamış aktivasyonunun APAP kaynaklı hücre ölümünde rol oynadığı bildirilmiş (63) ve JNK inhibisyonu ile akut karaciğer hasarının engellenebileceği rapor edilmiştir (64). Ayrıca JNK aktivasyonuna bağlı gelişen mitokondriyal permeabilite artışının inhibe edilmesiyle APAP toksisitesinin önüne geçilebileceği tespit edilmiştir (65). Hücre ölüm mekanizmaları ile ilgili yapılan bir başka çalışmada proapoptotik proteinlerin toksisite oluşumunda oynadığı rol araştırılmıştır. Proapoptotik Bax proteininin mitokondriye geçerek dış mitokondri membranında (DMM) porlar açtığı gösterilmiştir (66). DMM' de oluşan bu porlar

İMM' de oluşan MPT porları birlikte AİF salımına neden olmaktadır. Mitokondriden salınan AİF nükleusa geçerek DNA kırılmasını başlatmaktadır (62).

Tüm bunlara rağmen, APAP toksisitesinde hücre ölüm yolağı ile ilgili varılan sonuçlar hakkında tartışmalı literatür bilgileri bulunmaktadır. Bu durum apoptoz ile nekroz sinyal yolları arasında yakından ilişki olmasına bağlıdır. Kabul gören hücre ölüm şekli nekrozdur. Ancak bir hücrenin nekrozla mı yoksa apoptozla mı öleceğini belirleyen şey ATP miktarıdır. Düşük ATP seviyelerinde nekroz, normal ATP miktarında ise apoptoz yolağı aktif olur. APAP uygulaması sonrası meydana gelen hücre ölümü ATP azalmasına bağlı nekroz ile olur. Bu nedenle ATP prekürsörü ve membran stabilizatörü uygulamasıyla nekroz azaltılırken, hücreler apoptoza yönlendirilebilmektedir (53).

2.1.6. APAP Toksisitesinde Tamir Mekanizmaları

APAP toksisitesinde meydana gelen karaciğer hasarı sonrası homeostazisin tekrar sağlanması bir dizi karmaşık olay sonucu gerçekleşir. Bu süreçte olgun hücrelerde proliferasyon görülür (67). Proliferasyon süreci tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) tarafından yürütülür (68). Tamir mekanizması özellikle TNF- α reseptör 1 (TNFR1) üzerinden sağlanmaktadır ve bu reseptörün devre dışı bırakılması toksik hasarda artışa neden olmaktadır (69). TNF- α ile IL-6 birbiriyle bağlantılı olarak çalışmaktadır. TNF- α IL-6' yı nükleer faktör-kappa B (NF-kB) üzerinden upregüle ederken, NF-kB sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3' ü (STAT3) artırır. STAT3 ise hepatosit rejenerasyonu için gerekli olan birçok geni aktive eder (70). TNF- α hepatosit yenilenmesini bundan farklı mekanizmalar üzerinden de gerçekleştirebilir. Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) üzerinden gösterdiği mitojenik etki buna bir örnektir (71).

Büyüme faktörleri de sitokinlerle yakından ilişkilidir ve benzer şekilde etki göstermektedir. Örneğin vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) hepatositlerin bölünmesini uyarır. Endotel hücrelerden salgılanan ve hücrelerin canlılığının sürdürülmesinde kritik olan VEGF, antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırır ve hücrelerin canlı kalmasını destekler (72). APAP toksisitesinde ve tamir sürecinde VEGF' in rolü çeşitli deney hayvanları üzerinde araştırılmıştır. Bu araştırmalarda toksik doz ilaç uygulaması sonrası VEGF miktarının 30 kat arttığı (73), VEGF ile

tedavi edilen farelerde serum ALT seviyesinin düştüğü ve hepatosit yenilenmesinin arttığı belirtilmiştir (74). Ancak VEGF' in GSH azalması ve NAPQI' nın proteinlere kovalent bağlanması üzerine bir etkisi yoktur. VEGF' in karaciğer hücrelerinin korunmasındaki mekanizması tam olarak belirlenebilmiş değildir. Ancak karaciğer kan akımını ve mikrosirkülasyonu düzenlemesinin muhtemel bir etkisi olabileceği değerlendirilmektedir (7).

2.2. APAP TOKSİSİTE TEDAVİSİ

APAP toksisitesi oluşumuna neden olan olaylar NAPQI üretimi, GSH tükenmesi ve başta mitokondriyal proteinler olmak üzere çeşitli proteinlerin hasarlanmasıdır (75). Bu nedenle APAP toksisitesiyle savaşmak amacıyla GSH kaynağı olabilecek maddeler ve oksidatif stresi azaltabilecek ajanlar üzerinde araştırmalar yapılması düşünülmüştür. Bu amaçla NAC, sisteamin ve methionin gibi NAPQI' yi nötralize ederek hasar oluşumunun önüne geçebilecek çeşitli maddeler üzerinde çalışmalar yapılmıştır (76,77). Bunların yanında melatonin, vitaminler, bitkisel maddeler gibi çeşitli antioksidan özelliği olan ajanlar üzerinde de birçok çalışma yapılmıştır (78,79).

APAP kaynaklı karaciğer toksisitesine karşı günümüzün en etkin antidotu NAC' dir (80). NAC aynı zamanda etkin bir antioksidan olarak da kullanılmaktadır (81). Yapılan birçok çalışmada APAP toksisitesinde NAC' in koruyucu etkinliği değerlendirilmiştir. Ciddi bir APAP toksisite vakasında ilk 10 saat içinde uygulandığında önemli ölçüde karaciğer hasarını engellediği rapor edilmiştir (82). 10 saatten sonra kullanıldığında ise etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir (83). Bu veriler başka çalışmalarla da desteklenmiştir. Bu çalışmalardan birinde NAC tedavisinin ilk 12 saat içinde uygulandığında %80 oranında iyileşme sağladığı, tedavi verilmeyen vakalarda ise iyileşme oranının %48 oranında kaldığı bildirilmiştir (84). Yine NAC tedavisi sayesinde %90 oranında iyileşme sağlandığı bir diğer çalışmada rapor edilmiştir (26).

2.2.1. APAP Toksisitesinde GSH' nın Rolü

APAP toksisitesinde hepatik GSH' nın önemi 1973 yılında Mitchell ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Toksik doz APAP uygulaması GSH miktarını

ciddi oranda azaltmaktadır. Buna bağlı olarak karaciğer GSH miktarının dzenlenmesiyle toksik karaciğer hasarının azaltılabileceği gsterilmiştir (85).

GSH glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir. Sulfidril grubuna sahip olan bu peptit okside formu olan glutatyon disulfite dnuşturulurken cok guclu bir antioksidan ve indirgeyici ajan olarak etki eder. GSH sentezi GCS enzimi ile başlar. GSH sentez hızı ve miktarı sisteinin ortamda bulunmasına bağlıdır (86). Ancak sistein karaciğerde diğer dokulara gbre daha az bulunur (87). Bu nedenle GSH uretiminin desteklenmesi iwin eşitli ajanların kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan molekullerden birisi L-sistein' dir. Yapılan araştırmalarda L-sistein' in bağırsaklarda ve dolaşımda hızla yıkıldığı iwin GSH miktarını onemli olude artırmadığı gsterilmiştir (88). Ayrıca suda ozunebilirliği az olduğu iwin yuksek dozlarda intravenoz olarak uygulaması teknik olarak zordur. Buna rağmen APAP toksisitesinde karaciğer hasarına karşı koruyucu etki gsterdiği rapor edilmiştir (89). GSH sentezini uyarmak amacıyla kullanılan ajanlardan bazıları da sisteamin ve methionindir. Bu ajanlar da APAP toksisitesine karşı etili molekuller olsa da ciddi yan etkileri oluşabilmektedir (90). Bu nedenle zaman iwerisinde *in vivo* olarak sisteine dnuşturuken oncul ajanların kullanılması gundeme gelmiştir. Bu ajanlardan biri olan NAC' ın, karaciğer hasarına karşı etkin koruma sağlayabileceği duşunulmuş ve yapılan çalışmalar sonucunda toksik hasarın engellenmesinde başarılı olduğu ve guvenle kullanılabileceği gsterilmiştir (91).

2.2.2. NAC Etki Mekanizması

NAC, GSH azalmasını engelleyerek birçok toksinin neden olduğu karaciğer hasarını onleyebilmektedir. NAC' ın bu etkisi sistein onculu olarak GSH sentezini artırması yoluyla gerçekleşmektedir. Boylece karaciğer hasarı başlamadan NAPQI' nin detoksifiye edilmesine olanak sağlar. Diğer koruyucu mekanizması ise potansiyel elektron verici olması ve oksidatif stresi azaltmasıdır. APAP toksisitesinde hucreyel redox durumu oksidatif strese doğru kayar ve NAC' ın ROT ve RNT supurucu ozelliği sayesinde bu hasar odağı engellenir (92). Tum bu ozellikleri sayesinde proteinlerin oksidasyon ve arilasyonunu engeller, mitokondriyal enerji uretimini destekler. Boylece karaciğer yetmezliği gelişen hastalarda geç uygulansa bile hasarı

engelleyebilir ve karaciğer fonksiyonlarını düzeltebilir (93). Elde edilen tüm bu bulgular sayesinde NAC APAP toksisitesinin kabul gören antidotu haline gelmiştir.

2.2.3. İntravenöz NAC Tedavisi

Yapılan ilk klinik araştırmalarda NAC tedavisinin APAP toksisitesinde ilk 10 saat içinde uygulandığında tam bir etkinlik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (94). İntravenöz NAC infüzyon tedavisi tolere edilebilen en yüksek dozun, mümkün olan en kısa zamanda yapılması temeli üzerine kurulmuştur. İlerleyen yıllarda elde edilen farmakokinetik veriler ışığında tedavi dozlarında düzenleme yapılması gerektiği gündeme gelmiştir. Çünkü plazma NAC konsantrasyonu en yüksek seviyede olduğunda meydana gelen zararlı reaksiyonların ciddi yan etkilere neden olduğu tespit edilmiştir. Karaciğer hasarının en az görüldüğü NAC plazma pik değeri ise 304-875 mg/L olarak belirlenmiştir (95). Tüm bu verilere rağmen orijinal tedavi protokolü ciddi bir değişiklik yapılmadan 30 yıl boyunca kullanımda kalmıştır.

NAC tedavi dozu hastanın kilosuna göre düzenlenmektedir. Orijinal protokole göre yükleme dozu 15 dakikada 150mg/kg, ardından 4 saatte 50 mg/kg ve sonra 16 saatte 100mg/kg olmak üzere toplamda 20 saat 15 dakikada 300mg/kg' dır (82). Bu tedavi şekli yapılan çeşitli çalışmalar ile test edilmiştir. Halen APAP zehirlenmesi tedavisi olarak dünyanın birçok yerinde standart tedavi olarak uygulanmaktadır (96).

2.2.4. NAC Tedavisinin Yan Etkileri

İntravenöz NAC tedavisi yapılan hastalarda ciddi yan etkiler görülebilmektedir. Bu yan etkilerin önemli bir kısmı alerjik olmayan anaflaksi (immünolojik olmayan mekanizmalarla gelişen anaflaktoid reaksiyon) ve GİS semptomlarıdır (97). Anaflaksi gelişen vakalar kızarıklık, hipotansiyon ve eritem bulguları ile karakterize olarak görülmektedir. Astımlı hastalarda bu tip bulgular 3 kat daha yaygın meydana gelmektedir. Ciddi vakalarda larinks ödemi ve hırıltılı solunum meydana gelebilmektedir. Yan etki mekanizması NAC bağımlı histamin salımı olarak görülmektedir. Ancak mast hücreleri ve bazofiller gibi immün sistem hücrelerinden bağımsız olarak gerçekleştiği için immünolojik anaflaksiden farklıdır (98). Birçok vakada reaksiyonlar kendiliğinden son bulmaktadır. Ciddi vakalarda ise

antihistaminik kullanılması gerekebilmektedir. Meydana gelen bu reaksiyonlar alerji kaynaklı olmadığı için tedavinin güvenle tekrar uygulanması mümkündür. Diğer yan etkileri ise bulantı, kusma, halsizlik ve karın ağrısıdır. GİS semptomları doğrudan yerel etkiler göstermekte ve özellikle oral NAC alımı sonrası görülmektedir. Lokal histamin salımı da bu süreçte önemli olabilmektedir. Gastrointestinal yan etkiler çoğu zaman tedavi gerektirmez. Ancak ciddi vakalarda infüzyonun durdurulması ve antiemetik başlanması gerekebilir (99). Yan etki oluşma oranı NAC tedavisinin uygulama yolu ve zamanına bağlıdır. Örneğin, GİS semptomları oral alım sonrası gelişirken, anaflaktik reaksiyonlar i.v. uygulama sonrası daha yaygındır (100). Ayrıca anaflaktik reaksiyon meydana gelme oranı sindirimden sonra uzun zaman geçmiş ve plazma APAP konsantrasyonu az olan hastalarda en yüksek seviyededir (101).

2.2.5. NAC Tedavisi İle İlgili Sorunlar

Günümüzde uygulanan i.v. NAC tedavisi ile ilgili zaman içerisinde elde edilen bulgular sonucu çeşitli düzenlemeler yapılması gerektiği görülmüştür. Bunlar içerisinde özellikle yan etkilerin azaltılması öne çıkmaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi NAC tedavisinin önemli yan etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle NAC tedavisinin öncelikle çok miktarda APAP almış olan ve akut karaciğer yetmezliği gelişme riski yüksek olan hastalara uygulanması tercih edilmektedir (102). Günümüz tedavi uygulamaları ilk defa Prescott tarafından belirlenmiştir. Buna göre 20 saat 15 dakika içerisinde 300 mg/kg dozunda NAC i.v. yoldan uygulanmaktadır. Her ne kadar bu dozun yüksek olduğu düşünülse de literatürde yeterince doz bağımlı veri bulunmamaktadır. Tedavi protokolünün düzenlenmesi ile ilgili daha fazla çalışmaya ve veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

APAP toksisitesi vakalarında NAC tedavisi sayesinde önemli iyileşmeler sağlanmaktadır. NAC'ın bu koruyucu etkinliğinin mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da, NAPQI'ı direkt zararsız hale getirmesi ya da GSH sentezini artırması muhtemel mekanizmalar olarak ifade edilmektedir (103). NAC tedavisi ile ilgili bir diğer nokta tedavi protokollerinde ülkeler arasında farklılıklar bulunmasıdır. Örneğin, İngiltere' de NAC tedavisi çeşitli risk faktörlerine göre uygulanmaktadır. Tedavide bu risk faktörlerinin varlığına bağlı olarak oluşturulan standart ve yüksek

risk nomogramları kullanılmaktadır. Amerika ve Avustralya’ da ise NAC ihtiyacının belirlenmesinde risk faktörü değerlendirilmesi yapılmaksızın tek bir nomogram kullanılır (83). Ancak dünyanın birçok yerinde risk değerlendirmesinde genel yaklaşım APAP maruziyet süresine göre NAC tedavisinin belirlenmesi şeklindedir. Danimarka’ da ise tüm bunlardan farklı olarak APAP maruziyet süresi dikkate alınmadan rutin olarak tüm hastalara NAC tedavisi uygulanmaktadır (104). Bunlardan farklı olarak ileri tedavi fazında yetersiz NAC uygulaması, tedavi endikasyonlarının net olarak belirlenmemiş olması, NAC’ ın hazırlanması ve uygulanması ile ilgili güçlükler gibi sorunlar bulunmaktadır (96).

2.3. MİTOKONDRI NAKLİ

Mitokondri alfa-proteobakteriyel endosimbiyont kökenli bir hücre organelidir. Bilindiği gibi mitokondri vücut hücrelerinin hemen hepsinde enerji ihtiyacının karşılanması, homeostatik dengenin sağlanması ve bu yolla organizmanın canlılığının sürdürülmesinde anahtar bir rol oynar. Bunlara ek olarak hücre büyümesi ve farklılaşması, apoptozis, demir metabolizması, kalsiyum dengesi, hem sentezi, steroid sentezi, sistemik inflamatuvar cevap oluşumu, nükleusta gen ekspresyonunun düzenlenmesi, nöronlarda sinaptik iletimin sağlanması gibi çok önemli hücresel aktivitelerde görevleri bulunmaktadır (105). Vücuttaki bu yaygın etkileri nedeniyle, mitokondride fonksiyon bozukluğu meydana geldiğinde ciddi sorunlar oluşmaktadır. Hastalıklar, doku hasarları ve yaşlanma gibi çeşitli nedenlerle mitokondrielerin bütünlük, fonksiyon ve homeostatik dengelerinin bozulması sonucu hücreler hasarlanır ve vücut ciddi zararlar görür. Mitokondri fonksiyon bozukluğunun kanser, yaşlanma, kardiyovasküler, nörodejeneratif ve metabolik hastalıkların yanında Kearns-Sayre Sendromu, Melas Sendromu (Mitokondrial Ensefalopati, Laktik asidoz, Stroke-Like episodlar), Pearson Sendromu, Merrf Sendromu (Miyoklonik Epilepsi, Ragged-Red Fibers), mitokondriyal solunum zincir anomalileri gibi patolojik durumlarla ilgili olduğu düşünülmektedir. Günümüzde hastalıkların mitokondri ile olan bağlantısını belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmaktadır (8). Bu nedenle mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına müdahale etmek ve böylece oluşabilecek hasarları engellemek son derece önemli bir hale gelmiştir. Hasarlı mitokondrieleri tedavi ederek, meydana gelecek çeşitli hastalıklara

karşı önlem almak amacıyla yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin kök hücre tedavisinin koruyucu etkilerinden birinin hücelere sağlıklı mitokondri transfer etmesi olduğu iddia edilmiştir (9). Son yıllarda mitokondriyal hastalıkların önlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmalarda kullanılan umut verici bir yöntem ise mitokondri naklidir. Bu yöntemle mitokondriler sağlıklı hücrelerden bütünlüğü korunmuş ve fonksiyonel olarak izole edildikten sonra hasarlı hücelere nakledilmektedir. Sağlıklı mitokondriler hücre içerisine girdikten sonra hem enerji üretimi yoluyla, hem de hasarlı mitokondrilerin yol açtığı hasar mekanizmalarını engelleyerek koruyucu etkinlik göstermektedir (106).

Hücreler doğal fizyolojik süreçlerde kendi iç materyallerini, özellikle de mitokondrilerini alışveriş etme yeteneğine sahiptirler. Bunu diğer hücrelerle direkt temas kurarak, mikroveziküller aracılığıyla veya nanotübüler yapı formasyonlarıyla yaparlar (107). Hücreler arası mitokondri naklinin yapay olarak uygulanması da mümkündür. Bu metot ilk defa 1982 yılından Clark ve Shay tarafından uygulanmıştır (108). Bu gelişme sayesinde yeni bir bilimsel araştırma alanı oluşmuştur. Günümüzde mitokondri nakli yaparak hasarlı hücrelerin kurtarılması amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (109,110). Ayrıca bu araştırmalar sayesinde, doğal süreçler de göz önünde bulundurularak bir takım düzenlemeler yapılmakta ve mitokondri nakli uygulamalarının geliştirilmesi sağlanmaktadır. Bu sayede başarıyla uygulanabilen yapay mitokondri nakli yoluyla hücre solunum, hücre çoğalması ve diğer hücresel süreçler yeniden yapılandırılabilir (111).

2.3.1. Hücrelerarası Doğal Mitokondri Transferi

Vücutta çeşitli fizyolojik süreçlerde hücreler arasında mitokondri transferi yapıldığı bilinmektedir. *In vivo* ve *in vitro* olarak hücreler arası mitokondri transferinin gösterildiği çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların bazılarında mezenkimal kök hücre (MKH) gibi sağlıklı hücrelerden hasarlı hücelere doğru, tamir amaçlı mitokondri transferi yapıldığını gösterilmiştir. Ayrıca mitokondri nakli için en uygun hücre kaynağının MKH olduğu iddia edilmiştir (112). Diğer bazı çalışmalarda ise sadece kök hücrelerin değil farklı hücre türlerinin de mitokondri transferi yapma kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin serebral iskemi sonrası astrositlerden nöronlara doğru mitokondri transferi yapılabilmektedir (113).

Transfer edilen bu mitokondriler hücre içerisine girerek etkinlik göstermektedir. Ayrıca bundan farklı olarak nakledilen mitokondrilerin yıkılarak yeniden üretilmesi de mümkündür (114). Fizyolojik süreçlerde gerçekleştirilen doğal mitokondri transferinin birçok potansiyel faydası bulunmaktadır. Bunlar dikkate alındığında transfer sürecinin yapay olarak gerçekleştirilmesi (mitokondri nakli) sayesinde etkin bir tedavi protokolü oluşturulabileceği düşüncesiyle yapılan araştırmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

1. Hücreler arasında doğal mitokondri transferi mekanizmaları: Hücreler arasında doğal mitokondri transferi yapılabilmesi için öncelikle bir iletişim ağı kurulmaktadır. Bu iletişim ağı, nanotübüler yapılardan oluşan tünellerle veya mikroveziküller içerisinde hücresel materyallerin sekrete edilmesiyle oluşturulur. Mitokondri transferi için tünel nanotüplerinin kullanıldığı, 2004 yılında Rustom ve arkadaşları tarafından sıçan feokromasitoma hücrelerinde tespit edilmiştir (115). Tünel nanotüpleri hücre membranının dışarı doğru uzaması ve diğer hücreden uzanan yapıyla birleşmesi sonucu oluşur. Böylece hücreler arası köprü kurulur. Bu yapı içerisinde esasen F-aktin ve bir taşıma proteini olan MIRO1 (“mitochondrial Rho-GTPase 1”) gibi moleküllerden oluşan bir iskelet vardır. Bu iskelet, köprü boyunca mitokondri ve diğer bazı hücresel paketlerin taşınmasını kolaylaştırır (116).

Tünel nanotüpleri aracılığıyla mitokondrilerin ve diğer hücresel materyallerin transportunu neyin sağladığı henüz anlaşılamamıştır. Bu sürecin nasıl başladığının tespit edilmesi son derece önemlidir. Yapılan bir çalışmada nanotübüler yapıların büyümesinin S100A4 (“S100 Calcium Binding Protein A4”) isimli bir protein ve onun RAGE (“Receptor for advanced glycation endproducts”) isimli reseptörü tarafından yönlendirildiği bulunmuştur. Bu çalışmada hasarlı hipokampal nöron ve astrositlerde p53 aktivasyonu sonucu tünel nanotüpleri oluştuğu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hasarlı hücrelerin sağlıklı olanlara hücresel materyal transferi yaptığı ve işlemlerin tehlike sinyallerine bağlı olarak yürütüldüğü rapor edilmiştir. Ancak mitokodri transferinin bu süreçte yer aldığı ile ilgili bir bulgu elde edilememiştir (117). Başka bir çalışmada ise MKH’ den solunum yetersizliği olan kanser hücrelerine mitokondri transfer edildiği gösterilmiştir. Fakat bu çalışmada da iletimin tek yönlü mü yoksa çift yönlü mü olduğu ve kanser hücrelerinden de MKH’

ye doğru bir materyal taşıyıp taşımadığı belirlenememiştir (118). Bir diğer çalışmada insan endotelial progenitör hücrelerinden neonatal farklılaşmamış kardiyomyositlere doğru nanotüpler aracılığıyla yoğun bir şekilde mitokondri taşındığı gösterilmiştir (119). Tüm bunlara rağmen transfer süreci tam olarak anlaşılammıştır. Örneğin hangi tür hücrelerin nanotüpler geliştirerek transport yapabildiği, transportun yönü, mitokondri transferi için gerekli olan koşullar, MKH'nin neden diğer hücelere göre daha çok nanotübüler yapı oluşturabildiği gibi önemli sorular henüz cevaplanamamıştır.

