

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEĞİŞİK DOZLARDAKİ ASETAMİNOFENİN KARACİĞER NİTRİK
OKSİT SENTAZ (iNOS) ENZİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER
KULLANILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Ahmet KOÇAK

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN**

**Tez No: 23
2008 – ISPARTA**

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEĞİŞİK DOZLARDAKİ ASETAMİNOFENİN KARACİĞER
NİTRİK OKSİT SENTAZ (İNOS) ENZİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER
KULLANILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Ahmet KOÇAK

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN**

**Bu tez, Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
1358-D-06 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez No: 23
2008 – ISPARTA**

KABUL VE ONAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19 / 11 / 2008

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. M. Ali MALAS
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Meral ÖNCÜ
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. A. Diljin KEÇECİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinden basılmasına kadar geçen sürede yardımlarını esirgemeyen ve doktora eğitimim boyunca bana her konuda yardımcı olan hocalarım Sayın DOÇ. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN ve Sayın Doç. Dr. Meral ÖNCÜ'ye,

Tez çalışmamın deneysel bölümünün gerçekleşmesinde yardımcı olan arkadaşlarımla Arş. Gör. Dilek BAYRAM, Arş. Gör. Dilek ULUSOY KARATOPUK, Arş. Gör. İbrahim Aydın CANDAN, Arş. Gör. Hakan DARICI, Arş. Gör. Dr. Özgür FEDAKAR, Arş. Gör. Dr. Abdullah ÇİM, Öğr. Gör. İbrahim ONARAN, İbrahim ULUSOY ve Vasfi BARAN'a

Araştırmamın biyokimyasal parametrelerinin çalışılması için Biyokimya Laboratuvarı imkanlarından faydalanmamızı sağlayan hocalarım Sayın Prof. Dr. Namık DELİBAŞ, Sayın Prof. Dr. Hüseyin VURAL ve Dr. Nigar YILMAZ'a,

Hayatım boyunca bana her zaman destek olan anneme, babama, anneanneme, kardeşime ve çalışmamın ilk aşamasından itibaren her zaman desteğini hissettiğim sevgili eşim Havva KOÇAK'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
TABLOLAR, ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE RESİMLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Asetaminofen	3
2.1.1. Farmakokinetik Özellikler	4
2.1.2. Endikasyonları (Kullanım Alanları)	4
2.1.3. İltihap Önleyici Etki	5
2.1.4. Ateş Düşürücü Etki	5
2.1.5. Ağrı Kesici Etki	6
2.1.6. Asetaminofenin Yan Etkileri	6
2.1.7. Doz ve Kullanım Bilgileri	7
2.1.8. Asetaminofen ve Lipit Peroksidasyonu	7
2.2. Nitrik Oksit (NO)	7
2.2.1. Nitrik Oksidin Biyosentezi ve NOS'un İzofomları	8
2.2.2. NO ve Lipit Peroksidasyonu	11
2.3. Antioksidan Enzimler	12
2.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	12
2.3.2. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)	13
2.4. Karaciğer	13
2.4.1. Karaciğer Stroması	14
2.4.2. Karaciğer Lobülü	14

3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Gereç	17
3.1.1. Deney Hayvanları.....	17
3.1.2. Kullanılan İlaçlar	17
3.1.3. Biyokimyasal Çalışma İçin Kullanılan Malzemeler	17
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Deney Planı.....	19
3.2.2. Histolojik Çalışmalar	20
3.2.3. İmmünohistokimyasal Çalışmalar	21
3.2.4. Değerlendirme	25
3.3.1. Biyokimyasal Çalışmalar.....	25
3.3.1.1. Dokuların Biyokimyasal Ölçümlere Hazırlanması.....	25
3.3.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Etkinliğinin Ölçülmesi.....	26
3.3.1.3. Lipit Peroksidasyon (MDA) Ölçümü.....	28
3.3.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Etkinliğinin Ölçülmesi.....	29
3.3.1.5. Serum Nitrik Oksit Seviyesinin Ölçülmesi.....	30
3.3.2. İstatistik Analiz.....	32
4. BULGULAR	33
4.1. Histolojik Bulgular.....	33
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	40
4.3. Biyokimyasal Bulgular.....	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	49
ÖZET	55
SUMMARY	56
KAYNAKLAR	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BH ₄	Tetrahidrobiopterin
BSA	Sığır serum albumini
cGMP	Halkasal guanozin monofosfat
CuCl ₂	Bakır klorür
Cu-Zn SOD	Bakır-çinko süperoksit dismutaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAPQI	N-asetil-p-benzokinin imin
NO	Nitrik oksit
iNOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
TNF- α	Tümör nekroz faktörü alfa
MDA	Malondialdehit
L-NAME	NG-nitro-L-arjinin metil ester
SOD	Süperoksit dismutaz
PO ₂	Oksijen basıncı
NOS	Nitrik oksit sentaz
NSAİİ	Steroid olmayan antienflamatuvar ilaç
PG	Prostaglandin
PGE ₁	Prostaglandin-E ₁
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif substans
TCA	Trikloroasetik asit
V-PYRRO/NO	1-[Eteniloksi-NNO-azoksi]-pirolidin
XO	Ksantin oksidaz

TABLolar, ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE RESİMLER DİZİNİ

TABLolar	Sayfa No
Tablo 1: Deney planı.....	20
Tablo 2: Gruplar arasında gözlenen yapısal değişikliklerin yarı nitel değerlendirilmesine ait puanlama.....	34
Tablo 3: Gruplar arasında gözlenen yapısal değişikliklerin Ki-kare (χ^2) testine göre p değerleri.....	34
Tablo 4: Gruplara göre ortalama iNOS reseptör boyanma dereceleri.....	40
Tablo 5: Karaciğer dokusundan ölçülen MDA seviyeleri ve serum SOD, GSH-Px ve NO seviyeleri.....	46

ŞEKİLLER

Şekil 1. Nitrik oksidin L-arjinin amino asidinden sentezlenmesi.....	9
-----------------------------------------------------------------------------	---

GRAFİKLER

Grafik 1. Ortalama serum glutatyon peroksidaz seviyeleri.....	47
Grafik 2. Ortalama serum süperoksit dismutaz seviyeleri.....	47
Grafik 3. Ortalama karaciğer dokusu malondialdehit seviyeleri.....	48
Grafik 4. Ortalama serum nitrik oksit seviyeleri.....	48

RESİMLER

Resim 1: Kontrol grubuna (Grup-I) ait normal karaciğer dokusu.....	37
Resim 2: Grup-II'ye ait (5 mg / kg asetaminofen uygulanan) karaciğer dokusu.....	37

TABLolar, ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE RESİMLER DİZİNİ (Devamı)

	Sayfa No
Resim 3: Grup–III'e ait (10 mg/kg asetaminofen uygulanan) karaciğer dokusu.....	36
Resim 4: Grup–IV'e ait (20 mg/kg asetaminofen uygulanan) karaciğer dokusu.....	36
Resim 5: Grup–V'e ait (100 mg/kg asetaminofen uygulanan) karaciğer dokusu.....	37
Resim 6: Grup–VI'ya ait (200 mg/kg asetaminofen verilen) karaciğer dokusu.....	38
Resim 7: Grup–VII'ye ait (500 mg/kg asetaminofen verilen) karaciğer doku kesiti.....	39
Resim 8: Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu.....	41
Resim 9: Grup–II'de yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu.....	41
Resim 10: Grup–III'te yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu.....	42
Resim 11: Grup–IV'te yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu.....	42
Resim 12: Grup–V'te yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu.....	43
Resim 13: Grup–VI'da yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu.....	43
Resim 14: Grup–VII'de yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu.....	44

1. GİRİŞ

Karaciğer, sahip olduğu işlevler ve sindirim sistemindeki yerleşimi dolayısıyla, iç veya dış kaynaklı pek çok maddenin metabolizmasından sorumludur. Bu durum, karaciğeri ilaç kaynaklı toksisite yönünden hedef organ haline getirmektedir. Akut şekilde gelişen karaciğer yetmezliği vakalarının % 50'sinden fazlasında, ilaçlar sorumlu tutulmuştur. Duyarlılığa bağlı olarak meydana gelen ilaç reaksiyonlarının yaklaşık % 75'inin karaciğer nakli ve ölümlerle sonuçlandığı bildirilmiştir (1).

Asetaminofen (parasetamol), etkinliği ve göreceli güvenilirliği dolayısıyla bütün dünya çapında en yaygın şekilde kullanılan antipiretik (ateş düşürücü) ve analjezik (ağrı kesici) ilaçlardan biridir. Fakat, bu ilacın karaciğerde hasarlanma yaparak yetmezliğe yol açtığına dair çok sayıda çalışma vardır (2-4). Ağır karaciğer hasarlanmasıyla asetaminofen arasındaki ilk bağlantı, 1966 yılında bildirilmiştir (5). Bu ilacın karaciğerde hasarlanmaya yol açtığı tespit edilen dozlarının, tedavi amacıyla kullanılan sınırlar içinde olduğu bilgisi önemlidir (6).

Asetaminofen, bazı kimyasal reaksiyonların aracılık ettiği ve karaciğer epitel hücreleri arasında meydana gelen etkileşimler sonucunda, karaciğer dokusunda nekroza yol açmaktadır. Bu ajana, "doğrudan hepatotoksin" de denmiştir (7). Bağışıklık mekanizmaları, bu süreçte yer almaz.

Toksik etkiye yol açan mekanizmalar arasında protein arilasyonu, oksidatif stres, kalsiyum dengesizliği, transkripsiyon yollarında meydana gelen değişiklikler, iltihabi (yangısal) değişikliklere öncülük eden sinyaller ve hücre ölüm yollarının harekete geçirilmesi sayılmaktadır (8-20). Asetaminofen, karaciğer üzerindeki toksik etkilerini N-asetil-p-benzokininimin (NAPQI) denilen ve sitokrom P-450 sistemi üzerinden açığa çıkan bir metaboliti aracılığıyla gösterir. Bu metabolit, genellikle iç kaynaklı bir antioksidan olan glutatyonla etkileşime geçerek zararsız hale gelmektedir. Diğer taraftan, asetaminofenin yüksek dozda alınması sonrasında metabolitlerin miktarında artış olur. Bu durumda, glutatyon açığa çıkan fazla miktardaki NAPQI molekülünü bağlayamaz. Serbest haldeki NAPQI, karaciğerdeki diğer büyük çaplı moleküllere kovalent şekilde bağlanarak, karaciğer dokusunda

hasarlanmaya yol açar (21,22). Karaciğerdeki glutatyon depolarının besin eksikliği veya alkol bağımlılığı gibi sebepler dolayısıyla tükenmesi, zehirlenmeyi kolaylaştırır. Kötü beslenme alışkanlığı olan kişilerde ve alkoliklerde, toksik dozdan daha düşük dozların alınması bile toksik etkilerin ortaya çıkmasına yol açabilir (21,23). Karaciğerde meydana gelen hasarlanma, glutatyon seviyelerini yükselten N-asetilsisteinin dışarıdan verilmesi yoluyla önlenmektedir (24). Asetaminofen aracılıklı karaciğer hasarlanması, sadece NAPQI'nın doğrudan açığa çıkan etkilerine bağlanamaz. Yakın geçmişte yapılan çalışmalarda, bazı sitokinlerin ve nitrik oksidin (NO) de bu süreçte rol oynayabileceğine ilişkin bulgular elde edilmiştir (24).

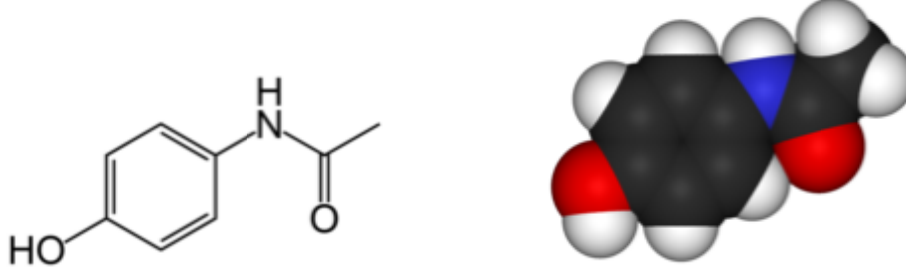
NO, karaciğerdeki parankim hücrelerinde ve parankimal olmayan diğer hücrelerde L-arginin amino asidinden uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimi aracılığıyla üretilen ve yüksek reaktif oksidan kapasiteye sahip bir bileşendir (25-32). NO'nun karaciğerde fazla miktarda üretilmesinin, endotoksin şokunda ve karaciğerdeki iltihabi (yangısal) reaksiyona ve hasarlanmaya ilişkin diğer modellerde rol oynayan önemli bir unsur olduğu düşünülmüştür (26,33-37).

NO'nun karaciğerdeki etkilerinin altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemesine rağmen, bu bileşenin sitokrom P-450'yi azalttığı (38-41), karaciğerdeki proteinlerin DNA sentezini baskıladığı (26,42-44) ve apoptozun yanı sıra nekrozu da uyardığı (26,45) bildirilmiştir. Diğer yandan, NO'nun antioksidan etkilerinin olduğuna dair yayınlar da mevcuttur (46,47). Dolayısıyla, NO'nun karaciğer üzerindeki etkileri tek yönlü değildir ve organizmanın içinde bulunduğu duruma göre değişebilmektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, periton içine enjeksiyon yoluyla uygulanan değişik dozlardaki asetaminofenin sıçanların karaciğer dokusunda yapısal değişikliklere yol açıp açmadığını ve doza bağlı olarak görülen değişikliklerin iNOS reseptör dağılımıyla olan bağlantısının yanı sıra, bu etkinin serum NO seviyeleriyle ve diğer biyokimyasal parametrelerle olan ilişkisini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Asetaminofen



Asetaminofen

Asetaminofen (Parasetamol), aynı zamanda ağrı giderici bir ilaç olan fenasetinin etkin metabolitlerinden biri olan para-aminofenol türevidir ve kaynaklarda “4-asetamidofenol”, “4–hidroksiasetanilid” veya “N-asetil-p-aminofenol” isimleriyle de yer almaktadır. Yapısal olarak beyaz, kokusuz ve acı tada sahip kristal toz şeklindedir. Doymuş çözeltisinin pH derecesi 6 olup, oldukça kararlıdır. Fakat bu kararlılık, asit veya alkali ortamlarda azalmakta ve parasetamol, bu tür ortamlarda yavaş bir şekilde asetik aside ve para aminofenole dönüşmektedir (48).

Ateş düşürücü etkisini merkezi sinir sisteminde yer alan hipotalamustaki ısı merkezi üzerinden gösterirken, ağrı kesici etkisi ağrı eşiğini yükseltme özelliğine bağlıdır (49). Asetaminofen ilk defa 1839’da keşfedilmiş olmasına rağmen, daha eski antipiretik (ateş düşürücü) ilaçlardan asetanilidin ve fenasetinin etkin bir metaboliti olduğunun anlaşıldığı 1949 yılına kadar kısıtlı şekilde kullanılmıştır (50-52). Asetaminofenin uzun dönem 10 g/gün miktarını aşan dozlarda akut karaciğer hasarlanması ortaya çıkmaktadır ve yetişkinler için önerilen dozun üst sınırı, en fazla 4 g/gün’dür (53).

Yaygın şekilde kullanılmasına rağmen, asetaminofenin etki mekanizması tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Doku şişliklerini azalttığı bildirilmesine rağmen, az oranda antienflamatuvar (iltihap giderici) özelliğe sahip gibi görünmektedir ve in-

vitro ortamda, prostaglandinleri (PG) zayıf şekilde önlemektedir (54,55). Asetaminofen, ateş düşürücü ve ağrı kesici etki yönleriyle steroid olmayan antienflamatuvar ilaç (NSAİİ) şeklinde de düşünülmektedir fakat, NSAİ ilaçların anti-platelet (trombosit birikimini engelleyici) etkinlik ve mide üzerine olan olumsuz etkiler gibi bazı tipik özelliklerini taşımaz (56).

2.1.1. Farmakokinetik Özellikler

Asetaminofen, vücuda alınmasından 30-60 dk sonra kandaki en yüksek yoğunluğuna ulaşır. Asetaminofenin dolaşımdaki plazma proteinlerine hafif şekilde bağlanan % 95'lik kısmı, karaciğerdeki mikrozomal enzimler tarafından sülfat ve glukronit bileşenlerine çevrilir. İlacın geriye kalan % 5'i ise değişmeden atılır. Asetaminofenin plazmadaki yarı ömrü 2-3 saat olup, böbrek işlevlerinden göreceli olarak etkilenmez. Toksik dozlarda alındığında veya karaciğer rahatsızlıklarında, bu süre iki katına kadar çıkabilir (57). Tedavi amacıyla kullanılan doz aralığındaki biyo yararlanım oranı, % 75-80 arasındadır (58).

2.1.2. Endikasyonları (Kullanım Alanları)

Asetaminofen etkin bir ağrı kesici ve ateş düşürücü ajan olarak aspirine eşdeğer olmasına rağmen, antienflamatuvar özelliklerinin olmaması dolayısıyla aspirinden farklılık gösterir. Ürik asit seviyelerini etkilemez ve kanın pıhtılaşmasını engelleyici özelliğe sahip değildir. Baş ve kas ağrısı, doğum sonrası ortaya çıkan ağrı gibi ılımlı veya orta derecedeki ağrılarda veya aspirinin etkin olduğu diğer durumlarda kullanışlıdır. Antienflamatuvar tedavide yardımcı bir analjezik olarak kullanılmasına rağmen, romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar durumlarda tek başına pek etkili değildir (57). Aspirine karşı duyarlılığı olanlarda, salisilatların kullanılabilirliğinin az olduğu durumlarda, hemofili, peptik ülser veya aspirine bağlı gelişen bronkospazm vakalarında ve viral enfeksiyonu olan çocuklarda asetaminofen tercih edilmektedir. Asetaminofen, aspirinden farklı olarak urikozürik ajanların etkisini azaltmaz ve gut hastalığının tedavisinde, probenesitle birlikte verilebilir (57).

2.1.3. İltihap Önleyici Etki

Asetaminofenin sadece zayıf bir iltihap önleyici etkiye sahip olduğu genel kabul görmüş olmasına rağmen, diş cerrahisi sonrasında doku şişliğini azalttığına yönünde bazı raporlar mevcuttur (54,55). Yapılan bir çalışmada, asetaminofenin cerrahi sonrası yumuşak doku ödemi plasebo grubuna göre % 30 oranında azalttığı bildirilmiştir (59).

250 mg/kg dozunda uygulanan asetaminofenin, ödem ve şişlikleri orta derecede giderebildiği fakat, bu etkinin 250 mg/kg dozunda uygulanan aspirin kadar olmadığı rapor edilmiştir (60). Buradan hareketle, hayvan modellerinde yüksek dozlardaki asetaminofenin, zayıf şekilde iltihap önleyici etkiye yol açtığını söylemek mümkündür.

2.1.4. Ateş Düşürücü Etki

Asetaminofenin ateş düşürücü etkinliği, pek çok türde gösterilmiştir. Milton ve Wendlant'ın yapmış oldukları çalışma, bu konudaki en eski kaynaklardan biridir. Bu çalışmada, asetaminofenin kedilerin beyin ventriküllerine enjekte edilen endotoksin kaynaklı ateşi düşürebilirken, aynı yere enjekte edilen PGE₁ kaynaklı ateşi etkilemediği bildirilmiştir (61,62). Bu durum, steroid olmayan antiinflamatuar ilaçların antipiretik etkinliğinin pirojenik (ateşlenmeye yol açan) PG'lerin üretiminin engellenmesine bağlı olduğunu fark eden Vane tarafından açıklanmıştır (63). Daha sonra yapılan bir çalışmada, asetaminofenin kedilerdeki bakteri kaynaklı pirojenlerce uyarılan ateşi, beyin–omurilik sıvısındaki PG benzeri maddelerin seviyesindeki azalmaya paralel olarak düşürdüğü gösterilmiştir (64). Asetaminofenin, enjekte edilen interlökin-1 gibi iç kaynaklı bir pirojene cevap olarak beyin-omurilik sıvısındaki PG seviyelerini ve ateşi etkin bir şekilde düşürmesi ilginçtir (65). Ek olarak, kedilerde beyin ventrikülüne enjekte edilen sodyum araşidonatın yol açtığı pirojen etki, damar içi yoldan enjekte edilen asetaminofenle geri döndürülmüştür (66).

Asetaminofen, yüksek ateşi olan çocukların tedavisinde sıklıkla tercih edilen bir ilaç olmuş ve ketorolak gibi yeni ateş düşürücü ajanların denenmesinde bir ölçüt ajan olarak kullanılmıştır (67–71).

