

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**KARNOZİN VE MELATONİNİN ASETAMİNOFEN ARACILI  
AKUT KARACİĞER TOKSİSİTESİ ÜZERİNE OLAN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Özgür FEDAKAR**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Meral ÖNCÜ**

**Bu tıpta uzmanlık tezi Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu  
tarafından 1890-TU-09 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ISPARTA - 2010**

## ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde yardımcı olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Meral ÖNCÜ'ye, uzmanlık eğitimim boyunca bilgilerinden yararlandığım, bana her konuda yardımını esirgemeyen, Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Sayın Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e, biyokimyasal değerlendirme için Sayın Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN'e, istatistik analizlerinin yapılmasında katkıda bulunan Sayın Yrd. Doç. Dr. Esin KULAÇ'a kıymetli zamanlarını ayırdıkları için teşekkür ederim.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Dr. Ahmet KOÇAK'a, Arş. Gör. Dilek BAYRAM'a, Arş. Gör. İbrahim Aydın CANDAN'a, Yük. Lisans Öğr. Belkıs BİRDEN'e, Arş. Gör. Hakan DARICI'ya, Doktora Öğr. Hayrunisa YEŞİL'e, Arş. Gör. Dr. İlkay ARMAĞAN'a ve Yük. Lisans Öğr. Meltem ÖZGÖÇMEN'e teşekkürü bir borç biliyorum.

Tüm bu tez aşamaları sürerken her an yanımda olan anne ve babama çok teşekkür ederim.

**Dr. Özgür FEDAKAR**

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>SİMGE ve KISALTMALAR</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Karaciğer Histolojisi.....	3
2.2. Asetaminophen.....	3
2.2.1. Farmakokinetik Özellikler .....	4
2.2.2. Endikasyonları (Kullanım Alanları) .....	5
2.2.3. Ateş Düşürücü Etki .....	5
2.2.4. Ağrı Kesici Etki .....	6
2.2.5. Asetaminofenin Yan Etkileri .....	6
2.2.6. Doz ve Kullanım Bilgileri .....	6
2.2.7. Asetaminofen ve Lipit Peroksidasyonu .....	7
2.2.8. Asetaminofen Toksisitesi.....	7
2.3. Melatonin.....	8
2.4. Karnozin .....	10
2.5. Nitrik Oksit (NO) .....	11
2.5.1. Nitrik Oksidin Biyosentezi ve NOS'ın İzofomları.....	12
2.5.2. NO ve Lipit Peroksidasyonu.....	13
2.6. Oksidatif Hasar Ve Reaktif Oksijen Partikülleri .....	14
2.6.1. Reaktif Oksijen Partikülleri Tanımı.....	14
2.6.2. ROP Sınıflandırılması.....	14
2.6.3. ROP Kaynakları.....	15
2.6.4. Antioksidan Savunma .....	16
2.6.5. Hücre İçi Ortamda Antioksidan Savunma .....	16
2.6.6. İn Vivo - Hücre Dışı Ortamda Antioksidan Savunma.....	16

<b>3. MATERYAL ve METOT</b> .....	<b>18</b>
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Deney Hayvanları .....	18
3.1.2. Kullanılan İlaçlar .....	18
3.1.3. Biyokimyasal Çalışma İçin Kullanılan Malzemeler.....	18
3.2. Metot .....	19
3.2.1. Deney Planı.....	19
3.2.2. Histolojik Çalışmalar .....	20
3.2.3. İmmünohistokimyasal Çalışmalar .....	21
3.2.4. Biyokimyasal Çalışmalar.....	24
3.2.5. İstatistiksel Analiz .....	24
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>26</b>
4.1. Histolojik Bulgular .....	26
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular .....	32
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>39</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>42</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>43</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>44</b>

## SİMGE ve KISALTMALAR

<b>AFMK</b>	: N1-Asetil-N2-formil-5-Metoksikinüramin
<b>AG</b>	: Aminoguanidin
<b>ALP</b>	: Alkale Fosfataz
<b>ALT</b>	: Alanin Transaminaz
<b>AST</b>	: Aspartat Transaminaz
<b>BH<sub>4</sub></b>	: Tetrahidrobiopterin
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CCl<sub>4</sub></b>	: Karbon Tetraklorür
<b>cNOS</b>	: Yapısal Nitrik Oksit Sentaz
<b>COX</b>	: Siklooksijenaz
<b>CYP</b>	: Sitokrom
<b>eNOS</b>	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
<b>Fe</b>	: Demir
<b>GdCl<sub>3</sub></b>	: Gadolinyum Klorid
<b>GGT</b>	: Gama Glutamil Transferaz
<b>GSH</b>	: Glutatyon
<b>GSHPx</b>	: Glutatyon Peroksidaz
<b>H.E.</b>	: Hemotoksilen Eosin
<b>HİV</b>	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>iNOS</b>	: (İndüklenebilir) Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz
<b>KC</b>	: Karaciğer
<b>L-NAME</b>	: L-N-Nitro-Arjinin-Metil Ester
<b>MDA</b>	: Malondialdehid
<b>NAPQI</b>	: N-asetil-p-benzokinin imin
<b>nNOS</b>	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>NSAİİ</b>	: Non-steroidal Antiinflamatuvar İlaç
<b>OA</b>	: Oleanolik Asit
<b>OH</b>	: Hidroksil Radikali

<b>OSİ</b>	: Oksidatif Stres İndeksi
<b>PBS</b>	: Fosfat Tampon Solüsyonu
<b>PGI</b>	: Prostaglandin
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Radikalleri
<b>SOD</b>	: Süperoksid Dismutaz
<b>TAS</b>	: Total Antioksidan Status
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekrozis Faktör Alfa
<b>TOS</b>	: Total Oksidan Status

**TABLULAR DİZİNİ**

Tablo 1. Reaktif Oksijen Partikülleri .....	15
Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarında gözlenen yapısal değişiklikler ve Kruskal-Wallis p değerleri .....	27
Tablo 3. Gruplar Arasında Gözlenen yapısal değişikliklerin Mann-Whitney U testine göre p değerleri .....	28
Tablo 4. Gruplara göre ortalama iNOS reseptör boyanma dereceleri.....	32
Tablo 5. Deney ve Kontrol grubuna ait serumda TOS, TAS ve OSİ düzeylerinin aritmetik ortalamaları .....	36

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

Şekil 1. Asetaminofenin Kimyasal Yapısı .....	4
Şekil 2. Melatoninin kimyasal yapısı .....	8
Şekil 3. Karnozin Sentezi ve Yıkımı.....	10



## RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Kontrol grubuna ait sıçan KC dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (H-E; x120).....	29
Resim 2. Melatonin grubuna ait sıçan KC dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (H-E; x120).....	29
Resim 3. Karnozin grubuna ait sıçan KC dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte.(H-E; x120).....	30
Resim 4. Asetaminofen grubuna ait sıçan KC dokusu. Hepatositlerde granüler dejenerasyon, santral ven çevresinde nekroz ve vasküler konjesyon belirgin olarak gözlenmekte (H-E; x120).....	30
Resim 5. Asetaminofen + Melatonin grubuna ait sıçan KC dokusu. Hepatositlerde düşük düzeylerde granüler dejenerasyon ve vasküler konjesyon görülmekte (H-E; x120). .....	31
Resim 6. Asetaminofen + Karnozin grubuna ait sıçan KC dokusu. Hepatositlerde düşük düzeylerde granüler dejenerasyon ve vasküler konjesyon görülmekte (H-E; x120). .....	31
Resim 7. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. Çok düşük düzeyde boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120).....	33
Resim 8. Melatonin grubuna ait karaciğer dokusu. Çok düşük düzeyde boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120).....	33
Resim 9. Karnozin grubuna ait karaciğer dokusu. Çok düşük düzeyde boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120).....	34
Resim 10. Asetaminofen grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevresi alanlarda ve parankimde yoğun boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120). .....	34
Resim 11. Asetaminofen+ Melatonin grubuna ait karaciğer dokusu. Düşük düzeyde boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120). .....	35
Resim 12. Asetaminofen+ Karnozin grubuna ait karaciğer dokusu. Düşük düzeyde boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120). .....	35

## GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Gruplara ait serum TOS düzeylerinin karşılaştırılması .....	37
Grafik 2. Gruplara ait serum TAS düzeylerinin karşılaştırılması .....	37
Grafik 3. Gruplara ait serum OSİ düzeylerinin karşılaştırılması .....	38

## 1. GİRİŞ

Vücuda dışarıdan giren maddelerin metabolizmasından, işlevleri ve sahip olduğu enzimler dolayısıyla, karaciğer sorumludur. Bu durum; karaciğeri ilaç kaynaklı toksisite yönünden de hedef organ haline getirmektedir (1).

Asetaminofen (parasetamol), etkinliği ve göreceli güvenilirliği dolayısıyla bütün dünya çapında en yaygın şekilde kullanılan ateş düşürücü ve ağrı kesici ilaçlardan biridir. Fakat bu ilacın karaciğerde hasarlanma yaparak yetmezliğe yol açtığına dair çok sayıda çalışma vardır (2). Karaciğerde hasarlanmaya yol açtığı tespit edilen dozlarının, tedavi amacıyla kullanılan sınırlarda da olması önemlidir (3).

Asetaminofene bağlı toksik etkilere yol açan mekanizmalar arasında protein arilasyonu, oksidatif stres, kalsiyum dengesizliği, iltihabi (yangısal) değişikliklere öncülük eden sinyaller ve hücre ölüm yollarının harekete geçirilmesi gibi pek çok mekanizma sayılmıştır (4).

Asetaminofen, karaciğer üzerindeki esas toksik etkilerini N-asetil-p-benzokinin imin (NAPQI) adı verilen ve sitokrom P450 (CYP450) sistemi üzerinden açığa çıkan bir metaboliti aracılığıyla gösterir. Bu metabolit, iç kaynaklı bir antioksidan olan glutatyonla (GSH) etkileşime geçerek zararsız hale gelmektedir. Asetaminofenin yüksek dozda alınması sonrasında metabolitlerin miktarında artış olur. Bu durumda; GSH açığa çıkan fazla miktardaki NAPQI molekülünü bağlayamaz. Serbest haldeki NAPQI, karaciğerdeki diğer büyük çaplı moleküllere kovalent şekilde bağlanarak, karaciğer dokusunda hasarlanmaya yol açar (5). Karaciğerde meydana gelen hasarlanma, GSH seviyelerini yükselten N-asetilsisteinin (NAC) dışarıdan verilmesi yoluyla önlenebilmektedir. Asetaminofene bağlı 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 veriler elde edilmiştir (6).

NO, karaciğerdeki parankim hücrelerinde ve parankimal olmayan diğer hücrelerde, uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimi aracılığıyla üretilen ve yüksek miktarda oksidan kapasiteye sahip bir bileşendir (7). NO'in karaciğerde fazla miktarda üretilmesinin, karaciğerdeki iltihabi (yangısal) olaylarda ve hasarlanmaya ilişkin diğer modellerde rol oynayan önemli bir etken olduğu düşünülmüştür (8).

NO'in karaciğerdeki etkilerinin altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemesine rağmen, bu bileşenin CYP450'yi azalttığı (9), karaciğerdeki proteinlerin DNA sentezini baskıladığı (10) ve apoptozun yanı sıra nekrozu da uyardığı (11) bildirilmiştir. Diğer yandan, NO'in karaciğerde antioksidan etkilerinin olduğuna dair yayınlar da mevcuttur (12). Dolayısıyla, NO'in karaciğer üzerindeki etkileri tek yönlü değildir ve organizmanın içinde bulunduğu duruma göre değişebilmektedir.

Melatonin epifiz bezinin pinealosit adı verilen hücrelerinden salgılanan bir hormondur. Biyoritmi (sirkadyan ritm) belirler ve vücudun uyku-uyanıklık döngüsü üzerinde etkilidir. Melatonin güçlü bir antioksidan ve serbest radikal kovucudur (13,14).

Karnozin beta-alanin ve histidin aminoasitlerinden oluşan bir dipeptiddir. İnsan beyin ve kas dokularında doğal olarak bulunur. Güçlü bir antioksidan ve metal şelatördür. Lipit peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu önler (15).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de ilaçlar ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisi ile oluşabilmektedir (16). Serbest radikal biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler, oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalleridir (OH) . Oksidanların totali, yani Total Antioksidan Status (Toplam Oksidan Seviye) (TOS) ölçülebilmektedir. Bu da yorumlama açısından tek tek ölçülmesine göre kolaylık ve doğruluk sağlamaktadır.

Serbest radikalleri yok eden savunma sistemi antioksidan sistemdir. Hücre içinde ve hücre dışında bulunan, etki güçleri farklı farklı, pek çok antioksidan vardır. Antioksidanları tek tek ölçmek yerine tamamını, yani Toplam Antioksidan Status'u (Toplam Antioksidan Seviye) (TAS) ölçmek savunma düzeyini daha doğru göstermesi bakımından önemlidir (17). Bu metod ile daha iyi yorumlama imkanı doğmaktadır.

Çalışmamızda asetaminofenin, sıçanların karaciğer dokusunda meydana getirdiği yapısal değişikliklere, karnozin ve melatoninin etkilerini; histolojik düzeyde, iNOS reseptör dağılımına etkisi bakımından ve biyokimyasal olarak karşılaştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer; metabolizmanın önemli bir organıdır. Ağırlığı yaklaşık 1,5 kg' dır. Organa kanın %70-80'i portal venden, geri kalan bölümü hepatik arterden gelir. Sindirim kanalından emilen şilomikronlar dışındaki maddeler portal ven yoluyla karaciğere ulaşır. Hilumda portal ven, hepatik arter ve sinirler girer, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar. Glisson kapsülü hilusta organın içine girer ve organı lobüllere ayırır. Karaciğerin temel yapı elemanı, karaciğer epitel hücreleri olan hepatositlerdir. Bu epitel hücreleri, birbirleriyle bağlantılı plaklar halinde gruplandırılmışlardır. Işık mikroskobu kesitlerinde, "karaciğer lobülü" olarak isimlendirilen yapısal birimler görülebilir. Karaciğer lobülü, 0,7 x 2 mm boyutlarında poligonol bir doku kütesidir. Lopçuklar, bazı kenar bölümlerde safra kanalları, lenfatikler, sinirler ve kan damarları içeren bağ dokusuyla sınırlanmıştır. "Portal alan" adı verilen bu bölgeler, lopçukların köşelerinde bulunur. Arter, ven ve safra duktusunu içeren bağ dokusu alanlardır. Parankimde, hepatositlerin dışında Kupffer hücreleri (sinuzoidal makrofajlar) da bulunur (18).