Hücelerden salgılanan ekstrasellüler veziküller de hücrel materyallerin diğer hücelere taşınmasında rol oynar. Ekstrasellüler veziküller lipid çift tabaka ile çevrili sferoid şekilli yapılardır. Bu yapılar protein, karbonhidrat, lipid, metabolit, ribonükleik asit (RNA) ve mitokondriyal DNA (mtDNA) gibi materyalleri taşıyabilirler (120). Veziküller büyüklük ve üretim özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırma küçükten büyüğe doğru eksozom (30-100 nm), mikrovezikül (100nm-1 µm) ve apoptotik cisim (1-2 µm) olarak yapılmaktadır. Apoptotik cisimler üzerinde yapılan çalışma sayısı azdır. Çünkü fagositlerce hızla yıkılmaktadır (121). Eksozom ve mikroveziküller hakkında ise çeşitli araştırmalar yapılmış ve bu yapıların trombositler, endotel hüceleri, meme kanser hüceleri gibi çeşitli hücelerden salgılandığı gösterilmiştir (122). mtDNA, haberci RNA (mRNA) ve mikro RNA (miRNA) gibi hücrel materyaller eksozomlar içerisinde hedef hücelere taşınabilmektedir. Ancak bu yolla mitokondri taşıma mekanizmaları ve hedef hücelere üzerine etkileri tam olarak ortaya konulamamıştır.

2. Vücutta fizyolojik süreçlerde mitokondri tranferi: Son yıllarda çeşitli hastalıkların tedavisinde hücreyi temel alan araştırmalarda yeni ve umut verici yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır. Bu kapsamda kök hücre nakli ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Ancak kök hücre nakli ile ilgili tümörögenез ve etik kaygılar gibi ciddi sorunlar bulunmaktadır (123). Kök hücre naklinin tedavi edici özelliklerinden birinin, verilen kök hücelerin hasarlı hücelere fonksiyonel mitokondri nakletmesi olduğu ifade edilmektedir (9). Kök hücelere mitokondri naklini muhtemelen ekstrasellüler veziküller aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Yapılan bir araştırma sonucu insan ve fare MKH'lerinden izole edilen eksozomların

hipoksik pulmoner hipertansiyon modelinde tedavi edici etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu eksozomların hücre dışına sekrete edildiği, makrofajlarla birleştiği ve onların oksijen tüketimini artırdığı da gösterilmiştir. Bu yolla makrofajların koruyucu etkinliğini artırabilmektedir (124).

Bazı hücreler, özellikle MKH' ler, mitokondrilerin yeniden programlanması amacıyla da kullanılabilirler. Hücrelerin bu etkilerini mitokondri transferi yoluyla hasarlı mitokondrilere sağlam mtDNA naklederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Bu sayede mitokondriyal membran bütünlüğüne ve ATP üretimine katkıda bulunabilmektedir. Mitokondriler koruyucu etkilerini göstermek için reseptör ya da eşleşmiş proteinlere ihtiyaç duymazlar (125). Oysa sitokin, miRNA, transkripsiyon faktörleri gibi diğer mekanizmalar ise hücre büyümesi, farklılaşması gibi hücresel süreçleri uyararak için özgün sinyal yollarını kullanmak zorundadırlar. Eksojen mitokondriler hedef hücre içerisine girdikten sonra solunum yapmaya başlar ve diğer mitokondrilerle füzyon yapar. Bu nedenle mitokondrilerin bütünlük ve fonksiyonelliğinin korunması gerekmektedir. Nanotüpler ya da mikroveziküller aracılığıyla mitokondri taşınması bu koruma görevinin yerine getirilmesi açısından çok önemlidir.

Mitokondri transferi işlemi özellikle sinir sisteminde önemli mekanizmalara aracılık etmektedir. Örneğin bu yolla hem sağlıklı mitokondriler hasarlı nöronlara ulaştırılabilmekte hem de işlevsiz mitokondrilerin yıkılmasına olanak sağlanmaktadır. Bu işlem sayesinde yalnız hasarlı hücre kurtarılmakla kalmaz, aynı zamanda işlevsiz mitokondriler diğer hücrelere gönderilerek geridönüşüme tabi tutulurlar. Bu işleme transmitofaji adı verilir. Transmitofaji sırasında içerisinde işlevsiz mitokondrilerin de bulunduğu hücre materyal sinir hücrelerinden dışarı atılır. Bu materyal astrositler tarafından alınarak geri dönüştürülür. Transmitofaji işleminin ne amaçla yapıldığı tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu süreci fokal akson hasarının başlattığı ve hasarlı mitokondrilerin nöron gövdesine geri taşınmasının enerji kaybına neden olacağı için özelleşmiş astrositlerce bu mitokondrilerin temizlendiği düşünülmektedir (114). Astrositler nöronların tamir ve korunmasından sorumludur. Bu görevlerini hücre dışı mikroveziküller içerisinde mitokondri transferi yapmak gibi bazı mekanizmalar üzerinden yaparlar. Bu veziküller içerisinde aynı zamanda VEGF, fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) gibi

bazı faktörler de bulunur. Mitokondri ve büyüme faktörleri inme veya nöron hasarı sonrası dokunun tamir edilmesi son derecede önemlidir (113). Sinir siteminde transmitofaji ve nöronlar arasında mikroveziküller aracılığıyla mitokondri transferi olgularını anlamak yeni tedavi yaklaşımları geliştirmede önemli olabilir. Çünkü bu sayede özellikle dejeneratif hastalıklarda hasarlı nöronların homeostatik dengesinin sağlanması ve normal fonksiyonlarına döndürülmesi için gerekli müdahaleler yapılabilir.

Mitokondri transferinin kullanıldığı başka durumlar da vardır. Örneğin hücreler, hasara uğramış veya aşırı ROT üreterek hücreye zarar veren mitokondrileri uzaklaştırma eğilimi gösterirler. Bu süreç hasarlı mitokondrilerin veziküller içerisinde yıkılıp egzozitozla hücre dışarısına atıldığı mitoptozis veya selektif eliminasyon yoluyla gerçekleştirilir. Ayrıca aktive trombositlerden de serbest olarak ya da kapsüle edilmiş halde mitokondri salgılanmaktadır. Trombositlerden salgılanan bu mitokondriler inflamatuvar yanıt oluşumuna aracılık etmektedir (126). Bu işlemler sırasında meydana gelen olayların net olarak ortaya konması mitokondriyal veya inflamatuvar hastalıkların tedavi edilmesinde önemli rol oynayabilir.

Mitokondrilerin membranla kaplı olarak veya tek başına hücre dışarısında salgılanabildiğinin gösterilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan birinde anti-Fas antikoru enjeksiyonu yapılarak hücre ölümü uyarılmıştır. Bu uygulama sayesinde hücre dışarısına çıplak mitokondri atıldığı gösterilmiştir (127). Hücre dışarısında mitokondriyal içeriğin bulunabildiğinin bir başka kanıtı ise sepsis tablosununda görülen antikardiyolipindir. Bir anti-mitokondri antikoru olan antikardiyolipinin bulunması sepsis tablosunun daha kötü seyretmesine sebep olur (128).

2.3.2. Mitokondri Nakli Çalışmaları

Mitokondri hücresel enerji üretiminin merkezi ve birçok homeostatik mekanizmanın önemli bir bileşenidir. Doğal yollarla hücreler arası mitokondri alışverişi sayesinde bozulan homeostatik dengeler yeniden düzenlenerek hücre hasarları engellenebilmektedir. Buna paralel olarak mitokondri naklini yapay yollardan uygulamak ve böylece hücresel tamir mekanizmalarını harekete geçirmek amacıyla araştırmalar yapılmaktadır (10,110). Mitokondri nakli sayesinde ROT

üretimi azaltılabilir, sağlıklı bir mtDNA havuzu oluşturulabilir ve enerji üretimi artırılabilir. Fonksiyonel olmayan endojen mitokondrilerin sağlıklı eksojen mitokondrilerle değiştirilmesinin umut verici sonuçları bulunmaktadır.

Mitokondri nakli ilk olarak 1982 yılında Clark ve Shay tarafından koinkübasyon yöntemiyle yapılmıştır. Bu çalışmada öncelikle kloramfenikol (CAP) ve efrapetin (EF) antibiyotikleri kullanılarak hücre ölümü uyarılmıştır. Bu ilaçlar mitokondri protein sentezini ve ATPaz aktivitesini engelleyerek hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu şekilde hasar oluşturulan hücrelere CAP antibiyotigine direçli olan hücrelerden alınan mitokondriler basit koinkübasyon tekniği ile nakledilmiştir. Nakledilen mitokondrilerin alıcı hücrelerde antibiyotik direnci geliştirdiği ve hücrelerin canlılığını artırdığı rapor edilmiştir. Antibiyotik direncinin, nakledilen mitokondrilerin ilgili mtDNA'ya sahip olması sayesinde geliştiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada ksenojenik mitokondri nakli yoluyla (farelerden alınan mitokondrilerin insan hücrelerine nakli) antibiyotik direnci oluşturulamadığı ve farklı türler arasında mitokondri naklinin kısıtlı olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca bazı hücre türlerinin diğer hücrelere göre mitokondri alma kapasitesinin daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Koinkübasyon metoduyla aynı anda çok fazla sayıda hücreye mitokondri nakli yapılabildiği sonucuna da varılmıştır (108). İlerleyen zamanlarda eksojen mitokondrilerin hedef hücre içerisine direkt olarak enjekte edildiği ya da diğer bazı invazif araçlarla mitokondri nakil prosedürlerin uygulandığı yeni metotlar geliştirilmiştir (129,130). Ancak bu yöntemlerde nakil yapılabilecek hücre sayısının kısıtlı olması, alıcı hücrelerin hasarlanma ihtimali ve teknik zorluklar gibi güçlükler olması nedeniyle koinkübasyon tekniği daha etkin olarak değerlendirilmiştir.

İlerleyen yıllarda mitokondri naklinin *in vivo* olarak uygulandığı yöntemler üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda direkt dokuya enjeksiyon ve sistemik dolaşım üzerinden hasarlı dokuya mitokondri ulaştırılmıştır. Dokuya enjeksiyon yoluyla mitokondri nakli yapılan çalışmalarda McCully ve arkadaşlarının yaptığı çalışma öncü olmuştur. Tavşanlar üzerinde yapılan bu çalışmada iskemik doku hasarında mitokondri naklinin etkileri araştırılmıştır. Çalışmada sol ön inen koroner arter kan akımı kesilerek kalpte iskemik hasar oluşturulmuştur. Ardından iskemik dokuya direkt enjeksiyon yoluyla izole mitokondriler nakledilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre iskemik alanlar azalmış ve doku fonksiyonlarında düzelme

sağlanmıştır. Bu çalışmada mitokondri izolasyonu için kaynak olarak sağlıklı tavşan kalp dokusu kullanılmıştır (109). Bu konudaki önemli çalışmalardan biri de Lin ve arkadaşlarının karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarı modelinde yaptığı çalışmadır (110). Farklı bir çalışmada ise serebral inme modelinde mitokondri nakli uygulanmıştır. Huang ve arkadaşlarının bu çalışmasında mitokondri nakli hem dokuya direkt enjeksiyon yoluyla hem de intravenöz olarak yapılmıştır. Sonuç olarak dokuya direkt enjeksiyon yönteminin daha başarılı olduğu rapor edilmiştir (11).

İlk uygulandığı zamandan günümüze kadar mitokondri nakli ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve uygulanmasına yönelik iki ana eğilim ortaya çıkmıştır. Bunlardan birisi koinkübasyon tekniği (108), diğeri ise *in vivo* yaklaşımdır (109). Tüm bu çalışmalar mitokondri nakli hakkında yol gösterici olmuş ve önemli sorunları gündeme getirmiştir. İzolasyon prosedürlerinin mitokondrilerin bütünlük ve fonksiyonlarını nasıl etkilediği, izolasyon sonrasında elde edilen mitokondrilerin saf haliyle değil, ilişkili olduğu diğer organellere ait yapılarla karışmış halde bulunması (131) ve donör mitokondri genetik yapısının mitokondrinin alıcı hücrelerdeki etkilerini nasıl değiştirdiği gibi önemli sorunlar bunlardan bazılarıdır.

Biz de çalışmamızda mitokondriyal hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek yeni bir metot oluşturma çabalarına destek olmayı amaçladık. Aynı zamanda yaptığımız çalışmayla bu yeni araştırma alanındaki bilgi havuzuna katkıda bulunmayı hedefledik. Bu amaçla karaciğer hasarına neden olan en yaygın etkenlerden biri olan APAP toksisitesinde mitokondri naklinin etkilerini araştırdık. Çalışmamızda toksik dozda APAP uygulaması yaparak karaciğer hasarı oluşturduğumuz deney hayvanlarına mitokondri nakli yaptık. Ardından histolojik ve biyokimyasal analizlerle mitokondri nakli metodunun etkinliğini değerlendirdik. Çalışmamız karaciğer ilaç toksisitesinde mitokondri naklinin etkinliğinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. DENEY HAYVANLARI

Çalışmada 4-6 aylık, 250-350 gram ağırlığında 42 adet “Sprague-Dawley” cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sağlık Bilimleri Üniversitesi (SBÜ) Gülhane Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ nun 26.02.2019 tarih ve 19/06 karar no’ lu etik kurulu onayı alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Hayvanlar, SBÜ Gülhane Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi’ nden temin edilerek çalışma süresince SBÜ Gülhane Fizyoloji Laboratuvarında 25 °C oda sıcaklığında ve 12 saatlik karanlık/aydınlık periyodu altında plastik kafeslerde barındırıldı. Ticari yem ve musluk suyu ile kendi başlarına serbestçe beslenmesine olanak sağlanan deneklere çalışma öncesinde herhangi bir sıvı ve diyet kısıtlaması uygulanmadı. Deneysel çalışma sırasında Avrupa Konseyi’nin önerdiği standartlara (“European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes”) (ETS 123) uyuldu.

3.2. DENEY GRUPLARI

Sıçanlar basit rastgele örnekleme ile toplam 6 gruba ayrıldı. Gruplar aşağıda listelenmiştir:

- **Sham Grubu (n=6):** Deney hayvanlarının hiçbir ilaç, anestezi madde ve cerrahi işlem uygulanmadan kendi haline bırakıldığı gruptur.
- **APAP Grubu (n=8):** Deney hayvanlarına oral gavaj yoluyla ve tek doz olarak 1g/kg APAP uygulandıktan sonra kafeslerinde kendi haline bırakılarak 48 saat boyunca izlenen gruptur.
- **Kontrol 1 (Distile Su+Cerrahi İşlem) Grubu (n=6):** APAP grubu ile aynı hacimde ancak APAP içermeyen distile su oral gavaj yoluyla verilmiştir. Ardından ratların batınları açıldıktan sonra dalağa enjektör batırılıp çıkarılarak 48 saat boyunca izlenen gruptur.
- **APAP+Mitokondri Grubu (n=8):** Deney hayvanlarına oral gavaj yoluyla ve tek doz olarak 1g/kg APAP uygulandıktan sonra dalaklarının subkapsüler bölgesine izole edilmiş olan mitokondriler enjekte edilerek 48 saat boyunca izlenen gruptur.

- **Kontrol 2 (APAP+Respirasyon Tamponu) Grubu (n=6):** Deney hayvanlarına oral gavaj yoluyla ve tek doz olarak 1g/kg APAP uygulandıktan sonra dalaklarının subkapsüler bölgesine mitokondri içermeyen tampon sıvısı (100 µl) enjekte edilerek 48 saat boyunca izlenen gruptur.
- **APAP+NAC Grubu (n=8):** Deney hayvanlarına oral gavaj yoluyla ve tek doz olarak 1g/kg APAP uygulandıktan sonra tedavi olarak 300 mg/kg dozunda NAC intraperitoneal yoldan uygulanıp 48 saat boyunca izlenen gruptur.

3.3. CERRAHİ PROSEDÜR

Çalışmanın ilk aşamasında karaciğer hasarı oluşturmak üzere APAP (Parasetamol Toz-Galenik Ecza ve Kimyevi Maddeler Deposu-İzmir) uygulaması yapıldı. Sham grubu ve Kontrol 1 grubu hariç diğer tüm deney hayvanlarına tek doz olarak 1g/kg APAP verildi. APAP, hassas terazide (Scaltec-SBC21) tartıldıktan sonra 50 °C' ye ısıtılmış distile su içerisinde (5cc/kg) çözülerek hazırlandı. Isısı 25 °C' ye düşürüldükten oral gavaj yoluyla deney hayvanlarına verildi (132,133). APAP uygulamasından 1 saat sonra deney tedavilerine başlandı (134).

İlk önce mitokondri nakli yapılacak gruplar için mitokondri izolasyonu yapıldı. İzolasyon için mitokondri kaynağı olarak iyi bir seçenek olan mezenkimal kök hücreler kullanıldı (115). Enjekte edilecek mitokondriler ticari olarak satılan sıçan mezenkimal kök hücrelerinin temel hücre kültürü prensiplerine göre yeterli sayıda üretilmesi ile elde edilen hücrelerden sağlandı. Bu hücrelerden ticari mitokondri izolasyon kiti kullanılarak, kit protokolüne göre mitokondri izolasyonu yapıldı. Bu aşamada izole edilen mitokondrilerin canlı ve fonksiyonel olduğunun gösterilmesi için çeşitli analizler yapıldı. Mitokondri naklinin başarıya ulaşması için mitokondrilerin sağlıklı olması gereklidir. İzolasyon ve transfer süreçlerinde mitokondriler hücre koruması olmaksızın ekstrasellüler alan ile temas halindedir. Mitokondriler hücre dışında bulunduğu süre boyunca sıcaklık değişimi, içinde bulunduğu sıvı ortamın farklı olması gibi çeşitli stres kaynaklarına maruz kalırlar. Bunlar mitokondrilerin yapısal bütünlüğünü, fonksiyonlarını ve hedef hücrelere ulaştıktan sonraki potansiyel etkilerini önemli ölçüde değiştirebilecek etkenlerdir (135). Mitokondrilerin yapısal bütünlüğünün ve fonksiyonlarının korunmasında mitokondriyal membranların intakt olması son derece önemlidir. Dış membranı hasar

görmüş olan mitokondrilerin hücre içerisine girişi inhibe olurken, iç membranı hasarlı olan mitokondrilerde ATP üretimi bozulur ve fonksiyon bozukluğu gelişir (106,136). Bu nedenle çalışmamızda mitokondriyal membran bütünlüğü tespiti için “MitoTracker® Red CMXRos Mitochondrion-Selective (Invitrogen Ltd.-UK)” probu kullanılarak boyamalar yapıldı. Ayrıca izole edilen mitokondrilerin fonksiyonel olup olmadığının değerlendirilmesi için ATP düzeyi ticari ATPaz ölçüm kiti (ATPlite Luminescence Assay System, 300 Assay Kit, Perkin Elmer-USA) kullanılarak belirlendi. Ardından deney hayvanları intramüsküler (i.m.) ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) kombinasyonu ile genel anestezi altına alındı. Anestezi derinliği ve ağrı duyuları ayak parmakları pens ile sıkıştırılarak kontrol edildi. Anestezi altındaki deney hayvanları sırt üstü yatırılarak batın bölgesi traş edildi ve sterilizasyon sağlanması için batikon ile temizlendi. Bu aşamadan sonra işlemlerin steril koşullar altında yapılması sağlandı. Cilt ve karın duvarı bistüri yardımı ile 2-3 cm uzunluğunda kesildi. Karın duvarı açıldıktan sonra dalak görünür hale getirildi ve ardından mitokondri nakil işlemi gerçekleştirildi. Mitokondri nakli Lin ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle yapıldı (110). Bu yöntemde mitokondrilerin karaciğere splenik ven aracılığıyla ulaşması hedeflenmektedir. Bu nedenle mitokondriler mikro enjektör kullanılarak dalağın subkapsüler bölgesine enjekte edildi. Mitokondri enjeksiyonu 100 µl. respirasyon tampon sıvısı (mitokondrilerin içerisinde bekletildiği sıvı medyum) içerisinde $7,7 \times 10^6$ ($\pm 1,5 \times 10^6$) mitokondri/deney hayvanı dozunda olacak şekilde yapıldı. Enjeksiyon sonrası deney hayvanlarının batınları ipek iplik ile suture edilerek kapatıldı. Batikonla iyice yıkanarak temizlendi ve kafese alınarak yan yatar pozisyonda bırakıldı (Resim 3.1).