2.1.5. Ağrı Kesici Etki

Lim ve arkadaşları tarafından çapraz perfüzyonlu köpek dalağı üzerinde yapılan denemelerde, asetaminofenin ağrı kesici etkisinin merkezi olmaktan daha çok çevresel bir yeri olduğu gösterilmiştir (72). Bu denemede, asetaminofenin dalağa enjekte edilen bradikinine olan cevabı engellediği görülmüştür. Dolayısıyla, bu ilacın morfinin aksine etkinliğin çevresel olarak gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

2.1.6. Asetaminofenin Yan Etkileri

Tedavi amacıyla kullanılan doz aralığında, bazen karaciğer enzimlerinde ılımlı bir yükselmeye yol açabilir. İlaça bağlı olan bu durum, geri dönüşlüdür. Daha yüksek dozlarda alınması durumunda baş dönmesine, huzursuzluğa ve yönelim bozukluğuna yol açabilir. Asetaminofen, 15 g dozunda alınması halinde karaciğerde ciddi hasarlanma ve nekrozla birlikte böbreklerde tübüler nekroza yol açabilir ve ölümcül olabilir (57). Bulantı, kusma, ishal ve karın ağrısı, karaciğerdeki hasarlanmanın erken belirtileri arasındadır. Karaciğerde herhangi bir hasarlanmanın olmadığı, fakat böbreklerin etkilendiği bazı nadir vakalar da bildirilmiştir. Bazen bu etki, normal dozlarda kullanımın ardından da ortaya çıkmıştır. Buradaki tedavi, aşırı dozda aspirin sonrası uygulananla karşılaştırıldığı zaman daha az yüz güldürücüdür (57). Asetaminofen zehirlenmesinde, destek tedavisine ek olarak son derece faydalı oldukları gösterilen yöntemler arasında, sülfidril gruplarının toksik metabolitlerin etkisizleştirilmesi için kullanılması yer almaktadır. Asetilsistein, bu amaçla kullanılmaktadır. Fenasetinin kullanılması sonrasında ortaya çıktığı bildirilen hemolitik anemi ve methemoglobinemi, asetaminofen için nadiren rapor edilmiştir. Ayrıca, bu ilaç sindirim sisteminde herhangi bir kanamaya da yol açmamaktadır. Karaciğer rahatsızlığı olan hastalarda, dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır (57).

2.1.7. Doz ve Kullanım Bilgileri

Asetaminofenin, günlük kullanımda tablet, sıvı süspansiyon, fitil veya flakon şekilleri bulunmaktadır. Yetişkinlere verilen ortalama doz 500 mg/gün–1 g/gün arasında değişmekte olup, tavsiye edilen üst sınır 4 g/gün'dür (73). Toksik doz, oldukça değişkenlik göstermektedir. Yetişkinlerde, bir defada alınan 10 g üzeri dozların veya 150 mg/kg dozunun toksik etkiye yol açma ihtimali yüksektir (74). Daha düşük dozların 24 saat içinde alınması ve toplamda bu sınırları geçmesi veya 4 g/gün seviyesindeki kullanımın kronik şekilde devam etmesi de, yine toksisiteye yol açabilmektedir. Çocuklarda, 200 mg/kg'nın üzerindeki dozlar toksik etki potansiyeli taşımaktadır. Yetişkinlerdekine göre daha yüksek olan bu sınır, çocukların böbrek ve karaciğerlerinin göreceli olarak daha büyük olmasına ve asetaminofen doz aşımını daha iyi karşılayabilmelerine bağlıdır (75).

2.1.8. Asetaminofen ve Lipit Peroksidasyonu

Asetaminofenin toksik etkilerinin ortaya çıkabilmesi, metabolize olmasına bağlıdır. Metabolizma sonucunda açığa çıkan NAPQI'nın hem protein tiyoller ve hem de glutatyonla kovalent bağlar sağladığı gösterilmiştir (76–78). Asetaminofene bağlı söz konusu etkilerin açığa çıkışında, son zamanlarda NAPQI'nın yanı sıra lipit peroksidasyon mekanizmasının da yer aldığından da bahsedilmektedir (79). Ayrıca, karaciğerdeki glutatyon depolarının azalması sonrasında karaciğer hücrelerinde lipit peroksidasyonunun ve kovalent bağlanma olayının aynı anda gerçekleşebileceği de öne sürülmüştür (80). Asetaminofenin aşırı dozlarında, glutatyonun azalması ve antioksidan sistemin etkinliğinin azalması sonucu lipit peroksidasyonunda artış olduğu rapor edilmiştir (79).

2.2. Nitrik Oksit (NO)

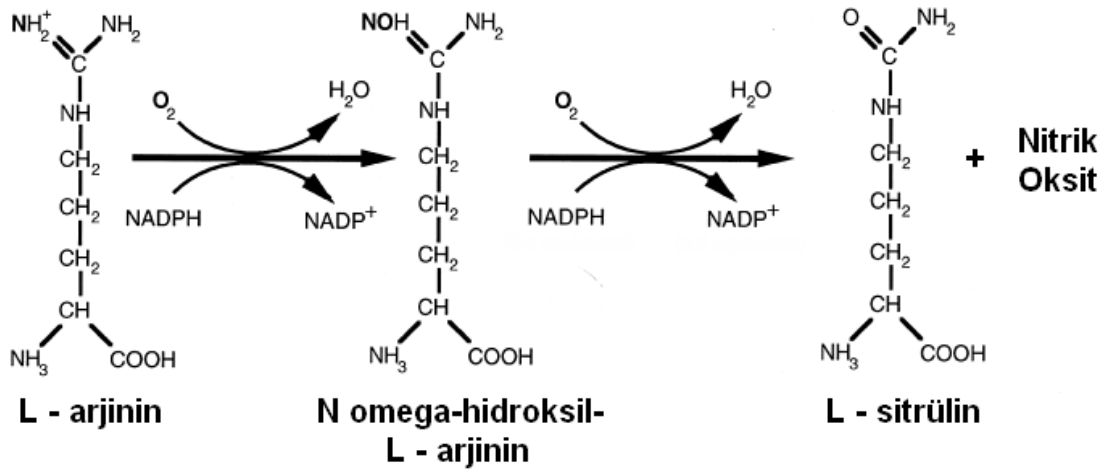
NO, 1987 yılında kan damarlarının asetilkolin uygulaması sonrasında endotele bağlı şekilde gevşemesinden sorumlu molekül olarak keşfedilmiştir (81,82). Bundan kısa bir süre sonra, damar endotel hücrelerinden köken alan

NO'nun L-arjinin amino asidinden sentezlendiği gösterildi (83). NO, yarı ömrü birkaç saniye olan, hızla çözünebilen, reaktif ve gaz halinde bir moleküldür. Günümüzde NO'nun memelilerdeki dolaşım, sinirsel işlev ve savunma gibi bazı olayları ve sistemleri de içine alan fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer aldığı ortaya çıkarılmıştır (84,85).

2.2.1. Nitrik Oksidin Biyosentezi ve NOS'un İzofomları

NO, L-arjininden üç farklı NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. İşlevsel yönden etkin olan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi, dimerik şekilde bulunur. Her üç NOS monomerinin molekül yapısında da, oksijenaz içeren bir N-terminal ucu ve kalmodulin tanıma bölgesine sahip bir C-terminal ucu vardır. Enzimlerin redüktaz bölgesinde NADPH, flavin adenin dinükleotid ve flavin mononükleotid gibi bazı kofaktörler için bağlanma bölgeleri bulunurken, oksijenaz bölgesinde hem ve tetrahidrobiopterin (BH₄) kofaktörlerinin yanı sıra, L-arjinin için de bağlanma sahaları vardır (86–89).

NO'nun L-arjininden sentezlenmesi, iki farklı reaksiyonla gerçekleşir. NOS monooksijenasyon-I reaksiyonu denilen birinci basamakta, L-arjinin NO sentezi için bir aracı olan N omega-hidroksil-L-arjinine dönüşür. Bu reaksiyon için, NADPH ve oksijen gerekir. NOS monooksijenasyon-II reaksiyonu denilen ikinci basamakta, N omega-hidroksil-L-arjinin bileşeni NO ve sitriline oksidize edilir. Flavin adenin dinükleotid ve flavin mononükleotid, kalmodulin ve BH₄, bu süreçte ko-faktör olarak görev yapar (89,90-93). NOS enzimleri, üç ana gruba ayrılır. Bunlar nöron kaynaklı NOS (nNOS veya NOS1), endotel kaynaklı NOS (eNOS veya NOS3) ve uyarılabilir NOS (iNOS veya NOS2) şeklinde sınıflandırılmaktadır. NO sentez reaksiyonları temelde her üç NOS çeşidinde de aynıdır fakat, NO üretiminin düzenlenmesi enzimler arasında farklılık gösterir.



Şekil 1. Nitrik oksidin L-arjinin amino asidinden sentezlenmesi

Damar endotelinin yanı sıra merkezi ve periferik sinir sisteminde ilk keşfedilenler sırasıyla eNOS ve nNOS'tur. Günümüzde, bu enzimlerin çeşitli hücre ve doku tiplerinde üretildikleri bilinmektedir. NO'nun adı geçen NO sentazlar aracılığıyla üretilmesi, çoğunlukla enzim etkinliği seviyesinde düzenlenmektedir ve bu reaksiyonlarda, az miktarda NO üretilmektedir. Hücre içi kalsiyum iyon yoğunluğundaki değişiklikler, NO sentezinde anahtar bir role sahiptir.

Endotel hücrelerindeki asetilkolin ve beyindeki glutamat gibi agonist maddeler, etkiledikleri reseptörler aracılığıyla kalsiyum iyonunda artışa yol açar ve bu yolla, NOS enzimlerini ve NO üretimini etkinleştirir. Kalsiyumdaki artış, eNOS ve nNOS gibi kalsiyuma bağımlı enzimlerde olduğu gibi kalmodulinin NOS molekülüne daha kararlı bir şekilde bağlanmasını sağlayarak, NO sentezini başlatır (90,94).

Her iki izoform da, kalp-damar ve sinir sistemlerindeki fizyolojik süreçlerde yer almaktadır (89,95,96). Ayrıca, eNOS ve nNOS sentezi transkripsiyon seviyesinde de bir noktaya kadar düzenlenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, nNOS üretiminin (ekspresyonunun) sinirsel faaliyet, steroid hormonları, iltihabi sitokinler ve bakteri türevi olan moleküller gibi çeşitli etkenlerce düzenlenebileceğini ortaya çıkarmıştır (97–99). Benzer şekilde, eNOS üretiminin

düzenlenmesi de yerel çevresel şartlardan etkilenebilmektedir. Kan damarlarının, hücresel büyümenin, büyüme faktörlerinin, TNF- α (tümör nekroz faktörü alfa) nın ve hipoksinin yol açtığı etkilerin, eNOS üretimini yönlendirdiği bulunmuştur (97,99–101). Uyarılabilir NO üretimi, esas olarak iNOS ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla kontrol edilmektedir. iNOS istirahat halindeki hücrelerde tespit edilememektedir fakat, bu enzimin ekspresyonu lipopolisakaritler, inflamasyona öncülük eden sitokinler, hipoksi ve yabancı DNA veya RNA gibi bazı unsurlar tarafından uyarılabilmektedir. iNOS, aralarında makrofajların, karaciğer epitel hücrelerinin, kondrositlerin, epitel hücrelerinin, mezangiyel hücrelerin ve düz kas hücrelerinin de olduğu çeşitli hücre tiplerince üretilmektedir.

iNOS uyarıldığı zaman, uzun bir zaman dilimi boyunca ve fazla miktarda NO üretimine yol açar. Bu yolla üretilen NO çeşitli patofizyolojik süreçlerle ilgili olup, antibakteriyel (102) ve antiviral (103) etkinlik, mitokondriyon solunumunun engellenmesi (104), protein nitrasyonu ve doku hasarlanmasının uyarılması (105,106) gibi çeşitli olaylarla bağlantılıdır. iNOS enzim etkinliğinin düzenlenmesi, eNOS ve nNOS'takinden farklıdır. Kalmodulinin iNOS'a sıkı bir şekilde bağlanmasına ve NO sentezi için gerekli bir molekül olmasına rağmen, iNOS'un etkinliği kalsiyum iyonlarından bağımsızdır (107). iNOS eksprese edildikten sonra, birkaç saatten günlere kadar değişebilen zaman periyotları boyunca NO üretimine yol açabilir ve üretimin olduğu hücrelerde, programlı hücre ölümü anlamına gelen apoptoz olayını uyarabilir (85,89,102). Ayrıca, ağız yoluyla etanol verilen farelerin karaciğerlerinde nekroz, enflamasyon ve yağlı dejeneratif değişikliklerin görüldüğü, iNOS geni yönünden eksikliği olan (-/-) farelerde ise bu tür değişikliklerin meydana gelmediği bildirilmiştir (108). Yakın geçmişte, NOS enzim polimorfizminin bazı klinik durumlarla bağlantısının olduğu öne sürülmüştür. iNOS promotör (öncül) geninde yer alan 954(G-C)bp bölgesinde görülen bir nokta mutasyonunun, sıtma hastalığına karşı korunma özelliğiyle bağlantılı olduğu bildirilmiştir (109). eNOS ve iNOS genlerindeki polimorfizmler, kalp ve damar hastalıklarında sorumlu tutulmuştur (110,111). Bunun yanında, nNOS genindeki polimorfizmin astım hastalığıyla ilgisinin olabileceği bildirilmiştir (112,113).

2.2.2. NO ve Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyon yoluyla yıkılması işlemidir ve oldukça zararlı zincirleme bir reaksiyondur. Hücre zarında lipit peroksidasyonu yoluyla meydana gelen hasarlanma geri dönüşümsüzdür (114). Malondialdehit (MDA), reaktif oksijen türlerinin hücre zarıyla etkileşiminden kaynaklanan membran lipit peroksidasyonunun bir belirteci olup, membranda hasarlanmaya yol açarak, hücredeki yaşam dengesinin bozulmasına yol açabilir. Hücre zarında hasarlanma, işlev bozukluğu ve hücreler arası neksus haberleşmesinin kaybı, kalsiyum ve diğer iyon taşıma sistemlerinin de kaybına yol açar (115). Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbitürik asitle ölçülebilen MDA meydana gelir. Bu reaksiyon, lipit peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. Lipit peroksidasyonu, çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Doğrudan hücre zarı yapısını bozma ve dolaylı olarak da reaktif aldehitler üretme yoluyla, diğer hücre bileşenlerine zarar verir.

Peroksidasyonla oluşan MDA, hücre zarı bileşenlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu durum iyon taşınması, enzim etkinliği ve hücre yüzey bileşenlerinin birikimi gibi iç kaynaklı membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (116).

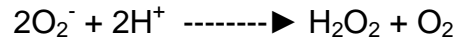
NO'nun, lipit peroksidasyonunu hem artırıcı ve hem de engelleyici bir yönü vardır. Nitrik oksit, lipit peroksil radikallerini yakalayıcı işlevi yönüyle lipit peroksidasyonuna ait zincir reaksiyonlarını önleyici etkiye sahiptir ve aynı zamanda, peroksidaz enzimleri gibi pek çok potansiyel tetikleyici unsurları da engelleyebilmektedir. Fakat ortamda süperoksidin bulunması durumunda, NO peroksinitrit sentezine yol açmakta ve lipit peroksidasyonunu başlatıcı etki göstermektedir (117). Karbon tetraklorürün NO'yu engelleyen NG-nitro-L-arjinin metil esterini (L-NAME) ve aminoguanidinle birlikte verildiği bir çalışmada, NO'nun engellenmesinin karaciğerdeki oksidatif hasarlanmayı artırdığı bulunmuştur (118).

NO'nun ve onun süperoksitle girmiş olduğu reaksiyonun bir ürünü olan peroksinitritin (ONOO^-), toksik hedef molekül reaksiyonlarına yol açtığı gösterilmiştir. Oldukça hızlı gerçekleşen bu reaksiyonda peroksinitrit oluşum hızı 6.7×10^9 L/mol/sn olup, difüzyon sınırlıdır (119). Bu maddelerin üretimi, enflamasyon veya diğer patolojik olaylar esnasında genellikle artmaktadır (120). Sonuçta, hücredeki proteinlerin tirozin kalıntılarının nitratlanması, hücrede işlev bozukluğuna ve ölüme yol açabilir (121,122).

2.3. Antioksidan Enzimler

2.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

İlk defa 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksit dismutaz enzimi süperoksitin, hidrojenperoksit ve moleküler oksijene dönüşümünde görev alır. Reaksiyonun formülasyonu, şu şekildedir:



Bu reaksiyon ani olarak da gelişebilir fakat, SOD tarafından katalizlendiğinde hızı 4000 kat artar. Bunlar, Cu ve Zn içeren izomerler bulundurur (123, 124).

Bu enzim grubunun, canlıda bulunduğu bölgeye göre değişiklik gösteren üç farklı izoformu tespit edilmiştir.

1) Cu-Zn SOD: Bakır ve çinko iyonlarını içeren dimerik tiptir ve sitoplazmada bulunur. Siyanit, bu izoformun işlevini baskılar. Hücrede en fazla miktarda bulunan izomerdir.

2) Mn SOD: Mangan iyonu içeren tetramerik tiptir ve mitokondriyonda bulunur. Siyanit tarafından bloke edilmez.

3) Hücre Dışı SOD: Bu izoform, hücre zarındaki kollajene bağlanarak nötrofil ve diğer hücrelerden salınan süperoksitleri kontrol eder.

Enzimin fizyolojik işlevi, oksijeni katabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının zararlı etkilerine karşı korumaktır. Bu yolla, lipid peroksidasyonu engellenmiş olur (125). SOD'un etkinliği, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda daha fazladır ve doku PO₂ artışına paralel olarak artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranlarda süperoksit üretimi olmasına rağmen, hücre içi süperoksit seviyeleri düşük tutulur. SOD'un hücre dışı etkinliği ise oldukça düşüktür (126). SOD, fagosite edilmiş bakterilerin hücre içi ortamda öldürülmesinde de rol oynar. Bundan dolayı, SOD granülosit işlevi için çok önemli bir enzimdir. Lenfositlerde, granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır (127).

2.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan enzimdir. Hücre zarındaki fosfolipit hidroperoksitlerini alkole indirger (128). Tetramerik yapıdadır ve dört selenyum atomu içerir. Sitoplazmada ve mitokondriyonda bulunabilir (129). GSH-Px'in fagositoz yapan hücrelerde önemli işlevleri vardır.

Diğer antioksidanlarla birlikte, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositoz yapan hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde, oksidasyona yol açan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px'in enzim etkinliğindeki azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar. Aynı zamanda bu enzim, lipid peroksitlerinin indirgenmesini de katalizlemektedir (130). Hücre zarına bağlı en önemli bağlı antioksidan olan E vitamini miktarı az olduğu zaman, hücre zarının peroksidasyona karşı korunmasını sağlar (128).

2.4. Karaciğer

Karaciğer, vücudun deriden sonra en büyük organı ve en büyük bezidir. Ağırlığı, yaklaşık 1,5 kg kadardır. Diyafragmanın altındaki abdominal boşlukla yerleşmiştir. Karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer kısımları tarafından kullanılmak üzere depolandığı bir organdır. Bu yüzden sindirim sistemi ile kan arasında bir geçiş bölgesi oluşturur. Organa kanın % 70-

80'i portal venden gelir. Geri kalan az bir bölümü ise, hepatic arterle sağlanır. İnce bağırsaklardan emilen maddelerin çoğu, portal ven yoluyla karaciğere ulaşır. Sadece kompleks lipitler (şilomikronlar) lenf damarlarıyla taşınır. Karaciğerin dolaşım sistemindeki konumu, metabolitlerin bir araya getirilmesi, dönüştürülmesi, biriktirilmesi ve toksik maddelerin etkisizleştirilmesi ve elenmesi için çok uygundur. Bu işlev, karaciğerin lipit sindirimi için önemli bir dış salgılaması olan safrada gerçekleşir. Karaciğerin, ayrıca albümin ve diğer taşıyıcı proteinler gibi plazma proteinlerinin üretilmesi gibi çok önemli bir işlevi de vardır (131).

2.4.1. Karaciğer Stroması

Karaciğer, hilumda kalınlaşan ince bir bağ dokusu kapsülü (Glisson kapsülü) ile örtülüdür. Hilumdan organa portal ven ve hepatic arter girerken, sağ ve sol hepatic kanallar ve lenfatikler çıkar. Bu damarlar ve kanallar, klasik karaciğer lopçukları arasında sonlandıkları (ya da köken aldıkları) portal alanlara kadar bağ dokusu ile çevrilmiştir. Bu noktadan itibaren, karaciğer lopçuklarındaki hepatositlere ve sinüzoidal endotel hücrelerine destek sağlayan ince bir retiküler lif ağı oluşur (131).

