



**YENİ NESİL ANTİEPİLEPTİK İLAÇLARIN  
*İN VİTRO* HEPATOTOKSİSİTELERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Sırma GİRİTLİ**

**Eskişehir 2019**

**YENİ NESİL ANTİEPİLEPTİK İLAÇLARIN *İN VİTRO*  
HEPATOTOKSİSİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Sırma GİRİTLİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. BÜLENT ERGUN**

**Eskişehir**




**Anadolu Üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Ağustos 2019**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sırma GİRİTLİ'nin "YENİ NESİL ANTİEPİLEPTİK İLAÇLARIN *İN VİTRO* HEPATOTOKSİSİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı tezi 09/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Yüksek Lisans Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Bülent ERGUN	
Üye	: Doç. Dr. Sinem ILGIN	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Volkan KILIÇ	

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü



## ÖZET

### YENİ NESİL ANTİEPİLEPTİK İLAÇLARIN *İN VİTRO* HEPATOTOKSİSİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sırma GİRİTLİ

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı  
Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2019

Danışman: Doç. Dr. Bülent ERGUN

Gabapentin ve pregabalin epilepsi ve nöropatik ağrı tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Güvenli advers etki profilleri nedeni hepatik yetmezliği olan epilepsi hastalarının tedavisinde tercih edilmelerine rağmen gabapentin ve pregabalin tedavisi ile ilişkilendirilmiş hepatik hasar vakaları bulunmamaktadır. Bu noktadan hareketle tez çalışması kapsamında, gabapentin ve pregabalinin *in vitro* HepG2 hücre modeli kullanılarak hepatotoksitenin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla HepG2 hücrelerinde ajanların sitotoksik etkileri, apoptotik/nekrotik etkileri ve ALT, AST, total bilirubin ve üre gibi hepatik biyogöstergelerin seviyeleri değerlendirilmiştir. Ek olarak HepG2 hücrelerinde ajanlara maruziyeti takiben reaktif oksijen türlerinin seviyesi ölçülmüştür. Sonuçlara göre, gabapentin ve pregabalin uygulanan hücrelerde hücre canlılığı azalmış ve apoptotik hücre ölümü indüklenmiştir. Kültür ortamında AST seviyesi gabapentin ve pregabalin uygulanan gruplarda artmıştır. Ayrıca pregabalin uygulaması HepG2 hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin seviyesinin artmasına neden olmuştur. Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda *in vitro* gabapentin ve pregabalin maruziyeti hepatotoksiste ile ilişkilendirilebilecek etkilere neden olduğu söylenebilir.

**Anahtar Sözcükler:** Gabapentin, Pregabalin, Hepatotoksiste, HepG2 hücreleri, Sitotoksiste, Apoptotik/Nekrotik hücre ölümü, Biyokimyasal parametreler, Reaktif oksijen türleri.

## ABSTRACT

### YENİ NESİL ANTİEPİLEPTİK İLAÇLARIN İN VİTRO HEPATOTOKSİSİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sırma GİRİTLİ

Department of Pharmaceutical Toxicology  
Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bülent ERGUN

Gabapentin and pregabalin are frequently used in the treatment of epilepsy and neuropathic pain. Although they are preferred in the treatment of epileptic patients with hepatic insufficiency because of their safe profiles, there are reported cases of hepatic damage associated with gabapentin and pregabalin treatment. Therefore, potential hepatotoxic effects of gabapentin and pregabalin were aimed to evaluate using *in vitro* HepG2 cell model in our study. For this purpose, cytotoxic effects, apoptotic / necrotic effects and levels of hepatic biomarkers such as ALT, AST, total bilirubin and urea in HepG2 cells were evaluated. In addition, the level of reactive oxygen species was measured in HepG2 cells following exposure to agents. According to our results, decreased cell viability and induced apoptotic cell death were determined in gabapentin and pregabalin applied. According to our results, gabapentin and pregabalin applied to cells decreased cell viability and induced apoptotic cell death. AST levels in culture medium increased in gabapentin and pregabalin applied to cells. In addition, pregabalin administration caused an increase in the level of reactive oxygen species in HepG2 cells. In conclusion, it could be said that *in vitro* gabapentin and pregabalin exposure may cause hepatotoxicity in our study.

**Keywords:** Gabapentin, Pregabalin, Hepatotoxicity, HepG2 cells, Cytotoxicity, Apoptotic/Necrotic cell death, Biochemical parameters, Reactive oxygen species.

## TEŞEKKÜR

Hazırlamıő olduğum bu yüksek lisans tezinin her aőamasında bana destek olarak yol gösteren Hocalarım tez danıőmanım Doç. Dr. Bülent ERGUN'a, Doç. Dr. Sinem ILGIN'a ve Doç. Dr. Özlem ATLI EKLİOğLU'na; deneyler sırasında tecrübe ve bilgilerini paylaőarak deneysel çalışmalarda büyük emekleri olan Araő. Gör. Merve BAYSAL'a ve Araő. Gör. Abdullah Burak KARADUMAN'a; lisansüstü eğitimimi tamamlamamda motivasyon kaynağım olması yanında tez çalıőmama katkılarından dolayı eőim Ersem GİRİTLİ'ye en içten teőekkürlerimi sunarım.



09/08/2019

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığımı ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

  
Sırma Giritli

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ .....	3
2.1. İİKH ile İlgili Genel Bilgiler.....	3
2.1.1. İİKH'nin klinik bulguları .....	3
2.1.2. İİKH biyogöstergeleri .....	4
2.1.3. İİKH'nin mekanizmaları .....	5
2.1.3.1. İnterinsik İİKH .....	6
2.1.3.2. İdiyosenkratik İİKH .....	7
2.1.3.3. İİKH patogeneğinde rol oynayan diğer mekanizmalar.....	8
2.1.3.4. Kolestatik İİKH Mekanizmaları .....	8
2.1.4. İİKH'a duyarlılıkta etiyolojik risk faktörleri .....	9
2.1.4.1. Yaş ve cinsiyet.....	9
2.1.4.2. İlacın dozu ve maruziyet süresi.....	10
2.1.4.3. Genetik faktörler .....	10
2.1.4.4. Kronik karaciğer hastalığının varlığı.....	11
2.1.4.5. Diğer faktörler .....	11
2.1.5. İİKH'nin diagnozu.....	11
2.2. Epilepsi ve Epilepsinin Tedavisi .....	13
2.2.1. Antiepileptik ilaçların sınıflandırılması .....	14
3. GEREÇLER .....	16
3.1. Kullanılan Maddeler .....	16
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	16



<b>4. YÖNTEMLER .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Hücrelerin Çoğaltılması.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2. Hücrelere MTT Sitotoksosite Testinin Uygulanması .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3. Apoptoz Ölçümü (Flow (Akış) Sitometrik Yöntem) .....</b>	<b>19</b>
<b>4.4. Biyokimyasal Analiz.....</b>	<b>20</b>
<b>4.5. ROT Seviyesinin Ölçülmesi .....</b>	<b>20</b>
<b>4.6. İstatistiksel Analiz .....</b>	<b>21</b>
<b>5. BULGULAR VE TARTIŞMALAR .....</b>	<b>22</b>
<b>5.1. MTT Sitotoksosite Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....</b>	<b>22</b>
<b>5.2. Apoptoz Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....</b>	<b>24</b>
<b>5.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....</b>	<b>27</b>
<b>5.4. ROT Seviyesinin Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....</b>	<b>27</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>29</b>
<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>30</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>34</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 5.1.</b> Farklı konsantrasyonlarda gabapentin ve pregabalin uygulanan hücrelerde canlı/apoptotik/nekrotik hücre yüzdesi .....	26
<b>Çizelge 5.2.</b> Farklı konsantrasyonlarda gabapentin ve pregabalin uygulanan hücrelerde AST, ALT, üre ve total bilirubin seviyeleri. ....	27



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 5.1.</b> Gabapentin'e ait % hücre inhibisyon değerleri .....	23
<b>Şekil 5.2.</b> Pregabalin'e ait % hücre inhibisyon değerleri .....	24
<b>Şekil 5.3.</b> HepG2 hücre hattı için gabapentin'in akış sitometrik analiz diyagramı .....	25
<b>Şekil 5.4.</b> HepG2 hücre hattı için pregabalin'in akış sitometrik analiz diyagramı.....	26
<b>Şekil 5.5.</b> Farklı konsantrasyonlarda uygulanan gabapentin ve pregabalin uygulanan hücrelerde reaktif oksijen türlerinin seviyeleri. ....	28



## KISALTMALAR DİZİNİ

ABC ailesi	: ATP bağlayan kaset ailesi
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozintrifosfat
CIOMS	: Council For International Organizations of Medical Sciences
DCFH-DA	: Dikloro-dihidro-fluoresin diasetat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELİSA	: Enzim bağlı immunosorbent assay
EMEM	: Eagle's Minimum Essential Medium
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
GABA	: Gamma-aminobütirik asit
HLA	: Human Leukocyte Antigens
IC50	: Inhibitory concentration
İİKH	: İlaç ile indüklenen karaciğer hasarı
MTT	: 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NAPKI	: N-asetil-p-benzokinonimin
PI	: Propidium iyodür
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RUCAM	: Roussel Uclaf Causality Assessment Method
TNF- $\alpha$	: Tümör nekroz faktör- $\alpha$
t-BOOH	: tert-Butil hidroperokside

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Herhangi bir karaciğer hastalığının akut ve kronik karaciğer hasarı formlarını taklit edebilen ilaç ile indüklenen karaciğer hasarı (İİKH), en yaygın ilaç toksisitesi olarak ifade edilmektedir. İİKH'in tüm hastane yatışlarının yaklaşık % 5'inden, açıklanamayan belirgin serum karaciğer enzim yüksekliklerinin yaklaşık % 10'undan ve akut karaciğer yetmezliği vakalarının yaklaşık % 50'sinden sorumlu olduğu belirtilmektedir (Ramaiah, 2007; Pandit, 2012). İlaçlar yüksek dozlarda veya duyarlı bireylerde terapötik dozlarda kullanıldığında karaciğer hasarına neden olabilmektedir. Bugüne kadar İİKH'ye neden olabilen yaklaşık 1000'den fazla ilaç bildirilmiştir (Lee vd., 2016). Dolayısıyla İİKH ilaç araştırma/geliştirilme süreçlerinin önündeki önemli bir engel olarak kabul edilmekte ve ilaçların piyasadan geri çekilmesinin önemli bir nedeni olarak ifade edilmektedir (O'Brien vd., 2006; Gerets vd., 2012; Kleiner, 2018).

Dünya çapında yaklaşık 50 milyon kişiyi etkileyen epilepsi kronik ve bulaşıcı olmayan bir hastalıktır. Vücudun bir kısmını (parsiyal) veya tümünü (jeneralize) içerebilen istemsiz hareketlere bazı durumlarda bilinç kaybı ve bağırsak veya mesane fonksiyonunun kontrolünün kaybolmasının eşlik ettiği tekrarlayan nöbetler ile karakterize nörolojik bir sendromdur. Belirli bir zamanda nöbetleri süren veya tedaviye ihtiyaç duyan aktif epilepsinin tahmini oranı 1000 kişi başına 4 ile 10 arasında olduğu belirtilmektedir. Epilepsi tedavisinde ilk basamak hastalarda ilaçlar ile nöbetlerin kontrol altına alınmasıdır. Epilepsili hastalarının yaklaşık olarak % 70'i tedaviye yanıt vermekte ve hastalarda nöbetler kontrol altına alınabilmektedir (World Health Organization, 2019). Gabapentin bir gamma-aminobütirik asit (GABA) analogu olarak Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından nöropatik ağrı ve huzursuz bacak sendromu tedavisinde ve sekonder jeneralize olan veya olmayan parsiyal nöbetlerin adjuvan tedavisinde onaylanmıştır (Kelly, 1998; Zylitz ve Krajnik, 2008; Yasaei ve Saadabadi, 2019). Gabapentinin karaciğer biyotransformasyonunun önemsiz olduğu bilinmekle birlikte (Vidaurre vd., 2017) gabapentin kaynaklı hepatotoksisite vakaları bildirilmiştir (Baldev ve White-Scott, 1997; Lasso-de-la-Vega vd., 2001; Richardson vd., 2002; Bureau vd., 2003; Jackson vd., 2018). Diğer bir GABA analogu pregabalin, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından diyabetik periferik nöropati ile ilişkili nöropatik ağrı, postherpetik nevralji, fibromiyalji ve spinal kord yaralanması ile ilişkili nöropatik ağrı tedavisinde ve parsiyal başlangıçlı nöbetlerin

adjuvan tedavisinde onaylanmıştır (Griffin ve Brown, 2016). Gabapentine benzer şekilde pregabalinin de karaciğer biyotransformasyonu önemsizdir.

