

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAÇ TOKSİSİTESİNDE MİTOKONDRİNİN ROLÜNÜN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Programı

Doktora Tezi

Uzman Eczacı Ege ARZUK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hilmi ORHAN

İZMİR

2018

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAÇ TOKSİSİTESİNDE MİTOKONDRİNİN ROLÜNÜN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Programı

Doktora Tezi

Uzman Eczacı Ege ARZUK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hilmi ORHAN

İZMİR

2018

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Hilmi ORHAN

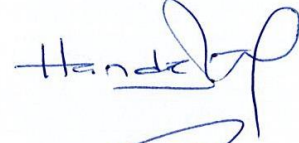


(Danışman)

Üye: Prof. Dr. Halit Sinan SÜZEN



Üye: Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN



Üye: Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS



Üye: Prof. Dr. Metiner TOSUN

Metiner Tosun

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 24/9/2018

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü desteği veren, tez çalışmalarım boyunca teorik ve pratik olarak bilimsel gelişimime katkıda bulunan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hilmi ORHAN'a en içten dileklerle teşekkür ederim. Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS'a, Sayın Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN'a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sumru SÖZER KARADAĞLI'ya teşekkürü bir borç bilirim. İlaçların mitokondriyel DNA metilasyon düzeyine etkilerinin araştırılmasına yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Sibel ÖZDEN'e çok teşekkür ederim.

Çalışmamda emeği geçen, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Fuat KARAKUŞ'a, Arş. Gör. Ali ERGÜÇ'e, Arş. Gör. Rasih KOCAGÖZ'e çok teşekkür ederim. Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan Arş. Gör. Büşra DEMİR'e ve Arş. Gör. Merve TUNÇYÜREKLİ'ye çok teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen aileme ve tüm dostlarıma teşekkür ederim.

Bu tez, TÜBİTAK (2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı ve 110S224 nolu 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı) ve E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP-16/ECZ/024) tarafından desteklenmiştir.

Ege ARZUK

İzmir

2018

ÖZET

İlaç Toksisitesinde Mitokondrinin Rolünün Değerlendirilmesi

Mitokondri hücresel enerjinin üretildiği, oksidatif solunumun ve diğer birçok yaşamsal öneme sahip olayın gerçekleştiği organeldir. Bu nedenle ilaçların neden olduğu mitokondriyel yapısal ya da işlevsel bozukluklar, organizma açısından ciddi sonuçlar doğurabilmektedir. Bu tez kapsamında toksisite mekanizması tam olarak anlaşılamamış olan bazı ilaçların mitokondri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Klozapin kullanan hastalarda gözlenen kardiyotoksisite ve parasetamol kullanan hastalarda oluşan nefrotoksisitenin mekanizması henüz anlaşılamamıştır, ancak biyotransformasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Advers ilaç reaksiyonlarının önemli bir kısmının ilaç molekülünden oluşan reaktif metabolitlerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle her iki ilacın toksisitesinde mitokondriyel ve mikrozomal biyoaktivasyonun rolü araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle hastalardan elde edilen karaciğer ve böbrek dokularından hazırlanan mikrozomlar parasetamolle inkübe edilmiş, oluşan reaktif metabolit miktarları ve biyoaktivasyonu katalize eden enzim aktivitelerinde bireyler arası ve organlar arası farklılıklar ortaya konmuştur. Çalışmanın hipotezlerinden birisi olan “ilaçların mitokondri içerisinde lokal reaktif metabolit üreterek toksisiteye yol açması” olasılığı parasetamol ve klozapin için test edilmiş, bu amaçla öncelikle çeşitli tekniklerle saf mitokondriyel fraksiyonlar elde edilmiş ve saflık Western blot tekniği ile gösterilmiştir. Klozapinin fare karaciğer ve kalp mitokondriyel fraksiyonları ile inkübasyonları gerçekleştirilmiş, mitokondriyel enzimler aracılığıyla stabil metabolitlerin yanı sıra reaktif metabolit oluşumu gösterilmiştir. Benzer şekilde mitokondriler tarafından parasetamolden reaktif metabolit oluşumu da gösterilmiştir. Mitokondrilerin yapısal ve işlevsel bütünlüğünün göstergesi olarak “mitochondrial permeability transition pore (MPTP)” oluşumu ölçülmüş ve 3 ay süreyle doku ya da izole halde -86°C’de saklanan mitokondrilerin bütünlüğünü koruduğu gözlenmiştir. Klozapin ve parasetamol dışında olanzapin, nifedipin, diklofenak, valproik asit, metformin, dapson, tiyaprofenik asit ve sülfafenazolün de kalsiyum varlığında ve yokluğunda mitokondrideki MPTP indükleyici etkileri araştırılmış, diklofenak ve valproik asitin kalsiyum tarafından indüklenen MPTP oluşumunu şiddetlendirdiği, ancak hiçbir ilacın tek başına MPTP oluşturmadığı gözlenmiştir. Genlerin aktivitelerini belirleyen önemli olaylardan birisi olan DNA metilasyonunun mitokondriyel DNA’da çalışılan ilaçlar tarafından değiştirilip değiştirilmediği araştırılmış, tüm incelenen ilaçların anlamlı derecede hipometilasyona yol açtığı, klozapinin bu etkisinin reaktif metaboliti aracılığı ile olduğu gösterilmiştir. Araştırılan ilaçların mitokondrilerde gerçekleşen en önemli metabolik süreç olan oksijen tüketim hızını etkileyip etkilemediği incelenmiş, klozapin, olanzapin, nifedipin, valproik asit, dapson ve tiyaprofenik asitin tüketim hızını düşürdüğü, sülfafenazolün ise

ilginç bir şekilde artırdığı gözlenmiştir. Son olarak mitokondriyel ilaç biyotransformasyonu açısından önemli olan insan karaciğer ve kalp mitokondrilerinin antioksidan ve konjugasyon enzim aktiviteleri, otopsi sırasında farklı bireylerden elde edilen dokularda incelenmiş, her iki organ mitokondrilerinde GSTT, GSTM, CAT ve Se-GPx aktiviteleri insanda gösterilmiştir. Tez çalışmasında çalışılan ilaçların mitokondride yapısal ve/veya işlevsel etkilerinin incelenmesiyle sadece toksik değil, olası terapötik hedefler için de veri sağlanmış, klozapin-aracılıklı kardiyotoksisite ve parasetamol-aracılıklı nefrotoksisite mekanizmaları açısından yeni fikirler ortaya konmuştur. Geliştirilen bu deneysel yaklaşımlar farklı ilaç, ilaç adayları ya da diğer kimyasal maddelerin olası mitokondriyel toksisitelerini taramak üzere sonraki çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: mitokondri; biyoaktivasyon; toksisite; reaktif metabolit; klozapin; parasetamol

ABSTRACT

Evaluation of the Role of Mitochondria in Drug-Induced Toxicity

Mitochondria are organelles where the cellular energy is produced and oxidative respiration as well as many other vital physiological processes take place. Therefore any structural or functional disorders in mitochondria may cause drastic results in the organism. In this thesis, it has been aimed to investigate the effects of various drugs on mitochondria whose toxic mechanisms are unclear. Mechanisms of clozapine-induced cardiotoxicity and paracetamol-induced nephrotoxicity have not been enlightened yet, but is thought to be related with the biotransformation of the drugs. Many adverse drug reactions are known to be mediated by the reactive metabolites of the drug molecules. Therefore the role of mitochondrial and microsomal bioactivation is investigated in the toxicity of the two drugs. To achieve this aim, microsomes that are obtained from liver and kidney tissues of the patients were incubated with paracetamol. Inter-individual differences between the amounts of reactive metabolites and inter-organ variations in enzyme activities that catalyze the bioactivation of paracetamol were evaluated. Possibility of one of the hypotheses of the present study, “drugs can cause toxicity via producing local reactive metabolites in mitochondria” was tested for paracetamol and clozapine. For this aim, pure mitochondrial fractions were obtained by using various techniques and their purity was proven by Western blot analysis. Clozapine was incubated with mice liver and heart mitochondrial fractions and formation of reactive metabolite as well as several stable metabolites were shown. Similarly, reactive metabolite formation was shown for paracetamol following incubation with liver mitochondria. Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPTP) formation was measured and utilized as an indicator of the structural and functional integrity of mitochondria. Our data indicated that mitochondria maintain their integrity for 3 months when they are kept in -86°C as the whole tissue or as isolated mitochondria. Next to clozapine and paracetamol, the effects of olanzapine, nifedipin, diclofenac, valproic acid, metformin, dapson, tiaprofenic acid and sulphafenazole on mitochondria were investigated in the presence or absence of calcium as MPTP inducers. Diclofenac and valproic acid have been found to increase the formation of calcium-induced MPTP, but none of the drugs was found to induce MPTP formation alone. DNA methylation as an important determinant of the gene activity, has been further evaluated in mitochondrial DNA in the presence of the above drugs. All tested drugs were shown to cause statistically significant hypomethylation, and clozapine was shown to cause this effect via its reactive metabolite. The effect of the drugs on oxygen consumption rates, the most important metabolic process taking place in mitochondria, was further investigated. Clozapine, olanzapine, nifedipin, valproic acid, dapson ve tiaprofenic acid were shown to decrease the oxygen consumption rates, where sulphafenazol

interestingly caused an increase. Finally human liver and heart antioxidant and phase II conjugation enzyme activities that are important in terms of mitochondrial drug biotransformation, were evaluated in human tissues obtained via autopsy, and GSTT, GSTM, CAT and Se-GPx activities were shown in mitochondria from both organs in humans. By investigating the structural and/or functional effects of the drugs on mitochondria, data were obtained not only for toxic, but also for possible therapeutic targets in this thesis. As well as novel opinions have been put forward for the mechanisms of clozapine-associated cardiac toxicity and paracetamol-associated kidney toxicity. Developed experimental approaches may be used for screening the mitochondrial toxicity of other drugs, drug candidates or chemicals.

Keywords: mitochondria; bioactivation; toxicity; reactive metabolite; clozapine; paracetamol

İçindekiler

ÖNSÖZ.....	II
ÖZET.....	I
ABSTRACT	III
İçindekiler	V
Tablolar Dizini.....	XII
Şekiller Dizini	XIII
Kısaltmalar Listesi	XVII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mitokondri	3
2.2. Mitokondrinin Görevleri	6
2.2.1. Pirüvat ve Yağ Asitlerinin Oksidasyonu ve Oksidatif Fosforilasyon ..	6
2.2.2. Mitokondrinin Apoptotik Hücre Ölümündeki Rolü	7
2.2.3. Hüresel Kalsiyum Düzeyinin Regülasyonu	8
2.2.4. Endojen Metabolizmada Rolü	9
2.2.5. Mitokondriyel Oksidatif Solunumun Yan Ürünü Olarak Süperoksit Radikali ve Antioksidan Savunma Sistemleri	9
2.2.5.1. Oksidatif Stres ve Oksidatif Hasar	11
2.2.5.2. Antioksidan Savunma Sistemi	12
2.2.5.2.1. Enzimatik Antioksidanlar	12
2.2.5.2.1.1. Süperoksit Dismutaz.....	12
2.2.5.2.1.2. Katalaz	14
2.2.5.2.1.3. Glutatyon Peroksidaz	15
2.2.5.2.1.4. Glutatyon S-transferaz Enzimleri	16
2.2.5.3.1.4.1. Mitokondriyel Glutatyon S-transferaz Enzimleri.....	18
2.2.5.2.2. Enzimatik Olmayan Mitokondriyel Antioksidanlar	19

2.3. Mitokondriyel Toksikite Mekanizmaları.....	20
2.3.1. Oksidatif Fosforilasyonun İnhibisyonu	21
2.3.2. Kenetsizleyici Etki.....	22
2.3.3.Yağ Asidi Oksidasyonunun İnhibisyonu	23
2.3.4. Oksidatif Stres İndüksiyonu	25
2.3.5. Mitokondriyel Geçirgenlik-Dönüşüm Porlarının (MPTP) Oluşumu	26
2.3.6. Mitokondriyel DNA Replikasyon ya da Translasyonunun Bozulması	29
2.3.7. Mitokondriyel DNA Metilasyon Düzeylerinin Değişmesi	30
2.4. Mitokondriyel İşlevlerin Analizi	31
2.4.1. Mitokondriyel Oksijen Tüketim Hızının Ölçülmesi	31
2.4.2. Elektron Transport Zinciri Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi.....	32
2.4.3. Mitokondriyel ATP Miktarlarının Ölçülmesi.....	33
2.4.4. Reaktif Oksijen Türleri Miktarının Ölçülmesi	34
2.4.5. Mitokondriyel Transmembran Elektrik Potansiyelinin Ölçülmesi ...	34
2.4.6. MPTP Oluşumunun Ölçülmesi	35
2.4.7. Mitokondriyel Kalsiyum Düzeyinin Ölçülmesi.....	36
2.4.8. Mitokondriyel DNA Miktarının Ölçülmesi	36
2.5. Ksenobiyotik Biyotransformasyonu	36
2.5.1. Sitokrom P450 Enzimleri	39
2.5.1.1. Mikrozomal CYP'ler	39
2.5.1.2. Mitokondriyel CYP'ler	44
2.5.1.2.1. CYP'lerin Biyosentez Sonrası Hücre İçinde Hedeflendirilmesi	45
2.5.1.2.2. Endojen Metabolizma ve Ksenobiyotik Metabolizmasında	47
Mitokondriyel CYP'lerin Rollerini	47
2.6. Çalışılan İlaçlar.....	50
2.6.1. Klozapin.....	50

2.6.2. Parasetamol	54
2.6.3. Diklofenak.....	57
2.6.4. Valproik Asit	60
2.6.5. Olanzapin.....	62
2.6.6. Nifedipin	62
2.6.7. Tiyaprofenik asit	63
2.6.8. Dapson.....	64
2.6.9. Sülfafenazol	64
2.6.10. Metformin.....	65
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	67
3.1. Gereç	67
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	67
3.1.2. Kullanılan Gereçler	70
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler.....	72
3.1.3.1. Mikrozomal Fraksiyon Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler .	72
3.1.3.2. İnsan Dokularından Mitokondriyel Fraksiyon Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler	72
3.1.3.3. İnsan Dışı Türlerden Mitokondriyel Fraksiyon Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler	72
3.1.3.4. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	72
3.1.3.5. Western Blot Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler	72
3.1.3.6. Total GST Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	73
3.1.3.7. GSTM Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler.....	73
3.1.3.8. GSTT Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler.....	73
3.1.3.9. Total SOD Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	74
3.1.3.10. Mn-SOD Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler.....	74
3.1.3.11. CAT Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	74
3.1.3.12. GPx Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler.....	74

3.1.3.13. Mitokondriyel ve Mikrozomal İnkübasyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	74
3.1.3.14. CYP3A4 Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	75
3.1.3.15. CYP2E1 Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	75
3.1.3.16. Penetrasyon Testinde Kullanılan Çözeltiler	75
3.1.3.17. MPTP Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	76
3.1.3.18. Mitokondriyel DNA Metilasyonun Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	76
3.1.3.19. Mitokondriyel Oksijen Tüketiminin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	76
3.2. Yöntemler	77
3.2.1. Hüresel Fraksiyonların İzole Edilmesi.....	77
3.2.1.1. Mikrozomal Fraksiyonların Hazırlanması	77
3.2.1.1.1. İnsan Dokularından Mikrozomal Fraksiyon Hazırlanması..	77
3.2.1.1.2. Fare Dokularından Mikrozomal Fraksiyon Hazırlanması ...	78
3.2.1.2. Mitokondriyel Fraksiyon Hazırlanması.....	78
3.2.1.2.1. İnsan Dokularından Mitokondriyel Fraksiyon Hazırlanması	78
3.2.1.2.2. İnsan Dışı Türlerden Mitokondriyel Fraksiyon Hazırlanması	79
3.2.2. Protein Miktar Tayini	81
3.2.3. Western Blot Tekniğiyle Saflık Kontrolü	81
3.2.4. İlaç Biyoaktivasyon Çalışmaları.....	83
3.2.4.1. Bireyler ve Organlararası Parasetamol Biyoaktivasyonu Farklılığı Çalışması	83
3.2.4.1.1. Mikrozomal Çalışmalar	83
3.2.4.1.1.1. Oluşan NAPQI'nın Miktar Tayini	83
3.2.4.1.1.2. NAPQI-SG Oluşumda NADPH Bağımlılığının Belirlenmesi	85

3.2.4.1.1.3. Bireyler Arası Mikrozomal CYP3A4 Aktivite Farklılıkları	86
3.2.4.1.1.4. Bireyler Arası Mikrozomal CYP2E1 Aktivite Farklılıkları	88
3.2.4.1.2. Mitokondriyel Parasetamol Biyotransformasyonu	90
3.2.4.2. Klozapin Biyoaktivasyonu Çalışmaları.....	90
3.2.4.2.1. Mitokondriyel Klozapin Biyotransformasyonu.....	90
3.2.4.2.2. Mitokondriyel Penetrasyonun Belirlenmesi	92
3.2.4.2.3. Sıçanda <i>in vivo</i> Klozapin Dağılımının Belirlenmesi	93
3.2.5. Farklı Saklama Sıcaklıklarında Mitokondri İşlevselliğinin MPTP Oluşturma Yeteneği Aracılığıyla İzlenmesi.....	93
3.2.6. Çalışılan İlaçların Mitokondriyel İşlevlere Etkilerinin Değerlendirilmesi	94
3.2.6.1. İlaçların MPTP Oluşumu Üzerine Etkilerinin Test Edilmesi.....	95
3.2.6.2. İlaçların mtDNA Metilasyonu Düzeylerine Etkileri	95
3.2.6.3. İlaçların Mitokondriyel Oksijen Tüketimine Etkileri	97
3.2.7. İnsan Mitokondriyel Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü	98
3.2.7.1. Total GST Enzim Aktivitesi Ölçümü	98
3.2.7.2. GST İzoenzimlerinin Spesifik Aktivite Ölçümleri	98
3.2.7.3. Total SOD Aktivitesinin Ölçülmesi	99
3.2.7.4. Mn-SOD Aktivitesinin Ölçülmesi	99
3.2.7.5. Cu,Zn-SOD Aktivitesinin Ölçülmesi	99
3.2.7.6. CAT Aktivitesinin Ölçülmesi	99
3.2.7.7. Se-GPx Aktivitesinin Ölçülmesi.....	100
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	100
4. BULGULAR.....	101
4.1. Bireyler ve Organlararası Parasetamol Biyoaktivasyonu Farklılığı Çalışması Bulguları	101

4.1.1. Mikrozomal Çalışmalara Ait Bulgular	101
4.1.1.1. Oluşan NAPQI'ın Miktar Tayini.....	101
4.1.1.2. Bireyler Arası Mikrozomal CYP3A4 Aktivite Farklılıkları Bulguları	104
4.1.1.3. Bireyler Arası Mikrozomal CYP2E1 Aktivite Farklılıkları Bulguları	106
4.1.1.4. Cinsiyetler Arası Biyoaktivasyon ve Enzim Aktivitesi Farklılığı Bulguları	108
4.1.2. Mitokondriyel Biyoaktivasyon Bulguları	110
4.2. Klozapin Biyoaktivasyonu Çalışmalarına Ait Bulgular	111
4.2.1. Western Blot ile Saflık Kontrolü Bulguları.....	111
4.2.2. Mitokondriyel Biyotransformasyonun Belirlenmesine Ait Bulgular	113
4.2.3. Mitokondriyel Penetrasyonun Belirlenmesine Ait Bulgular	117
4.2.4. Sıçanda <i>in vivo</i> Klozapin Dağılımının Belirlenmesine ait Bulgular .	119
4.3. Farklı Saklama Sıcaklıklarında Mitokondri İşlevselliğinin MPTP Oluşturma Yeteneği Aracılığıyla İzlenmesine Ait Bulgular	120
4.4. Çalışılan İlaçların Mitokondriyel İşlevlere Etkilerine Ait Bulgular.....	122
4.4.1. İlaçların MPTP Oluşumu Üzerine Etkilerinin Test Edilmesine Ait Bulgular	122
4.4.2. İlaçların Mitokondriyel DNA Metilasyonu Düzeylerine Etkilerine Ait Bulgular	124
4.4.3. İlaçların Mitokondriyel Oksijen Tüketimine Etkilerine Ait Bulgular	127
4.5. İnsan Mitokondriyel Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümleri	130
5. TARTIŞMA	138
5.1. Bireyler ve Organlar Arası Parasetamol Biyoaktivasyonu Farklılığı	138
5.2. Klozapin Dağılımı ve Biyoaktivasyonu Çalışmaları.....	140

5.3. Farklı Saklama Sıcaklıklarında Mitokondri Stabilitesinin MPTP Oluşturma Yeteneği Aracılığıyla İzlenmesi	144
5.4. İlaçların MPTP Oluşumuna Etkileri.....	145
5.5. İlaçların mtDNA Metilasyon Düzeylerine Etkileri.....	145
5.6. İlaçların Mitokondriyel Oksijen Tüketim Hızına Etkileri	146
5.7 İnsan Mitokondriyel Antioksidan Enzim Aktiviteleri	148
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	152
7. KAYNAKLAR	155
ÖZGEÇMİŞ.....	209



Tablolar Dizini

Tablo 1. Memeli mitokondrilerinde bulunan GST enzimleri, fonksiyonları ve spesifik substratları (<i>MLMx</i> , fare karaciğer mitokondriyel matriks; <i>RLMx</i> ; sıçan karaciğer mitokondriyel matriks; <i>HLMx</i> , insan karaciğer mitokondriyel matriks; <i>MKMx</i> , fare böbrek mitokondriyel matriks; <i>HHMx</i> , insan kalp mitokondriyel matriks; <i>CDNB</i> , 2,4-dinitroklorobenzen; <i>DCNB</i> , 1,2-Dikloro-4-nitrobenzen; <i>PBO</i> , trans-4-fenil-3-buten-2-on; <i>NBC</i> , p-nitrobenzilklorür; <i>EPNP</i> , 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksil) propan.	19
Tablo 2. Mitokondriyel P450 enzimlerinin endojen metabolizmadaki rolleri ve buldukları dokular	48
Tablo 3. Hüresel fraksiyonların izole edilebildiğini ve birbirleriyle kontaminasyon derecesini belirlemeye yönelik seçilen ve western blot tekniğinde kullanılan markör proteinler (657).	82
Tablo 4. Karaciğer ve böbrek tarafından üretilen NAPQI-SG miktarları ile aynı organların CYP2E1 ve CYP3A4 aktiviteleri arasındaki korelasyon katsayıları ve istatistiksel önemleri.	110
Tablo 5. Karaciğer ve kalp mitokondriyel enzimlerin korelasyon değerleri	137