Karaciğer parankimi yapısal olarak kanlanma ve metabolik aktiviteye göre "karaciğer asinüsü" olarak adlandırılan alanlara ayrılır. Karaciğer asinüsündeki hepatositler, buldukları yere göre 3 eliptik zonal bölgeye ayrılır.

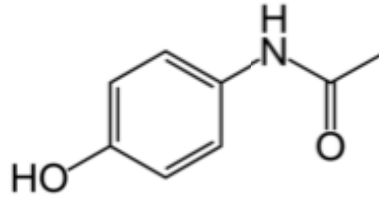
Zon 1: Portal ven ve hepatik arterin dallarının olduğu bölgedir.

Zon 2: Zon 1 ve 3 arasında sınırları tam belli olmayan bir bölgedir.

Zon 3: Terminal hepatik ven (santral ven ) çevresindeki bölgeyi kapsar (19).

### 2.2. Asetaminophen

Asetaminofen, non-steroidal antiinflamatuvar ilaç (NSAİİ) grubu ilaçlardan fenasetinin etkin metabolitlerinden biri olan para-aminofenol türevidir.



**Şekil 1.** Asetaminofenin Kimyasal Yapısı (20)

Yapısal olarak beyaz, kokusuz 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 (20).

Ateş düşürücü etkisini hipotalamustaki ısı merkezi üzerinden gösterirken, ağrı kesici etkisi ağrı eşiğini yükseltme özelliğine bağlıdır (21). Asetaminofen ilk 1839'da keşfedilmesine rağmen, daha eski ateş düşürücü ilaçlardan asetanilidin ve fenasetinin etkin bir metaboliti olduğunun anlaşıldığı 1949 yılına kadar kısıtlı şekilde kullanılmıştır (22). Yetişkinler için önerilen dozun üst sınırı, en fazla 4 g/gün'dür (23).

Asetaminofen, ateş düşürücü ve ağrı kesici etkileri yönüyle NSAİİ şeklinde de düşünülmektedir. Fakat NSAİİ ilaçların trombosit birikimini engelleyici ve mide mukozası ve mukusunu bozucu etkileri gibi bazı tipik özelliklerini taşımaz (24). Asetaminofen'in analjezik ve antipiretik etkilerini, merkezi sinir sisteminde bulunan siklooksijenaz-3 (COX-3) enzimi inhibisyonu üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Diğer NSAİİ ilaçlar gibi, az miktarda COX-1 ve COX-2 inhibisyonu yapmakta; fakat iltihap önleyici etkileri bulunmamaktadır. Merkezi sinir sistemi dışındaki periferdeki dokularda, iltihabi durumlarda; COX'u inhibe etmemesi, antiinflamatuvar etkisinin olmamasının sebebi olarak düşünülmektedir (25). Asetaminofen metabolizması ise CYP450 enzimlerinden CYP1A2 ile olmaktadır. Fakat toksik etkileri bu yol üzerinden oluşan metaboliti ve daha pek çok mekanizma sonucu meydana gelmektedir (26).

### 2.2.1. 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 (26).

### **2.2.2. Endikasyonları (Kullanım Alanları)**

Asetaminofen etkin bir ağrı kesici ve ateş düşürücü ajan olarak aspirine eşdeğer olmasına rağmen, iltihap önleyici etkisinin 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. Aspirine karşı duyarlılığı olanlarda, 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, probenesidle birlikte verilebilir (26).

### **2.2.3. Ateş Düşürücü Etki**

Asetaminofenin ateş düşürücü etkinliği, pek çok hayvan türünde gösterilmiştir. Milton ve Wendlant'ın (27) yapmış oldukları bir çalışmada; asetaminofen kedilerin beyin ventriküllerine enjekte edilen endotoksin kaynaklı ateşi düşürebilirken, aynı yere enjekte edilen prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) kaynaklı ateşi etkilemediği bildirilmiştir. Bu durum, NSAİİ'lerin antipiretik etkinliğinin, ateşlenmeye yol açan PG'lerin üretimini engellenmesine bağlı olduğunu fark eden Vane (28) tarafından açıklanmıştır. Daha sonra yapılan bir çalışmada, asetaminofenin kedilerde bakteri kaynaklı uyarılan ateşi, beyin omurilik sıvısındaki PG benzeri maddelerin miktarını azaltarak düşürdüğü gösterilmiştir (29).

Asetaminofen, yüksek ateş tedavisinde sıklıkla tercih edilmiş ve ketorolak gibi yeni ateş düşürücü ajanların da denenmesinde bir ölçü olarak kullanılmıştır (30).

#### **2.2.4. Ağrı Kesici Etki**

Asetaminofenin ağrı kesici etkisinin, merkezi olmaktan çok çevresel bir yeri olduğu gösterilmiştir. Lim ve arkadaşları (31) , bu denemede, asetaminofenin köpek dalağına enjekte edilen bradikinine olan cevabı engellediğini görmüştür. Dolayısıyla, bu ilacın morfinin aksine etkinliğini çevresel olarak gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır .

#### **2.2.5. Asetaminofenin Yan Etkileri**

Asetaminofenin solunum, kardiyovasküler sistem ve asit- baz dengesi üzerinde belirgin bir etkisi yoktur. Aspirinin aksine oral antikoagülanlarla belirgin bir etkileşme göstermez (25). 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 gr. dozunda alınması halinde karaciğerde ciddi hasarlanma ve nekrozla birlikte böbreklerde tübüler nekroza yol açabilir ve ölümcül olabilir. 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. Tedavisi aşırı doz aspirin tedavisine göre daha zordur. Asetaminofen zehirlenmesinde, destek tedavisine ek olarak son derece faydalı oldukları gösterilen yöntemler arasında, sülfidril gruplarının toksik metabolitlerin etkisizleştirilmesi için kullanılması yer almaktadır. NAC 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 (26).

#### **2.2.6. Doz ve Kullanım Bilgileri**

Asetaminofen suda fazla çözünen ve stabil kalan bir madde olduğu için, sıvı farmasötik şekiller içinde vermek mümkündür. Günlük kullanımda tablet, sıvı süspansiyon, fitil veya flakon şekilleri bulunmaktadır. Yetişkinlere verilen ortalama



doz 325-500 mg günde 4 keredir (26). Küçük çocuklara doktor tavsiye ettiği takdirde; bir yaşından küçüklerde bir kezlik doz 60-120 mg ve 1-5 yaşlar arasında 120-250 mg'dır. Asetaminofen, yemek sırasında veya yemekten sonra alınır, biyoyararlanımı belirgin şekilde azalır; onun için aç karna alınması tercih edilir. Asetaminofen oral dozuna eşit dozlarda rektal yoldan da verilebilir (25). Toksik doz, oldukça değişkenlik göstermektedir. Yetişkinlerde, bir defada alınan 10 g üzeri dozların veya 150 mg/kg dozunun toksik etkiye yol açma ihtimali çok yüksektir (32). 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 karaciğer ve böbrek boyutlarının göreceli olarak daha büyük olmasına ve asetaminofen doz aşımını daha iyi karşılayabilmelerine bağlıdır (33).

#### **2.2.7. Asetaminofen ve Lipit Peroksidasyonu**

Asetaminofenin toksik etkilerinin ortaya çıkabilmesi, metabolize olmasına bağlıdır. Metabolizma sonucunda açığa çıkan NAPQI'nın hem protein tiyoller ve hem de GSH'la kovalent bağlar sağladığı gösterilmiştir (34). Asetaminofene bağlı söz konusu etkilerin açığa çıkışında, son zamanlarda NAPQI'nın yanı sıra lipit peroksidasyon mekanizmasının da yer aldığından bahsedilmektedir. Asetaminofenin aşırı dozlarında, GSH azalması ve antioksidan sistemin etkinliğinin azalması sonucu lipit peroksidasyonunda artış olduğu rapor edilmiştir (35).

#### **2.2.8. Asetaminofen Toksisitesi**

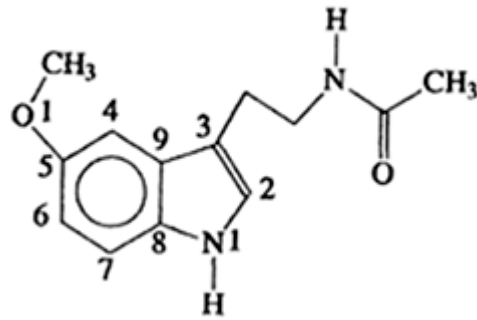
Asetaminofen intihar girişimlerinde en çok kullanılan ve diğer ilaçlarda birlikte kullanılan formları olduğu için kazara zehirlenmesi de sık rastlanan bir ilaçtır. Zehirlenme halinde; hastanın durumu çoğunlukla asemptomatik veya bulantı gibi gastrointestinal şikayetleri vardır. 24-36 saat sonra karaciğer hasarının oturmaya başlaması ile karaciğer enzimleri yükselir ve hipoprotrombinemi oluşur. Ağır vakalarda hepatik ensefalopati ve ölüme kadar gidebilen fulminan karaciğer yetmezliği gelişebilir. Renal yetmezlik meydana gelebilir.

Zehirlenme durumu serum asetaminofen konsantrasyonu ölçülerek değerlendirilebilir. Alımdan 4 saat sonra seviye 150-200 mg/L üzerindeyse karaciğer yetmezliği riski büyüktür. Kronik alkoliklerde ve kronik ilaç kullananlarda CYP450 miktarı arttığı için seviye 100mg/L üzerinde olduğunda risk fazladır. İlk 8-10 saat içerisinde; GSH sağlayan NAC verilmesi etkili olabilir. Fulminan karaciğer yetmezliğine giren vakalara, karaciğer transplantasyonu gerekebilir (26).

### 2.3. Melatonin

Melatonin, pineal bezden belli bir ritm dahilinde salgılanan, vücudun sirkadiyen ritmini düzenleyen bir hormondur. Karanlıkta salgınır, güneş ışığı ile salınımı baskılanır. Vücudun uyku- uyanıklık siklusunu düzenlediğine inanılmaktadır (25). Melatonin (N-asetil 5-metoksitriptamin) seratonin kaynaklı güçlü bir antioksidan indol türevidir. İlk kez sığır epifiz bezinin pinealosit adı verilen hücrelerinden salgılandığı keşfedilmiş ve bir hormon olarak değerlendirilmiştir (36).

Çeşitli fonksiyonları açısından çalışılmış ve yaşlanmayı geciktirici, doğum kontrolü amaçlı, depresyon tedavisinde, HIV enfeksiyonuna karşı ve en önemlisi antioksidan ve kansere karşı koruyucu etkileri tespit edilmiştir (26).



Şekil 2. Melatoninin kimyasal yapısı (37).

Bakterilerde dahil bütün yaşam formlarında salınımı tespit edilmiştir (36). Uyku uyanıklık dengesi üzerine etkilidir. Uzun uçak yolculuklarına bağlı oluşan jetlag ve uykusuzluğa karşı tedavi amaçlı kullanılmaktadır (26).

Lipofilik özelliği nedeniyle, hücrenin tüm bölümlerine kolaylıkla girebildiği için melatoninin hem sitoplazmada hem de çekirdekte bağlanma bölgeleri bulunmaktadır (38). Hem lipofilik hem de hidrofilik olduğundan dolayı, organizmada

çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilir. Hücrenin çekirdeğine kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine üstünlük sağlamaktadır (39).

Yapısındaki pirol halkasının antioksidan özelliğinde rolü büyüktür. Fizyolojik şartlarda, melatoninin pirol halkasının yıkılımı, N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Bu metabolitin güçlü radikal yoketici özelliği vardır (40).

Melatoninin antioksidan özellikleri 90'lı yılların başlarından beri bilinmektedir. Çok çeşitli serbest radikalleri, reaktif oksijen ve nitrojen türevlerini nötralize edebilme özelliğinin yanı sıra; antioksidan özelliğini arttıran pek çok antioksidan enziminde sentezini stimüle eder. Çok güçlü toksik etkileri olan OH ile etkileşir ve hidrojen peroksiti, peroksinitrit anyonunu, NO'i ve hipokloröz asidi nötralize eder. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan sistem enzimlerinin üretimini arttırır (39). Ratlarda yapılan bir çalışmada serum TAS seviyesinin Melatonin seviyesi ile direkt ilişkili olduğu gösterilmiştir. 5 gün boyunca saat 20:00 ile 05:00 arasında ışığa maruz bırakılan ratlarda Melatonin sentezinin azalmasına bağlı olarak TAS seviyelerinin de düştüğü rapor edilmiştir (41).

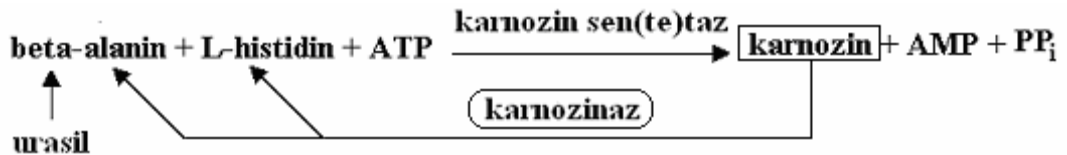
Melatonin'in antioksidan mekanizmaları, C ve E vitamini gibi klasik antioksidanlardan farklılık göstermektedir. Elektron donörü olarak klasik antioksidanlar redoks siklusuna girmekte ve oksidasyonu önleme yanında, arttırma durumları da bulunabilmekte iken melatonin; üriner sistemle atılabilen çok sayıda AFMK gibi metabolit oluşturarak, oksidanlarla savaşmakta ve redoks siklusuna girmemektedir. Bu sebeple oksidasyona sebebiyet vermesi mümkün değildir ve bu özelliklerinden dolayı diğer antioksidanlardan farklı olarak terminal antioksidan adını almaktadır. Metabolitleri ile kaskad reaksiyon ile antioksidan özelliği artmakta ve diğer antioksidanlarla da sinerjistik etkilerinden dolayı en etkili antioksidanlardandır. (42).