Kontrol 2 grubuna tedavi olarak mitokondri içermeyen tampon sıvısı verildi. Tampon sıvısının hacmi ve uygulamanın geri kalan kısmı aynı APAP+Mitokondri grubunda olduğu gibi yapıldı. APAP+NAC grubuna ise tedavi olarak toplamda 300mg/kg dozunda NAC (Merck-Darmstadt/Germany) 3cc distile su içerisinde çözülerek hazırlandı ve intraperitoneal yoldan verildi (79). NAC uygulaması 1. saatte 200 mg/kg ve 4. saatte 100 mg/kg olmak üzere 2 doz olarak uygulandı. Böylece APAP toksisitesinin klinik tedavisi kısmen taklit edildi. Kontrol 1 grubundaki hayvanlara herhangi bir ilaç veya tedavi uygulaması yapılmadı. Bu gruptaki deney hayvanlarına APAP içermeyen distile su oral olarak verildi ve ardından dalağının

subkapsüler bölgesine mikro enjektör batırılıp çıkarılarak cerrahi prosedür taklit edildi. Sham grubundaki hayvanlara ise hiçbir uygulama yapılmadan laboratuvar koşullarında deney sonuna kadar bekletildi (Resim 3.1).



a. Oral gavaj uygulaması



b. Anestezi altındaki sıçanın batın bölgesinin traş edilmesi ve batikonla temizlenmesi



c. Sıçanın batın bölgesinin açılması



d. Dalağın görünür hale getirilmesi



e. Dalağa enjeksiyon yoluyla mitokondri verilmesi



f. Sıçanın batınının sütüre edilerek kapatılması

Resim 3.1: Deney süreci ve mitokondri nakli

Tüm bu işlemlerden sonra bütün deney hayvanları 48 saat boyunca kendi hallerine bırakılarak izlendi. 48 saat sonunda tüm deney hayvanları ketamin/ksilazin ile yapılmış genel anestezi altında kalplerinden kan alınarak sakrifiye edildi. Ardından karaciğer doku örnekleri alındı. Sakrifiye edilen deney hayvanlarının karaciğer ve kan dokuları biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için saklandı. Histopatolojik analizler için alınan doku örnekleri %10' luk formaldehit içinde, biyokimyasal analizler için alınan doku ve kan örnekleri ise ependorf tüplerde sıvı nitrojende şok dondurma yapılarak -80 °C derin dondurucuda analizlerin yapılacağı tarihe kadar saklandı. Alınan karaciğer dokusu örneklerinde hematoksilen eozin boyamasının yanında MDA, SOD, TAS, TOS ve GSH oksidatif stres ölçümleri, kan örneklerinde ise AST, ALT, laktat dehidrogenaz (LDH) ve alkalin fosfataz (ALP) ölçümleri yapılarak analizler gerçekleştirildi (Resim 3.2).



a. Sıçanın batınının açılması



b. Sıçanın kalbinden kan alınması ve sakrifiye edilmesi



c. Karaciğerin dokusu örneklerinin toplanması



Resim 3.2: Deneyin sonlandırılması ve doku örneklerinin toplanması

3.4. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ

Mitokondri kaynağı olarak kullanılacak hücreler ticari olarak satın alınan sıçan mezenkimal kök hücre hattından (Milipore-Rat Mesenchymal Stem Cells SCR027) temel hücre kültürü prensiplerine göre Fizyoloji AD. Hücre Kültürü Laboratuvarı ve SBÜ Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Araştırma Merkezinde üretildi. T75 kültür flasklarına 1 milyon hücre ekilerek çoğalması beklendi. Konfluens %70-80 seviyelerine ulaşıncaya kadar bu flasklar takip edildi. Bu süre içerisinde 2 günde bir medyumları değiştirildi. Bu seviyede flasklardaki hücre sayısı 5-6 milyon olacak şekilde hücreler elde edildi. Deney hayvanı başına yaklaşık 20 milyon hücre üretildi.

3.5. MİTOKONDİRİ İZOLASYONU

Mitokondri izolasyon işlemi ticari mitokondri izolasyon kiti (Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells-Thermo Scientific-USA) kullanılarak kit protokolüne göre yapıldı. İşlem basamakları aşağıda yazıldığı şekilde uygulandı:

1. Hücre kültüründen elde edilen hücrelere 800 µl “Reagent A” eklendi ve buz kabında 2 dakika inkübe edildi.
2. Sonra 10 µl “Reagent B” eklendi ve buz kabında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi boyunca her 1 dakikada bir kez vorteksle (Heidolph-MR Hei-Standard) karıştırıldı.
3. Daha sonra 800 µl “Reagent C” eklendi ve 4 °C’ de 700xg hızda 10 dakika santrifüj (Hermle-Z323K) işlemi yapıldı. Süpernatantı alınıp 500 µl “Reagent C” ile pellet yıkandı.
4. Ardından 5 dakika boyunca 4 °C’ de 12000xg hızında santrifüj işlemi yapıldı ve süpernatant yeni tüpe alındı.
5. Altta kalan pellet üzerine 100 µl respirasyon tamponu konularak mitokondri izolasyon prosedürü tamamlandı.

3.6. MİTOKONDİRİ MEMBRAN BÜTÜNLÜĞÜ ANALİZİ

Mitokondri membran potansiyeli immünofloresan yöntemle “MitoTracker® Red CMXRos Mitochondrion-Selective (Invitrogen Ltd.-UK)” probu kullanılarak yapıldı.

3.6.1. Mezenkimal Kök Hücre İçi “Mitotracker Red CMXROS” ile Mitokondri Boyaması ve Konfokal Mikroskop Analizi

1. DMEM içinde bulunan mezenkimal kök hücreler 3000 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı atıldı.
2. Altta kalan hücre pelletine 2 ml PBS ilave edilerek 3000 rpm’ de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
3. Altta kalan pellete 1,5 ml PBS eklendi ve ardından vortekslendi.
4. 10 µl hücre süspansiyonu ile önceden 37 °C’ ye ısıtılmış 10 µl (100 nM) “MitoTracker® Red CMXROS Mitochondrion-Selective (Invitrogen Ltd.-UK)” boyama solüsyonu karıştırıldı. Lam üzerine yayılarak 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.
5. Ardından hücreler %4 paraformaldehit içerisinde 10 dakika bekletilerek fikse edildi.
6. Hazırlanan numuneler lazer taramalı konfokal mikroskop cihazı (Leica-SP8) ile görüntülendi.

3.6.2. İzole Edilmiş Mitokondrilerin “Mitotracker Red CMXROS” ile Boyanması ve Konfokal Mikroskop Analizi

1. Respirasyon tamponu içerisinde bulunan izole edilmiş mitokondrilerden 10 µl alınarak lam üzerine yayıldı.
2. Üzerine önceden 37 °C’ ye ısıtılmış 10 µl (100 nM) “MitoTracker® Red CMXROS Mitochondrion-Selective (Invitrogen Ltd.-UK)” boyama solüsyonu eklendi ve 10 dakika inkübe edildi.
3. Elde edilen numuneler hızla lazer taramalı konfokal mikroskop cihazı ile görüntülendi.

3.7. İZOLE MİTOKONDRİLERİN HEDEF HÜCRELERE DAĞILIMININ GÖSTERİLMESİ

APAP+Mitokondri grubundan 2 sıçana izole edilen mitokondrilerin hedef hücrelere dağılımını göstermek için “MitoTracker® Red CMXROS Mitochondrion-Selective (Invitrogen Ltd.-UK)” ve DAPI (“4,6-diamidine-2’-phenylindole”) (Zytovision) boyaması yapıldı:

1. İzole mitokondriler sıçana enjekte edilmeden önce 100 µl (200nM) “MitoTracker® Red” ile 10 dakika inkübe edilerek boyandı.
2. Boyanmış olan mitokondriler sıçana enjekte edildi.
3. Ardından deney süresi sonunda karaciğer dokuları alınarak kriyotomda (Thermo-Shandon) 5 mikronluk kesitler halinde lama alındı.
4. Alınan kesitler %4’ lük paraformaldehit solüsyonunda 10 dakika fikse edildi.
5. Numuneler paraformaldehit solüsyonundan çıkarıldıktan sonra 2 kez PBS ile yıkandı.
6. Üzerine 15 µl kullanıma hazır DAPI boyası eklenerek 5 dakika daha beklendi ve lazer taramalı konfokal mikroskop cihazı ile görüntüler alındı.

3.8. MİTOKONDİRİ ATP ÖLÇÜM ANALİZİ

İzole edilmiş mitokondrinin metabolik aktivitesini belirlemek için ATP ölçüm analizi yapıldı. Bu ölçüm ticari kit (ATPlite Luminescence Assay System, 300 Assay Kit, Perkin Elmer-USA) kullanılarak yapıldı. İşlem basamakları aşağıda yazıldığı şekilde uygulandı:

1. Kit içerisinde bulunan toz haldeki ATP stok solüsyonu distile su ile hazırlandı.
2. İzole edilmiş mitokondrilerden 10 µl alınarak 96 kuyucuklu mikroplaka içerisine yüklendi. Ardından tüm kuyucuklara 50 µl hücre lizis solüsyonu eklendi. 5 dakika boyunca 37 °C ’de ve 125 rpm hızda karıştırıldı. Bu aşama ATP’ nin sabitlenmesi amacıyla yapıldı.
3. Daha sonra mikroplaka kuyucuklarına 50 µl substrat solüsyonu eklendi ve 5 dakika boyunca 37 °C’de ve 125 rpm hızda karıştırıldı.
4. Hazırlanan numunelere ait ölçümler spektrofotometre cihazı (Molecular Devices-Filter Max F5) ile yapıldı.

3.9. HİSTOLOJİK ANALİZLER

Histolojik analizlerin yapılması için öncelikle doku takibi işlemi yapıldı. Bunun için sıçanlardan alınan karaciğer dokuları doku takip cihazında (Leica-ASP 300) doku takibine alındı. Bu işlemde cihaz içerisinde bulunan örnekler sırayla formalin, alkol, ksilen ve parafinden geçirildi. Takip sonrası örnekler doku bloklama cihazında (Sakura-Tissue TEK) parafin bloklar haline getirildi. Parafin bloklardan

mikrotom cihazında (Leica-RM 2255) 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınarak adhezivli lamlara konuldu. Lam üzerine alınan dokular deparafinizasyon için 70 °C' lik etüvde (Incucell-MMM Medcenter) 30 dk tutuldu. Boyama işlemine hazır hale getirilen kesitlere, lam boyama cihazında (Sakura-Tissue TEK) hematoksilin-eosin boyaması yapıldı. Boyanan örnekler ışık mikroskopunda (Olympus-BX 51) görüntülendi.

Değerlendirme aşamasında histopatolojik olarak; sentrilobüler hepatosit nekrozu, sentrilobüler balonlaşma dejenerasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun varlığı değerlendirildi. Histopatolojik değişiklikler hafif (1), orta (2), belirgin (3) ya da yok (0) olarak ifade edildi (1; sentrilobüler alanda, hepatositlerin % 10'undan azı, 2; sentrilobüler alanda, hepatositlerin % 10-50 kadarı, 3; sentrilobüler alanda, hepatositlerin %50' den daha fazlası) (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Histopatolojik skorlama tablosu

	Nekroz	Dejenerasyon	İnflamasyon
0	Yok	Yok	Yok
1	Hafif	Hafif	Hafif
2	Orta	Orta	Orta
3	Belirgin	Belirgin	Belirgin

0: hasar yok

1: sentrilobüler alanda, hepatositlerin % 10'undan azı

2: sentrilobüler alanda, hepatositlerin % 10-50 kadar

3: sentrilobüler alanda, hepatositlerin %50' den daha fazlası

3.10. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Sıçanlardan alınan kanların serumlarında AST, ALT, LDH ve ALP ölçümleri ve karaciğer dokusunda MDA, SOD, TAS, TOS ve GSH oksidatif stres analizleri ve doku protein ölçümleri yapıldı.

3.10.1. Kan Örneklerine Ait Ölçümler

Kan örneklerine ait AST, ALT, LDH ve ALP ölçümleri rutin biyokimya cihazı (Beckman Coulter-Autoanalyzer AU 680) kullanılarak yapıldı. Bunun için

önce kan örnekleri santrifüj edilerek (Eppendorf-Centrifuge 5804 R) serumu ayrıldı. Ardından cihaza konularak ölçüm gerçekleştirildi.

3.10.2. Karaciğer Doku Örneklerine Ait Ölçümler

Karaciğer doku örneklerinde MDA, SOD, TAS, TOS ve GSH ölçümleri yapıldı. Bunun için öncelikle dokular homojenize edildi. Daha sonra elde edilen verilerin sayısal olarak ifade edilebilmesi için bahsedilen ölçümlerin yanında doku protein ölçümleri yapıldı.

1. Dokuların Homojenizasyonu: Homejenizasyon işleminin yapılması için öncelikle dokular -80°C 'den çıkarılarak 50-100 mg aralığında hassas terazide (Scaltec-SBC21) tartıldı. Daha sonra tartılan dokular numaralandırılmış ependorf tüplerin içine konuldu ve 1/9 oranında uygun tampon (trizma HCL 0,2 mM, pH:7.2) eklenerek bilyeli homojenizatörde (Retsch-MM400) homojenize edildi. Homojenatlar 4°C ' de 10000 rcf hızında 10 dakika boyunca santrifüj edildi (Hermle-Z323K). Süpernatantlar MDA, SOD, TAS ve TOS analizleri için parçalara ayrılarak -80°C ' de derin dondurucuda saklandı.

2. Protein Ölçümü: Protein ölçümü Lowry yöntemine göre yapıldı. Bunun için öncelikle A, B, C ve D reaktifleri aşağıda ifade edildiği şekilde hazırlandı:

- A reaktifi: 0,050 gr bakır sülfat (CuSO_4) ve 0,1 gr trisodyum sitrat (Na_3Sitrat) tartıldıktan sonra distile su ile 10 ml' ye tamamlanarak hazırlandı.
- B reaktifi: 5 gr sodyum karbonat (Na_2CO_3) ve 1 gr sodyum hidroksit (NaOH) tartıldıktan sonra distile su ile 250 ml' ye tamamlanarak hazırlandı.
- C reaktifi: 10 ml B reaktifi ve 200 ml A reaktifi alınarak taze olarak hazırlandı.
- D reaktifi: 25 m folin-ciocalteu reaktifidir.

Reaktiflerin hazırlanmasından sonra standartlar için 2 mg/ml "bovine serum albumin" (BSA) solüsyonu hazırlandı. Sonra seri dilüsyonla standartlar hazırlandı. Ardından numuneler 25 kat sulandırılarak dilüe edildi. Mikroplakaya 20 µl hacimde standartlar ve ardından 20 µl hacimde numuneler yüklendi. Üzerlerine 100 µl C reaktifi eklenerek 10 dakika karanlık ortamda oda ısısında bekletildi. Daha sonra

üzerine 10 µl D reaktifi eklenerek 25 dakika karanlık ortamda oda ısısında bekletildi. Son olarak absorbanlar spektrofotometrede (Molecular Devices-Filter Max F5) 620 nm' de okundu.

3. Lipid Peroksidasyonu Düzeyinin Ölçümü (Malondialdehit-MDA):

Oksidatif stresin bir göstergesi olan lipid peroksidasyon düzeyinin belirlenmesi için MDA ölçümü yapıldı. Bunun amaçla %10' luk triklorasetik asit (TCA) ve %0,37' lik tiyobarbitürik asit (TBA) solüsyonları kullanıldı. Öncelikle 10 ml' lik deney tüplerinin içerisine 750 µl %10' luk TCA, 500 µl %0,3' lük TBA konuldu. Daha sonra üzerine 250 µl süpernatant ilave edilerek 5-7 saniye vortekslendi. 100 °C' de 15 dakika inkübatörde bekletildi ve buz üzerine alınarak soğutuldu. Ardından 10000 rev' de 10 dakika santrifüj edilen örneklerden 250 µl alınarak eliza 96' lık mikropalakaya yüklendi. Hazırlanan numuneler spektrofotometrede 532 nm' de okundu. TBA-MDA kompleksinin ekstinksiyon katsayısından ($1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) yararlanılarak milimol/gram protein (mmol/g-protein) cinsinden MDA değerleri hesaplandı.

4. Total Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD):

SOD aktivitesi için ilk olarak 400 milimol/litre (mmol/L) Na_2CO_3 , 0,3 mmol/L ksantin, 150 mikromol/litre (µmol/L) nitro blue tetrazolium klorür (NBT), 0,6 mmol/L etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ve 1 gram/litre (g/L) BSA karışımı ile reaktif hazırlandı. Bu reaktif hazırlandıktan sonra 2 mol (M) amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0,8 mmol/L bakır-II-klorür (CuCl_2) ve amonyum sülfat içinde 167 ünite/litre (U/L) ksantin oksidaz (XO) solüsyonları hazırlandı. Cam tüplerin içine 25 µl 167 U/L XO, 1425 µl ölçüm reaktifi ve 50 µl süpernatant ilave edildi. Kontrol tüpüne etanol fazı yerine 50 µl distile su ilave edilerek, 25 °C' de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir numuneye 100 µl 0,08 mM/L CuCl_2 eklenerek reaksiyon durduruldu ve distile suya göre absorbanlar sıfırlanarak kontrolden itibaren örnekler 560 nm' de okundu. Bulunan değerler aşağıdaki formüle konularak SOD aktivitesi hesaplandı:

$$[(K-N) / N] \times D \times 20 / P = U/g\text{-protein}$$

Bu formülde; K: körün absorbansı; N: numune absorbansı; D: dilüsyon miktarı; P: süpernatant protein miktarını (g/ml) ifade etmektedir.

5. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) Ölçümleri: TAS ve TOS ölçümleri doku örnekleri kullanılarak kit protokollerine yapıldı ("Total Antioxidant Status, Total Oxidant Status - Rel Assay Diagnostics-TURKEY). Analizler için öncelikle doku numuneleri, standartlar ve su kit protokolünde belirtilen hacimlerde alındıktan sonra üzerlerine belirtilen hacimde "Reagent 1" eklenerek iyice karıştırıldı ve 1. absorbanslar okundu. Sonra üzerlerine "Reagent 2" eklenerek iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika beklendikten sonra 2. absorbanslar okundu. Absorbanslar protokolde belirtilen dalga boylarında okundu. TAS ve TOS değerleri elde edilen bu 1. ve 2. ölçümler kullanılarak kitte belirtilen formüle göre hesaplandı.

6. Glutasyon (GSH) Düzeyinin Ölçülmesi: Doku GSH düzeyi tayini için öncelikle karaciğer dokuları 1/9 oranında TCA kullanılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenaldan 250 µl alınarak üzerine 1000 µl 0,3 M disodyum fosfat (Na₂HPO₄) eklendi. Üzerine 125 µl DTNB eklendikten sonra vorteksle karıştırıldı. Oda ısısında 10 dakika beklendikten sonra spektrofotometrede 412 nm' de okundu. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$(4,23 \times \text{absorbans}) / \text{doku ağırlığı} = \mu\text{mol/gram doku}$$

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızda istatistiksel analizler "IBM SPSS Statistic 23" programı kullanılarak yapıldı. Karşılaştırılacak grup sayısı ve her gruptaki sıçan sayısına göre verilerimizin istatistiksel değerlendirmesine parametrik olmayan testler uygun görüldü. Tüm gruplar arasında "Kruskal Wallis" testi ile istatistiksel analizler yapıldı. Analiz sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlendiği takdirde, bu anlamlı farkın hangi gruplardan kaynaklandığını görmek için yine "Kruskal-Wallis" yöntemiyle grupların ikili karşılaştırmaları ("Pairwise Comparison")

yapılarak incelendi. Sonuçlar Medyan±Ortalamanın Standart Hatası (Median±SEM) olarak ifade edildi. $p<0.05$ değeri bulunan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

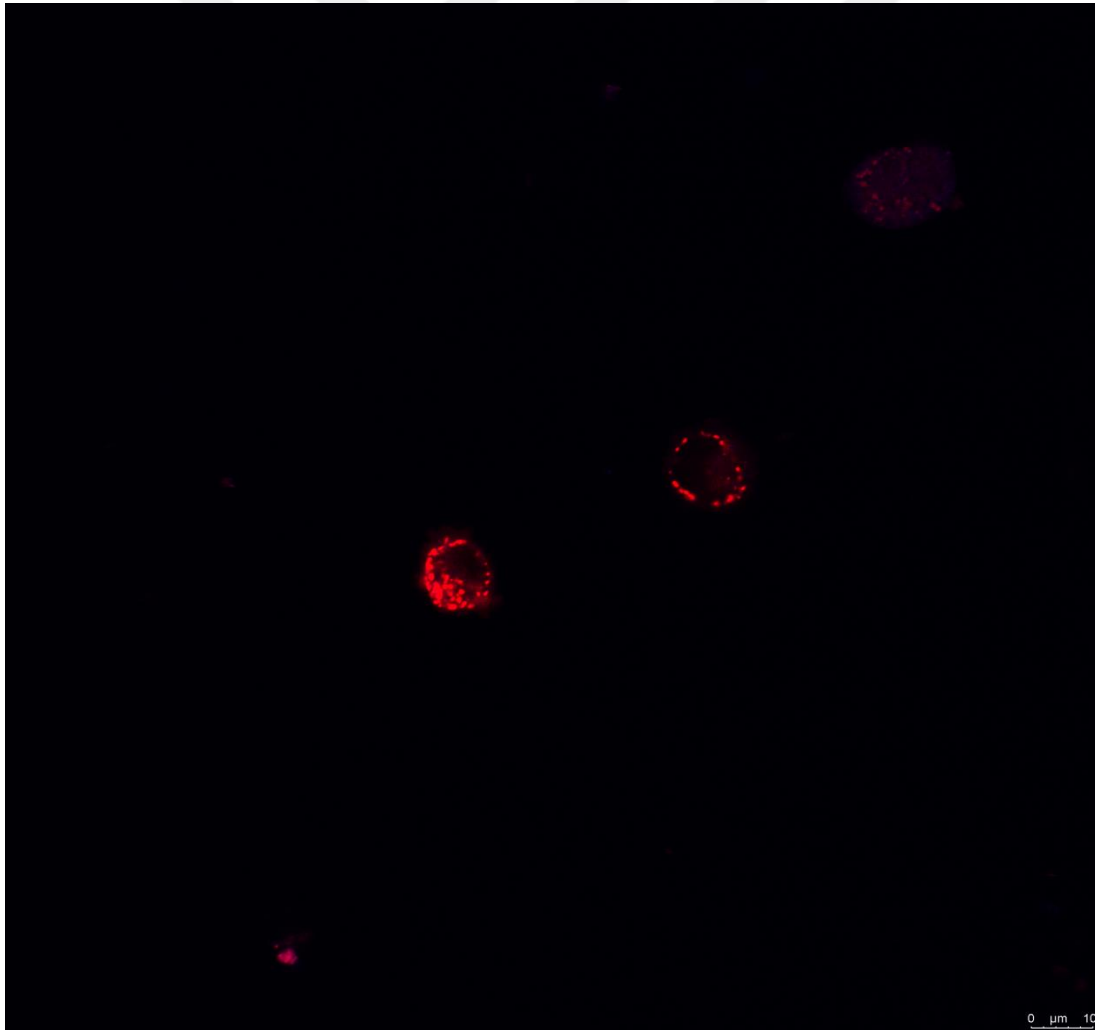


4. BULGULAR

4.1. İZOLE MİTOKONDİRİ BÜTÜNLÜK VE FONKSİYON ANALİZLERİ

4.1.1. Mezenkimal Kök Hücre İçi “Mitotracker Red CMXRos” ile Mitokondri Boyaması ve Konfokal Mikroskop Analizi Sonuçları

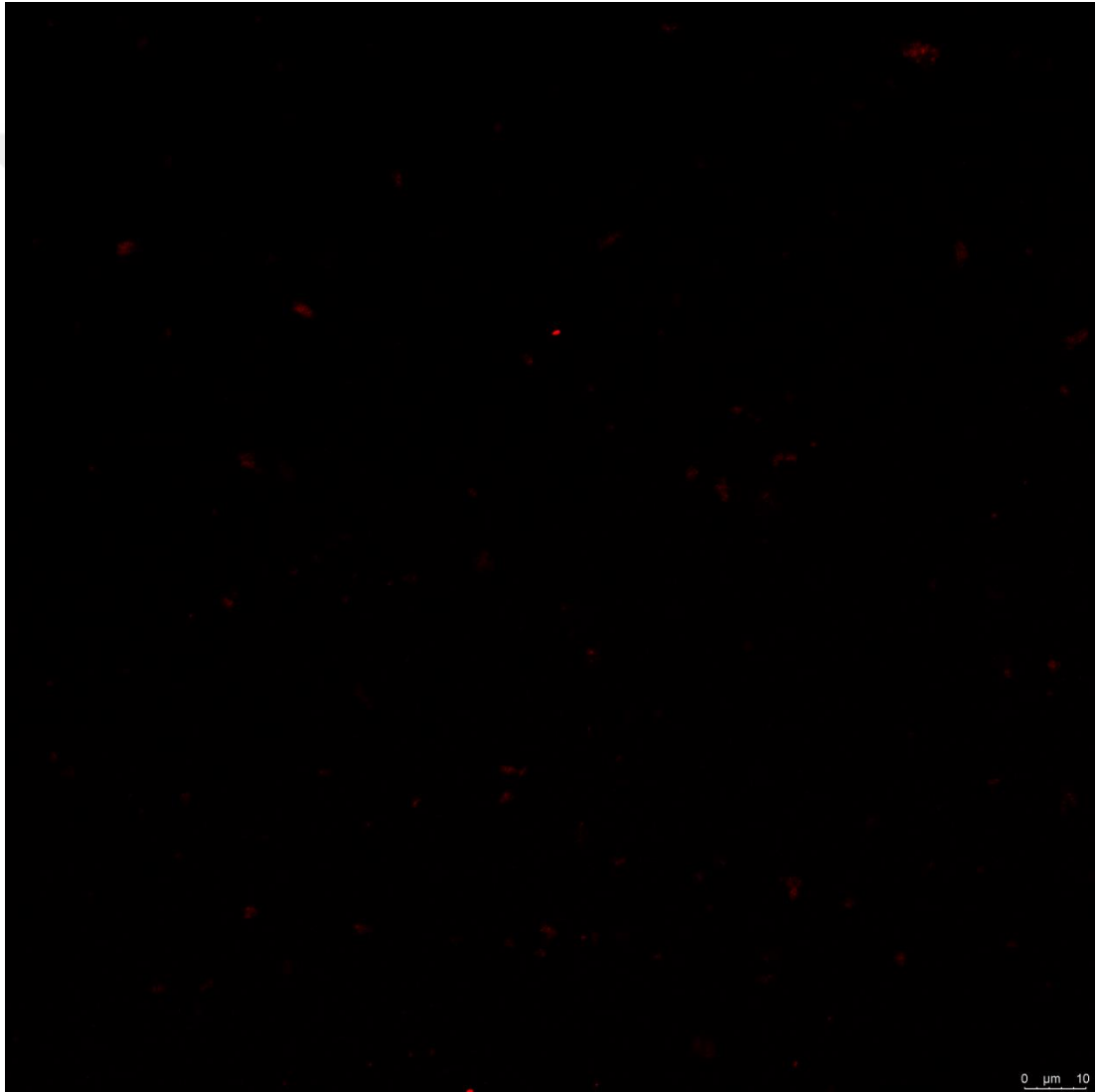
Mitokondri izolasyonu yapılacak mezenkimal kök hücrelere ait mitokondriler “Mitotracker Red” boyası ile boyanarak görüntülendi (Resim 4.1). Kök hücrelerin içerisinde bulunan mitokondrilerin canlılığını ve membran bütünlüğünü koruduğu izlendi.