2.4.2. Karaciğer Lobülü

Karaciğerin temel yapı elemanı, karaciğer epitel hücreleri olan hepatositlerdir (Yun. *hepar*, karaciğer + *kytos*, hücre). Bu epitel hücreleri, birbirleriyle bağlantılı plaklar halinde gruplaşmışlardır. Işık mikroskobu kesitlerinde, "karaciğer lobülü" olarak isimlendirilen yapısal birimler görülebilir. Karaciğer lobülü, 0.7 x 2 mm boyutlarında poligonal bir doku kütesidir. Domuzda ve devede, lopçuklar birbirlerinden bir bağ dokusu tabakası ile ayrılır. İnsanda bu söz konusu değildir ve lopçukların çoğu birbirleriyle yakın temasta oldukları için, kesin sınırlarının belirlenmesi oldukça güçtür. Lopçuklar, bazı kenar bölümlerde safra kanalları, lenfatikler, sinirler ve kan damarları içeren bağ dokusuyla sınırlanmıştır. "Portal alan" adı verilen bu bölgeler, lopçukların köşelerinde bulunur. İnsan karaciğer lobülünde 3-6 adet portal alan bulunur ve her bir portal alanda bir venül (portal

venin bir dalı), bir arteriyol (hepatik arterin bir dalı), bir kanal (safra kanalı sisteminin bir parçası) ve lenfatik damarlar bulunur. Venül, süperiyor ve inferiyor mezenlerik venlerle dalak veninden gelen kanı içerir. Arteriyoldeki kan, abdominal aortun çölyak dalından gelir. Kübik epitelle örtülü olan kanal, parenkim hücrelerinden gelen safrayı taşır ve sonunda hepatik kanalın içine boşaltır. Lenf, bir veya daha fazla lenfatikle taşınır ve sonuçta kan dolaşımına geçer. Bu yapıların hepsi, bir bağ dokusu kılıfı içinde bulunur (131).

Karaciğer lobülünün içindeki epitel hücreleri ışınsal olarak dizilmiştir ve bir duvarın tuğlalarına benzer biçimde düzenlenmiştir. Bu hücre plakları, lobülün periferinden merkezine doğru yönlenmişlerdir. Labirent şeklinde ve sünger benzeri bir yapı oluşturacak biçimde serbestçe anastomozlaşırlar. Bu plaklar arasındaki boşlukta, "karaciğer sinüzoidleri" adı verilen kılcal damarlar bulunur. Sinüzoid kılcalları, sadece kesintili ve pencereci bir endotel tabakasından oluşan düzensiz olarak genişlemiş damarlardır. Pencereci yaklaşık 100 nm çapındadır ve kümeler halinde gruplaşmıştır. Endotel hücreleri, altlarında bulunan hepatositlerden kesintili bir bazal laminayla ve "Disse aralığı" adı verilen endotel altı bir boşlukla ayrılmıştır. Bu aralıkta, hepatositlerin mikrovilusları bulunur. Sonuç olarak, kan sıvısı endotel duvarından kolayca geçer ve hepatosit yüzeyi ile temas eder. Böylece, sinüzoid lümeniyle karaciğer hücreleri arasında makromolekül alışverişi kolaylıkla sağlanır. Bu geçiş, sadece çok sayıda büyük molekülün (örn. lipoproteinler, albümin, fibrinojen) hepatositler tarafından kana verilmesi yönünden değil, aynı zamanda bu makromoleküllerin çoğunun hepatositlerce alınıp çözülmesi yönünden de fizyolojik bir önem taşır (131).

Sinüzoid ince bir retiküler lif kılıfıyla desteklenmiş olup, burada endotel hücrelerine ek olarak, "Kupffer hücreleri" adı verilen ve endotel hücrelerinin lümenine bakan yüzlerinde yerleşik makrofajlar da bulunmaktadır. Bu hücrelerin başlıca işlevleri yaşlı eritrositlerin metabolize edilmesi, hemoglobinin sindirilmesi, bağışıklık olaylarıyla ilgili proteinlerin salgılanması ve kalın bağırsaktan portal kana geçen bakterilerin ortadan kaldırılmasıdır. Kupffer hücreleri, karaciğer hücre topluluğunun % 15'ini oluşturur. Bu hücrelerin çoğu, fagositozda çok etkin oldukları

periportal lopçuk bölümlerinde yerleşmiştir. Disse aralığında, “İto hücreleri” olarak da bilinen ve yağ depolayan hücreler yer almaktadır. Bu hücrelerde, A vitamini yönünden zengin lipit çökeltileri bulunur. İto hücreleri, sağlıklı karaciğer dokusunda retinoidlerin alınması, depolanması ve salınması, bazı hücre dışı matriks proteinlerinin ve proteoglikanların sentezi ve salgılanması, büyüme unsurlarının ve sitokinlerin salgılanması ve çeşitli düzenleyici maddelere (örn.PG veya tromboksan A₂) cevap olarak sinüzoid lümen çapının düzenlenmesi gibi bazı işlevlere sahiptir (131).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın deney kısmı, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, toplam 70 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Hayvanların grup ağırlıkları, ortalama olarak 134-144 g arasındaydı. Deney süresince, sıçanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) verildi.

3.1.2. Kullanılan İlaçlar

Asetaminofen: Çalışmada, serum fizyolojik içinde çözülmüş halde bulunan 5, 10, 20, 100, 200 ve 500 mg asetaminofen (Sigma) kullanıldı. Toplamda, 35 ml çözelti kullanıldı.

3.1.3. Biyokimyasal Çalışma İçin Kullanılan Malzemeler

- 1- Soğutmalı Santrifüj: Eppendorf MR5415 (Almanya)
- 2- Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)
- 3- Derin Dondurucu: Uğur (Türkiye)
- 4- Hassas Teraziler: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
- 5- Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
- 6- Otomatik Pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
- 7- Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
- 8- Cam-Teflon Homojenizatör
- 9- Sonikatör: Bandelin Sonoplus (Almanya)
- 10- pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

- 11- Manyetik Karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
- 12- Homojenizatör: Ultra Turrax T25 (Almanya)
- 13- Biyokimya Analizörü: Roche/Hitachi Modular P800 (Almanya)

NO tayini için kullanılanlar

- NO Eliza Kiti (Cayman)

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Tayini İçin Kullanılanlar

- Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya)
- Glutasyon redüktaz, Fluka (İsviçre)
- β -NADPH, Sigma (Almanya)
- Glutasyon-redükte, Sigma (Almanya)
- Kümen hidroperoksit, Sigma (Almanya)
- Titripleks III, Merck (Almanya)
- Kümen hidroperoksit çözeltisi (0.18 mM)
- Glutasyon çözeltisi (4 mM)
- Glutasyon redüktaz ($\geq 0,5$ U/L)

Lipit peroksidasyonu (MDA) tayini için kullanılanlar

- TCA (Trikloroasetik asit) Merck, Katalog no: 100810 (Almanya)
- TBA (Tiyobarbitürik asit) Merck, Katalog no: 100180 (Almanya)

Süperoksit dismutaz (SOD) tayini için kullanılanlar

- KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat) Merck, Katalog no: 106323 (Almanya)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Disodyum hidrojen fosfat dihidrat) Merck, Katakog no: 106586 (Almanya)
- EDTA (Na tuzu) Merck (Almanya)

- BSA (Bovine serum albumin) Sigma (Almanya)
- Ksantin Sigma (Almanya)
- XO (Ksantin oksidaz) Sigma (Almanya)
- CuCl_2 (Bakır klorür) Sigma (Almanya)
- NaCO_3 (Sodyum karbonat) Merck (Almanya)
- NBT (Nitroblue tetrazolium) Sigma (Almanya)

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Planı

Çalışmada, altı deney grubu ve bir kontrol grubu oluşturuldu. Her bir grupta onar adet olmak üzere toplam 70 adet sıçan kullanıldı. Deney planı, Tablo 1'de verilmiştir.

Grup I: Kontrol grubu. 1 ml serum fizyolojik, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

Grup II: 5 mg / kg dozunda asetaminofen çözeltisi, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

Grup III: 10 mg / kg dozunda asetaminofen çözeltisi, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

Grup IV: 20 mg / kg dozunda asetaminofen çözeltisi, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

Grup V: 100 mg / kg dozunda asetaminofen çözeltisi, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

Grup VI: 200 mg / kg dozunda asetaminofen çözeltisi, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

Grup VII: 500 mg / kg dozunda asetaminofen çözeltisi, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

Çalışmada uygulanan bütün asetaminofen dozları, ilgili literatüre göre belirlenmiştir (132-137).

Tablo 1: Deney planı

Gruplar	Hayvan Sayısı	Tedavi	Doz	Süre
I	10	Kontrol	1 ml SF	1 Gün
II	10	Asetaminofen	5 mg / kg	1 Gün
III	10	Asetaminofen	10 mg / kg	1 Gün
IV	10	Asetaminofen	20 mg / kg	1 Gün
V	10	Asetaminofen	100 mg / kg	1 Gün
VI	10	Asetaminofen	200 mg / kg	1 Gün
VII	10	Asetaminofen	500 mg / kg	1 Gün

Deneyin başlangıcında, ilk gün sıçanların ağırlıkları ölçüldü. Çalışmanın başlangıcından 24 saat sonra deney sonlandırıldı ve ketamin anestezisi altında karaciğerler ve kan örnekleri alındı. Alınan karaciğerin bir kısmı biyokimyasal analiz için ayrıldı ve fosfat tamponuna konuldu. Karaciğerin geri kalan kısmı ise, histolojik çalışma için % 10'luk nötral formaldehit çözeltisine konularak tespit edildi.

3.2.2. Histolojik Çalışmalar

Yüzde 10'luk nötral formalin çözeltisi içinde bir gece boyunca bekletilerek sabitlenen doku örnekleri, bir gece akan suda yıkama işlemine tâbi tutulduktan sonra aşağıda gösterilen işlemlerden geçirildi.

A) Suyun Dokulardan Uzaklaştırılması

Alkol derecesi

Süre

%70

1 gece

%80

1 saat

%90

1 saat

%96	1 saat
%100	1 saat
%100	1 saat

B) Şeffaflandırma

Ksilol	1/2 saat
Ksilol	1/2 saat

C) Parafin Emdirme

Ksilol+Parafin (60 °C etüvde)	15 dakika
Yumuşak parafin (60 °C etüvde)	1 saat
Sert parafin (60 °C etüvde)	4 saat

D) Gömme

Sert parafin

Hazırlanan parafin bloklardan, Leica tipi kızaklı mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve hematoksilin-eozin kullanılarak boyama yapıldı. Boyanan örneklerin incelenmesinde ve fotoğraflarının çekiminde, Olympus BX-50 tipi binoküler araştırma mikroskobu ve görüntüleme donanımı kullanıldı.

3.2.3. İmmunohistokimyasal Çalışma

a) Kesitlerin elde edilmesi:

Elde edilen tüm doku örnekleri, % 10'luk formalin solüsyonuna alındı. Dokular en fazla 24 saat formalin solüsyonunda bekletildi. Daha sonra yukarıda sayılan rutin histolojik yöntemler kullanılarak dokular parafine gömüldü. Mikrotom (Leica tipi kızaklı mikrotom) ile alınan 5 µm kalınlığında seri kesitler lizinli lamlara alındı.

İmmün boyamada kullanılan kimyasal maddeler:**Birincil (Çoğul Klonlu-Poliklonal) Antikor:**

iNOS (Epitopa Özgün Tavşan Antikoru, Labvision Fremont, CA 94539, USA) Seyreltme çözeltisi olarak, fosfat tampon solüsyonu (PBS, Phosphate Buffer Solution) kullanılmıştır. Bu solüsyonun hazırlanışı aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

İkincil Antikor:

Biotinylated Goat Anti-Polyvalent-Labvision TP-125-BN

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS; Phosphate Buffer Solutaion):

- Sodyumdihidrojen fosfatomonohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K.N:3090,Merck):
1,37gr.
- Sodyumdihidrojen fosfatodihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K.N: 6345,Merck):
1,56gr.
- Sodyum klorür (NaCl , K.N: 6048,Merck) 8,76gr
- Distile su: 1000 ml.

Sitrik Asit Solüsyonu:

- Sitrik asit: 2,1 gr.
- Distile Su: 1lt.
- Hazırlanışı: Sitrik asit distile su içinde eritilir ve karıştırılır. PH=6 olacak şekilde, 2M NaOH ilave edilir.

Hidrojen Peroksit Solüsyonu (%3) :

- Metanol 5.4 ml.
- Hidrojen Peroksit 0,6 ml.
- Hazırlanışı: Metanol ve Hidrojen Peroksit karıştırılır.

Kromojen:

- DAB (Ultravision Detection System) Large Volume DAB Substrate System

Bu madde, ikincil antikor olarak kullanılan Horseradish-peroksidaz enziminin substratı olarak kullanıldı.

Zıt Boyama:

- Zıt boyamada amaç dokudaki antijenik olmayan hücre ve hücre yapılarını boyamaktır.
- Mayer hematoksilen ile yapıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi:

- 4 µm kalınlığında elde edilen parafin kesitler etüvde 37 °C' de etüvde bir gece bekletildi.
- Deparafinizasyon işlemi için 20 dakika ksilende tutuldu.
- Dehidratasyon işlemi için 20 dakika absolut alkolde tutuldu.
- Distile sudan geçirildi.
- Antijen retrieval uygulaması için citrate buffer tamponu içinde Labvision PT
- Modulle cihazında 98°C de 20 dakika ısıtıldı, 20 dakika oda ısısında soğutuldu.

- Distile sudan geçirildi.
- Dakopen ile çevrelenen dokulara nemli ortamda % 3'lük H₂O₂ 20 dakika süreyle uygulandı.
- PBS çözeltisinde yıkandı.
- Ultra V blok ile 5 dakika inkübe edildi.
- Dokular 1 saat süreyle oda ısısında primer antikor iNOS (Epitope Spesific Rabbit Antibody) Labvision Fremont CA 94539 USA ile 1/50'lik dilüsyonda enkübe edildi.
- PBS'de yıkandı.
- İkincil antikor Biotinylated Goat Anti-Polyvalent- Labvision TP-125-BN ile 20 dakika muamele edildi.
- PBS çözeltisinde yıkandı.
- Streptavidin damlatıldı (20 dakika).
- PBS çözeltisinde yıkandı.
- Daha sonra, dokuların üzerine DAB damlatıldı (5–10 dakika).
- Distile su ile yıkandı.
- Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı (1 dakika).
- Distile su ile yıkandı.
- Dehidratasyon için, sırasıyla % 80, % 96 ve % 100'lük alkol serilerinde beşer dakika bekletildi.
- Preparatlar, 2 x 5 dakika ksilolde şeffanlaştırıldı.

- Kapatma işlemi, entellan kullanılarak gerçekleştirildi.
- Kontrol amacıyla, her poliklonal antikor için birkaç kesit birincil antikor basamağı atlanarak (dokulara PBS damlatıldı), izleyen basamaklara geçildi.

3.2.4 Değerlendirme:

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan karaciğer doku kesitlerindeki iNOS reseptör yoğunluklarının belirlenmesinde, yarı nitel değerlendirme yöntemi kullanıldı (138). Bunun için, şu derecelendirme ölçütüne başvuruldu:

(-): Boyanma yok (-/+): Çok hafif boyanma (+): Az boyanma
(++): Orta derecede boyanma (+++) : Yoğun şekilde boyanma

3.3.1. Biyokimyasal Çalışmalar

3.3.1.1. Dokuların Biyokimyasal Ölçümlere Hazırlanması

Karaciğer doku numuneleri, kanın uzaklaştırılması amacıyla önce soğuk distile su ile yıkandı. Daha sonra, doku örnekleri 150 ml'lik soğuk potasyum fosfat tamponu içine alınarak -20⁰C'de muhafaza edildi. Derin dondurucudan çıkarılan karaciğer örnekleri, buzlarının çözülmesinin ardından üç kez soğuk distile su ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurulandı. Kurulanan karaciğer örnekleri tartılarak, hacim doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde fosfat tamponu içine alındı ve buz üzerinde homojenizatörle 16,000 devir/dk hızında iki dakika boyunca homojenize edildi. Elde edilen homojenatlardan, TBARS ölçümü yapıldı (139).

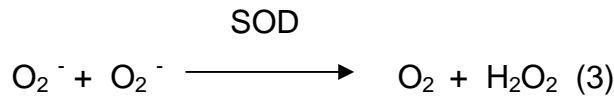
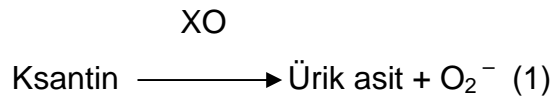
3.3.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Etkinliğinin Ölçülmesi

SOD etkinliğinin belirlenmesi için kullanılan deneyin yapılış ilkesi, Sun ve arkadaşlarının yöntemine dayanmaktadır (140).

Deneyin İlkesi:

Süperoksit dismutaz, çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit (O_2^-) radikalinin hidrojen peroksit (H_2O_2) dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. Ksantin-ksantin oksidaz (XO) sistemi ile üretilen O_2^- radikallerinin (reaksiyon 1) nitroblue tetrazolium (NBT) bileşenini indirgemesi esasına dayanır. Oluşan O_2^- radikalleri, nitroblue tetrazoliumu indirgeyerek renkli formazon oluşturur (reaksiyon 2). Bu kompleks, 560 nm'de maksimum absorbanans verir. Enzimin bulunmadığı ortamda, bu indirgeme meydana gelmekte ve mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD bulunduğunda ise, NBT indirgenmesi olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzimin miktarına ve etkinliğine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır (reaksiyon 3). Bu reaksiyona dayanan optik yoğunluktaki azalmadan yararlanılarak, reaksiyonun SOD tarafından yüzdelik engelleme oranı belirlendi ve sonuçlar U/mg protein olarak değerlendirildi.

$$\text{Enzimin Yüzdelik Engelleme Oranı} = (\text{Abs}_{\text{körv}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{körv}} \times 100$$



SOD tayini için kullanılan reaktifler

SOD reaktifi [0.3 mmol/L ksantin, 0.6 mmol/L EDTA (Na tuzu), 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na₂CO₃, 1 g/L bovine serum albumin (BSA)], 167 Ü/L ksantin oksidaz (XO), 0.8 mmol CuCl₂.

Deneyin yapılışı

	Körv (mL)	Numune (mL)
SOD reaktifi	2.85	2.85
Ekstrakt	-	0.10
Bidistile su	0.10	-
XO	0.05	0.05

25 °C'de 20 dakika inkübasyon

CuCl ₂	1	1
-------------------	---	---

Distile suya karşı körv'den başlanarak numuneler 560 nm'de okunur.

SOD etkinliğinin hesaplanması

% Engelleme Oranı = $([\text{Absorbans körv (K)} - \text{Absorbans numune (N)}]) / K \times 100$

% 50'lik engellemeye 1 Ü denildiği için:

Etkinlik (Ü/ml) = $[(\% \text{ inhibisyon} / 50) \times (1 / 0.1)] \text{ ml}$.

Ü/ml = $[(K - N) / K] \times 20 \times 5$ (sulandırma faktörü)

Özgün etkinlik (U/mg protein) = (U/mL/ml protein) (136).

3.3.1.3 Lipit Peroksidasyon (MDA) Ölçümü

Doku örneklerindeki lipit peroksidasyon seviyeleri, tiobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) yoğunlukları ölçülerek tespit edildi (116).

Deneyin İlkesi

MDA (TBARS) seviyelerinin ölçümü, Draper ve Hadley'in metoduna göre yapıldı (115). Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA), TBA ile reaksiyona girerek 532 nm'de en üst seviyede dalgaboyu emilimine yol açan renkli bir kompleks oluşturur.

TBARS ölçümü için kullanılan reaktifler

2.5 ml yüzde 10'luk TCA (Trikarboksilik asit) ve 1 ml yüzde 0.67'lik TBA (Tyiobarbitürik asit).

Deneyin Yapılışı

	Numune	Numune körv'ü
Deiyonize su	1 mL	1 mL
Homojenat	0.5 ml	-
TCA çözeltisi	2.5 ml	2.5 ml

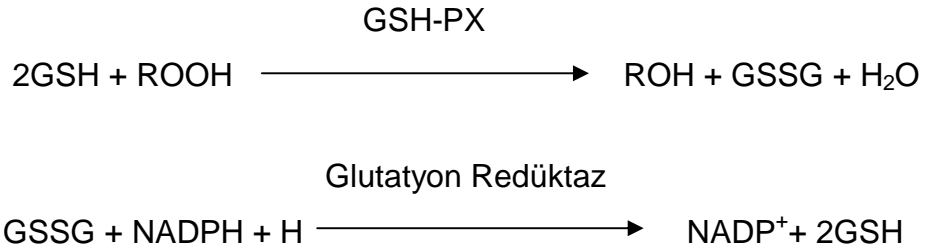
Homojenat, 15 dakika kaynar suda bekletildi ve daha sonra, 5000 devir / dk'da 10 dakika boyunca santrifüje edildi. 2 ml süpernatant alınıp,

	Numune	Numune körv'ü
Süpernatant	2 ml	2 ml
TBA çözeltisi	1 ml	1 ml

15 dakika kaynar suda bekletildi ve hemen soğutuldu. 532 nm’de numune yerine distile su konularak, hazırlanan körve karşı absorbanları okutuldu. MDA–TBA (TBARS) kompleksinin 532 nanometredeki ekstraksiyon katsayısından ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) yola çıkılarak, nmol / ml cinsinden MDA değeri bulundu. Elde edilen sonuçların ml’deki protein miktarına bölünmesi yoluyla, nmol / mg protein cinsinden TBARS değeri bulundu.