Yapılan çeşitli çalışmalarla melatonin'in karaciğerin kimyasal, termal ve iskemi sonucu hasarlanmalarında antioksidan olarak koruyucu özelliği gösterilmiştir (13). Lipopolisakkarid'e bağlı iNOS üretimini azaltarak, benzen ve okratoksin'in

arttırdığı lipit peroksidasyonuna önleyici olarak; koruyucu etkiler göstermiştir (39, 43, 44) . Karbon tetraklorüre (CCL<sub>4</sub>) bağlı serum alanin amino transferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST), total ve konjuge bilirubin, alkalen fosfataz (ALP), gama glutamil transferaz (GGT) ve total demir (Fe) düzeyindeki düşüşleri düzelterek etkili olmuştur (45). Ratlarda CCL<sub>4</sub>'e bağlı hepatotoksisite oluşturulan bir çalışmada; karaciğer dokusunda meydana gelen nekrozis, fibrozis, mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji, yağlı değişiklik ve rejeneratif nodül formasyonu oluşumunu engellediği tespit edilmiştir (46). Diğer bir çalışmada da doku hidroksiprolin seviyelerini azaltarak CCL<sub>4</sub>'e bağlı fibrozisi azalttığı gözlenmiş; aynı çalışmada malondialdehidi (MDA) azalttığı, SOD ve GSHPx'i arttırdığı ama Kupffer hücrelerinden üretilen tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) seviyelerini azaltmadığı için proinflamatuvar sitokinler üzerinden değil, oksidatif stresi önleyerek hepatotoksisiteyi düzeltici rol oynadığı düşünülmüştür (47). İskemi-reperfüzyon hasarının karaciğere yaptığı etkileri TNF-  $\alpha$  ve NO'ı azaltarak önlediği gösterilmiştir (48). Asetaminofene bağlı karaciğer ve böbrek toksisitesine karşı da lipit peroksidasyonu, nötrofil filtrasyonunu ve NO ile IL-6 üretimini azaltarak koruyucu etkili olduğu bulunmuştur (49, 14).

#### 2.4. Karnozin

Karnozin;  $\beta$ -alanin ve L-histidinden sentezlenen bir dipeptiddir. Karnozin sentaz enzimiyle sentezlenmektedir. Geniş bir substrat özgüllüğüne sahip karnozin sentetaz sitozolik bir enzimdir ve farklı dokularda tüm aminoasit histidin dipeptidlerini sentezleyebilmektedir (50). Karnozin; iskelet kası, sinir ve beyin dokularında çok yüksek miktarlarda bulunur.(51) Karnozinin yıkılımı; iskelet kası, serum, akciğer, karaciğer ve beynin farklı bölgelerinde, farklı konsantrasyonlarda bulunan, spesifik bir dipeptidaz olan karnozinazla gerçekleşmektedir (52)



Şekil 3. Karnozin Sentezi ve Yıkımı (50)

Güçlü bir antioksidan, metal şelatörü, hücre membranı koruyucusu, radyasyona karşı koruyucu (53) ve pH tamponlama yeteneğine sahip bir bileşiktir. Güçlü antioksidan özelliği; güçlü oksijen radikali yokedici ve Fe'e bağlı membran oksidasyonunu önleyici özelliklerine bağlıdır.(54, 55). Beyin, karaciğer, böbrek ve iskelet kasında OH ve süperoksit radikallerini süpürücü etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. (51, 55, 56). Karnozinin oksidatif strese bağlı hastalıklar olan yaşlanma, Alzheimer hastalığı ve diyabetik komplikasyonları önleyebileceği düşünülmektedir. (57, 58, 59).

Tiyoasetamide ve etanole bağlı (60) karaciğer hasarında oksidatif stres parametrelerini düzelttiğine dair çalışmalar mevcuttur (15). Karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarında meydana gelen ışık ve elektron mikroskopik düzeydeki nekroz, apopitoz ve hasarlanmada düzelme ve kaspaz-3 aktivitesinde de azalma sağladığı gösterilmiştir. (55).

Farelerde asetaminofene bağlı karaciğer hasarlanması yapılan bir çalışmada; karnozin ve histidin koruyucu olarak verilmiş; karnozin daha etkili olmak üzere; asetaminofene bağlı artış gösteren, MDA, reaktif oksijen partikülleri (ROP), CYP450, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , Monosit Kemoatraktan Protein-1 (MCP-1) miktarlarında azalma ve asetaminofene bağlı azalma göstermiş olan SOD, katalaz (CAT) ve GSHPx miktarlarında artma sağladığı saptanmıştır (61).

## 2.5. Nitrik Oksit (NO)

Kan damarlarının asetilkolin uygulaması sonrasında endotele bağlı şekilde gevşemesinden sorumlu molekül olarak 1987 yılında keşfedilmiştir (62). Bundan kısa bir süre sonra, damar endotel hücrelerinden köken alan NO'in L-arjinin amino asidinden sentezlendiği gösterilmiştir (63). NO, yarı ömrü birkaç saniye olan, hızla çözünebilen, reaktif ve gaz halinde bir moleküldür.

NO'in birçok etkisi bildirilmiştir. Vasodilatatör, venodilatatör, (-) inotrop, antiagregan, hücre koruyucu, düz kas proliferasyonunun engelleyici, nörotransmitter, nöromodülatör, immün modülatör, mikroorganizma ve tümör hücresi öldürücü etkileri ortaya konmuştur (64).

### 2.5.1. Nitrik Oksidin Biosentezi ve NOS'ın İzofomları

NO, L-arjininden üç farklı NOS enzimi aracılığıyla sentezlenir. İşlevsel yönden etkin olan 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 (BH<sub>4</sub>) kofaktörlerinin yanı sıra, L-arjinin için de bağlanma sahaları vardır.

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. Flavın adenin dinükleotid ve flavin mononükleotid, kalmodulin ve BH<sub>4</sub>, bu süreçte ko-faktör olarak görev yapar (65).

NOS'ın üç izoformu bulunmaktadır. Tip 1:nöronal NOS (nNOS), tip 2: indüklenebilir NOS (iNOS) ve tip 3: endotelial NOS (eNOS). nNOS ve eNOS'a yapısal (cNOS) da denilebilmektedir. Kalsiyuma (Ca) bağımlı olan nNOS ve eNOS, sürekli az miktarda NO sentezlerken; makrofajlar, düz kas hücreleri ve hepatositlerde bulunan iNOS, belirli sitokinlerin uyarısıyla NO üretmektedir.

Fizyolojik şartlarda ortaya çıkan NO sentezinden, büyük ölçüde eNOS ve nNOS sorumludur. Patolojik şartlarda ise, iNOS'ın aracılık ettiği NO üretimi söz konusudur ve sentezlenen NO aynı olduğu halde, üretilen NO miktarı ve üretim süresi farklıdır (66).

Endotel hücrelerindeki asetilkolin ve beyindeki glutamat gibi agonist maddeler, etkiledikleri reseptörler aracılığıyla Ca iyonunda artışa yol açar ve bu yolla, NOS enzimlerini ve NO üretimini etkinleştirir. Ca'daki artış, eNOS ve nNOS gibi Ca bağımlı enzimlerde olduğu gibi kalmodulinin NOS'a daha kararlı bir şekilde bağlanmasını sağlayarak, NO sentezini başlatır (67). Her iki izoform da, kalp-damar ve sinir sistemlerindeki fizyolojik süreçlerde yer almaktadır (65).

Uyarılabilir NO üretimi, esas olarak iNOS ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla kontrol edilmektedir. iNOS istirahat halindeki hücrelerde tespit edilememektedir. Fakat bu enzimin ekspresyonu lipopolisakkaridler, inflamasyona öncülük eden sitokinler, hipoksi ve yabancı DNA veya RNA gibi bazı unsurlar tarafından uyarılabilmektedir. 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 (11).

### 2.5.2. 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 (68). NO'in, lipit peroksidasyonunu hem artırıcı ve hem de engelleyici bir yönü vardır. NO , lipit peroksil radikallerini yakalayıcı işlevi yönüyle lipit peroksidasyonuna ait zincir reaksiyonlarını önleyici etkiye sahiptir. Fakat ortamda süperoksidin bulunması durumunda, NO peroksinitrit sentezine yol açmakta ve lipit peroksidasyonunu başlatıcı etki göstermektedir (69).

Asetaminofen'e bağlı hepatotoksisitede; iNOS enziminin artışı dolayısıyla NO'in artışının lipid peroksidasyonu ve oksidatif strese etkisi açısından yapılan çeşitli çalışmalarda; yüksek dozda asetaminofen dozu sonrası NO'in arttığı, bunun da toksisiteye katkıda bulunduğu düşünülmüştür (70). Nekrotik hücrelerin etrafında tirozin nitrasyonu meydana gelmekte ve bunun da sebebi NO'in bir formu olan peroksinitrittir. Sadece tek bir çalışmada, iNOS inhibitörü L-N-Nitro-arjinin-metil ester (L-NAME) verilerek NO azaltılmasına rağmen serum ALT, AST ve MDA seviyelerinde düzelme görülmemiştir (71). L-NAME verilerek yapılan bir çalışmada ALT, AST seviyeleri düşük bulunmuş ve yeni iNOS inhibitörü ONO-1714 verilerek yapılan bir çalışmada nitrotirozinin immünohistokimyasal olarak azaldığı gösterilmiştir (72). Diğer bir inhibitör aminoguanidin (AG) verilerek yapılan bir çalışmada; NO, asetaminofene bağlı toksisite de önemli bir mediyatör olarak vurgulanmış, AG'in de CYP2E1 enzim miktarını etkilemediği gösterilmiştir (70). Yine Abdel-Zaher ve ark. (73) yaptığı bir çalışmada; asetaminofenden 1 saat öncesi

verilen AG, Kupffer hücre inhibitörü Gadolinyum Klorid (GdCl<sub>3</sub>) veya önceden asetaminofene karşı koruyucu olduğu bilinen triptenoid bileşik, Oleanolik Asit'in (OA) etkileri araştırılmış ve karaciğer dokularında asetaminofene bağlı meydana gelen sentrolobüler nekrozu ve böbrek dokularındaki tübüllerdeki vakuoler dejenerasyonu bütün koruyucuların önlediği gözlemlenmiştir.

## **2.6. Oksidatif Hasar Ve Reaktif Oksijen Partikülleri**

### **2.6.1. Reaktif Oksijen Partikülleri Tanımı**

Elektronlar atomlarda orbital adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. Serbest radikal, atom da veya molekülde çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen partikülleri (ROP)" de denmektedir (74).

### **2.6.2. ROP Sınıflandırılması**

Organizmada pek çok türde ROP oluşabilir (Tablo 1). Ancak en sık olarak lipit yapılarla oluşur. Lipit radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehid grubundan MDA'dir. Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde etki edebilir, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle "reaktif oksijen partikülleri", süperoksit gibi radikaller, ayrıca hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir (75). Oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır. Diğer ROP grubunda ise normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen" bulunmaktadır. Singlet oksijen molekülü yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. Singlet oksijen hücre membranındaki poliansatüre yağ asidleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipit peroksitlerin oluşumuna yol açar.



### **Tablo 1. Reaktif Oksijen Partikülleri**

#### 1 - Radikaller:

Süperoksit radikal ( $O_2^-$ )

Hidroksil radikal ( $OH^-$ )

Alkoksil radikal ( $LO^-$ )

Peroksil radikal ( $LOO^-$ )

#### 2 - Radikal olmayanlar:

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )

Lipit hidroperoksit ( $LOOH$ )

Hipoklorik asit ( $HOCl$ )

#### 3 - Singlet oksijen

### **2.6.3. ROP Kaynakları**

Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada ROP'lar oluşur. İskemi, hemoraji, travma ve radyoaktivite gibi durumlarda mitokondrilerdeki aerobik oksidatif fosforilasyon dengesi etkilenir ve elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları daha fazla olur ve ROP düzeyi artar.

Nötrofiller tarafından kullanılan antibakteriyal savunma mekanizması myeloperoksidaz enzimidir. Süperoksit radikalının dismutasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit, myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla reaksiyona girerek güçlü bir antibakteriyal ajan olan hipoklorik asidi oluşturur. İnfeksiyöz ajanlarla savaş için gerekli olan ROP'lar kan hücreleri tarafından aşırı salgılanacak olurlarsa bu kez yarar yerine zararlı olmaya başlarlar.

NO bir adet çiftlenmemiş elektrona sahiptir ve bu nedenle ROP olarak kabul edilebilir. Vasküler endotelde az miktarda süperoksit radikali sentez yeteneğine de sahiptir. NO ile reaksiyon sonucu oluşabilecek bazı yan ürünler sitotoksik olmasına karşın NO ve süperoksit radikali etkileşiminin damar tonüsü düzenlenmesi üzerine yararlı etkilerinin olduğu da bildirilmiştir (76,77,78).

#### **2.6.4. Antioksidan Savunma**

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir.

Oksidanların organizmadaki düzeylerini arttırıcı etkenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi ve bunlardan uzak durulması ilk yapılması gereken girişim olmalıdır. İkinci girişim ise ROP'larla tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların bir yada birkaç basamağını kırmaktır. Üçüncü mücadele yolu, oluşan mediyatörlerle aktive olan inflamatuvar hücrelerin lezyon yerine hücumunu ve orada aşırı birikimini önlemektir. Oksidan moleküllerle mücadelede üzerinde durulacak esas girişim ise belirli düzeyi aşmış oksidanlara direkt olarak etki edip onları inaktif hale getiren antioksidanlardır.

Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır.

#### **2.6.5. Hücre İçi Ortamda Antioksidan Savunma**

İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar SOD, CAT ve GSHPx enzimleridir. SOD, süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalize eden bir metalloenzimdir. Süperoksit radikallerinin dismutasyonu ile yada direkt olarak oluşan hidrojen peroksit ise GSHPx ve CAT enzimleri tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir.

#### **2.6.6. İn Vivo - Hücre Dışı Ortamda Antioksidan Savunma**

Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır. Bu nedenle hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan minör olarak enzimler, major olarak E ve C vitamini, transferrin, haptoglobin, seruloplasmin, albumin, bilirubin,  $\beta$  - karoten, ürik asit, glukoz, sistein, trakeobronşial mukus ve  $\alpha$  -1 antitripsin sorumludur.

Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli düzeyin üzerinde

oluşur veya antioksidanlar yetersiz olursa yani denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (79).

### **3. MATERYAL ve METOT**

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

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Deney Hayvanları**

Bu çalışmada, toplam 48 adet Wistar albino türü dişi sıçan kullanıldı. Hayvanların grup ağırlıkları, ortalama olarak 120- 125 g arasındaydı. Deney süresince, sıçanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) verildi.

##### **3.1.2. Kullanılan İlaçlar**

Çalışmada, serum fizyolojik içinde çözünmüş halde bulunan 1 g/kg asetaminofen (Sigma), 10 mg/kg melatonin (Sigma) ve 250 mg/kg karnozin (Sigma) çözeltileri kullanıldı.