Resim 4.1: Mitokondri izolasyonu için kaynak olarak kullanılan kök hücre içi mitokondrilerin konfokal mikroskop ile gösterilmesi (x63, Mitotracker Red)

4.1.2. İzole Edilmiş Mitokondrilerin “Mitotracker Red CMXRos” ile Boyanması ve Konfokal Mikroskop Analizi Sonuçları

Deney hayvanlarına nakledilecek mitokondriler, kaynak olarak kullanılan mezenkimal kök hücrelerden izole edildikten sonra “Mitotracker Red” boyası ile boyanarak görüntülendi (Resim 4.2). İzolasyon sonrası elde edilen mitokondrilerin canlılıklarının ve membran bütünlüklerinin korunduğu izlendi. İzolasyon sürecinin başarıyla uygulanarak mitokondrilerin hasarlanmasının önüne geçildiği tespit edildi.



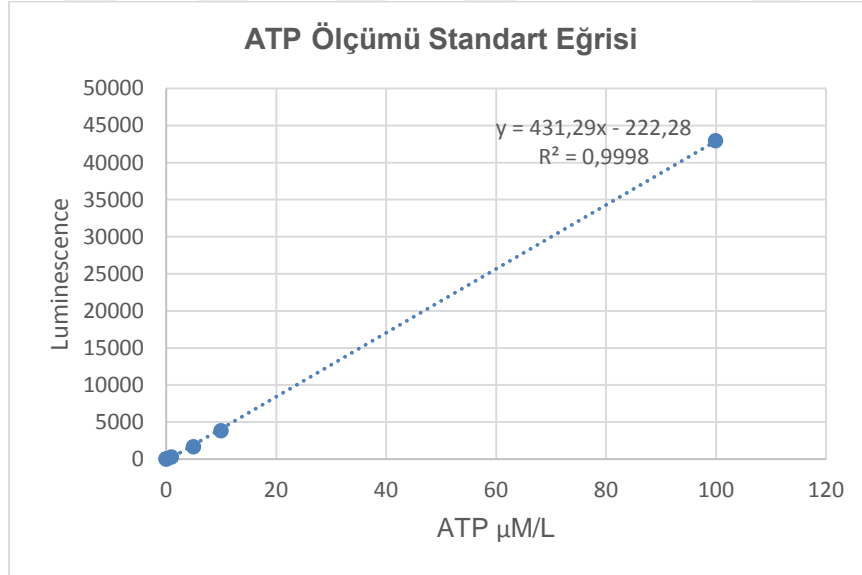
Resim 4.2: İzole edilmiş mitokondrilerin konfokal mikroskop ile gösterilmesi (x63, Mitotracker Red)

4.1.3. Mitokondri ATP Ölçüm Sonuçları

İzole edilmiş mitokondrilerin ATP seviyeleri ölçüldü (Tablo 4.1). ATP miktarının değerlendirilmesi ATP ölçüm kiti standart eğrisine göre değerlendirildi (Şekil 4.1). Yapılan değerlendirilmede izole mitokondrilerin ATP içerdiği ve metabolik olarak aktif olduğu tespit edildi. Bu veri sayesinde mitokondrilerin fonksiyonel olarak izole edildiği gösterildi. Bu analiz ile ilgili herhangi bir istatistiksel işlem yapılmadı.

Tablo 4.1: İzole mitokondri ATP miktarları

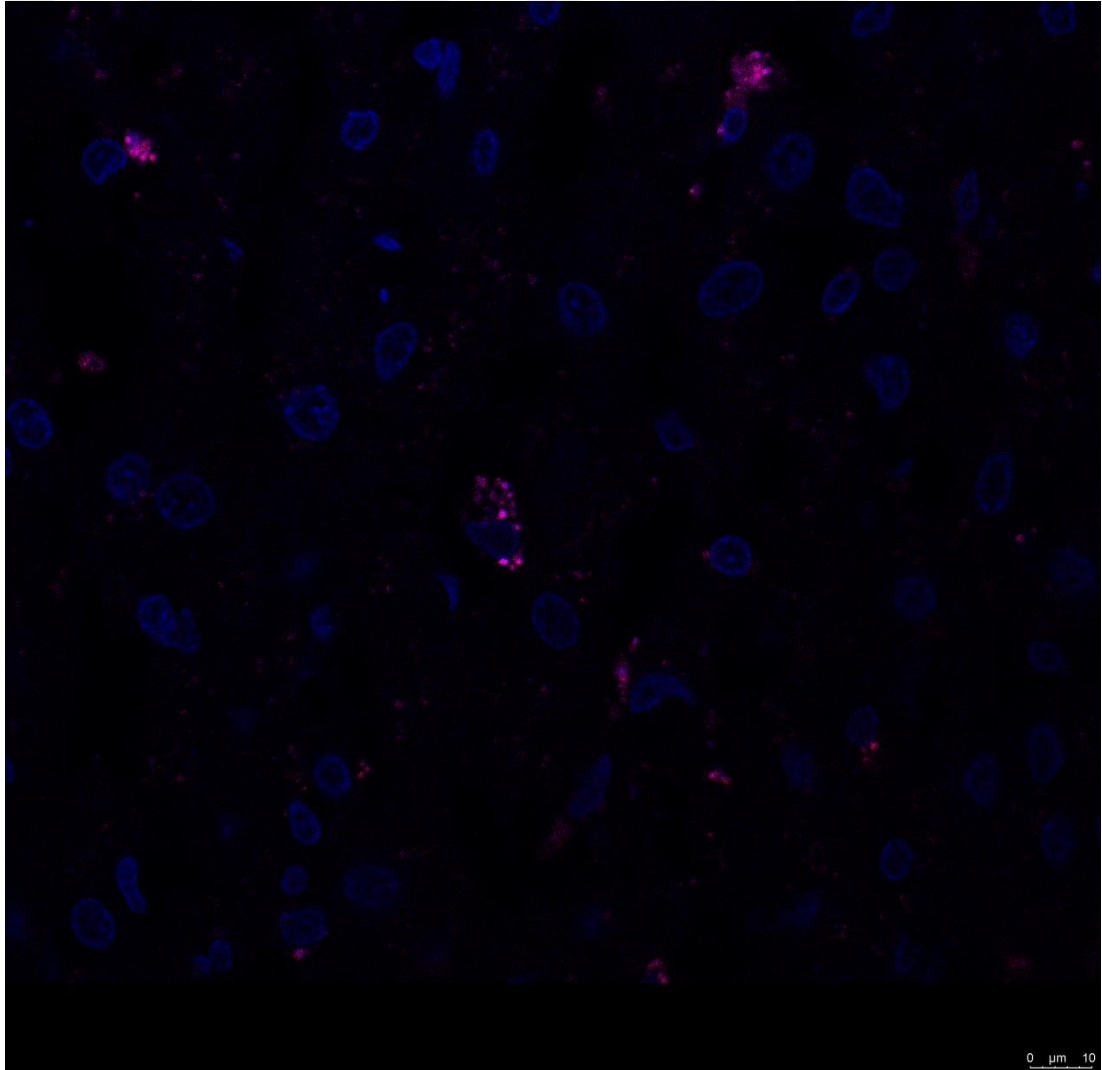
No:	ATP miktarı ($\mu\text{mol/L}$)
1	16,598
2	20,048
3	10,128
4	11,422
5	10,559
6	7,109



Şekil 4.1: ATP ölçümü standart eğrisi

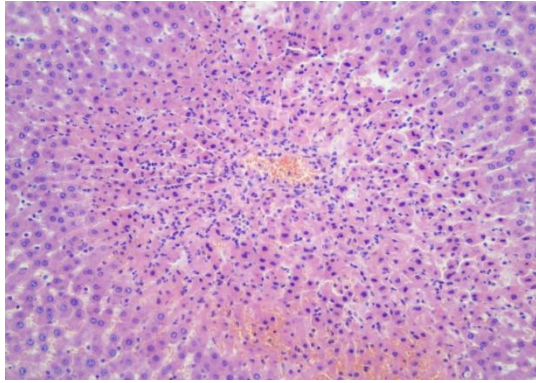
4.2. İZOLE MİTOKONDRİLERİN HEDEF HÜCRELERE DAĞILIMININ GÖSTERİLMESİ

Deney hayvanlarına enjekte edilmek üzere canlılığı ve bütünlüğü korunmuş olarak izole edilen mitokondriler “Mitotracker Red” boyası ile boyandıktan sonra nakil işlemi gerçekleştirildi. Deney süreci sonunda kurban edilen sıçanların karaciğer dokuları alınarak DAPI boyası ile boyandı ve böylece hepatosit çekirdekleri görünür hale getirildi. Ardından hazırlanmış olan bu numuneler konfokal mikroskop ile görüntüledi (Resim 4.3). Sonuç olarak izole edilen mitokondrilerin hepatosit membranını canlı ve bütün olarak başarıyla geçip hücre içerisine girdiği tespit edildi.

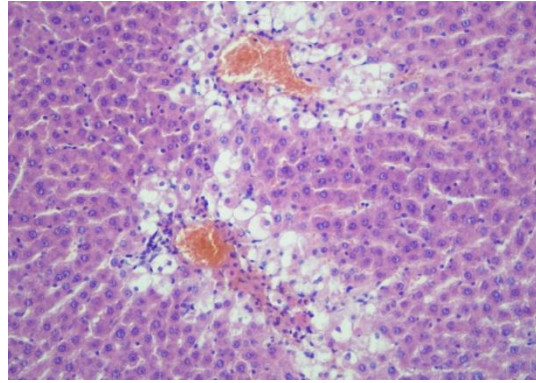


Resim 4.3: İzole edilmiş mitokondrilerin hedef hücre içerisine girişinin konfokal mikroskop ile gösterilmesi (x63, Mitotracker Red+DAPI)

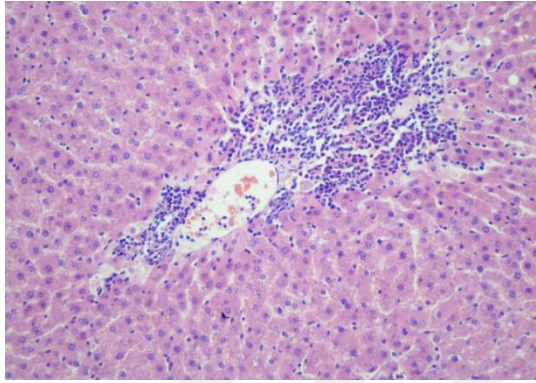
4.3. HİSTOLOJİK BULGULAR



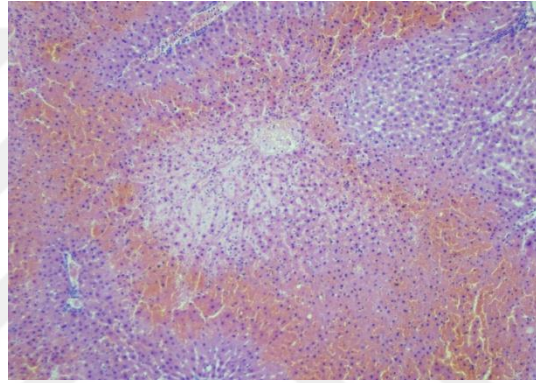
A. Nekroz (x200)



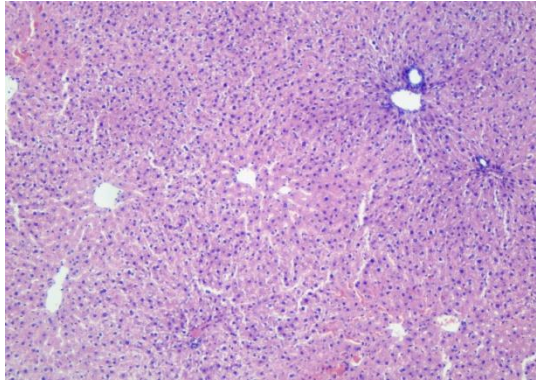
B. Dejenerasyon (x200)



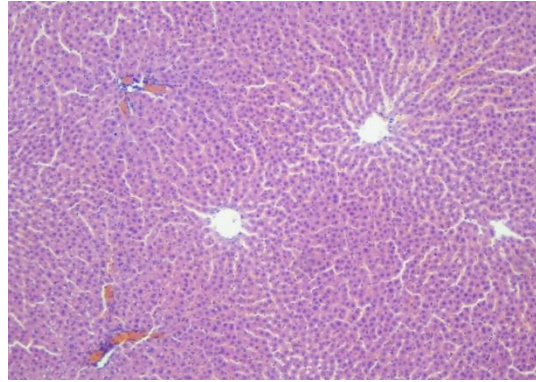
C. İnflamasyon (x200)



D. Nekroz, Dejenerasyon, İnflamasyon (x100)



E. Normal karaciğer dokusu (x100)



F. Mitokondri nakledilen karaciğer dokusu (x100)

Resim 4.4: Hematoksilen Eozin Boyama Görüntüleri

Doku örnekleri, sentrilobüler hepatosit nekrozu ve hepatosit dejenerasyonu (balonlaşma) ile inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından gereç ve yöntem bölümünde belirtildiği esaslara göre incelendikten sonra skorlanmıştır (Tablo 3.1)

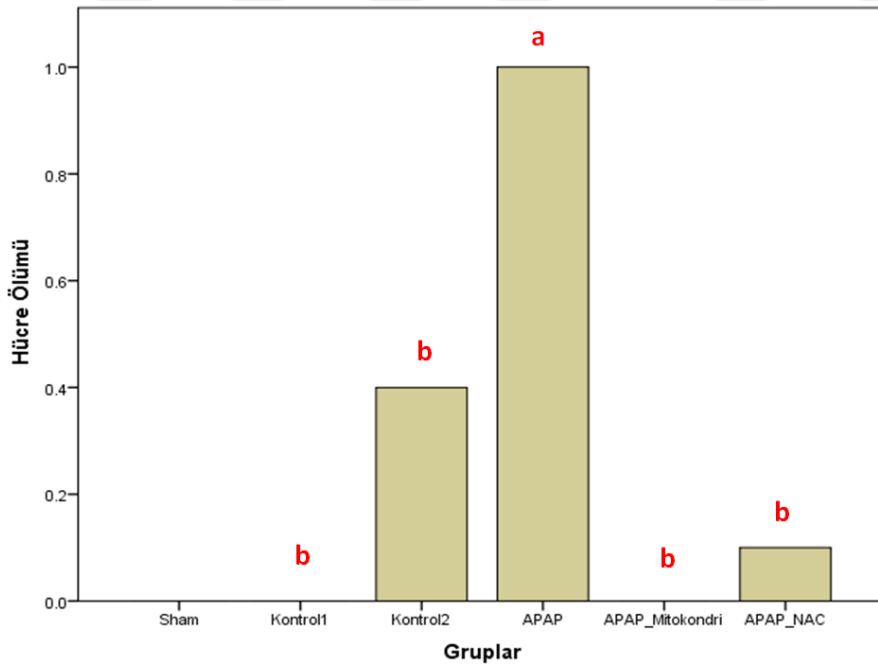
(Resim 4.4). Ardından istatistiksel analizler yapılarak grafikler halinde sunulmuştur (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4).

Sham ve Kontrol 1 gruplarında analiz edilen parametreler açısından değişiklik saptanmamıştır. Skorlama sonucu elde edilen bulgularda APAP grubunda Sham grubuna göre hafif düzeyde hepatosit nekrozu, orta düzeyde balonlaşma dejenerasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu olduğu görülmüştür. Tüm bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). Kontrol 2 grubunda hepatosit nekrozu saptanmazken orta düzeyde balonlaşma dejenerasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu olduğu belirlenmiştir. Tedavi gruplarına baktığımızda ise APAP+Mitokondri grubunda hepatosit nekrozu ve balonlaşma dejenerasyonu açısından bir hasar bulgusu saptanmamış ve anlamlı seviyelerde inflamatuvar hücre infiltrasyonu olmadığı görülmüştür (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). Elde edilen bu veriler mitokondri grubuna ait karaciğer dokusu örneklerinin toksik doz ilaç uygulaması yapılmamış olan Sham ve Kontrol 1 grubu ile benzer morfolojide olduğunu göstermektedir (Resim 4.4E, Resim 4.4F). Klinik tedavinin değerlendirildiği APAP+NAC grubunda ise hepatosit nekrozu saptanmazken, hasar bulgusu olarak balonlaşma dejenerasyonu izlenmiş ve hafif düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu olduğu görülmüştür. Balonlaşma dejenerasyonu seviyesinde Sham grubuna göre anlamlı yükseliş olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.3). İnflamasyon seviyeleri açısından ise APAP+NAC grubunda elde edilen veriler hem Sham grubundan hem de APAP+Mitokondri grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). APAP grubuna göre ise anlamlı seviyede bir düşüş olmadığı görülmüştür (Şekil 4.4) (Tablo 4.2).