Şekiller Dizini

- Şekil 1.** Farklı dokulara ait mitokondrilerin elektron mikroskop görüntüleri ve mitokondri yapılarının şematik gösterimi. A, Farklı dokulara ait mitokondrilerin elektron mikroskop görüntüleri (13); B, Mitokondri yapılarının şematik gösterimi 4
- Şekil 2.** Percoll dansisite gradiyenti (% 18, 30 ve 60) yardımıyla farklı dokulardan mitokondriyel fraksiyon izole edilmesi. Mitokondriyel fraksiyon % 30 - % 60 Percoll gradiyentleri arasından toplanmıştır (13)..... 81
- Şekil 3.** NAPQI-SG ve I.S. ²D₃-NAPQI-SG'nin pozitif elektrosprey iyonizasyonu sonrasında izlenen reaksiyonları ve kütle fragmentleri..... 85
- Şekil 4.** CYP2E1 ve CYP3A4 enzim aktivitelerinin LC-MS ile aktivite ölçümünde kullanılan iki substratın elektrosprey iyonizasyonu sonucu izlenen reaksiyonları. A: *p*-Nitrofenol ve metaboliti 4-nitrokatekolün Q1 ve Q2 iyonizasyonları ve oluşan iyonları. B: Nifedipin ve piridin türevi metabolitinin Q1 iyonizasyonları ve protonlanmış iyonları. 87
- Şekil 5.** Klozapin biyotransformasyonu analizinde izlenen reaksiyonlar ve oluşan iyonlar.. 92
- Şekil 6.** Bir hastanın karaciğer mikrozomal fraksiyonu tarafından oluşturulan N-asetil-*p*-benzokinonimin'e (NAPQI) ait total iyon ve SRM kromatogramları. A, Kütle spektrumunun total iyon kromatogramı; B, NAPQI-SG'nin *m/z* 457 [M]⁺'dan *m/z* 328 [M-129]⁺ ve *m/z* 382 [M-75]⁺ kütle dönüşümlerine ait SRM kromatogramı; C, ²D₃-NAPQI-SG'nin *m/z* 460 [M]⁺'dan *m/z* 331 [M-129]⁺ ve *m/z* 385 [M-75]⁺ kütle dönüşümlerine ait SRM kromatogramı; D, HPLC-ultraviyole (UV) kromatogramı (254 nm). 102
- Şekil 7.** NADPH üretici sistem (NRS) varlığında ve yokluğunda inkübasyon ortamında oluşan NAPQI-SG miktarları. A, İnsan karaciğer mikrozomal (HLM; human liver microsomal) inkübasyonları; B, İnsan böbrek mikrozomal (HKM; human kidney microsomal) inkübasyonları. Değerler *ort*± *standart hata* şeklinde ifade edilmiştir. * +NRS'ye kıyasla önemli derecede (p < 0.05) farklı. 103
- Şekil 8.** Nifedipin'in mikrozomal oksidasyonuna ait total iyon, Q1MS ve UV (254 nm) kromatogramları. A, MS total iyon kromatogramı; B, Nifedipin'e ait Q1 MS iyonizasyon kromatogramı (Rt:11.2 dk., *m/z* 346 [M]⁺ →*m/z* 347 [M+H]⁺); C, Nifedipin piridin metabolitine ait Q1 MS iyonizasyon kromatogramı (Rt:5.2 dk., *m/z* 344 [M]⁺ →*m/z* 345 [M+H]⁺); D, HPLC-UV kromatogramı (254 nm). 104
- Şekil 9.** Hastaların bireysel mikrozomal CYP3A4 aktiviteleri. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak Nifedipin kullanılmıştır. A, Karaciğer; B, Böbrek. 105
- Şekil 10.** *p*-nitrofenol'ün *p*-nitrokatekol'e mikrozomal oksidasyonuna ait total iyon, SRM ve UV (254 nm) kromatogramları. (*p*-nitrofenol alıkonma zamanı 5.06 dk., [M-H]⁻:138 → 108, 46; *p*-nitrokatekol alıkonma zamanı 3.36 dk., [M-NO]⁻: *m/z* 154 → *m/z* 125). A, MS total iyon kromatogramı; B, *p*-nitrofenol'ün *m/z* 139 [M]⁻'dan *m/z* 138 [M-H]⁻ ve

m/z 108 [M-30]⁺ kütle dönüşümünlerine ait SRM kromatogramı); C, *p*-nitrokatekol'ün m/z 155 [M]⁻'den m/z 154 [M-H]⁺ ve m/z 125 [M-30]⁺ kütle dönüşümünlerine ait SRM kromatogramı); D, HPLC-UV kromatogramı (254 nm)..... 107

Şekil 11. Hastaların bireysel mikrozomal CYP2E1 aktiviteleri. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak *p*-nitrofenol kullanılmıştır. A, Karaciğer; B, Böbrek. 108

Şekil 12. Reaktif metabolit oluşturma kapasitesi ve P450 aktivitelerinde cinsiyete bağlı farklılıklar. A, Karaciğer mikrozomal NAPQI oluşumu; B, Karaciğer mikrozomal CYP3A4 aktivitesi; C, Karaciğer mikrozomal CYP2E1 aktivitesi; D, Böbrek mikrozomlarıyla NAPQI oluşumu; E, Böbrek mikrozomal CYP3A4 aktivitesi; F, Böbrek mikrozomal CYP2E1 aktivitesi. Değerler *ort*± *standart hata* şeklinde ifade edilmiştir. * Kadınlara kıyasla önemli derecede ($p < 0.05$) farklı..... 109

Şekil 13. Sıçan karaciğer ve kalp mitokondriyel fraksiyonları varlığında parasetamol biyoaktivasyonu. LMM, *karaciğer mitokondriyel membranları*; HMM, *kalp mitokondriyel membranları*; LMx, *karaciğer mitokondriyel matriks*; HMx, *kalp mitokondriyel matriks*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 111

Şekil 14. Fare karaciğer ve kalbinden izole edilen mitokondriyel fraksiyonların Gereç ve Yöntem Bölümü'nde tanımlanan uygun antikorlarla Western blot analizi. Standart/markör proteinlerin molekül ağırlıkları, sağ sütunda oklarla gösterilmiştir. İlk sütun, kullanılan 15-100 kDa arası protein standartına aittir. Mitokondriyel protein olarak dış membran proteini VDAC1, iç membran proteini COXIV ve matriks proteini HSP60 kullanılmıştır. Bip/GRP78 ve GAPDH ise sırasıyla mikrozomal ve sitozolik kontaminasyonu test etmek için analiz edilmiştir. LMM, karaciğer mitokondriyel membran; HMM, kalp mitokondriyel membran; LMx, karaciğer mitokondriyel matriks; HMx, kalp mitokondriyel matriks. 112

Şekil 15. Fare karaciğer ve kalp mitokondriyel fraksiyonlarının Percoll dansite gradiyenti saflaştırması öncesi ve sonrasında mikrozomal ve sitozolik kontaminasyon düzeylerinin Western blot analizi. Bip/GRP78 ve GAPDH sırasıyla mikrozomal ve sitozolik kontaminasyon düzeyleri açısından belirleyici ER-spesifik protein ve sitozolik çözünür protein olarak kullanıldı. Standart/markör proteinlerin molekül ağırlıkları, sağ sütunda oklarla gösterilmiştir. MM_s, saflaştırılmış mitokondriyel membran; MM_h, ham mitokondriyel membran; MM_{x,s}, saf mitokondriyel matriks; MM_{x,h}, ham mitokondriyel matriks. 113

Şekil 16. Fare karaciğer ile kalp mikrozomal ve mitokondriyel fraksiyonları varlığında klozapin biyotransformasyonu. LM, *karaciğer mikrozomları*; HM, *kalp mikrozomları*; LMM, *karaciğer mitokondriyel membranları*; HMM, *kalp mitokondriyel membranları*; LMx, *karaciğer mitokondriyel matriks*; HMx, *kalp mitokondriyel matriks*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 116

Şekil 17. Klozapinin sıçan karaciğer ve kalp mitokondrisine penetrasyonu. A:Karaciğer, B:Kalp. Gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar klozapin, koyu gri sütunlar Norklozapin,

açık gri sütunlar ise klozapin N-oksit'e aittir. LMit, <i>karaciğer mitokondrisi</i> ; HMit, <i>kalp mitokondrisi</i>	118
Şekil 18. Oral uygulama sonrası klozapinin sıçan dokularında dağılımı. Dört sıçana oral yoldan 20 mg/kg klozapin uygulanmış, anestezi altında açılan hayvanlardan #3 ve #4 nolu sıçanların kalp ve karaciğerleri perfüze edilmiştir.	120
Şekil 19. Farklı depolama sıcaklıklarının izole mitokondri ve doku stabilitesine etkisinin MPTP testi ile değerlendirilmesi. A, +25°C, +4°C ve -86°C'de saklanan izole mitokondri; B, +4°C ve -86°C'de saklanan doku örnekleri. X skalasında birimler eşit aralıklı kullanılmamıştır.	122
Şekil 20. Çeşitli ilaçların MPTP oluşumuna etkileri. Kolon sayıları fazla olduğu için sonuçlar "A" ve "B" olacak şekilde iki grup halinde verilmiştir. A, Klozapin, olanzapin, nifedipin ve diklofenak ın MPTP oluşumuna etkisi, B, valproik asit, dapson, tiyaprofenik asit, sülfafenazolün MPTP oluşumuna etkisi. (D: % 1 DMSO, çözücü kontrolü, Mit: sadece mitokondri içeren inkübasyon, Mit+CaCl ₂ : 250µM CaCl ₂ içeren mitokondriyel inkübasyondur. Çalışma kapsamındaki ilaçların 1, 10 ve 100 µM olmak üzere 3 ayrı doz düzeyindeki MPTP oluşumuna etkileri CaCl ₂ ile beraber ya da ayrı olarak incelenmiştir. Değerler <i>ort±standart hata</i> şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel önem analizleri yapılırken "Mit+CaCl ₂ " örneği "Mit" ile "Mit+İlaç+CaCl ₂ " inkübasyonları ise "Mit+CaCl ₂ " inkübasyonu ile kıyaslanmıştır. (***) p < 0.001).....	123
Şekil 21. Bazı ilaçların sitotoksositeye neden olmayan en yüksek konsantrasyonlarında CHO-K1 hücrelerinde mtDNA metilasyonuna etkileri. D: % 1 DMSO, çözücü kontrol. VPA, valproik asit; DİK, diklofenak; OLA, olanzapin; NİF, nifedipin; MET, metformin; DAP, dapson; TİA, tiyaprofenik asit; SULF, sülfafenazol. Değerler <i>ort± standart hata</i> şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel önem analizleri "%1 DMSO" kontrol grubuna göre yapılmıştır; *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.....	126
Şekil 22. Klozapinin GSH varlığında ve yokluğunda CHO-K1 hücrelerinde mtDNA metilasyon düzeylerine etkileri. D, % 1 DMSO çözücü kontrol; KLZ, klozapin. Değerler <i>ort± standart hata</i> şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel önem analizleri "% 1 DMSO" kontrol grubuna göre yapılmıştır; *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.....	126
Şekil 23. Kontrol örneklerinin OCR değerleri ve klozapinin 3 ayrı konsantrasyonda CHO-K1 hücrelerinin oksijen tüketim hızına (OCR; oxygen consumption rate) etkisi. Oksijen tüketim hızı <i>Time-Resolved Fluorescence</i> modunda izlenmiştir (eks. 380 nm, em. 650 nm, okuma süresi: 200 dk, okuma sıklığı: 3 dk). İnkübasyonlar üçlü seriler halinde (triplike) yapılmıştır, her bir renk, üçlü seriyi temsil etmektedir. İlk sütundaki grafikler (A-C) deneydeki kontrol örneklerini göstermektedir; A, % 1 DMSO çözücü kontrolü; B, Bazal (test maddesi içermeyen kontrol; C, Pozitif kontrol (Antimisin A); D, 1 µM klozapin varlığında OCR; E, 10 µM klozapin varlığında OCR; G, 100 µM klozapin varlığında OCR.....	128

- Şekil 24.** CHO-K1 hücrelerinin farklı ilaçlarla inkübasyonu sonucu oksijen tüketim hızındaki (OCR) değişiklikler. (Çalışmadaki üç önemli kontrol grubuna ait % OCR değerleri grafikte gösterilmiştir; D; %1 DMSO, çözücü kontrolü, B; bazal OCR kontrol, A; Antimisin A, pozitif kontrol. Çalışılan ilaçlar ise KLZ; klozapin, OLA; olanzapin, NİF; nifedipin; DİK; diklofenak, VPA; valproik asit, MET; metformin, DAP; dapson, TİA; tiyaprofenik asit ve SULF; sülfafenazol. Tüm ilaçların 1, 10 ve 100 µM olmak üzere üç ayrı konsantrasyonları çalışılmıştır). Değerler *ort±standart hata* şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel önem analizleri “%1 DMSO” kontrol grubuna göre yapılmıştır; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. 129
- Şekil 25.** İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel total GST enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. Karaciğer ve kalp mitokondriyel GST aktiviteleri, izoenzimlerin genel substratı olan CDNB’ye karşı ölçülmüştür, bu nedenle her bir aktivite, GSTT dışında tüm mitokondriyel GST izoenzimlerinin toplam aktivitesini yansıtmaktadır..... 131
- Şekil 26.** İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel GSTM enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. A, DCNB spesifik substratına karşı GSTM aktivitesi; B, *trans*-4-fenil-3-buten-2-on’a spesifik substratına karşı GSTM aktivitesi..... 132
- Şekil 27.** İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel GSTT enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. Karaciğer ve kalp mitokondriyel GSTT aktiviteleri, EPNP’ye karşı ölçülmüştür..... 133
- Şekil 28.** İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel SOD enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. A, Total SOD aktivitesi; B, Mn-SOD (SOD2) aktivitesi; C, Cu,Zn-SOD (SOD1) aktivitesi. SOD aktivitesi, pirogallol otooksidasyonunun enzim varlığında engellenmesi yoluyla ölçülmüştür..... 134
- Şekil 29.** İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel CAT enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. Karaciğer ve kalp mitokondriyel CAT aktiviteleri, substrat olarak H₂O₂ kullanılarak ölçülmüştür. 135
- Şekil 30.** İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel Se-GPx enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. Karaciğer ve kalp mitokondriyel Se-GPx aktiviteleri, substrat olarak H₂O₂ kullanılarak ölçülmüştür. 136

Kısaltmalar Listesi

·OH	Hidroksil radikali
4-en-VPA	2- <i>N</i> -propil-4-pentenoik asit
4-OHDik	4-hidroksidiklofenak
5-mC	5-metil sitozin
5-OHDik	5-hidroksidiklofenak
Acn	Asetonitril
ADP	Adenozin difosfat
ADR	Adrenodoksin
Ag	Gümüş
AGC	Aspartat-glutamat taşıyıcısı
AgCl	Gümüş klorür
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
AİR	Advers ilaç reaksiyonları
ANT	Adenin nükleotid translokaz
ASA	Asetilsalisilik asit
ATP	Adenozin trifosfat
B[a]P	Benzo- α -piren
Bak	Bcl 2-antagonist/killer
Bax	Bcl 2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BHI	Biyoenerjetik sağlık indeksi
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
Bip	Binding immunoglobulin protein
BROD	Benzoksirezorufin <i>O</i> -dealkilasyon
BSA	Sığır serum albümini
Ca ⁺²	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CAT	Katalaz
CDNB	2-dikloro-4-nitrobenzen
CN ⁻	Siyanür
CO	Karbonmonoksit
Co	Kobalt
CO ₂	Karbondioksit

CoQ ₁₀	Koenzim Q
COX	Siklooksijenaz
COXIV	Sitokrom c oksidaz IV
cpYFP	Sirküler sarı floresan protein
Cu	Bakır
CYP	Sitokrom P450
CyD	Siklofilin D
DAP	Dapson
DCF	Diklorofloressein
DCNB	2,4-dinitroklorobenzen
DCPIP	2,6-diklorofenolindofenol
DHE	Dihidroetidium
DİK	Diklofenak
DikGluA	1-diklofenak-1-O-açıl glukronid
DCM	Diklorometan
DikSG	Diklofenak glutatyon tiyoesteri
DMO	4'-N-desmetilolanzapin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNP	2,4-dinitrofenol
Drp	Dynamine-related protein
DubH2	Desilubikinon
ECAR	Ekstrasellüler asidifikasyon oranı
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGTA	Etilenglikol-bi(2-aminoetiler)-N,N,N',N'-tetraasetik asit
EPO	Eozinofil peroksidaz
ER	Endoplazmik retikulum
ERND	Eritromisin N-demetilaz
EROD	Etoksirezorufin O-dealkilasyon
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
ETC	Elektron taşıma zinciri
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FBS	Fetal sığır serumu
FCCP	Karbonilsiyaniür p-triflorometoksifenilhidrazon
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Demir

Fis	Mitochondrial fission 1 protein
FMN	Flavin mononükleotid
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GI	Gastrointestinal
GPx	Glutasyon peroksidaz
GRP78	Glucose-regulated protein
GSH	Redükte glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
H ⁺	Proton
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HAMC	7-hidroksi-4-aminometilkumarin
Hsp	Heat shock protein
HHMMx	İnsan böbrek mitokondriyel matriks
HIV	Human immunodeficiency virus
HKM	İnsan böbrek mikrozomu
HLM	İnsan karaciğer mikrozomu
HLMMx	İnsan karaciğer mitokondriyel matriks
HMit	Kalp mitokondrisi
HMM	Kalp mitokondriyel membranları
HMx	Kalp mitokondriyel matriks
HOCl	Hipokloröz asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRP	Horseradish peroxidase
i.p.	İntraperitoneal
I.S.	İnternal standart
IP3	İnozitol-1,4,5-trifosfat
JC-1	5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol karbosiyanin iyodür
JNK	c-Jun <i>N</i> -terminal kinase
KCN	Potasyum siyanür
KLZ	Klozapin
KLZ-SG	Klozapin reaktif metabolitinin glutasyon konjugatı
KMM	Böbrek mitokondriyel membranları
KMx	Böbrek mitokondriyel matriks

LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
LMit	Karaciğer mitokondrisi
LMM	Karaciğer mitokondriyel membranları
LMx	Karaciğer mitokondriyel matriks
LPO	Lipit peroksidasyonu
MAMC	7-metoksi-4-(aminometil)kumarin
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MATE	Multi-antimicrobial extrusion protein
MDA	Malondialdehit
MEF	Fare embriyonik fibroblastları
MET	Metformin
Mfn	Mitofusin
MKM	Fare böbrek mikrozomu
MKMMx	Fare böbrek mitokondriyel matriks
MLM	Fare karaciğer mikrozomu
MLMMx;	Fare karaciğer mitokondriyel matriks
MM	Mitokondriyel membranlar
Mn	Mangan
Mn-SOD, SOD2	Mitokondriyel süperoksit dismutaz
MPO	Miyeloperoksidaz
MPP ⁺	1-metil-4-penil piridin
MPT	Mitokondriyel geçirgenlik-dönüşümü
MPTP	Mitokondriyel geçirgenlik-dönüşüm porları
Mrp	Multidrug resistance associated protein
MtDNA	Mitokondriyel deoksiribonükleik asit
Mx	Mitokondriyel matriks
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	Nikotinadenin dinükleotid fosfat
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH oksidaz	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-oksidaz
NAPQI	N-asetil-p-benzokinonimin
NBC	<i>p</i> -nitrobenzil klorür
NİF	Nifedipin
NMDA	N-demetilaz aktivitesi
NO [·]	Nitrik oksit radikali
NorKLZ	N-desmetilklozapin ya da norklozapin

NOS	Nitrit oksit sentaz
NRS	NADPH-üretici sistem
NSAI	Non-steroidal anti-inflamatuar
O ₂	Moleküler oksijen
O ₂ ⁻	Süperoksit anyon radikali
OCR	Oksijen tüketim hızı (oxygen consumption rate)
OCT	Organic cation transporter
OLA	Olanzapin
ONOO ⁻	Peroksinitrit anyonu
Opa	Opacity protein
GFP	Yeşil floresan protein
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PAR	Parasetamol
PBO	Trans-4-fenil-3-buten-2-on
Pi	İnorganik fosfat
Prxs	Peroksiredoksin
PTGS	Prostaglandin endoperoksit sentetaz
PVDF	Polivinil florür
Rhod123	Rodamin 123
RLMMx	Sıçan karaciğer mitokondriyel matriks
RNT	Reaktif nitrojen türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RT-PCR	Realtime -polymerase chain reaction
SAM	S-adenozilmetiyonin
SDS/PAGE	Sodyumdodesil sülfat-poliakrilamid jel
SOD	Süperoksit dismutaz
SOD1	Sitozolik süperoksit dismutaz
SRM	Selected reaction monitoring
SULF	Sülfafenazol
TCA	Trikarboksilik asit
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo- <i>p</i> -dioksinin
TİA	Tiyaprofenik asit
TMRE	Tetrametilrodamin etil esteri
TMRM	Tetrametilrodamin metil esteri
TRF	Time resolved fluorescence

tRNA	Transfer ribonükleik asit
UCP	Kenetsizleştirici protein
UGT	UDP-glukronil transferaz
VDAC	Voltage dependent anion channel
VPA	Valproik asit
WB	Western Blot
WT	Wild-type
Zn	Çinko



1. GİRİŞ

İlaçların profilaksi, tanı ya da tedavi amacıyla kullanılan dozlarında ortaya çıkan advers ilaç reaksiyonları, ölüm dâhil olmak üzere sağlık kayıplarına neden olmakta, ayrıca ülke ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir. Ruhsatlandırılarak kullanıma girdikten sonra kabul edilemeyecek düzeyde toksik etkilerin belirmesi, ilacın geri çekilmesi ve geliştirilmesi için harcanan sürenin ve paranın kaybedilmesi anlamına gelmektedir. Bu nedenle ilaçların advers etkilerinin ve bu etkilerin mekanizmalarının en erken dönemde tespit edilmesi gereklidir. Advers ve idyosinkratik ilaç reaksiyonlarının yaşamsal, sağlık, etik ve ekonomik sonuçları düşünüldüğünde tamamen önlenmeleri ya da mümkün olan en az düzeye indirilmeleri gereklidir.