##### **3.1.3. Biyokimyasal Çalışma İçin Kullanılan Malzemeler**

###### **Total Oksidan Status Tayini İçin Kullanılanlar:**

Rel-Assay TOS kiti

###### **Komponentleri:**

Assay Tamponu (Bileşen 1) =100 ml X 1

Prokromojen solüsyon (Bileşen 2) = 20 ml X 1.

Standart 1 (Blank) Solüsyon (0.0  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equiv./L)= 5 ml.

Standart 2 [Depo Stabilize Standart Solüsyon (SSSS)] (800 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  Equiv./L)= 5 ml.

Sonuçlar Olympus marka AU2700 model otoanalizör ile ölçüldü.

**Total Antioksidan Status Tayini İçin Kullanılanlar:**

Rel-Assay TOS kiti

**Komponentleri:**

Assay Tamponu (Bileşen 1) =100 ml

Renkli ABTS Radikal Solüsyonu (Bileşen 2)= 25 ml

Standart 1 (0.0 mmolTrolox Equiv./L) Solüsyon = 5 ml

Standart 2 (1.0 mmolTrolox Equiv./L) Solüsyon = 5 ml

Sonuçlar Olympus marka AU2700 model otoanalizör ile ölçüldü.

**3.2. Metot****3.2.1. Deney Planı**

Çalışmada, beş deney grubu ve bir kontrol grubu oluşturuldu. Her bir grupta sekizer adet olmak üzere toplam 48 adet sıçan kullanıldı.

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

**Grup II:** 10 mg / kg dozunda melatonin çözeltisi, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

**Grup III:** 250 mg / kg dozunda karnozin çözeltisi, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

**Grup IV:** 1 g / kg dozunda asetaminofen çözeltisi, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

**Grup V:** 1 g / kg dozunda asetaminofen çözeltisi ve 20 dakika sonra 10 mg/ kg dozunda melatonin çözeltisi, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

**Grup VI:** 1 g / kg dozunda asetaminofen çözeltisi ve 20 dakika sonra 250 mg/ kg dozunda karnozin çözeltisi, periton içine enjeksiyon yoluyla verildi.

Deney başlangıcından 24 saat sonra ketamin ve ksilazin anestezisi altında hayvanlardan kan örnekleri alındı ve deney sonlandırıldı. Histokimyasal ve

immünohistokimyasal çalışmalar için karaciğer doku örnekleri alınarak %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Biyokimyasal incelemeler için hayvanların serumları -20°C' ye konulup donduruldu ve daha sonra incelenmek amacıyla homojenize edildi. Elde edilen numuneler analizin yapılacağı tarihe kadar saklandı.

### 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

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
%50	1 saat
%70	1 saat
%80	1 saat
%90	1 saat
%96	1 saat
%100	1 gece

#### B) Şeffaflandırma

Ksilol	10 dakika
--------	-----------

#### 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 3-5 µm kalınlığında kesitler alındı ve hematoksilin-eozin kullanılarak boyama yapıldı. Değerlendirme kör şartlar altında iki kez yapıldı. Boyanan örneklerin incelenmesinde

ve fotoğraflarının çekiminde, Olypus BX-50 tipi binoküler araştırma mikroskobu ve görüntüleme donanımı kullanıldı.

### **Değerlendirme:**

Kontrol ve deney gruplarına ait karaciğer dokularının kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının (80) yapmış oldukları skorlamaya göre değerlendirildi.

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

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

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

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

### **3.2.3. İmmunohistokimyasal Çalışmalar**

#### **a) Kesitlerin elde edilmesi:**

Elde edilen tüm doku örnekleri, % 10'luk formalin solusyonuna alındı. Dokular en fazla 24 saat formalin solusyonunda bekletildi. Daha sonra rutin histolojik yöntemler kullanılarak dokular parafine gömüldü. 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, RB-1605-P1).

Seyreltme çözeltisi olarak, fosfat tampon solüsyonu (PBS) kullanılmıştır. Bu solüsyonun hazırlanışı aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

##### **İkincil Antikor:**

Biyotinize Keçi Anti-Polivalan-Labvision TP-125-BN.

##### **PBS:**

- 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: 16345,Merck): 1,56gr.
- Sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ , 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)

Bu madde, ikincil antikorun substratı olarak kullanıldı.

**Zıt Boyama:**

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

**İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi:**

- 5  $\mu\text{m}$  kalınlığında ede edilen parafin kesitler etüvde 37  $^{\circ}\text{C}$ ' de 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 sitrat tamponu içinde Labvision PT Modulle cihazında 98<sup>0</sup>C de 20 dakika ısıtıldı, 20 dakika oda ısısında soğutuldu.
- Distile sudan geçirildi.
- Dakopen ile çevrelenen dokulara nemli ortamda % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 dakika uygulandı.
- PBS çözeltisinde yıkandı.
- Ultra V blok ile 5 dakika inkübe edildi.
- Dokular 1 saat süreyle oda ısısında primer antikor iNOS ile 1/50'lik dilüsyonda enkübe edildi.
- PBS'de yıkandı.
- İkincil antikor (biyotinize keçi anti-polivalan) 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. Biyokimyasal Çalışmalar

#### Total Oksidan Status Deney Prensi:

Numunedeki oksidanlar ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyon oksitler. Reaksiyon medyumunda bulunan arttırıcı maddeler oksidasyon reaksiyonunu kuvvetlendirirler. Ferrik iyon asidik medyumda bulunan kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Boyanma miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür ve oksidan miktarına bağlıdır. Sonuç hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuç  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equiv./L olarak ölçülür.

#### Total Antioksidan Status Deney Prensi:

Numunedeki antioksidanlar; koyu mavi-yeşil renkteki ABTS radikalini, renksiz ABTSA formuna indirgerler. 660 nm'deki absorbans değişikliği; örnekteki antioksidan miktarı ile ilişkilidir. Vitamin E analogu olan Trolox Equivalent adlı standart antioksidan solüsyonu ile kalibre edilir.

#### Oksidatif Stres İndeksi (OSİ):

Biyokimyasal değerlerin incelenmesinde TOS ve TAS değerlerinden, OSİ (Oksidatif indeks) değeri de hesaplanarak sonuç toplam oksidan durum değerlendirilmesi yapıldı. Hesaplama  $\text{mmol Trolox equivalent/L}$  birimindeki TAS değerlerinin TOS birimine uygun olan  $\mu\text{mol equivalent/L}$  birimine çevrilmesi ile bölme şeklinde yapıldı.

$$\text{OSİ: } [(TOS, \mu\text{mol/L}) / (TAS, \text{mmol Trolox equivalent/L}) \times 100].$$

### 3.2.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS 15.0 for Windows” paket programı kullanılarak yapıldı. Histolojik bulguların analizinde gruplar nonparametrik testlerden “Kruskal - Wallis testi” ile karşılaştırıldı ve iki grup arasındaki ölçüm değerlerinin karşılaştırılmasında “Mann - Whitney U testi” kullanıldı. Anlamlılık değeri %95 Güven Aralığında  $p < 0,05$  olarak alındı.

Biyokimyasal değerlerin istatistiksel analizinde ilk olarak değerlerin normal dağılıma uygunluk testi yapıldı. Skewness ve Kurtosis katsayılarına göre normal dağılıma uygunluk saptandı. Daha sonra dağılımın homojen olup olmadığı

“Homojenite Varyans Testi” ile incelendi. TOS ve OSİ değerlerinin dağılımlarının homojen olduğu, TAS değerlerinin dağılımının homojen olmadığı saptandı. TOS ve OSİ değerlerinin incelenmesinde, değerler homojen dağıldığı için “ANOVA testi”, TAS değerleri karşılaştırılmasında, değerler homojen olmadığı için “Kruskal - Wallis Testi” yapıldı. Post hoc test olarak “Bonferroni testi” kullanıldı. Anlamlılık değeri %99 Güven Aralığında  $p < 0,01$  olarak alındı.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. Histolojik Bulgular**

Kontrol ve deney gruplarına ait karaciğer doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler tablo 2’de, gruplar arasında gözlenen değişikliklerin p değerleri ise tablo 3’te verilmiştir (80).

Histokimyasal değerlendirmelerde, Kontrol grubuna ait sıçanların karaciğer dokuları normal histolojik görünümde izlendi (Resim 1). Melatonin ve Karnozin gruplarına ait sıçanlarda da karaciğer parankimi ve portal alanlar normal olarak gözlemlendi (Resim 2 ve 3). Asetaminofen verilen gruba ait sıçanların karaciğer dokularında önemli histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Bu değişiklikler, hepatositlerde belirgin granüler dejenerasyon, santral ven çevresinde belirgin nekroz ve önemli ölçüde vasküler konjesyon şeklinde izlendi. Ayrıca parankimde, perivasküler ve portal alanlarda orta düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonları ve düşük düzeyde safra kanalı proliferasyonu ve yine düşük düzeyde hepatositlerde piknotik çekirdekler gözlemlendi (Resim 4). Asetaminofen+Melatonin ve Asetaminofen + Karnozin gruplarında ise düşük düzeylerde hepatositlerde granüler dejenerasyon ve vasküler konjesyon dışında bulguya rastlanmadı (Resim 5 ve 6).

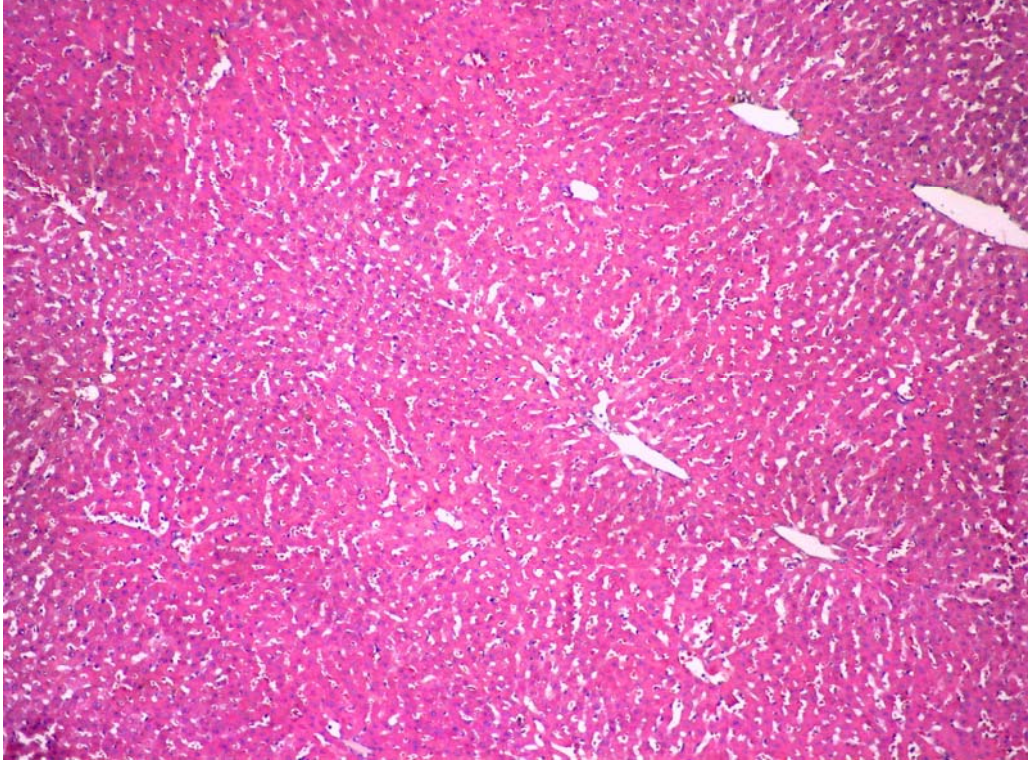
**Tablo 2.** Kontrol ve deney gruplarında gözlenen yapısal değişiklikler ve Kruskal-Wallis p değerleri

Deney Grupları	KONTROL				M (Melatonin)				K (Karnozin)				A (Asetaminofen)				A+M (Asetaminofen+ Melatonin)				A+K (Asetaminofen+ Karnozin)				Kruskall- Wallis P Değerleri	
	-	+	++	+++	O	-	+	++	+++	O	-	+	++	+++	O	-	+	++	+++	O	-	+	++	+++		O
Parametreler/Skor	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	0
Sentrolobüler nekroz	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	P<0,05
İnflamatuvar Hücre infiltrasyonu	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	7	1	0	0	-	P<0,05
Hepatositlerde Granüler Dejenerasyon	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	0	8	0	0	+	P<0,05
Vasküler Konjesyon	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	3	5	0	0	+	P<0,05

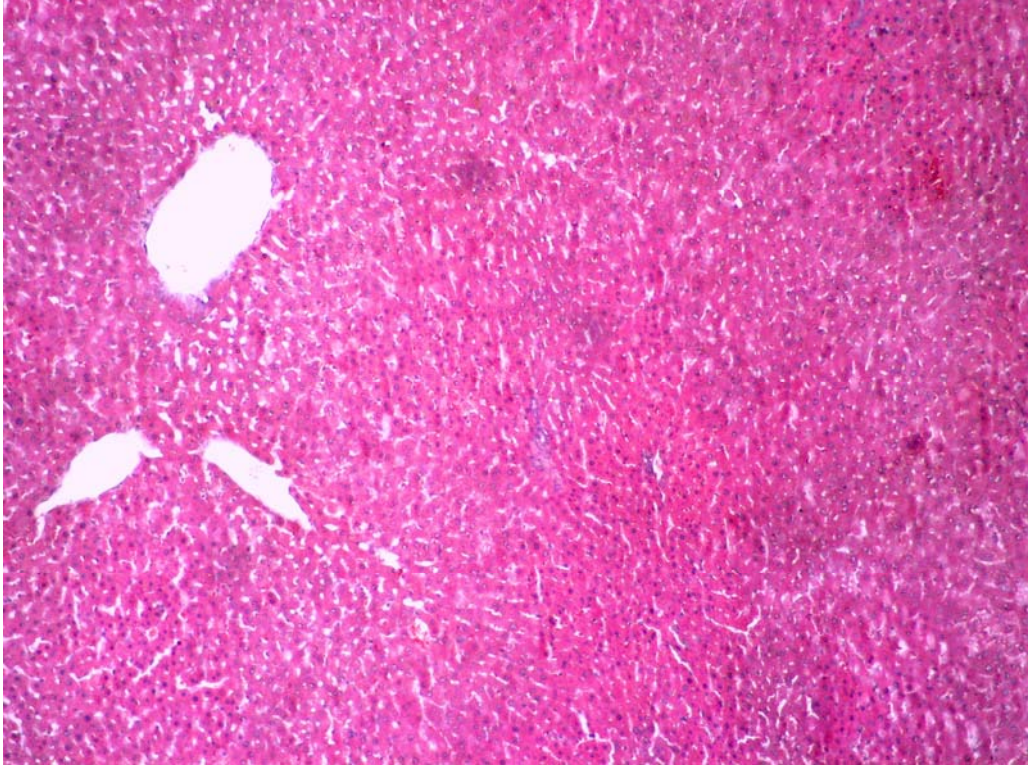
**Tablo 3.** Gruplar Arasında Gözlenen yapısal değişikliklerin Mann-Whitney U testine göre p değerleri