Ancak pregabalin tedavisi ile ilişkilendirilmiş kolestatik ve hepatoselüler hasar patternli vakalar rapor edilmiştir (Crespo Perez vd., 2008; Doğan vd., 2011; Sendra vd., 2011; Bamanikar vd., 2013). Diğer taraftan gabapentin ve pregabalin gibi hepatik biyotransformasyona uğramayan ilaçların valproik asit, fenitoin ve felbamat gibi hepatik biyotransformasyona uğrayan ilaçlara göre karaciğer yetmezliği olan epilepsili hastalarının tedavisinde ilk seçenek olduğu vurgulanmalıdır (Vidaurre vd., 2017).

Bu tez çalışması kapsamında farklı endikasyonlarda hastalar tarafından sıklıkla kullanılan gabapentin ve pregabalinine ait sınırlı sayıdaki hepatotoksisite vakalarından hareketle bilimsel otoritelerce hepatotoksisite araştırmaları açısından kabul gören *in vitro* sistem olarak HepG2 hücreleri kullanılarak ajanların hepatotoksik etki potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda gabapentin ve pregabalinin HepG2 hücrelerinde inhibitör konsantrasyon 50 (inhibitory concentration - IC50) değerlerinin belirlenmesini takiben hücrelerde apoptotik/nekrotik hücre ölümü, hepatik hasarın biyogöstergeleri olarak alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), üre ve total bilirubin seviyeleri ölçüldü. Ayrıca hepatotoksisitede oksidatif stresin rolünün aydınlatılmasına yönelik gabapentin ve pregabalin uygulanan HepG2 hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROT) seviyeleri belirlendi.

## **2. KAYNAK BİLGİSİ**

### **2.1. İİKH ile İlgili Genel Bilgiler**

Şiddetli İİKH seyrek görülen bir klinik vaka olmasına karşın hayati tehlike arz eden bir advers ilaç reaksiyonudur ve karaciğer transplantasyonu gerektirecek kadar kötü bir prognoz gösteren akut karaciğer yetmezliğinin başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir. Farklı çalışmalarla İİKH'nın patofizyolojisi ve geçerliliği kabul görmüş mekanizmaları aydınlatılmıştır (Lee vd., 2016). Akut ve kronik hepatik bozuklukların bilinen tüm morfolojik karakteristiklerini taklit eden İİKH tanısı için diğer etkenlerin dışlanması gerekmekte ve dolayısıyla bu durum İİKH teşhisini zorlaştırmaktadır (Tujios ve Fontana, 2011; Lee vd., 2016). Ayrıca diğer hepatik bozukluklarla morfolojik karakteristiklerin benzemesi İİKH insidansının belirlenmesini de zorlaştırmaktadır (Tujios ve Fontana, 2011). 1969 – 2002 yılları arasında piyasadan çekilen ilaçların % 15'i karaciğer toksisitesi ilişkili olarak piyasadan çekildiği bildirilmektedir (García-Cortés vd., 2018). İİKH ile ilişkili çalışmaların esas amacı potansiyel hepatotoksik ilaçlara hepatotoksisite için yüksek risk taşıyan bireylerin maruz kalmasını önlemek ve hepatotoksisite için düşük risk taşıyan bireylerin bu ilaçlara maruziyetini güvenli kılmaktır (Tujios ve Fontana, 2011). Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü, İİKH ile ilişkili çalışmalar ve bildirimler ile ilgili bilgileri daha hızlı elde etmek için İİKH Network sistemini kurmuştur. Benzer amaçlı sistemler Kore, Japonya ve Çin'in yanı sıra İngiltere, İzlanda, İspanya gibi Avrupa Ülkelerinde de kurulmuştur (Lee vd., 2016).

#### **2.1.1. İİKH'nın klinik bulguları**

İİKH, asemptomatik anormal biyokimyasal biyogösterge seviyelerinden, şiddetli akut ve kronik hepatite kadar değişebilen klinik tablo ile seyretmektedir. Dolayısıyla klinik ve etiyolojik faktörlere bağlı olarak İİKH semptomlarının değişkenlik gösterebildiğini söylemek mümkündür. Bu semptomlar arasında polifaji, sarılık, karın ağrısı ve kusma sıklıkla hastalarda gözlenmektedir. Ayrıca immün aracılıklı İİKH gelişen hastalarda serozit, ateş, eosinofil, döküntü, kemik iliği depresyonu ve multi organ tutulumu gibi belirgin immün-allerjik semptomları gözlenmektedir. İİKH ile ilişkili olarak hastalarda akut hepatit, kronik hepatit, fulminan hepatit, hepatik ven trombozu, steatohepatit, karaciğer granülomaları, siroz ve tümörler meydana gelebilmektedir.

Sarılık nedeniyle hastaneye yatırılan hastaların % 2 – 10'unun İİKH'a seconder vakalar olduğu rapor edilmiştir (Lee vd., 2016). Akut hepatitlerin % 10'u, fulminan hepatitlerin % 10 – 20'si, kronik hepatit ve sirozun ise %1'i İİKH ile ilişkilendirilmiştir (Arıcı, 2008).

Akut karaciğer yetmezliği ve fulminan hepatik yetmezlik ani ve ölümcül hepatik disfonksiyonla karakterizedir. Bu tablolar hastalarda ensefalopati ve koagülopatiyeye neden olmaktadır. Bu tip vakaların % 40 – 50'si yüksek doz asetaminofen ile meydana gelirken, asetaminofeni valproat, nitrofurantoin, ketokonazol, isoniazid ve fenitoin'in yüksek dozları izlemektedir. Ayrıca vakaların % 10'undan bitkisel ve diyet takviye edici ürünler sorumludur (Lee vd., 2016).

İlaça bağlı kolestazın klinik bulguları, kaşıntı ve sarılığa eşlik eden ve serum alkalin fosfataz seviyelerindeki artışlar olarak belirtilmektedir. Alkalin fosfatazın, fosfat gruplarını uzaklaştırması nedeniyle adenozintrifosfat (ATP) konsantrasyonları azalmaktadır. Kolanjiyosit hücrelerde ATP seviyelerinde devam eden azalmalar progresif duktopeni veya kaybolan safra kanalı sendromuna neden olmaktadır. Bu agresif patoloji kolestatik İİKH'lı hastaların en fazla %1'inde ortaya çıkmaktadır (Tujios ve Fontana, 2011).

### **2.1.2. İİKH biyogöstergeleri**

Karaciğerde karbonhidrat, lipid, protein, bilirubin ve yağda çözünen vitaminlerin metabolizması gerçekleşmektedir. Aynı zamanda ferritin, demir bağlama ve safranın üretiminde ve atılımında da karaciğer rol oynamaktadır. Karaciğerin bu fonksiyonlarından hareketle toksisiteyi belirlemek için enzim, konjuge bilirubin, serum albümin ve koagülasyon faktörleri gibi biyogöstergelerin kan seviyeleri ölçülmektedir (Lee vd., 2016). Kanda hepatik hücre içi enzimler olarak AST ve ALT gibi aminotransferazların belirgin şekilde yükselen seviyeleri ile kolestatik enzimler olarak alkalin fosfataz ve gamma-glutamil transpeptidazın yükselen seviyeleri hepatoselüler hasarın primer biyokimyasal göstergeleri olarak kabul edilmektedir (García-Cortés ve Ortega-Alonso, 2018). Ancak bu enzimler sadece İİKH'a spesifik olmamakla birlikte aminotransferazların ve alkalin fosfatazın seviyelerinde diğer organ hasarlarında da artışlar dikkat çekmektedir. Karaciğer hasarı meydana geldiğinde enzimler kan dolaşımına salıverilmektedir. Dolayısıyla karaciğer hasarı oluşmadan önce veya hasarının erken evrelerinde potansiyel toksisiteyi tespit etmek için kullanılamamaktadır (Kosanam



ve Boyina, 2015; García-Cortés ve Ortega-Alonso, 2018). Ayrıca kemokinler ve sitokinler İİKH'nin diagnostik ve prognostik biyogöstergeleri olarak kabul edilmektedir (Lee vd., 2016; García-Cortés ve Ortega-Alonso, 2018).

Alkalen fosfataz intrahepatik kolanjiyosit hücreleri içinde yer almakta ve intrahepatik ve ekstrahepatik safra kanallarının hepatoselüler hasarlı veya hasarsız obstrüksiyonunda seviyeleri yükselmektedir. Tıp Bilimleri Uluslararası Organizasyonlar Konseyi (Council For International Organizations of Medical Sciences-CIOMS) tarafından İİKH, ALT ve alkalen fosfataz seviyeleri ile ALT seviyesinin alkalen fosfataz seviyesine oranına göre hasarı hepatoselüler, kolestatik ve/veya miks tip olarak sınıflandırılmaktadır. Buna göre, ALT seviyesinin normal üst sınır değerinin 3 katı veya daha yüksek olduğu seviyeler ile ALT/alkalen fosfataz oranının 5 veya daha üstü olduğu değerler hepatoselüler hasarın, alkalen fosfataz seviyesinin normal üst sınır değerinin 2 katı veya daha yüksek olduğu seviyeler ile ALT/alkalen fosfataz oranının 2 veya daha azı olduğu değerler kolestatik hasarın, ALT seviyesinin normal üst sınır değerinin 3 katı veya daha yüksek olduğu ve alkalen fosfataz seviyesinin normal üst sınır değerinin 2 katı veya daha yüksek olduğu seviyeler ile ALT/alkalen fosfataz oranının 2'den büyük ve 5'den küçük olduğu değerler miks hasarın göstergesi olarak ifade edilmektedir (Lee vd., 2016).

Uluslararası İİKH çalışma grubu akut İİKH tespiti için ölçütler geliştirmişlerdir. Buna göre, ALT seviyesinin normal üst sınır değerinin 5 katı veya daha yüksek olduğu seviyeler, ALT seviyesinin normal üst sınır değerinin 3 katı veya daha yüksek olduğu seviyeler ile total bilirubin seviyesinin normal üst sınır değerinin 3 katı veya daha yüksek olduğu seviyeler, alkalen fosfataz seviyesinin normal üst sınır değerinin 2 katı veya daha yüksek olduğu seviyeler karaciğer hasarının biyogöstergeleri olarak ifade edilmektedir (García-Cortés ve Ortega-Alonso, 2018).

### **2.1.3. İİKH'nin mekanizmaları**

İİKH patogeneğinde rol oynayan mekanizmalar, ilaçlar veya onların reaktif metabolitlerinin direkt olarak karaciğer hücrelerinde strese neden olması, ilaçlar veya onların reaktif metabolitlerinin immün reaksiyonu tetiklemesi ve ATP varlığına bağlı olarak ilaçlar veya onların reaktif metabolitlerinin apoptozu veya nekrozu indüklemesi olarak temel 3 başlık altında toplanmaktadır (Lee vd., 2016).