3.3.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Etkinliğinin Ölçülmesi:

Deneyin prensibi Paglia ve Valentine’nin metoduna dayanmaktadır (141). Deneyin Prensibi: Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksid ile glutasyonun oksidasyonunu katalizler. Okside glutasyon, NADPH varlığında glutasyon redüktaz tarafından indirgenir. Bu arada NADPH, pozitif yüklü NADP^+ ’ye oksitlenir.

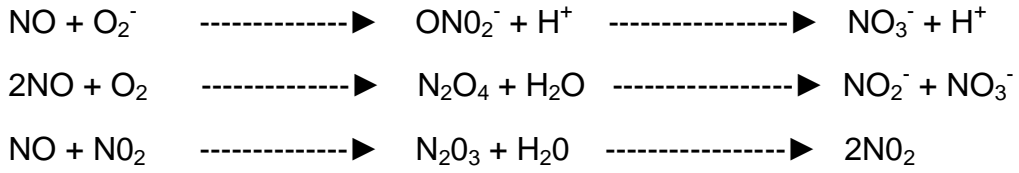


NADPH’nin azalmasına bağlı olarak 340 nm’de meydana gelen absorban değişimi ölçülerek enzim aktivitesi hesaplandı. Deneyin yapılışı: Bir deney tüpünde 1 ml; glutasyon (4 mM), glutasyon redüktaz ($\geq 0.5 \text{ U/L}$) ve β -NADPH (0.34 mM) çözeltilerini içeren reaktif ile 20 μl numune karıştırılıp, ölçümden hemen önce 40 μl kümen hidroperoksid (0,18 mM) ilave edildi. Enzim aktivitesini ölçmek için 340 nm’deki absorban değişimi hesaplandı. U/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi, homojenizasyon esnasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpıldıktan sonra doku protein değerine bölünerek sonuçlar U/gr birimi olarak ifade edildi.

3.3.1.5 Serum Nitrik Oksit (NO) Seviyesinin Ölçülmesi

Deneyin İlkesi

Vücutta in vivo ortamda üretilen NO, hızlı parakrin etki gösterir. NO, guanilat siklaz enziminin prostetik grubuyla reaksiyona girerek enzimi etkinleştirir ve cGMP seviyelerinde artışa yol açar. NO, aynı zamanda vücut sıvılarında bulunan bazı moleküllerle de reaksiyon verir. Bunları, şu şekilde sıralayabiliriz:



Ölçüm yönteminde, iki basamaklı bir tepkime sürecinden faydalanılır. Birinci basamakta nitrit, nitrat redüktaz aracılığıyla nitrate dönüştürülür. İkinci basamakta ise, nitriti koyu mor renkli azot bileşenine dönüştüren Griess Reaktifi ortama eklenir. Bu bileşenin dalgaboyunu emme oranı (absorbance) ölçülerek, NO yoğunluğu hesaplanmış olur.

Nitrat Standart Eğrisinin Hazırlanması

Ölçümü yapılacak örneklerdeki nitrat + nitrit yoğunluklarının belirlenebilmesi için, önce bir nitrat standart eğrisi hazırlandı. Temiz bir deney tüpünün içine 0,9 ml deney tamponu ve 0,1 ml nitrat standardı eklendi ve bu karışım çalkalandı. Bu standardın yoğunluğu, 200 mikromolardı. Standart eğrisi, aşağıdaki tabloda verilen reaktiflerin eklenmesi yoluyla hazırlandı:

Kuyucuk	Nitrat Standardı (µl)	Deney Tamponu (µl)	Son Nitrat Yoğunluğu
A1, A2	0	80	0
B1, B2	5	75	5
C1, C2	10	70	10
D1, D2	15	65	15
E1, E2	20	60	20
F1, F2	25	55	25
G1, G2	30	50	30
H1, H2	35	45	35

Serum Örneklerinin Hazırlanması

Alınan kan örnekleri, santrifüjden geçirilerek 10-30 kDa'lık molekül ağırlığına sahip partikülleri ayıran filtreden geçirildi. Elde edilen filtrelenmiş örneklerin distile sudan geçirilmesi yoluyla, arka planda hemoglobinin gibi diğer faktörlerden kaynaklanabilecek absorbansın en aza indirilmesinin yanı sıra, Griess reaktiflerinden açığa çıkan rengin daha da netleşmesi sağlandı.

Ölçüm İşlemi

Ölçüm işleminde, 96 kuyucuklu petri kullanıldı. İki kuyucuk, absorbans körü olarak ayrıldı ve bunların içine 200 mikrolitre tampon kondu. Her bir kuyucuğa nitratla birlikte 80 mikrolitre serum örneği kondu. Daha sonra, şu basamaklar takip edildi:

- Petrideki kör (blank) kuyucuklarına 200 mikrolitre deney tamponu kondu.
- Diğer kuyucuklara ise, ölçümü yapılacak örnekten konularak, üstüne deney tamponu eklendi ve son hacim 80 mikrolitreye tamamlandı.
- Her bir kuyucuğa, 10 mikrolitre enzim kofaktör karışımı eklendi.
- Daha sonra, örnek içeren kuyucuklara 10 mikrolitre Nitrat Redüktaz karışımı eklendi.

- Petri kutusunun kapağı kapatılır ve örnekler, oda sıcaklığı ortamında bir saat tutulur.
- Enkübyasyon sonrasında, kuyucuklara 50 mikrolitre Griess Reaktanı – R1 ve R2 eklendi.
- Renk oluşumu için 10 dakika beklendikten sonra, örneklerin absorban değerleri okundu.

NO Değerinin Hesaplanması:

Kör (blank) kuyucuklarından elde edilen değer, örnek içeren diğer kuyucuklardan ölçülen ortalama emilim (absorbans) değerlerinden çıkarıldı.

Standart Eğrilerin İşaretlenmesi:

İşaretleme noktası olarak, 540 veya 550 nanometrelik dalgaboyu emilim değeri referans olarak alındı ve aşağıdaki formül kullanıldı:

$$[\text{Nitrat} + \text{Nitrit}] (\mu\text{M}) = [(A_{540} - y \text{ kesişme noktası}) / \text{Eğim Açısı}] \times [200 \mu\text{l} / \text{Örnek hacmi}] \times \text{Seyreltme Oranı}$$

$$[\text{Nitrit}] (\mu\text{M}) = [(A_{540} - y \text{ kesişme noktası}) / \text{Eğim Açısı}] \times [200 \mu\text{l} / \text{Örnek hacmi}] \times \text{Seyreltme Oranı}$$

$$[\text{Nitrat}] (\mu\text{M}) = [\text{Nitrat} + \text{Nitrit}] - [\text{Nitrit}]$$

3.3.2. İstatistik Analiz

Histolojik çalışmaların istatistik değerlendirmeleri, SPSS 15.0 ve Instat 3.0 yazılımları kullanılarak yapıldı ve yarı nitel değerlendirme ölçümünde Ki-kare testi uygulandı. İkili grup karşılaştırmaları için parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanıldı ve 0.05'in altındaki P değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Biyokimyasal çalışmaların istatistik analizi SPSS 15.0 ve Instat 3.0 yazılımları kullanılarak gerçekleştirildi ve ikili grup karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Elde edilen değerler, ortalama \pm standart sapma olarak verildi ve 0.05'in altındaki P değerleri, istatistik açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

Kontrol grubu ve deney gruplarına ait karaciğer doku kesitlerinde incelenen yapısal değişikliklerin değerlendirilmesinde, Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının kullandıkları yarı-nitel değerlendirme yöntemi kullanıldı (142). Bu yöntemle elde edilen sonuçlar istatistik analizden geçirildi. Gruplara ait "p" değerleri, Tablo 3'te verilmiştir. Kontrol grubu sıçanlara ait karaciğer doku kesitlerinin histolojik incelenmesinde, bu organa ait histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (Resim 1).

Grup-II, Grup-III ve Grup-IV'e ait 5, 10 ve 20 mg/kg asetaminofen verilen sıçanların karaciğer doku örnekleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, arada herhangi bir yapısal farklılığın olmadığı görüldü ($p > 0.05$) (Resim 2 – 4). Grup-V'te yer alan ve 100 mg/kg dozunda ilaç uygulaması yapılan hayvanlara ait karaciğer doku örnekleri incelendiğinde, portal venin etrafındaki sahada mononükleer hücre infiltrasyonu, parankimde piknotik ve hiperkromatik çekirdekli hücrelerin ve hepatositlerde granüler ve vakuoler bozunmaların olduğu gözlemlendi ve bu değişimler, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlıydı ($p < 0.05$) (Resim – 5). Benzer şekilde, 200 mg/kg ve 500 mg/kg dozlarında asetaminofen enjekte edilen ve Grup-VI ile Grup-VII'ye ait karaciğer doku kesitlerinde sinüzoidal genişleme, piknotik ve nekroza giden hücrelerin yanı sıra, şiddeti daha da artan şekilde hepatosit bozunmalarının olduğu ve bu değişimlerin kontrol grubuna göre anlamlı oldukları gözlemlendi ($p < 0.05$) (Resim 6 ve 7). Histolojik (yapısal) değişiklikler, yarı nitel değerlendirme yöntemiyle karşılaştırıldı. Buna göre:

(-) (negatif puan): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,

(+) (1 pozitif puan): hafif derecede,

(++) (2 pozitif puan): orta derecede,

(+++) (3 pozitif puan): ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

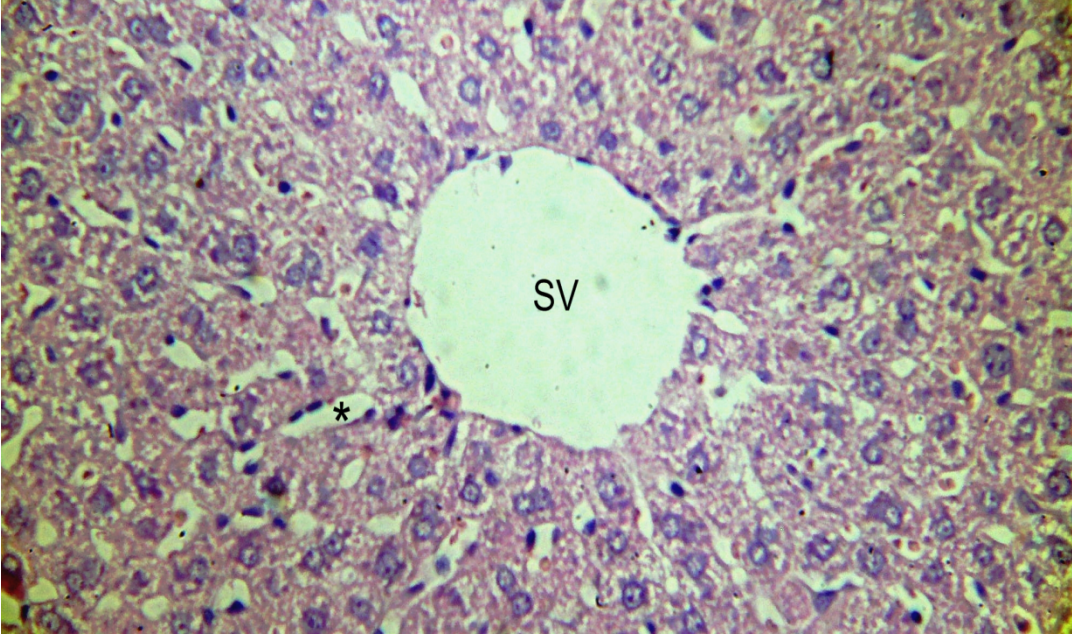
(142) (Tablo 2).

Tablo 2: Gruplar arasında gözlenen yapısal değişikliklerin yarı nitel değerlendirilmesine ait puanlama.

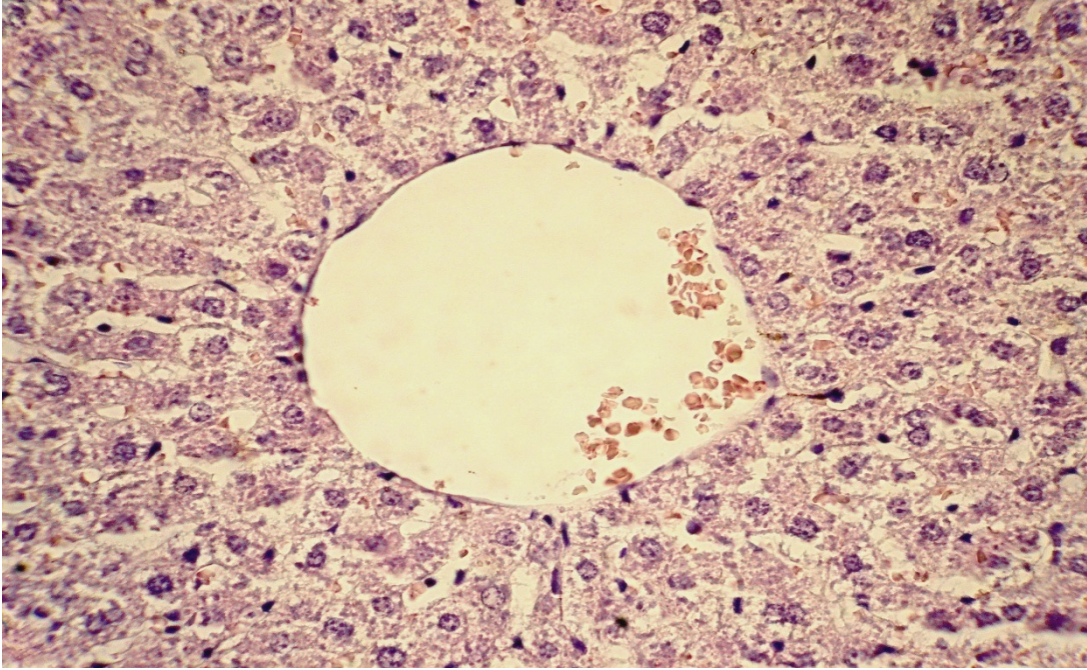
Gruplar	Hepatosit Dejenerasyonu	Sinüzoid Dilatasyonu	Piknotik Çekirdek	Nekroza Giden Hücre	Parankimde MN Hücre İnfiltrasyonu
Kontrol	-	-	-	-	-
Grup II	-	-	-	-	-
Grup III	-	-	-	-	-
Grup IV	-	-	-	-	-
Grup V	+	+	+	+	++
Grup VI	++	++	+	++	++
Grup VI	+++	++	++	++	++

Tablo 3: Gruplar arasında gözlenen yapısal değişikliklerin Ki-kare (χ^2) testine göre p değerleri.

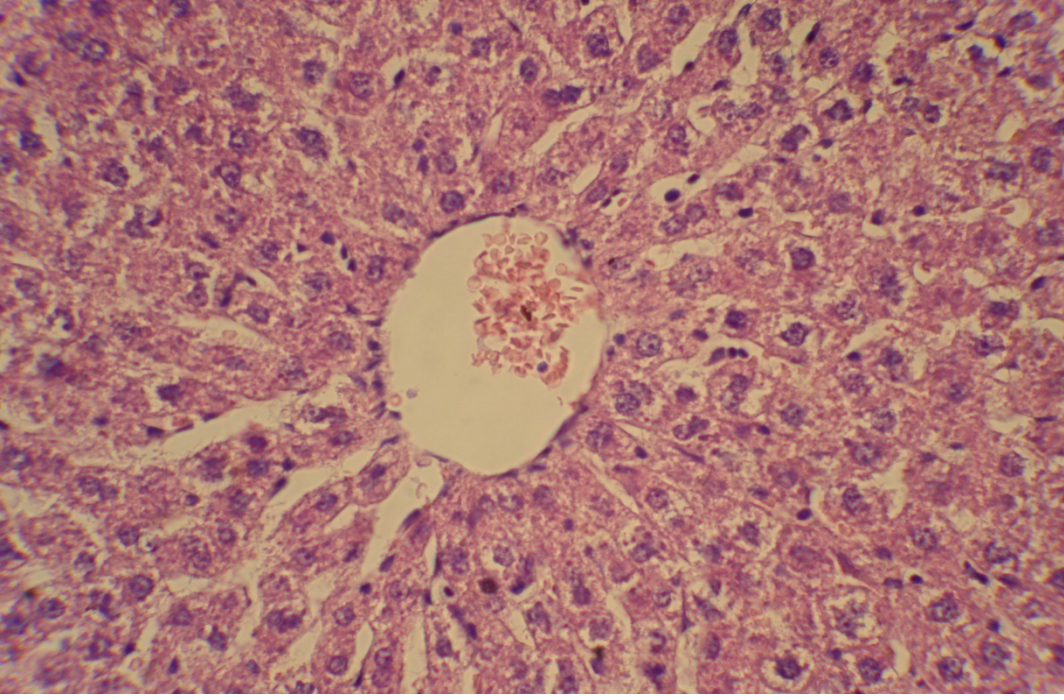
Gruplar	Hepatosit Dejenerasyonu	Sinüzoid Dilatasyonu	Piknotik Çekirdek	Nekroza Giden Hücre	Parankimde MN Hücre İnfiltrasyonu
Kontrol – Grup II	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
Kontrol – Grup III	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
Kontrol – Grup IV	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
Kontrol – Grup V	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.01
Kontrol – Grup VI	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.01
Kontrol – Grup VI	P < 0.001	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01



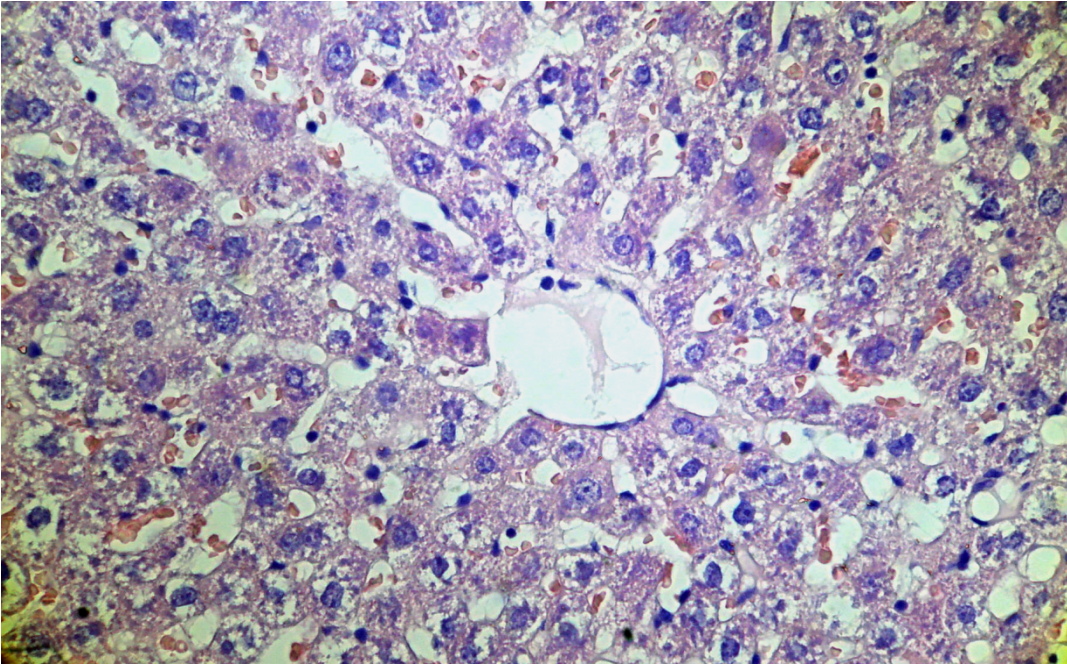
Resim 1: Kontrol grubuna (Grup-I) ait normal karaciğer dokusu. SV: Santral ven, yıldız: Sinüzoid (Hematoksilen-Eozin, x40).