	<b>Sentrolobüler Nekroz</b>	<b>İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu</b>	<b>Hepatositlerde Granüler Dejenerasyon</b>	<b>Vasküler Konjesyon</b>
KONTROL - M	AD	AD	AD	AD
KONTROL - K	AD	AD	AD	AD
KONTROL - A	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
KONTROL - A+M	AD	AD	p<0,01	p<0,01
KONTROL - A+K	AD	AD	p<0,01	p<0,01
M - K	AD	AD	AD	AD
M - A	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
M - A+M	AD	AD	p<0,01	p<0,01
M - A+K	AD	AD	p<0,01	p<0,01
K - A	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
K - A+M	AD	AD	p<0,01	p<0,01
K - A+K	AD	AD	p<0,01	p<0,01
A - A+M	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
A - A+K	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
A+M - A+K	AD	AD	AD	AD

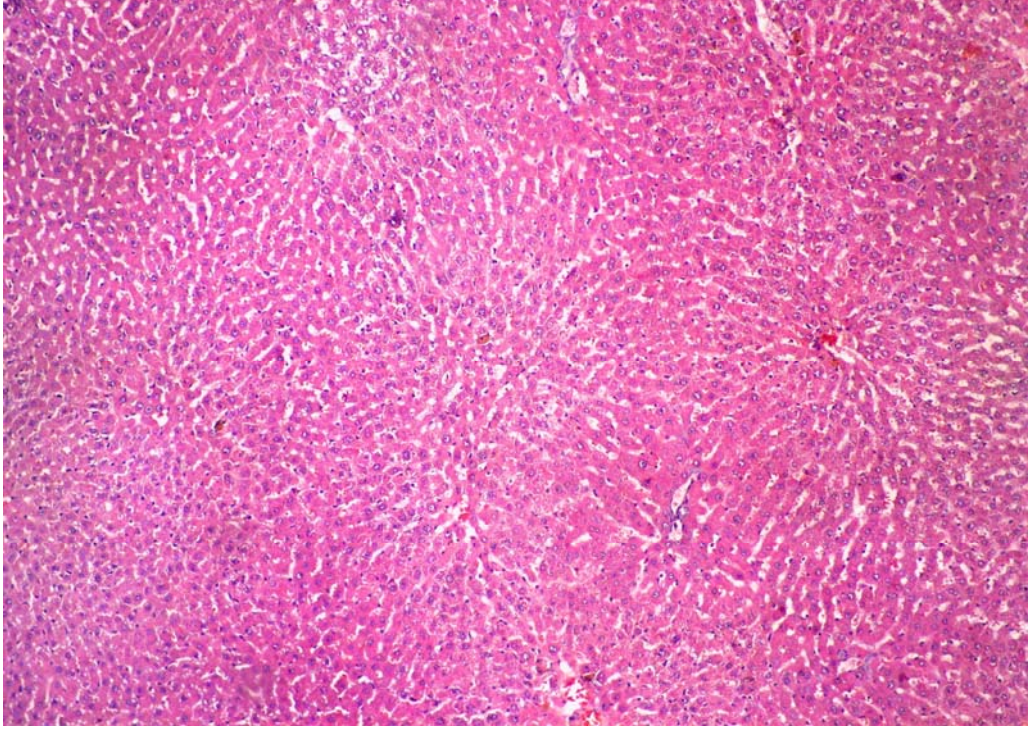
AD: Anlamlı Değil.



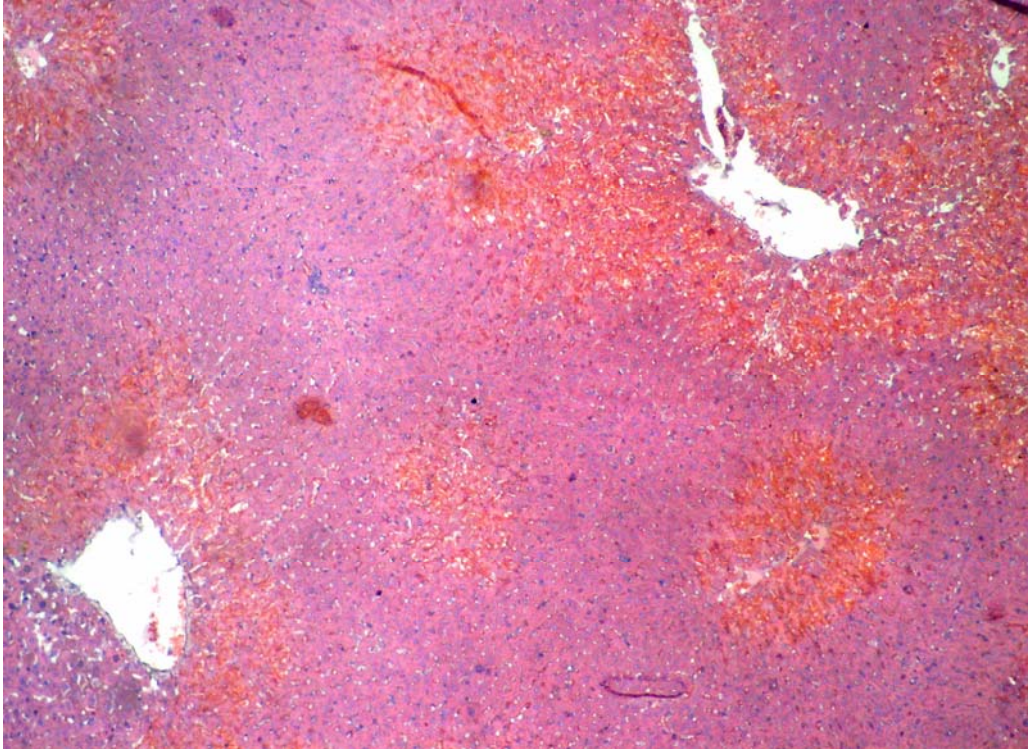
**Resim 1.** Kontrol grubuna ait sıçan KC dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (H-E; x120).



**Resim 2.** Melatonin grubuna ait sıçan KC dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (H-E; x120).

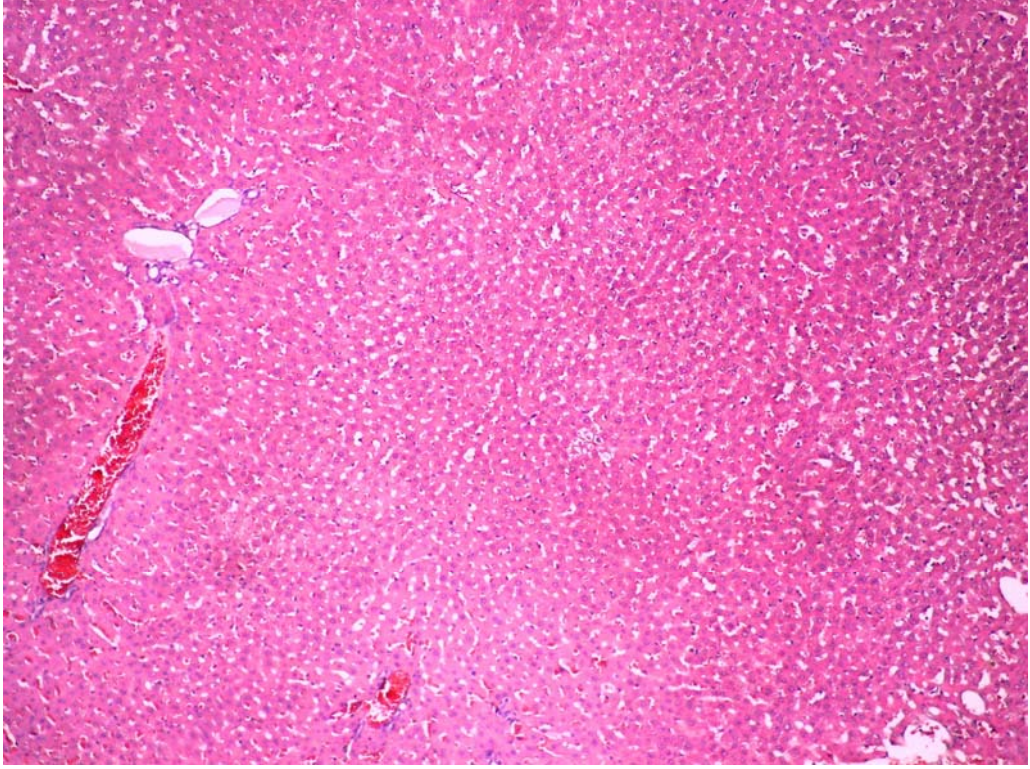


**Resim 3.** Karnozin grubuna ait sıçan KC dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte.(H-E; x120).

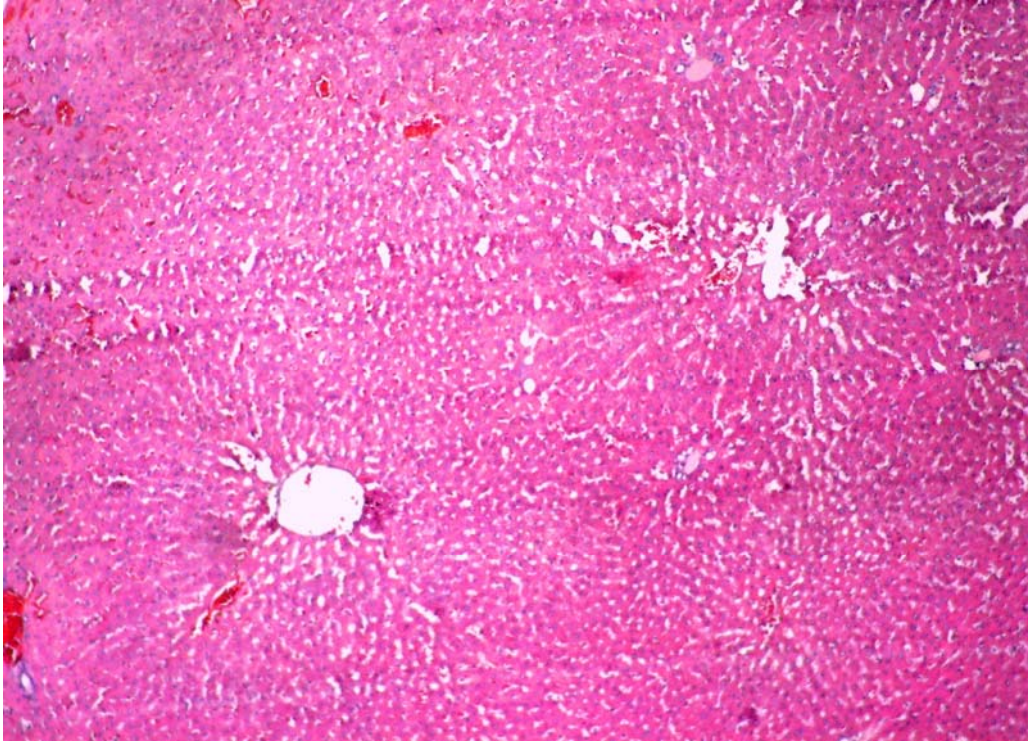


**Resim 4.** Asetaminofen grubuna ait sıçan KC dokusu. Hepatositlerde granüler dejenerasyon, santral ven çevresinde nekroz ve vasküler konjesyon belirgin olarak gözlenmekte (H-E; x120).





**Resim 5.** Asetaminofen + Melatonin grubuna ait sıçan KC dokusu. Hepatositlerde düşük düzeylerde granüler dejenerasyon ve vasküler konjesyon görülmekte (H-E; x120).



**Resim 6.** Asetaminofen + Karnozin grubuna ait sıçan KC dokusu. Hepatositlerde düşük düzeylerde granüler dejenerasyon ve vasküler konjesyon görülmekte (H-E; x120).