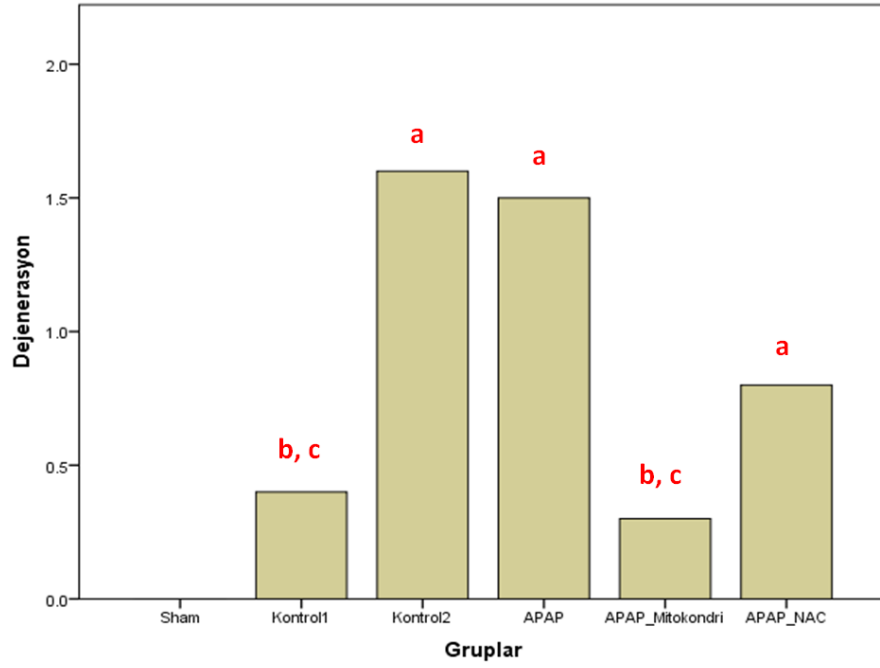
Tablo 4.2: Grupların histolojik skorlaması

Gruplar	Sham (n=5)	Kontrol 1 (n=5)	APAP (n=5)	Kontrol 2 (n=5)	APAP+ Mitokondri (n=5)	APAP+ NAC (n=5)
Hücre Ölümü	0 (0-0)	0 (0-0) ^b	1 (1-2) ^a	0 (0-2) ^b	0 (0-0) ^b	0 (0-1) ^b
Dejenerasyon	0 (0-0)	1 (0-1) ^{b,c}	2 (1-2) ^a	2 (1-3) ^a	0 (0-1) ^{b,c}	1 (0-2) ^a
İnflamasyon	0 (0-0)	0 (0-0) ^{b,d}	2 (0-3) ^a	1 (0-1)	0 (0-0) ^{b,d}	1 (0-2) ^a
Toplam Skor	0 (0-0)	0 (0-1)	5 (2-7)	3 (1-6)	0 (0-1)	2 (0-5)

- a: Sham grubuna göre anlamlı artış
b: APAP grubuna göre anlamlı azalış
c: Kontrol 2 grubuna göre anlamlı azalış
d: APAP+NAC grubuna göre anlamlı azalış

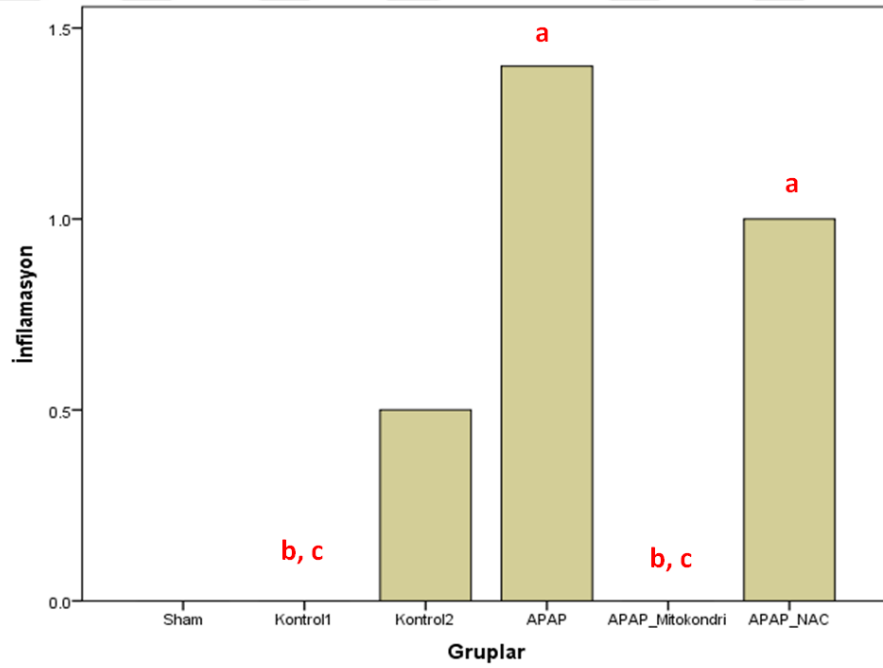
**Şekil 4.2:** Hepatosit nekrozu grafiği

- a: Sham grubuna göre anlamlı artış
b: APAP grubuna göre anlamlı azalış



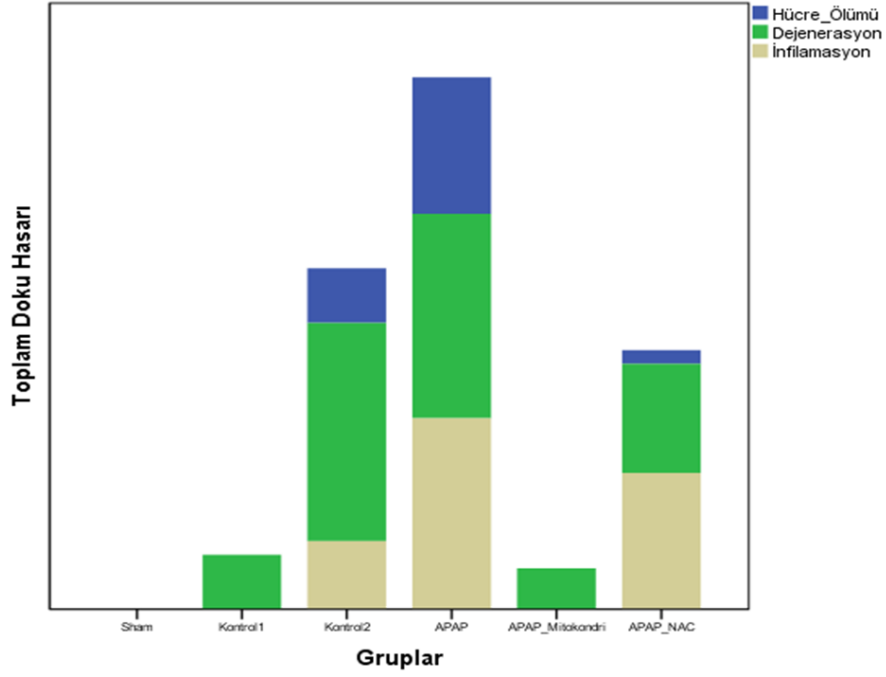
Şekil 4.3: Dejenersasyon grafiği

- a: Sham grubuna göre anlamlı artış
- b: APAP grubuna göre anlamlı azalış
- c: Kontrol 2 grubuna göre anlamlı azalış



Şekil 4.4: İnflamasyon grafiği

- a: Sham grubuna göre anlamlı artış
- b: APAP grubuna göre anlamlı azalış
- c: APAP+NAC grubuna göre anlamlı azalış



Şekil 4.5: Toplam doku hasarı grafiği

4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.4.1. Kan Örneklerine Ait Ölçümlerden Elde Edilen Bulgular

Tablo 4.3: Karaciğer enzim değerleri (Median±SEM)

Gruplar	AST	ALT	LDH	ALP
Sham	118±6,421	64±1,122	115±62,184	259±35,487
Kontrol 1	279±58,165 ^a	60±3,043 ^b	202±53,986 ^b	193±20,961
APAP	474±100,704 ^a	258±90,803 ^a	424±54,578 ^a	263±13,515
Kontrol 2	273±132,885 ^a	61±101,147 ^b	192±36,723 ^b	191±40,108
APAP+Mitokondri	190±25,593	65±6,406 ^b	253±85,497	161±33,115
APAP+NAC	173±23,455	79±6,928 ^c	359±28,739 ^{a, d}	222±21,373

a: Sham grubuna göre anlamlı artış

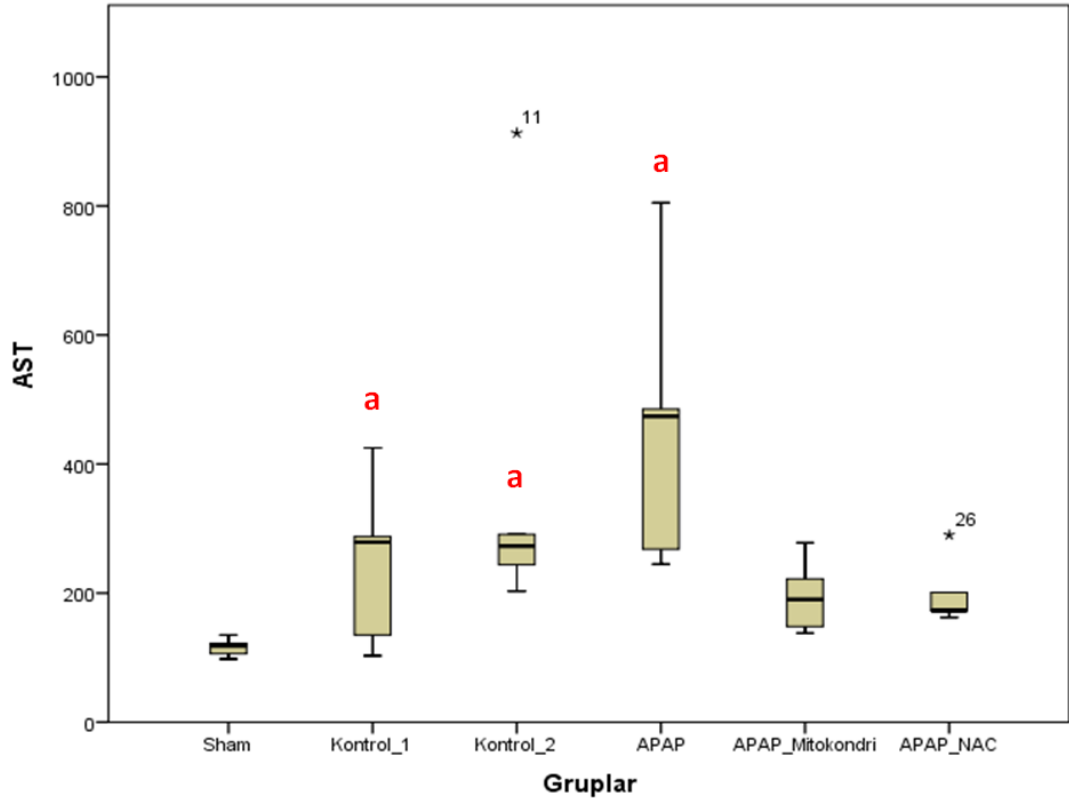
b: APAP grubuna göre anlamlı azalış

c: Kontrol 1 grubuna göre anlamlı artış

d: Kontrol 2 grubuna göre anlamlı artış

1. AST Ölçümü Bulguları

Serum AST düzeyi ölçümlerine göre enzim seviyesinin en düşük olduğu grup Sham grubudur. Diğer tüm gruplarda AST seviyesi Sham grubuna göre yüksek ölçülmüştür. Ancak bunlar içerisinde Kontrol 1, Kontrol 2 ve APAP gruplarındaki yükseliş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). En yüksek enzim değerinin ölçüldüğü APAP grubundaki ($p<0,000$) ve Kontrol 2 ($p<0,002$) grubundaki yükselişin ciddi seviyede olduğu değerlendirilmiştir. APAP+Mitokondri ve APAP+NAC uygulaması yaptığımız tedavi gruplarında ise enzim seviyelerinde APAP grubuna göre anlamlı azalma görülmemiştir. Buna rağmen mitokondri grubunda anlamlılığa çok yakın bir azalma olduğu görülmektedir ($p<0,052$). Ayrıca tedavi grupları ile Sham grubu arasında da anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.6) (Tablo 4.3).

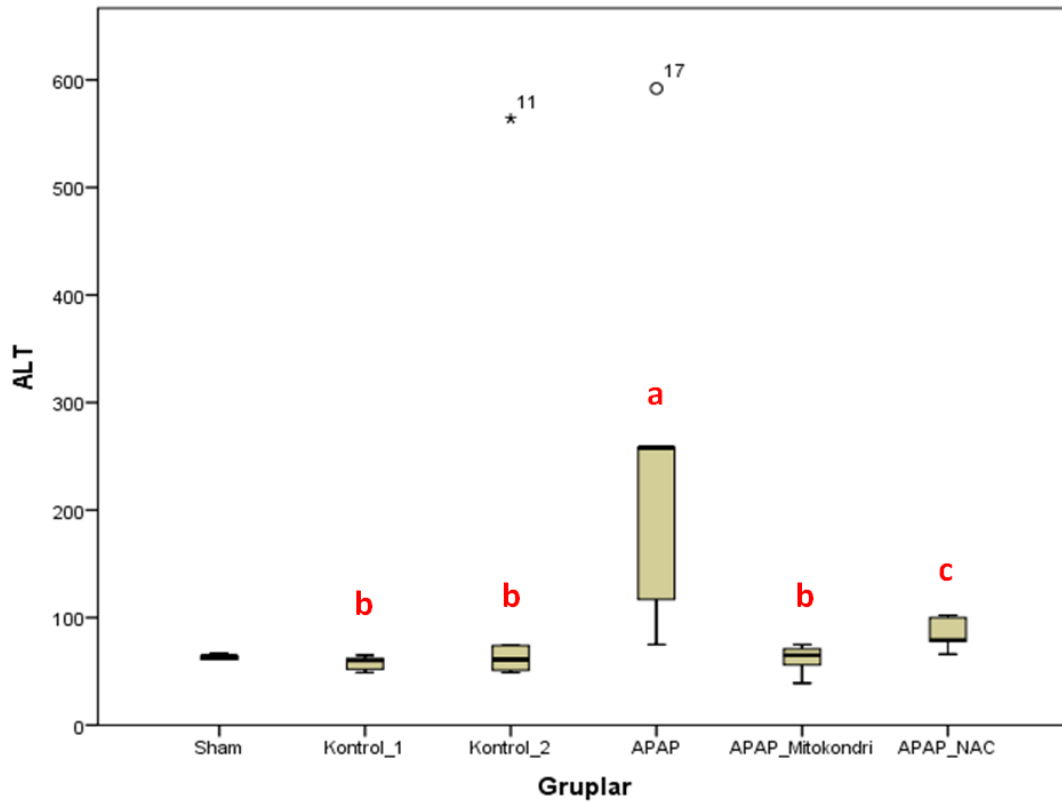


Şekil 4.6: Serum AST düzeyleri grafiği

a: Sham grubuna göre anlamlı artış

2. ALT Ölçümü Bulguları

Serum ALT düzeylerinde en yüksek ölçüm APAP grubunda elde edilmiştir. Bu yükseliş APAP+NAC grubu hariç diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca Kontrol 1 grubuna göre APAP+NAC grubunda anlamlı bir yükseliş olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). APAP+Mitokondri ve APAP+NAC tedavi gruplarında ise Sham grubuna göre anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.7) (Tablo 4.3).



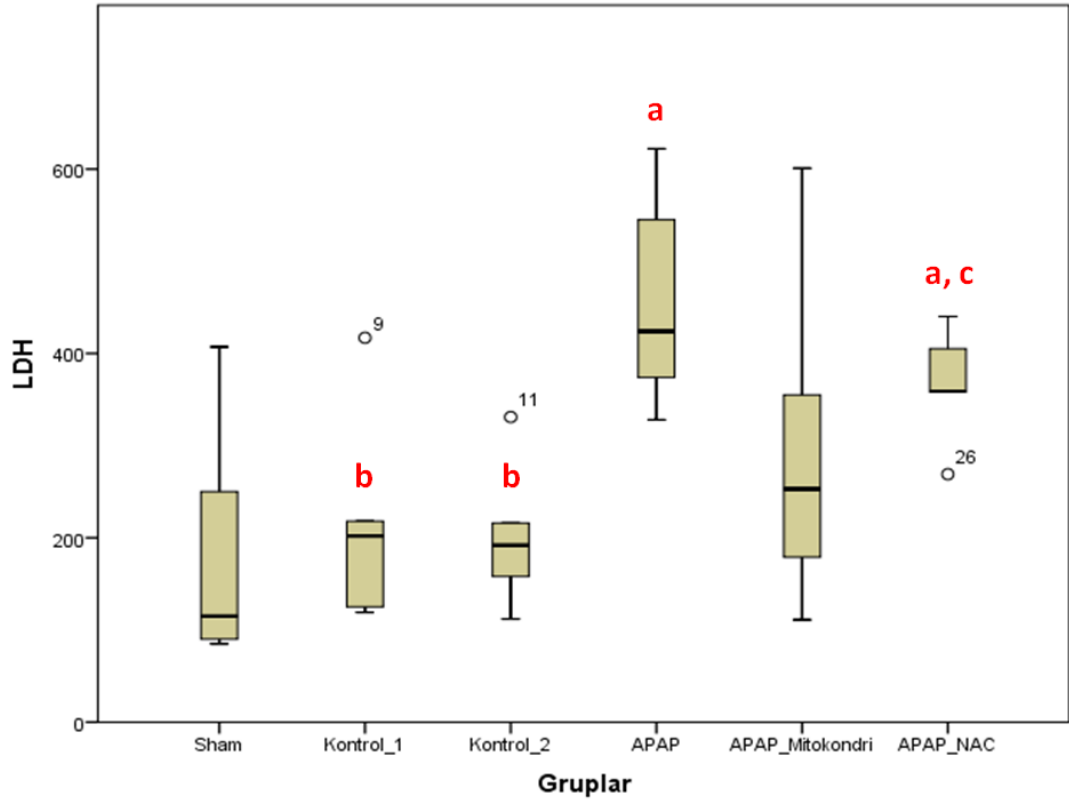
Şekil 4.7: Serum ALT düzeyleri grafiği

- a: Sham grubuna göre anlamlı artış
- b: APAP grubuna göre anlamlı azalış
- c: Kontrol 1 grubuna göre anlamlı artış

3. LDH Ölçümü Bulguları

LDH ölçümünden elde edilen sonuçlarda Sham grubuna göre yalnızca APAP ve APAP+NAC gruplarında anlamlı artış olduğu görülmüştür ($p<0,05$). En yüksek enzim seviyesi APAP grubunda bulunmuştur. Ancak bu yükseliş sadece Sham, Kontrol 1 ve Kontrol 2 gruplarında anlamlı olarak kaydedilmiştir ($p<0,05$). Diğer

anlamli sonuçlar ise Kontrol 2 ve APAP+NAC grupları arasında bulunmuştur ($p<0,05$). APAP+Mitokondri ve APAP+NAC tedavi gruplarında ise APAP grubuna göre anlamli bir LDH düşüşü elde edilememiştir. Aynı zamanda APAP+Mitokondri grubundaki enzim seviyesindeki artışın Sham grubuna göre anlamli olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8) (Tablo 4.3).

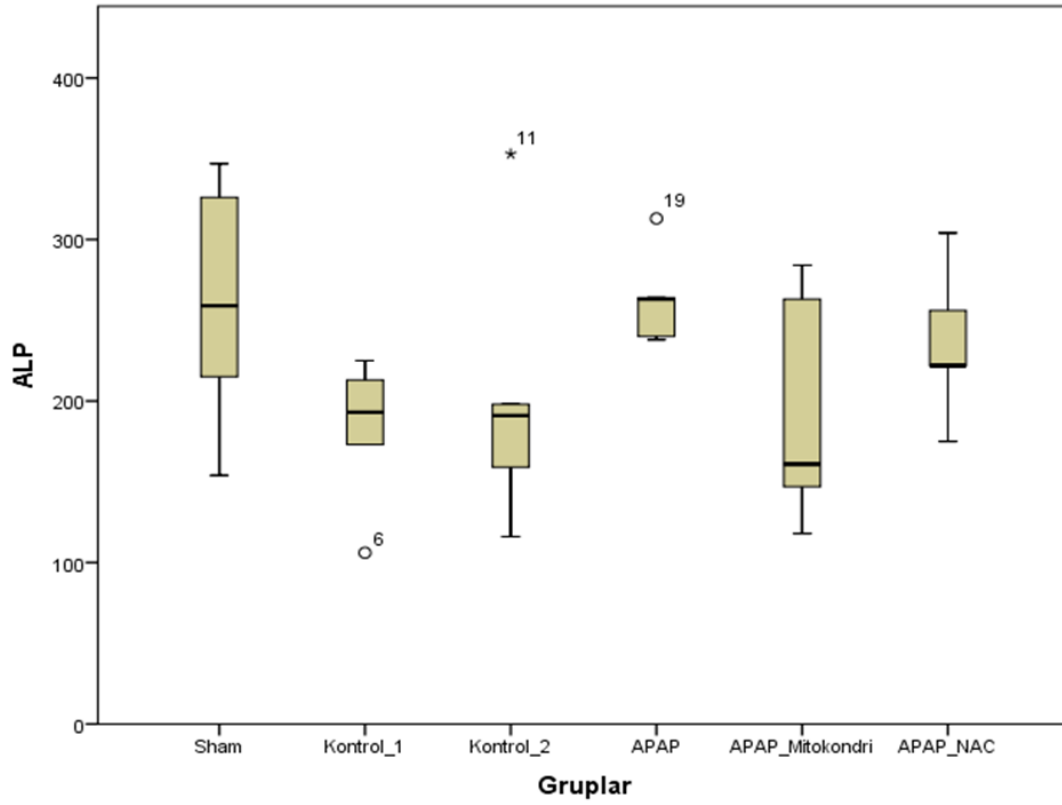


Şekil 4.8: Serum LDH düzeyleri grafiği

- a: Sham grubuna göre anlamli artış
- b: APAP grubuna göre anlamli azalış
- c: Kontrol 2 grubuna göre anlamli artış

4. ALP Ölçümü Bulguları

ALP ölçümlerinden elde edilen verilerde istatistiksel olarak anlamli bir sonuç bulunamamıştır (Şekil 4.9) (Tablo 4.3).



Şekil 4.9: Serum ALP düzeyleri grafiği

4.4.2. Oksidatif Stres Analizlerine Ait Bulgular

Tablo 4.4: Oksidatif stres ölçümlerine ait değerler (Median±SEM)

Gruplar	MDA (mmol/gpro)	SOD (U/gpro)	TAS (µM/L)	TOS (µM/L)	GSH (µM/gdoku)
Sham	0,75±0,017	93,13±12,689	3,61±0,178	6,96±0,732	39,97±2,198
Kontrol 1	1,19±0,124	56,58±17,924	3,50±0,237	7,44±0,711	28,60±2,033 ^{a,d}
APAP	0,92±0,084	69,27±4,350	3,65±0,109	7,51±0,493	29,83±1,984 ^{a,d}
Kontrol 2	0,74±0,149	68,48±8,872	3,57±0,191	5,94±0,653 ^b	34,43±2,244 ^d
APAP+ Mitokondri	0,83±0,115	70,16±8,550	2,96±0,129	4,92±0,179 ^{a,b,c}	31,64±1,066 ^d
APAP+ NAC	1,22±0,442	84,98±9,496	3,23±0,136	5,94±0,305 ^b	44,60±0,579

a: Sham grubuna göre anlamlı azalış

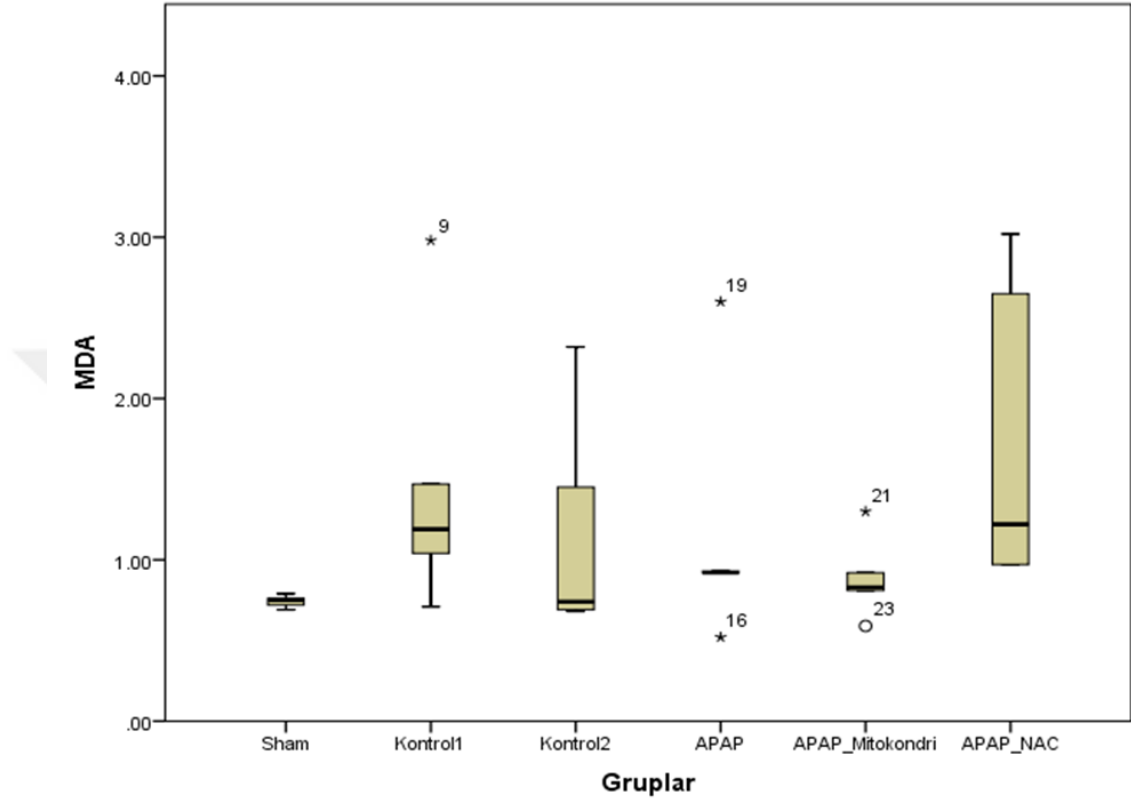
b: APAP grubuna göre anlamlı azalış

c: Kontrol 1 grubuna göre anlamlı artış

d: APAP+NAC grubuna göre anlamlı azalış

1. MDA Ölçümü Bulguları

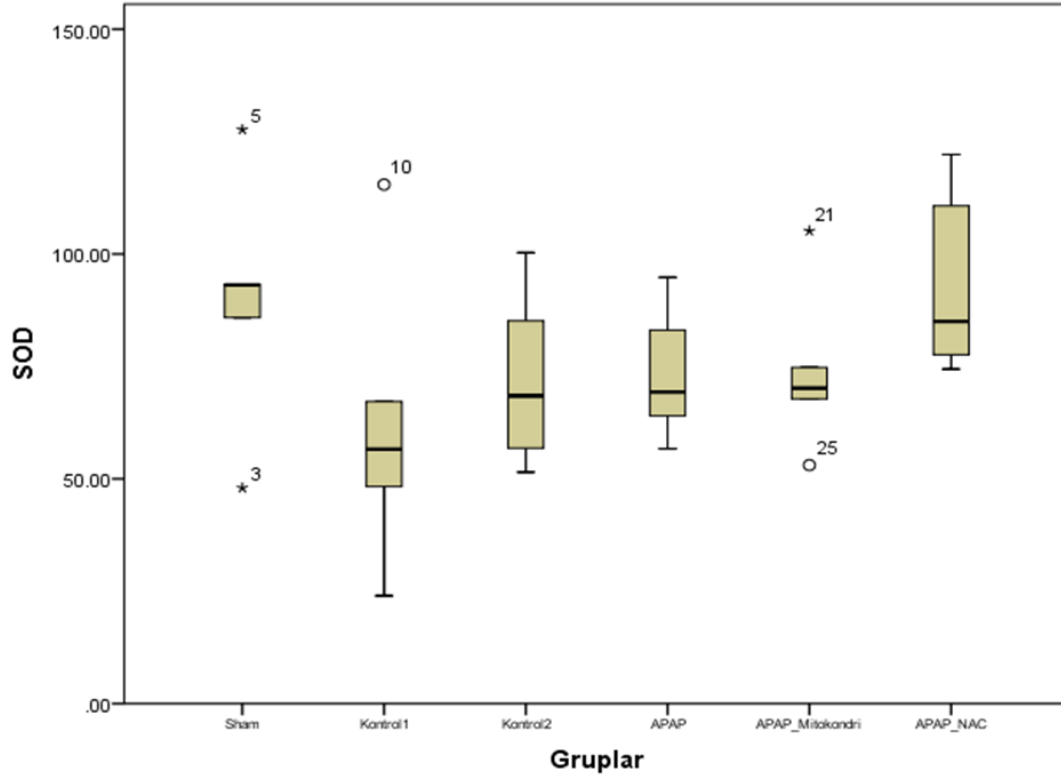
MDA ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır.