Son yıllarda yapısal ya da işlevsel mitokondriyel bozuklukların birçok ilacın toksik etkisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Mitokondri hücresel enerji üretiminin ve birçok hücresel olayın gerçekleştiği yaşamsal öneme sahip bir organeldir. Dolayısıyla mitokondri içerisinde ilaçlar ve metabolitleri açısından fazla sayıda yapısal ve/veya işlevsel hedef bulunmaktadır. Bu nedenle mitokondriyel toksisite son yıllarda dikkat çeken çalışma konuları arasındadır. İlaç moleküllerinden biyotransformasyon sonucu reaktif metabolit oluşumu, ilaca bağlı gözlenmesi muhtemel advers ilaç reaksiyonlarının önemli bir bölümünden sorumludur. Bu nedenle gerek farmasötik endüstride, gerekse akademik araştırmalarda ilaç ve ilaç adaylarının reaktif metabolit oluşturma kapasiteleri araştırılmaktadır. Mitokondrilerin zengin enzim içeriğine karşın bu organelde lokal olarak biyoaktivasyon gerçekleşip gerçekleşmediği konusu tartışmalıdır. Dolayısıyla oluşması muhtemel reaktif metabolitlerin mitokondriyel hedeflerle etkileşip etkileşmediği de netleşmemiştir. Bu nedenlerden dolayı tez çalışması kapsamında toksik etki mekanizması bilinmeyen bazı ilaçlar seçilmiş, ilaçların ve/veya metabolitlerinin mitokondriyel yapı ve/veya işlevler üzerindeki olası etkilerinin bu mekanizmalarda rol oynayıp oynamadığı araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle farklı organ mitokondrilerinin biyoaktivasyon kapasitesi olup olmadığı araştırılmış ve mikrozomal aktivite ile kıyaslanmıştır. Bireyler arasında mitokondriyel antioksidan ve detoksifikasyon enzim aktivite farklılıkları belirlenmiştir. Yanı sıra çalışılan ilaçların mitokondriyel oksijen metabolizması, iç ve dış mitokondriyel membran ve mtDNA metilasyon düzeylerine etkileri incelenmiştir.

Tez çalışması sonucunda parasetamol kaynaklı nefrotoksisitenin tam anlaşılammış mekanizmasına ilişkin veriler elde edilmiş, mitokondrilerin biyoaktivasyon kapasitesi gösterilmiş, farklı insan organ mitokondrilerinde bazı antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin varlığı belirlenmiş, test edilen ilaçlardan bazılarının mitokondriyel oksijen tüketimini önemli derecede değiştirdiği, membranlar üzerinde hasar oluşturduğu ve MPTP

oluşumunu etkilediği, son olarak çalışılan tüm ilaçların mtDNA metilasyon düzeylerini önemli derecede azalttığı gösterilmiştir. Bu bulguların net sonucu, ilaç ve ilaç adaylarının toksisite mekanizmalarında mitokondriyel etkilerinin rol alıp almadığını test etmeye yönelik bir model sunması, böylece toksisitesi daha az ilaçların geliştirilmesine katkı sağlamasıdır.



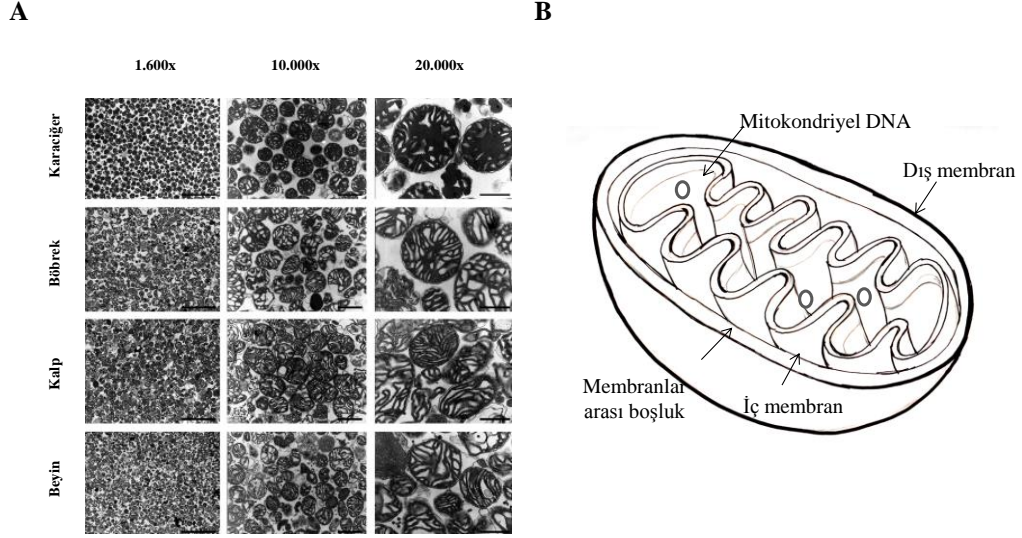
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mitokondri

Mitokondriler hücrenin, dolayısıyla organizmanın ana enerji kaynağı olan, hücresel solunumun ve hücre canlılığıyla ilgili birçok önemli işlevin gerçekleştiği organelerdir (1). Memeli eritrositleri ve monocercomonoides dışında tüm ökaryotik hücrelerde bulunan mitokondriler genellikle 0.5-1 µm çapında, 0.2-5 µm boyundadır. Hücrenin metabolik ihtiyacına ve hücre tipine göre mitokondri sayısı ve şekilleri hücreden hücreye değişmektedir. Bir hücredeki mitokondri sayısı ortalama 1000 – 2000 arasındadır. İskelet kas hücreleri ile kalp kası hücrelerinin (kardiyomiyosetler) enerji ihtiyaçları diğer hücrelere göre fazladır. Bu nedenle bu hücreler daha fazla mitokondri ve mitokondrileri de daha çok krista içerir. Kalp kası hücresinde 5000, karaciğer ve beyin hücrelerinde 2000'den fazla mitokondri varken (2, 3) akyuvarlar 100 (4), sperm hücresi 25–50 arasında mitokondriye sahiptir. Buna karşın değişen çevresel ve fizyolojik koşullara yanıt olarak hücrelerin mitokondri sayıları da değişmektedir (5, 6). Dokudan dokuya şekil ve sayı olarak farklılıklar gösteren mitokondriler ve genel yapıları Şekil 1'de gösterilmiştir.

Mitokondriler dinamik bir şekilde füzyon ve fizyon denilen olaylarla sırasıyla gereklilik durumunda birleşebilmekte ve bir mitokondriden bölünme yoluyla iki mitokondri oluşabilmektedir (7). Bunların yanı sıra mitofaji denilen olay, hücre içerisinde belirli sayıda mitokondrinin sindirilerek yok edilmesi sürecidir.

Endosimbiyotik hipoteze göre, mitokondrinin 2 milyar yıl önce hayvan hücresine difüze olarak ortaklaşa yaşamaya başlayan bir tek hücreli canlı (arkaik bir bakteri) olduğu düşünülmektedir (8-10). Kendine ait deoksiribonükleik asitin (DNA) olması ve membran yapısının prokaryotik canlılarla büyük benzerlikler taşıması bu hipotezi güçlendirmektedir. 1886'da Richard Altmann tarafından ilk defa tanımlanan bu organel, başta "bioblast" olarak adlandırılmış, 1897 yılında ise Benda, Yunanca'da *iplikli tanecik* anlamına gelen "mitokondri" terimini ortaya atmıştır. 1920'lerde Warburg, oksidatif reaksiyonların hücrede bu organellerde gerçekleştiğini gözlemiştir (11). 1950'lerin başlarında mitokondrilerde dış ve iç olmak üzere iki tabakalı lipid membran yapısının bulunduğu elektron mikroskobu ile gösterilmiştir (12). Dokudan dokuya şekil ve sayı olarak farklılıklar gösteren mitokondriler ve genel yapıları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Farklı dokulara ait mitokondrilerin elektron mikroskop görüntüleri ve mitokondri yapılarının şematik gösterimi. A, Farklı dokulara ait mitokondrilerin elektron mikroskop görüntüleri (13); B, Mitokondri yapılarının şematik gösterimi

Mitokondrilerde diğer organellerden farklı olarak dışta düz bir membran, içte ise katlı yapıdaki ikinci bir membran bulunmaktadır. Bu iki membran arasında kalan alan membranlar arası boşluk, iç membranın kapsadığı çözünür fraksiyon ise mitokondriyel matriks olarak adlandırılmaktadır. Dış membran fosfolipid yapıdadır. Porin proteinler olarak adlandırılan transport proteinleri 5000 Dalton'dan küçük olan moleküllerin geçişini sağlamaktadır. İyonlar, nutrientler, adenozin trifosfat (ATP), adenozin difosfat (ADP) gibi moleküller dış membrandan kolaylıkla geçebilir. İç membran "krista" denilen ve birçok biyokimyasal reaksiyonun gerçekleştiği girintili-çıkıntılı bir yapıya sahiptir, kristalar iç membranın yüzey alanını arttırmakta, dolayısıyla membran aracılığı ile gerçekleşen işlevlerin kapasitesini de artırmaktadır (11). Lipid bileşeni açısından zengin olan dış membrana kıyasla iç membran proteince zengindir. İç membrandaki lipid bileşenlerini oluşturan kardiyolipin, ksenobiyotiklerin mitokondriyel hedefleri arasındadır. Birçok ilaç (adriyamin tipinde antrakinonlar) kardiyolipine yüksek afinite gösterir ve iç membrana bağlanarak burada birikebilir.

Oksidatif fosforilasyonda görev yapan elektron taşıma zinciri (ETC) proteinleri, protein pompaları ve ATP sentaz, iç membran zarına bağlı halde bulunmaktadır. İç membran sadece oksijen, karbondioksit ve suya tamamen geçirgendir. Taşıyıcı spesifik proteinler yardımıyla piruvat, yağ asitleri, glutatyon (GSH), ADP gibi bazı küçük endojen moleküllerin

ve ksenobiyotiklerin iç membrandan geçişi sağlanmaktadır (14, 15). Hücresel solunum, mitokondri iç membranında bulunan ETC aracılığı ile gerçekleşir. Bu zincir dört ardışık protein kompleksinden oluşur ve burada moleküler oksijen suya yıkılarak detoksifiye edilir. Matriks, mitokondrinin kendi genomu olan mitokondriyel deoksiribonükleik asit (mtDNA), sitrik asit döngüsünde veya yağ asidi oksidasyonunda görevli olan enzimler, çözünür halde bulunan oksijen (O₂), karbondioksit (CO₂), metabolik yollarda oluşan ara ürünler gibi molekülleri barındırır (11).

Hücrelerin enerji ihtiyacına göre mitokondrilerdeki mtDNA sayısı değişmektedir. Beyin, karaciğer, kalp, böbrek gibi metabolik işlevleri ve dolayısıyla enerji ihtiyaçları fazla olan hücrelerde yüz binlerce mtDNA kopyası varken, kan hücrelerinde 2-10 kopya bulunmaktadır (16, 17, 18). mtDNA çift zincirli, sirküler, 16.6 kilobaz uzunluğundadır ve 37 gen bölgesine sahiptir. Mitokondriyel proteinler mtDNA ve nükleer DNA olmak üzere 2 farklı genetik materyal tarafından kodlanmaktadır. mtDNA, oksidatif fosforilasyonun gerçekleştiği *Kompleks I, III, IV* ve *V*'in yapısal alt üniteleri olan toplam 13 polipeptidi kodlar (19). Bu polipeptitlerin transkripsiyon ve translasyonu için gerekli ribozomal (rRNA) ve transfer RNA'lar da (tRNA) yine mtDNA tarafından sırasıyla 2 ve 22 gen aracılığıyla kopyalanır (20, 21).

Diğer tüm mitokondriyel proteinler, nükleus tarafından kodlandıktan sonra hücre sitozolünde sentezlenerek mitokondriye gönderilir (translokasyon/import). Mitokondriyel ya da nükleer genetik temelli mitokondriyel işlev bozuklukları, klinik belirtilerle kendini gösteren hastalıkların da nedenidir (22, 23). Genetik temelli mitokondri işlev bozukluklarının nörodejeneratif hastalıklar (24), diyabet (25) ve kanserle (26) ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Mitokondri, oldukça dinamik bir organeldir (27). Yaşam döngüsü boyunca hücrenin ATP ihtiyacına göre çok sık füzyon (iki mitokondrinin iç ve dış zarlarının tamamen kaynaşarak daha büyük bir mitokondri oluşturması) ve fizyona (mitokondrinin bölünmesi) uğrar. Mitokondriyel füzyon, hücresel olayların devamlılığını sağlamak için yeterli sayıda mitokondrinin olmasını, yeni organellerin yapılmasını ve mitofaji için mitokondrilerin hedeflendirilmesini kontrol eder (28). Yüksek ATP ihtiyacı olduğu durumlarda mitokondriler füzyona uğrayarak oksidatif fosforilasyonun sağlıklı bir şekilde sürdürülmesi ve mitokondriyel membran potansiyelinin korunması sağlanır (29).

Mitokondriyel dinamik hücre döngüsünün regülasyonu, apoptoz, mitofaji gibi yaşamsal öneme sahip hücresel olaylar açısından önemlidir (30-32). Mitofusinler (Mfn1/2) ve opacity protein 1 (Opa1) füzyon sırasında, dynamin-related protein 1 (Drp1) ve mitochondrial fission 1 protein (Fis1) de fizyonda önemlidir. Mitokondri homeostazında, mitokondriyel dinamiğe ek olarak rol oynayan bir diğer mekanizma ise hasarı telafi

edilemeyen mitokondrilerin seçici olarak ortadan kaldırıldığı mitofajidir. Mitokondriyel dinamik füzyon, füzyon ve mitofaji arasındaki dengenin korunmasıyla kontrol edilir (32-34). Mitokondriyel dinamiğin bozulması özellikle nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalıkla ilişkili bulunmuştur (30-32, 35).

2.2. Mitokondrinin Görevleri

Mitokondri hücrenin enerji üretiminde ve diğer birçok metabolik olayda görev alan, yaşamsal öneme sahip bir organeldir. Hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROT) ana kaynağı olan mitokondri ayrıca hücrel kalsiyum (Ca^{+2}) homeostazının sağlanması, sinyal yollarının ve apoptotik süreçlerin yönetilmesi gibi hücre canlılığı için kritik olan birçok işlevde rol alır (36). Mitokondrinin görevleri başlıklar altında ayrıntılı bir şekilde açıklanmaktadır.

2.2.1. Pirüvat ve Yağ Asitlerinin Oksidasyonu ve Oksidatif Fosforilasyon

Organizmanın canlılığını sürdürmesi için gerekli enerjinin büyük bir kısmı mitokondride pirüvat, yağ asitleri ve aminoasitler (glutamat, alanin, valin vb.) gibi birçok substratın oksidasyonu aracılığıyla sağlanır (37). Hücre içine alınan glukoz, sitozolde glikoliz reaksiyonları ile pirüvata dönüştürülür. Mitokondriye geçen pirüvat buradaki *pirüvat dehidrogenaz* enzimi aracılığıyla asetil CoA'ya dönüştürülür ve trikarboksilik asit (TCA, Krebs) döngüsüne girer.

Glukozun parçalanması sonucu oluşan pirüvatın yanı sıra yağ asitleri de mitokondri içine alınırlar. Kısa (C_4-C_6) ve orta (C_6-C_{14}) zincirli yağ asitleri mitokondri membranını serbest bir şekilde geçerken, uzun zincirli ($C_{14}-C_{18}$) yağ asitlerinin geçişi *karnitin palmitoiltransferaz I* ve diğer bazı enzimler aracılığı ile olur. Mitokondri içine geçen yağ asitleri, β -oksidasyon ile asetil CoA'ya dönüştürülür. Oluşan asetil CoA ise daha ileri reaksiyonlar ile ya keton cisimciklerine dönüştürülür ya da trikarboksilik asit döngüsüne girer (38,39).

Glukoz ve yağ asidi metabolizması sırasında oluşan asetil CoA ve diğer karbon substratları TCA döngüsünde okside olurken NADH (nikotinamid adenin dinükleotid) ve $FADH_2$ (flavin adenin dinükleotid) gibi proton kaynağı ve elektron kaydırıcı redükte kofaktörler sentezlenir. Bu redükte kofaktörler elektronlarını mitokondriyel ETC'ye aktarırlar. *Kompleks I (NADH-ubikinon oksidoredüktaz)* ve *Kompleks II (süksinat-ubikinon oksidoredüktaz)* sırasıyla NADH ve $FADH_2$ 'den aldığı elektronları iç membranın hareketli elektron taşıyıcısı olan ubikinona (Koenzim Q) verir. Elektronlar ubikinondan *Kompleks*

III'e (ubikinol-sitokrom C oksidoredüktaz), oradan da Kompleks IV'e (Sitokrom C oksidaz) taşınır (40). Sitokrom oksidaza ulaşan elektronlar moleküler oksijene aktarılır ve moleküler oksijeni anyon (negatif yüklü iyon) haline getirir. Oluşan anyonun nötrleşmesi için ortamdaki su molekülünden bir proton (H⁺) moleküle aktarılır ve su oluşur.

Oksidatif fosforilasyon sırasında NADH ve FADH₂'den alınan elektronlar kompleks proteinlerine aktarılırken protonlar ise mebranlar arası boşluğa pompalanır. Bu durum membranlar arası boşluğun protonca zengin olmasına ve iç membran boyunca yüksek bir elektrokimyasal potansiyelinin oluşumuna neden olmaktadır (36, 41, 42). Protonların matrikse geri dönüşü sadece *Kompleks V (F₀/F₁-ATP sentaz)* üzerinden olmaktadır. Protonlar *ATP sentaz*dan matrikse geri dönerken oluşan enerji, ADP ve inorganik fosfattan (Pi) ATP sentezlenmesinde kullanılır. Hücre sitozolünde ADP/ATP oranı yükseldiğinde (yani enerji tüketildiğinde) artan ADP, mitokondri matriksindeki ATP ile yer değiştirir ve burada *ATP sentaz* aracılığıyla yüksek enerjili fosfat bağı içeren ATP'ye dönüştürülür (43, 44).

2.2.2. Mitokondrinin Apoptotik Hücre Ölümündeki Rolü

Organizmanın homeostazı, hücre ölümü ve hücre çoğalması arasındaki dengeye bağlıdır. Apoptoz, embriyonik dönemden itibaren tüm yaşam boyunca pek çok fizyolojik veya patolojik olayda gözlenen programlı hücre ölümüdür. Çeşitli hastalıklar (diyabet, parkinson, alzheimer), viral enfeksiyonlar, biyolojik ve kimyasal maddeler, X ışınları ve radyasyona maruz kalma sonucu hücrelerde oluşan hasarlar, apoptotik hücre ölümünü indükleyebilir (45). Hücrede enerji üretiminin bozulması (46), oksidatif stresin oluşumu (47), DNA hasarı (48) mitokondri işlev bozukluklarına, dolayısıyla hücresele toksisiteye neden olmaktadır. İntrinsik apoptoz, birçok sinyal proteini yardımıyla mitokondri tarafından düzenlenir. ATP üretiminin merkezi olan ve kaspaz aktivasyonunda rol alan mitokondri, apoptotik ölüm sürecinde de önemlidir.

Mitokondriyel dış membran ATP üretiminde görev alması da geçirgenliğindeki değişiklikler oksidatif fosforilasyonu, diğer tüm mitokondri fonksiyonlarını ve dolayısıyla hücrenin canlılığını etkilemektedir. Fizyolojik koşullarda dış membran sitokrom c ve diğer apoptotik sinyal proteinlerine geçirgen değildir. Dış membran permeabilitesi çeşitli uyarılar nedeniyle bozulursa ADP, malat, fosfat, süksinat, pirüvat gibi metabolik anyonların mitokondriye VDAC (voltage dependent anion channel) transport proteini aracılığıyla girişi engellenir (49, 50). Bu durumda sitrik asit döngüsü ve ATP sentezi bozulur. Hücrenin enerji kapasitesi azalır. Mitokondriyel reaktif oksijen türlerinin üretimi artar, oksidatif stres

nedeniyle membranlar ve diğer endojen yapılar zarar görür. Mitokondrilerin içine su girer ve dış membran bütünlüğü bozulur. Sitokrom c membranlar arası boşluktan sitozole salınır ve apoptotik peptidaz aktifleştirici protein (Apaf-1) ile kompleks oluşturur, prokaspaz 9 aktive olur. Proteolitik kaspaz yolağı başlar ve hücre apoptoza gider (51, 52).

Bcl-2 grubu proteinleri, mitokondrinin dış membran bütünlüğünü ve fonksiyonlarını düzenleyen, dolayısıyla apoptozu kontrol eden geniş bir protein ailesidir (51, 53). Bu protein ailesi, homoloji ve işlevlerindeki farklılıklar nedeniyle üç grup altında incelenir; anti-apoptotik proteinler (B-cell lymphoma; Bcl-2 ve B-cell lymphoma-extra large; Bcl-xL), proapoptotik üyeler (Bcl2-associated X protein; Bax ve Bcl2-antagonist/killer protein; Bak) ve proapoptotik enzim (Bcl-2-associated death promoter; Bad). Bcl-2 ve Bcl-xL, VDAC proteininin normal fizyolojik koşullarda açılıp kapanmasını kontrol ederler. Mitokondrinin ve dolayısıyla hücrenin homeostazını sağlarlar. Bax ise dış membran geçirgenliğini bozar, moleküller arası bağlantılar kurarak dış membranda büyük porların oluşumuna neden olur. Bu durum apoptotik sürecin başlamasında etkilidir (54, 55). Bu ayrıntılı deneysel verilere karşın apoptoz regülasyonunda Bcl proteinlerinin rolleri ve mekanizmalarına ilişkin tam olarak aydınlatılamamış noktalar vardır.

2.2.3. Hücresel Kalsiyum Düzeyinin Regülasyonu

Kalsiyum, ökaryotik hücrelerde birçok sinyal yolağında görevli olan ikincil habercilerden biridir (56,57). Hücre dışı sıvıda Ca^{+2} konsantrasyonu, sitozole göre çok daha yüksektir. Buna karşın hücre içinde mitokondri, endoplazmik retikulum (ER), golgi aparatı, lizozom gibi organeller, Ca^{+2} depolarıdır. Sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu 0.1 μ M iken, hücre dışında 1 mM ve ER'de ise 0.5 mM'dır (58). Fizyolojik ya da patolojik birçok mediyatörün hücreye ulaşması sonucu Ca^{+2} 'nin sitozolik konsantrasyonunda artış olur. ER'de depolanan Ca^{+2} 'un serbestleşmesinden inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3), hücre dışındaki Ca^{+2} 'un sitozole girişinden ise plazma membranındaki taşıyıcı proteinler sorumludur (59).

Hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin artışı, birçok sinyal yolağını ve proteini (kinazlar, transport proteinleri, kontaktil proteinler) aktive eder. Ca^{+2} ; gen transkripsiyonunda, hücre proliferasyonunda ve farklılaşmasında, kasların kasılmasında, nöronların uyarılmasında, nörotransmitter iletiminde, membran transportunda, enzimatik reaksiyonlarda, hormonların salınmasında ve kanın pıhtılaşmasında rol alır (56). Dolayısıyla Ca^{+2} düzeylerinin regülasyonu, hücrenin canlılığının ve işlevselliğinin korunması için önemlidir. ER ve Ca^{+2} bağlayan proteinler gibi mitokondriler de Ca^{+2} homeostazında önemlidir. Mitokondri hücre içi Ca^{+2} düzeyini Ca^{+2} depolayarak, akışını kontrol ederek ve sinyal yolları aracılığıyla

düzenlemektedir (60). Dinlenme anında mitokondrilerde Ca^{+2} konsantrasyonu nmol düzeyindedir. Ancak bir uyarın varlığında sitozolden matrikse geçişi nedeniyle 1-20 μM 'a ulaşır (61-63). Oksidatif stres; mitokondriyel membran hasarı oluşumuna, mitokondriyel Ca^{+2} düzeyinin artmasına, mitokondriyel geçirgenlik-dönüşüm porlarının (MPTP) oluşumuna ve patolojik olayların daha da şiddetlenmesine neden olabilmektedir (36).