## 4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan karaciğer doku kesitlerindeki iNOS reseptör yoğunluklarının belirlenmesinde, yarı nitel değerlendirme yöntemi kullanıldı (81). Bunun için, bu derecelendirme ölçütüne başvuruldu:

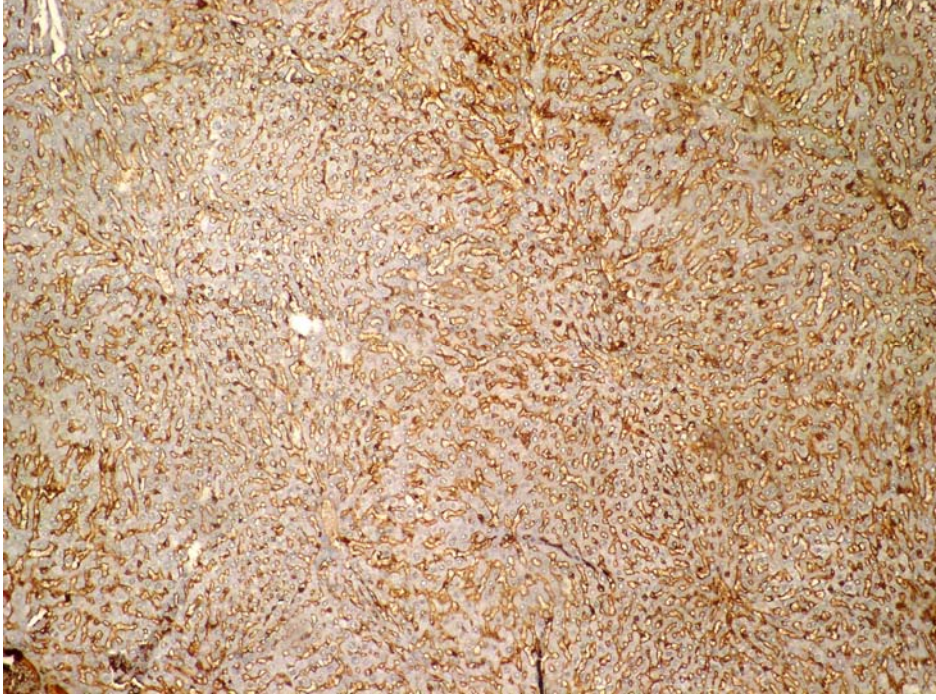
(-): Boyanma yok    (-/+): Çok hafif boyanma    (+): Az boyanma

(++): Orta derecede boyanma    (+++): Yoğun şekilde boyanma

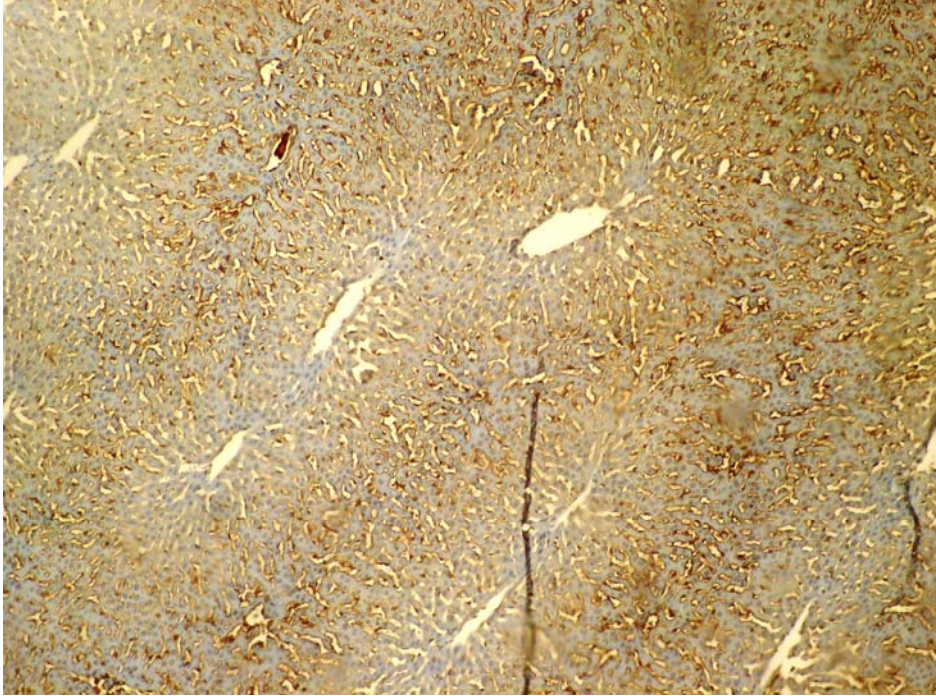
İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde, Kontrol grubuna ait sıçanların karaciğer dokularında santral ven çevresinde iNOS enzimi boyanmasının çok düşük düzeyde olduğu gözlemlendi (Resim 7). Aynı şekilde Melatonin ve Karnozin gruplarında da iNOS ekspresyonu düşük düzeydeydi (Resim 8,9). Asetaminofen grubuna ait hayvanların karaciğer dokularında parankimal alanlarda iNOS boyanmasının daha yoğun olduğu ve özellikle santral ven çevresinde çok yoğun boyandıkları gözlemlendi (Resim 10). Asetaminofen + Melatonin (Resim 11) ve Asetaminofen + Karnozin (Resim 12) gruplarında yer alan sıçanların karaciğer doku örneklerinde ise parankimde ve santral ven çevresinde iNOS enzim boyanmasının düşük düzeyde fakat Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman daha belirgin bir şekilde boyandığı izlendi ( $p<0,05$ ). Fakat bu gruplardaki boyanma düzeylerinin Asetaminofen grubu ile karşılaştırıldığı zaman önemli ölçüde düşük olduğu izlendi ( $p<0,05$ ).

**Tablo 4.** Gruplara göre ortalama iNOS reseptör boyanma dereceleri.

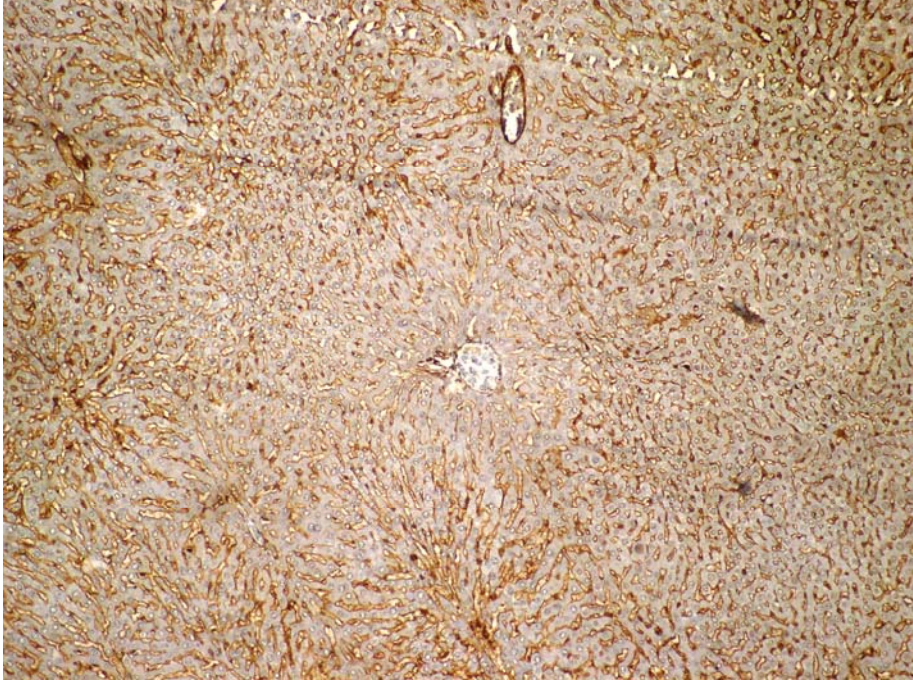
	<b>Kontrol</b>	<b>M</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>A+M</b>	<b>A+K</b>
Boyanma Derecesi	-/+	-/+	-/+	+++	+	+



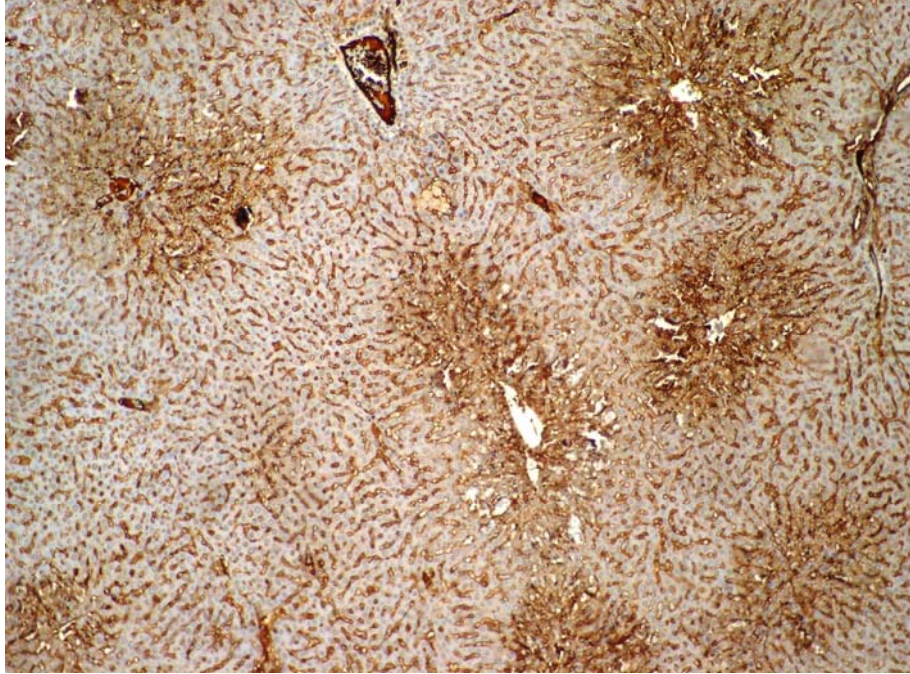
**Resim 7.** Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. Çok düşük düzeyde boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120).



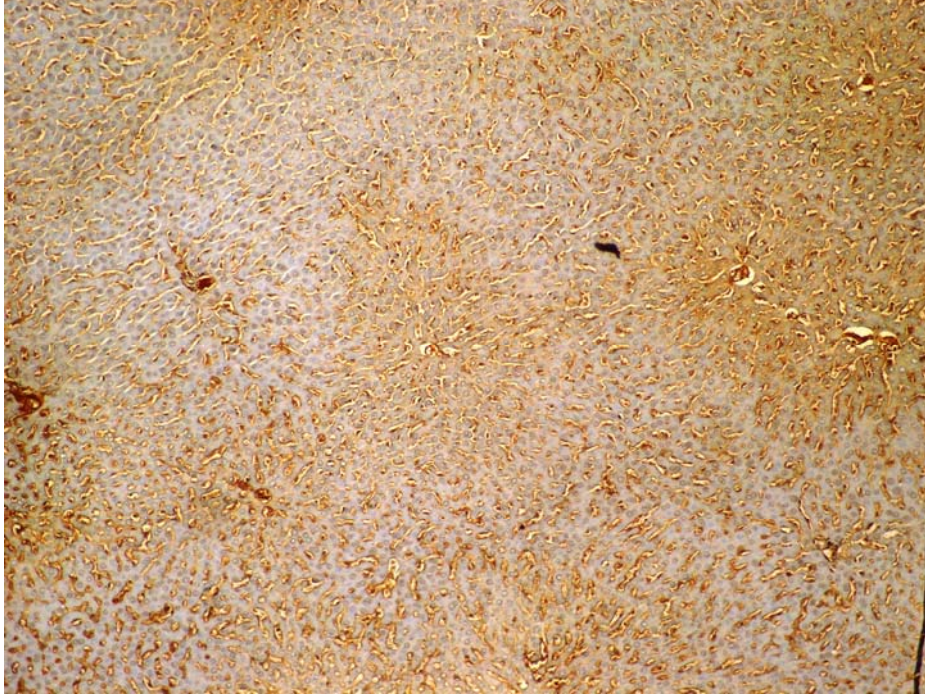
**Resim 8.** Melatonin grubuna ait karaciğer dokusu. Çok düşük düzeyde boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120)



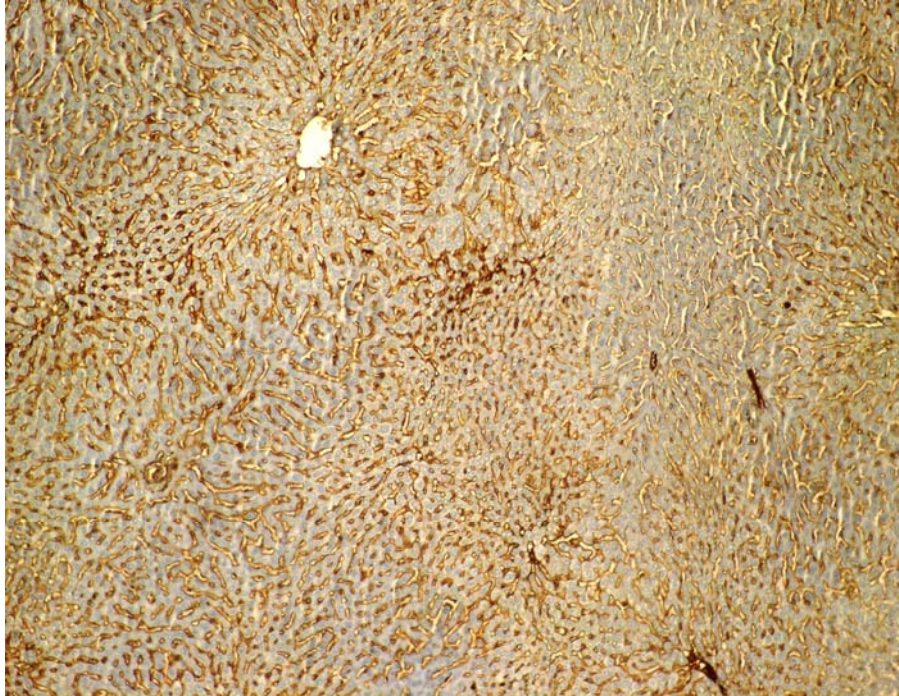
**Resim 9.** Karnozin grubuna ait karaciğer dokusu. Çok düşük düzeyde boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120).



**Resim 10.** Asetaminofen grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevresi alanlarda ve parankimde yoğun boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120).



**Resim 11.** Asetaminofen+ Melatonin grubuna ait karaciğer dokusu. Düşük düzeyde boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120).



**Resim 12.** Asetaminofen+ Karnozin grubuna ait karaciğer dokusu. Düşük düzeyde boyanma görülmekte. (iNOS immün boyama, x120).

### 4.3. Biyokimyasal Bulgular

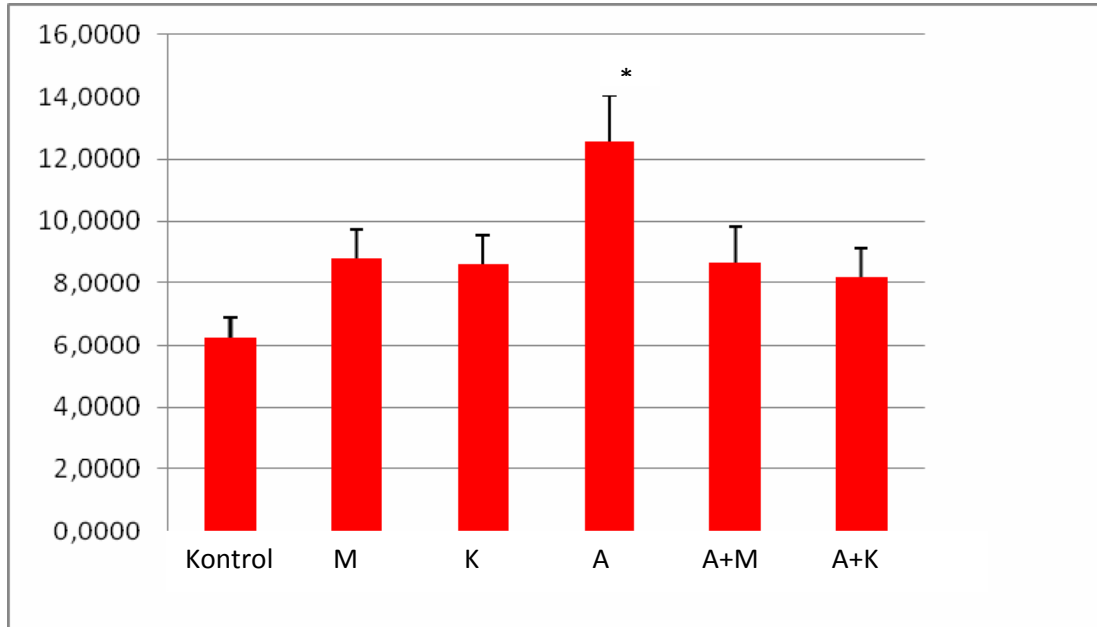
Kontrol ve deney grubu sıçanlara ait TAS, TOS ve OSI değerleri ortalama ve standart sapmaları tablo 5’de verilmiştir. Değerlerin dağılımı grafiklerle gösterilmiştir (Grafik 1., Grafik 2., Grafik 3).