Şekil 4.10: MDA düzeyleri grafiği

2. SOD Ölçümü Bulguları

SOD değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim görülmemiştir.

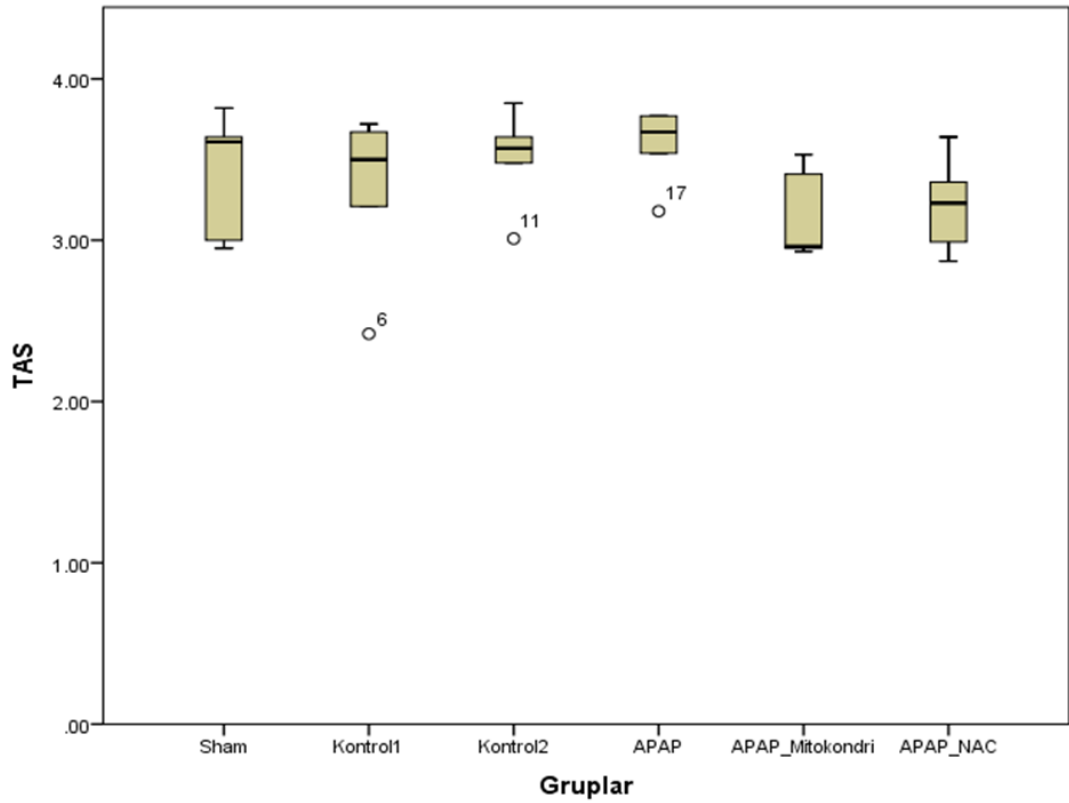


Şekil 4.11: SOD düzeyleri grafiği

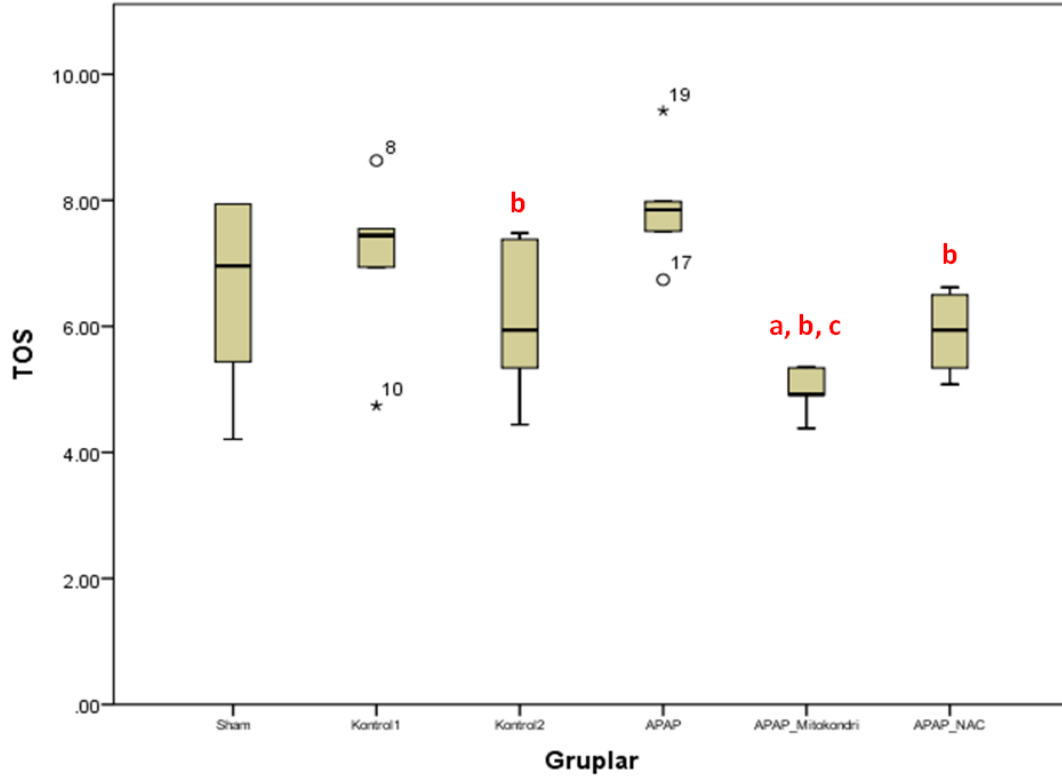
3. TAS ve TOS Ölçümleri Bulguları

Oksidatif stres analizlerinden MDA, SOD ölçümlerine ek olarak TAS ve TOS ölçümleri yapılmıştır (Tablo 4.4). TAS ölçümünden alınan sonuçlarda gruplar arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.12). TOS ölçümlerinde ise en düşük oksidan seviyesi APAP+Mitokondri grubunda iken, en yüksek oksidan seviyesi APAP grubunda bulunmuştur. Bu analizden elde edilen sonuçlarda APAP+Mitokondri grubu toplam oksidan seviyesinin Sham, APAP ve Kontrol 1 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Ek olarak APAP+NAC ve Kontrol 2 grupları TOS seviyesi APAP grubuna göre anlamlı seviyede daha az bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.13).

TAS ve TOS analizlerinin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer ölçüt ise ticari kite ait oksidatif stres derecelendirme tablosudur (Oksidatif indeks tablosu). Ölçülen TAS ve TOS değerlerinin derecelendirme tablosundaki yerlerine konulması sonrası alınan skora göre APAP+Mitokondri grubu değerlerinin çoğunlukla en iyi seviyede (9. alan) olduğu görülmüştür. Diğer gruplarda ise bu skor çoğunlukla 2 puan aşağıda kalarak iyi seviyede (7. alan) bulunmuştur (Tablo 4.5).



Şekil 4.12: TAS düzeyleri grafiği



Şekil 4.13: TOS düzeyleri grafiği

- a: Sham grubuna göre anlamlı azalış
- b: APAP grubuna göre anlamlı azalış
- c: Kontrol 1 grubuna göre anlamlı azalış

TAS

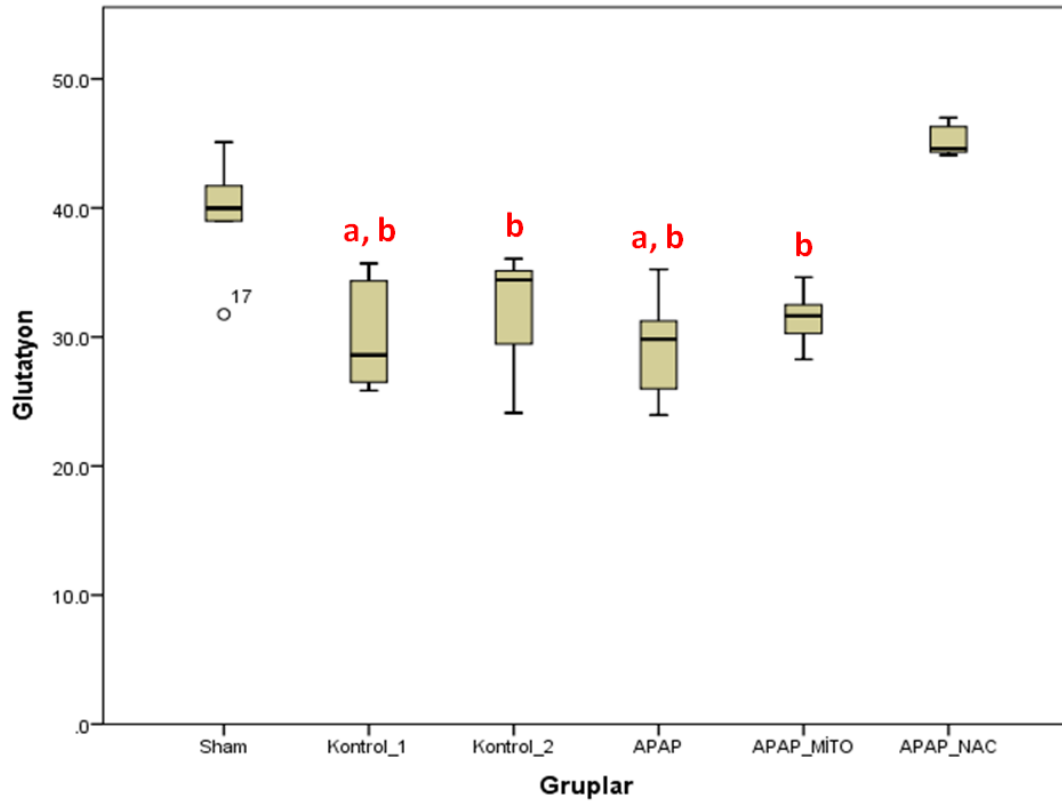
	5,00						8,00						TOS					
	AFAP+ NAC	APAP+Mito	AFAP	Kontrol 2	Kontrol 1	Sham	AFAP+ NAC	APAP+Mito	AFAP	Kontrol 2	Kontrol 1	Sham		AFAP+ NAC	APAP+Mito	AFAP	Kontrol 2	Kontrol 1
2,00	M2 M3 M5		K2-1	K1-5	S4		N1 N2 N3 N4 N5	M1 M4	A1 A2 A3 A5	K2-2 K2-3 K2-4 K2-5	K1-1 K1-2 K1-4			A4			K1-3	
	9						7						5					
1,45							8						2					
	4						6						1					

Tablo 4.5: Oksidatif stres derecelendirme tablosu (Rel Assay DiagnoSquare®)

1. Çok yüksek oksidatif stres
2. Yüksek oksidatif stres
3. Oksidatif stres
4. İmmün ve metabolik hastalıklar
5. Denge-Hastalık başlangıcı da olabilir
6. Normal seviye
7. İyi seviye
8. Çok iyi seviye
9. En üst seviye

4. GSH Ölçümü Bulguları

Doku GSH düzeylerinde Sham grubuna göre APAP ve Kontrol 1 gruplarında anlamlı düzeyde bir azalış olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Tüm gruplar içerisinde en yüksek GSH değeri APAP+NAC grubunda ölçülmüştür. APAP+NAC grubundaki GSH düzeyinin Sham grubu hariç diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$).



Şekil 4.14: GSH düzeyleri grafiği

a: Sham grubuna göre anlamlı azalış

b: APAP+NAC grubuna göre anlamlı azalış

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda toksik dozda APAP alımına bağlı olarak meydana gelen karaciğer hasarında mitokondri naklinin etkileri araştırıldı. Bu kapsamda APAP toksisitesi oluşturmak için deney hayvanlarına oral gavaj yoluyla toksik dozda APAP uygulandı (79). APAP kaynaklı karaciğer toksisitesi karmaşık mekanizmalar sonucu meydana gelmektedir. Normal koşullarda APAP karaciğerde zararsız hale getirilerek uzaklaştırılır. Bu süreçte az miktarda APAP reaktif metabolik ürünü olan NAPQI üretilir ve hızla GSH ile tamponlanarak detoksifiye edilir. Ancak yüksek dozda APAP kullanımı sonrası NAPQI üretiminin artması sonucu hücresel GSH tükenir ve buna bağlı olarak fazla NAPQI detoksifiye edilemez. NAPQI serbest halde bulunduğu hücresel makromoleküllere bağlanarak protein ve organelerin hasarlanmasına neden olur. Ayrıca oksidatif strese yol açarak daha fazla hasar oluşumuna ve hücre ölümüne neden olur (137).

Literatürde APAP toksisitesini üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde Amir MK. ve arkadaşları APAP toksisitesine karşı oral silimarinin etkilerini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre yüksek dozda APAP uygulanması sonucu serum ALT seviyesinde artış olduğu ve hepatositlerde nekroz geliştiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada tedavi olarak silimarinin etkileri değerlendirilmiş ve bulgular altın standart olarak kabul edilen NAC ile kıyaslanmıştır (79). Yapılan bir diğer çalışmada ise Tatsuya M. ve arkadaşları toksik doz APAP uygulaması sonrası serum ALT, AST seviyelerinin arttığını, karaciğer dokusunda sentrilobüler nekroz gerçekleştiğini, lipid peroksidasyonunun arttığını, nitrit/nitrat seviyesinin yükseldiğini ve hepatik glutasyon miktarının azaldığını göstermişlerdir. Çalışmada tedavi olarak melatonin uygulanmış ve sonuç olarak AST, ALT seviyeleri, hepatosit nekrozu ve lipid peroksidasyonu gibi parametrelerde anlamlı düşüşler olduğu gösterilmiştir (138).

Karaciğer hasarının belirlenmesinde amacıyla yapılan çeşitli analizler vardır. Rutin kullanımda özellikle kan numunelerinde çalışılan biyokimyasal analizler önemli yer tutmaktadır. Bunlar içerisinde hepatosellüler hasarın belirlenmesi için yapılan ölçümlerden bazıları AST, ALT, ALP, GGT ve LDH ölçümleridir. AST, ALT ve LDH enzimleri hepatositlerde sentezlenirken ALP ve GGT safra kanalı

epitel hücrelerinde üretilmektedir. Bu enzimler hepatositlerin yanında daha birçok hücre türünde de bulunmaktadır. Bu nedenle tamamen karaciğere özgün olmasa bile karaciğer fonksiyonlarının test edilmesinde önemli yer tutmaktadırlar (139). AST, ALT ve LDH hepatosellüler nekrozun gösterilmesinde, ALP ve GGT ise hepatik hasarın yanında özellikle kolestaz gibi safra kaynaklı çeşitli hasarlarının gösterilmesinde kullanılan ölçümleridir.

AST, ALT enzimleri özellikle karbonhidrat metabolizmasında rol alır. AST hem sitozolde hem de mitokondride bulunurken, ALT yalnızca sitozolde bulunan bir enzimdir. Hepatositlerin nekroza uğraması bu enzimlerin hücre dışına salınmasına ve kan serum seviyelerinin artışına neden olur. Yalnızca nekrotik hücrelerden değil dejenerasyona uğrayarak membran geçirgenliği artan hücrelerden de salgılanabilirler (140). Bu enzimler idrarla atılamaz, safra yoluyla ise kısmen uzaklaştırılabilirler. Bu nedenle karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilmesinde önemli yer tutarlar (141). Serum AST, ALT serum düzeyleri çeşitli enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, iskemi, aşırı alkol alımı ve ilaç kullanımına bağlı olarak artabilir (142). Karaciğer hasarına neden olarak bu enzimlerin serum seviyelerini artıran en önemli ilaçlardan birisi de APAP' tır (143). İlaç alımına bağlı karaciğer hasarında enzim artışı hafif şiddette olabileceği gibi organ yetmezliğinde olduğu gibi ciddi düzeylerde de olabilir.

LDH enzimi hepatositlerin yanında birçok hücre türünde bulunan ve çeşitli izoenzimleri olan sitoplazmik bir enzimdir. Karaciğer dokusunda bulunan formu LDH₅' tir. LDH anaerobik glikoliz yolağının son enzimidir. Pirüvatın laktata dönüşmesini sağlar. Bu enzimin serum düzeylerinin artması hücre harabiyetini gösterir. Ancak yalnızca karaciğer hasarında değil kalp, akciğer, böbrek ve kan dokusu gibi birçok hasarlanma sonucu serum LDH seviyesi artar.

ALP ve GGT enzimleri ise karaciğere özgü değil, çeşitli hücre türlerinde bulunan enzimlerlerdir. Karaciğer hasarının ölçülmesinde ALP ve GGT birlikte kullanılır. Bu enzimlerin hepatosit hasarı sonucu sistemik dolaşıma geçmesi ya da safra yoluyla atılmalarının bozulması sonucu serum düzeyleri yükselebilir. Bazı ilaçların toksik dozda alınması sonrası bu enzimlerin de yükseldiği bilinmektedir. Ancak literatürde bu enzimlerin APAP alımına özgün olarak yükselmesi ile ilgili bilgi bulunmamaktadır.

Bizim çalışmamızda da karaciğer hasarının ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi için kan numunelerinde AST, ALT, LDH ve ALP ölçümleri yapılmıştır. AST ölçümlerinden elde edilen sonuçlarda Sham grubuna göre Kontrol 1, Kontrol 2 ve APAP gruplarında anlamlı yükseliş olduğu görülmüştür. APAP grubu enzim seviyesi Sham grubundan istatistiksel olarak ciddi ölçüde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,000$). Benzer şekilde ALT düzeyleri en yüksek APAP grubunda ölçülmüş ve APAP+NAC grubu hariç diğer tüm gruplardan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak APAP grubu hariç diğer tüm gruplarda ALT seviyeleri birbirine yakın bulunmuştur. LDH ölçümlerine baktığımızda ise Sham grubu ile APAP grubu arasında önemli ölçüde istatistiksel fark olduğu ortaya konulmuştur ($p<0,006$). Literatür bilgilerine bakıldığında bu modelde toksik hasara uğramış sıçanlardan AST, ALT değerlerinin yükseldiği görülmektedir (138). Bizim çalışmamızda alınan sonuçlar da literatür bilgileri ile uyumlu olarak AST, ALT ve LDH ölçümleriyle gösterilen hepatosit hasarı açısından APAP toksisite modelinin başarıyla uygulandığını göstermektedir.

Herhangi bir toksik hasar oluşturmadan deney sürecini taklit ettiğimiz Kontrol 1 grubunda Sham grubuna kıyasla AST seviyesinin anlamlı olarak yüksek olduğu, ancak ALT ve LDH ölçümlerinde bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle ilaç ve tedavi uygulaması yapılmaksızın deney sürecinin taklit edilmesinin tedavi gruplarında alınacak sonuçları etkilemediği değerlendirilmiştir.

Toksik karaciğer hasarı oluşturduğumuz, ancak tedavi olarak mitokondri içermeyen respirasyon tamponu enjekte ettiğimiz Kontrol 2 grubunda ise Sham grubuna göre AST değerinin anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca bu grup ile Kontrol 1 ve APAP grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuç mitokondrilerin içerisinde çözüldüğü respirasyon tamponunun karaciğer fonksiyonlarına olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Ancak Kontrol 2 grubunda ALT ve LDH değerleri Sham grubu ile benzer ve APAP grubundan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Bu beklenenden farklı bir durumdur. Çünkü bu sonuçlara göre diğer bulgularla paralel olarak APAP grubunda hastalık modelinin başarıyla uygulandığı, ancak Kontrol 2 grubunda toksik hasarın tam olarak gösterilemediği değerlendirilmiştir. Çünkü histolojik bulgulara bakıldığında hepatositlerin dejenerasyona uğradığı ancak nekroz gelişmediği

görülmüş ve inflamasyonun da sınırlı kaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca diğer biyokimyasal veriler de bu değerlendirmeyi desteklemektedir. Kontrol 2 grubunda elde edilen bu sonuçlar nedeniyle, sıçanlara uygulanan respirasyon tamponunun koruyucu bir etkisi olabileceği düşünülebilir. Ancak literatürde respirasyon tamponunun koruyucu etkileri olduğuna dair herhangi bir bilgiye ulaşılamamıştır. Bu durumun net olarak anlaşılabilmesi için yapılacak başka çalışmalarda sadece respirasyon tamponunun uygulandığı yeni bir grup eklenmesinin uygun olacağı değerlendirilmiştir.