Hücre stresi ile proapoptik proteinlerin aktif hale getirildiği ve anti-apoptik proteinlerin mitokondri permeabilite geçişini aktive etmek için inhibe edildiği direkt yol başlatılmaktadır. Diğer taraftan, immün reaksiyonlar sırasında meydana gelen antijen Kupffer hücrelerinden tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve Fas ligand proteinlerinin salıverilmesi ile ekstrinsik ölüm yolağı aktive olmaktadır. TNF- $\alpha$  ve Fas ligand proteinleri kaspaz 8'i aktive etmek için hücre içi ölüm reseptörlerine ve ölüm domeni proteinlerine bağlanmaktadır. Bu olayı takiben ölüm indükleyici sinyal kompleksi oluşmaktadır (Kosanam ve Boyina, 2015). Hasarın son adımı hücrel apoptoz veya nekrozdur. Apoptoz, ATP bağımlı ölüm mekanizması olarak mitokondri permeabilite geçişinin hızlı ve aniden tüm hücrel mitokondrilerde oluşmadığı durumlarda meydana gelmektedir. Bu durumda sitokrom C, pro-kaspaz 9 ve sitoplazmik scaffold proteinine bağlanarak apoptozu oluşturmaktadır. Devamında sitoplazmik nükleer kondensasyon ve fragmentasyon ile sonuçlanmaktadır. Fragmanlar daha sonra fagositoz ile uzaklaştırılmaktadır. Apoptoz sürecinde plazma membran bütünlüğü bozulmamakta, bu nedenle çok az sekonder hasar indüklenmekte ve inflamatuvar reaksiyon azalmaktadır. Nekrotik hücre ölümü ise mitokondri permeabilite geçişi ve hücrel ATP depolarının tükenmesi nedeniyle meydana gelen mitokondriyal disfonksiyon sonrası sırasıyla bleb oluşumu, aktin oksidasyonu, mikrofilament kırılması, hücrel şişme ve plazma membran rüptürü ile gerçekleşmektedir (Kosanam ve Boyina, 2015).

### **2.1.3.1. İntrensik İİKH**

Terapötik dozun üstünde maruz kalınan ilaçların veya bu ilaç metabolitlerinin direkt hepatotoksik etkileri ile indüklenen İİKH modelidir. İntrensik karaciğer hasarının en bilinen örneği akut asetaminofen toksisitesidir. Asetaminofenin hepatositlerdeki biyotransformasyonu sonucu meydana gelen N-asetil-p-benzokinonimin (NAPKI) reaktif metaboliti hepatik hasardan sorumludur. Asetaminofen toksisitesi akut karaciğer yetmezliği vakalarının yaklaşık %50'sinden sorumludur (Lee vd., 2016).

İlaçlar veya onların reaktif metabolitleri ile indüklenen direkt hücre stresi glutatyon depolarının tükenmesi veya reaktif metabolitlerin protein, lipid, nükleik asit veya hücrel diğer yapılara bağlanması ile devam etmektedir. Benzer şekilde ilaç veya onun reaktif metabolitleri ile direkt mitokondriyal inhibisyon mitokondriyal membran geçirgenliğinin artması ile hücrel ATP'nin tükenmesi ve mitokondride ROT'un birikimi sonucu

mitokondriyal solunum zincirinin inhibisyonu ile devam etmektedir. Diğer taraftan, mitokondriyal membran geçirgenliğinin artması ile bozulan ATP sentezine sekonder meydana gelen mitokondriyal matris genişlemesi ve sitokrom C'nin hücre sitoplazmasına salıverilmesi ile apoptotik hücre ölüm aktivasyonu tetiklenmektedir (Kosanam ve Boyina, 2015; Lee vd., 2016). Mitokondriyal toksisitenin sonuçlarından biri olarak meydana gelen mikrovezüküler yağlı karaciğer tetrasiklin, amiodaron, valproat ve çeşitli antiviral nükleosid analoglar ile tedavi sırasında gözlenmektedir. Bu toksisite formunda mikrovezüküler yağ hepatositlerde birikmiştir ve hepatositlerdeki mitokondri sayısı azalmıştır. Devam eden hasar fokal nekroz, fibrozis, kolestazis ve safra kanal poliferasyonu ile birlikte makrovezüküler yağlı karaciğere dönüşmektedir (Tujios ve Fontana, 2011).

### **2.1.3.2. İdiyosenkratik İİKH**

İdiyosenkratik İİKH terapötik dozlarda maruz kalan bireylerin az bir kısmında meydana gelen hepatotoksisite modelidir (Kosanam ve Boyina, 2015; Lee vd., 2016). İdiyosenkratik İİKH'ı ilaç veya metabolit ile değiştirilmiş proteine karşı atipik immün cevap olarak özetlemek mümkündür. Hastaların çok az bir kısmında döküntü ve eozinofili gibi immünolojik ve hipersensitivitenin klasik özellikleri görülmektedir (Tujios ve Fontana, 2011). Bu tip hepatik reaksiyonların yaklaşık %75'i karaciğer transplantasyonu veya ölümle sonuçlanmaktadır. İdiyosenkratik İİKH maruz kalınan ilaca, maruz kalan hastaya ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Kosanam ve Boyina, 2015).

İdiyosenkratik İİKH hipotezine göre temel basamak direkt veya indirekt yolla hücresel protein ve organellere zarar vererek karaciğer hasarını başlatan reaktif metabolit- veya ilaç- protein kompleksinin oluşmasıdır. İİKH'lı hastalar normalde zarar görmüş hepatositleri kurtaran detoksifikasyon, adaptasyon veya tolerans yollarının azalması nedeniyle karaciğer hasarının gelişmesine atipik olarak duyarlı olabilmektedir (Lee vd., 2016).

Genel popülasyonda idiyosenkratik İİKH görülme sıklığının düşük olması nedeniyle, konak reseptörlerde, immün yanıtta ve metabolik yollardaki genetik çeşitliliklerin idiyosenkratik reaksiyonların patogenezinde rol oynadığı belirtilmiştir. Önceki çalışmalarda, ilaçların absorpsiyonu, biyotransformasyonu, taşınması veya

detoksifikasyonunda rol oynayan aday genlere yoğunlaşmıştır (Lee vd., 2016). İlaç-protein veya metabolit-protein kompleksi neo-antijen oluşumuna yol açmakta ve hepatik proteinlere karşı otoantikor üretecek adaptif immün sistemin aktivasyonuna neden olmaktadır (Tujios ve Fontana, 2011; Lee vd., 2016). Spesifik sınıf II insan lökosit antijeni (Human Leukocyte Antigens) aleline sahip bireylerde ilaçlar ve onların reaktif metabolitleri insan lökosit antijeni proteinine bağlanarak immün sistemin T hücrelerine sunulmaktadır. Bundan sonra T hücrelerinin aktivasyonu ve proliferasyonu indüklenerek ilaç veya metabolitine karşı immün yanıt tetiklenmektedir. Bu stimülasyonun karaciğer hasarı ile sonuçlanan oksidatif stres veya hücre hasarı sinyal yollarını aktive ettiği düşünülmektedir (Tujios ve Fontana, 2011; Kosanam ve Boyina, 2015; Lee vd., 2016).

#### ***2.1.3.3. İİKH patogeneğinde rol oynayan diğer mekanizmalar***

İİKH'ın patogeneğinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve aktif ilaç metabolitleri gibi diğer mekanizmaların rolü araştırılmaktadır. Mitokondride ROT'un yaygın üretimi, mitokondriyal membran permeabilite geçişini ve mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasını indükleyerek karaciğer hasarında önemli bir adımı oluşturmaktadır. Mitokondrilerin aktivitesi ile ilgili olarak, bazı ilaçlar ve bunların metabolitleri, sitokrom c'yi mitokondriden sitozole taşıyabilmektedir. Bu yer değiştirme mitokondriyal zar geçirgenliğini değiştirebilmekte ve hepatotoksisiteyi indüklemektedir (Lee vd., 2016).

Hepatositlerin endoplazmik retikulumunda yerleşim gösteren sitokrom P450 enzimlerinin, özellikle CYP3A4 ve CYP2D6 enzimleri, ilaçların oksidatif biyotransformasyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Hepatositlerdeki bu oksidatif biyotransformasyon sırasında meydana gelen reaktif metabolitler ile endoplazmik retikulum stresi de indüklenmektedir. İndüklenen strese bağlı olarak mitokondriyal protein sitokrom C sitoplazmaya salıverilmekte ve bu durum apoptotik hücre ölümü ile sonlanmaktadır (Lee vd., 2016).

#### ***2.1.3.4. Kolestatik İİKH Mekanizmaları***

İlaçlarla indüklenen kolestaz, bozulmuş safra akışı sonrasında safra asitlerinin hepatik tutulumu ile gerçekleşmektedir. Safra asitlerinin sitotoksik etkileri karaciğer

hasarını indüklemekte ve hastalarda siroz ve biliyer fibroz oluşumunu tetikleyerek akut ve kronik hepatik hasar gelişimine yol açmaktadır (Tujios ve Fontana, 2011).

Kolestaza neden olan ilaçların büyük çoğunluğu hepatositlerin kanaliküler yüzeyinde bulunan taşıyıcıların ATP bağlayan kaset (ABC) ailesinin substratlarıdır. ABC ailesinin üyeleri olarak çoklu ilaç direnci ilişkili protein-2 ve protein-3 bazı ilaçlar tarafından inhibe edilmekte ve bu inhibisyon progressif karaciğer hasarına neden olabilmektedir. Ayrıca hepatik katyon taşıyıcı proteinlerin de ilaçlar tarafından inhibisyonu kolestatik İİKH gelişimini indüklemektedir (Tujios ve Fontana, 2011).

#### **2.1.4. İİKH'a duyarlılıkta etiyolojik risk faktörleri**

Karaciğerin İİKH'a duyarlılığı ilaç toksisitesinin yanı sıra karaciğer veya diğer organlardaki kronik hastalıkların varlığı, kullanılan diğer ilaçlar, alkol kullanımı ile de ilgili olabilmektedir. Hormonal bozukluklar, hamilelik, yaş, cinsiyet, beslenme durumu, genetik faktörler, ilacın dozu ve ilaca maruziyet süresi gibi faktörler de İİKH gelişimini etkilemektedir (Lee vd., 2015).

##### **2.1.4.1. Yaş ve cinsiyet**

Yaş ve cinsiyet gibi bireysel faktörler olası karaciğer hasarını indükleyen ilaçlara duyarlılığı arttırabilmektedir (Kosanam ve Boyina, 2015). Çocukların İİKH gelişimi için düşük risk taşıdıkları ifade edilse de, aspirin ve valproata bağlı hepatotoksisite için yüksek risk taşıdıkları tespit edilmiştir. Diğer taraftan, 50 yaş üstü bireylerde asetaminofen, halotan, isoniazid ve amoksisilin- klavulanik asite bağlı İİKH insidansının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Kosanam ve Boyina, 2015; Lee vd., 2015).

İdiyosenkratik İİKH'ta cinsiyetin önemli bir faktör olduğu vurgulanmaktadır. İlaçlar arasında farklılıklar gözlenmekle birlikte, genellikle İİKH riskinin kadınlarda düşük olduğu, ancak idiyosenkratik İİKH'lı kadınlarda karaciğer hasarının akut karaciğer yetmezliğine dönüşme riskinin erkeklerden daha yüksek olduğu ifade edilmektedir (Lee vd., 2015). Kadınlarda halotan, nitrofurantoin ve sulindak ile tedavide İİKH gelişim riski erkeklere göre daha yüksekken, erkeklerde amoksisilin-klavulanik asit ile tedavide İİKH gelişim riski kadınlara göre daha yüksektir (Kosanam ve Boyina, 2015).

#### **2.1.4.2. İlacın dozu ve maruziyet süresi**

İdiyosenkratik İİKH gelişimi için ilaç dozu belirleyici değildir, ancak yoğun hepatik biyotransformasyona uğrayan ilaçlarda dozla idiyosenkratik İİKH gelişim riski artmaktadır. Bu yüksek riskin reaktif metabolit oluşumu ve bunu takiben metabolik idiyosenkrazinin sonucu olduğu ifade edilmektedir. İlaçlar yüksek dozlarda kullanıldığında İİKH gelişiminde rol oynayan toksik ilaç metabolitlerinin intrahepatik seviyeleri artmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, günlük dozu 50 mg'dan yüksek olan lipofilik ilaçların daha sıklıkla İİKH gelişimine neden olduğu tespit edilmiştir. Lipofilik ilaçların vücuttan uzaklaştırılması için daha fazla biyotransforme edilmesi gerektiği için karaciğer hasarına neden olma potansiyelleri yüksektir. Ayrıca büyük ölçüde biyotransforme edilen ilaçların kovalent bağlar ile haptenlere dönüşmeleri ile genetik duyarlı hastalarda advers adaptif immün reaksiyon oluşturmaları da mümkündür (Lee vd., 2015).