Tüm deney gruplarında belirlenen TAS değerleri Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0,063$ ). Asetaminofen grubunda belirlenen TOS ve OSI değerleri Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (TOS p değeri,  $p=0,026$ ; OSI p değeri,  $p=0,01$ ). Asetaminofen grubunda belirlenen TOS ve OSI değerlerinin diğer deney grupları ile karşılaştırıldığı zaman da anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirlendi ( $p<0,01$ ).

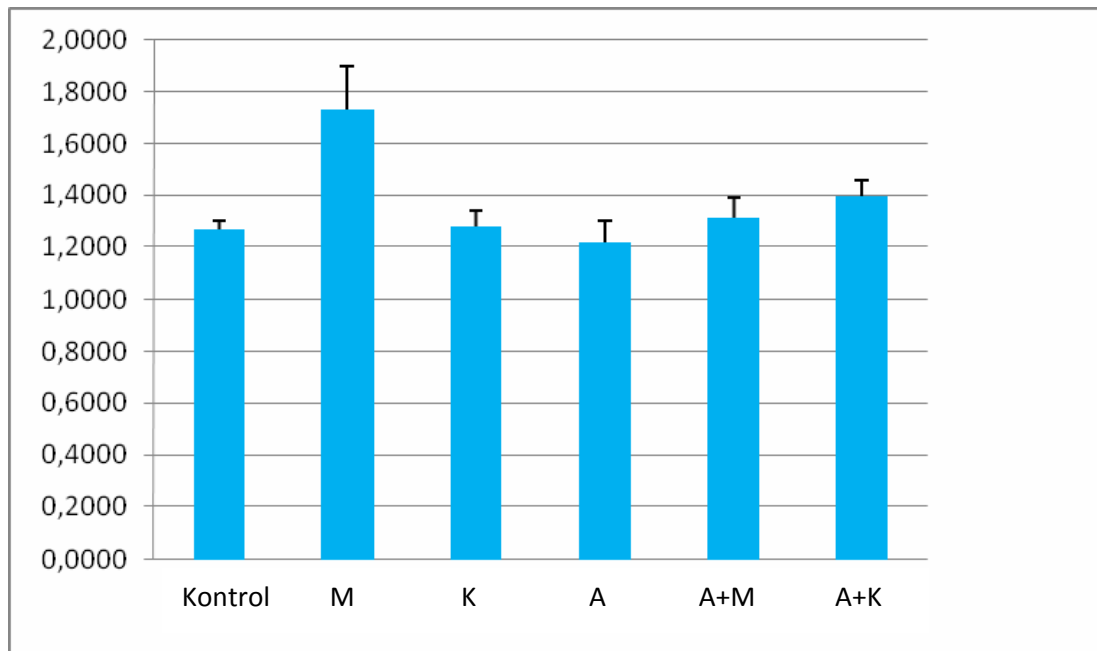
**Tablo 5.** Deney ve Kontrol grubuna ait serumda TOS, TAS ve OSİ düzeylerinin aritmetik ortalamaları

GRUPLAR	TOS	TAS	OSİ
<b>KONTROL</b>	6,2616 ± 0,62724	1,2651 ± 0,03514	0,4956 ± 0,05009
<b>M</b>	8,8114 ± 0,92835	1,7293 ± 0,16857	0,5527 ± 0,08572
<b>K</b>	8,6175 ± 0,93189	1,2780 ± 0,06419	0,6737 ± 0,06855
<b>A</b>	12,5694*± 1,43894	1,2185 ± 0,08302	1,0650* ± 0,14434
<b>A+M</b>	8,6771 ± 1,13267	1,3125 ± 0,07826	0,6696 ± 0,8972
<b>A+K</b>	8,2078 ± 0,90317	1,3979 ± 0,06008	0,5893 ± 0,07030

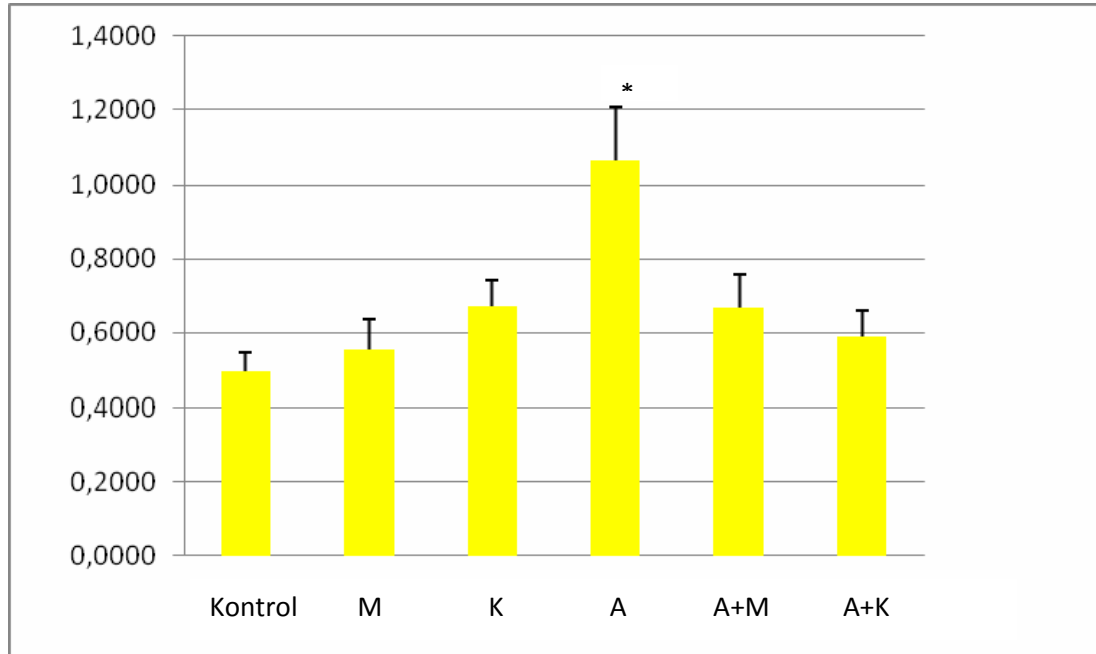
\*=  $p<0,01$



**Grafik 1.** Gruplara ait serum TOS düzeylerinin karşılaştırılması (\*=  $p < 0,01$ )



**Grafik 2.** Gruplara ait serum TAS düzeylerinin karşılaştırılması



**Grafik 3.** Gruplara ait serum OSİ düzeylerinin karşılaştırılması (\*= p<0,01)



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

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 ölümlerine sonuclandığı bildirilmiştir (1).

Asetaminofen (parasetamol), yaygın şekilde kullanılan ateş düşürücü ve ağrı kesici ilaçlardan biridir. Fakat bu ilacın karaciğerde hasarlanma yaparak yetmezliğe yol açtığına dair çok sayıda çalışma vardır (2). Ağır karaciğer hasarlanmasıyla asetaminofen arasındaki ilk bağlantı, 1966 yılında bildirilmiştir (82). Akut karaciğer yetmezliği vakalarının %40 kadarının nedenini asetaminofenin kronik veya akut çok yüksek doz kullanılması oluşturmaktadır (6). Bu ilacın karaciğerde hasarlanmaya yol açtığı tespit edilen dozlarının, tedavi amacıyla kullanılan sınırlar içinde olduğu bilgisi önemlidir (3).

Asetaminofen, bazı kimyasal reaksiyonlar ve karaciğer epitel hücreleri arasında meydana gelen etkileşimler sonucunda, karaciğer dokusunda nekroza yol açmaktadır. Bu ajana, “doğrudan hepatotoksin” de denmiştir (83).

Asetaminofen, karaciğer üzerindeki esas toksik etkilerini N-asetil-p-benzokinin imin (NAPQI) adı verilen ve CYP450 sistemi üzerinden açığa çıkan bir metaboliti aracılığıyla gösterir. Yakın geçmişte yapılan çalışmalarda, bazı sitokinlerin ve NO'nun de bu süreçte rol oynayabileceğine ilişkin veriler elde edilmiştir (6).

Asetaminofenin aşırı dozlarında, glutatyonun azalması ve antioksidan sistemin etkinliğinin azalması sonucu lipid peroksidasyonunda artış olduğu rapor edilmiştir (35, 84). Çalışmamızda da Asetaminofen verilen grupta TOS ve OSI değerleri Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Histokimyasal bulgularımız da asetaminofenin yol açtığı oksidatif stres bulgularını destekliyordu. Asetaminofen verilen grupta hayvanların karaciğer doku kesitlerinde hepatositlerde belirgin granüler dejenerasyon, santral ven çevresinde nekroz ve vasküler konjesyon gözlemlendi. Ayrıca parankimde inflamatuvar hücre infiltrasyonları bulunuyordu.

Asetaminofen'in karaciğer üzerindeki lipit peroksidasyonunu arttırıcı etkisini azaltma maksadıyla çeşitli antioksidanlar denenmiş ve asetaminofenin toksik etkilerine karşı koruyucu etkileri bulunmuştur (84, 85, 86). Ayrıca NO ve iNOS enzim miktarının azaltılmasının asetaminofene bağlı hasarlanmayı azalttığı; asetaminofenin toksik dozu öncesi, AG verilerek hasarlanmaya karşı koruyucu etki bulunarak Gardner ve ark. (70) tarafından gösterilmiştir. Çalışmamızda da, Asetaminofen grubuna ait sıçanların karaciğer dokularında parankimde ve özellikle santral ven çevresindeki alanlarda iNOS reseptörlerinin çok yoğun bir şekilde boyandıklarını, buna karşılık Asetaminofen + Melatonin ve Asetaminofen + Karnozin gruplarında iNOS ekspresyonlarının düşük düzeylerde olduğunu gözlemledik. NO'nin asetaminofene bağlı oluşan oksidatif strese cevap olarak yüksek dozda salındığını ve toksik etkileri arttırıcı etkisinin olabileceğini düşünmekteyiz. Asetaminofene bağlı olarak oluşan oksidatif hasarda Melatonin ve Karnozin ilave edilen gruplarda düzelmeye gözlenmesi, verilen antioksidanların asetaminofene bağlı artış gösteren lipit peroksidasyonunu azalttığını göstermiştir.

Melatonin bilinen en güçlü antioksidanlardır. Melatoninin böbrekte ve karaciğerde asetaminofene bağlı artan lipit peroksidasyonunu azalttığı, asetaminofenin azalttığı GSH seviyelerini yükselttiği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. (14, 49).

Karnozin insan vücudunda doğal olarak bulunan bir dipeptiddir. Karnozinin karaciğerde tiyoasetamide bağlı karaciğer hasarını ve iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı karaciğer hasarını azaltıcı etkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.(15, 55). Karnozin ile histidin, karnozinin etkileri daha güçlü olmakla birlikte akut asetaminofen toksisitesine karşı karaciğere koruyucu etkili oldukları; asetaminofene bağlı azalış gösteren hepatik GSH, askorbik asit seviyeleri, GSHPx, CAT, SOD seviyelerini arttırdıkları, artış gösteren MDA, ROP, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1 seviyelerini azaltarak lipit peroksidasyonunu azalttıkları belirtilmiştir (61) Ratlarda iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı oluşan karaciğer hasarına karşı, karnozin ve melatoninin koruyucu etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; karnozinin lipit peroksidasyonunu daha fazla azalttığı ve daha etkili olduğu gösterilmiştir (56).

Sonuç olarak, asetaminofen karaciğer hasarı oluşturmaktadır. Yaptığımız bu çalışmada melatonin ve karnozinin bu hasarı önlediğini gördük. Oksidan durumun total sonuç durumunu gösteren oksidatif stres indeksinin (OSİ) , asetaminofen sonrası karnozin verilen grupta daha düşük olması dolayısıyla karnozinin asetaminofene bağlı karaciğer hasarını düzeltici etkilerinin melatonine göre daha fazla olduğu sonucuna vardık. Bu verilere dayanarak, özellikle intihar amaçlı çok yüksek doz asetaminofen alan vakalarda meydana gelen toksik tesirlerin önlenmesinde, özellikle karnozin olmakla birlikte melatoninin de tedavi protokolüne eklenmesinin yarar sağlayacağını ummaktayız.

## ÖZET

### **Karnozin ve Melatoninin Asetaminofen Aracılı Akut Karaciğer Toksisitesi Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması**

Asetaminofen , dünya çapında yaygın şekilde kullanılan ateş düşürücü ve ağrı kesici ilaçlardan biridir. Fakat bu ilacın karaciğerde hasarlanma yaparak yetmezliğe yol açtığına dair çok sayıda çalışma vardır. Melatonin bilinen en güçlü antioksidanlardan olan bir hormundur. Karnozin güçlü antioksidan özellikleri gösterilmiş bir dipeptiddir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada; asetaminofenin, sıçanların karaciğer dokusunda meydana getirdiği yapısal değişikliklere, karnozin ve melatoninin etkilerini karşılaştırmayı amaçladık.

48 adet Wistar albino dişi rat rastgele 6 eşit gruba bolündü. Gruplar; Kontrol, Asetaminofen (1 g/kg, i.p, tek doz), Melatonin (10 mg/kg, i.p, tek doz), Karnozin (250 mg/kg, i.p., tek doz), Asetaminofen + Melatonin ve Asetaminofen + Karnozin olacak şekilde planlandı. Deney sonunda serum Total Antioksidan Status (TAS), Total Oksidan Status (TOS) değerleri ölçüldü ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI) değerleri hesaplandı. Karaciğer dokularının histolojik incelemesi yapıldı ve immünohistokimyasal olarak karaciğerde indüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) enzimi miktarına bakıldı.