ALP ölçümlerinde ise tüm gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunamamıştır. Bu enzimin karaciğer hasarından daha çok safra yolları ile ilgili hastalıklarda yükseldiği bilinmektedir. Ayrıca literatürde bu enzimin APAP hasarına özgü bir yükselişi olduğu ile ilgili bir bilgi tespit edilememiştir. Bu nedenle alınan sonuçlar literatür ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

APAP toksisitesine bağlı hasarlı dokuların histolojik görüntüsü sentrilobüler alanlarda hepatosit nekrozu ile karakterizedir (144). Literatürde toksik hasar modelinde benzer doku morfolojisini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak toksik doz APAP uygulaması sonrası hepatosellüler nekroz geliştiği, bunun yanında hepatositlerin balonlaşma dejenerasyonuna uğradıkları ve hasarlı alanlara lökosit infiltrasyonu olduğu görülmüştür (Resim 4.4D). APAP grubunda hepatosit nekrozu diğer tüm gruplardan, dejenerasyon ve inflamasyon ise Sham, Kontrol 1 ve APAP+Mitokondri gruplarından anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.2). Ayrıca toksik hasar oluşturulan ancak tedavi yerine respirasyon tamponu uygulanan Kontrol 2 grubundaki ratlarda ise hepatositlerin nekroza uğramadığı, ancak orta düzeyde dejenerasyon ve hafif düzeyde inflamasyon olduğu görülmüştür. Kontrol 2 grubunun yalnızca balonlaşma dejenerasyonu açısından Sham grubuna göre anlamlı seviyede yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2). Karaciğer enzim düzeylerinde elde edilen bulgulara paralel olarak histolojik bulgular da respirasyon tamponunun koruyucu bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

APAP toksisitesinde doku hasarına neden olan bir faktör de artan oksidatif strestir. Yüksek doz APAP alımı sonrası lipit peroksidasyonunda artış olduğu ve GSH, SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan ajanların etkinliklerinin azaldığı rapor

edilmiştir (38,145). Bizim çalışmamızda da toksik karaciğer hasarının gösterilmesi ve kısmen de olsa mekanizmanın açıklanması için oksidatif stres analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda oksidatif stresi ölçmek amacıyla MDA, SOD, TAS, TOS ve GSH ölçümleri yapılmıştır. APAP grubunda Sham grubuna göre MDA ve TOS ölçümlerinde kısmi bir yükseliş, SOD düzeylerinde kısmi bir düşüş görülse de istatistiksel olarak anlamlı değildir. Literatürde lipid peroksidasyonunun APAP toksisitesinde hücre ölümünü tetikleyen önemli bir olay olmadığını iddia eden yayınlar da bulunmaktadır. Bu yayınlarda APAP toksisitesinin başka mekanizmalar üzerinden de olabileceği rapor edilmiştir (146). Çalışmamızda APAP grubunda MDA seviyelerinde artış tespit edilememesinin nedeninin bu gruplarda bizim artışını ölçemediğimiz seviyelerde (az miktarda) olduğu ya da başka mekanizmaların etkili olduğu düşünülmektedir.

Oksidatif stresin iyi bir göstergesi olan TOS seviyesi APAP grubunda Kontrol 2, APAP+Mitokondri ve APAP+NAC gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. APAP grubunda MDA ölçümü ile tespit edilemeyen oksidatif stres artışı TOS ölçümü ile tespit edilmiştir. APAP grubunda görülen oksidatif stres artışı genel literatür bilgileri ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

APAP kaynaklı toksik karaciğer hasarında önemli rol oynayan olaylardan birisi de hepatik GSH' nin tükenmesidir. Yapılan birçok çalışmada yüksek doz APAP alınması sonrasında GSH azalmasına ve oksidatif strese bağlı olarak doku hasarı geliştiği rapor edilmiştir (147). Bizim çalışmamızda da literatür bilgileriyle uyumlu olarak APAP uygulaması sonrası hepatik GSH miktarının azaldığı görülmüştür. APAP grubundaki bu azalış Sham grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu nedenle APAP toksisitesinde hasar mekanizmalarından birisinin hepatik GSH miktarının azalması olduğu bilgisi desteklenmiştir (Tablo 4.4) (Şekil 4.14).

APAP toksisitesinde mitokondriyal disfonksiyonun önemini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Toksik dozda alınan APAP' ın karaciğerde metabolize edilmesi sonucu artan reaktif metabolitlerinin mitokondrileri hedef aldığı bilinmektedir (148). Son yıllarda mitokondrinin APAP toksisitesinde ana oksidatif stres ve hasar kaynağı olduğu hakkında literatür bilgileri artmaktadır (149). Bu kapsamda NAPQI' nin GPx ve ATP sentaz enzimi α alt birimi gibi çeşitli

mitokondriyal proteinlere bağlandığı rapor edilmiştir (150). Bu durum ATP üretimini ve mitokondriyal solunumu bozarak ROT artışına neden olmaktadır (151). Ayrıca APAP toksisitesine maruz kalmış hepatositlerin elektron mikroskopi ile incelendiği bir çalışmada mitokondrielerde meydana gelen morfolojik değişimler de gösterilmiştir (25). Tüm bunlara ek olarak kompleks I ve II mitokondriyal respirasyon inhibisyonu (45), mitokondriyal proteinlerin arilasyonu (35), kalsiyum taşıma yeteneğinde azalma (44) ve mitokondri iç membran geçirgenliğinde artma (53) meydana geldiği rapor edilmiştir. Bahsedilen literatür bilgilerine göre yüksek dozda APAP alınması mitokondri üzerinden ciddi hasara neden olmaktadır.

Mitokondri hücrenin enerji ihtiyacının karşılanmasından hücre ölüm yollarının aktiflenmesine kadar birçok kritik süreçte rol oynar. Organizmanın canlılığının korunması ve homeostatik dengenin sürdürülmesi mitokondrinin sağlıklı olmasına bağlıdır. Bu önemli görevleri nedeniyle hasarlı mitokondrielerin yerine fonksiyonel mitokondrielerin nakledilmesiyle doku hasarının önlenilebileceği düşünülmektedir. Bu kapsamda farklı modellerde yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (109,110). Bu çalışmalar sonucunda mitokondri naklinin doku hasarını ve oksidatif stresi azalttığı, fonksiyonel geri dönüşü ise artırdığı rapor edilmiştir.

Çalışmamızda APAP toksisitesinde meydana gelen en önemli hasar mekanizmalarından birisi olan mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna karşı tedavi edici ajan olarak mitokondri nakli yapılmıştır. Mitokondri nakli yapılan grupta hepatosit nekrozu, dejenerasyonu ve inflamasyon parametrelerinin tümünde iyileşme olduğu tespit edilmiştir. Bu değerlendirmelerin hepsinde (nekroz, dejenerasyon ve inflamasyon) sonuçlar APAP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde neredeyse APAP+Mitokondri grubundaki deney hayvanları ile sağlıklı sıçanların olduğu Sham grubundaki doku örnekleri arasında bir fark olmadığı değerlendirilmiştir. Mitokondri nakli sonucu doku hasarı tamamen iyileşmiş (ya da doku hasarından korunmuş) ve hasarlı dokunun normal karaciğer doku morfolojisine sahip olması sağlanmıştır (Resim 4.4F). Kan örnekleri sonuçlarına göre ise serum ALT seviyelerinin mitokondri uygulaması sonrasında APAP grubuna göre anlamlı olarak düştüğü görülmüştür. Ayrıca Sham grubu ile mitokondri nakli yapılan grup arasında fark olmaması nedeniyle iyi seviyede bir

iyileşme sağlanarak karaciğer fonksiyonlarının düzeltilebildiği değerlendirilmiştir. Ancak AST ve LDH değerlerinde APAP grubuna göre APAP+Mitokondri grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş sağlanamamıştır (Tablo 4.3). Literatürde AST enziminin ALT enziminden daha hızlı elimine edildiğini (152) ve ilaç toksisitesinde ALT artışının daha baskın olduğunu ifade eden bilgiler bulunmaktadır (153). ALT enzimi AST' ye göre karaciğer için daha özgündür. AST kalp, böbrek, eritrositler gibi karaciğer dışı hücrelerde daha yoğun bulunurken, ALT daha az bulunmaktadır (154). Bizim sonuçlarımızda da bu bilgilerle uyumlu olarak APAP+Mitokondri grubunda ALT ölçümlerinde anlamlı düşüş kaydedilmiş ancak AST ve LDH düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Çalışmamızda gruplar arasında AST ve LDH seviyelerinde anlamlı bir farklılık bulunamamasının bu nedenle olabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca LDH enzimi vücut hücrelerinin çoğunda bulunan bir enzimdir. Hücre ölümünün bir göstergesi olarak kullanılan bu enzimin karaciğere özgün olmaması nedeniyle sonuçlarda istatistiksel anlamlılığın elde edilememesinin başka bir nedeni olabilir. Mitokondri uygulanan grup ile APAP grubu arasında AST ($p<0,052$) ve LDH ($p<0,085$) ölçümlerinde anlamlı fark bulunamamasının bir nedeni de gruplardaki sıçan sayısının az olmasından kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmektedir.

TOS ölçümlerine göre mitokondri grubunda toplam oksidan seviyesinin APAP grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür. Bunun yanında ilginç bir şekilde mitokondri grubu TOS seviyesi Sham grubuna göre de anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Ek olarak ölçüm sonuçlarının TAS ve TOS ölçüm kitinin üretici firması tarafından önerilen "Rel Assay DiagnoSquare[®]" tablosuna göre değerlendirilmesi yapılmıştır. Değerlendirmede TAS ve TOS değerlerinin tablodaki yerlerine konulduktan karşılık geldiği alanların (1:en yüksek oksidatif stres, 9:en iyi değer) açıklamasına göre yapılmaktadır. Yapılan bu skorlama tablosuna göre de öne çıkan grup diğer gruplara göre daha olumlu değerler gösteren mitokondri transplantasyon grubu olmuştur. Buna göre mitokondri uygulaması oksidan seviyesini azaltmıştır. Doku GSH seviyeleri APAP grubuna göre APAP+Mitokondri grubunda aynı olmasına rağmen, APAP+Mitokondri grubu GSH seviyeleri Sham grubu ile de aynı olmuştur (Tablo 4.4). Bu nedenle mitokondri naklinin oksidatif stresi antioksidan GSH üzerinden de desteklediği düşünülebilir.

Tüm dünyada akut karaciğer hasarının en önemli nedenlerinden biri olan APAP toksisitesinin tedavisinde NAC kullanılmaktadır. NAC, APAP bağımlı karaciğer toksik hasarının önlenmesinde etkili bir tedavi ajanıdır (27). Bizim çalışmamızda da mitokondri naklinin etkilerini kıyaslamak için diğer bir grup sıçana APAP toksisitesinin tedavisinde kullanılan NAC uygulanmıştır. Böylece mitokondri naklinin ve NAC tedavisinin etkileri çok yönlü olarak incelenmiştir. NAC uygulaması yapılan sıçanların karaciğer histolojik bulgularında hepatosit nekrozunun APAP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığı tespit edilmiştir. Ancak bu başarılı etkisi hücre dejenerasyonu ve inflamasyon parametrelerinde görülememiştir. APAP grubuna göre bu parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Yine NAC tedavisi uygulanan grubun serum AST, ALT ve LDH seviyelerinde APAP grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Oksidatif stres ölçümlerine göre ise APAP+NAC grubunda mitokondri uygulanan grubun değerlerine benzer olarak yalnızca TOS değeri APAP grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ayrıca bu grupta GSH seviyesinin diğer tüm gruplardan (Sham grubu hariç) anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.14). NAC tedavisinin etki mekanizmasının GSH sentezini ve dolayısıyla doku GSH miktarını artırması olduğunu rapor eden çalışmalar bulunmaktadır. Bu yolla fazla NAPQI' yi zararsız hale getirerek oksidatif stresi engellemektedir (147). Bizim çalışmamızda elde edilen bu bulguların literatür bilgisine paralel olduğu ve NAC tedavisinin koruyucu etkinliğini GSH miktarını artırarak gerçekleştirdiği görülmüştür. Tüm bu veriler dikkate alındığında klinik tedavide kullanılan NAC uygulaması bizim çalışmamızda kısmi bir koruyucu ve tedavi edici etkinlik göstermiştir. Çalışmamızda NAC tedavisinin en önemli özelliğinin hepatosit nekrozunu önlemesi ve GSH sentezini artırması konusunda olduğu görülmüştür. Ancak karaciğer fonksiyonları açısından önemli bir gelişme sağlayamadığı değerlendirilmiştir. Literatürde deneysel APAP toksisitesinde uygulanan NAC tedavisi ile ilgili bir çok doz ve uygulama zamanı bulunmaktadır. Çalışmamızda bu uygulamalar arasından seçilen modelden kaynaklı doz problemi yaşanmış olabilir. Devam eden çalışmalarda deney gruplarında değişik doz ve zamanlama içeren eklemelerin yapılmasının daha uygun olacağı değerlendirilmiştir.

APAP+NAC grubu inflamasyon seviyesinin ve GSH miktarının APAP+Mitokondri grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. İki grup arasında analizi yapılan diğer parametreler açısından (nekroz, dejenerasyon, serum enzim düzeyleri ve oksidatif stres) anlamlı bir fark bulunamamıştır. Buraya kadar açıklanan bulgular ışığında yapılan değerlendirmede mitokondri nakli uygulamasının klinikte kullanılan NAC tedavisinden APAP toksisitesine karşı daha başarılı olduğu değerlendirilmektedir.

Yaptığımız çalışmada mitokondri nakli başarıyla uygulanmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu başarılı sonuçlara ulaşılabilmesi için mitokondrilerin canlı ve fonksiyonel olarak izole edildikten sonra en uygun yolla verilmesi gerekmektedir. Başarılı bir mitokondri nakli uygulamasında nakledilen mitokondriler hedef hücre içerisine girerek aktivite göstermektedir. Çalışmamız sırasında izolasyon ve nakil süreçlerinin en uygun şekilde yapıp yapılmadığının değerlendirilmesi için de çeşitli analizler yapılmıştır. Bu amaçla mitokondriler kaynak olarak kullanılan mezenkimal kök hücrelerin içerisindeyken boyanarak görüntülenmiştir (Resim 4.1). Daha sonra bu hücrelerden izole edilen mitokondriler yine boyanarak membran bütünlükleri incelenmiştir (Resim 4.2). Bu şekilde mitokondrilerin yapısal bütünlüklerini koruyup korumadıkları değerlendirilmiştir. Mitokondri izolasyonunun başarılı olup olmadığının değerlendirilmesi yalnızca yapısal bütünlüğünün analiz edilmesiyle yapılamaz. Aynı zamanda bu mitokondrilerin fonksiyonel olarak da aktif ve sağlıklı olması gerekmektedir. Çünkü yapısal bütünlüğünü koruyan ve halen aktivite gösteren mitokondriler çeşitli sebeplerle ROT üreterek hücelere hasar verebilir (155). Bu nedenle çalışmamızda izole mitokondrilerin ATP seviyeleri/üretimleri de ölçülerek fonksiyonel olarak değerlendirmesi yapılmıştır (Tablo 4.1). İzole mitokondrilerin sağlamlığının değerlendirildiği çeşitli analizler bulunmaktadır. Mitokondri canlılığı mitotracker isimli boyalar kullanılarak membran bütünlüğünün gösterilmesi, oksijen tüketim oranının ölçülmesi, mitokondriyal kompleks aktivitelerinin ölçülmesi ya da ATP içeriğinin ölçülmesi ile gösterilebilmektedir (156). Biz de çalışmamızda bu yöntemlerden mitokondri membran bütünlüğünün Mitotracker Red ile boyanarak konfokal mikroskop ile görüntülenmesi ve mitokondri fonksiyonelliğinin ATP düzeyinin ölçülerek değerlendirilmesi yöntemlerini kullanarak mitokondri sağlamlık analizlerini gerçekleştirdik. Elde edilen ölçüm ve

sonuçlardan çalışmamızda kullanılan mitokondrilerin intakt ve fonksiyonel olduğu ve izolasyon sürecinin başarıyla yapıldığı anlaşılmıştır. Mitokondri naklinde bir diğer sorun ise izole mitokondrilerin hedef hücelere girişinin kanıtlanmasıdır. Bu amaçla daha önceden boyanmış olan mitokondriler sıçanlara verilmiştir. Ardından bu sıçanlardan alınan karaciğer dokuları konfokal mikroskop ile incelenmiştir. Yapılan bu incelemede mitokondrilerin başarıyla hedef hücre içerisine girdiği gösterilmiştir (Resim 4.3). Deney sürecinde yapılan diğer histolojik ve biyokimyasal analizlerle de nakil sürecinin faydalı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Özellikle histolojik analizlerde son derece başarılı sonuçlara ulaşılmıştır. Tüm bu veriler mitokondri nakli sürecinin başından sonuna kadar başarıyla uygulandığını göstermektedir. Alınan sonuçlar mitokondri naklinin karaciğer APAP toksisitesinde bir tedavi seçeneği olabileceği hipotezimizi desteklemektedir. Çalışmamızın bulgularına göre mitokondri transplantasyonu APAP toksisitesine karşı klinik çalışmalarda uygulamaya değer bir tedavi alternatifi olabilir. Yapılan çalışmalarla birlikte yakın zamanda mitokondri naklinin APAP toksisitesinin yanında mitokondriyal hasar ve enerji kriziyle seyreden birçok hastalıkta kullanılacak bir seçenek haline gelebileceği değerlendirilmektedir.

6. SONUÇLAR

Mitokondri nakli son yıllarda hakkında yapılan çalışmaların arttığı bir alandır. Biz de yaptığımız çalışmada mitokondri naklinin etkilerini gün geçtikçe daha sık karşılaşılan APAP kaynaklı toksik karaciğer hasarında inceledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre;

- (1) Toksik doz APAP uygulamasının hepatosellüler nekroz, balonlaşma dejenerasyonu ve hasarlı alanlara lökosit infiltrasyonuna neden olduğu ve serum AST, ALT ve LDH enzim düzeyleri ölçümleriyle gösterilen hepatosit hasarına yol açtığı görülmüştür. Literatürde APAP toksisitesinde oksidatif stresin arttığı bilgisi ise bizim çalışmamızda TOS ve GSH ölçümleri ile desteklenmiştir. Bu sonuçlar APAP toksisitesinde ciddi karaciğer hasarı geliştiğini ve çalışmamızda APAP toksisite modelinin başarıyla uygulandığını göstermektedir.
- (2) Herhangi bir toksik hasar oluşturmadan deney sürecini taklit ettiğimiz Kontrol 1 grubunda normal karaciğer morfolojik yapısının korunduğu, karaciğer fonksiyonlarında önemli bir değişiklik olmadığı ve oksidatif stres artışı olmadığı görülmüştür.
- (3) Toksik karaciğer hasarı oluşturulan ancak tedavi yerine mitokondri içermeyen respirasyon tamponu uygulanan Kontrol 2 grubundaki ratların karaciğerlerinde dejenerasyon ve inflamasyon meydana geldiği, serum AST değerinin yükselerek kısmi bir fonksiyon bozukluğu olduğu, ancak herhangi bir oksidatif stres artışı olmadığı görülmüştür.
- (4) Mitokondri nakli yapılan gruptaki sıçanlar ile herhangi bir uygulama yapılmayan sağlıklı sıçanlara ait doku örneklerinin morfolojik yapıları ve karaciğer enzim düzeyleri arasında neredeyse bir fark olmadığı görülmüştür. Toplam oksidan seviyesinin en düşük olduğu grup (Sham grubu dâhil) mitokondri nakli yapılan gruptur. Tüm bu sonuçlara göre

mitokondri naklinin karaciğer doku hasarını, fonksiyonlarını ve oksidan düzeylerini engellemede başarılı olduğu değerlendirilmiştir.

- (5) APAP toksisitesinde klinikte rutin olarak uygulanan NAC tedavisi grubunda ise tedavi ile hepatosit nekrozu başarıyla engellenirken, aynı olumlu sonuçların hücre dejenerasyonu ve inflamasyon parametrelerinde görülmediği ve karaciğer fonksiyonlarında da kısmi bir düzelme olduğu görülmüştür. Ayrıca GSH seviyesinin önemli ölçüde artırıldığı tespit edilmiştir.
- (6) APAP+NAC grubu inflamasyon seviyesinin ve GSH miktarının APAP+Mitokondri grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu, bunun yanında iki grup arasında diğer histolojik ve biyokimyasal parametreler açısından anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Bu nedenle mitokondri nakli uygulamasının APAP toksisitesi klinik tedavisinden daha başarılı olduğu değerlendirilmiştir.
- (7) Yaptığımız çalışmada mitokondri nakli sürecinin başarıyla uygulandığı değerlendirilmiştir. Mitokondriler canlı ve fonksiyonel olarak izole edildikten sonra deney hayvanlarına nakledilmiştir. Nakledilen bu mitokondriler hedef hücre içerisine girerek aktivite göstermiş ve tedavi edivi/koruyucu etkinlik oluşturmuştur.
- (8) Alınan sonuçlara göre mitokondri naklinin karaciğerde APAP toksisitesi tedavisi ile ilgili klinik çalışmalarda araştırılmaya değer bir alternatif olabileceği değerlendirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Bessems JG, Vermeulen NP. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol.* 2001;31:55–138.
2. Wilcox CM, Cryer B, Triadafilopoulos G. Patterns of use and public perception of over-the-counter pain relievers: focus on nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Rheumatol.* 2005;32:2218–2224.
3. Carolina I Ghanem, J Pérez María, José E Manautou, Aldo D Mottino. Acetaminophen; from liver to brain: new insights into drug pharmacological action and toxicity. *Pharmacol Res.* 2016 Jul; 109: 119–131.
4. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS. Et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology.* 2005;42:1364–1372.
5. Bond GR, Novak JE. The human and economic cost of paracetamol (acetaminophen) overdose. *Pharmacoeconomics.* 1995;8:177–181.
6. Gloria AS., Iker U., Maria UL. Engineered fibroblast growth factor 19 protects from acetaminophen-induced liver injury and stimulates aged liver regeneration in mice. *Cell Death and Disease* (2017) 8, e3083.
7. Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;(196):369-405.
8. Picard M, Wallace DC, Burelle Y. The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion.* 2016 Sep;30:105-16.
9. Cselenyák A, Pankotai E, Horváth EM, Kiss L, Lacza Z. Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol.* 2010 Apr 20;11:29.
10. Kitani T, Kami D, Matoba S, Gojo S. Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of macropinocytosis. *J Cell Mol Med.* 2014 Aug;18(8):1694-703.
11. Huang PJ, Kuo CC, Lee HC, Shen CI. Transferring Xenogenic Mitochondria Provides Neural Protection Against Ischemic Stress in Ischemic Rat Brains. *Cell Transplant.* 2016;25(5):913-27.
12. Anup Ramachandran, Hartmut Jaeschke Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. *J Clin Transl Res.* 2017 Feb 17; 3(1): 157–169.
13. Chhaya V Sharma, Vivek Mehta. Paracetamol: mechanisms and updates. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain.* 2014, 14 (4), 153-158.
14. Hinson JA. Biochemical toxicology of acetaminophen. *Rev Biochem Toxicol* 1980;2:103–129.
15. Hawkins N, and Golding J. A survey of the administration of drugs to young infants. The alspac survey team. Avon longitudinal study of pregnancy and childhood. *Br J Clin Pharmacol* 1995; 40: 79–82.
16. Carolina I Ghanem, J Pérez María, José E Manautou, Aldo D Mottino. Acetaminophen; from liver to brain: new insights into drug pharmacological action and toxicity. *Pharmacol Res.* 2016 Jul; 109: 119–131.
17. Hodgman MJ, Garrard AR. A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin.* 2012;499-516.
18. Davidson DG, and Eastham WN. Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *Br Med J* 1966; 2: 497–499.
19. Steinebrunner N, Mogler C, Vittas S, Hoyler B, Sandig C, Stremmel W, Eisenbach C. Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *BMC Gastroenterol* (2014).
20. Litovitz TL, Klein-Schwartz W, Rodgers GC, Jr, Cobaugh DJ, Youniss J, Omslaer JC, May ME, Woolf AD, Benson BE. 2001 Annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am J Emerg Med.* 2002;20:391–452.
21. Boyer TD, Rouff SL. Acetaminophen-induced hepatic necrosis and renal failure. *JAMA* 1971;218:440–441.
22. Dixon MF, Nimmo J, Prescott LF. Experimental paracetamol-induced hepatic necrosis: a histopathological study. *J Pathol* 1971;103:225–229.
23. Rajasekaran A, and Periyasamy M. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Trichosanthes lobata* on paracetamol-induced liver toxicity in rats. *Chinese Med* 2012; 7: 12.