#### **2.1.4.3. Genetik faktörler**

İlaç biyotransformasyonunda rol oynayan enzimleri kodlayan genlerin keşfi idiyosenkratik İİKH patogenezi anlamaya yardımcı olmuştur. İlaç biyotransformasyonundan sorumlu sitokrom P450 enzimleri, N-asetiltransferaz 2, UDP-glukuronosiltransferaz ve glutatyon-S-transferaz enzimleri düzeyinde tespit edilen polimorfizimlerin İİKH gelişiminde önemli olduğu tespit edilmiştir (Kosanam ve Boyina, 2015; Lee vd., 2015). Detoksifikasyondan sorumlu glutatyon-S-transferaz enzim ailesi reaktif metabolitlerin elektrofilik kısımlarının glutatyonla bağlanmasını katalize ederek reaktif metabolitlerin hücre sel makromoleküler hasara neden olmasını engellemektedir. Glutatyon-S-transferazların gen seviyesindeki farklılıklara bağlı olarak düşük aktiviteye sahip bireylerin ilaçlara bağlı hepatotoksositeye daha duyarlı olduğu özellikle vurgulanmaktadır (García-Cortés ve Ortega-Alonso, 2018). Taşıyıcı protein seviyesindeki farklılıklar da kolestatik İİKH gelişimi için duyarlılık nedeni olarak ifade edilmektedir (Tujios ve Fontana, 2011).

İnsan lökosit antijeni alellerinin idiyosenkratik İİKH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Amoksisilin klavulanat, izoniyazid ve ximelagatran tedavisi ile İİKH gelişen hastalarda insan lökosit antijenini kodlayan genlerdeki farklılığın varlığı çalışmalarda gösterilmiştir (Tujios ve Fontana, 2011; Lee vd., 2015).

#### **2.1.4.4. Kronik karaciğer hastalığının varlığı**

Altta yatan kronik karaciğer hastalığının varlığı hem intrinsik hem de idiyosenkratik İİKH gelişiminde risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Kosanam ve Boyina, 2015; Lee vd., 2015). Karaciğerin fonksiyonel kapasitesinin azalması veya karaciğerin rejenerasyon kapasitesinin azalması ilaçlar ile gelişen karaciğer hasarı sonuçlarını daha kötüleştirebilmektedir (Kosanam ve Boyina, 2015). Altta yatan karaciğer hastalığına bağlı olarak anormal karaciğer fonksiyonu ilaç taşıyıcı proteinlerin aktivitesini azaltmaktadır. Ayrıca hastalıklara bağlı olarak ilaçların farmakokinetiği değişebilmekte ve önceden tahmin edilemeyen etkiler gözlenebilmektedir. Karaciğer hastalığı varlığında hastalarda ilaçların etkisini tahmin etmek oldukça zordur. Bu yüzden ilaçların serum seviyeleri ve doz adaptasyonları dikkatle izlenmelidir (Lee vd., 2015).

#### **2.1.4.5. Diğer faktörler**

Bazı ilaçların farklı ırklarda İİKH oluşturma potansiyelleri farklılık göstermektedir. İzonyazid ile ilişkili toksisite gelişimine siyahlar ispanıklara oranla daha duyarlıdır. Irklar arasında biyotransformasyon hızını belirleyen sitokrom P450 enzimlerinin aktivitesi farklılık göstermektedir. Alkol kullanımı bireylerde glutatyon depolarının tükenmesine neden olarak bireylerin ilaçların hepatotoksik etkilerine daha duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır. İlaç formülasyonları da İİKH gelişiminde belirleyici olabilmektedir. Buna göre, uzun etki süreli ilaçların kısa etki süreli ilaçlara göre daha sıklıkla karaciğer hasarına neden olduğu ifade edilmektedir. Malnütrisyon, obezite, böbrek yetmezliği gibi varolan diğer hastalıklar da İİKH gelişimi için risk oluşturmaktadır (Kosanam ve Boyina, 2015).

#### **2.1.5. İİKH'in diagnozu**

İİKH'in spesifik ve diagnostik klinik, laboratuvar veya histolojik bulgularının olmaması ve karaciğerin diğer hastalıklarını taklit edebilmesi nedeniyle kesin tanısının yapılması oldukça zordur (Lee vd., 2015; García-Cortés ve Ortega-Alonso, 2018). Doza bağımlı intrinsik İİKH vakalarında ve şüpheli ilacın kesilip sonra tekrar başlanması ile semptomların yeniden ortaya çıkması durumlarında kesin tanı mümkündür. Ancak şüpheli ilacın kesilip tekrar kullanılması şiddetli karaciğer hasarı riskinden dolayı önerilmemektedir (García-Cortés ve Ortega-Alonso, 2018). Dolayısıyla, İİKH'in kesin

tanısı şüphelenilen ilaçla sürekli karaciğer hasarının ilişkisinin kurulması ve diğer karaciğer hasarına neden olabilecek etkenlerin ortadan kaldırılmasıyla mümkün olmaktadır (Lee vd., 2015). Temel olarak hastada gelişen karaciğer hasarını kullanılan ilaç ile ilişkilendirebilmek için ilacın alımı ile karaciğer hasarı arasındaki sürenin 1 hafta ile 3 ay arasında olması, ilacın kesilmesi ile laboratuvar biyokimyası sonuçlarının normalize olması, ilaca tekrar maruziyet ile hasarın yeniden meydana gelmesi gerekmektedir (Eren vd., 2004).

İİKH tanısında hastadan alınan öykü kritik önem arz etmektedir. İlaça maruziyet ile hastalık arasındaki ilişkiyi içeren kapsamlı bir klinik değerlendirme İİKH tanısını mümkün kılmaktadır (Lee vd., 2015). Karaciğer biyopsisinin İİKH tanısındaki önemi tartışılmaktadır. Çünkü İİKH için ayırt edici bir histolojik görünüm bulunmamaktadır. Eozinofil ve nötrofillerin çokluğu, granümatöz hepatit, perivenüler lokasyonda hepatosit nekrozu, hepatitle birlikte gelişmiş kolestaz gibi bazı histolojik özellikler İİKH'ı düşündürse bile bu bulgular birçok akut ve kronik karaciğer hastalıklarının farklı formlarında da görülebilmektedir (Lee vd., 2015; García-Cortés ve Ortega-Alonso, 2018). Mitokondriyal zar permeabilitesini azaltarak veya mitokondriyal DNA hasarını indükleyerek mitokondriyal disfonksiyona neden olan ilaçlar karaciğer dokusunda yağ infiltrasyonuna yol açmaktadır. Valproatın, tetrasiklin grubu antibiyotiklerin, bazı dideoksinükleosit analoglarının ve tamoksifenin neden olduğu steatozis tablosunun bu ilaçlarla indüklenen mitokondriyal disfonksiyonun bir sonucu olduğu ifade edilmektedir. Karaciğerde nötrofil ve makrofaj infiltrasyonunun karaciğer hasarının geç evresini işaret etmektedir. Ayrıca bazı histolojik görünümeler hastalar için belirgin prognostik gösterge olarak değerlendirilmektedir. Özellikle yaygın nekroz, mikroveziküler steatozis, fibrozisin ileri evreleri, duktuler tutulum kötü prognozlu bir tabloyu işaret etmektedir (Lee vd., 2015). Ancak biyopsi ile altta yatan patogenezin aydınlatılması İİKH tedavisinde yol gösterici olmakla birlikte karaciğer hasarının derecesinin, tipinin ve klinik seyrinin belirlenmesinde rol oynamaktadır (Lee vd., 2015; García-Cortés ve Ortega-Alonso, 2018).

İİKH ile ilişkili olabileceği düşünülen şüpheli vakalarda değerlendirmeyi geliştirmek için farklı algoritmalar ve etkene yönelik değerlendirme metotları son yıllarda geliştirilmiştir. Yarı kantitatif bir skorlama sistemi olarak Roussel Uclaf Nedensellik Değerlendirme Yöntemi (Roussel Uclaf Causality Assessment Method-RUCAM)



ölçütlerine göre yüksek skorlar artmış İİKH potansiyelini işaret etmektedir. Buna göre vakalar başlangıç zamanı veya süresi, progresyon ve şüphelenilen ilacın kesildikten sonra verilen yanıtın seyri, risk faktörleri, eşlik eden ilaçlar, karaciğer hasarına neden olan diğer etkenlerin varlığı, daha önceden geçirilmiş ilaca bağlı hepatotoksisite öyküsü ve hasara karşı oluşan yanıtta göre skorlandırılmaktadır (Lee vd., 2015; García-Cortés ve Ortega-Alonso, 2018).

## **2.2. Epilepsi ve Epilepsinin Tedavisi**

Genel bir tanımlamayla epilepsi, merkezi sinir sisteminde belirli bir işlevi olan nöron topluluğun ani, anormal ve hipersenkron deşarjı sonucu ortaya çıkan, bu nöronların somatik ve/veya psişik işlevi ile ilgili geçici ve yineleyici bozukluklarıdır (Stafstrom, 2006; Wells, 2009). Genellikle kısa süren, kendiliğinden geçen duyu ve hareket bozuklukları ve bazen bilinç kaybıyla parsiyal ve/veya jeneralize konvulsiyonlarla karakteristik kronik beyin sendromu olarak kabul edilmektedir (Riviello, 2003; Dökmeci, 2007).

Nöbetler, travma ve genetik anomaliler dahil çok çeşitli patolojik durumdan kaynaklı olabilmektedir (Das vd., 2012). Nöbet oluşumuna neden olan etkenler arasında metabolik anormallikler (hiponatremi, hipokalsemi, hipoglisemi ve hiperglisemi), akut nörolojik hasar (menenjit, ensefalit gibi enfeksiyonlar, inme, kafa travması), alkol yoksunluğu, nöbet eşiğini düşüren ilaçlar sayılmaktadır (Shneker ve Fountain, 2003).

Epilepsi tedavisinde asıl amaç, nöbetleri tamamen kontrol altına almak veya nöbetlerin görülme sıklığını en aza indirmek ve kullanılan antiepileptik ilaçların advers etkilerini en düşük düzeyde tutarak hastaların yaşam kalitelerini arttırmaktır (Şenol vd., 2011). Tedavide başarının sağlanması için hastalığın kaynaklandığı patofizyolojiyi iyi belirlemek, doğru etkili antiepileptik ilacın seçilmesi ve hastanın zaman içinde tedaviye yanıtının izlenmesi son derece önemlidir (Podell, 2013). Antiepileptik ilacın seçiminde ise hastanın nöbet tipi, ilacın etkinliği, advers ve toksik etkileri, tolere edilebilirliği, ilaç etkileşimleri, kullanım kolaylığı ve fiyatı göz önünde bulundurulmalıdır (Conway ve Henry, 2012). Tedaviye genellikle tek bir ilacın düşük dozuyla başlanmakta ve doz yavaş yavaş yükseltilmektedir (French ve Gazzola, 2013). Hastaların % 30-40'ında nöbetler tek bir antiepileptik ilaçla kontrol edilebilmektedir (Lee ve Dworetzy, 2010). Parsiyal epilepsi hastalarının % 30'u ile jeneralize epilepsi hastalarının % 25'inde mevcut ilaçlarla

hastalık iyi kontrol edilemez. Bu hastalar genellikle birden fazla antiepileptik ilaç kullanmak durumundadırlar (Madkarni vd., 2005). Hastaların % 20-30'u antiepileptik ilaçların etkili kombinasyonlarına rağmen tıbbi tedaviye direnç göstermektedir. Bu durumda cerrahi tedavi seçeneği nöbetlerin ortaya çıkmasını engellemek için tercih edilebilmektedir (Goldenberg, 2010). Cerrahi ve vagus sinir stimülatörü, antiepileptik ilaçlar tarafından nöbet kontrolünün sağlanamadığı hastalarda önemli bir tedavi seçeneği sağlamaktadır (Madkarni vd., 2005).

### **2.2.1. Antiepileptik ilaçların sınıflandırılması**

Antiepileptik ilaçlar, her bir ilacın etki mekanizmasının birbirlerinden farklı ve birden fazla olması, ayrıca bu mekanizmaların tam anlamıyla aydınlatılmamış olması yüzünden diğer ilaçlardan farklı olarak etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmazlar (Perucca, 2005).