Histolojik olarak, Asetaminofen grubunda sıçan karaciğer dokusunda oluşan santral ven çevresi nekrozun ve hasarlanmanın; Asetaminofen+Melatonin ve Asetaminofen+Karnozin gruplarında belirgin azalma gösterdiği gözlemlendi. iNOS enzim miktarının Asetaminofen grubunda çok fazla boyanma göstererek, artış gösterdiği görüldü. Asetaminofen+Karnozin ve Asetaminofen+Melatonin gruplarında boyanma miktarı, Kontrol grubuna göre artmış olmasına rağmen, Asetaminofen grubuna göre daha az miktarda olduğu tespit edildi. Asetaminofen grubunda meydana gelen TOS ve OSI artışının, diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gösterdiği gözlemlendi. Bu azalış miktarı, Asetaminofen+Karnozin grubunda diğer gruplara göre daha fazlaydı. Sonuç olarak; yüksek doz asetaminofenin rat karaciğer dokusu üzerine olan toksik etkilerinin önlenmesinde karnozinin düzeltici etkilerinin melatonine göre daha fazla olduğu sonucuna ulaştık.

**Anahtar Kelimeler:** Asetaminofen, Karnozin, Melatonin, Karaciğer, Oksidatif doku hasarı.

## SUMMARY

### **Evaluation of the Effects of Carnosine and Melatonin on Acetaminophen Induced Acute Liver Toxicity**

Acetaminofen, is the most common using pain and fever reducing medical agent worldwide. But there is a lot of study, suggesting this medicine makes suffering of liver via liver damage. Melatonin, which is a famous powerful antioxidant, is a hormone. Carnosine is a powerful antioxidant dipeptide. In our study; our goal was to compare melatonin and carnosine for their effects on Acetaminophen's damage on rat liver tissue.

48 Wistar albino female rats were randomly divided into six equal groups. Groups planned as: Control, Acetaminophen (1 g/kg, i.p. , single dose), Melatonin (10 mg/kg, i.p., single dose), Carnosine (250 mg/kg, i.p., single dose), Acetaminophen+Melatonin and Asetaminofen+Carnosine. At the end of the study; Serum Total Oksidant Status (TOS) and Total Antioxidant Status (TAS) levels measured and Oxidative Stress Index (OSI) values calculated. Liver tissue samples examined histologically and the amount of liver tissue's inducible Nitric Oxide Sentase (iNOS) enzyme, examined immunohistochemically.

In histological exammination; damage and sentrolobuler necrozis in the rat liver tissues of the Acetaminophen group's, decreased in the Asetaminophen+Melatonin and the Asetaminophen+Carnosine groups, distinctly. In the Acetaminophen group, iNOS receptor range increased. In the Acetaminophen+Melatonin and the Asetaminophen+Carnosine groups, a little more staining were present when compared to the Control group and this staining is very low than the staining of the Acetaminophen group's. The more increased values of TOS and OSI parameters in the Acetaminophen group, decreased statistically significant in the other groups. This decrease is especially seen in the Acetaminophen+Carnosine group. We have concluded that; about preventing high doses of acetaminophen's toxic effects in the rat liver tissues, carnosine has powerful effects than melatonin.

**Key Words:** Acetaminophen, Melatonin, Carnosine, Liver, Oksidative Tissue Damage.

## KAYNAKLAR

- 1- Eren M, Saltık-Temizel İN, Koçak N. İlaça bağlı hepatotoksisite. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2004; 47: 222-7.
- 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: 1141-8.
- 3- Black M. Acetaminophen Hepatotoxicity. *Ann Rev Med* 1984; 35: 577-93.
- 4- 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, 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.
- 5- Goodman LS, Gilman A. The Pharmacological Basis of Theurapeutics. Eight Edition. *New York: Permagon Press* 1991; (1): 656-9.
- 6- Wallace JL. Acetaminophen hepatotoxicity: NO to the rescue. *Br JPharmacol* 2004; 143: 1-2.
- 7- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
- 8- 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.
- 9- Hodgson PD, Renton KW. The role of nitric oxide generation in interferonevoked cytochrome P450 down-regulation. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17: 995-1000.
- 10- Nussler AK, Beger H-G, Liu ZZ, Billiar TR. Nitric oxide, hepatocytes and inflammation. *Res Immunol* 1995; 146: 671-7.
- 11- 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-a and interferon- $\alpha$ . *J Pathol* 1991; 165: 247-53.
- 12- 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.
- 13- Sener G, Sehirli AO, Satiroğlu H, Keyer-Uysal M, C Yeğen B. Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns*. 2002 Aug;28(5):419-25.
- 14- Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Somay A, Ozcan L, Otüncemur A, Simsek A, Mete F. Melatonin prevents acetaminophen-induced nephrotoxicity in rats. *Int Urol Nephrol* 2009;41(3):695-702. Epub 2009 Jan 1.
- 15- Mehmetçik G, Ozdemirler G, Koçak-Toker N, Cevikbaş U, Uysal M. Role of carnosine in preventing thioacetamide-induced liver injury in the rat. *Peptides* 2008 Mar;29(3):425-9. Epub 2007 Nov 22.

- 16- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D.; Oxygene radicals and human disease. *Ann. Intern. Med* 107: 526-45, 1987.
- 17- Miller, NJ et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84: 407-12 (1993).
- 18- Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology 10th Edition. *New York: McGraw Hill Companies Inc* 2003; 332-44.
- 19- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology A Text and Atlas. Fourth Edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2003; 532-48.
- 20- BrandonG.<http://www.pharmweb.net/pwmirror/pwy/paracetamol/pharmwebpicm.html>.  
*Norfolk, UK: Paracetamol Information Centre* (26/ 09/ 2008).
- 21- <http://www.tylenolprofessional.com/tylenolprofessional/pharmacology.html> 26/09/ 2008.
- 22- 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.
- 23- Farrell GC. The hepatic side effects of drugs. *Med J Aust* 1986; 145: 600-4.
- 24- Botting RM. Mechanism of action of acetaminophen: Is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis* 2000; 31(5): 202-10.
- 25- Kayaalp O.S. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 11. Baskı 2.Cilt 849-850 *Hacettepe-Taş* 2005.
- 26- Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology 10th Ed. *New York: McGraw Hill Companies Inc* 2007; 591-2.
- 27- Milton AS, Wendlandt S. A possible role for prostaglandin E<sub>1</sub> as a modulator for temperature regulation in the central nervous system of the cat. *J Physiol* 1970; 207: 76-7.
- 28- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971; 231: 232-5.
- 29- 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.
- 30- 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.
- 31- 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.
- 32- 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.
- 33- Tenenbein M. Acetaminophen: the 150 mg/kg myth. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004; 42 (2): 145-8.

- 34- Blair IA, Boobis AR, Davies Ds, Creps RM. Synthesis and reactivity of NAPQI. *Tetrahedron Lett* 1980; 21: 4947-50.
- 35- Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1987; 18(1): 27-79.
- 36- Sigala F, Theocharis S, Sigalas K, Kyroudis M.S., Papalabros E, Triantafyllou A, Kostopanagiotou G, Andreadou I. Therapeutic value of melatonin in an experimental model of liver injury and regeneration. *J. Pineal Res* 2006; 40: 270-9.
- 37- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochem Pol* 2003; 50: 1129-46.
- 38- Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian Journal Medicine Biology Research* 1993, 26: 1141-55.
- 39- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stres. *Journal of Biomedical Science* 2000; 7: 444-58.
- 40- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neuroscience Biobehavioral Rev* 1993, 17: 347-57.
- 41- Benot S, Molinero P, Soutto M, Goberna R, Guerrero JM Circadian variations in the rat serum total antioxidant status: correlation with melatonin levels. *J Pineal Res* 1998 Aug;25(1):1-4.
- 42- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept.* 2000 May-Aug;9(3-4):137-59.
- 43- Meki A-RMA, Hussein A. Melatonin reduces oxidative stres induced ochratoxin A in rat liver and kidney. *Comp Biochem Physiol Part C* 2001; 130:305-13.
- 44- Sharma S, Rana SV Melatonin inhibits benzene-induced lipid peroxidaton in rat liver. *Arh Hig Rada Toksikol* 2010 Mar 1;61 (1) : 11-8.
- 45- Ogeturk M, Kus I, Kavakli A, Zararsiz I, İlhan N, Sarsılmaz M. Effects of melatonin on carbontetrachloride-induced changes in rat serum. *J Physiol Biochem* 2004: 60: 205-10.
- 46- Zavodnik LB, Zavodnik IB, Lapshina EA, Belonovskaya EB, Martinchik DI, Kravchuk RI, Bryszewska M, Reiter RJ. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. *Cell Biochem Funct* 2005 Sep-Oct;23(5):353-9.
- 47- Wang H, Wei W, Wang NP, Gri SY, Wu L, Sun WY, Xu SY. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sci* 2005 Aug 26,77 (15): 1902-15.
- 48- Rodriguez-Reynoso S, Leal C, Portilla E, Olvares N, Muniz J. Effects of exogenous melatonin on hepatic energetic status during ischemia/reperfusion: possible role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J Surg Res* 2001 Oct; 100 (2) : 141-9.
- 49- Matura T, Nishida T, Togawa A, Horie S, Kusumoto C, Ohata S, Nakada J, Ishibe Y, Yamada K, Ohta Y. Mechanisms of protection by melatonin against acetaminophen-induced liver injury in mice. *J. Pineal Res* 2006; 41: 211-9.
- 50- Quinn PJ, Boldyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine: its properties, function and potential therapeutic applications. *Mol Aspects Med* 1992; 13: 379-444.



- 51-Boldyrev AA, Gallant SC, Sukhich GT. Carnosine, the protective, anti-aging peptide. *Biosci Rep* 1999; 19: 581-7.
- 52-Boldyrev AA. Carnosine and Oxidative Stress in Cells and Tissues. E-Kitap, NY Nova Publ, USA, 2007.
- 53-Kudriashov IuB, Deev LI, Goncharenko EN, Baizhumanov AA, Graevskaia EE, Naumova OV, Platonov AG. Radioprotective properties of carnosine *Radiats Biol Radioecol* 1999 Mar-Jun;39(2-3):268-71.
- 54-Gariballa, S.E., Sinclair, A.J. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. 2000. *Age Aging* 29,207-10.
- 55-Fouad A, El-Rehany M.A., Maghraby H.K. The hepatoprotective effect of carnosine against ischemia/reperfusion liver injury in rats. *European Journal of Pharmacology* 572 (2007) 61-68.
- 56-Baykara B, Tekmen I, Pekcetin C, Ulukus C, Tuncel P, Sagol O, Ormen M, Ozogul C. The protective effects of carnosine and melatonin in ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Acta histochemica* 111 (2009) 42-51.
- 57-Hipkiss AR. Would carnosine or a carnivorous diet help suppress aging and associated pathologies? *Ann NY Acad Sci* 2006;1067:369-74.
- 58-Hipkiss AR. Could carnosine or related structures suppress Alzheimer's Disease? *J Alzheimers Dis* 2007;11: 229-40.
- 59-Lee Y, Hsu C, Lin M, Yin M. Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *Eur J Pharmacol* 2005;513:145-50.
- 60-Artun B, Küskü-Kiraz Z, Gulluoglu M, Cevikbas U, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine pretreatment on oxidative stress and hepatotoxicity in binge ethanol administered rats. *Hum Exp Toxicol*.2010 Jan 11.
- 61-Yan S, Wu S, Yin M, Chen H, Chen H. Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. *Journal of Food Science* vol 74. Nr. 8,2009.
- 62-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: 9265-9.
- 63-Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-6.
- 64-Gürdal F, Ademoglu E. *Biyokimya. Nobel Kitap Evi*. Ankara, 746-747, 2005.
- 65-Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
- 66-Laskin DL, Rodriguez del Vale 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.
- 67-Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-5.
- 68-Akkus İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimoza Yayınları*. Konya. 1995.

- 69- Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411(2-3): 378-84.
- 70- Gardner C.R., Heck D, Yang C.S., Thomas P, Zang X, DeGeorge G, Laskin J, Laskin D. Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology* Vol. 27, No. 3, 1998 748-54.
- 71- Hinson J, Bucci T, Irwin L.K., Michael S.L., Mayeux P.R. Effect of Inhibitors of Nitric Oxide Synthase on Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice NITRIC OXIDE: *Biology and Chemistry* Vol 6, No. 2, pp. 160–7 (2002).
- 72- Kamanaka Y, Kawabata A, Matsuya H, Taga C, Sekiguchi F, Kawao N. Effect of a potent iNOS inhibitor (ONO-1714) on acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Life Sciences* 74 (2003) 793–802.
- 73- Abdel-Zaher A, Abdel-Rahman M, Hafez M, Omran F. Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicology* 234 (2007) 124–34.
- 74- Halliwell B. Drug antioxidant effects. *Drugs* 1991; 42(4):569 - 605.
- 75- McCord J. Human disease, free radicals and the oxidant /antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26: 351-7.
- 76- Saran M, Michel C, Bors W. Reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res* 1990; 10: 221 - 6.
- 77- Lowenstein C, Dinerman J, Snyder S. Nitric Oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120:227-37.
- 78- Grozdanovic Z, Briining G, Baumgarten H. Nitric Oxide: A novel autonomic neurotransmitter. *Acta Anat* 1994; 150: 16-24.
- 79- Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997;3-4: 92-5.
- 80- A. Abdel-wahhab, s. A. Nada and m. S. Arbid, Ochratoxicosis: Prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats m. *Journal of applied toxicology. J. Appl. Toxicol* 19, 7–12 (1999).
- 81- 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.
- 82- Davidson DGD, Eastham WN. Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *Br Med J* 1966; 2: 497-9.
- 83- 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.
- 84- Şener G, Şehirli A. S., Dülger G.A. Protective effects of melatonin, vitamin E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. *J. Pineal Res* 2003; 35: 61-8.
- 85- Chen Y, Lin F, Liu P, Huang Y, Chiu J, Chang Y, Man K, Hong C, Ho Y, Lai M. Antioxidative and Hepatoprotective Effects of Magnolol on Acetaminophen-induced Liver Damage in Rats. *Arch Pharm Res* Vol 32, No 2, 221-8, 2009.

- 86- Abdel-Zaher A. O., Abdel-Hady R. H. ,Mahmoud M. M., Farrag M. M. The potential protective role of alpha-lipoic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage.*Toxicology* 243 (2008) 261–70.