2.2.4. Endojen Metabolizmada Rolü

Mitokondriler buldukları hücre tipine göre özelleşmiş metabolik görevlere sahiptirler. Hücre fonksiyonları için gerekli esansiyel maddelerin sentezi, yıkılması, metabolizmasının kontrolü, steroid hormonların sentezi (64), kolesterol metabolizması (39), üre döngüsünde amonyağın detoksifikasyonu (65) ve *hem* sentezi, mitokondrinin metabolik görevleri arasında sayılabilir (66).

Mitokondriyel *sitokrom P450* enzimleri (P450) kolesterol, steroid hormon ve D vitamini gibi endojen madde metabolizmasında görev alır. Mitokondrilerin bu endojen metabolik kapasitesi ve enzimatik içeriği nedeniyle vücuda dışarıdan giren kimyasal maddelerin biyotransformasyonunda da rolü olabileceği düşünülmektedir (67-69).

2.2.5. Mitokondriyel Oksidatif Solunumun Yan Ürünü Olarak Süperoksit Radikali ve Antioksidan Savunma Sistemleri

Moleküler oksijen, hayvan hücresinde oksidatif metabolizmada elektron transport zincirinde son elektron yakalayıcısıdır. Solunan atmosferik oksijen, mitokondride toplam dört elektron redüksiyonu sonucu detoksifiye edilir. Buna karşın oksidatif fosforilasyon sırasında ETC'den moleküler oksijene elektron sızması nedeniyle (tek elektron redüksiyonu) % 1-5 arasında süperoksit anyon radikali (O_2^-) oluşur. Bu radikal kısmen hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşür (70). Fizyolojik düzeylerde oluşan O_2^- ve H_2O_2 'ye karşı enzimatik antioksidan savunma sistemi devreye girer ve her iki reaktif oksijen türünü detoksifiye eder. Söz konusu ROT'ların fizyolojik düzeylerin üzerindeki miktarlarda oluştuğu ve/veya savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda ortamdaki uzaklaştırılamayan H_2O_2 , bilinen en reaktif radikal olan hidroksil radikali ($\cdot OH$) dönüşür ve devamında hücre proteinleri başta olmak üzere hücre proteinleri ve lipidleri hidroksele ederek yapısal ve işlevsel hasara yol açar. Süperoksit anyon radikali için bir başka toksik yolak, nitrik oksit radikali ($\cdot NO$) ile reaksiyona girerek peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) oluşturmasıdır. Bu anyon başta hücre proteinleri olmak üzere nitrosasyon yaparak benzer şekilde hasara yol açar (71).

Bu yollarda yer alan kimyasal yapılar sırasıyla reaktif oksijen (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) olarak adlandırılırlar. En önemli ROT ve RNT oluşum yolları oksidatif fosforilasyon, *sitokrom P450 monooksijenazlar*, *ksantin oksidazlar*, *nitrit oksit sentaz* (NOS) ve *nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-oksidad* (NADPH oksidad) aktivitesidir (72). Oksidatif fosforilasyon sırasında moleküler oksijenin redüksiyonu sonucu hücre içi ROT'ların %80'i oluşmaktadır (73). Oksijenin tek elektron redüksiyonu sonucu oluşan süperoksit anyon radikali, *Kompleks I* ve *III* düzeyinden, daha az oranda da *Kompleks II* den matrikse salınır (74, 75). Ayrıca, mitokondride ETC proteinleri dışında *p66Shc*, *monoamin oksidad A* ve *B*, *NADH oksidad IV* gibi proteinlerin de ROT üretiminde payı vardır (76). Hücrel metabolizmanın ürünleri olan ROT ve RNT fizyolojik düzeylerde hücrel sinyal yollarında ikincil taşıyıcı rolü oynarlar, ayrıca gen ekspresyonu, inflamasyon, hücre büyümesi ve apoptoz gibi fizyolojik süreçlerde de görev alırlar (77-81). Ancak, yüksek miktarda oluşumları durumunda lipidler, proteinler ve DNA gibi hücrel bileşenlerde hasara neden olur (82).

Aerobik organizmalar, ROT'un zararlı etkilerine karşı enzimatik ve enzimatik olmayan iki ayrı antioksidan savunma sistemine sahiptir. Aşırı miktarda ROT üretimi ya da antioksidan savunmanın yetersiz kalması sonucu oksidatif denge bozulur ve oksidatif hasar oluşabilir. Oksidatif stres kanser, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi/reperfüzyon hasarı (83), nörolojik hastalıklar (84, 85) gibi birçok patolojik süreçte artmaktadır. ETC; süperoksit anyon radikalinin dolayısıyla ROT'ların ana kaynaklarından birisi olduğu için oksidatif dengenin antioksidan savunma mekanizmalarıyla kontrol altında tutulması mitokondriyel toksisite açısından kritiktir.

ROT'lar, serbest radikaller ve radikal yapıda olmayan moleküller olmak üzere iki grup altında incelenir. Serbest radikallerin taşıdığı tek ya da daha fazla ortaklaşmamış elektron moleküle reaktivite kazandırır. İki serbest radikalın ortaklaşmamış elektronlarını paylaşması sonucu radikal olmayan yapılar oluşmaktadır. Üç ana ROT; O_2^- , $\cdot OH$ ve H_2O_2 'dir. Süperoksit anyon radikali, moleküler oksijene bir elektron eklenmesi sonucunda oluşur (86). Bu elektron eklenmesi daha önce vurgulandığı gibi ana olarak mitokondriyel elektron transportu sırasında gerçekleşmesinin yanı sıra *NAD(P)H oksidad* ve *ksantin oksidad* enzimlerinin çalışması sırasında da oluşmaktadır. Normal şartlarda elektronlar ETC boyunca hareket eder. Oksijen suya indirgenirken, elektronların % 1- 5'i süperoksit anyonu oluşturur.

Süperoksit anyon radikali, süperoksit dismutaz enzimi (SOD) ile hidrojen peroksite çevrilir. Süperoksit anyon radikalinin aksine H_2O_2 , plazma membranlarından kolayca difüze olur. H_2O_2 ayrıca *ksantin oksidad*, *aminoasit oksidad* ve *NAD(P)H oksidad* tarafından oksidatif reaksiyonlar sonucunda da oluşur (87, 88). Ortamda demir (Fe), bakır (Cu) gibi

metallerin varlığında H_2O_2 , *Fenton Reaksiyonu* ile hidroksil radikaline ($\cdot OH$) dönüşür (89). Bilinen en reaktif, yani en tehlikeli radikal olan $\cdot OH$ 'ne karşı enzimatik antioksidan savunma sistemi yoktur; bu nedenle protein, lipid ve DNA'ya zarar verebilir. *Miyeloperoksidaz* (MPO)- H_2O_2 - Cl^- sistemiyle hipokloröz asite (HOCl) dönüşen H_2O_2 (90), DNA-protein çapraz bağları oluşmasına neden olur (91).

Diğer oksijen türevi radikaller, EPO ve MPO aracılığıyla hücrel proteinler üzerinde oluşan tirozil ve peroksil radikalleridir ($ROO\cdot$). Serbest radikaller, yağ asitlerinin metilen karbonundan bir hidrojen atomu çıkartarak yağ asitini radikal haline getirir ve lipid peroksidasyonu (LPO) zincir reaksiyonunu başlatır. Ara basamaklarda oluşan lipid peroksil radikalinin neden olduğu zincir reaksiyonu sonucu doymamış yağ asitleri, lipid hidroperoksitlere dönüşür. Lipid hidroperoksitler kimyasal açıdan dayanıksız bileşiklerdir ve 4-hidroksi-2,3-nonenal, malondialdehit (MDA) gibi birçok küçük moleküllü LPO parçalanma ürünü oluşumuna neden olur (92).

Ayrıca anti-inflamatuvar, antikoagülan ve vazodilatör etkili NO, hızlıca oksijenle reaksiyona girerek güçlü bir nitrozan olan $ONOO^-$ anyonunu oluşturur. Bu anyon, mitokondri ve endotel hasarına neden olabildiği için hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diyabet gibi hastalıkların patojenezinde ve yaşlanma sürecinde rol alır (72, 93).

2.2.5.1. Oksidatif Stres ve Oksidatif Hasar

Antioksidan savunma sisteminin kapasitesinin azalması ya da aşırı miktarda ROT birikimi sonucu oksidatif denge bozulur ve oksidatif stres oluşur; DNA, protein ve lipidlerin yapı ve işlevleri zarar görür. Birçok transkripsiyon faktörü aktive olur, pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler salınır (94, 95).

ROT'lar DNA'da bazların parçalanması, DNA kırıklıklarının oluşumu, pürin-pirimidin modifikasyonları, mutasyonlar, delesyonlar, translokasyon, DNA metilasyonu ve proteinlerde çapraz bağlanma gibi birçok farklı mekanizmayla hasar oluşturur. Birçok DNA modifikasyonu karsinogenezis, yaşlanma, nörodejeneratif, kardiyovasküler, otoimmün hastalıklar ile ilişkilidir. Oksidatif stres sonucu lipid peroksidasyonu artar ve lipid yapıdaki membranlar zarar görür. Bu durum, membrana gömülü reseptör proteinlerin ve enzimlerin aktivitesinin kaybına ve membran geçirgenliğinin de bozulmasına yol açar. MDA, doymamış aldehitler gibi lipid peroksidasyonu ürünleri, proteinlerde çapraz bağlanma yaparak proteinlerin aktivitesinin kaybına, hücrel GSH konsantrasyonunun azalmasına neden olur (96).

ROT; peptid zincirinde fragmentasyona, proteinlerin yüklerinin değişmesine, çapraz bağlanmaya, spesifik aminoasitlerin oksidasyonuna neden olarak proteinlerin spesifik proteazlar tarafından yıkılmasına yol açar. Proteinlerdeki sistein ve metiyonin aminoasitleri, oksidasyona en duyarlı kısımlardır. Bu aminoasitlerin oksidasyonu sonucu proteinde konformasyonel değişiklikler, katlanma problemleri, protein aktivite kayıpları ve kısmi ya da tam parçalanma gerçekleşir. Aktif bölgesinde metal içeren enzimler, oksidatif strese daha duyarlıdır (97).

2.2.5.2. Antioksidan Savunma Sistemi

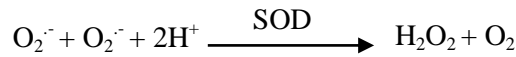
ROT'lara karşı *enzimatik* ve *enzimatik-olmayan* 2 ayrı savunma sistemi vardır. Vitaminler (Vitamin C ve E), β-karoten (Vitamin A öncülü), ürik asit, GSH gibi düşük molekül ağırlıklı bileşikler, *enzimatik-olmayan* antioksidanlardır.

2.2.5.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

En önemli antioksidan enzimler *süperoksit dismutaz* (SOD), *katalaz* (CAT) ve *glutasyon peroksidaz*'dır (GPx). Ayrıca *hem-oksijenaz 1* ve redoks proteinleri de antioksidan savunma sisteminde önemli rol oynamaktadır.

2.2.5.2.1.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit ve peroksinitrit radikaline karşı en önemli savunmayı oluşturur. Süperoksit anyon radikali, SOD enzimi tarafından H₂O₂'ye dönüştürülerek reaktivitesi önemli oranda azaltılır. H₂O₂ CAT, GPx ya da *peroksiredoksin* (Prxs) enzimiyle suya (H₂O) dönüştürülür. SOD'ın katalize ettiği dismutasyon reaksiyonu aşağıdaki gibi şematize edilebilir:



Memelilerde farklı genler tarafından kodlanan ve farklı hücresel bölümlerde yer almasına rağmen aynı reaksiyonu katalize eden üç ayrı SOD izoenzimi vardır; SOD1 (Cu,Zn-SOD), SOD2 (Mn-SOD), SOD3 (ecSOD). Bu enzimlerin aktif kısımlarında bulunan ve elektronların transferinde görev alan metal atomları farklıdır (98). SOD1 aktif bölgesinde Cu ve Zn içerirken, SOD2 Mn taşır.

SOD1 (Sitozolik Cu,ZnSOD)

SOD1; 32 kDa ağırlığında, esas olarak hücre sitozolünde, ayrıca eser miktarda mitokondrinin membranlar arası boşluğu, nükleus, lizozom ve peroksisomda bulunmaktadır (99-101). SOD1 enzimin katalitik aktivitesi, aktif bölgesinde Cu ya da çinko (Zn) varlığına bağlıdır. Zn, proteinin katlanmasında ve stabilitesinin sürdürülmesinde görevlidir. Zn, Cu ya da kobalt (Co) atomları ile yer değiştirebilir. Zn atomu enzim aktivitesi için gerekli değilken, Cu enzimin aktif bölgesinde bulunur ve enzimin katalitik aktivitesi için şarttır. Fizyolojik koşullarda sitozolde çözünür halde bulunan Cu atomu, Cu taşıyıcı proteinler, yani şaperonlar aracılığı ile hedefe ulaştırılır (102, 103).

SOD2 (Mn-SOD)

Aktif bölgesinde mangan (Mn) içeren bu izoenzim 96 kDa ağırlığındadır. Mitokondrinin matriksinde bulunur ve burada ana olarak ETC tarafından yan ürün olarak üretilen $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'ye dönüşümünü katalize eder (104). SOD2 sitozolde sentezlenir. Aminoasit diziliminin N-terminaline eklenen sinyal peptid aracılığıyla mitokondriye hedeflenir. SOD2 enziminin aktif bölgesi, SOD1 enzimi ile benzerlik göstermezken, ökaryotlarda bulunmayan FeSOD enziminin aktif bölgesi ile hemen hemen aynıdır (105). SOD2 enziminin aktif bölgesine Mn ya da Fe atomları bağlanabilir ancak, sadece MnSOD enzimi katalitik olarak aktiftir (106, 107).

Mn-SOD, aerobik organizmalarda hayati öneme sahiptir. Farelerle yapılan bir çalışmada Mn-SOD enziminin eksprese edilmemesi durumunda farelerin kardiyomiyopati ve nörodejenerasyon sonucu yaşam sürelerinin kısaldığı gözlenmiştir (108). Mn-SOD enzim eksikliği olan farelerde *Kompleks II* ve Krebs Döngüsü'nde görevli *akonitaz* enzim aktivitesinin azaldığı, mitokondriyel fonksiyon kayıplarının olduğu gösterilmiştir (109).

Fare embriyonik fibroblastları (MEF) ile yapılan bir çalışmada *SOD2* geninin silinmesi sonucu ATP üretiminin ve O_2 tüketiminin azaldığı, ROT üretiminin arttığı ve bu toksisite mekanizmalarına bağlı olarak da farelerin ömürlerinin azaldığı gösterilmiştir (110, 111). SOD2 enzimidaki genetik polimorfizm ile tip II diyabet, hipertansiyon, astım, parkinson, akciğer kanseri ve prostat kanseri gibi hastalıklar arasında ilişkinin incelendiği birçok çalışma bulunmaktadır; Mn-SOD ekspresyonunun azalması, bu hastalıklara yatkınlığı arttırmaktadır (112-115). *Mn-SOD* geninin promotör bölgesinde 102. konumdaki sisteinin timine mutasyonu, 93. koda alanin eklenmesi, 58. aminoasitin lösin yerine treoninin olması sonucu enzimin yapısı bozulur, ekspresyonu ve mitokondriye girişi azalır. Bu genetik

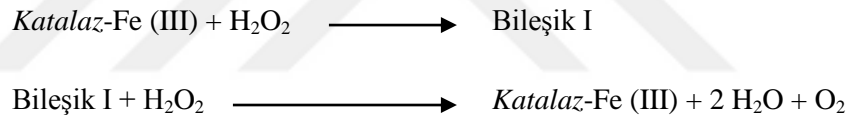
mutasyonlar enzimin ekspresyonu ve aktivitesindeki bireyler arası farklılıkları açıklamaktadır (116).

SOD3 (Ekstrasellüler Cu,ZnSOD ya da ecSOD)

SOD3, aktif bölgesinde Cu atomu taşıyan ve esas olarak vasküler ekstrasellüler boşlukta ayrıca akciğer, böbrek ve uterusunda bulunan bir izozimdir; vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlar tarafından sentezlenir (117). Vasküler tonusun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. SOD3 izoenzimi ayrıca, dokuda hasar olduğu zaman ya da ateroskleroz sırasında infalasyon hücrelerinde de sentezlenmektedir (118).

2.2.5.2.1.2. Katalaz

Aktif bölgesinde *hem* grubu (dolayısıyla Fe) barındıran tetramerik bir enzimdir. Hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya yıkarak uzaklaştırır. Molekül ağırlığı yaklaşık 240 kDa'dır. *Katalaz* enziminin katalize ettiği reaksiyon şu şekilde şematize edilebilir (119).



En yüksek *katalaz* aktivitesi karaciğer ve eritrositlerde, ancak enzim değişen miktarlarda bütün dokularda bulunmaktadır (120).

Katalaz enzimi ana olarak hücre sitozolünde ve hidrojen peroksitin yoğun olarak üretildiği peroksizomlarda bulunmaktadır. Mitokondrielerde oksidatif fosforilasyon sırasında kompleks proteinlerde oluşan süperoksit radikali mitokondriyel matrikse salınır ve SOD enzimleriyle H_2O_2 'ye dönüşür. Bu nedenle mitokondrielerde *katalaz* aktivitesinin olması, oksidatif hasarın oluşmasını engellemektedir. 1991 yılında Radi ve ark., sıçan kalp mitokondriyel matriksinde (121), 2007 yılında Salvi ve ark., sıçan karaciğer mitokondriyel matriksinde *katalaz* enzim aktivitesini belirlemişler ve bu enzimin, matrikste H_2O_2 düzeylerinin kontrolünde ve mitokondrieleri oksidatif hasara karşı korumada önemli olduğunu göstermişlerdir (122). Mitokondriyel *katalaz* enziminin N-terminal kısmındaki pozitif yüklü 20-60 aminoasit sekansı hedeflendirici dizidir ve sitozolde sentezlenen enzimin mitokondriye taşınmasını sağlar (123-125). Farklı çalışmalarda iskelet kas (126) ve santral sinir sistemi hücrelerinin mitokondrielerinde *katalaz* aktivitesi araştırılmış, ancak bu hücrelerin mitokondrielerinde enzim saptanamamıştır (127).

Mitokondrilerde H_2O_2 'nin % 80'i matrikste oluşur. Oluşan peroksitin ortalama % 60'ı *katalaz*, % 15'i GPx ve % 3'ü ise fenton reaksiyonu aracılığıyla suya yıkılırken, geri kalan sitozole difüze olur (128). Mitokondriyel *katalaz* aktivitesi olmayan sıçanlarla yapılan bir çalışmada bu deney hayvanlarının lipid peroksidasyona çok daha duyarlı oldukları, bu nedenle mitokondriyel *katalaz*'ın oksidatif dengeyi sağlamada önemli olduğu gösterilmiştir (129, 130).

2.2.5.2.1.3. Glutatyon Peroksidaz

GSH gibi düşük molekül ağırlıklı tiyollerden sağladığı proton ile H_2O_2 ve lipid peroksitleri redükte eden sitozolik bir enzim grubudur. Lipid peroksitler karbon sayısına denk gelen alkol türevine, H_2O_2 ise suya yıkılır. Böylece GPx hücre proteinlerini ve hücre zarını oksidatif hasara karşı korur (131).



GSH tüm hücrelerde bulunan, GPx ve GST gibi detoksifikasyon enzimleri için nükleofilik kofaktördür. GSH elektronlarını H_2O_2 'ye aktarır ve kendisi okside glutatyona (GSSG) yükseltgenir. GSSG, NAD(P)H'ı elektron kaynağı olarak kullanan *GSH redüktaz* ile tekrar GSH'a indirgenir (132). Memeli dokularında hidroperoksitlerin GSH bağımlı indirgenmesine sadece GPx enzimlerinin değil, aynı zamanda GSTA'nın da katkı sağladığı bilinmektedir, bu enzim Se-bağımsız GPx olarak da adlandırılır (133).

GPx enzimleri, hemen hemen bütün memeli dokularında bulunmasına rağmen en yüksek miktarda buldukları doku karaciğerdir (120). Memelilerde enzimin aktif bölgesinde selenosistein aminoasidi bulunan dört ana izoenzim vardır; GPx-1, (hücresel GPx) eritrositlerde, karaciğer, akciğer ve böbrekte bulunur, H_2O_2 ve yağ asidi peroksitlerinin redüksiyonunda görevlidir (134). GPx-2 (gastrointestinal GPx), gastrointestinal epitel hücrelerinde bulunur, diyet kaynaklı peroksitlerin indirgenmesini sağlar (135). GPx-3 (ekstrasellüler GPx), memelilerde ekstrasellüler antioksidan enzimlerin en önemlisidir ve böbrek, akciğer, epididimis, plesanta, kalp ve kasta bulunmaktadır. GPx-4 (fosfolipid hidroperoksit GPx) ise esterlenmiş peroksil lipidlerin redüksiyonundan sorumlu, membran bağımlı bir enzimdir. Ayrıca memelilerde tanımlanan diğer iki izoenzim GPx-5 ve GPx-6 enzimleri de GPx-3 ile yapıca benzerlik göstermektedir. GPx-5 aktif kısmında selenyum taşımayan ve epididimisten salgılan izoenzimdir. Selenyuma bağımlı bir izoenzim olan GPx-

6'nın ise insanda burun epitelinde varlığı gösterilmiştir. Son yıllarda memelilerde enzimin aktif kısmında selenosistein yerine sadece sistein aminoasidi taşıyan yeni bir aile tanımlanmıştır. 22 kDa ağırlığında, katalitik aktivitesi düşük, özellikle memeli salgı bezlerinde bulunan NPGPx (selenosistein içermeyen fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz) enzimleri 7. GPx ailesi olarak tanımlanmıştır (136).

İzoenzimlerin hücre içi konumları farklıdır. GPx-1 sitozol, nükleus ve mitokondrilerde, GPx 2 sitozol ve nükleusta, GPx-3 sitozolde, GPx-4 ise sitozol, nükleus ve mitokondrilerde bulunan membrana bağlı izoenzimdir (137). Memeli mitokondrilerinde GPx enzimlerinden GPx-1 ve GPx-4 bulunmaktadır (138, 139).