Genel olarak antiepileptik ilaçlar birinci, ikinci ve üçüncü kuşak antiepileptik ilaçlar olmak üzere üç grup altında sınıflandırılmaktadır. Eski nesil (1.kuşak) ilaçların terapötik indeksleri düşüktür ve farmakokinetik özellikleri bireyler arasında önemli ölçüde farklılıklar göstermektedir (Nicholas vd., 2015). Fenitoin, fenobarbital, valproik asit ve karbamazepin epilepsi tedavisinde sıklıkla kullanılan eski nesil antiepileptik ilaçlar olarak sayılmaktadır (Podell, 2013). Bu ilaçlar dışında kullanımda olan diğer eski nesil ilaçlar klobazam, klonazepam, etosüksimid ve pirimidondur (McLachlan, 2000).

Yeni nesil antiepileptik ilaçlar, antiepileptik tedavide kar-zarar dengesini iyileştirmek amacı ile geliştirilmişlerdir (Erdoğan, 2014). Günümüzde epilepsi tedavisinde dünyada kullanılmakta olan antiepileptik ilaçların yaklaşık dörtte üçü bu grup içinde yer almaktadır (French, 2012). Etkinliklerinin yüksek olmasının yanı sıra hastalar tarafından tolere edilebilmeleri, ilaç etkileşimlerinin eski nesil antiepileptik ilaçlara göre daha az olmasından dolayı nispeten daha güvenli olmaları ve farmakokinetik profillerinin daha iyi olmaları nedeni ile dikkat çekmektedirler (Spina ve Perugi, 2004). Bu ilaçların çoğu, geleneksel tedavi ile tatmin edici düzeyde nöbet kontrolü sağlanamamış hastalar için ek bir tedavi yöntemi özelliği göstermektedir (Erdoğan, 2014). Yeni nesil antiepileptik ilaçlar arasından felbamat, gabapentin, lamotrijin, okskarbamazepin, pregabalin, remasemid, tiagabin, topiramet, vigabatrin, zonizamid sıklıkla epilepsi

tedavisinde kullanılmaktadır. Brivasetam, karabersat, karisbamat, eslikarbazepin asetat üçüncü kuşak antiepileptik ilaçlar olarak bilinmektedir (McLachlan, 2000).

Gabapentin, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından 1993 yılında erişkinlerde parsiyal nöbetlerin kontrolü amacıyla adjuvan medikasyon olarak ve postherpetik nevralsi ve huzursuz bacak sendromunun tedavisinde onanmıştır. Ayrıca nöropatik ağrı, anksiyete bozuklukları, uykusuzluk ve bipolar bozukluklar gibi endikasyon dışı durumlarda da kullanılmaktadır (Yasaei ve Saadabadi, 2019). GABA reseptörleri ile tam etki mekanizması bilinmemekle birlikte gabapentinin kan-beyin bariyerini geçerek ve nörotransmitterler üzerinde rol oynadığı belirtilmektedir. Gabapentinin GABA'ya benzer bir moleküler yapıya sahip olmasına rağmen, GABA reseptörlerine bağlanmadığı ve GABA'nın sentezini veya geri alımını etkilemediği bilinmektedir. Nöronal voltaj kapılı kalsiyum kanallarını inhibe ederek nörotransmitter salıverilmesini azaltarak etki göstermektedir (Kelly, 1998; Yasaei ve Saadabadi, 2019). Hastalarda sık görülen advers etkileri arasında yorgunluk, baş dönmesi ve baş ağrısı sayılmaktadır. Ayrıca insomni, ataksi, periferik ödem, nistagmus, tremor, ağırlık artışı, impotans, ateş ve depresyon gibi advers etkiler de meydana gelebilmektedir. Gabapentinin moleküler yapısı bir nörotransmitter olan GABA'ya benzemekte ve nöronal kalsiyum kanallarını inhibe ederek etki göstermektedir (Yasaei ve Saadabadi, 2019). Gabapentin, insanlarda ihmal edilebilir düzeyde biyotransformasyona uğramakta dolayısıyla hepatik enzimler tarafından metabolize edilmediği bilinmektedir (Honarmand vd., 2011).

Pregabalin, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından erişkinlerde parsiyal nöbetlerin adjuvan tedavisinde, postherpetik nevralsi, spinal kort travması ile ilgili nöropatik ağrı, diyabetik periferik nöropati ve fibromiyaljinin tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Hastalarda baş dönmesi, uyku hali, ağız kuruluğu, ödem, bulanık görme, kilo artışı ve anormal düşünme, konsantre olma veya odaklanma zorluğu gibi advers etkiler meydana gelebilmektedir (Griffin ve Brown, 2016). Pregabalinin moleküler yapısının GABA'ya benzemesine rağmen GABA reseptörlerine bağlanmadığı ve GABA'nın sentezini veya geri alımını etkilemediği ve nöronal voltaj kapılı kalsiyum kanallarını inhibe ederek nörotransmitter salıverilmesini azaltarak etki gösterdiği bilinmektedir (Zylicz ve Krajnik, 2008; Griffin ve Brown, 2016). Pregabalin insanlarda ihmal edilebilir düzeyde biyotransformasyona uğramakta (< %2 metabolizma) ve böbrekler tarafından neredeyse hiç değişmeden atılmaktadır (Ben-Menachem, 2004).

### 3. GEREÇLER

#### 3.1. Kullanılan Maddeler

Gabapentin	: Sigma-Aldrich
Pregabalin	: Sigma-Aldrich
EMEM	: Wisent Bio Products
Fetal sığır serumu	: Capricorn Scientific
Tripsin-EDTA çözeltisi	: Wisent Bio Products
Penisilin-streptomisin çözeltisi	: Wisent Bio Products
DMSO	: Carlo Erba
Fosfat tamponu çözeltisi	: Biomatik
3-[4,5-dimetiltiyazol- 2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT)	: Sigma-Aldrich
Floresan izotiyosiyanat (FITC)	
Annexin V Apoptoz Kiti	: BD Biosciences
DCFH-DA	: Santo Cruz Biotechnology
t-BOOH, %70	: ACROS Organics
Trikloro asetik asit	: Sigma-Aldrich

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Biyogüvenlik kabini	: Heal Force HF Safe 1800
Buzdolabı	: Arçelik 2470 NEX
Buz makinası	: Kale Kd 030
Derin dondurucu (-20°C)	: Arçelik 2470 NEX
Derin dondurucu (-80°C)	: Arçelik 2470 NEX
ELISA plak okuyucusu	: Biotek Eon
Akış sitometre cihazı	: BD Biosciences FACS Aria III
Enjektör filtresi (0,2 µm por büyüklüğü)	: Aisimo
Kilitli kapaklı mini santrifüj tüpleri (2 mL)	: Nest
Hassas terazi	: Ohaus Pioneer PA64
Hücre kültür kabı (25 ve 75 cm <sup>2</sup> )	: Nest

Hücre plağı (6, 24 ve 96 kuyucuklu)	: Nest
Ters mikroskop	: Leica DMI1
İnkübatör (CO2 dönüşümlü)	: Thermo Fisher Scientific
Kriyo tüp	: Nest
Otoklav	: Hirayama HG-80
Otomatik pipet (10, 20, 100, 200 ve 1000 µL)	: Eppendorf
Polipropilen tüp (15 ve 50 mL)	: Nest
Soğutmalı santrifüj	: Eppendorf Centrifuge 5810 R
Steril polipropilen santrifüj tüpü (15 ve 50 mL)	: Isolab
Steril serolojik pipet (5, 10, 25 ve 50 mL)	: LP
Termostatlı su banyosu	: Wise Clean Wisd WUC-D06H
Vorteks	: Bio-Rad BR-2000
Hücre Sayım Cihazı	: Bio-Rad TC20
Pipet ucu (10, 20, 100, 200, 300 ve 1000 µL)	: Nest

## 4. YÖNTEMLER

Gabapentin ve pregabalin'in hepatotoksik etkisinin değerlendirilmesinde HepG2 (insan karaciğer hepatosellüler karsinoma hücre dizisi) hücre dizileri kullanıldı.

### 4.1. Hücrelerin Çoğaltılması

Deneylerde kullanılan HepG2 hücrelerinin çoğaltılması ve deneye hazırlanması için 2-3 günde bir rutin olarak pasajlama işlemi yapıldı. İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesini sağlamak için hafifçe çalkalandı ve ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı. Hücrelerin yıkanması için hücre kültür şişesine 5 mL fosfat tamponu ilave edildi ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı. Kültür şişesine tripsin- etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (1X) ilave edildikten sonra inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletildi (% 5 CO<sub>2</sub>, % 95 nem ve 37 °C). İnkübatörden alınan kültür şişelerinin üzerine besiyeri ilave edilerek hücreler süspansiyon edildi ve 1:2, 1:3 bölünerek yeni kültür şişelerine aktarıldı. Kültür şişeleri inkübatöre konularak inkübasyona bırakıldı.

### 4.2. Hücrelere MTT Sitotoksikite Testinin Uygulanması

MTT canlı hücrelerdeki metabolik aktivitenin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Tetrazolium tuzları, metabolizma ve solunum zinciri intakt hücrelerde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile formazana dönüşmektedir. Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz sarı renkli tetrazolium tuzunu elektron kenetli reaktif varlığında çözünür turuncu renkli formazana dönüştürmektedir (Berridge vd., 2005).

İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi içindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Kültür şişesine tripsin-EDTA çözeltisi (1X) ilave edilerek inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletildi. İnkübatörden alınan kültür şişesi içine besiyeri ilave edildi ve pipetleme ile hücre süspansiyonu hazırlandı. Pipet yardımıyla kültür şişesinin içindeki besiyeri süspansiyonu santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı, hücrelerin tripan mavisi ile boyanması ve ardından otomatik hücre sayma cihazı kullanılarak belirlendi. Her bir kuyucukta  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 96'lık hücre kültür plakasına hücre süspansiyonu dağıtıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür plakalarının üst kısmı ters çevrilerek uzaklaştırıldı. Hücreler fosfat tamponu ile yıkandı ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra

gabapentin ve pregabalin'in 1 – 0,000316 mM aralığında olacak şekilde hazırlanmış 8 farklı konsantrasyonu 8 tekrarlı olacak şekilde hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna uygulandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür plakasının üst kısmı ters çevrilerek uzaklaştırıldı. Hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna fosfat tamponu çözeltisi ilave edildi ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna besiyerinde hazırlanmış 100 µL MTT çözeltisi (0,5 mg/mL) ilave edildi ve 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür plakasının üst kısmı ters çevrilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna 100 µL DMSO ilave edildi. Hücre kültür plakasının optik dansitesi (OD) 540 nm' de okundu. Gabapentin ve pregabalin için non-lineer regresyon analizi ile inhibitör konsantrasyon 50 (IK<sub>50</sub>) değeri hesaplandı ve sitotoksik özellikleri yorumlandı.

MTT sitotoksikite testi gabapentin ve pregabalin için 3 kez tekrarlandı. Gabapentin ve pregabalin'in stok çözeltileri besiyerinde hazırlandı.

### **4.3. Apoptoz Ölçümü (Flow (Akış) Sitometrik Yöntem)**

Hücre apoptoz uyarısı alırsa hücre zarının sitoplazmik yüzeyindeki lipid sırasında bulunan fosfatidilserin hücre zarının dış lipid tabakasına geçmektedir. Bu yer değiştirme apoptozun erken döneminde gerçekleşmektedir. Anneksin V fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, bu protein floresan bir madde ile (FITC) işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilmektedir. Bu bağlanma oranı da akış sitometri cihazı ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerde de anneksin bağlanması görülebileceği için ayrıca vital bir boya olan propidiyum iyodür (PI) boyaması da yapılmaktadır. Canlı hücrelerin zarları sağlam olduğu için PI boyası ile boyanmamaktadır. Canlı hücreler FITC (-) / PI (-), erken apoptotik hücreler FITC (+) / PI (-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler FITC (+) / PI (+) olarak ayırt edilmektedir (Jayakumar vd., 2012).

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı belirlendikten sonra her bir kuyucukta  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde 96'lık hücre kültür plakasına hücre süspansiyonu dağıtıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. MTT sitotoksikite sonuçlarına göre gabapentin ve pregabalin'in 0,316-0,1-0,0316 mM olacak şekilde hazırlanmış 3 farklı konsantrasyonu 2 tekrarlı olacak şekilde hücre kültür

plakasının her bir kuyucuğuna uygulandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür plakasındaki besiyerleri farklı santrifüj tüplerine aktarıldı.

Hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna tripsin-EDTA çözeltisi (1X) ilave edildi ve plaka inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletildi. İnkübatörden alınan hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna besiyeri ilave edildi ve pipetleme ile hücre süspansiyonu hazırlandı. Her bir kuyucuktaki hücre süspansiyonu ilgili santrifüj tüpüne aktarıldı ve +4 °C, 1200 g, 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletine 100 µL “Binding buffer” ilave edildi. Daha sonra tüpe 5 µL Anneksin-5, FITC ve 10 µL PI ilave edilerek 15 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüpe 400 µL “Binding buffer” ilave edilerek hücreler tekrar süspanse edildi. Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi, Hücre Kültürü Laboratuvarında bulunan Akış Sitometri cihazında analiz gerçekleştirildi. Akış sitometri testi gabapentin ve pregabalin için 3 kez tekrarlandı.

#### **4.4. Biyokimyasal Analiz**

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı belirlendikten sonra 25 cm<sup>2</sup> lik hücre kültür şişesine 5x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu ilave edildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. MTT sitotoksosite sonuçlarına göre gabapentin ve pregabalin’in 0.316-0.1-0.0316 mM olacak şekilde hazırlanmış 3 farklı konsantrasyonu farklı hücre kültür şişelerine uygulandı ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür şişesindeki besiyerleri toplandı ve +4 °C, 1200 g, 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantta enzim bağlı immunosorbent assay (ELİSA) kit prosedürüne uygun olarak AST, ALT, total bilirubin ve üre seviyeleri belirlendi.

#### **4.5. ROT Seviyesinin Ölçülmesi**

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı belirlendikten sonra her bir kuyucukta 5x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde 96’lık hücre kültür plakasına hücre süspansiyonu dağıtıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. MTT sitotoksosite sonuçlarına göre gabapentin ve pregabalin’in 0.316-0.1-0.0316 mM olacak şekilde hazırlanmış 3 farklı konsantrasyonu farklı hücre kültür plakasına uygulandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür plakasının her bir



kuyucuğuna besiyerinde hazırlanmış 20 µM dikloro-dihidro-fluorescein diasetat (DCFH-DA) çözeltilisi ilave edildi ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür plakasının üst kısmı ters çevrilerek uzaklaştırıldı. Hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna fosfat tamponu çözeltilisi ilave edildi ve yıkama çözeltilisi ortamdan uzaklaştırıldı. Hücre kültür plakasının 485 nm eksitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında floresans ölçümü gerçekleştirildi. Deneylerde pozitif kontrol olarak 0.5 mM tert-butil hidroperokside (t-BOOH) çözeltilisi kullanıldı.

#### **4.6. İstatistiksel Analiz**

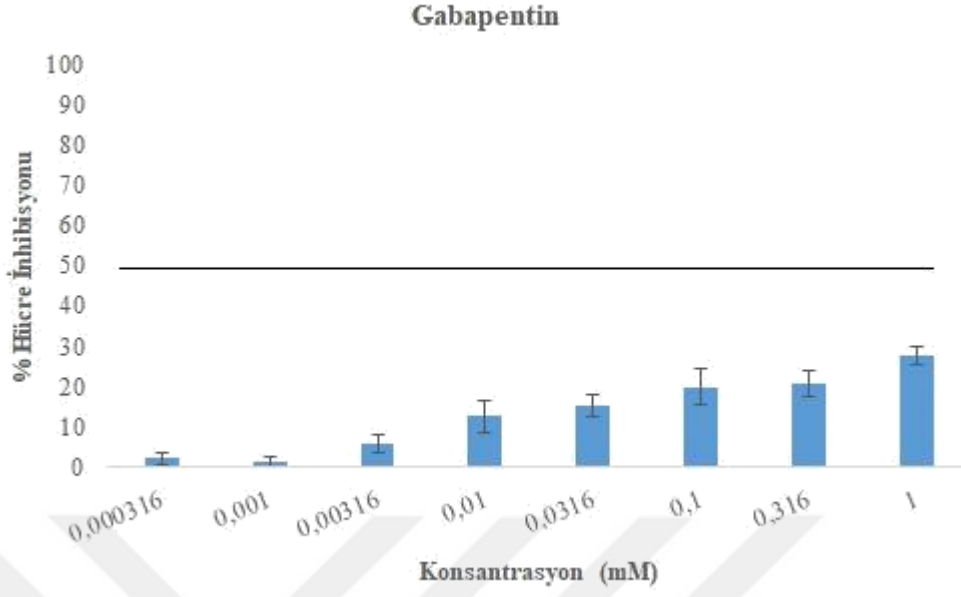
Sonuçlar ortalama  $\pm$ standart sapma olarak sunulacaktır. İstatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism 5 programında tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey çok yönlü karşılaştırma testi ile gerçekleştirilecektir.  $P < 0.05$  değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir.

## 5. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

İlaçlarla indüklenen hepatotoksisite ciddi morbitite ve mortalite açısından önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle ilaçların güvenli kullanımları için hepatotoksisite açısından değerlendirilmesi gerekmektedir (Qiaoli vd., 2010). HepG2 hücreleri sağlıklı insan hepatositleri gibi hepatositlerin özel fonksiyonlarının çoğunu korudukları için *in vitro* ksenobiyotik biyotransformasyonunu ve karaciğer toksisitesini araştırmak için kabul edilebilir bir model olarak kabul edilmektedir (Pareek vd., 2013). Bu tez çalışması kapsamında farklı nörolojik endikasyonlarda sıklıkla kullanılan ilaçlar olarak gabapentin ve pregabalinin HepG2 hücrelerinde *in vitro* hepatotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmamızda gabapentin ve pregabalinin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir, ancak test edildikleri konsantrasyonlarda ajanlar tarafından meydana gelen inhibisyonun anlamlı bir düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Konsantrasyon bağımlı olarak gabapentin ve pregabalin maruziyetinin hücrelerde apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Hepatoselüler hasarın bir göstergesi olarak intraselüler bir enzim olan AST seviyesinin gabapentin ve pregabalin uygulanan hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edilmiş, bu doğrultuda ajanların HepG2 hücrelerinde membran hasarına neden olabildiği sonucuna varılmıştır. ROT seviyesinde özellikle pregabaline maruz kalan hücrelerde anlamlı artış dikkat çekmiştir.

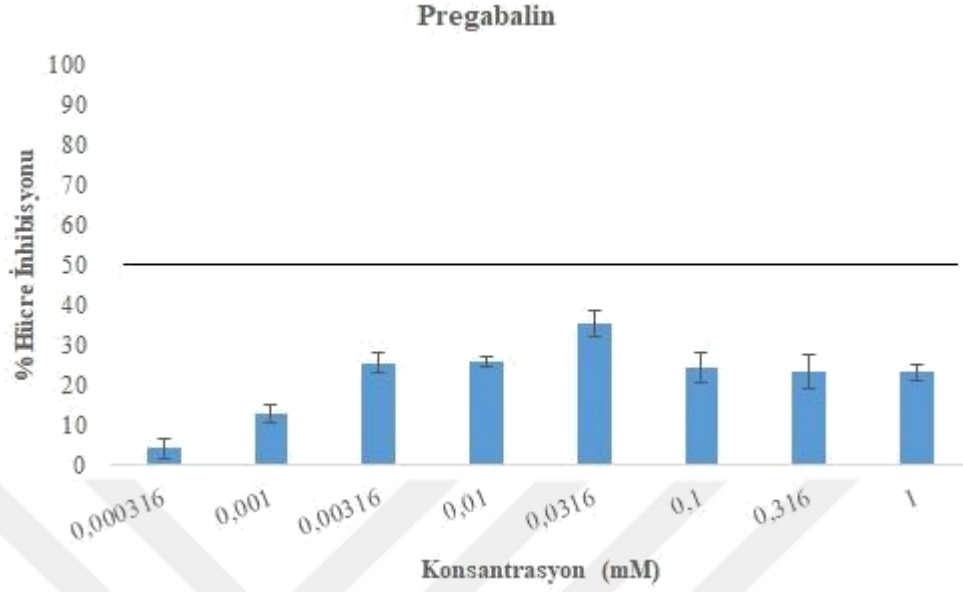
### 5.1. MTT Sitotoksisite Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Gabapentine maruz bırakılan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı 0.000316 mM için %2.8, 0.001 mM için %1.43, 0.00316 mM için %5.81, 0.01 mM için %12.53, 0.0316 mM için %15.38, 0.1 mM için %19.83, 0.316 mM için 20.57, 1 mM için %27.66 azalmıştır (Şekil 5.1.). Bu sonuçlara göre gabapentin HepG2 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında test edildiği konsantrasyonlarında hücre canlılığında %50 inhibisyona ulaşmadığı belirlenmiştir. Ayrıca gabapentinin artan konsantrasyonlarında hücre canlılığını azalttığı tespit edilse de bu sonuçlar doğrultusunda HepG2 hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını söylemek mümkündür.



**Şekil 5.1.** Gabapentin'e ait % hücre inhibisyon değerleri

Pregabalin maruz bırakılan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı 0,000316 mM için %4,25, 0,001 mM için %12,86, 0,00316 mM için %25,55, 0,01 mM için %25,84, 0,0316 mM için %35,22, 0,1 mM için %24,17, 0,316 mM için 23,24, 1 mM için %23,15 azalmıştır (Şekil 5.2.). Bu sonuçlara göre pregabalinin HepG2 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında test edildiği konsantrasyonlarında hücre canlılığında %50 inhibisyona ulaşmadığı belirlenmiştir. Ayrıca pregabalinin hücre canlılığı üzerinde konsantrasyon bağımlı bir etkisi gözlenmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda gabapentine benzer şekilde pregabalinin de HepG2 hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını söylemek mümkündür.

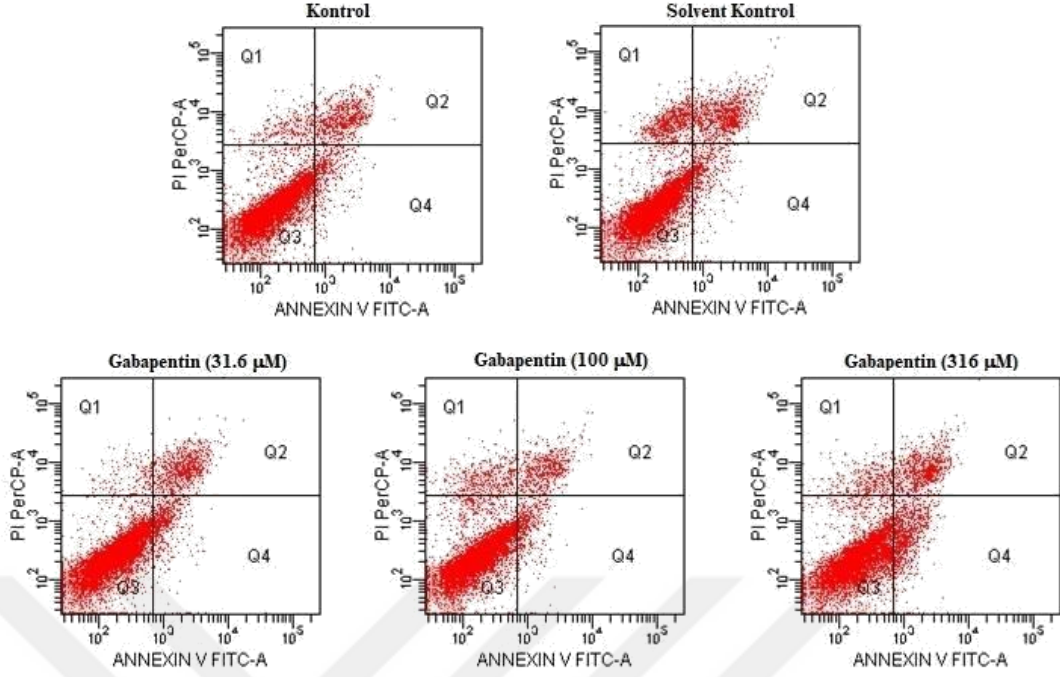


**Şekil 5.2.** Pregabalin'e ait % hücre inhibisyon değerleri

## 5.2. Apoptoz Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Hücre sel yuvarlama (rounding) ve ayrılma (detachment), nükleer kondensasyon ve fragmentasyon ve pozitif Annexin V / PI boyanması, apoptoz indüksiyonunun klasik belirteçleri olarak kabul edilmektedir (Thongtan vd., 2004). Akış sitometrisi çalışma sonuçlarına göre gabapentin ve pregabalinin HepG2 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediği tespit edilmiştir.