24. Hartmut J., Yuchao X., Mitchell RM. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. *J Clin Transl Hepatol*. 2014 Sep; 2(3): 153–161.
25. Walker RM, Racz WJ, McElligott TF. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Lab Invest* 1980;42:181–189.
26. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 525–48.
27. Acharya, M. and Lau-Cam, C. (2010) Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *J Biomed Sci* 17(Suppl. 1): S35.
28. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:1327–1331.
29. Susanna STL., Jeroen TMB., Thierry P. Role of CYP2E1 in the Hepatotoxicity of Acetaminophen. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 12063-12067. 1996.
30. Chuan Chen, Gayle E. Hennig, Jose E. Manautou. Hepatobiliary excretion of acetaminophen glutathione conjugate and its derivatives in transport-deficient (tr⁻) hyperbilirubinemic rats. *Drug metabolism and disposition*. 31:798–804, 2003.
31. Coles B, Wilson I, Wardman P, Hinson JA, Nelson SD, Ketterer B. The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinonimine with glutathione: a stopped-flow kinetic study. *Arch Biochem Biophys* 1988;264:253–260.
32. Lauterburg BH, Mitchell JR: Toxic doses of acetaminophen suppress hepatic glutathione synthesis in rats. *Hepatology* 1982, 2:8-12.
33. James LP, Mayeux PR, Hinson JA: Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* 2003, 31:1499-1506.
34. Ojo OO, Kabutu FR, Bello M, and Babayo U. Inhibition of paracetamol-induced oxidative stress in rats by extracts of lemongrass (*Cymbropogon citratus*) and green tea (*Camellia sinensis*) in rats. *Afr J Biotechnol* 2006; 5: 1227–1232.
35. Bulera SJ, Cohen SD, Khairallah EA. Acetaminophen-arylated proteins are detected in hepatic subcellular fractions and numerous extra-hepatic tissues in CD-1 and C57B1/6J mice. *Toxicology* 1996;109:85–99.
36. Yamanaka K, Hasegawa A, Sawamura R, and Okada S. Cellular response to oxidative damage in lung induced by the administration of dimethylarsinic acid, a major metabolite of inorganic arsenics, in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 108: 205–213.
37. Reid AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson JA: Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 312:509-516.
38. O'Brien PJ, Slaughter MR, Swain A, Birmingham JM, Greenhill RW, Elcok F, Bugelski PJ: Repeated acetaminophen dosing in rats: adaptation of hepatic antioxidant system. *Hum Exp Toxicol* 2000, 19:277-283.
39. Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J* 1992;6:724–730.
40. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 2004;37:755–767.
41. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 1997;272:27812–27817.
42. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424–C1437.
43. Hinson JA, Pike SL, Pumford NR, Mayeux PR. Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem Res Toxicol* 1998;11:604–607.
44. Tirmenstein MA, Nelson SD. Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. *J Biol Chem* 1989;264:9814–9819.
45. Burcham PC, Harman AW. Acetaminophen toxicity results in site-specific mitochondrial damage in isolated mouse hepatocytes. *J Biol Chem* 1991;266:5049–5054.
46. Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E, Turturro N, Guerrieri F. Effect of acetaminophen administration on hepatic glutathione compartmentation and mitochondrial energy metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol* 1996;52:1147–1154.

47. Andersson BS, Rundgren M, Nelson SD, Harder S. N-acetyl-p-benzoquinone imine-induced changes in the energy metabolism in hepatocytes. *Chem Biol Interact* 1990;75:201–211.
48. Masubuchi Y, Suda C, Horie T. Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen induced liver injury in mice. *J Hepatol* 2005;42:110–116.
49. Corcoran GB, Wong BK, Neese BL. Early sustained rise in total liver calcium during acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1987;58:291–305.
50. Packer MA, Scarlett JL, Martin SW, Murphy MP. Induction of the mitochondrial permeability transition by peroxynitrite. *Biochem Soc Trans* 1997;25:909–914.
51. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005;434:658–662.
52. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001;495:12–15.
53. Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 2004;40:1170–1179.
54. Cover C, Mansouri A, Knight TR, Bajt ML, Lemasters JJ, Pessayre D, Jaeschke H. Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315:879–887.
55. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:190–195.
56. Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW. Regulation of the mitochondrial apoptosis induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:191–201.
57. Kinnally KW, Antonsson B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 2007;12:857–868.
58. Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 2000;345(Pt 2):271–278.
59. Jaeschke H, Duan L, Akakpo JY, Farhood A, Ramachandran A. The role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2018 Aug;118:709–718.
60. Ray SD, Mumaw VR, Raje RR, Fariss MW. Protection of acetaminophen-induced hepato-cellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:1470–1483.
61. 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;67:322–328.
62. Bajt ML, Cover C, Lemasters JJ, Jaeschke H (2006) Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury. *Toxicol Sci* 94: 217–225.
63. Gunawan BK, Liu ZX, Han D, Hanawa N, Gaarde WA, et al. (2006) c-Jun Nterminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 131: 165–178.
64. Latchoumycandane C, Goh CW, Ong MM, Boelsterli UA (2007) Mitochondrial protection by the JNK inhibitor leflunomide rescues mice from acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 45: 412–421.
65. Ghosh J, Das J, Manna P, Sil PC (2010) Arjunolic acid, a triterpenoid saponin, prevents acetaminophen (APAP)-induced liver and hepatocyte injury via the inhibition of APAP bioactivation and JNK-mediated mitochondrial protection. *Free Radic Biol Med* 48: 535–53.
66. Chao DT, Korsmeyer SJ (1998) BCL-2 family: Regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16: 395–419.
67. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60–66.
68. Diehl AM, Yin M, Fleckenstein J, Yang SQ, Lin HZ, Brenner DA, Westwick J, Bagby G, Nelson S. Tumor necrosis factor- α induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am J Physiol* 1994;267:G552–G561.
69. Chiu H, Gardner CR, Dambach DM, Brittingham JA, Durham SK, Laskin JD, Laskin DL. Role of p55 tumor necrosis factor receptor 1 in acetaminophen-induced antioxidant defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G959–G966.

70. Li W, Liang X, Leu JI, Kovalovich K, Ciliberto G, Taub R. Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* 2001;33:1377–1386.
71. Kalthoff H, Roeder C, Brockhaus M, Thiele HG, Schmiegel W. Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA. *J Biol Chem* 1993;268:2762–2766.
72. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003;299:890–893.
73. Donahower B, McCullough SS, Kurten R, Lamps LW, Simpson P, Hinson JA, James LP. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G102–G109.
74. Donahower BC, McCullough SS, Lamps L, Stowe CD, Hinson JA, James LP. Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Acetaminophen Toxicity in the Mouse. *Experimental Biology*. 2007 meeting abstracts [on CD-ROM], Abstract # 730.12.
75. Jaeschke H, Bajt ML: Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced cell death. *Toxicol Sci* 2006, 89:31-41.
76. Iyanda AA., Adeniyi FAA. Biochemical and histologic presentations of female wistar rats administered with different doses of paracetamol/methionine. *Niger. J. Physiol. Sci.* 26(December 2011) 151 – 160.
77. Peterson TC, Brown IR. Cysteamine in combination with N-acetylcysteine prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol.* 1992 Jan;70(1):20-8.
78. Syu-ichi K., Ayako T., Takako H. et al. Melatonin Protects on Toxicity by Acetaminophen But Not on Pharmacological Effects in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* (2006) 29(3) 472—476.
79. Amir MK., Ali AH., Rasoul S. et al. Hepatoprotective Property of Oral Silymarin is Comparable to N-Acetyl Cysteine in Acetaminophen Poisoning. *Gastroenterology Research.* 2012;5(5):190-194.
80. Brok J, Buckley N, and Gluud C. Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 2: CD003328.
81. Çay A, Alver A, Küçük M, Isik O, Selçuk Eminagaoglu M, Caner Karahan S, Değer O: The effects of N-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *J Surg Res* 2006, 131:199-203.
82. Prescott, L., Illingworth, R., Critchley, J., Stewart, M., Adam, R. and Proudfoot, A. (1979) Intravenous N-acetylcysteine: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *Br Med J* 2: 1097–1100.
83. Rumack BH, Peterson RC, Koch GG, Amara IA. Acetaminophen overdose. 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment. *Arch Intern Med* 1981;141:380–385.
84. Makin AJ, Wendon J, and Williams R. A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity (1987–1993). *Gastroenterol* 1995; 109: 1907–1916.
85. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 1973;187:211–217.
86. Corcoran GB, Wong BK: Role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by N-acetyl-L-cysteine in vivo: studies with N-acetyl-D-cysteine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1986, 238:54-61.
87. Stipanuk, M., Dominy, J., Jr, Lee, J. and Coloso, R. (2006) Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *J Nutr* 136(6 Suppl.): 1652S–1659S.
88. Frimpter, G. (1966) Cystinuria: intravenous administration of 35S cystine and 35S cysteine. *Clin Sci* 31: 207–214.
89. Prescott, L. (1978) The chief scientist reports. Prevention of hepatic necrosis following paracetamol overdose. *Health Bull* 36: 204–212.
90. Prescott, L. and Matthew, H. (1974) Cysteamine for paracetamol overdosage. *Lancet* 1: 998.
91. Marcus V. Terneusa, J. Michael Brown, A. Betts Carpenter. Comparison of S-adenosyl-methionine (SAME) and N-acetylcysteine (NAC) protective effects on hepatic damage when administered after acetaminophen overdose. *Toxicology* 244(1), 25-34. 2008.
92. Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H: Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* 2010, 51:246-254.

93. Keays, R., Harrison, P., Wendon, J., Forbes, A., Gove, C., Alexander, G. et al. (1991) Intravenous acetylcysteine in paracetamol induced fulminant hepatic failure: a prospective controlled trial. *BMJ* 303: 1026–1029.
94. Prescott, L., Park, J., Ballantyne, A., Adriaenssens, P. and Proudfoot, A. (1977) Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet* 2: 432–434.
95. Prescott, L., Donovan, J., Jarvie, D. And Proudfoot, A. (1989) The disposition and kinetics of intravenous N-acetylcysteine in patients with paracetamol overdosage. *Eur J Clin Pharmacol* 37: 501–506.
96. W. Stephen Waring. Novel acetylcysteine regimens for treatment of paracetamol overdose. *Ther Adv Drug Saf* (2012) 3(6) 305–315.
97. Waring W., Stephen A., Robinson O., Dow M., Pettie J. (2008) Lower incidence of anaphylactoid reactions to N-acetylcysteine in patients with high acetaminophen concentrations after overdose. *Clin Toxicol* 46: 496–500.
98. Pakravan, N., Waring, W., Sharma, S., Ludlam, C., Megson, I. and Bateman, D. (2008) Risk factors and mechanisms of anaphylactoid reactions to acetylcysteine in acetaminophen overdose. *Clin Toxicol* 46: 697–702.
99. Waring, W., Stephen, A., Malkowska, A. And Robinson, O. (2008) Acute ethanol coingestion confers a lower risk of hepatotoxicity after deliberate acetaminophen overdose. *Acad Emerg Med* 15: 54–58.
100. Bebarta, V., Kao, L., Froberg, B., Clark, R., Lavonas, E., Qi, M. et al. (2010) A multicenter comparison of the safety of oral versus intravenous acetylcysteine for treatment of acetaminophen overdose. *Clin Toxicol* 48: 424–430.
101. Schmidt, L. and Dalhoff, K. (2001) Risk factors in the development of adverse reactions to N-acetylcysteine in patients with paracetamol poisoning. *Br J Clin Pharmacol* 51: 87–91.
102. Heard, K. (2008) Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. *N Engl J Med* 359: 285–292.
103. Ann M. Moyer, Brooke L. Fridley, Gregory D. Jenkins. Acetaminophen-NAPQI Hepatotoxicity: A Cell Line Model System Genome-Wide Association Study. *Toxicological Sciences* 120(1), 33–41 (2011).
104. Schmidt, L., Knudsen, T., Dalhoff, K. And Bendtsen, F. (2002) Effect of acetylcysteine on prothrombin index in paracetamol poisoning without hepatocellular injury. *Lancet* 360: 1151–1152.
105. Stephen W. G. Tait, Douglas R. Green. Mitochondria and cell signalling. *Journal of Cell Science* 2012 125: 807-815.
106. E. E. Kesner, A. Saada-Reich, and H. Lorberboum-Galski, “Characteristics of mitochondrial transformation into human cells,” *Scientific Reports*, vol. 6, article 26057, 2016.
107. A. Caicedo, P.M. Aponte, F. Cabrera et al. Artificial Mitochondria Transfer: Current Challenges, Advances, and Future Applications. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 7610414.
108. M. A. Clark and J. W. Shay, “Mitochondrial transformation of mammalian cells,” *Nature*, vol. 295, no. 5850, pp. 605–607, 1982.
109. J. D. McCully, D. B. Cowan, C. A. Pacak, I. K. Toumpoulis, H. Dayalan, and S. Levitsky, “Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection,” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 296, no. 1, pp. H94–H105, 2009.
110. H.C. Lin, S.Y. Liu, H.S. Lai, I.R. Lai, “Isolated mitochondria infusion mitigates ischemia-reperfusion injury of the liver in rats,” *Shock*, vol. 39, no. 3, pp. 304–310, 2013.
111. A. Caicedo, V. Fritz, J. M. Brondello et al., “MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function,” *Scientific Reports*, vol. 5, p. 9073, 2015.
112. Y. M. Cho, H. W. Jeong, J. H. Sohn, D. B. Seo, W. G. Kim, and S. J. Lee, “Mesenchymal stem cells transfer mitochondria to the cells with virtually no mitochondrial function but not with pathogenic mtDNA mutations,” *PloS One*, vol. 7, no. 3, article e32778, 2012.
113. K. Hayakawa, E. Esposito, X. Wang et al., “Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke,” *Nature*, vol. 535, no. 7613, pp. 551–555, 2016.
114. C. H. Davis, K. Y. Kim, E. A. Bushong et al., “Transcellular degradation of axonal mitochondria,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 26, pp. 9633–9638, 2014.
115. A. Rustom, R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, and H.-H. Gerdes, “Nanotubular highways for intercellular organelle transport,” *Science*, vol. 303, no. 5660, pp. 1007–1010, 2004.

116. T. Ahmad, S. Mukherjee, B. Pattnaik et al., "Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy," *The EMBO Journal*, vol. 33, no. 9, pp. 994–1010, 2014.
117. X. Sun, Y. Wang, J. Zhang et al., "Tunneling-nanotube direction determination in neurons and astrocytes," *Cell Death & Disease*, vol. 3, article e438, 2012.
118. J. L. Spees, S. D. Olson, M. J. Whitney, and D. J. Prockop, "Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 5, pp. 1283–1288, 2006.
119. M. Koyanagi, R. P. Brandes, J. Haendeler, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler, "Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes?" *Circulation Research*, vol. 96, no. 10, pp. 1039–1041, 2005.
120. P. D. Robbins and A. E. Morelli, "Regulation of immune responses by extracellular vesicles," *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, no. 3, pp. 195–208, 2014.
121. J. M. Pitt, G. Kroemer, and L. Zitvogel, "Extracellular vesicles: masters of intercellular communication and potential clinical interventions," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 126, no. 4, pp. 1139–1143, 2016.
122. G. Raposo and W. Stoorvogel, "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends," *The Journal of Cell Biology*, vol. 200, no. 4, pp. 373–383, 2013.
123. Vladislav V., Bojana S., Marina G. et al. Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int J Med Sci*. 2018; 15(1): 36–45.
124. C. Lee, S. A. Mitsialis, M. Aslam et al., "Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension," *Circulation*, vol. 126, no. 22, pp. 2601–2611, 2012.
125. A. Caicedo, P.M. Aponte, F. Cabrera et al. Artificial Mitochondria Transfer: Current Challenges, Advances, and Future Applications. *Stem Cells Int*. 2017; 2017: 7610414.
126. L. H. Boudreau, A. C. Duchez, N. Cloutier et al., "Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation," *Blood*, vol. 124, no. 14, pp. 2173–2183, 2014.
127. A. Nakajima, H. Kurihara, H. Yagita, K. Okumura, and H. Nakano, "Mitochondrial extrusion through the cytoplasmic vacuoles during cell death," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 35, pp. 24128–24135, 2008.
128. K. G. Lyamzaev, O. K. Nepryakhina, V. B. Saprunova et al., "Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, vol. 1777, no. 7-8, pp. 817–825, 2008.
129. M. P. King and G. Attardi, "Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA," *Cell*, vol. 52, no. 6, pp. 811–819, 1988.
130. T.-H. Wu, E. Sagullo, D. Case et al., "Mitochondrial transfer by photothermal nanoblade restores metabolite profile in mammalian cells," *Cell Metabolism*, vol. 23, no. 5, pp. 921–929, 2016.
131. P. Azimzadeh, H. Asadzadeh Aghdaei, P. Tarban, M. M. Akhondi, A. Shirazi, and H. R. Khorram Khorshid, "Comparison of three methods for mitochondria isolation from the human liver cell line (HepG2)," *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, vol. 9, no. 2, pp. 105–113, 2016.
132. Patricia V Turner, Thea Brabb, Cynthia Pekow, Mary Ann Vasbinder. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011 Sep; 50(5): 600–613.
133. Onuoha NO, Ogbusua NO, Okorie AN, Ejike CECC. Tigernut (*Cyperus esculentus* L.) "milk" as a potent "nutri-drink" for the prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity in a murine model. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2017 Jun 9;6(3):290-295.
134. JC Mossanen, F Tacke. Acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Laboratory Animals* 2015, Vol. 49(S1) 30–36.
135. M. Picard, T. Taivassalo, D. Ritchie et al., "Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods," *PLoS One*, vol. 6, no. 3, article e18317, 2011.
136. S. Meeusen, R. DeVay, J. Block et al., "Mitochondrial inner membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1," *Cell*, vol. 127, no. 2, pp. 383–395, 2006.

137. Jaeschke H. Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice in vivo: The protective effect of allopurinol. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 935–941.
138. Tatsuya M., Tadashi N., Aki T. et al. Mechanisms of protection by melatonin against acetaminophen-induced liver injury in mice. *J. Pineal Res.* 2006; 41:211–219.
139. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med* 2000;342:1266–71.
140. Osman E. Evaluation Of Elevated Liver Enzymes. *Ankara Medical Journal* 2012; 12(3):129-135.
141. Pratt DS, Kaplan MM. Laboratory tests. In: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC, eds. *Schiff's diseases of the liver.* 8th Ed. Vol 1. Philadelphia: Lippencott-Raven, 1999: 205–44.
142. Kundrotas LW, Clement DJ. Serum alanine aminotransferase (ALT) elevation in asymptomatic US Air Force basic trainee blood donors. *Dig Dis Sci* 1993;38:2145-50.
143. Makin AJ, Williams R. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: predisposing factors and treatments. *Adv Intern Med* 1997;42:453– 483.
144. R. Tittarelli, M. Pellegrini, M.G. Scarpellini. Hepatotoxicity of paracetamol and related fatalities. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2017; 21 (1 Suppl): 95-101.
145. Wendel A., Feuerstein S., Konz K.H. Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 1979;28:2051–2055.
146. Knight T.R., Fariss M.W., Farhood A., Jaeschke H. Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice. *Toxicol. Sci.* 2003;76:229–236.
147. Kuo Du, Anup Ramachandran, Hartmut Jaeschke. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biology* 10 (2016) 148–156.
148. Jollow, D., Mitchell, J., Potter, W., Davis, D., Gillette, J. and Brodie, B. (1973) Acetaminophen induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 195–202.
149. Jaeschke H., McGill M.R., Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* 2012;44:88–106.
150. Qiu Y., Benet L.Z., Burlingame A.L. Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen in vivo in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 1998;273:17940–17953.
151. Tirmenstein M.A., Nelson S.D. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols. Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 1990;265:3059–3065.
152. Lott JA, Wolf PL. Alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST). *Clinical enzymology: a case-oriented approach.* Chicago, Year Book Medical Publishers, 1986,111-138.
153. Kundrotas LW, Clement DJ. Serum alanine aminotransferase (ALT) elevation in asymptomatic US Air Force basic trainee blood donors. *Dig Dis Sci* 1993;38:2145-50.
154. Buket Dalğıç. Çocuklarda Karaciğer Hastalıklarının Değerlendirilmesi. *STED* 2002;11(5): 173-176.
155. M. K. C. Hesselink, V. Schrauwen-Hinderling, and P. Schrauwen, “Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus,” *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 12, no. 11, pp. 633–645, 2016.
156. Preble JM, Kondo H, Levitsky S, McCully JD (2014) Quality Control Parameters for Mitochondria Transplant in Cardiac Tissue. *JSM Biochem Mol Biol* 2(1): 1008.