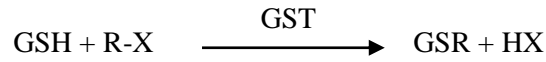
Ana olarak sitozolde bulunan GPx-1 izoenzimin mitokondri içindeki miktarı, dokudan dokuya farklılık göstermektedir. GPx-1'in karaciğer ve böbrek mitokondrilerinde fazla miktarda bulunmasına rağmen beyin ve kas mitokondrilerinde az miktarda olduğu tespit edilmiştir. GPx-1 eksikliği lipid peroksidasyonunun ve mitokondriyel H₂O₂ oluşumunun artmasına, oksidatif fosforilasyonun ise azalmasına neden olmaktadır (140). GPx-4 (fosfolipid hidroperoksit GPx) mitokondrilerde en fazla bulunan GPx üyesi olup membrana bağlı izoenzimdir (141). Enzim sitozolde uzun peptid (L form; 23 kDa) ya da kısa peptid (S form; 20 kDa) olarak sentezlenir. L formu mitokondriyi hedefleyen sinyal dizisi yardımıyla mitokondriye girer. Bu enzimin ana görevi lipid hidroperoksitlerin detoksifikasyonudur, bu nedenle oksidatif membran hasarına karşı koruyucudur. Beyin ve testis mitokondrisinde önemli miktarda bulunan GPx-4 izozimi, karaciğer ve böbrek mitokondrilerinde ise minör seviyede bulunmaktadır (140). En önemli proapoptotik faktörlerden biri olan sitokrom c, kardiyolipine bağlanırken *kardiyolipin hidroperoksidaza* bağlanamaz. GPx-4 ekspresyonu artan hücrelerde oksidatif stres sonucu oluşan membran potansiyelindeki kaybın azaldığı, sitokrom c salınımının ve kaspaz yolağı aktivasyonunun engellendiği gösterilmiştir (142, 143). Bu nedenle GPx-4'ün apoptoz kontrolünde de önemli olduğu ileri sürülmüştür (144, 145). Mitokondriyel GPx miktarlarının azalması, mitokondri işlevlerinde bozukluğa neden olmaktadır. Örneğin, homozigot mutant GPx-1 farelerinin vücut ağırlığının diğer farelerden % 20 daha az olduğu, karaciğerde H₂O₂ miktarlarının ve lipid peroksitlerin arttığı, solunumun ise azaldığı gösterilmiştir (140).

2.2.5.2.1.4. Glutatyon S-transferaz Enzimleri

Glutatyon S-transferazlar (GST), endojen ya da eksojen kaynaklı elektrofilik, hidrofobik maddelerin ve reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda ya da bu maddelerin hücre içi ve hücreler arası taşınmalarında görev alan nükleofilik bir enzim ailesidir (146,

147). GST enzimleri, konjugasyon reaksiyonlarının yanında izomerizasyon, redüksiyon gibi farklı reaksiyonları da katalize edebilirler. Steroid ve prostaglandin biyosentezi, tirozin katabolizması, apoptoz gibi birçok biyokimyasal süreçte rol oynamaktadırlar (148). Hücre içindeki önemli rolleri nedeniyle GST enzimleri aynı zamanda toksisite hedefidir.

GST enzimleri tarafından katalizlenen *displacement (yer değiştirme)* reaksiyonu, glutatyonun aktif sülfidril grubunun substratların elektrofilik merkezlerine nükleofilik atağı sonucu gerçekleşir. Reaksiyon aşağıdaki gibidir;



Bu konjugasyon reaksiyonu sonucu oluşan glutatyon konjugatı, glutamin ve glisin aminoasitlerini kaybederek sistein konjugatına dönüşür. Sistein konjugatının amin grubu asetillenir ve idrarla atılma uygun merkaptürik asit türevi oluşur (149).

İnsanlarda GST enzimleri sitozolik, mitokondriyel ve eikosanoid ya da glutatyon metabolizmasında görevli membran bağımlı mikrozomal GST'ler olmak üzere 3 sınıfta incelenebilir (150). Sitozolik GST enzimleri aminoasit sekanslarına göre alfa (5 üye), mü (5 üye), pi (1 üye), teta (2 üye), zeta (1 üye), omega (2 üye) ve sigma (1 üye) olmak üzere 7 alt aileye ayrılır (151). Aynı sınıfa ait enzimlerin aminoasit sekansları birbirine en az % 40 oranda benzerlik göstermektedir. Sitozolik GST enzimleri, esas olarak sitozolde bulunmalarına rağmen nükleus ya da mitokondrilerde de aktivite gösterirler. Örneğin; GSTPi 1 (GSTP1) doksorubisin kaynaklı DNA hasarına karşı hücreyi korur, yani nükleusta aktivite gösterir. Mitokondriyel GST enzimleri kimyasal ya da oksidatif strese karşı savunma mekanizmasında rol oynarlar (152).

İnsanlarda birçok GST enzimi ilaç ve diğer ksenobiyotiklerin GSH ile konjugasyon reaksiyonlarını katalize eder (146). Teta sınıfı GST'lerin sülfataz aktivitesi de vardır (153). Omega sınıfı enzimler ise disülfid redüksiyonunu katalize ederler (154).

Mikrozomal GST (mGST), yapı ve büyüklük olarak mitokondriyel ve sitozolik enzimlerden farklıdır (155). Ökaryotik mikrozomal GST ailesi *mGST 1, 2, 3, lökotrienC4 sentaz (LTC4), 5-lipooksijenaz aktive edici protein mikrozomal prostaglandin E2 sentaz 1 (MPGES1)* olmak üzere 6 alt aileden oluşmaktadır. Bu enzim ailesi ksenobiyotik detoksifikasyonu ve hücreyi oksidatif strese karşı korumada rol alırlar (156).

2.2.5.3.1.4.1. Mitokondriyel Glutasyon S-transferaz Enzimleri

Mitokondri organizmada oksijen metabolizmasının merkezi olmaları nedeniyle oksidatif stresin hem kaynağı hem de hedefidir. Mitokondriyel GST enzimlerinin sitozolik tiplerinin hücrel peroksitler ve doymamış yağ asitleri gibi oksidatif stres ürünlerini redükleyerek detoksifikasyonda rol oynadığı bilinmektedir (157). Mitokondriyel GST enzimleri nükleer DNA tarafından kodlandıktan sonra hücre sitozolünde sentezlenirler ve amino asit dizilimlerinin *N*-terminallerindeki hedeflendirici dizi ile mitokondriyel matrikse yönlendirilirler (158). Robin ve ark. 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada *Cercopithecus aethiops* kidney (COS) hücreleri ile çalışmış ve GSTA4-4'ün siklik adenozin monofosfat (cAMP) aracılı fosforilasyonu sonucu mitokondriye girdiğini göstermişlerdir. Proteinin *N*-terminal hedeflendirici sinyal dizisi ile *C*-terminal kısmındaki 20 aminoasit bölgesi *protein kinaz A* tarafından Ser-189, *protein kinaz C* ile Thr-193 aminoasitinden fosforillenir. Fosforilasyon sonucu proteinin, heat shock protein 70 (Hsp70)'e afinitesi ve dolayısıyla mitokondriye girişi artar (159). Sıçanda diyabet gibi oksidatif stres koşullarında sitozolik GST izoenzimlerinin de mitokondriye yönlendiği gösterilmiştir (160).

Farklı türlerle yapılan çalışmalarda memeli mitokondrilerinde GST izoenzimlerinin aktivitesi gösterilmiştir. Fare karaciğer mitokondrilerinde *alfa* (152, 161), sıçan karaciğer mitokondriyel matrikste *kappa* ve *teta* sınıfı GST'lerin varlığı kanıtlanmıştır (162). İnsan karaciğer mitokondriyel matrikste GSTA4 (163), A1, A2 ve P1 enzimlerinin varlığı ve aktiviteleri gösterilmiştir (157).

GST *kappa* diğer GST izoenzimlerinden farklı olarak sadece mitokondriyel fraksiyonda bulunmaktadır (164). İlk olarak sıçan karaciğer mitokondriyel matriksinde gösterilen GST *kappa*'nın (162) fare karaciğer ve böbreğinde de varlığı kanıtlanmıştır (165). 2004 yılında ise insan karaciğer mitokondriyel matriksinde de GSTK aktivitesinin olduğu bildirilmiştir (166).

GSTK, genel GST substratı 2,4-dinitroklorobenzen (CDNB) ve GSTP substratı etakrinik asite karşı aktivite göstermesine rağmen spesifik substratı henüz tanımlanamamıştır (167).

Tablo 1'de memelilerde bulunan GST izoenzimleri ve bu izoenzimlerin *in vitro* aktivite tayinlerinde kullanılan substratları özetlenmiştir.

Tablo 1. Memeli mitokondrilerinde bulunan GST enzimleri, fonksiyonları ve spesifik substratları (*MLMx*, fare karaciğer mitokondriyel matriks; *RLMx*, sıçan karaciğer mitokondriyel matriks; *HLMx*, insan karaciğer mitokondriyel matriks; *MKMx*, fare böbrek mitokondriyel matriks; *HHMx*, insan kalp mitokondriyel matriks; *CDNB*, 2,4-dinitroklorobenzen; *DCNB*, 1,2-Dikloro-4-nitrobenzen; *PBO*, *trans-4-fenil-3-buten-2-on*; *NBC*, *p-nitrobenzilklorür*; *EPNP*, 1,2-epoksi-3-(*p-nitrofenoksil*) propan.

GST izozimi	Hüresel Konumu	Fonksiyonu (170)	Genel / Spesifik Substratı
GST alfa	MLMx (161) HLMx (157)	Detoksifikasyon Peroksit redüksiyonu	CDNB /Etakrinik asit (171)
GST mü	MLMx (152)	Detoksifikasyon	CDNB /DCNB (172), PBO (168), NBC (168)
GST pi	HLMx (157)	Detoksifikasyon	CDNB /Etakrinik asit (150)
GST tetä	RLMx (162) MLMx (168) HLMx (157)	Detoksifikasyon Peroksit redüksiyonu Haloalkan konjugasyonu	CDNB /EPNP (173), Diklorometan (168)
GST kappa	RLMx (162) MLMx (165) MKMx (165) HHMx (169)	Detoksifikasyon Peroksit redüksiyonu	CDNB / -

2.2.5.2.2. Enzimatik Olmayan Mitokondriyel Antioksidanlar

Mitokondrilerde ayrıca GSH gibi *enzimatik-olmayan* birçok antioksidan bulunmaktadır. GSH sitozolde sentezlenerek ER, mitokondri ve nükleusa gönderilir (174). GSH'ın mitokondrilere girmesi için redükte olması gerekmektedir. Mitokondriyel matrikste redükte glutatyonun elektronlarını elektrofilik maddelere vermesi sonucu okside glutatyon (GSSG) oluşur. GSH, GSH redüktaz, GPx, GST ya da GSH ile ilişkili mitokondriyel redoks enzimleriyle (*glutaredoksin*, *tiyoredoksin*, *peroksiredoksin*) tekrar redükte hale gelir.

GSSG ve diğer okside mitokondriyel tiyollerin redüksiyonunda görev alan *glutaredoksin*, hem mitokondriyel, hem de nükleer fraksiyonlarda bulunmaktadır (175). Doksorubisinle indüklenen kardiyak hasarı azaltıcı etkisi vardır (176). Ayrıca mitokondrilerde diğer *disülfid redüktaz* üyeleri *tiyoredoksin 2* ve *peroksiredoksin* de bulunmaktadır (177).

Koenzim Q (CoQ₁₀), ETC'de *Kompleks I* ve *II*'den aldığı elektronları *Kompleks III*'e aktaran lipofilik bir antioksidandır. Okside form ubikinon ile redükte form ubikinol arasında iki elektron değişimini sağlaması, CoQ₁₀'nun antioksidan kapasitesini oluşturmaktadır. Ubikinol, süperoksit ve serbest radikallerden elektronları üzerine alabilen ayrıca protein ve DNA oksidasyonunu ve lipit peroksidasyonunu inhibe eden zincir kırıcı bir antioksidandır (178).

2.3. Mitokondriyel Toksikite Mekanizmaları

Advers İlaç Reaksiyonları (AİR), Dünya Sağlık Örgütü tarafından bir ilacın profilaksi, tanı ya da tedavi amacıyla kullanılan dozlarında ortaya çıkan zararlı, amaçlanmamış ve arzu edilmeyen etkileri olarak tanımlanmaktadır (179). Bu açıdan bakıldığında her ne kadar daha güvenli ilaçlar geliştirilmesi amaçlansa da AİR ilaç geliştirme aşamalarında ve ilaç tedavisinde karşılaşılan ana komplikasyonlardan biridir. Piyasaya çıkan ilaçların % 1'i ölümcül advers ilaç reaksiyonlarına neden olduklarından dolayı geri çekilmiştir (180). Son yıllarda mitokondriyel toksisitenin AİR'nin nedenleri arasında olduğu düşünülmektedir. Mitokondri, özelleşmiş yapısı ve hücre için kritik işlevleri nedeniyle birçok ksenobiyotiğin hedefidir (181). Mitokondrilerde yapısal ya da işlevsel herhangi bir bozukluk hücre ve organizma için karmaşık, hayati sonuçları oluşturmaktadır.

Karaciğer sistemik dolaşıma giren ilaç ve diğer kimyasallara yüksek konsantrasyonda maruz kaldığı için, kalp, böbrek ve santral sinir sistemi ise enerji açısından oksidatif fosforilasyona daha fazla bağımlı oldukları için mitokondriyel toksisitenin hedefi olan organlardır. İlaçlar hücresel enerji üretiminin inhibisyonu, mitokondriyel permeabilite por oluşumunun indüksiyonu, yağ asidi döngüsünün bozulması, oksidatif stres, mtDNA hasarı gibi farklı mekanizmalarla mitokondriyel toksisiteye neden olabilirler (182). Mitokondriyel toksisite mekanizmaları aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

2.3.1. Oksidatif Fosforilasyonun İnhibisyonu

Bazı ilaçlar mtDNA üzerinden mitokondriyel transkripsiyonu ya da protein transformasyonunu etkileyerek, bazı ilaçlar ise doğrudan ETC zincirindeki elektronların geçişini bozarak solunumu inhibe ederler (182). Elektron taşıma zincirinde (*Kompleks I-IV*) elektron akışının inhibisyonu, oksidatif fosforilasyonun bozulmasına neden olmaktadır. Ksenobiyotikler, elektron akışını iki farklı mekanizmayla bozabilirler; 1) proteinin bir ya da daha fazla alt ünitesine bağlanarak enzimin inhibe edilmesi ya da 2) elektronları kendi üzerlerine çekerek ubikinon ya da sitokrom c'nin elektron taşımasının engellenmesi (182, 183).

Mitokondriyel oksidatif fosforilasyonun bozulması ATP üretiminin azalmasına, dolayısıyla hücrenin işlevselliğinin ve canlılığının etkilenmesine neden olmaktadır. Elektron akışının kesilmesi sonucunda NADH'nin, NAD⁺'ya oksidasyonu azalır. NADH/NAD⁺ oranının yükselmesiyle *piruvat dehidrogenaz* enzimi tarafından gerçekleştirilen piruvatın asetil CoA'ya oksidasyonu engellenir. Piruvatın laktata dönüşümü artar ve aşırı laktik asit birikimi sonucu laktik asidoz görülebilir (183). NAD⁺ ve flavin adenin dinükleotid (FAD) seviyelerindeki düşüş, yağ asitlerinin β -oksidasyonunun da azalmasına neden olur. Hücrenin enerji metabolizması daha da kötüleşir (184).

Ayrıca elektronların kompleks proteinler üzerinden akışının bozulması, elektronların matrikste birikmesine neden olur. Mitokondriyel ROT üretimi artar ve oksidatif stres oluşur. Reaktif oksijen türleri proteinlere, lipid membranlara ve/veya mtDNA'ya bağlanır ve işlev kayıpları oluşur. mtDNA tarafından kodlanan proteinlerin ekspresyon düzeyleri azalır, mitokondrilerin morfolojileri ve fonksiyonları bozulur (1).

Elektron transport zincirini oluşturan *Kompleks I, III, IV* ve *V*'in klasik inhibitörleri sırasıyla rotenon, antimisin A, siyanür (CN⁻) ya da karbonmonoksit (CO) ve oligomisinidir. Klinikte kullanılan birçok ilaç, kompleks proteinlerini değişen derecelerde inhibe ederek oksidatif fosforilasyonu bozabilir (185).

NSAI ilaçların neden olduğu oksidatif strese ve hücre hasarında mitokondriyel işlev bozukluğu önemli rol oynamaktadır. Aspirin, indometazin, diklofenak, piroksikam, ibuprofen *Kompleks I*'i inhibe eder. Bu durum ROT oluşumunun artmasına, oksidatif strese, ATP sentezinin azalması yoluyla toksisiteye neden olmaktadır (186).

Haloperidol, klorpromazin, flufenazin ve risperidon gibi antipsikotik nöroleptik ilaçların (187), idiyosenkratik hepatotoksisiteye neden olan antidepresan nefazodonun, barbitüratların, prostat kanseri tedavisinde kullanılan nilutamit ve flutamitin (188), antiaritmik amiodaronun (189) *Kompleks I* inhibisyonu yaptığı bildirilmiştir (190). Ayrıca

yasa dışı sentezlenen eroin 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridin (MPTP)'nin metaboliti olan 1-metil-4-fenil piridin (MPP⁺), dopaminerjik nöronlarda *Kompleks I*'i inhibe eder ve parkinson benzeri semptomlar oluşturur (191).

Hiperlipidemi tedavisinde kullanılan *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR α) agonistlerinin (klofibrat, fenofibrat) yine *Kompleks I* inhibisyonuna bağı karaciğer toksisitesine neden olduğu gösterilmiştir (192). Antidiyabetik ilaçlar troglitazon, rosiglitazon ve pioglitazon da *Kompleks I* inhibitörü ilaçlardır. Troglitazonun piyasadan geri çekilmesine neden olan hepatotoksitesinin altında yatan mekanizma, önemli derecede mitokondriyel işlev kaybıdır (193-195). Rosiglitazon ve pioglitazon ise kardiyotoksitesite nedeniyle dikkatli olunması gereken ilaçlar sınıfındadır (181). Antidiyabetik ilaçlardan fenformin, buformin ve metformin de *Kompleks I* inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Mitokondriyel solunumu güçlü bir şekilde inhibe eden fenformin ve buformin, laktik asidoza neden oldukları için piyasadan geri çekilmiştir. Metformin ise daha zayıf inhibisyona neden olmakta ve tedavide hala kullanılmaktadır (196).

H₂ reseptör blokörü oksmetidin, *Kompleks I*'den elektronları kendi üzerine alarak ubikinona aktarımını engeller (197). Simvastatin *Kompleks I, II, III, IV* ve *V* aktivitesini inhibe eder (181). Antineoplastik tamoksifen, *Kompleks II* ve *III*'ün zayıf, *Kompleks V*'in ise güçlü inhibitörüdür (198). NSAI ilaç diklofenak, *Kompleks V* inhibitörüdür (199). Klorpromazinin özellikle *Kompleks V*, ayrıca *Kompleks II* ve *III*'ün de aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (181).

Mitokondri aracılıklı toksisitenin en iyi bilinen örneklerinden biri siyanür (CN⁻) toksisitesidir Siyanür, uygun moleküler boyutları ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle vücuda girdiğinde hızlı ve kolay bir biçimde mitokondriye kadar ulaşır. ETC'deki *sitokrom oksidaz*'ın aktif bölgesinde bulunan Fe⁺³'e çok yüksek bir afinite ile bağlanarak bu enzimi bloke eder. *Sitokrom oksidaz* inhibisyonu, hücreye gelen oksijeni toplam 4 elektron transferiyle suya metabolize eden ETC'nin bu işlevini *Kompleks IV* düzeyinde durdurur, hücre solunum ve ATP üretimi inhibe olur. Vücuda giren CN⁻'nin dozuna bağı olarak bu inhibisyon ölümle sonuçlanabilir (200).

2.3.2. Kenetsizleyici Etki

ETC üzerindeki elektron akışı sırasında matriksten membranlar arası boşluğa aktarılan protonların, *F₀F₁-ATP sentaz* üzerinden değil de iç membran boyunca matrikse geri dönmesi sonucunda *kenetsizleyici etki* (uncoupling effect) görülmektedir. Bu durumda ATP üretimi engellenir ve fosfat bağlarında yakalanmayan enerji, ısı olarak ortaya çıkar (44, 200).

Üretilen ATP miktarının azalması ve oksijen tüketiminin artması sonucu hücre hasarı oluşur ve apoptotik/nekrotik süreçler indüklenir.

Bazı ilaçlar ve kimyasal maddeler, membran yapısında değişiklikler oluşturarak ya da taşıyıcı proteinleri (termojenin, kenetsizleştirici protein; UCP1, adenin nükleotit translokaz; ANT, aspartat-glutamat taşıyıcısı; AGC) etkileyerek protonların anormal bir şekilde iç membran boyunca matrikse serbestçe geçmesine neden olabilirler. Bu durumda protoforetik güç azalır ve elektronların oksijene aktarılmasıyla ATP sentezi arasındaki ilişki, yani oksidatif fosforilasyon bozulur (201).

En çok bilinen mitokondriyel kenetsizleyici madde, 2,4-dinitrofenol'dür (DNP). 1930'larda kilo verme amacıyla kullanılan DNP, ciddi hipertermiye neden olduğu için ölümlere yol açmıştır (202). DNP ve karbonilsiyaniür p-triflorometoksifenilhidrazon (FCCP) gibi zayıf lipofilik asitler, membranlar arası boşlukta protonlanır ve iç membrandan matrikse doğru difüze olurlar. Yapılarındaki protonları matrikse bırakarak, membranlar arası boşluğa geri dönerler.

Diklofenak, indometazin, naproksen, nimesulid, mefenamik asit, tolfenamid asit, flufenamik asit, diflunisal gibi birçok NSAI ilaç, kenetsizleyicidir. Lipofilik yapıları ve zayıf asidik özellikleri nedeniyle bu ilaçlar, protonofor özelliktedirler, yani mitokondriyel iç membranın membranlar arası boşluk tarafında birikerek membran yapılarında değişikliklere neden olurlar (MPTP oluşumu) ve taşıyıcı proteinler aracılığıyla proton geçişine yol açarlar (203,204).

Bir çalışmada kenetsizleyici olarak bilinen bazı NSAI ilaçların solunuma etkileri incelenmiş ve mefenamik asitin % 60, difenilaminin % 40, diklofenakın % 25 oranında oksidatif fosforilasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (205).

Mitokondriyel matriks, membranlar arası boşluğa göre daha negatif yüklü ve alkali olduğu için lipofilik katyonik bileşikler matriks içinde birikme eğilimindedirler. İmipiramin, klorpromazin, fentamidin, dibukain, kinidin gibi lipofilik katyonik ilaçlar, matrikste birikerek mitokondrinin iç membranı boyunca oluşan elektrokimyasal yük dengesinin bozulmasına ve oksidatif solunumla fosforilasyon arasında kenetsizlenmeye neden olurlar (206).

2.3.3.Yağ Asidi Oksidasyonunun İnhibisyonu

Mitokondriyel yağ asidi oksidasyonu, hücre homeostazı ve işlevleri için gerekli olan ATP üretiminin temel kaynağıdır. Bu süreçte yağ asidinden oluşan asetil CoA molekülleri

TCA döngüsüne girerek NADH ve FADH üretimini sağlarlar. NADH ve FADH da ETC'de kullanılıp ATP üretimine katkı sağlar. β -oksidasyonun bozulması, enerji üretiminin engellenmesine ve hücre ölümüne giden patolojik sürecin başlamasına neden olmaktadır (14, 38).