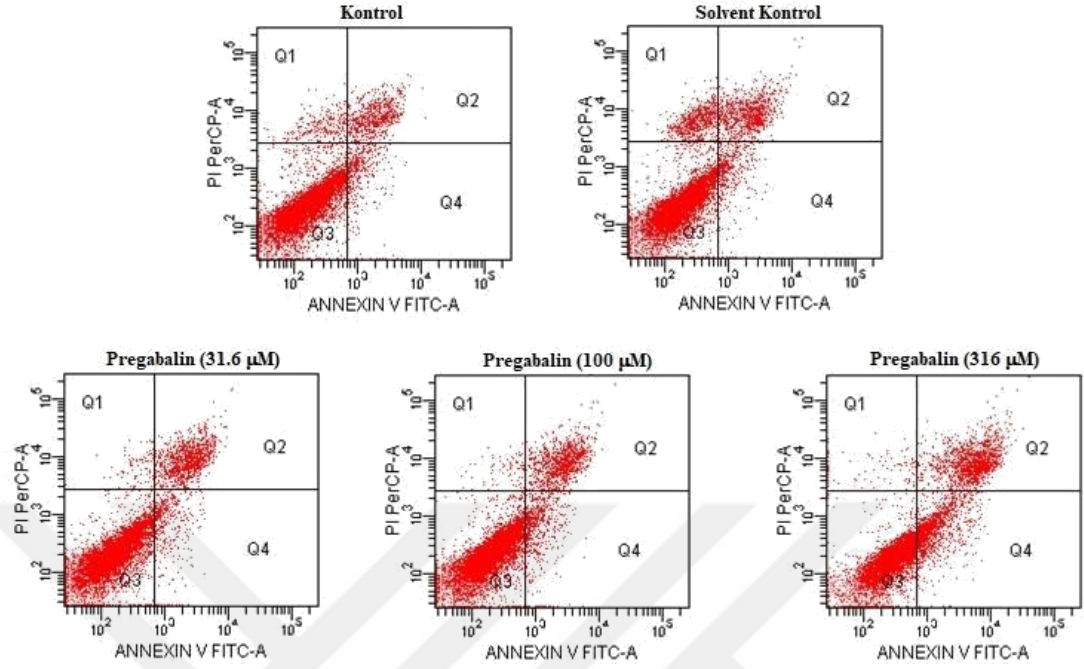
Gabapentinin 0,0316 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %9,9 ve nekrotik hücre popülasyonu %4,2, 0,1 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %12,9 ve nekrotik hücre popülasyonu %1,6, 0,316 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %17,3 ve nekrotik hücre popülasyonu %3,3 olarak belirlendi. Gabapentinin akış sitometrik analiz diyagramı Şekil 5.3.'te sunulmuştur.



Şekil 5.3. HepG2 hücre hattı için gabapentin'in akış sitometrik analiz diyagramı

Üst sol kadrant nekrotik (Q1; Anneksin V-negatif/PI-pozitif); üst sağ kadrant geç apoptotik hücreler (Q2; Anneksin V-pozitif/PI-pozitif); alt sol kadrant canlı hücreler (Q3; Anneksin V-negatif/PI-negatif) ve alt sağ kadrant apoptotik hücreler (Q4; Anneksin V-pozitif/PI-negatif).

Pregabalinin 0,0316 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %14,2 ve nekrotik hücre popülasyonu %1,1, 0,1 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %16,1 ve nekrotik hücre popülasyonu %2,9, 0,316 mM konsantrasyonu için apoptotik hücre popülasyonu %27,4 ve nekrotik hücre popülasyonu %1,0 olarak belirlendi. Pregabalinin akış sitometrik analiz diyagramı Şekil 5.4.'te sunulmuştur.



**Şekil 5.4.** HepG2 hücre hattı için pregabalin'in akış sitometrik analiz diyagramı.

Üst sol kadrant nekrotik (Q1; Anneksin V-negatif/PI-pozitif); üst sağ kadrant geç apoptotik hücreler (Q2; Anneksin V-pozitif/PI-pozitif); alt sol kadrant canlı hücreler (Q3; Anneksin V-negatif/PI-negatif) ve alt sağ kadrant apoptotik hücreler (Q4; Anneksin V-pozitif/PI-negatif).

**Çizelge 5.1.** Farklı konsantrasyonlarda gabapentin ve pregabalin uygulanan hücrelerde canlı/apoptotik/nekrotik hücre yüzdesi

Madde	mM	Q1	Q2	Q3	Q4
Gabapentin	0,0316	4,2	5,0	86,4	4,4
	0,1	1,6	7,1	85,6	5,8
	0,316	3,3	7,1	79,4	10,2
Pregabalin	0,0316	1,1	9,8	84,8	4,4
	0,1	2,9	9,3	83,0	6,8
	0,316	1,0	12,9	71,6	14,5

Q1 (Anneksin V-negatif/PI-pozitif): nekrotik hücreler; Q2 (Anneksin V-pozitif/PI-pozitif): geç apoptotik hücreler; Q3 (Anneksin V-negatif/PI-negatif): canlı hücreler; Q4 (Anneksin V-pozitif/PI-negatif): apoptotik hücreler.

### 5.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

HepG2 hücrelerinde AST seviyesi açısından gruplar karşılaştırıldığında 0,1 ve 0,316 mM gabapentin maruziyetinin AST seviyelerini kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı arttırdığı tespit edilmiştir. Gabapentine benzer şekilde 0,1 ve 0,316 mM pregabalin uygulanan gruplarda da AST seviyelerinin kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı arttığı belirlenmiştir. Kültür ortamında yüksek seviyelerde intraselüler enzimlerin, ALT ve AST tespiti hepatosit hücre zarının işlevsel bütünlüğünün kaybına işaret etmektedir (Pareek vd., 2013).

HepG2 hücrelerinde ALT, üre ve total bilirubin seviyeleri açısından gruplar karşılaştırıldığında gabapentin ve pregabalin maruziyetinin ALT, üre ve total bilirubin seviyelerinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir.

HepG2 hücrelerinde gruplara ait AST, ALT, üre ve total bilirubin seviyeleri Çizelge 5.2.'de sunulmuştur.

**Çizelge 5.2.** Farklı konsantrasyonlarda gabapentin ve pregabalin uygulanan hücrelerde AST, ALT, üre ve total bilirubin seviyeleri.

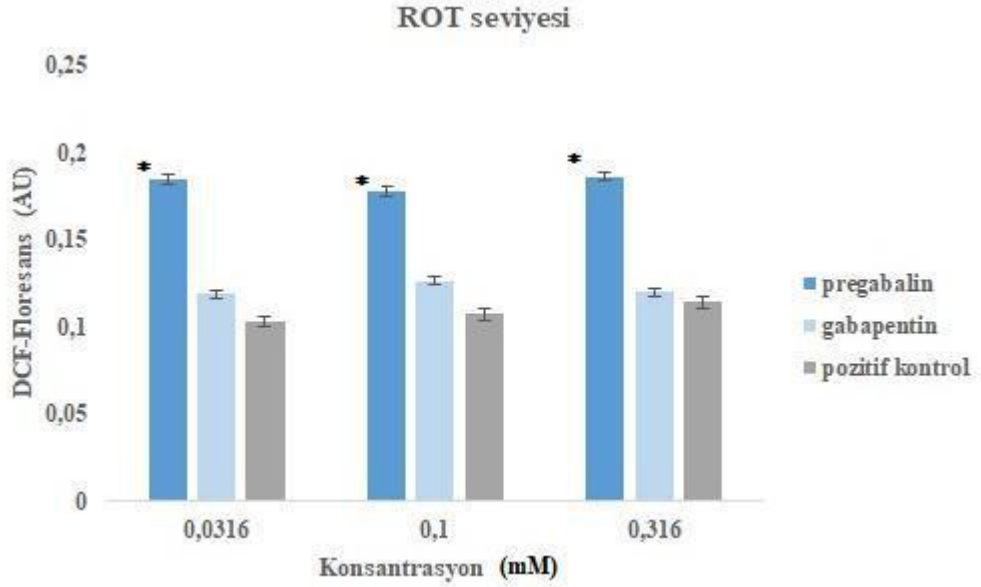
	Kontrol	Gabapentin (mM)			Pregabalin (mM)		
		0,0316	0,1	0,316	0,0316	0,1	0,316
AST	7,16 ±0,68	8,10 ±0,94	9,01 ±0,68 (* )	9,06 ±0,99 (* )	6,03 ±0,94	9,10 ±0,76 (* )	9,10 ±0,94 (* )
ALT	6,17 ±0,81	5,06 ±0,89	4,96 ±0,95	5,23 ±0,50	3,20 ±1,21	4,06 ±0,90	4,03 ±0,95
Üre	3,30 ±0,08	3,24 ±0,06	3,21 ±0,1	3,30 ±0,09	2,50 ±0,09	2,61 ±0,09	2,91 ±0,08
Total Bilirubin	0,001 ±0,0006	0,02 ±0,008	0,008 ±0,002	0,01 ±0,006	0,02 ±0,008	0,02 ±0,009	0,02 ±0,007 (* )

### 5.4. ROT Seviyesinin Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Toksik kimyasallara maruziyet sonrasında hücrelerde meydana gelen ROT hücre canlılığında, hücre apoptozunda ve hücre ölümünde kritik öneme sahiptir (Franklin, 2011). Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan t-BOOH uygulanan hücrelerde

DCF floresans yoğunluğu büyüme kontrol hücrelerine göre anlamlı olarak artmıştır. HepG2 hücrelerinde DCF floresans yoğunluğu 0,0316 mM t-BOOH için 0,10, 0,1 mM için 0,11 ve 0,316 mM için 0,12 olarak ölçülmüştür. Diğer taraftan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında gabapentin uygulanan hücrelerde DCF floresans yoğunluğu 0,0316 mM için 0,12, 0,1 mM için 0,13, 0,316 mM için 0,12 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler doğrultusunda gabapentinin hücrelerde ROT oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı arttırmadığı belirlenmiştir. Pregabalin uygulanan hücrelerde ise DCF floresans yoğunluğu 0,0316 mM için 0,18, 0,1 mM için 0,18, 0,316 mM için 0,19 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler doğrultusunda pregabalinin hücrelerde ROT oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı arttırdığı belirlenmiştir ( $p < 0,01$ ).

Çalışmalarda artmış ROT seviyesinin hücre canlılığını azaltan ve hücrede apoptozu arttıran önemli bir faktör olduğu ifade edilmektedir (Gao vd., 2013; Palacio-Cortes vd., 2017). Özellikle pregabalin maruziyetine bağlı olarak hücrelerde apoptozun belirgin olarak artmasını ROT seviyesindeki artışlar ile ilişkilendirmek mümkündür. Gabapentin ile indüklenen ROT üretiminin hücreler tarafından tolere edebilecek limitler içinde olduğunu söylemek mümkündür.



**Şekil 5.5.** Farklı konsantrasyonlarda uygulanan gabapentin ve pregabalin uygulanan hücrelerde reaktif oksijen türlerinin seviyeleri.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda hepatotoksik etkisini değerlendirdiğimiz gabapentin ve pregabalinin kayda değer bir karaciğer biyotransformasyonuna sahip olmadığı bilinmektedir. Ancak ilaçların karaciğer biyotransformasyonunun olmaması ilaca bağlı hepatotoksisite gelişimini engellemektedir (Sendra vd., 2011). Her iki ilaç Gıda ve İlaç Dairesi ve Avrupa İlaç Ajansı tarafından karaciğer toksisitesi açısından güvenilir kabul edilse de varolan şüpheli vakalar her iki ilacın da klinik olarak belirgin karaciğer hasarının olası nedeni olarak sınıflandırılmasına neden olmuştur (Sendra vd., 2011; Livertox, 2019). Tez çalışması kapsamında hepatotoksisite araştırmalarında kabul görmüş bir model olarak HepG2 hücrelerinde gabapentin ve pregabalinin etkileri incelenmiş, pregabalin maruziyetinde belirgin olmak üzere hepatotoksisite ile ilişkilendirilebilecek bulgular elde edilmiştir. Ancak her iki ilaç için de hepatotoksisite riskini tayin etmek oldukça zor gibi görünmektedir. *İn vivo* hayvan modelleri kullanılarak tekrarlayan farmakolojik dozlarda gabapentin ve pregabalin maruz bırakılan deney hayvanlarında, maruziyeti takiben hepatotoksisitenin biyokimyasal ve morfolojik biyogöstergelerinin belirlenmesi ile olası risk aydınlatılabilecektir. Diğer taraftan gabapentin ve pregabalin maruz kalan hastalarda da karaciğer hasarı insidansını tahmin etmeye olanak sağlayacak ve karaciğer fonksiyon testlerindeki anomalilerin tek nedenin bu ilaçlar olup olmadığını işaret edecek yeterli veri de bulunmamaktadır. Dolayısıyla, gabapentin ve pregabalin ile karaciğer toksisitesinin hastalarda çok nadir meydana geldiği ifade edilse de bu ilaçların potansiyel hepatotoksik etkilerinin farkında olmak oldukça önemlidir.