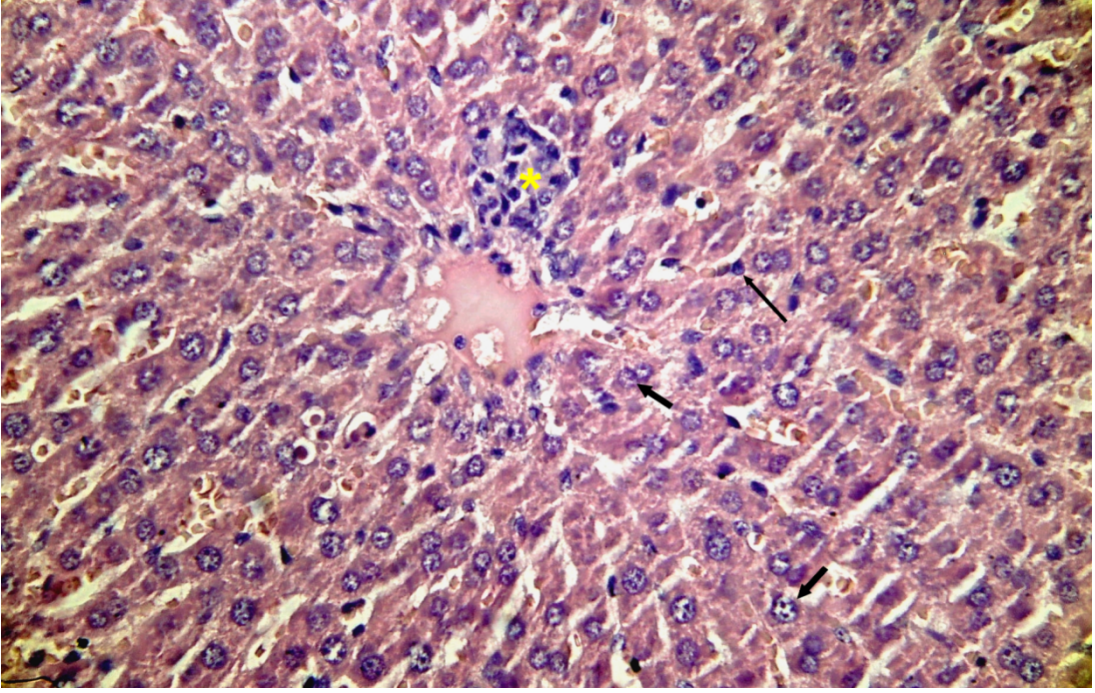
Resim 2: Grup-II'ye ait (5 mg/kg asetaminofen uygulanan) karaciğer dokusu (Hematoksilen-Eozin, x40).



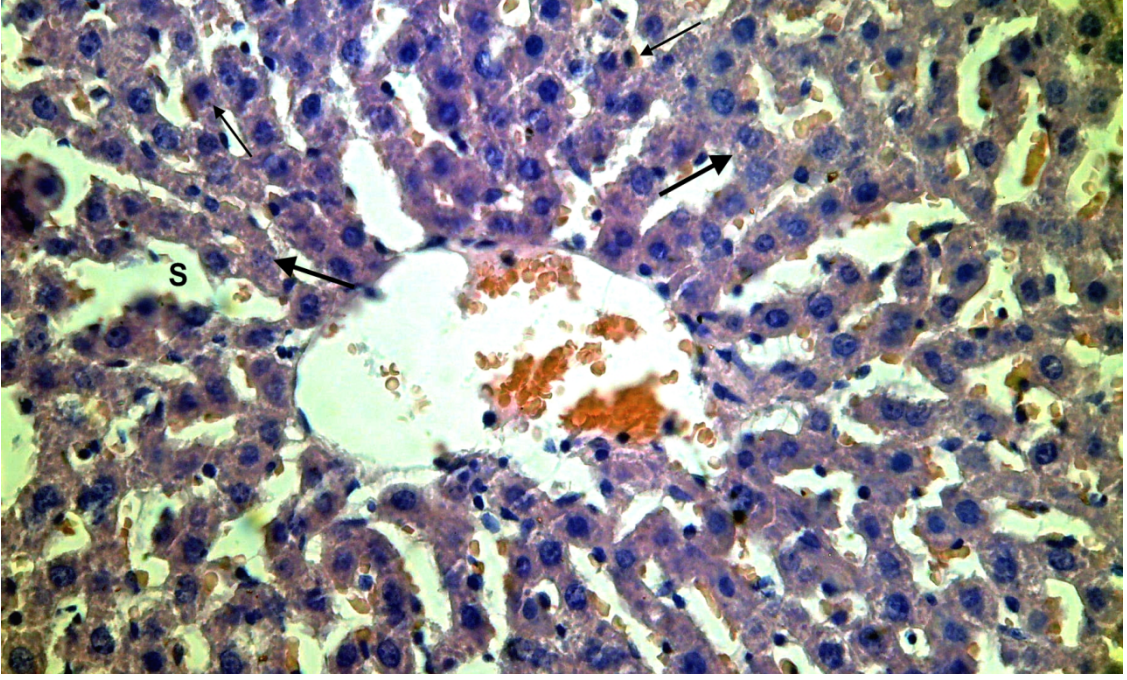
Resim 3: Grup – 3'e ait (10 mg/kg asetaminofen uygulanan) karaciğer dokusu (Hematoksilen-Eozin, x40).



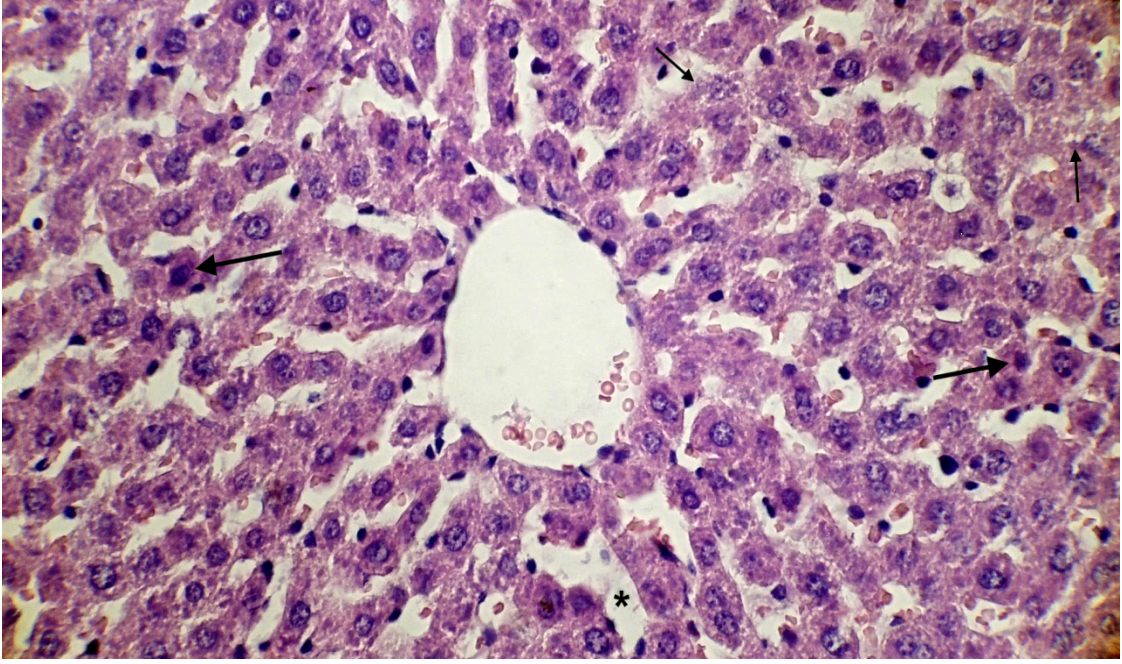
Resim 4: Grup–IV'e ait (20 mg/kg asetaminofen uygulanan) karaciğer dokusu (Hematoksilen-Eozin, x40).



Resim 5: Grup–V'e ait (100 mg/kg asetaminofen uygulanan) karaciğer dokusu. Mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldız), piknotik ve hiperkromatik çekirdek (ince oklar) ve hepatositlerde granüler ve vakuoler dejenerasyonlar olduğu (kalın oklar) gözlenmekte (Hematoksilen-Eozin, x40).



Resim 6: Grup-VI'ya ait (200 mg/kg asetaminofen verilen) karaciğer dokusu. Piknotik çekirdekli hücreler (ince oklar), hepatosit dejenerasyonları (kalın oklar) ve sinüzoid dilatasyonu (S) (Hematoksilen-Eozin, x40).



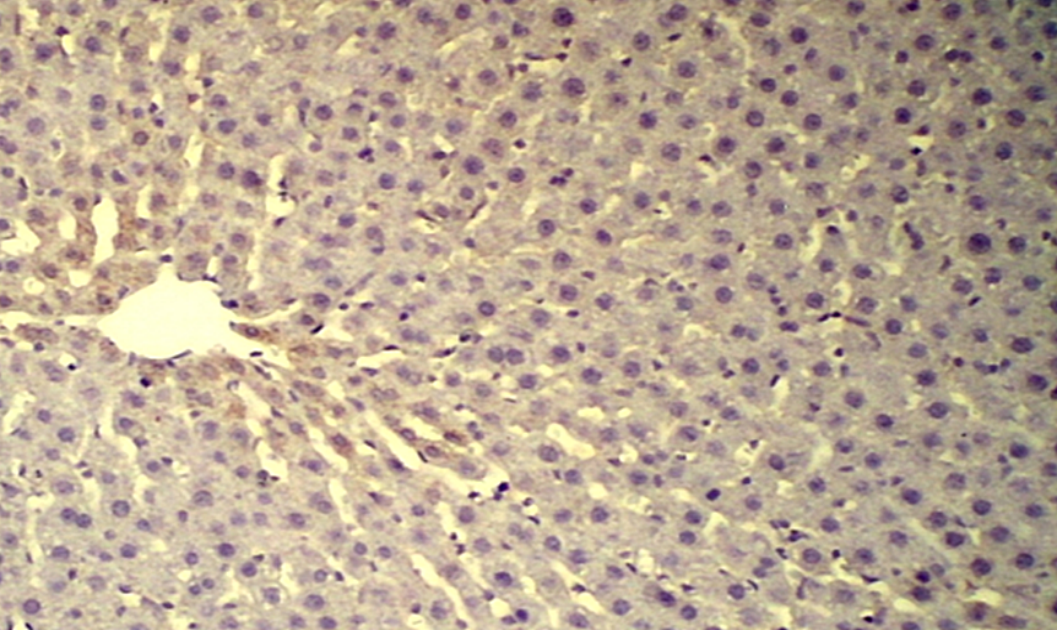
Resim 7: Grup-VII'ye ait (500 mg/kg asetaminofen verilen) karaciğer doku kesiti. Sinüzoidal genişleme (yıldız), granüler ve vakuoler hepatosit dejenerasyonları (ince oklar) ve nekroza giden hiperkromatik / piknotik çekirdekli hücreler (kalın oklar) görülmektedir (Hematoksilen – Eozin, x40).

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

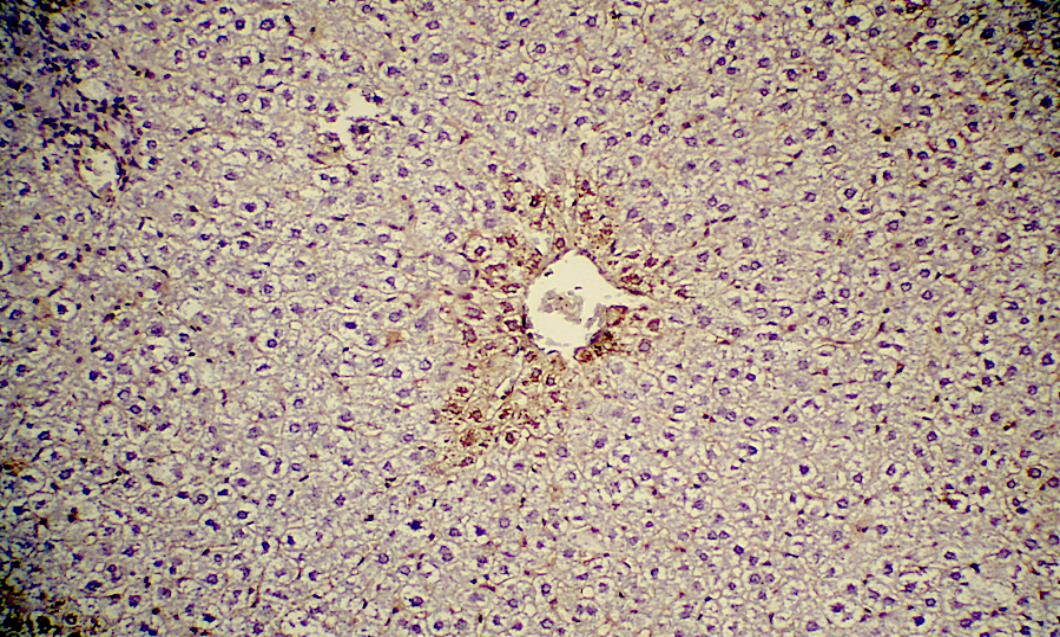
Kontrol grubundaki (Grup-I) hayvanlara ait karaciğer dokularının sentrilobüler sahalarında iNOS reseptörlerinin çok hafif şekilde boyandıkları (Resim 8), diğer yandan 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarında asetaminofen enjekte edilen ve Grup-II, Grup-III ve Grup-IV'te yer alan sıçan karaciğerlerine ait kesit örneklerinde ise, iNOS reseptörlerinin sentrilobüler bölgelerde ve parankim sahalarında yer alan hepatosit hücrelerinde az miktarda, fakat kontrol grubuna göre daha belirgin oranda boyandıkları gözlemlendi (Resim 9-11). Buna karşılık olarak 100, 200 ve 500 mg/kg dozlarında asetaminofen enjekte edilen ve Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII'de yer alan sıçanlara ait karaciğer doku kesitlerindeki iNOS reseptörlerinin daha yoğun ve kuvvetli şekilde boyandıkları, özellikle 500 mg/kg asetaminofen enjeksiyonu yapılan gruptaki parankim dokusunun daha belirgin ve yaygın şekilde boya tuttuğu tespit edildi (Resim 12-14) (Tablo 4). Boyanma şiddeti yönünden, kontrol grubuyla düşük doz asetaminofen verilen gruplar arasında ($p < 0,05$) ve aynı zamanda, düşük doz gruplarıyla yüksek dozda ilaç verilen gruplar arasında istatistik açıdan anlamlı farklılık vardı ($p < 0,05$).

Tablo 4: Gruplara göre ortalama iNOS reseptör boyanma dereceleri.

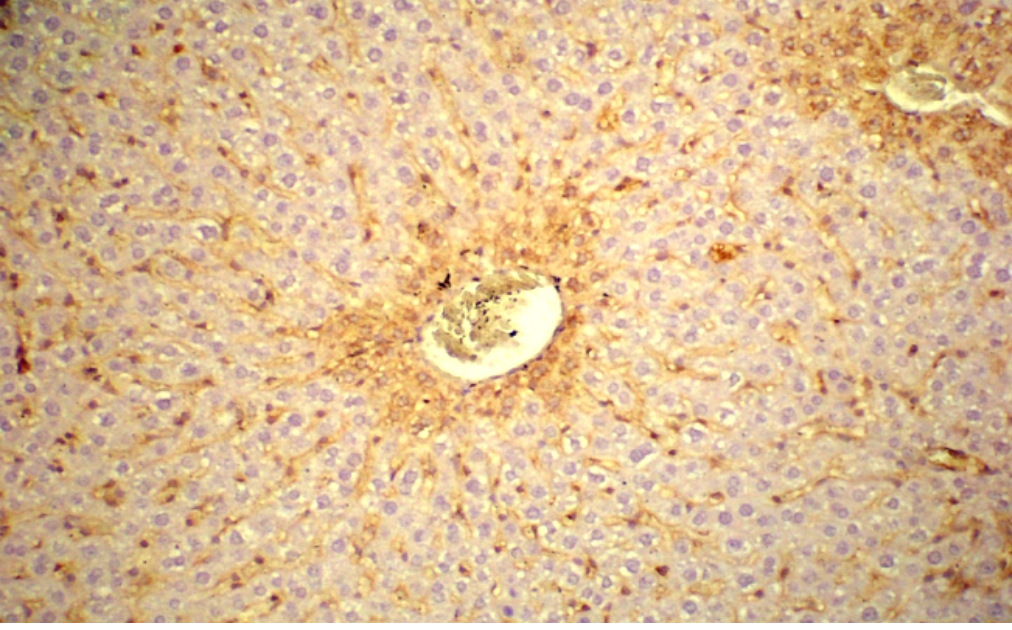
	Kontrol	Grup-II	Grup-III	Grup-IV	Grup-V	Grup-VI	Grup-VII
Boyanma Derecesi	-/+	+	+	+	++	+++	+++



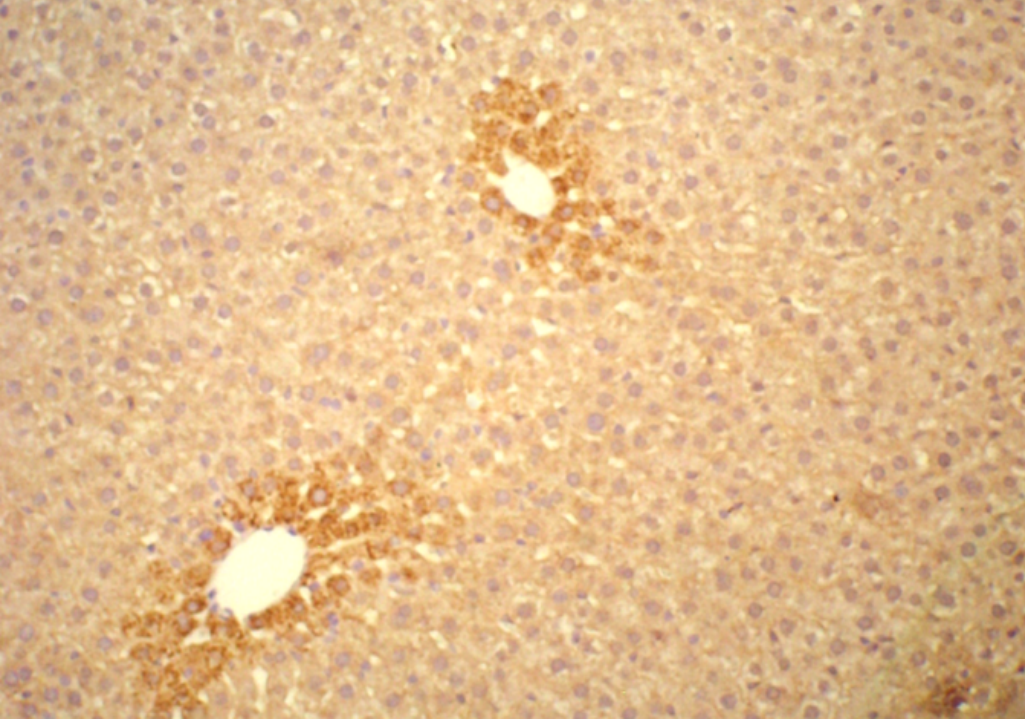
Resim 8: Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu (iNOS immün boyama, x20).



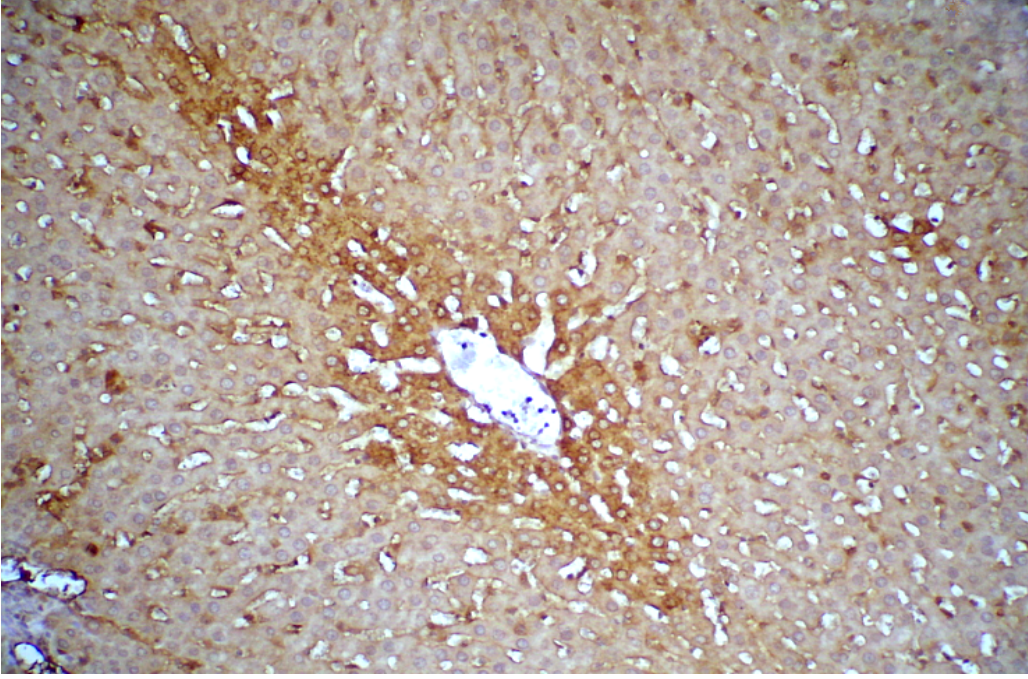
Resim 9: Grup-II'de yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu (iNOS immün boyama, x20).