Birçok ilaç yağ asitlerinin aktivasyonunu ya da β -oksidasyonunda görev alan enzimleri inhibe ederek yağ asidi metabolizmasını bozar. Bu durumda sitozolde aşırı miktarda lipid birikimi, yani steatozis gerçekleşir ve karaciğer hasarı oluşur (207).

Valproik asit ve amiodaron gibi ilaçların toksisite mekanizmalarından biri de mitokondride yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonudur (208). Antiepileptik valproik asit, iki ayrı mekanizmayla yağ asidi oksidasyonunu bozar. Matrikste CoA ile VPA-CoA oluşur ve mitokondri içindeki CoA düzeyi azalır. Ayrıca, 4-en-VPA-CoA ve 2,4-dien-VPA-CoA metaboliti, yağ asidi oksidasyonunda görev alan enzimleri inhibe ederek β -oksidasyonu bozar, hepatik steatozis oluşur (209).

Atipik bir antipsikotik ilaç olan klozapinle birlikte olanzapin ve risperidon kullanımı sırasında insülin direnci, glukoz intoleransı, metabolik sendrom, diyabet gibi metabolik bozukluklar görülebilmektedir. Metabolik sendrom, insülin direnci, abdominal obezite, glukoz ve lipid metabolizmasında bozukluk, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı gibi sistemik bozuklukların birbirine eklendiği ölümcül bir endokrin hastalıktır. Bu ilaçların neden olduğu söz konusu metabolik bozuklukların mekanizması tam olarak aydınlatılamamasına rağmen mitokondriyel işlevleri bozarak toksisite oluşturdukları düşünülmektedir. Fare ve sıçanlarla yapılan *in vivo* çalışmalar sonucu bu ilaçların mitokondriyel yağ asidi oksidasyonunu ve plazma glukoz seviyelerini artırdığı, mitokondrilerde oksijen tüketimini ise azalttığı gösterilmiştir (210-212).

Asetilsalisilik asit (ASA) ve metabolitlerinin, mitokondriyel işlev bozukluğuna neden oldukları son yıllarda tartışılan bir konudur. Bu etkinin aspirin kullanan hastalarda görülebilen Reye Sendromu'nun mekanizmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir. ASA'nın temel metaboliti olan salisilik asitin uzun ve orta uzun zincirli yağ asidi oksidasyonunu inhibe ettiği, sıçan karaciğer mitokondrisinde, sıçan karaciğer doku kesitlerinde (213), sıçan hepatositlerinde (214) ve *in vivo* olarak farede (215) gösterilmiştir. Ancak 2017 yılında yayımlanan bir çalışmada ASA'nın orta zincirli yağ asidi metabolizmasını etkilemezken, uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu ve mitokondriyel proteinlerin asetilasyonunu artırdığı bildirilmiştir. Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye girişinin azalması ve yağ asidi metabolizmasının bozulması sonucu mitokondri morfolojisinde değişikliklerin olduğu ve ETC'nin etkilendiği yine aynı çalışmada gösterilmiştir (216).

Ayrıca, yüksek doz tetrasiklin sonucu oluşan steatozis ve trisiklik antidepresan amineptin kullanımı sonucu görülen hepatitin altında yatan mekanizmanın da mitokondriyel matrikste yağ asidi oksidasyonunun bozulması olduğu bildirilmiştir (38, 217).

2.3.4. Oksidatif Stres İndüksiyonu

Serbest radikaller DNA, proteinler ve lipidlerle reaksiyona girerek geri dönüşsüz oksidatif hasara neden olurlar. Mitokondrilerde serbest radikallerin artması durumunda mtDNA, mitokondriyel membran hasarı ve ETC'de hasarlar oluşur, hassas bir şekilde düzenlenen kalsiyum homeostazı bozulur. Bu durum ROT'ların oluşumunu daha da artırır ve hücre apoptotik ya da onkotik sürece girer (218-224).

SOD, CAT, GR, vitamin C ve E gibi hücresele antioksidanlar sağlıklı koşullarda hücrede ROT'ların belirli düzeylerde tutulmasını sağlarlar. Ancak bu antioksidan savunma sisteminin bir nedenle zayıflaması sonucu ROT regülasyonu bozulur ve hücre oksidatif hasara karşı korunmasız hale gelir. Proteinlerin işlevlerini normal biçimde sürdürmesi ve hücrenin canlılığını koruması için hücrede ROT homeostazı denetim altında tutulmalıdır (36, 225).

Parasetamolün 1 ve 10 µM dozları ile inkübe edilen J774.2 (fare makrofaj) hücrelerinde ve 1 mM parasetamole maruz kalan izole fare hepatositlerinde mitokondriyel GSH konsantrasyonunun önemli derecede azaldığı, lipid ve protein peroksidasyon düzeylerinin arttığı ve bu nedenle ROT oluşumunda artış olduğu gözlenmiştir (226). Bir başka çalışmada fare hepatositleri 1 mM parasetamole maruz bırakılmış ve 2 saat inkübasyonun sonunda oksidatif stresin olduğu, MPTP'nin indüklendiği ve membran potansiyelinde kayıp olduğu gösterilmiş, parasetamolün neden olduğu mitokondriyel toksisitede oksidatif stresin rolü olduğu sonucuna varılmıştır (227).

Valproik asit hepatotoksitesinin mekanizması olan mitokondriyel toksisitenin ana nedeninin mitokondriyel oksidatif stres olduğu bilinmektedir. Valproik asit sıçan primer hepatositlere 10-1 000 µM konsantrasyonda uygulandığında mitokondrilerde doza bağlı bir şekilde 2',7'-diklorofloressein (DCF) floresans şiddetinin arttığı, 400 µM ve üzeri dozlarda ise ROT oluşumundaki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu gösterilmiştir. DCF floresansı 1 000 µM valproik asit dozunda 5 kat, okside glutatyon düzeyi ise 1.5 kat artmıştır (228). Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde valproik asitin sıçan karaciğer mitokondrilerinde 100 ve 200 µM, HEPG2 hücrelerinde ise 2 mM dozda oksidatif stresi anlamlı şekilde artırdığı gösterilmiştir (229, 230).

Sıçan hepatositlerinde 6 mM olanzapin oksidatif stresi 2 kat artırmış ve ilaca bağlı hepatotoksisitenin nedeninin oksidatif stres sonucu mitokondriyel hasar olduğu ileri sürülmüştür (231).

Doksorubisin, kinon yapısında bir antineoplastik ilaçtır. Mitokondriye ulaşan doksorubisin, *Kompleks I*'den elektron alarak semikinona indirgenir. Bu ara ürün oksijeni indirgeyerek süperoksit anyon radikali oluşumu aracılığıyla GSH'ın tükenmesine neden olur (232).

Nefrotoksisite ve ototoksisiteye neden olan antineoplastik sisplatinin ROT oluşumunu artırıp antioksidan savunmayı zayıflattığı, mitokondriyel işlev bozukluğu oluşturduğu ve bu nedenlerle proksimal tübül hücrelerinin apoptoza gittiği bildirilmiştir (233).

Human immunodeficiency virus (HIV) enfeksiyonu sonucu ortaya çıkan acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) tedavisinde uzun dönem zidovudin kullanımı nöropati ve kardiyotoksisiteye neden olmaktadır. İnsan kas hücreleriyle yapılan *in vitro* ve farelerle yapılan *in vivo* çalışmalar sonucu ilacın toksisite hedefinin mitokondri olduğu bildirilmiştir (234). Zidovudin kullanımıyla oksidatif stres oluştuğu, mitokondri membran potansiyelinin düştüğü ve sitokrom c salınımı olduğu gösterilmiştir (235, 236).

Antiarritmik bir ilaç olan amiodaron kullanımı sırasında görülen hepatotoksisitenin nedeninin oksidatif stres indüksiyonuna bağlı mitokondriyel toksisite olduğu gösterilmiştir. Amiodaron; mitokondriyel H₂O₂ sentezini artırır, oksidatif fosforilasyonu bozar ve membran fosfolipitlerinin oksidasyonuna neden olur. Oluşan oksidatif stres nedeniyle mitokondriyel işlevler bozulur ve hepatotoksisite ortaya çıkar (189).

2.3.5. Mitokondriyel Geçirgenlik-Dönüşüm Porlarının (MPTP) Oluşumu

Mitokondriyel membran permeabilitesindeki artış olarak tanımlanan MPT, hücre hasarı ve hücre ölümüne neden olan patolojik bir süreçtir (237). MPT porlarının açılması; iç membran potansiyelinin düşmesine, oksidatif fosforilasyonda kenetsizleyici etkiye, mitokondriden iyon ve metabolik ara ürünlerin dışarı salınmasına, matrikse çok miktarda su girişi sonucu mitokondrilerin şişmesine, ATP sentezinin bozulmasına ve dış membran hasarına neden olur (238-241). Mitokondriyel membranlar arası boşluktan salınan sitokrom c, apoptotik süreci indükleyen sitozolik *kaspazları* ve *DNAaz*'ı aktive eder, devamında DNA kırıkları oluşur ve apoptotik süreç başlar (242, 243). Peroksit ya da peroksinitrit gibi oksidanlar, Ca⁺² ve inorganik fosfat MPT por oluşumunu indüklerken, Mg⁺², ADP, düşük pH ve yüksek membran potansiyeli por oluşumunu inhibe etmektedir.

MPTP; dış membran proteini VDAC, iç membran proteini ANT, F_0F_1 ATP sentazın C alt ünitesi, matriks proteini siklofilin D (CyD) ve membranlar arası boşlukta bulunan *kreatin kinaz* gibi birçok proteinin dâhil olduğu bir multiprotein kompleksidir, bu proteinlerin etkileşimi sonucunda iç ve dış mitokondri membranını birbirine bağlayan bir por oluşur. İmmün baskılayıcı ilaç siklosporin A, CyD'ye bağlanarak por oluşumunu engeller (244).

MPTP oluşumu, Ca^{+2} bağımlı bir süreçtir (245). Ca^{+2} , MPTP oluşumunu birçok aşamada etkiler. Ca^{+2} 'nin mitokondrideki tek anyonik lipid bileşeni olan iç membrandaki kardiyolipine bağlanması sonucu membranın yapısı bozulur. Ayrıca Ca^{+2} , membran proteinlerindeki tiyol gruplarının reaktivitesini de değiştirir. Bu durum, oksidatif stres varlığında daha da şiddetlenmektedir.

MPTP iç membranın proton ve küçük iyonlara geçirgenliğinin artışı ile başlar, küçük molekül ağırlıklı proteinler ve karbonhidratların geçişiyle devam eder, en son ise yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin geçişi gerçekleşir. Son aşamada geri dönülmez mitokondriyel fonksiyon kayıpları oluşur (246). Geçirgenlikteki artış, mitokondriyel membran proteinlerinin tiyol gruplarının oksidasyonu ve çapraz bağlanmasıyla ilişkilidir. Bu durumda proteinlerde yapısal değişiklikler ve spesifik olmayan büyük porlar oluşur (247).

MPT porlarının açılmasıyla iç membran bütünlüğü ve dolayısıyla ATP sentezi bozulur. İç membran geçirgenliğinin artış *apoptoz indükleyici faktör* (AIF) ve sitokrom c'nin sitozole salınımına ve apoptotik sürecin indüksiyonuna neden olmaktadır. Eğer bu patolojik durum sınırlı sayıda mitokondride olursa hücrenin ATP ihtiyacı sağlıklı diğer hücreler tarafından sağlanırken, çok sayıda mitokondrinin etkilenmesi sonucu hücrenin ATP içeriğine bağlı olarak onkotik ya da apoptotik ölüm gerçekleşir (14, 183). Ayrıca, MPT por oluşumu olmaksızın Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinler aracılıklı dış membran geçirgenliği artabilmektedir (248, 249).

MPT porlarının fizyolojik rollerinin olup olmadığı tartışmalı bir konudur. Eldrod ve ark. 2010 yılında, MPT porlarının kısa süreli açılmasıyla matrikte Ca^{+2} seviyesinin kontrol edildiğini ve böylece mitokondri homeostazının sağlanıyor olabileceğini ileri sürmüşlerdir (250) ancak bu hipotez hala soru işaretleri barındırmaktadır (251, 252).

Son yıllarda birçok ilacın MPTP indüksiyonundaki rolü farklı çalışmalarla incelenmiştir. İzole sıçan mitokondrileri kullanılarak yapılan bir çalışmada 12.5-100 μ M diklofenakın MPTP oluşumuna etkisi araştırılmıştır. Diklofenakın doza bağımlı bir şekilde mitokondriyel matriks hacminde artışa neden olduğu, membran potansiyelini düşürdüğü, kenetsizleme yoluyla oksidatif fosforilasyonu bozduğu gösterilmiştir. Diklofenakın neden

olduğu idyosinkratik hepatotoksisitede MPT por indüksiyonunun rolü olduğu ileri sürülmüştür (253).

2016 yılında Tatematsu ve ark., NSAI ilaçların mitokondriyel toksisite mekanizmalarını araştırmışlardır. Mefenamik asit, flufenamik asit, meklofenamik asit ve tolfenamik asitin 200 µM dozlarıyla izole sıçan karaciğer mitokondriyel matriks hacminde önemli derecede artış olduğu, aynı dozda diklofenakın neden olduğu toksisitenin ise diğer ilaçlara göre daha az olduğu gösterilmiştir (254). Bir başka çalışmada ise izole sıçan karaciğer mitokondrilerinde 2.5-20 µM mefenamik asit uygulamasıyla bile MPTP indüksiyonu olduğu gözlenmiştir (255).

Valproik asite bağlı mitokondriyel toksisite mekanizmalarının araştırıldığı bir makalede ilacın 25 ve 50 µM dozlarının izole sıçan karaciğer mitokondrisinde MPT por oluşumunu ve membran potansiyelini değiştirmezken, 100 ve 200 µM dozların oksidatif strese, mitokondriyel matriksin şişmesine, membran potansiyelinde düşüşe, sitokrom c salınımına neden olduğu gösterilmiştir. Valproik asite bağlı MPTP indüksiyonunun, güçlü antioksidan özellikteki bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ile önlenmesi, MPTP oluşumu mekanizmasının oksidatif stres olduğunu düşündürmüştür (256). Bir başka çalışmada 37.5 – 300 µM salisilat ve valproik asitin sıçan karaciğer mitokondrisinde MPTP indüksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (257). İnsan primer hepatositleriyle yapılan bir çalışmada ise MPTP oluşumunun göstergesi olarak *kaspaz 3* aktiviteleri ölçülmüştür. 250, 350 ve 450 µM valproik asitin *kaspaz 3* salınımını kontrole göre sırasıyla 2, 4 ve 5 kat arttırdığı gözlenmiştir (258).

Parasetamolün hepatotoksisite mekanizmasında mitokondriyel toksisitenin önemli olduğu bilinmektedir. MPTP indüksiyonunun nekrotik hücre ölümü ve devamında hepatotoksisiteye neden olabileceği ileri sürülmüştür. Bir çalışmada farelere intraperitoneal (i.p.) 350 mg/kg dozda parasetamol verilmiş ve 8 saat sonunda ilaca bağlı MPTP indüksiyonu gösterilmiştir. Aynı çalışmada fare karaciğerinden izole edilen mitokondriler ile de çalışılmıştır. İzole mitokondriler 25 veya 50 µM *N*-asetil-*p*-benzokinonimin (NAPQI) ile inkübe edilmiş ve MPTP indüksiyonunun göstergesi olan 540 nm dalga boyunda absorbanstaki düşüşlerin sırasıyla 0.05 ve 0.1 birim olduğu gösterilmiştir. Bu değerler ilaç uygulanmayan kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. GSH depolarının tükenmesi sonucu oluşan oksidatif stresin MPTP indüksiyonuna ve membran potansiyelindeki düşüşe neden olduğu yorumu yapılmıştır (259).

Ciddi hepatotoksisiteye neden olduğu için klinik kullanımdan geri çekilen nimesulidin toksisite mekanizması, kenetsizleyici etki ve MPTP indüksiyonudur (260, 261). Benzer

şekilde geri çekilen troglitazon ve gemfibrozilin de toksisite mekanizmaları arasında MPT por indüksiyonu yer almaktadır (194, 262).

2.3.6. Mitokondriyel DNA Replikasyon ya da Translasyonunun Bozulması

Mitokondriyel DNA (mtDNA) replikasyonunun ya da protein sentezinin inhibisyonu, mitokondriyel toksisiteye neden olmaktadır. Oksidatif fosforilasyonda görevli 13 protein, mtDNA tarafından kodlanmaktadır. Bu nedenle mtDNA replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonundaki değişiklikler hücresel solunumun bozulmasına, oksidatif stresin indüksiyonuna, mitokondriyel membran hasarına ve onkotik ya da apoptotik ölüme yol açar (263,264). mtDNA kopya sayısının % 20-40 oranında azalması sonucu hücrelerde ciddi mitokondriyel fonksiyon bozuklukları oluşmaktadır (14). Ayrıca mtDNA histon proteinleri içermediği ve onarım mekanizmaları yetersiz olduğu için nükleer DNA'ya göre oksidatif hasara daha fazla duyarlıdır. Bu nedenle mtDNA, mitokondriyel oksidatif stres indüksiyonuna yol açan ilaçların hedefidir (265).

HIV ya da hepatit B tedavisinde kullanılan nükleozid analogları, DNA sentezini bozarlar. Zalsitabin, abakavir, stavudin gibi *nükleozid-revers transkriptaz* inhibitörleri, *DNA polimeraz*'ı inhibe ederek mtDNA replikasyonunu engellerler; mtDNA tarafından kodlanan 13 polipeptidin ekspresyon düzeyleri azalır (266) ve oksidatif fosforilasyon bozulur. Bu *in vitro* veriler, ilaçların klinik kullanımı sırasında görülen semptomlarla desteklenmektedir. Bu ilaçları kullanan hastalarda periferik nöropati, kardiyomiyopati, hepatik steatozis, laktik asidoz, tip II diyabet ve insülin direnci görülmektedir (234).

Bakteriyel ve mitokondriyel ribozomların yapısal benzerliği nedeniyle prokaryotik ribozomları hedefleyen kloramfenikol, tetrasiklinler, aminoglikozidler, makrolidler gibi antibakteriyel ilaçlar mitokondriyel ribozomları da etkileyerek mitokondriyel protein sentezini inhibe edebilirler (267-269).

Le Guillou ve ark. 2018 yılında yayımladıkları bir çalışmada, HepaRG hücre hattının hepatotoksik yan etkisi olan imipramin ve ritonavir ile inkübasyonu sonucu mitokondriyel translasyonun azaldığını ancak mtDNA seviyelerinde değişiklik olmadığını gözlemişlerdir (270).

2.3.7. Mitokondriyel DNA Metilasyon Düzeylerinin Değişmesi

DNA metilasyonu, epigenetik DNA modifikasyonu mekanizmalarından birisidir. Sitozin (C) bazının 5. karbonuna bir metil grubu (-CH₃) takılması sonucu 5-metil sitozin (5-mC) yapısının oluşmasıyla karakterize edilir. DNA metilasyonu bazı genlerin ifade edilmesi, bazı genlerin ise susması, yani protein kodlamamasıyla sonuçlanır (271, 272). Metilasyon gen regülasyonunda, hasarlı genlerin ortadan kaldırılmasında, kadınlarda X kromozomunun susturulmasında rol oynar (273). Fizyolojik metilasyon düzeyleri değişirse (hiper ya da hipometilasyon) hayati öneme sahip genlerin susmasıyla kritik proteinlerin ekspresyonu azalabilir ya da susması gereken genler aktive olabilir. Bazı otoimmün hastalıklar, kanser ve nörolojik hastalıkların patojenezinde DNA metilasyon düzeylerinde anormal değişimlerin rol oynadığı ileri sürülmektedir (274, 275).

Mitokondriyel DNA'da histon proteinlerinin olmaması ve *metilaz*ların bulunup bulunmadığının tam bilinmemesinden dolayı mtDNA'nın metilasyona maruz kalmayabileceği ileri sürülmüştür (276). Ancak son yıllarda sadece nükleer DNA'nın değil, mtDNA'nın da epigenetik modifikasyonlara uğradığına ilişkin veriler elde edilmiştir (277). Örneğin; 2011 yılında mtDNA'da 5-mC tespit edilmiştir (278). Yine aynı yıl Shock ve Chestnut tarafından mitokondrilerde metiltransferaz enziminin varlığı gösterilmiş (270, 280) ve son yıllarda yapılan çalışmalarda "mitoepigenetik" kavramı ortaya atılmıştır (281). Nükleer DNA'da olduğu gibi mtDNA'nın metilasyon düzeylerindeki değişikliklerin nedeni birtakım hastalıklar, ilaç ve diğer ksenobiyotiklere maruz kalma, oksidatif stres ve yaşlanma olabilir (282-284).

Günümüzde birçok ilacın nükleer DNA'da metilasyonu etkilediği bilinmektedir (285, 286). Bu ilaçlar arasında bulunan *histon deasetilaz* inhibitörü valproik asitin mtDNA metilasyonuna etkisinin araştırıldığı çalışmada, ilacın nükleer DNA'da olduğu gibi mtDNA'da da hipometilasyona neden olduğu gösterilmiştir (287).

Mitokondriyel DNA metilasyonu mitokondriyel gen ekspresyonunu, mitokondri dinamiğini ve işlevlerini etkilemektedir. Herhangi bir epigenetik modifikasyon, ETC proteinlerinin sentezinde dolayısıyla enerji üretimde değişikliklere neden olabilmektedir. Epigenetik mekanizmalar ve sonuçları nispeten yeni bir çalışma alanıdır ve nükleer DNA'da olduğu gibi mtDNA için de aydınlatılması gereken süreçlerdir (288).

2.4. Mitokondriyel İşlevlerin Analizi

Günümüzde birçok ilacın toksisite mekanizmasında mitokondriyel işlev kaybının rol oynadığı bilinmektedir. İlaçların ya da ilaç adaylarının mitokondriyel toksisite profilinin tam olarak ortaya konulması güvenilir ilaçların üretilmesine, ilaç endüstrisindeki maliyetlerin azaltılmasına ve hasta sağlığının korunmasına katkı sağlayabilir.