## KAYNAKÇA

- Alempijevic, T., Zec, S. and Milosavljevic, T. (2017). Drug-induced liver injury: Do we know everything? *World J Hepatol.*, 9 (10), 491–502.
- Aricı, S. (2008). Toksik hepatit. *Pam. Tıp Derg.*, 2, 113-119.
- Baldev, K.S. and White-Scott, S. (1997). Side effects of add-on gabapentin in individuals with epilepsy, mental retardation, and developmental disabilities. *Epilepsia*, 38, 180.
- Bamanikar, A., Dhobale, S. and Lokwani, S. (2013). Pregabalin hypersensitivity in a patient treated for postherpetic neuralgia. *Ind. J. Pharmacol.*, 45 (5), 522-523.
- Ben-Menachem, E. (2004). Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia*, 45 (6), 13-18.
- Berridge, M.V., Herst, P.M. and Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 11, 127-152.
- Bleibel, W., Kim, S., D’Silva, K., Lemmer, E.R. (2007). Drug-induced liver injury: review article. *Dig. Dis. Sci.*, 52 (10), 2463–2471.
- Bureau, C., Poirson, H., Peron, J.M., Vinel, J.P. (2003). Gabapentin-induced acute hepatitis. *Gastroenterol Clin. Biol.*, 27 (12), 1169-1170.
- Busardò, F.P. and Grieco, A. (2017). Editorial–drug-induced hepatotoxicity. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 21 (1), 135-137.
- Chen, M., Suzuki, A., Borlak, J., Andrade, R.J., Lucena, M.I. (2015). Drug-induced liver injury: interactions between drug properties and host factors. *J. Hepatol.*, 63 (2), 503–514.
- Conway, J. and Henry, T.R. (2012). Antiepilepsy drugs: mechanisms of action and pharmacokinetics. *Epilepsy.*, 1 (5), 1-11.
- Crespo Perez, L., Moreira Vicente, V., Manzano Fernandez, R., Garcia Aguilera, X.A. (2008). Cholestasis associated with pregabalin treatment. *Med. Clin. (Barc)*, 130 (4), 157-158.
- Cullen, J. M. (2005). Mechanistic classification of liver injury. *Toxicol. Pathol.*, 33 (1), 6–8.
- Das, N., Dhanawat, M. and Shrivastava, S.K., (2012). An overview on antiepileptic drugs. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 6 (4), 178-193.

- David, S. and Hamilton, J.P. (2010). Drug-induced liver injury. *US Gastroenterol Hepatol Rev.*, 6, 73–80.
- Dogan, S., Ozberk, S. and Yurci, A. (2011). Pregabalin-induced hepatotoxicity. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.*, 23 (7), 628.
- Dökmeci, İ. (2007). *Farmakoloji İlaçlar ve Etkileşimleri*, İstanbul: Alfa Yayınları.
- Erdoğan, F.F. (2014). Yeni antiepileptik ilaçlar. *Epilepsi*, 20, 56-58.
- Eren, M., Saltık-Temizel, İ.U. ve Koçak, N. (2004). İlaça bağlı hepatotoksisite. *Çocuk Sağlığı Hast Derg.*, 47, 222–227.
- Franklin, J.M. (2011). Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 1437-1448.
- French, J.A. (2012). Trial design: How do we figure out if and AED works?. *Epilepsia*, 12 (1), 24-26.
- French, J.A. Gazzola, D.M. (2013). Antiepileptic drug treatment: new drugs. and new strategies. *Continuum*, 19 (3), 643-655.
- Gao, L., Yuan, T., Zhou, C.Q., Cheng, P., Bai, Q.F., Ao, J.J., Wang, W.H., Zhang, H.M. (2013). Effects of four commonly used UV filters on the growth, cell viability and oxidative stress responses of the *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere*, 93, 2507-2513.
- García-Cortés, M., Ortega-Alonso, A., Lucena, M.I., Andrade, R.J. (2018). Drug-induced liver injury: A Safety Review. *Expert Opin. Drug. Saf.*, 17 (8), 795–804.
- Goldenberg, M.M. (2010). Overview of drugs used for epilepsy and seizures etiology, diagnosis, and treatment, *P&T*, 35 (7), 392-415.
- Griffin, E., Brown, J.N. (2016). Pregabalin for the treatment of restless legs syndrome. *Ann. Pharmacother*, 50 (7), 586–591.
- Honarmand, A., Safavi, M. and Zare, M. (2011). Gabapentin: An update of its pharmacological properties and therapeutic use in epilepsy. *J. Res. Med. Sci.*, 16 (8), 1062-1069.
- Jackson, C., Clanahan, M.J., Joglekar, K., Decha-Umphai, S.T. (2018). Hold the gaba: A Case of gabapentin-induced hepatotoxicity. *Cureus.*, 10 (3), 2269.
- Jayakumar, S., Haridass, S. ve Krishnamurthy, V. (2012). Anticancer activity of Punica Granatum Rind extracts against human lung cancer cell line. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5 (2), 204-210.

- Kelly, K. (1998). Gabapentin. *Neuropsychobiology*, 38 (3), 139–144.
- Kosanam, S. and Boyina, R. (2015). Drug-induced liver injury: a review. *Int. J. Pharmacol Res.*, 5 (2), 24-30.
- Lasso-de-la-Vega, M.C., Zapater, P., Such, J., Perez-Mateo, M., Horga, J.F. (2001). Gabapentin-associated hepatotoxicity. *Am. J. Gastroenterol.*, 96 (12), 3460–3462.
- Lee, J.W. and Dworetzky, B., (2010). Rational polytherapy with antiepileptic drugs. *Pharmaceuticals*. 3, 2362-2379.
- Lee, S.J., Lee, Y.J. and Park, K.K. (2016). The pathogenesis of drug-induced liver injury. *Expert Rev. Gastroenterol Hepatol.*, 10 (10), 1175–1185.
- Madkarni, S., LaJoie, J., Devinsky, O. (2005). Current treatments of epilepsy. *Neurology.*, 64 (12), 2-11.
- McLachlan, R.S. (2000). Neurologic disorders-seizures. *Melmon and Morrell's Clinical Pharmacology Basic Principles in Therapeutics*, McGraw-Hill Companies, United States of America, 411-423.
- Nicholas, D., Sarrif, A.B., Palanivelu, T., Nelson, K., George, S.B. (2015). Evaluation of therapeutic drug monitoring (TDM) on older antiepileptic medications. *Der. Pharmacia Lettre*, 7 (2), 243-250.
- Palacio-Cortes, A.M., Signorini-Souza, I.D.L., Hara, E.L.Y., Disner, R.G., Rebechi, D., Grassi, M.T., Cestari, M.M., Navarro-Silva, M.A. (2017). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) effects on *Chironomus sancticaroli* larvae after short-term exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139, 308-315.
- Pareek, A., Godavarthi, A., Issarani, R., Nagori, B.P. (2013). Antioxidant and hepatoprotective activity of *Fagonia schweinfurthii* (Hadidi) Hadidi extract in carbontetrachloride induced hepatotoxicity in HepG2 cell line and rats. *J. Ethnopharmacol.* 150 (3), 973-81.
- Perucca, E. (2000). TDM and the new anticonvulsants, is there a role for therapeutic drug monitoring of new anticonvulsants?. *Clin. Pharmacokinet*, 38 (3), 191-204.
- Podell, M. (2013). Antiepileptic drug therapy and monitoring. *Companion Animal Medicine.*, 28 (2), 59-66.
- Richardson, C.E., Williams, D.W., Kingham, J.G. (2002). Gabapentin induced cholestasis. *BMJ*, 325 (7365), 635.

- Roth, A.D. and Lee, M.Y. (2017). Idiosyncratic drug-induced liver injury (idili): potential mechanisms and predictive assays. *Biomed. Res. Int.*, 2017, 1–23.
- Sendra, J.M., Junyent, T.T. and Pellicer, M.J.R. (2011). Pregabalin-induced hepatotoxicity. *Ann. Pharmacother*, 45 (6), e32–e32.
- Şenol, M., Gün, İ. ve Saraçoğlu, M. (2006). Hasta Bakış Açısı: Epilepsi Hakkında Bilgi ve Anlayış. *Nobel Medicus*, 19 (7), 95-101.
- Shneker, B.F. and Fountain, N.B. (2003). Epilepsy. *Disease-a-Month*, 49 (7), 426-478.
- Spina, E. and Perugi, G. (2004). Antiepileptic drugs: indications other than epilepsy. *Epileptic. Disorders.*, 6 (2), 57-75.
- Stafstrom, C.E. (2006). Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26 (8), 983-1004.
- Thongtan, T., Panyim, S. and Smith, D.R. (2004). Apoptosis in dengue virus infected liver cell lines HepG2 and Hep3B. *J. Med. Virol.* 72, 436-444.
- Tujios, S. and Fontana, R.J. (2011). Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 8 (4), 202–211.
- Vidaurre, J., Gedela, S. and Yarosz, S. (2017). Antiepileptic drugs and liver disease. *Pediatr. Neurol.*, 77, 23–36.
- Wells, B.G. (2009). Neurologic disorders- Epilepsy. *Pharmacotherapy Handbook Seventh Edition* içinde (577-599), United States of America: The McGraw-Hill Companies.
- Wongtrakul, J., Paemanee, A., Wintachai, P., Thepparit, C., Roytrakul, S., Thongtan, T., Janphen, K., Supparatpinyo, K., Smith, D.R. (2016). Nevirapine induces apoptosis in liver (HepG2) cells. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9 (6), 547-553.
- World Health Organization. (2019). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy> (Erişim tarihi: 23.07.2019).
- Yasaei, R. and Saadabadi, A. (2019). *Gabapentin*. e-book. StatPearls Publishing. 2019. Last Update: May 10, 2019.
- Zylicz, Z., Krajnik, M. (2008). The effect of gabapentin and pregabalin on symptoms other than pain and seizures. A review of the evidence. *Adv. Pall. Med.*, 7, 179–184.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Sırma GİRİTLİ  
Yabancı Dil : İngilizce  
Doğum Yeri ve Yılı : Malatya / 25.06.1980  
E-Posta : sirmaaktan.33@hotmail.com.tr

### Eğitim Durumu:

Lisans : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eskişehir (2001)  
Lise : Cengiz Topel Lisesi, Tarsus (1997)  
Orta öğretim : Cengiz Topel Lisesi, Tarsus (1994)  
İlköğretim : Turgut İçgören İlköğretim Okulu, Tarsus (1991)

### Mesleki Deneyim:

Kurum : Tunceli Devlet Hastanesi, Tunceli (2004-2006)  
: Dr.Abdullah Sayiner Göğ. Hast. Hastanesi, Buldan (2006-2007)  
: Yunus Emre Devlet Hastanesi, Eskişehir (2009-2017)  
Birim : Eczane  
Unvan : Sorumlu Eczacı  
Kurum : Bağcılar Sağlık Grup Başkanlığı, İstanbul (2007-2009)  
Birim : Eczacılık Şube  
Unvan : Eczacı  
Kurum : Eskişehir İl Sağlık Müdürlüğü, Eskişehir (2017-2019)  
Birim : KHHB Tıbbi Cihaz ve İlaç Birimi  
Unvan : Sözleşmeli Uzman Eczacı