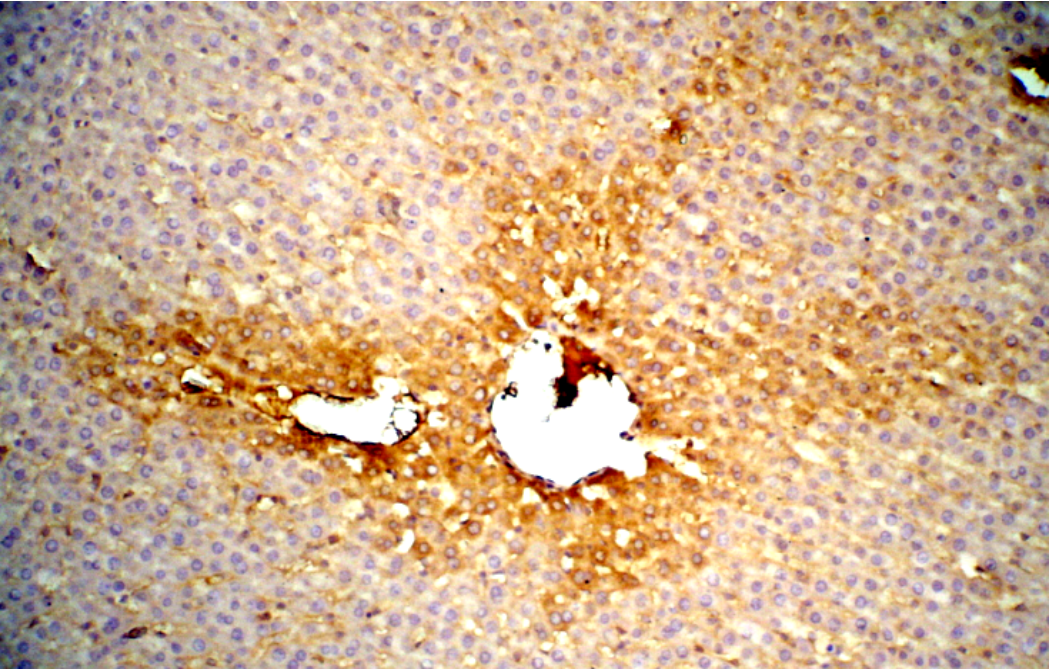
Resim 10: Grup-III'te yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu (iNOS immün boyama, x20).



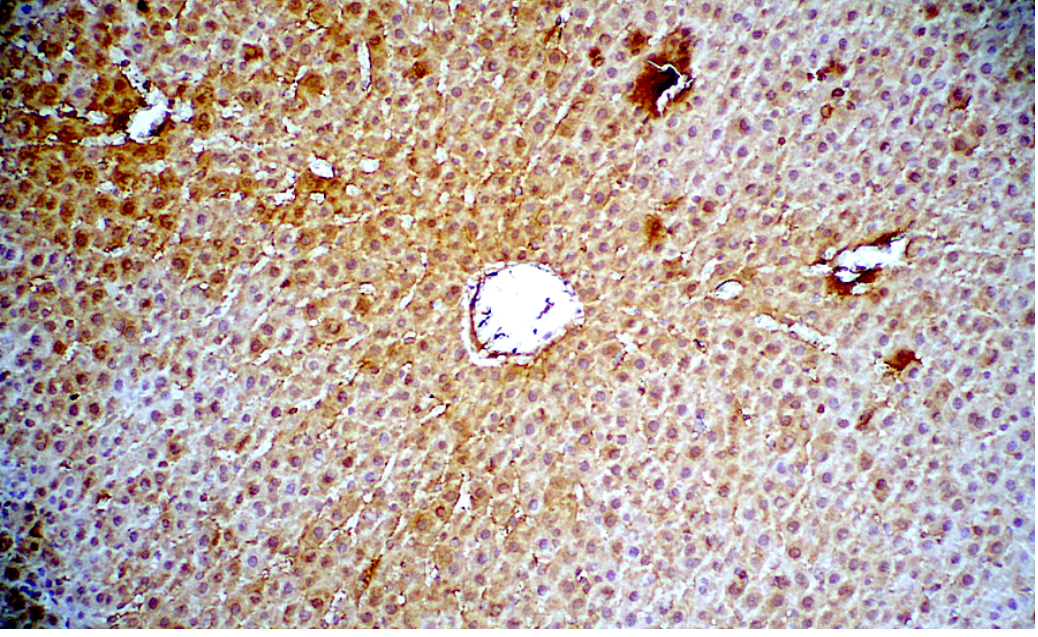
Resim 11: Grup-IV'te yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu (iNOS immün boyama, x20).



Resim 12: Grup-V'te yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu (iNOS immün boyama, x20).



Resim 13: Grup-VI'da yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu (iNOS immün boyama, x20).



Resim 14: Grup-VII'de yer alan sıçanlara ait karaciğer dokusu (iNOS immün boyama, x20).

4.3. Biyokimyasal Bulgular

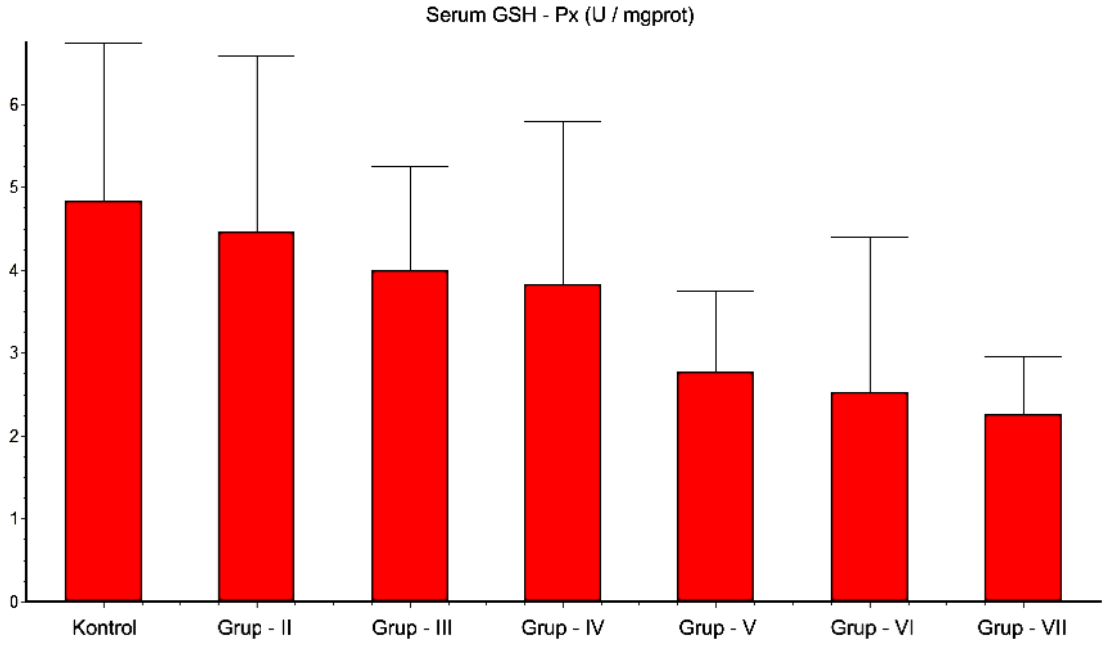
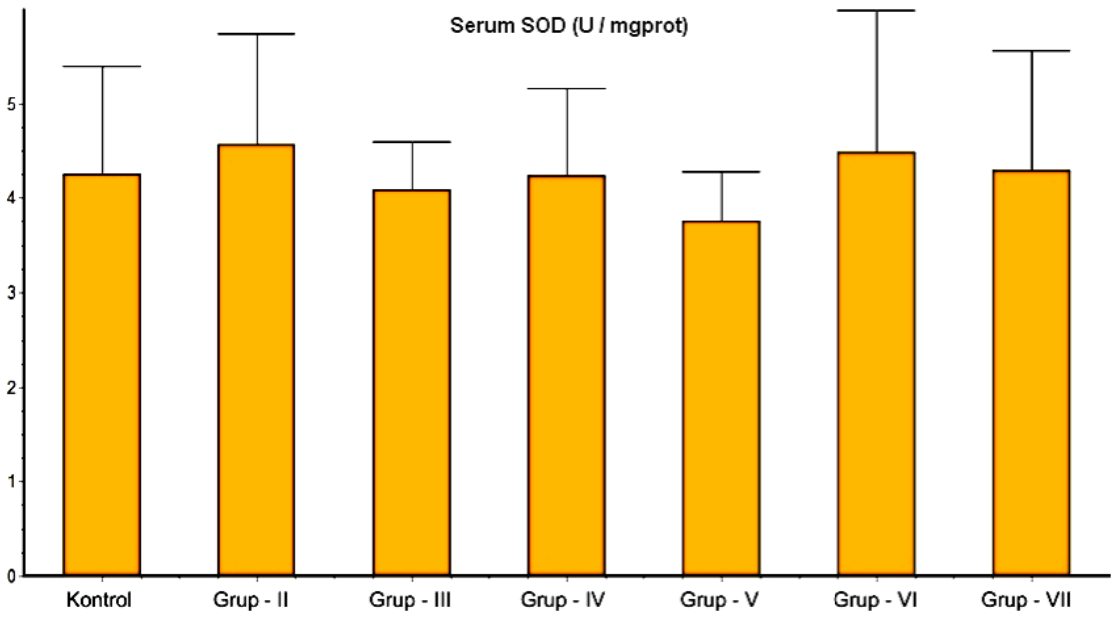
Kontrol ve çalışma gruplarında yer alan sıçanlara ait serum SOD, GSH-Px ve NO değerleri ve karaciğer doku homojenatlarından ölçülen malondialdehit (MDA) seviyelerinin ortalama \pm standart sapma değerleri, Tablo 5'te verilmiştir. Düşük dozlarda (5, 10 ve 20 mg/kg) asetaminofen uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda lipid peroksidasyon (TBARS=MDA) seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, arada anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$). Yüksek dozlarda (100, 200 ve 500 mg/kg) ilaç uygulaması yapılan ve Grup-V, Grup - VI ve Grup-VII'de yer alan sıçanların doku MDA seviyelerinde, kontrol grubuna ve düşük dozlarda uygulama yapılan gruplara göre oldukça hafif bir artışın olduğu fakat, bu artışın da istatistik açıdan anlamlı olmadığı görüldü ($p > 0,05$) (Tablo 3 ve Grafik 1).

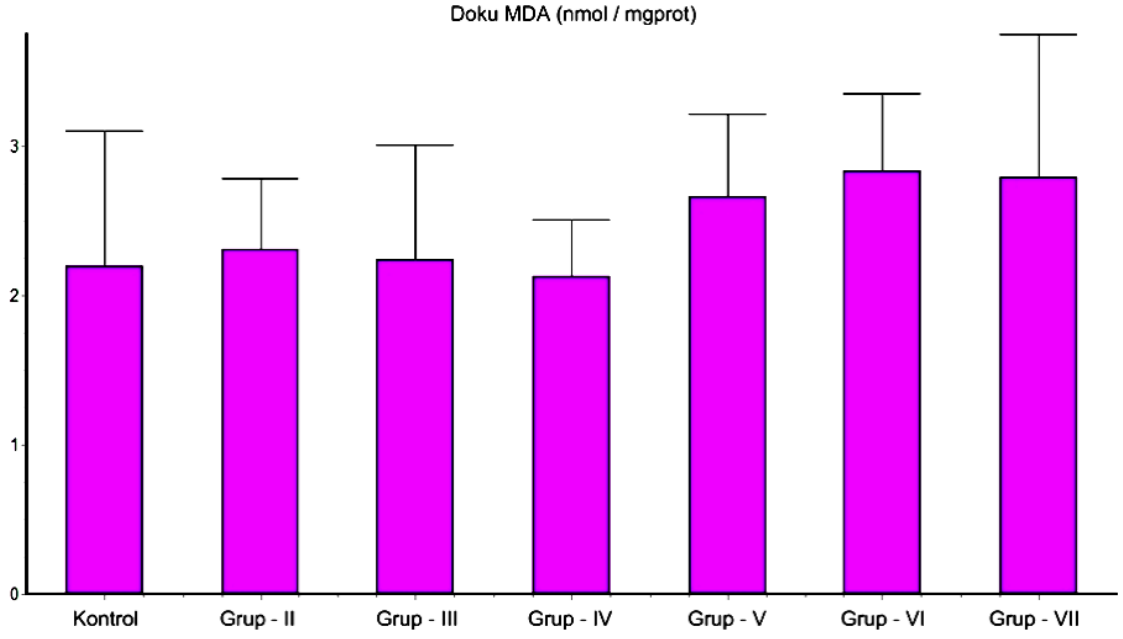
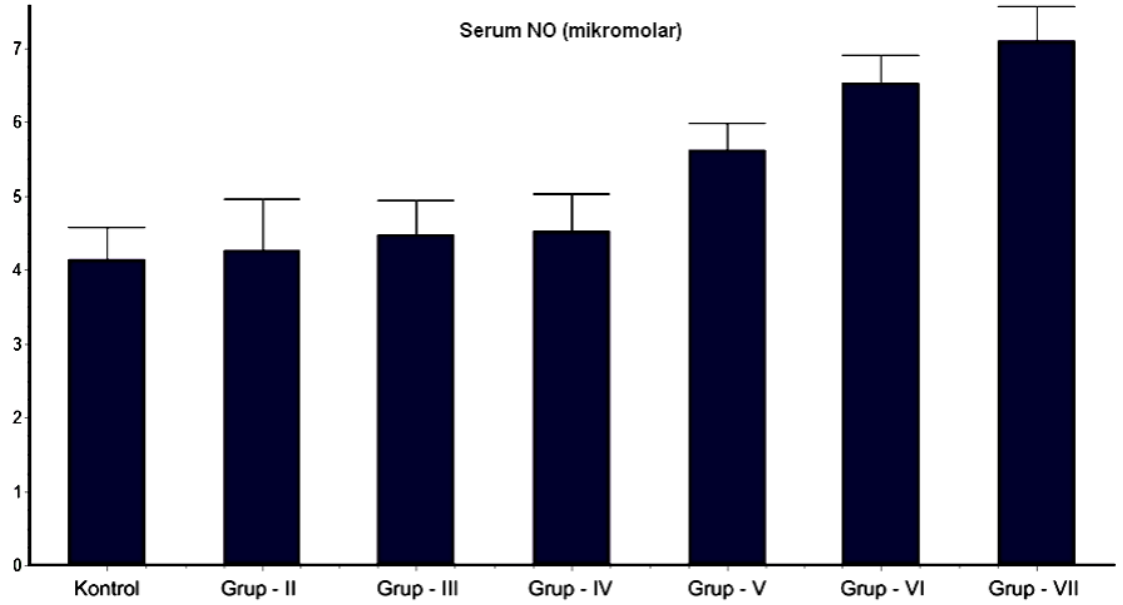
Serum SOD etkinlik değerleri yönünden, çalışma gruplarıyla kontrol grubu arasında bir farklılık yoktu ($p > 0,05$) (Tablo 5 ve Grafik 2). Serum GSH-Px enzim etkinlik seviyeleri ölçüldüğünde ise, bu etkinliğin kontrol grubuna göre diğer çalışma gruplarında giderek azaldığı görüldü ve kontrol grubu ile Grup-VI (200 mg/kg) ve Grup-VII (500 mg/kg) arasında istatistik açıdan anlamlı bir farkın olduğu bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 5 ve Grafik 3).

Düşük dozlarda asetaminofen verilen grupların (Grup-II, Grup-III ve Grup-IV) serum NO seviyelerinde hafif bir artış olduğu görüldü fakat, bu artış kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistik açıdan anlamlı değildi ($p > 0,05$). Öte yandan, daha yüksek dozlarda uygulama yapılan Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII'deki ortalama serum NO seviyelerinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Tablo 5 ve Grafik 4).

Tablo 5: Karaciğer dokusundan ölçülen MDA ve serum SOD, GSH-Px ve NO seviyeleri (* İşareti: Kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmada, arada istatistik açıdan anlamlı farklılık bulunan gruplar. P < 0,05).

Gruplar	SOD	MDA	Gsh-Px	NO
Kontrol	4,25 ± 1,14	2,20 ± 0,90	4,83 ± 1,90	4.13 ± 0.43
Grup-II	4,56 ± 1,17	2,31 ± 0,47	4,45 ± 2,13	4.26 ± 0.69
Grup-III	4,09 ± 0,50	2,24 ± 0,77	3,99 ± 1,25	4.47 ± 0.46
Grup-IV	4,23 ± 0,92	2,13 ± 0,38	3,92 ± 1,63	4.53 ± 0.50
Grup-V	3,75 ± 0,52	2,66 ± 0,54	2,60 ± 1,12*	5.63 ± 0.36*
Grup-VI	4,48 ± 1,50	2,83 ± 0,52	2,52 ± 1,87*	6.57 ± 0.38*
Grup-VII	4,28 ± 1,26	2,79 ± 0,95	2,26 ± 0,69*	7.11 ± 0.46*

Grafik 1. Ortalama serum glutatyon peroksidaz seviyeleri**Grafik 2.** Ortalama serum süperoksit dismutaz seviyeleri

Grafik 3. Ortalama karaciğer dokusu malondialdehit seviyeleri**Grafik 4.** Ortalama serum nitrik oksit seviyeleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Asetaminofen kaynaklı karaciğer toksisitesi, günümüzde akut karaciğer yetmezliğinin önde gelen sebeplerinden birini oluşturmaktadır. Bu ajanın biyolojik olarak etkinleşmesi ve sitokrom P-450 sisteminde metabolize edilmesi, reaktif bir metabolit olan N-asetil-p-benzokinoniminin (NAPQI) adlı bir bileşenin açığa çıkmasına yol açmakta, fazla miktarda NAPQI üretimi ise karaciğerdeki glutatyon depolarında azalmayla sonuçlanmaktadır (143-145). Glutatyonun azalması, proteinlerin arilasyonu ve kovalent bağlanma olayları, asetaminofen toksisitesine öncülük eden önemli olaylardır ve karaciğerdeki hücre hasarlanması için gerekli olabilirler fakat, bunlar tek başlarına bu tür bir hasarlanmanın ortaya çıkması için yeterli değildir. Çünkü, bazı antioksidanlar glutatyondaki azalmayı veya kovalent bağlanmayı belirgin şekilde etkilemeksizin karaciğeri hasarlanmaya karşı koruyucu etki sağlayabilir (146-148).

Nitrik oksidin, bahsedilen toksisite mekanizmasında yer aldığı öne sürülmektedir. Asetaminofen uygulaması sonrasında, uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enziminin etkinliğinde ve serum nitrik oksit seviyelerinde artış meydana geldiği gözlenmiştir (149,150). Ayrıca, iNOS'u seçici olarak engelleyen aminoguanidin gibi ajanların, karaciğerde asetaminofene bağlı olarak ortaya çıkan etkilerde azalmaya yol açtığı da bildirilmiştir (151). Daha önce yapılan bazı immünohistokimya çalışmalarında, hepatositlerde iNOS ekspresyonunun (ifadesinin) olduğu ve bu hücrelerin iNOS için birer kaynak teşkil ettikleri gösterilmiştir. Aynı zamanda, izole edilerek kültür ortamına alınan hepatositlerde NO üretiminin olduğu ve glutatyon gibi dışarıdan kültür ortamına eklenen bazı maddelerle nitrik oksit sentezinde artış olduğu bildirilmiştir (152). Çalışmamızda, değişik dozlardaki asetaminofen uygulaması sonrasında karaciğerdeki iNOS reseptör dağılımının biyokimyasal parametrelerle ve lipid peroksidasyonu ile olan bağlantısını incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz asetaminofen dozlarıyla karaciğer dokusunda meydana gelen değişiklikler arasındaki bağlantıya ilişkin olarak yapmış olduğumuz literatür araştırmamızda, düşük dozlarda (5, 10 ve 20 mg/kg) periton içi yoldan verilen asetaminofenin karaciğer üzerine olan etkilerini doğrudan veya dolaylı yollardan incelemeyi amaçlayan herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Yapmış olduğumuz çalışmada, bu doz seviyelerinde verilen asetaminofenin karaciğer üzerinde herhangi bir akut toksik etkiye veya yapısal değişikliğe yol açmadığını gözlemledik. Daha yüksek doz seviyeleri olan 100 ve 200 mg/kg asetaminofenin periton içi yoldan enjeksiyonu söz konusu olduğunda da, bu dozlara ilişkin herhangi bir çalışma bulunamadı. Bununla birlikte, asetaminofenin 250, 300, 350, 400, 500, 600, 800 ve 1000 mg/kg doz seviyelerindeki uygulamalarına ilişkin çalışmalar mevcuttur (153-155). Mesela, Terneus ve arkadaşları 300 mg/kg dozunda periton içi yoldan enjekte edilen asetaminofenin karaciğer dokusu üzerinde sentrilobüler sahalarda nekroz ve serum enzim seviyelerinde yükselme gibi akut toksisite etkilerinin olduğunu rapor etmişlerdir (156). Iwalokun ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş oldukları bir diğer çalışmada, yedi gün boyunca 300 mg/gün dozunda uygulanan asetaminofenin kan bilirubin, karaciğer enzimleri, TBARS ve demir seviyelerini belirgin şekilde artırdığı bildirilmiştir (157).