Kimyasal maddelerin mitokondriyel toksisitesi izole hayvan mitokondrisi (289), insan hücre hatları (290), 3 boyutlu doku modelleri gibi farklı *in vitro*, *in vivo* ya da *in silico* modeller kullanılarak araştırılabilmektedir. Yapılacak olan çalışmalar tasarlanırken doğru test parametresi ve tekniği seçilmelidir. Günümüzde kullanılan mitokondriyel toksisite belirleme yöntemleri aşağıdaki metinde ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

2.4.1. Mitokondriyel Oksijen Tüketim Hızının Ölçülmesi

Doku, hücre kültürü ya da izole mitokondride oksijen tüketim hızındaki (oxygen consumption rate; OCR) değişiklikler mitokondri işlevlerinin dolayısıyla ilaç toksisitesinin bir göstergesidir. Bu amaçla kullanılan ilk yöntem, çözünmüş oksijen miktarının ölçülmesini sağlayan oksijene duyarlı, Leland C. Clark tarafından 1953 yılında geliştirilen *Clark elektrotu*'dur. Elektrodun katodu platin ya da altın, anodu ise gümüş metalinden oluşmaktadır. Elektriksel potansiyel uygulandığında anottaki gümüş (Ag), gümüş klorüre (AgCl) okside olurken, ortamdaki O₂, katotta OH⁻ iyonuna redüklenir. Katot ve anottaki elektron üretimi ya da kullanımı 1 µA'lık akım oluşmasına yol açar. Oluşan akımın şiddeti örnekteki çözünmüş oksijen miktarını göstermektedir. Son yıllarda birçok ticari firma tarafından bu tarz elektrotlar geliştirilmiştir (291).

İzole mitokondrilerde (291), homojenize doku örneklerinde (292, 293) ve intakt hücrelerde (294) oksijen tüketiminin *Clark elektrodu* kullanılmasıyla belirlendiği birçok çalışma bulunmaktadır. Az miktarda örnek gereksinimi, deney sırasında sıcaklığın sabit tutulabilmesi ve kullanılan bazik boyalar ile mitokondriyel diğer parametrelerin (H₂O₂ seviyesi, membran potansiyeli vb.) ölçülebilmesi yöntemin avantajları arasındadır (291, 295).

Solunumun farklı evrelerinde mitokondriyel solunum hızı ölçülerek kimyasalların toksisite mekanizması detaylı olarak araştırılabilir. Ortamda substrat yokken mitokondrilerdeki oksijen tüketim hızının ölçülmesi *Evre I* düzeyindeki solunumu gösterir, bu evrede OCR çok düşük seviyededir. *Evre II*'de ortama substratlar eklenir ve OCR, *Evre I*'e göre artmasına rağmen hala düşüktür. Bu evrede iç membrandaki proton akışından dolayı

membran potansiyeli azalır. *Evre III*, fosforilasyon aşamasıdır. Fosfat iyonu (Pi) varlığında ortama ADP eklenir ve ATP üretilir, membran potansiyeli tekrar artar. Tüm ADP'nin ATP'ye dönüşümü ise *Evre IV*'dedir. Bu aşamada solunum azalır ve OCR, *Evre II* aşamasına döner. *Evre III* ve *IV* arasındaki OCR oranı, mitokondriyel işlev bozukluğunun göstergesidir. Örneğin, *Kompleks V* inhibitörü oligomisin maruziyeti sonucunda *Evre III*'ün OCR düzeyi, *Evre IV*'le eşdeğerdir. Test edilen kimyasal maddelerin farklı evrelere etkilerinin tespit edilmesiyle kimyasalların ETC komplekslerine etkisi ve dolayısıyla mitokondriyel solunuma ilişkin toksisite mekanizmaları araştırılabilir (289). Kesin ve güvenilir bir yöntem olmasına rağmen *Clark elektrodunun* en önemli dezavantajı yöntemin zaman alıcı olmasıdır.

Son yıllarda *Clark elektrodu* kullanımından daha hızlı, verimli ve güvenilir yöntemler geliştirilmiştir. Bu tekniklerden birisi Luxcel Biosciences tarafından üretilen MitoXpress®Xtra oksijen kullanımı ölçüm kitidir. MitoXpress®Xtra floresan bir boyadır, izole mitokondri ya da hücre kültürleriyle çalışılabilmektedir. Ortamdaki ekstraselüler oksijen miktarı tespit edilerek OCR hesaplanır. MitoXpress®Xtra boyasının eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 380 ve 535 nm'dir. Time resolved fluorescence (TRF detection) ölçümü ile gerçekleştirilen yöntem oldukça duyarlıdır (296). Analiz sırasında mitokondrilerin *Evre II* ya da *Evre III*'de tutulması sağlanır. Kullanılan mineral yağ ile kuyucuklardaki reaksiyon ortamı üzerinde ince bir tabaka oluşturularak çevresel oksijenin difüzyonu önlenir. Son yıllarda hücre içi oksijen konsantrasyonunun ölçülmesini sağlayan başka boyalar da geliştirilmiştir (297, 298). Kit yardımıyla gerçekleştirilen dolaylı ve doğrudan ölçümler hızlıdır, ancak doğruluk deneysel koşullardan çok kolay etkilenebilmektedir (190).

Bir diğer yöntem ise hem OCR hem de ekstraselüler asidifikasyon oranının (ECAR) ölçüldüğü, "The Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer" sistemidir. İzole mitokondri (299, 300), hücre hatları ve 3D hücre kültürünün kullanıldığı çalışmalarda bu yöntemin uygulanmasıyla bazal respirasyon düzeyi, ATP sentezine bağlı solunum kapasitesi ve mitokondri dışı solunum tayin edilerek hücre ya da mitokondrilerin *biyoenerjetik sağlık indeksi* (BHI) hesaplanabilir (301). Hücresel ve mitokondriyel metabolizmanın tam olarak araştırılabilmesine olanak sağlayan, yüksek verimli bu tekniğin en önemli dezavantajı ise maliyetinin fazla olmasıdır.

2.4.2. Elektron Transport Zinciri Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi

Oksijen tüketim oranındaki herhangi bir önemli değişiklik mitokondriyel solunumda bozulma olduğunu göstermesine karşın moleküler düzeyde etkilenen yer hakkında bilgi

vermez. ETC kompleks proteinleri kimyasal maddelerin önemli toksisite hedefleri arasındadır ve bu kompleks proteinlerinin aktivitelerinin ölçülmesini sağlayan kolorimetrik ya da florimetrik temelli yöntemler geliştirilmiştir (302).

NADH varlığında 2,6-diklorofenolindofenol (DCPIP) absorbandsındaki düşüşle *Kompleks I*, desilubikinon (DubH2) varlığında okside sitokrom c absorbandsındaki artışla *Kompleks III*, indirgenmiş sitokrom c absorbandsındaki azalışla *Kompleks IV* aktivitesi ölçülebilmektedir. Ancak bu spektrofotometrik ölçümler pH, ozmolarite, substrat konsantrasyonu ve hücre bileşiminden çok kolay etkilenir ve kenetsizlenme mekanizmasını ortaya koyamaz (303).

Son yıllarda enzim aktivitesinin çok daha hassas ölçüldüğü yöntemler geliştirilmiştir. MitoSciences tarafından geliştirilen yöntemde aktivitesi araştırılacak olan enzim, immünolojik olarak yakalanır. Spesifik substratının uygulanması sonucu substrat ya da ürünün absorbands değişiminden enzim aktivitesi belirlenir. Çok daha hassas ve spesifik bir analiz imkanı sağlayan bu yöntemde eş zamanlı olarak OCR de saptanabilir (304-306).

2.4.3. Mitokondriyel ATP Miktarlarının Ölçülmesi

Hücrenin ATP konsantrasyonunda değişikliklerin ölçülmesi hücrenin enerji metabolizması ve kimyasalların neden olduğu mitokondriyel toksisite mekanizmaları hakkında önemli bilgiler verir. Oksidatif fosforilasyon hasarı ya da kenetsizleyici etkiyi gösteren en önemli parametrelerden biri ATP/ADP oranıdır (307). Hücrelerdeki ya da izole mitokondrideki ATP düzeyinin ölçülmesi için lüminesans, floresans ya da HPLC temelli yöntemler geliştirilmiştir (308).

Biyoluminesans yöntemde substrat lusiferin; ATP ve magnezyum varlığında *lusiferaz* enzimiyle lusiferil adenilat kompleksine dönüşür. Bu kompleksin oksidasyonu sonucu oksilusiferin oluşur, oksilusiferinin uyarılmış halden stabil hale geçişi sırasında açığa çıkan enerji ışınım şeklinde gözlenir (309, 310).

Biyolojik örneklerin ATP, ADP ve AMP içerikleri polarite farklılıklarına bağlı olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile de tayin edilebilir (311). Hassasiyeti yüksek, ancak seçiciliği düşük olan bioluminesans yöntemlerin yanı sıra hızlı ve doğru analiz imkanı sağlayan, ortamdaki tüm adenin nükleotidlere ait piklerin gözlenebildiği HPLC temelli yöntemler sıklıkla tercih edilmektedir (311, 312).

2.4.4. Reaktif Oksijen Türleri Miktarının Ölçülmesi

Mitokondriyel oksidatif stresin ve ROT seviyelerinin ölçülmesini sağlayan oksidasyona duyarlı ya da redoks özelliği bulunmayan birçok floresan madde geliştirilmiştir (313). 2',7'-diklorodihidroflorosein (DCFH₂); H₂O₂ (314) ve dihidrodamin ONOO⁻ radikali (315), dihidroetidium (DHE); hücre sel süperoksit radikali ve MitoSOX ise mitokondriyel süperoksit radikali (316) düzeylerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Ayrıca, HyPer (yeşil floresan protein) veya Orp1-roGFP2 (redoks duyarlı yeşil floresan protein) (317) kullanılarak H₂O₂, düzeyi ölçülebilirken, cpYFP (sirküler sarı floresan protein) ile de süperoksit radikali miktarları belirlenebilir. Ancak bu proteinler birçok izole hücre sel kompartmanda oksidatif stresin belirlenmesinde kullanılmasına rağmen ortam pH'sından çok kolay etkilendikleri için ölçümlerin doğruluğu tartışmalıdır (318).

2.4.5. Mitokondriyel Transmembran Elektrik Potansiyelinin Ölçülmesi

Mitokondrilerin hücre canlılığı için önemli olan işlevlerini sürdürebilmesi için *transmembran elektrokimyasal potansiyeli*'nin ($\Delta\psi_m$) korunması gereklidir (319). İç membrandaki membranlar arası boşluğa doğru proton akışı, membranlar arası boşluğun daha katyonik olmasına ve mitokondriyel pH gradiyentinin (ΔpH_m) oluşumuna neden olmaktadır. Nernst eşitliğine göre protonların hareket edici gücü (Δp), mitokondriyel pH gradiyentine ve elektrokimyasal transmembran potansiyeline bağlıdır ($\Delta p(mV)$; $37^\circ C = \Delta\psi_m - 60\Delta pH_m$) (320). ΔpH_m 'ın saptanmasındaki güçlük nedeniyle genellikle birçok yöntem, $\Delta\psi_m$ belirlenmesi üzerine kurulmuştur (321).

Floresan lipofilik boyalar, $\Delta\psi_m$ göstergesi olarak kullanılmaktadır. Bu maddeler, membran potansiyeline bağlı olarak mitokondriyel membranları aşar ve matrikste birikirler. Matriks negatif yüklüken, yani mitokondriler polarize iken boya birikimi meydana gelir (322, 323). Floresans şiddeti konfokal mikroskop, floresans spektrometrisi ya da flow sitometrisi ile ölçülür (321).

En çok kullanılan lipofilik katyonik boyalar kırmızı floresan; tetrametilrodamin metil (TMRM) (324) ve etil (TMRE) esteri (325), yeşil floresan boya; rodamin 123 (Rhod123) (326), 3,3'-dihekzilokarbosiyanin iyodür (DiOC6) ve kırmızı/yeşil floresan oranının ölçüldüğü 5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol karbosiyanin iyodür'dür (JC-1) (327).

Hücreler test maddesine maruz bırakıldıktan sonra boya eklenir ve floresans şiddeti ölçülür. Boyalar çok yüksek ya da çok düşük konsantrasyonlarda kullanılabilir. Yüksek

konsantrasyonda boya kullanımı sırasında, mitokondri depolarize durumda ise yani membran potansiyeli hasarı varsa boya sitozolde kalır ve floresans şiddeti yüksek olur. Mitokondriler polarize durumda iken boya matrikste birikir, agregat oluşur ve floresans şiddeti azalır.

Düşük konsantrasyonda kullanılan boyalar mitokondri içinde agregat oluşturmaz. Bu nedenle depolarizasyon sırasında az miktarda boya matrikste birikerek düşük floresans oluşurken hiperpolarize durumda ise floresans şiddeti artar (323).

2.4.6. MPTP Oluşumunun Ölçülmesi

MPT porlarının oluşması ve bu oluşumun indüksiyonunun araştırılması için kobalt-kalsein yöntemi (328), mitokondriyel membran depolarizasyonunun belirlenmesi (329) ve mitokondriyel şişmenin tayini (330) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Kobalt-kalsein tekniği, hücrelerde MPTP düzeylerinin doğrudan ölçülmesini sağlayan bir yöntemdir. Öncelikle hücreler membran geçirgen boya olan kalsein-AM ile inkübe edilir. Kalsein-AM mitokondri ve diğer hücresel kompartmanlara girer ve buralarda *esteraz* enzimleriyle kalsein serbestleşir. Eklenen Co^{+2} , sitozoldeki kalsein floresansının azalmasına neden olurken, mitokondriyel kalseini etkilemez. MPT porları açılırsa kalsein mitokondriyel matriksten salınır, Co^{+2} mitokondriye girer ve floresans şiddeti düşer (331, 332).

Bir diğer yöntem ise *mitokondriyel membran potansiyelinin* ($\Delta\psi_m$) ölçülmesidir. MPTP açıldığı zaman mitokondrilerdeki iç membran boyunca oluşan proton gradiyenti bozulur ve $\Delta\psi_m$ düşer. TMRM(E), Rhod123, JC-1 ya da DiOC6 gibi boyalar yardımıyla $\Delta\psi_m$ belirlenmektedir. Porların açılması, bu boyaların floresans şiddetinde azalışa neden olmaktadır (329).

Kullanılan son yöntem ise sadece izole mitokondrilerde uygulanabilen mitokondriyel matriks hacminin ölçülmesine dayalı spektrofotometrik yöntemdir. MPTP oluşması sonucunda ozmotik denge gereği matrikse yüksek miktarda su girer. 540 nm'deki absorbanstaki azalış matriks hacmindeki artışın göstergesidir (334, 335). MPTP indüksiyonu sonucu 1mL hacimde bulunan 0.2–0.5 mg mitokondriyel protein için absorbansta 0.2–0.4 birimlik düşüş meydana gelmektedir. Mitokondriyel inkübasyon ortamlarına Ca^{+2} eklenmesi ise absorbansta daha keskin düşüslere neden olmakta, etkinin daha net bir şekilde izlenmesini sağlamaktadır (336).

2.4.7. Mitokondriyel Kalsiyum Düzeyinin Ölçülmesi

Mitokondriyel Ca^{+2} seviyesi *in vitro* (izole mitokondri ya da hücre kültürü), *in situ* (doku kesitleri) ya da *in vivo* olarak ölçülebilmektedir (337).

Ca^{+2} göstergesi olan floresans özellikli Ca^{+2} duyarlı boyalar (Rhod-2AM gibi), lüminesans ve floresans özellikli proteinler (GFP) kullanılarak mitokondriyel Ca^{+2} düzeyi ölçülebilir (338).

Ayrıca, mitokondriyel Ca^{+2} seviyesinin belirlenmesinde Fura-2AM, Fluo-3 ve Fluo-4 gibi boyalar da kullanılabilmesine rağmen bu maddeler mitokondriye özgü olmamaları nedeniyle tercih edilmemektedirler (339).

2.4.8. Mitokondriyel DNA Miktarının Ölçülmesi

Hücrelerdeki mitokondriyel genom kopya sayısının belirlenmesi ve mitokondriyel genom sayısının nükleer genoma bölünmesiyle elde edilen oran (Mt/N), mitokondri işlevlerinin önemli bir göstergedir (340, 341). Redoks dengesinin bozulması ve hücre sel sinyal yollarında oluşan değişiklikler gibi nedenlerle hücrelerde oksidatif stres oluşur, mtDNA ve protein hasarları meydana gelir ve Mt/N oranı azalır. Hasarlı mtDNA'ların hücrede birikimi sonucu inflamatuvar yanıt indüklenir, hücre canlılığının kaybına yol açan süreçler başlayabilir.

mtDNA miktarı kolaylıkla saptanabilen mitokondriyel stresin en önemli biyogöstergelerinden biridir. mtDNA miktarındaki değişikliklerin birçok hastalık (diyabet, kanser vb.), fertilité problemleri, toksik bileşiklere maruz kalmakla ilişkili olduğu gözlenmiştir (342). Birçok hastalığın izlenmesinde, ilaç geliştirme ve toksisite çalışmalarında mtDNA miktarı ve Mt/N oranı hibridizasyon (343), realtime (RT-PCR) (344-346) ya da dijital -polymerase chain reaction (PCR) (347) teknikleriyle belirlenmektedir. *In vitro* hücre hatları, *in vivo* hayvan deneyleri ya da klinikte hasta biyolojik örnekleri kullanılarak mtDNA miktarları saptanabilir (308).

2.5. Ksenobiyotik Biyotransformasyonu

Organizmanın kendi ürettiği endojen maddelerin haricinde dış fiziksel ortamdan maruz kaldığı ilaçlar ve diğer kimyasal maddeler “ksenobiyotik” olarak adlandırılır (xenobiotic; biyolojik yapı tarafından bilinmeyen). Ksenobiyotikler çeşitli yollarla vücuda

girdikten sonra başta kan dolaşımı aracılığı ile farklı organlara dağılırlar ve farklı mekanizmalarla elimine edilmeye çalışılırlar. Ksenobiyotikler, biyotransformasyon reaksiyonlarıyla absorpsiyona uygun lipofilik formdan daha hidrofilik hale getirilerek çeşitli itrah yollarından vücuttan uzaklaştırılırlar. İlaçların biyotransformasyonu sonucu farmakolojik ya da toksikolojik etkisinde artış ya da azalış meydana gelir. Ksenobiyotikleri metabolize eden enzimler en fazla karaciğer ve intestinal dokuda olmakla birlikte hemen hemen tüm dokularda bulunmaktadır. Biyotransformasyon reaksiyonları ve sonuçları genetik polimorfizm, yaş, cinsiyet, hastalıklar, kullanılan ilaçlar, etkileşimler gibi birçok faktör nedeniyle bireyler arasında büyük değişkenlikler göstermektedir (348, 349).

Biyotransformasyon reaksiyonları faz I, II ve III olmak üzere üç başlık altında incelenir. Faz I *P450 monooksijenazlar* ve diğer birçok enzim aracılığıyla gerçekleşen oksidasyon, redüksiyon, hidroliz ve dekarboksilasyon reaksiyonlarıdır. Faz I reaksiyonlarında genellikle moleküle bir fonksiyonel grup (-OH, -SH, -COOH, -NH₂) eklenir ya da çıkarılır. Bu reaksiyonlar çoğunlukla bileşiği faz II reaksiyonlarına hazırlar. Oksidasyon, molekülün elektron kaybetmesidir. Bir oksijenin yapıya girmesi, yani oksijenasyon, yapıdan bir hidrojenin ayrılması (dehidrojenasyon) ya da moleküle elektron transferi sonucu gerçekleşmektedir. Redüksiyon reaksiyonları, molekülün elektron kazandığı reaksiyonlardır. Bazı metaller ve azo, nitro, karbonil, disülfit, sülfoksit, N-oksit, kinon, aldehit, keton grubu taşıyan ksenobiyotikler, enzimatik ya da nonenzimatik olarak redüksiyon reaksiyonlarına uğrarlar. GSH, FAD, flavin mononükleotid (FMN), nikotinadenin dinükleotid fosfat (NADP) gibi indirgen ajanlarla etkileşim sonucu *alkol dehidrojenaz*, *aldehit dehidrojenaz*, P450 gibi enzimlerin katalizlediği redüksiyon reaksiyonları gerçekleşir. Moleküle su eklenmesiyle iki ya da daha fazla sayıda yapıya bölünmesi ise hidrolizdir. Yapıca büyük olan ester, amin, hidrazin ve karbamatlar, genellikle hidroliz reaksiyonlarıyla biyotransformasyona uğrarlar (350).

Faz II konjugasyon reaksiyonlarında ise ilaç ya da metabolitinin fonksiyonel grupları, bazı endojen moleküllerle reaksiyona girer. Molekülün kendisi ya da faz I reaksiyonları sonucu oluşan metaboliti, faz II reaksiyonuna uğrayabilir. Glukronidasyon, sülfatasyon, asetilasyon, metilasyon, glutatyon ve amino asit konjugasyonu faz II reaksiyonlarıdır. Metilasyon ve asetilasyon hariç konjugasyon reaksiyonları sonucu molekülün hidrofilik özelliğinde büyük ölçüde artış olur ve molekül vücuttan atılmaya hazır hale getirilir. Glukronidasyon dışındaki konjugasyon reaksiyonları büyük oranda çözünür formda (mikrozomal olmayan) enzimlerle gerçekleşir.

Fenoller, karboksilik asitler, primer ve sekonder alifatik amin ya da alkollerin elektronca zengin nükleofilik heteroatomları (O, N, S) glukronidasyona uğrarlar.

Reaksiyonda substrat olarak üridindifosfat-glukronik asit (UDP-glukronik asit) kullanılır ve reaksiyonu *UDP-glukronil transferaz* (UGT) enzimi katalize eder. Glukronidasyon sonucu bileşiğin suda çözünürlüğü artar ve itrah yollarından atımı kolaylaşır (351).

Sülfat konjugasyonu, birçok endojen madde ve ksenobiyotikten *sülfotransferaz* enzimleri aracılığıyla suda çözünürlüğü yüksek sülfirik asit esterleri oluşumudur. Sülfat konjugatları başlıca idrarla atılır. Genellikle detoksifikasyonla sonuçlanan sülfasyon; aromatik aminler ve metillenmiş aromatik hidrokarbonların biyoaktivasyonunda rol almaktadır (351).

Metilasyon, nispeten daha minör bir biyotransformasyon yolağıdır. Diğer konjugasyon reaksiyonlarının aksine metilasyon sonucu bileşiklerin suda çözünürlüğü azalır, toksisitede artış görülebilir. *S-adenozilmetiyonin* (SAM), reaksiyon için gerekli substrattır. SAM'da sülfonyum iyonuna bağlı metil grubu bileşiğin elektronca zengin heteroatomlarına aktarılır. Fenoller ve katekollerin metabolizmasında *O*-metilasyon, sülfhidril grubu içeren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda *S*-metilasyon ve örneğin norepinefrinden epinefrin oluşumunda ise *N*-metilasyon rol oynar (350).

N-asetilasyon, aromatik amin veya hidrazin grubu taşıyan ksenobiyotiklerin ana biyotransformasyon yolağıdır. *N*-asetilasyon reaksiyonlarında, amin grubu iyonize olmayan bir grupta maskelenir, bu nedenle bileşiğin sudaki çözünürlüğü azalır. Endojen substrat olarak *asetil-koenzim A* kullanılır. *N-asetiltransferaz* enzimi reaksiyondan sorumludur ve bu enzim polimorfik bir enzimdir. Bu nedenle yavaş ya da hızlı asetilleyci bireylerde ksenobiyotiklerin farmakolojik ve toksikolojik sonuçları değişmektedir (350).