Yine, Macrides ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş oldukları bir diğer çalışmada, periton içi yoldan 250 ve 500 mg/kg dozlarında verilen asetaminofenin karaciğerde akut toksik etkiye yol açtığı ve bunun ardından 250 mg/kg dozunda uygulanan N-asetil sisteinin (NAC), karaciğerdeki akut yapısal ve enzimatik değişiklikleri geriye çevirebildiği ve dolayısıyla koruyucu etkisinin olduğu rapor edilmiştir (158). Kanno ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada 400, 600 ve 800 mg/kg dozlarında periton içi enjeksiyon yoluyla uygulanan asetaminofenin karaciğerde akut toksik etkilere yol açtığını rapor etmişlerdir (159).

Biz de, yapmış olduğumuz çalışmada yukarıda adı geçen çalışmalardan elde edilen sonuçlara paralel olarak 100, 200 ve 500 mg/kg dozlarında uyguladığımız asetaminofenin karaciğer dokusunda hepatosit dejenerasyonu, piknotik ve

nekroza giden hücreler ve sinüzoidlerde genişleme gibi akut yapısal değişikliklere yol açtığını gözledik. Gerçekleştirmiş olduğumuz literatür taramasında, çalışmamızda kullanmış olduğumuz doz seviyelerinde (5, 10, 20, 100, 200 ve 500 mg/kg) periton içi yoldan uygulanan asetaminofenin karaciğerdeki iNOS reseptörleri üzerine olan etkilerini immünohistokimyasal yönden karşılaştırmalı olarak veya her bir dozu ayrı ayrı inceleyen bir çalışmaya rastlamadık. Bu sahada yapılan benzeri bir çalışmada, Gardner ve arkadaşları 1 g/kg parasetamol enjekte edilen sıçanların karaciğer dokusundaki iNOS reseptörlerinde kontrol grubuna göre belirgin bir artışın olduğunu tespit etmişlerdir (151).

Yapmış olduğumuz çalışmada, düşük dozlarda (5, 10 ve 20 mg/kg) ilaç uygulaması yapılan sıçanların karaciğer dokularındaki iNOS reseptörlerinin immünohistokimyasal yöntemle boyanması sonucu ortaya çıkan dağılımın hafif olduğunu tespit ettik. Bunun yanında, daha yüksek dozlarda (100, 200 ve 500 mg/kg) asetaminofen uygulaması yapılan ve Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII'de yer alan sıçanların karaciğer dokusundaki iNOS reseptör yoğunluklarında ise istatistik açıdan belirgin bir artışın meydana geldiğini bulduk.

Oksidatif hasarlanmanın, asetaminofen toksisitesi için katkı sağlayıcı bir mekanizma olduğu düşünülmüştür (148,160). Asetaminofen, kovalent bağ oluşturmanın yanı sıra protein sülfidril gruplarının oksidasyonuna da yol açabilir (161,162). Yaptığımız literatür araştırmasında 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarında asetaminofen enjeksiyonu sonrasında SOD veya GSH-Px seviyelerindeki değişime ilişkin olarak halihazırda herhangi bir bilgi bulamadık. Yapmış olduğumuz çalışmada 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarında uygulanan enjeksiyonlar sonrasında Grup-II, III ve IV ile kontrol grubu arasında, bu enzimlerin etkinlik seviyeleri yönüyle istatistik açıdan herhangi bir farklılık olmadığını bulduk. Loes ve arkadaşları, 375 mg/kg dozundaki asetaminofen uygulaması sonrasında SOD'un etkinliğinde herhangi bir değişikliğin olmadığını, buna karşılık olarak GSH-Px enziminin etkinliğinde % 40-53'lük bir azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir (162).

Yine, Hinson ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada 100 mg/kg ve 500 mg/kg'lık parasetamol enjeksiyonları sonrasında glutasyon seviyelerinde sırasıyla yaklaşık % 30 ve % 65'lik bir azalmanın olduğu rapor edilmiştir (164).

Öte yandan, Mirochnitchenko ve arkadaşlarının antioksidan enzimleri fazla oranlarda üreten transgenik hayvanlar üzerinde yapmış oldukları bir araştırmada, SOD ve GSH-Px enzimlerini aşırı şekilde üreten hayvanların asetaminofen toksisitesine karşı oldukça belirgin bir direnç gösterdikleri ifade edilmiştir (165). Adamson ve Harman, glutasyon peroksidaz enzim sistemini engelleyen 1,3-Bis-(kloroetil)-1-nitrozüre (BCNU) ve altın tiyoglukoz (GTG) gibi maddelerin karaciğer hücre kültürlerine eklenmesinin, kültür ortamındaki hücreleri parasetamolün toksik etkilerine karşı daha açık ve dayanıksız hale getirdiğini tespit etmişlerdir (166). Mevcut çalışmamızda 100, 200 ve 500 mg/kg asetaminofen enjeksiyonu yapılan ve Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII'de yer alan sıçanların serum glutasyon peroksidaz seviyelerinde, kontrol grubuna ve düşük dozda uygulama yapılan diğer gruplara göre istatistik açıdan anlamlı bir azalmanın olduğunu tespit ettik. Buna karşılık, söz konusu gruplardaki SOD enzim etkinlik seviyelerini kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda, anlamlı herhangi bir değişiklik gözlemedik.

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, asetaminofen uyarımlı oksidatif stresin lipid peroksidasyonuna yol açtığı öne sürülmüştür (167-169). Bu bağlamda, Şener ve arkadaşları 900 mg/kg dozundaki asetaminofen uygulaması sonrasında glutasyon seviyelerinde azalmanın yanı sıra, MDA seviyelerinde artış meydana geldiğini rapor etmişlerdir (170). Diğer yandan, akut asetaminofen toksisitesinde lipid peroksidasyonunun tartışmalı bir konu olduğu (171-173) ve izole karaciğer hücre kültürlerinin asetaminofenle inkübasyonu sonrasında lipid peroksidasyonunun gözlenmediği bildirilmiştir (174). Hatta, asetaminofenin lipid peroksidasyonunu önlediğine ilişkin bazı çalışmalar da mevcuttur (175).

Yapmış olduğumuz çalışmada, sıçanların karaciğer dokularından ölçülen MDA seviyelerinde doza bağımlı olarak çok hafif bir artışın olduğunu, fakat gruplar arasında bu yönden herhangi bir farklılık olmadığını bulduk. Benzer şekilde, Knight ve arkadaşları 300 mg/kg dozundaki asetaminofenin karaciğer dokusundaki MDA seviyelerinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığını rapor etmişlerdir (172). Yine Powell ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise, asetaminofenin verilmesi sonrasında MDA aracılığıyla ölçülen lipid peroksidasyonunun meydana gelmediği bildirilmiştir (176).

Yapılan biyokimyasal çalışmalar, NO'nun lipid peroksidasyon mekanizmasında yer alan reaksiyonların ilerleyişini önleyebileceğini göstermiştir (177). Elde edilen bu bulgu, NO üretimini uyarıcı V-PYRRO/NO ve interlökin-1 gibi bazı maddelerin asetaminofen maruziyetine paralel olarak kullanılmasının lipid peroksidasyonunda önemli azalmalara yol açtığını rapor eden çalışmalarla da desteklenmektedir (178,179). Asetaminofen uygulaması sonrasında NO üretiminin arttığı ve iNOS yönünden eksikliği olan (knockout) farelerde NO üretiminin artmadığı, ayrıca bu tür farelerde lipid peroksidasyonunun görüldüğü rapor edilmiştir (180,181). Taylor ve arkadaşları, özgün olmayan NOS engelleyicisi ajanların kemirgen endotoksemi modelinde karaciğer hasarlanmasını belirgin bir şekilde artırdığını ve NO'nun platelet adezyonunu önlemesinin yanı sıra, toksik oksijen radikallerini nötralize edici etkisinin olduğunu da bildirmişlerdir (182). Yine, 300 mg/kg asetaminofen uygulaması sonrasında serum nitrik oksit seviyelerinde belirgin bir artışın olduğu rapor edilmiştir (183).

Literatür araştırmasında, serum NO seviyelerini çalışmamızda kullandığımız dozlardaki ilaç uygulamalarını kapsayacak şekilde karşılaştıran veya bu dozların tek tek ele alındığı bir araştırmaya rastlamadık. Biz, yapmış olduğumuz çalışmada düşük dozlarda asetaminofen verilen Grup-II, Grup-III ve Grup-IV'te yer alan sıçanların serum NO seviyelerinde kontrol grubuyla karşılaştırıldıkları zaman belirgin bir artışın olmadığını, Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII'de yer alan sıçanların serum nitrik oksit seviyelerindeyse, kontrol grubuna ve düşük dozda ilaç alan gruplara göre anlamlı bir artışın olduğunu bulduk.

Asetaminofen, geçmişte olduğu gibi günümüzde de yaygın şekilde kullanılmaya devam eden, ateş düşürücü ve ağrı kesici özelliklere sahip önemli bir ajandır. NO ise, üzerinde geniş çaplı araştırmaların halen devam ettiği ve bazı yönleri keşfedilmeyi bekleyen bir bileşen olmayı sürdürmektedir. Bu çalışmanın sonucu olarak, asetaminofenin karaciğer üzerinde doza bağlı olarak yol açtığı yapısal değişikliklere ve glutatyon üzerindeki azaltıcı etkisine ek olarak karaciğer dokusunda uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) etkinliğini artırdığını, artan iNOS etkinliğinin, bir yandan NO retiminde artış sağlama yoluyla lipit peroksidasyonu reaksiyonlarını önemli lde engellerken, diğer yandan doz artımına paralel olarak zararlı etki gösterebileceği sonucuna ulaştıık.

ÖZET

Amaç: Asetaminofen, yaygın olarak kullanılan ağrı kesici ve ateş düşürücü bir ilaçtır. Asetaminofenin günlük tavsiye edilen doz sınırının üzerinde kullanılmasının, karaciğer üzerinde akut yetmezliğe kadar varan çeşitli olumsuz etkileri vardır. Yapılan bazı çalışmalarda, karaciğer parankiminde üretilen bazı metabolitlerin de bu sürece katkı sağladığı bildirilmiştir. Nitrik oksit (NO), yangısal medyatörlere karşı sentezlenen oldukça reaktif bir maddedir. Bu çalışmada, değişik dozlarda uygulanan asetaminofenin karaciğer üzerindeki muhtemel yapısal etkilerinin iNOS enzimi, NO ve diğer biyokimyasal parametrelerle olan bağlantısını incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, toplam 70 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar, periton içi yoldan enjekte edilen asetaminofen dozuna göre yedi eşit gruba ayrıldı: Grup-I (Kontrol, n=10), Grup-II (5 mg/kg, n=10), Grup-III (10 mg/kg, n=10), Grup-IV (20 mg/kg, n=10), Grup-V (100 mg/kg, n=10), Grup-VI (200 mg/kg, n=10) ve Grup VII (500 mg/kg, n=10). Periton içi enjeksiyondan 24 saat sonra, hayvanlar anestezi altında açıldı. Karaciğer doku ve kan örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri yapı ve lipit peroksidasyonu yönünden, kan örnekleri ise serum NO, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) seviyeleri bakımından incelendi.

Bulgular: Grup-II, Grup-III ve Grup-IV'ten elde edilen veriler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, arada yapısal veya biyokimyasal yönlerden herhangi bir farklılığın olmadığı görüldü ($p > 0,05$). Diğer yandan, Grup-V, Grup-VI ve Grup-VII ile kontrol grubu arasında, karaciğerdeki yapısal değişiklikler, iNOS enzimine ait reseptör dağılımı ve serum NO seviyeleri yönünden anlamlı bir farklılık vardı ($p < 0,05$).

Sonuç: Elde edilen bulgular, NO'nun asetaminofenin karaciğer üzerindeki etkilerine paralel olarak artmasının lipit peroksidasyonunu engellemesinin yanı sıra, farklı mekanizmalar üzerinden doku hasarlanmasında da rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Asetaminofen, karaciğer, nitrik oksit, iNOS.

SUMMARY

Objective: Acetaminophen is a widely used analgesic and antipyretic drug. Excessive administration of acetaminophen above the limits of daily recommended dose range have some negative effects on liver that may even progress to acute failure. In some studies, it has been reported that some metabolites produced in liver parenchyme contribute to this process. Nitric oxide (NO) is a highly reactive substance which is synthesized in response to inflammatory mediators. In this study, we aimed to investigate the relationship between the possible structural effects of acetaminophen at different doses on liver with iNOS enzyme, NO and other biochemical parameters.

Materials and Methods: A total of 70 male Wistar albino rats were included in this study. Animals were equally divided to seven groups according to the injected acetaminophen dose as follows: Group-I (Controls, n=10), Group-II (5 mg/kg, n=10), Group-III (10 mg/kg, n=10), Group-IV (20 mg/kg, n=10), Group-V (100 mg/kg, n=10), Group-VI (200 mg/kg, n=10) ve Group VII (500 mg/kg, n=10). After 24 hours from intraperitoneal injection, animals were sacrificed under anesthesia. Liver tissue and blood samples were collected. Tissues have undergone analysis with structure and lipid peroxidation aspects, whereas blood samples were analyzed by means of serum NO, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px).

Results: When Group-II, III and IV were compared with the controls, there was no difference by means of structural and biochemical aspects ($p > 0,05$). Whereas, there was a significant difference between Group-V, VI, VII and the controls by means of hepatic structural changes, iNOS receptor distribution and serum NO levels ($p > 0,05$)

Conclusion: Current evidence suggest that increase in NO in parallel to the effects of acetaminophen on liver may play a role in tissue damage via different mechanisms, beside its preventive effect on lipid peroxidation.

Keywords: Acetaminophen, liver, nitric oxide, iNOS

KAYNAKLAR

1. Eren M, Saltık-Temizel İN, Koçak N. İlaça bağlı hepatotoksisite. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2004; 47: 222-27.
2. Bonkovsky HL, Kane RE, Jones DP, Galinsky RE, Banner B. Acute hepatic and renal toxicity from low doses of acetaminophen in the absence of alcohol abuse or malnutrition: evidence for increased susceptibility to drug toxicity due to cardiopulmonary and renal insufficiency. *Hepatology* 1994; 19: 1141-48.
3. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, Reisch JS, Schiødt FV, Ostapowicz G, Shakil AO, Lee WM. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* 2005; 42(6):1364-72.
4. Gallanosa AG, Spyker DA. Sulindac hepatotoxicity: a case report and review. *J Toxicol Clin Toxicol* 1995; 23: 205-38.
5. Davidson DGD, Eastham WN. Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *Br Med J* 1966; 2: 497-99.
6. Black M. Acetaminophen Hepatotoxicity. *Ann Rev Med* 1984; 35: 577-93.
7. Zimmerman HJ. Classification of hepatotoxins and mechanisms of toxicity. In hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver. *New York: Appleton-Century-Crofts* 1978; 91-121.
8. Gibson JD, Pumford NR, Samokyszyn VM and Hinson JA. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 580-85.
9. Brent JA, Rumack BH. Role of free radicals in toxic hepatic injury. II. Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury ? *J Toxicol Clin Toxicol* 1993; 31(1): 173-96.
10. Adamson GM, Harman AW. Oxidative stress in cultured hepatocytes exposed to acetaminophen. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2289-94.
11. Liu J, Liu Y, Hartley D, Klaassen CD, Shehin-Johnson SE, Lucas A, Cohen SD. Metallothionein-I/II knockout mice are sensitive to acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289(1): 580-6.
12. Moore M, Thor H, Moore G, Nelson S, Moldeus P and Orrenius S. The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca²⁺. *J Biol Chem* 1985; 260(24): 13035-40.
13. Salas VM, Corcoran GB. Calcium-dependent DNA damage and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-independent glycogen phosphorylase activation in an in vitro model of acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 1997; 25(6): 1432-8.
14. Blazka ME, Germolec DR, Simeonova P, Bruccoleri A, Pennypacker KR, Luster MI. Acetaminophen-induced hepatotoxicity is associated with early changes in NF-κB and NF-IL6 DNA binding activity. *J Inflamm* 1995-1996; 47(3): 138-50.
15. Blazka ME, Bruccoleri A, Simeonova PP, Germolec DR, Pennypacker KR, Luster MI. Acetaminophen-induced hepatotoxicity is associated with early changes in AP-1 DNA binding activity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996; 92(3): 259-73.

16. Boulares AH, Giardina C, Inan MS, Khairallah EA, Cohen SD. Acetaminophen inhibits NF-kappaB activation by interfering with the oxidant signal in murine Hepa 1-6 cells. *Toxicol Sci* 2000; 55(2): 370-5.
17. Blazka ME, Wilmer JL, Holladay SD, Wilson RE, Luster MI. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 133(1): 43-52.
18. Laskin DL, Pilaro AM, Ji S. Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. II. Mechanism of macrophage accumulation and activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 86(2): 216-26.
19. Laskin DL, Gardner CR, Price VF, Jollow DJ. Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. *Hepatology* 1995; 21(4): 1045-50.
20. Ray SD, Jena N. A hepatotoxic dose of acetaminophen modulates expression of BCL-2, BCL-X(L), and BCL-X(S) during apoptotic and necrotic death of mouse liver cells in vivo. *Arch Toxicol* 2000; 73(10-11): 594-606.
21. Goldfrank R. Toxicologic Emergencies: Chapter-15. 4th International Edition. *East Norwalk: Appleton and Lange* 1990; 183-85, 251-57.
22. Goodman LS, Gilman A. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Eight Edition. *New York: Permagon Press* 1991; (1): 656-59.
23. Prescott LF. Effect of non-narcotic analgesics on the liver. University Department of Clinical Pharmacology. *Edinburg: The Royal Infirmary* 1986; 138-42.
24. Wallace JL. Acetaminophen hepatotoxicity: NO to the rescue. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 1-2.
25. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
26. Laskin DL, Rodriguez del Valle M, Heck DE, Hwang S-M, Ohnishi ST, Durham SK, Goller NL, et al. Hepatic nitric oxide production following acute endotoxemia in rats is mediated by increased nitric oxide synthase gene expression. *Hepatology* 1995; 22: 223-34.
27. Laskin DL, Heck DE, Gardner CR, Feder LS, Laskin JD. Distinct patterns of nitric oxide production in hepatic macrophages and endothelial cells following acute exposure of rats to endotoxin. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 751-58.
28. Feder LS, Laskin DL. Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide production by GM-CSF M-CSF and IL-1 beta following acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 507-13.
29. Helyar L, Bundschuh DS, Laskin JD, Laskin DL. Induction of hepatic Ito cell nitric oxide production after acute endotoxemia. *Hepatology* 1994; 20: 1509-15.
30. Nussler AK, Geller DA, Sweetland MA, DiSilvio M, Billiar TR, Madariaga JB, Simmons RL, et al. Induction of nitric oxide synthesis and its reactions in cultured human and rat hepatocytes stimulated with cytokines plus LPS. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 826-35.
31. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Hofmann K, Simmons RL. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med* 1989; 170: 1769-74.

32. Gardner CR, Heck DE, Feder LS, Mc Closkey TW, Laskin JD, Laskin DL. Differential regulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate production by hepatic macrophages and endothelial cells. In: Jesaitus A, Dratz E, eds. The molecular basis of oxidative damage by leukocytes. *Boca Raton, Florida: CRC Press* 1992: 267-72.
33. Thiemermann C, Ruetten H, Wu C-C, Vane JR. The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2845-51.
34. Decker KF, Obolenskaya MY. Cytokines, nitric oxide synthesis and liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 12-17.
35. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 737-69.
36. Chamulitrat W, Blazka ME, Jordan SJ, Luster MI, Mason RR. Tumor necrosis factor- α and nitric oxide production in endotoxin-primed rats administered carbon tetrachloride. *Life Sci* 1995; 24: 2273-80.
37. Wang JF, Greenberg SS, Spitzer JJ. Chronic alcohol administration stimulates nitric oxide formation in the rat liver with and without pretreatment by lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 387-93.
38. Hodgson PD, Renton KW. The role of nitric oxide generation in interferon-evoked cytochrome P450 down-regulation. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17: 995-1000.
39. Muller CM, Scierka A, Stiller RL, Kim Y-M, Cook DR, Lancaster JR, Buffington CW. Nitric oxide mediates hepatic cytochrome P450 dysfunction induced by endotoxin. *Anesthesiology* 1996; 84: 35-42.
40. Stadler J, Trockfeld J, Schmalix WA, Brill T, Siewert JR, Greim H, Doehmer J. Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 3559-63.
41. Gergel D, Misik V, Riesz P, Cederbaum AI. Inhibition of rat and human cytochrome P4502E1 catalytic activity and reactive oxygen radical formation by nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1997; 337: 239-50.
42. Nussler AK, Beger H-G, Liu ZZ, Billiar TR. Nitric oxide, hepatocytes and inflammation. *Res Immunol* 1995; 146: 671-77.
43. Curran BD, Ferrari FK, Kispert PH, Stadler J, Stuehr DJ, Simmons RL, Billiar TR. Nitric oxide and nitric-oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *FASEBJ* 1991; 5: 2085-92.
44. Dalmau M, Joaquin M, Nakamura T, Bartrons R, Gil J. Nitric oxide inhibits DNA synthesis and induces activation of poly(ADP-ribose) polymerase in cultured rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 1996; 228: 14-18.
45. Shinagawa T, Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayangi M. Apoptosis in cultured rat hepatocytes: the effects of tumour necrosis factor- α and interferon- γ . *J Pathol* 1991; 165: 247-53.
46. Laskin JD, Heck DE, Gardner CR, Laskin DL. Prooxidant and antioxidant functions of nitric oxide in liver toxicity. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3(2): 261-71.
47. Wink DA, Miranda KM, Espey MC, Pluta RM, Hewett SJ, Colton C, Vitek M, Feelisch M and Grisham MB. Mechanism of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3(2): 203-13.

48. Brandon G. <http://www.pharmweb.net/pwmirror/pwy/paracetamol/pharmwebpicm.html>. Norfolk, UK: *Paracetamol Information Centre* (26/09/2008).
49. <http://www.tylenolprofessional.com/tylenolprofessional/pharmacology.html> (26/09/2008).
50. Mehring von I. Beitrage zur Kenntniss der antipyretica. *Ther Monatsschrift* 1893; 7: 577-9.
51. Brodie BB, Axelrod AE. The estimation of acetanilide and its metabolic products, aniline, n-acetyl-p-aminophenol and p-aminophenol (free and total conjugated) in biological fluids and tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1948; 94: 22-8.
52. Brodie BB, Axelrod AE. The fate of acetophenetidin (phenacetin) in man and methods for the estimation of acetophenetidin and its metabolites in biological material. *J Pharmacol Exp Ther* 1949; 97: 58-67.
53. Farrell GC. The hepatic side effects of drugs. *Med J Aust* 1986; 145: 600-4.
54. Skjelbred P, Album B, Lokken P. Acetylsalicylic acid versus paracetamol: effects on post-operative course. *Eur J Clin Pharmacol* 1977; 12: 257-64.
55. Skjelbred P, Lokken P. Paracetamol versus placebo: effects on post-operative course. *Eur J Clin Pharmacol* 1979; 15: 27-33.
56. Botting RM. Mechanism of action of acetaminophen: Is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis* 2000; 31(5): 202-10.
57. Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology 10th Ed. New York: McGraw Hill Companies Inc 2007; 591-2.
58. Prescott LF. Treatment of severe acetaminophen poisoning with intravenous acetylcysteine. *Arch Intern Med* 1981; 141: 386-89.
59. Skoglund LA, Eidsaunet W, Pettersen N. The anti-oedematous efficacy of oxindanac equals that of paracetamol in acute postoperative inflammation: are weak cyclooxygenase inhibitors more effective than strong inhibitors ? *Int J Clin Pharmacol Res* 1989; 9: 371-5.
60. Seegers AJM, Jager LP, Zandberg P, van Noordwijk J. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of non-narcotic analgesic drug mixtures in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1981; 251: 237-54.
61. Milton AS, Wendlandt S. The effect of 4-acetamidophenol in reducing fever produced by the intracerebral injection of 5-hydroxytryptamine and pyrogen in the conscious cat. *Br J Pharmacol* 1968; 34: 215-6.
62. Milton AS, Wendlandt S. A possible role for prostaglandin E₁ as a modulator for temperature regulation in the central nervous system of the cat. *J Physiol* 1970; 207: 76-77.
63. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971; 231: 232-5.
64. Feldberg W, Gupta KP, Milton AS, Wendlandt S. The effect of pyrogen and antipyretics on prostaglandin activity in cisternal CSF of unanaesthetized cats. *J Physiol* 1973; 234: 279-303.
65. Harvey CA, Milton AS. Proceedings: endogenous pyrogen fever, prostaglandin release and prostaglandin synthetase inhibitors. *J Physiol* 1975; 250: 18-20.
66. Clark WG, Cumby HR. Antagonism by antipyretics of the hyperthermic effect of a prostaglandin precursor, sodium arachidonate, in the cat. *J Physiol* 1976; 257: 581-95.

67. Yaffe SJ. Comparative efficacy of aspirin and acetaminophen in the reduction of fever in children. *Arch Intern Med* 1981; 141: 286-92.
68. Temple AR. Review of comparative antipyretic activity in children. *Am J Med* 1983; 75 (Suppl 5A): 38-46.
69. Gladtko E. Use of antipyretic analgesics in the pediatric patient. *Am J Med* 1983; 75 (Suppl 5A): 121-6.
70. Drwal-Klein LA, Phelps SJ. Antipyretic therapy in the febrile child. *Clin Pharm* 1992; 11: 1005-21.
71. Vargas R, Maneatis T, Bynum L, Peterson C, McMahon FG. Evaluation of the antipyretic effect of ketorolac, acetaminophen and placebo in endotoxin-induced fever. *J Clin Pharmacol* 1994; 34: 848-53.
72. Lim RKS, Guzman F, Rodgers DW, et al. Site of action of narcotic and non-narcotic analgesics determined by blocking bradykinin-evoked visceral pain. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1964; 152: 25-58.
73. <http://en.wikipedia.org/wiki/Paracetamol>. (20/10/2008).
74. Dart RC, Erdman AR, Olson KR, Christianson G, Manoguerra AS, Chyka PA, Caravati EM, Wax PM, Keyes DC, Woolf AD, Scharman EJ, Booze LL, Troutman WG. Acetaminophen poisoning: An evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clin Toxicol (Phila)* 2006; 44 (1): 1-18.
75. Tenenbein M. Acetaminophen: the 150 mg/kg myth. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004; 42 (2): 145-8.
76. Blair IA, Boobis AR, Davies DS, Creps RM. Synthesis and reactivity of NAPQI. *Tetrahedron Lett* 1980; 21: 4947-50.
77. Brent JA, Rumack BH. Role of free radicals in toxic hepatic injury. II. Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury? *Clin Toxicol* 1993; 31(1): 173-96.
78. Rosen GM, Rauckman EJ, Ellington SP. Reduction and glutathione conjugation reactions of NAPQI and two dimethylated analogues. *Mol Pharmacol* 1984; 25: 151-57.
79. Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1987; 18(1): 27-79.
80. Fairhurst S, Barber DJ, Clark B, Horton AA. Studies on paracetamol-induced lipid peroxidation. *Toxicology* 1982; 23: 249-59.
81. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-26.
82. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chadhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-69.
83. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-66.
84. Wink Da, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-56.
85. Moilanen E, Whittle BJR, Moncada S. Nitric oxide as a factor in inflammation. In: *Inflammation: Principles and Clinical Correlations*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999; 787-800.

86. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor / nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267: 14519-22.
87. Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Synder SH. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6711-15.
88. Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S. Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11419-23.
89. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
90. Bredt DS, Synder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-85.
91. Mayer B, Schmid M, Klatt P, Schmidt K. Reversible inactivation of endothelial nitric oxide synthase by NG-nitro-L-arginine. *FEBS Lett* 1993; 333(1-2): 203-6.
92. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Synder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-18.
93. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7773-77.
94. Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10769-72.
95. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9: 1319-30.
96. Christopherson KS, Bredt DS. Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *J Clin Invest* 1997; 100: 2424-29.
97. Liu SF, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans TW. Differential regulation of the constitutive and inducible nitric oxide synthase mRNA by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Crit Care Med* 1996; 24: 1219-25.
98. Xu DL, Martin PY, St. John J, Tsai P, Summer SN, Ohara M, Kim JK, Schrier RW. Upregulation of endothelial and neuronal constitutive nitric oxide synthase in pregnant rats. *Am J Physiol* 1996; 271: 1739-45.
99. Kleinert H, Boissel J-P, Schwarz PM, Förstermann U. Regulation of the expression of nitric oxide synthase isoform. In: Nitric Oxide. Biology and Pathobiology. *San Diego: Academic Press* 2000; 105-28.
100. Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A, Johns RA. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol* 1996; 270: 164-70.
101. Alonso J, De Miguel LS, Monton M, Casado S and Lopez-Farre A. Endothelial cytosolic proteins bind to the 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: Regulation by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5719-26.
102. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5243-48.

103. Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 1993; 261: 1445-48.
104. Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7631-36.
105. Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJ, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 1993; 342: 338-40.
106. Kooy NW, Lewis SJ, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: Evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit Care Med* 1997; 25: 812-19.
107. Ruan J, Xie Q, Hutchinson N, Cho H, Wolfe GC, Nathan C. Inducible nitric oxide synthase requires both the canonical calmodulin-binding domain and additional sequences in order to bind calmodulin and produce nitric oxide in the absence of free Ca^{2+} . *J Biol Chem* 1996; 271: 22679-86.
108. McKim SE, Gäbele E, Isayama F, Lambert JC, Tucker LM, Wheeler MD, Connor HD, Mason RP, Doll MA, Hein DW, Arteel GE. Inducible nitric oxide synthase is required in alcohol-induced liver injury: Studies with knockout mice. *Gastroenterology* 2003; 125(6): 1834-44.
109. Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, Weinberg JB, Kremsner PG. Nitric oxide synthase 2 (Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J Infect Dis* 2001; 184: 330-36.
110. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 2000; 70: 241-51.
111. Rutherford S, Johnson MP, Curtain RP, Griffiths LR. Chromosome 17 and the inducible nitric oxide synthase gene in human essential hypertension. *Hum Genet* 2001; 109: 408-15.
112. Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao XQ, Roberts MH, Miyamoto Y, Yoshimura M, Saitoh Y, Yasue H, Nakao K, Adra CN, Kun JF, Moro-oka S, Inoko H, Ho LP, Shirakawa T, Hopkin JM. Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 761-63.
113. Wechsler ME, Grasemann H, Deykin A, Silverman EK, Yandava CN, Israel E, Wand M, Drazen JM. Exhaled nitric oxide in patients with asthma: association with NOS1 genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2043-47.
114. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Konya: Mimoza Yayınları* 1995.
115. Stephen B, Kyle L, Yong X, Cynthia A, Donald E, Earl F, James E. Role of Oxidative Stres in the :Mechanism of Dieldrin's Hepatotoxicity. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27(3): 196-208.
116. Drapper HH, Hadley M. Melondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-31.
117. Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411(2-3): 378-84.

118. Muriel P. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulaion and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol* 1998; 56(6): 773-79.
119. Hue RT, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993; 18: 1620-24.
120. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269(42): 26066-75.
121. Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 1993; 18: 195-99.
122. Patel RK, McAndrew J, Sellak H, White CR; Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar. Biological aspects of reactive nitrogen series. *Biochym Biophys Acta* 1999; 1411: 385-400.
123. Marklund SL. Analysis of Extracellular Superoxide Dismutase in Tissue Homogenates and Extracellular Fluids. *Methods Enzymol* 1990; 186: 260-65.
124. Halliwell B. Free Radical, Antioxidants and Human Disease: Curiosity, Cause, Consequence. *The Lancet* 1994; 344: 721-24.
125. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T. Induction of Superoxide Dismutase in Leukocytes by Paraquat: Correlation with Age and Possible Predictor of Longevity. *Blood* 1990; 76: 835-41.
126. Lunec J, Blake D. Oxygen Free Radicals: Their Relevance to Disease Processes. In: Cohen RD, Lewis B, Albert KGMM. The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease. London: *Balliere Tindall* 1990; 189-212.
127. Kobayashi Y, Ishigame Y, Usui T. Superoxide Dismutase Activity of Human Granulocytes and Lymphocytes. *The Lancet* 1977; 16: 865-66.
128. Spallholz JE. Selenium and Glutation Peroxidase: Essential Nutrient and Antioxidant Component of the Immun System. *Adv Exp Med Biol* 1990; 262: 145-58.
129. Blanco-Coronado JL, Repetto M, Ginestal RJ, Vicente JR, Yelamos F, Lardelli A. Acute Intoxication by Endosulfan. *J Toxicol Clin Toxicol* 1992; 30(4): 575-83.
130. Rambabu JP, Rao MB. Effect of an Organochlorine and Three Organophosphate Pesticides on Glucose, Glycogen, Lipid and Protein Contents in Tissues of The Freshwater Snail *Bellamya Dissimilis*. *Bull Environ Contam Toxicol* 1994; 53(1): 142-48.
131. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology 10th Edition. New York: *McGraw Hill Companies Inc* 2003; 332-44.
132. Monshouwer M, Witkamp RF, Nijmeijer SM, Pijpers A, Verheijden JH, Van Miert AS. Selective effects of a bacterial infection (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) on the hepatic clearances of caffeine, antipyrine, paracetamol and indocyanine green in the pig. *Xenobiotica* 1995; 25(5): 491-99.
133. Shimono N, Takatori T, Ueda M, Mori M, Nakamura Y. Multiparticulate Chitosan-Dispersed System for Drug Delivery. *Chem Pharm Bull* 2003; 51(6): 620-24.
134. Li XD, YLv Xia, He P, Han J, Wu C. Conjugation metabolism of acetaminophen and bilirubin in extrahepatic tissues of rats. *Life Sci* 2004; 74(10): 1307-15.

135. Muth-Selbach US, Irmgard T, Kay B, Geisslinger G. Acetaminophen Inhibits Spinal Prostaglandin-E₂ Release After Peripheral Noxious Stimulation. *Anesthesiology* 1999; 91(1): 231-39.
136. Lu ZB, Li Q, Ye BP, Bian S, Wang Y, Ruan QP, Wu WT. Protective effects of shark hepatic stimulator substance against acute hepatic injury induced by acetaminophen in mice. *Yao Xue Xue Bao* 2004; 39(1): 17-21.
137. Lai JT, Fang HL, Hsieh WT, Lin WC. Protective Effect of a Fermented Substance from *Saccharomyces cerevisiae* on Liver Injury in Mice Caused by Acetaminophen. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; Oct 7 (E-pub Ahead).
138. McNaughton L, Puttagunta L, Martinez-Cuesta MA, Kneteman N, Mayers I, Moqbel R, Hamid Q, Radomski MW. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(26):17161-6.
139. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Radall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
140. Sun Y, Oberley LW, Ying L. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
141. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(9): 158-69.
142. Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbid MS. Ochratoxicosis: Prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats m. *Journal of applied toxicology. J Appl Toxicol* 1999; 19: 7-12.
143. Mitchell J, Jollow D, Potter W, Gillette J, Brodie B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; 187: 211-17.
144. 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: 1327-31.
145. Allen AL. The diagnosis of acetaminophen toxicosis in a cat. *Can Vet J* 2003; 44(6): 509-10.
146. 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: 935-41.
147. Sakaida I, Kayano K, Wasaki S, Nagatomi A, Matsumura Y, Okita K. Protection against acetaminophen-induced liver injury in vivo by an iron chelator, deferoxamine. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 61-67.
148. Cohen SD, Hoivik DJ and Khairallah EA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in: *Toxicology of the Liver. Philadelphia: Taylor & Francis* 1998; 159-86.
149. 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(6): 604-7.
150. Gardner CR, Laskin JD, Dambach DM, Sacco M, Durham SK, Bruno MK, Cohen SD, Gordon MK, Gerecke DR, Zhou P, Laskin DL. Reduced hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking inducible nitric oxide synthase: Potential role of tumor necrosis factor and interleukin-10. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 184: 27-36.

151. Gardner CR, Heck DE, Yang CS, Thomas PE, Zhang XJ, DeGeorge GL, Laskin JD, Laskin DL. Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology* 1998; 27(3): 748-54.
152. Harbrecht BG, Di Silvio M, Chough V, Kim YM, Simmons RL, Billiar TR. Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultured hepatocytes. *Ann Surg* 1997 January; 225(1): 76–87.
153. Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Kakuta M, Kitajima Y, Koiwai K, Ohtake T, Ujibe M, Ishikawa M. Melatonin protects on toxicity by acetaminophen but not on pharmacological effects in mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(3): 472-6.
154. Gamal el-din AM, Mostafa AM, Al-Shabanah OA, Al-Bekairi AM, Nagi MN. Protective effect of arabic gum against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Pharmacol Res* 2003; 48(6): 631-5.
155. Bromer M, Black M. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 2003; 7(2):351-67.
156. Terneus MV, Kiningham KK, Carpenter AB, Sullivan SB, Valentovic MA. Comparison of S-Adenosyl-L-methionine and N-acetylcysteine protective effects on acetaminophen hepatic toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320(1): 99-107.
157. Iwalokun BA, Efedede BU, Alabi-Sofunde JA, Oduala T, Magbagbeola OA, Akinwande AI. Hepatoprotective and antioxidant activities of *Vernonia amygdalina* on acetaminophen-induced hepatic damage in mice. *J Med Food* 2006; 9(4): 524-30.
158. Macrides TA, Naylor LM, Kalafatis N, Shihata A, Wright PF. Hepatoprotective effects of the shark bile salt 5beta-scymnol on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 33(1): 31-7.
159. Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Kakuta M, Kitajima Y, Koiwai K, Ohtake T, Ujibe M, Ishikawa M. Melatonin protects on toxicity by acetaminophen but not on pharmacological effects in mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(3): 472-6.
160. Mason RP, Fisher V. Free radicals of acetaminophen: Their subsequent reactions and toxicological significance. *Fed Proc* 1986; 45: 2493-99.
161. Birge RB, Bartolone JB, Nishanian EV, Bruno MK, Mangold JB, Cohen SD, Khairallah EA. Dissociation of covalent binding from the oxidative effects of acetaminophen. Studies using dimethylated acetaminophen derivatives. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 3383-93.
162. Tirmenstein MA and Nelson SD. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols: Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotide. *J Biol Chem* 1990; 265: 3059-65.
163. Lores Arnaiz S, Llesuy S, Cutrín JC, Boveris A. Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver. *Free Radic Biol Med* 1995; 19(3): 303-10.
164. Hinson JA, Mays JB, Cameron AM. Acetaminophen-induced hepatic glycogen depletion and hyperglycemia in mice. *Biochem Pharmacol* 1983; 32(13): 1979-88.
165. Mirochnitchenko O, Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, Chen L, Yang C, Inouye M. Acetaminophen toxicity. Opposite effects of two forms of glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1999; 274(15): 10349-55.

166. Adamson GM, Harman AW. A role for the glutathione peroxidase/reductase enzyme system in the protection from paracetamol toxicity in isolated mouse hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(19): 3323-30.
167. Knight TR, Fariss MW, Farhood A, Jaeschke H. Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice. *Toxicol Sci* 2003; 76(1): 229-36.
168. Amimoto T, Matura T, Koyama SY, Nakanishi T, Yamada K, Kajiyama G. Acetaminophen-induced hepatic injury in mice: The role of lipid peroxidation and effects of pretreatment with coenzyme Q10 and alpha-tocopherol. *Free Radic Biol Med* 1995; 19(2): 169-76.
169. Muriel P, Garciapina T, Perez Alvarez V, Mourelle M. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *J Appl Toxicol* 1992; 12(6): 439-42.
170. Sener G, Toklu HZ, Sehirli AO, Velioglu-Ogunc A, Cetinel S, Gedik N. Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepatol Res* 2006; 35(1): 62-68.
171. Wendel A, Feuerstein S, Konz KH. Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. *Biochem Pharmacol* 1979; 28(13): 2051-55.
172. Knight TR, Fariss MW, Farhood A, Jaeschke H. Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice. *Toxicol Sci* 2003; 76(1): 229-36.
173. Hinson JA, Bucci TJ, Irwin LK, Michael SL, Mayeux PR. Effect of inhibitors of nitric oxide synthase on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Nitric Oxide* 2002; 6(2): 160-7.
174. Garrido A, Arancibia C, Campos R, Valenzuela A. Acetaminophen does not induce oxidative stress in isolated rat hepatocytes: Its probable antioxidant effect is potentiated by the flavonoid silybin. *Pharmacol Toxicol* 1991; 69(1): 9-12.
175. Maharaj H, Maharaj DS, Daya S. Acetylsalicylic acid and acetaminophen protect against oxidative neurotoxicity. *Metab Brain Dis* 2006; 21(2-3): 189-99.
176. Powell CL, Kosyk O, Ross PK, Schoonhoven R, Boysen G, Swenberg JA, Heinloth AN, Boorman GA, Cunningham ML, Paules RS, Rusyn I. Phenotypic anchoring of acetaminophen-induced oxidative stress with gene expression profiles in rat liver. *Toxicol Sci* 2006; 93(1): 213-22.
177. O'Donnell VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, Darley-Usmar VM, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: Kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry* 1997; 36(49): 15216-23.
178. Liu J, Li C, Waalkes MP, Clark J, Myers P, Saavedra JE, Keefer LK. The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Hepatology* 2003; 37(2): 324-33.
179. Kuo PC, Schroeder RA, Loscalzo J. Nitric oxide and acetaminophen-mediated oxidative injury: modulation of interleukin-1-induced nitric oxide synthesis in cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282(2): 1072-83.

180. Michael SL, Mayeux PR, Bucci TJ, Warbritton AR, Irwin LK, Pumford NR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice lacking inducible nitric oxide synthase activity. *Nitric Oxide* 2001; 5(5): 432-41.
181. James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* 2003; 31(12): 1499-506.
182. Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 63(7): 766-81.
183. James LP, McCullough SS, Lamps LW, Hinson JA. Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: Relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. *Toxicol Sci* 2003; 75(2): 458-67.