Alifatik, aromatik, heteroaromatik, arilasetik asit gibi karboksilik asit grubu taşıyan ksenobiyotikler glisin, glutamin, taurin aminoasitlerinin amino grubuyla konjugasyona uğrarlar. Aromatik hidroksilamin grubu içeren ksenobiyotikler ise serin ya da prolin gibi aminoasitlerin karboksilik asit gruplarıyla konjuge olurlar (350).

Glutasyon konjugasyonu; elektrofilik, hidrofobik maddelerin ve reaktif oksijen türlerinin nükleofilik kofaktör glutasyonla *glutasyon S-transferaz* enzimleri aracılı ya da spontan konjugasyonudur. Glutasyon; glisin, sistein ve glutamik asitten oluşan atipik bir tripeptittir. Karaciğerde mM, karaciğer dışı dokularda ise nM düzeylerde bulunur.

Faz I ve faz II reaksiyonları sonucu daha hidrofilik ve daha az toksik hale gelen konjugatlar, konsantrasyon gradiyentine karşı hücre dışına doğru hareket edip kapiller dolaşım ile atılım organlarına doğru ilerlerler. Faz III reaksiyonları bu süreçte konjugatların transporter proteinlerle yer değiştirmesi ve ileri biyotransformasyona uğramasıdır,

biyoaktivasyonla da sonuçlanabilmektedir. Faz III reaksiyonlarının substratları büyük çoğunlukla faz I ve faz II reaksiyonlarının metabolitleridir (350).

2.5.1. Sitokrom P450 Enzimleri

Sitokrom P450 enzim ailesi, endojen bileşiklerin ve ksenobiyotiklerin oksidatif metabolizmasında rol oynayan “*hem-tiolat*” enzimleridir. Bugüne kadar insanlarda 57 farklı CYP450 enzimi tanımlanmış, bu enzimlerden 41’i fonksiyoneldir (352). İnsan nükleer DNA’sında 57 fonksiyonel gen ve 58 psödogen tarafından kodlanan P450 enzim ailesi, aminoasit dizilerinin benzerliğine göre sınıflandırılır (353). Aile ismini belirten sayıyı (örneğin, 1, 2) alt aile numarası (1A, 2D) ve her bir izoenzimin kendine ait numarası (1A1, 2D6) takip eder (354). P450’ler 18 aile ve 44 alt aileden oluşan geniş bir enzim grubudur.

P450 enzimlerinde hem demiri, ferrik (Fe^{+3}) formda bulunmaktadır. Ferrik demirin ferröz (Fe^{+2}) hale indirgenmesiyle CYP450 enzimleri, oksijen (O_2) ya da karbonmonoksit (CO) gibi ligandları bağlayabilirler. CO ile enzimin +3 yüklü demir atomu arasındaki kompleksin λ_{max} değeri 450nm olduğu için bu enzimler “*P450*” olarak adlandırılmıştır (355).

Sitokrom P450 enzimleri bakteriyel, mikrozomal ve mitokondriyel olmak üzere üç grupta sınıflandırılabilirler. Bakteriyel ve mitokondriyel CYP450 sistemi, üç proteinden oluşmaktadır: 1) FAD içeren bir flavoprotein ya da nikotinamid-adenin dinükleotidin mikrozomal indirgenmiş formu; NADPH veya NADH bağımlı redüktaz, 2) demir-sülfürlü protein ve 3) CYP450. Ökaryotik P450 sistemi ise, hem FAD, hem de flavin mononükleotid (FMN) içeren bir flavoprotein olan *NADPH sitokromP450 redüktaz* ve CYP450’den oluşmaktadır. Enzimatik reaksiyon sırasında enzim, substrat ve moleküler oksijene doğrudan bağlanırken elektron kaynağı olan NADPH ya da NADH ile doğrudan bağlantısı yoktur. Bir flavoprotein olan *NADPH sitokrom P450 redüktaz* aracılığıyla NADPH’tan CYP450’lere elektron transferi gerçekleşir.

2.5.1.1. Mikrozomal CYP’ler

P450 enzim ailesinin büyük bir bölümünü oluşturan mikrozomal enzimler, düz ER zarına gömülü halde bulunmaktadırlar. P450 enzimleri NADPH’dan elektronlarını hem FAD, hem de FMN içeren bir flavoprotein olan *NADPH sitokrom P450 redüktaz* aracılığı ile almaktadır. CYP450 enzimleri gibi *NADPH sitokrom P450 redüktaz* enzimi de ER zarının sitoplazmaya bakan yüzüne gömülü halde bulunmaktadır (356). CYP450 enzimleri tüm

dokularda eksprese edilmelerine rağmen, karaciğer mikrozoamlarında en yüksek miktarda ve çeşitte bulunurlar. Karaciğer mikrozoamlarında en fazla bulunan izoenzimler; 3A4, 2C9, 2C8, 2E1 ve 1A2, daha az miktarda bulunanlar; 2A6, 2D6, 2B6, 2C19 ve 3A5, ana olarak ekstrahepatik dokularda bulunan izozimler ise 2J2, 1A1 ve 1B1'dir (350).

Bu enzim ailesinin ana görevi faz I monooksijenasyon reaksiyonlarını katalize etmektir. Monooksijenasyon reaksiyonlarında, oksijenin bir atomu substrata aktarılırken diğeri ise suya indirgenir. Enzimatik ürünler, *moleküler yeniden düzenlenme* nedeniyle alkol ve fenollerle kısıtlı değildir (357-360). P450 enzimleri daha az olmakla beraber redüksiyon reaksiyonlarını da (azo, nitro, *N*-oksit ve sülfoksit redüksiyonu, redüktif dehalojenizasyon) katalizleyebilmektedirler. CYP450 katalitik reaksiyonları daha çok ksenobiyotiğin toksik metabolitine biyoaktivasyonu, daha az miktarda ise detoksifikasyonu ile sonuçlanmaktadır (350).

Genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle, CYP450 enzim miktarları ve aktiviteleri bireyler arasında farklılık gösterebilmektedir. CYP450 enzim aktivitelerindeki azalma; enzimin sentezini ya da stabilitesini etkileyen genetik mutasyonlar, CYP450 enzimlerinin ekspresyonunu baskılayan çevresel faktörlere ya da enzimleri inaktive eden ksenobiyotiklere maruz kalma sonucunda olmaktadır. İlaç-ilaç etkileşimlerinin ana mekanizması enzim inhibisyonudur. CYP450 enzim aktivitesindeki artış; enzimlerin fazla miktarda ekspresyonuna neden olan gen dublikasyonları, kodlayıcı ya da promoter bölgedeki gen mutasyonları, enzimin degradasyonunu azaltan, sentezini veya aktivitesini arttıran ksenobiyotiklere maruz kalma gibi yollarla olabilir. CYP2D6, 2C19, 2C9, 2B6, 3A5 ve 2A6 enzimlerinde bireyler arasında genetik polimorfizme bağlı farklı farmakogenetik genotipler bulunmaktadır. CYP1A1, 1A2, 2C8, 2E1, 2J2, ve 3A4 enzimlerindeki polimorfizm ise daha nadirdir, bu nedenle daha az öngörülebilir. P450 inhibisyonu ya da indüksiyonunda en yaygın mekanizma ksenobiyotiklere maruz kalmadır. Birçok *in vitro* ve *in situ* çalışmada ksenobiyotik aracılıklı CYP450 enzim indüksiyonu araştırılmıştır. Tavşan karaciğer mikrozoamlarının katalizlediği *R*-varfarinin 10-hidroksilasyon reaksiyonu, kinidine maruz kalma sonucu 25 kat artış göstermiştir. İlaçlar, besinler, alkol ve sigara kullanımı, hastalıklar (diyabet, infeksiyon, inflamasyon, karaciğer, böbrek ve tiroid hastalıkları) gibi birçok faktör P450 seviyelerini ve aktivitesi etkilemektedir (361).

CYP450 enzimlerinin birçoğu endojen metabolizmada görevliken ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan aile sayısı sınırlıdır (362). CYP450 enzimlerinin günümüze kadar tanımlanan substrat sayısı 2000'dir ve bu kimyasal maddelerin % 68'i klinikte kullanılan ilaçlardır (308). CYP450 enzimleri, organizmadaki ana işlevlerine göre de sınıflandırılabilirler. Ksenobiyotik biyotransformasyonu, yağ asidi hidroksilasyonu ve

steroidojenezis, D vitamini metabolizması ve retinoik asit metabolizmasında görevli CYP'ler ve işlevleri henüz aydınlatılmamış olanlar olmak üzere 5 grupta incelenebilirler. Biyotransformasyon reaksiyonlarında katalizör rolü oynayan CYP450 enzimleri 1, 2 ve 3 gen ailesinin üyeleridir. Bir bileşiğin biyotransformasyonunda iki ya da daha çok CYP450 enzimi rol alabilir. Örneğin; parasetamolün reaktif metaboliti olan NAPQI'a biyoaktivasyonu CYP1A2, CYP2E1 ve CYP3A4 enzimleri tarafından katalizlenebilmektedir. Ayrıca bir enzim aynı ilacın iki ya da daha fazla metabolik yolağında görev alabilir. Kinidin biyotransformasyon yolağındaki CYP3A4 aracılıklı 3-hidroksilasyon ve *N*-oksijenizasyon reaksiyonu, metoksifenaminin CYP2D6 ile *O*-demetilasyonu ve 5-hidroksilasyonu bu duruma örnek olarak verilebilir.

İlaçların biyotransformasyonunda önemli rolleri olan CYP450 enzimleri aşağıda açıklanmıştır.

CYP1A2. CYP1A ailesi, 1A1 ve 1A2 olmak üzere iki enzimden oluşmaktadır. CYP1A1 karaciğerde az miktarda eksprese edilirken akciğer, plesanta ve lenfositlerde önemli miktarda bulunmaktadır. CYP1A2 ise ana olarak karaciğerde bulunur. Bu enzimler farklı kimyasal grupların bağlı olduğu aromatik halkaya sahip molekülleri biyotransforme ederler. Polisiklik aromatik hidrokarbonların metabolizmasında görev yapan CYP1A enzimleri (363) aynı zamanda bu bileşikler tarafından indüklenebilir (364). CYP1A2 enziminin substratları arasında kafein ve melatonin gibi doğal bileşiklerin yanı sıra çeşitli ilaçlar (parasetamol, flutamid, lidokain, olanzapin, takrin, teofilin, triamteren, zolmitran) bulunmaktadır (365). Enzimin ekspresyonu ve aktivitesi bireyler arası farklılıklar gösterdiğinden ilaç klerensinde varyasyonlar görülmektedir (366).

CYP2C5. Sınırlı sayıda substratı tanımlanmıştır. Diklofenakın oksidasyon reaksiyonunu katalize eden enzimin potent inhibitörleri 4-metil-*N*-metil-*N*-(2-fenil-2Hpirazol)-benzensülfonamid gibi bazı sülfafenazol türevleridir (367, 368).

CYP2C8. Esas olarak karaciğerde bulunan, tüm CYP450 enzimlerinin % 5-7'sini oluşturan ve birçok ilacın biyotransformasyonunda görev alan bir enzim ailesidir (369). CYP2C8 enzimleri karaciğer dışında beyin, over, kalp, endotel doku, böbrek, adrenal bezler, meme ve gastrointestinal kanalda da eksprese edilir (370). Meme kanserinde enzimin ekspresyon düzeyinin yüksek olması önemli bir biyogöstergedir (371). 15 alel tespit edilmiş ve bu genetik polimorfizmin ilaç tedavisinde bireyler arası farklılıkta önemli olduğu bildirilmiştir. CYP2C8*2 ve CYP2C8*3 enzimleri düşük katalitik aktivitede olup CYP2C8*2 Afro-Amerikalılarda % 15, beyaz ırkta % 1 oranında, CYP2C8*3 polimorfizmi ise beyazların % 20'sinde görülmektedir (372). İlaç-ilaç etkileşimleri açısından dikkat

edilmesi gereken bir enzimdir. Serivastatin kullanan hastalarda gemfibrozil tarafından enzimin inhibe edilmesi sonucu ölümcül rabdomiyoliz bildirilmiştir (373, 374).

CYP2C8 enzimi, piyasadaki ilaçların %20'sinden fazlasının biyotransformasyonundan sorumludur. (375). Özellikle antineoplastik ilaç paklitaksel (taksol) olmak üzere 60'dan fazla antimalaryal, antidiyabetik, antiinflamatuvar ve antineoplastik ilacı (amiodaron, karbamazepin, serivastatin, diklofenak, ibuprofen, pioglitazon, rosiglitazon) metabolize eder. CYP2J2'nin yanı sıra CYP2C8 enzimi de kardiyak doku için önemlidir (376, 377).

CYP2C9. Enzimin substratları varfarin, fenitoin, valproik asit, kandesartan, glibanklamid, tolbutamin, ibuprofen ve diğer NSAİ ilaçlar gibi zayıf asidik grup içeren küçük ve hidrofobik bileşiklerdir (378, 379). Enzim aynı zamanda kan basıncı regülasyonunda görev yapan araşidonik asit gibi bazı endojen maddelerin metabolizmasında da rol alır (380). CYP2C9 enzimidaki polimorfizm; enzimin etkinliğini ve metabolik aktivitesini değiştirebilmekte, advers ilaç reaksiyonlarının ve toksisitenin oluşmasına neden olabilmektedir (379). Varfarin, fenitoin gibi terapötik penceresi dar olan ilaçlarla tedavide bu durum daha da önem kazandığından tedavi sırasında hastaların izlenmesi gerekir (378).

CYP2C19. Benzodiazepin türevi diazepamın yanı sıra omeprazol gibi proton pompası inhibitörleri, propanolol gibi klinikte yaygın bir şekilde kullanılan birçok ilaç, polimorfik CYP2C19'un substratıdır (381-385).

CYP2D6. Klinikte kullanılan ilaçların % 20-25'inin biyotransformasyonunda rol oynayan CYP2D6, temel olarak karaciğer ve beyin dokularında eksprese edilmektedir (386). Enzim ayrıca böbrek, akciğer, meme ve plesanta dokularında bulunur (387). CYP2D6, kardiyovasküler ve santral sinir sistemi ilaçları olan lipofilik aminlerin biyotransformasyonunda önemlidir. Enzimin substratları arasında antiaritmikler, antihipertansifler, antidepressanlar ve analjezikler yer alır (388, 389).

Enzimin ekspresyonunu ve fonksiyonunu etkileyen genetik varyasyonlar nedeniyle popülasyonda bireyler arası CYP2D6 polimorfizmine sık rastlanmaktadır. CYP2D6 polimorfik enzimi için 112 alelik varyant tanımlanmış ve bireyler *zayıf*, *orta*, *güçlü* ve *çok güçlü metabolize ediciler* olmak üzere 4 fenotipik gruba sınıflandırılmıştır (390). CYP2D6 aracılıklı *zayıf metabolize ediciler* Beyaz ırkta % 5-7, Afrikalılar ve Afrikan-Amerikalılarda % 2-4, Asyalılarda ise % 1-2 oranında görülmektedir. Gen dublikasyonu nedeniyle çok güçlü CYP2D6 metabolizasyonu ise Etiyoplalılarda % 29, Beyaz ırkta % 5-10, Afrikalılar, Afrikan-Amerikalılarda ve Asyalılarda % 2, Türklerde ise (Beyaz ırk) % 5-10 oranındadır. CYP2D6 polimorfizmi nedeniyle substratı olan ilaçların farmakokinetiğindeki değişiklikler farmakodinamik yanıtın farklılaşmasına yol açmaktadır. CYP2D6 seviyelerinin hamilelik

döneminde artması veya böbrek hasarında azalmasına rağmen enzim indüklenebilen enzimler arasında sınıflandırılmamaktadır (391).

CYP2E1. En çok karaciğerde olmak üzere böbrek, pankreas, beyin, akciğer, intestin, nazal epitel, kemik iliği ve lenfosit gibi birçok ekstrahepatik dokuda da eksprese edilmektedir. CYP450 türevi bir enzim olduğu bilinmeyen yıllarda *mikrozomal etanol okside edici sistem* olarak tanımlanan (392) CYP2E1'in parasetamol, birçok uçucu halojenli alkan (kloroform, karbontetraklorür, vinil klorür vb.), halojenli anestezikler (halotan, enfluran vb.), küçük aromatik bileşikler (benzen, toluen, piridin, pirazol vb.), alkanlar (etan, hekzan), alkoller (etanol, pentanol), kolon karsinojeni azoksimetan ve birçok mutajenik/karsinojenik nitrözamin oluşturan bileşiğin biyotransformasyonunda rolü olduğu bilinmektedir (393). CYP2E1 aktivitesindeki bireyler arası varyasyonlar diğer CYP450 enzimlerine göre daha azdır. CYP2E1 geninde birçok polimorfizm saptanmış ancak bunların enzimin ekspresyonu ya da fonksiyonu üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir (393). İnsan ve birçok memeli türünde CYP2E1 etanol, isoniazid, pirazol, aseton ve substratı olan diğer küçük moleküller tarafından 5-15 kat arasında indüklenebilmektedir. Diğer birçok CYP450 enzim indüksiyonunun aksine 2E1 indüksiyonu, transkripsiyon düzeyinde değil, translasyon ya da protein stabilizasyonu düzeyindedir (394).

CYP2E1 tarafından katalizlenen birçok reaksiyon sonucu ksenobiyotikler reaktif metabolitlerine dönüşürler. Knockout farelerle yapılan çalışmalar, CYP2E1 enziminin *in vivo* ilaç biyoaktivasyonundaki önemini ortaya koymaktadır. CYP2E1 ekspresyonu olmayan fareler etil karbamatin karsinojenik etkisine, benzenin miyelotoksisitesine, parasetamol aracılıklı hepatotoksisiteye karşı dirençlidir (394).

Hücrelerde ROT üretiminin kaynaklarından birisi de P450 oksidasyon reaksiyonlarıdır. CYP2E1, iskemi/reperfüzyon hasarı veya ksenobiyotik metabolizması sırasında ROT üretiminde artışa neden olmaktadır. Bu durum katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesiyle sonuçlanan ER stresine de neden olmaktadır (395, 396). ER stresindeki artış kaspaz yolağının aktive olması ve apoptotik sürecin başlamasıyla sonuçlanmaktadır.

CYP3A4. Hem endojen maddelerin (steroid hormonlar, vitamin D vb.) hem de ksenobiyotiklerin metabolizmasında önemli rol oynayan CYP3A4, en fazla oranda karaciğer ve intestinal dokuda eksprese edilmekte ve hepatik P450 içeriğinin % 40'ını oluşturmaktadır (397). Siklosporin (369), makrolid grubu antibiyotikler, statinler (398), sedatifler (diazepam, midazolam, tiazolam), antidepresanlar (amitriptilin, imipiramin vb), antiaritmikler (amiodaron, kinidin, propafenon), antihistaminikler (terfenadin, asemizol, loratidin), kalsiyum kanal blokörleri (nifedipin, diltiazem), birçok antimikrobiyal ve proteaz

inhibitörleri (399) gibi piyasadaki ilaçların % 50'sinden fazlasının biyotransformasyonunda görev almaktadır (397).

Memelilerde CYP3A4 enziminin işlevleri ve regülasyonu büyük oranda aydınlatılmıştır. Enzim aktivitesinde bireyler arası genotipik ya da fenotipik düzeyde farklılıklar bulunmaktadır. *CYP3A4*20*, *CYP3A4*22* gen varyasyonlarına sahip bireylerde aktivitenin normal popülasyona göre % 40-80 oranında daha az olduğu gösterilmiştir. Klinik açıdan önemli olan birçok ilaç-ilaç, ilaç-bitki ve ilaç-besin etkileşmeleri, bireylerde CYP3A4 inhibisyonuna ya da indüksiyonuna neden olmaktadır. Spesifik inhibitörü ketokonazol (400) olan CYP3A4 ayrıca eritromisin, amiodaron, kinidin, siklosporin, diltiazem, fluoksetin gibi birçok ilaçla inhibe olurken rifampisin, rifabutin, fenobarbital, fenitoin, karbamazepin ve St. John's wort ile indüklenmektedir (401). İntestinal CYP3A4, ilaçların presistemik eliminasyonunda önemli bir enzimdir (402, 403). Greyfurt suyu içinde bulunan furanokumarinler, intestinal dokudaki ve enterositlerdeki izoenzimi inhibe ederler (404). Enzim aktivitesindeki değişiklikler, bu enzimin substratı olan ilaçların biyotransformasyonunda artış ya da azalışa neden olmaktadır. Bu durum ilaç ya da metabolit nedenli farmakolojik ya da toksikolojik yanıtın değişmesiyle sonuçlanmaktadır.

2.5.1.2. Mitokondriyel CYP'ler

Sitokrom P450 enzimlerinin mitokondrideki varlığı ilk kez 1964 yılında adrenal korteks hücrelerinde (405), daha sonraki yıllarda ise memelilerin steroidojenik organlarında gösterilmiştir (406). Mitokondriyel CYP450'ler iç membran zarına bağlı olarak bulunmaktadır. Mitokondriyel ve mikrozomal CYP450'ler arasındaki en önemli fark NADPH'dan elektron transferini sağlayan proteinlerin farklı olmasıdır. Mitokondriyel CYP450'ler monooksijenizasyon reaksiyonları için elektronlarını NADPH'dan matrikste çözünür halde bulunan iki protein aracılığıyla (adrenodoksin; ADR ve *NADPH-adrenodoksin redüktaz*) almaktadırlar (407, 410).

Mitokondriyel CYP450 sisteminin bakteriyel çözünür P450 sistemiyle (çözünür P450'ler, ferredoksin, *NADH-ferredoksin redüktaz*) benzer olduğu ileri sürülmüştür (411). Ancak hayvan hücrelerindeki mitokondriyel CYP450'lerin prokaryotik orjinli olmadığı düşünülmektedir. Birçok kanıt, mikrozom tipi CYP450'nin ökaryotik hücre biyolojik evrimi sırasında mitokondriye girdiğini düşündürmektedir (410, 411). Adrenodoksin; ferredoksin tipi bir demir-sülfür proteindir. [2Fe-2S] grubu olan molekül, 1 elektron alıcısı ya da vericisi olarak görev yapmaktadır. *Adrenodoksin redüktaz* ise FAD içeren flavoproteindir. En önemli görevleri mitokondriyel CYP450'lere elektron sağlamak olan ADR ve

redüktazının bir diğer fizyolojik rolü ise *süksinat dehidrojenaz*, *akonitaz* gibi birçok Fe-S proteinin aktif grubunun oluşumuna katkı sağlamasıdır (412).

2.5.1.2.1. CYP'lerin Biyosentez Sonrası Hücre İçinde Hedeflendirilmesi

Ökaryotik hücrelerde tüm P450ler nükleer DNA tarafından kodlanmaktadır. İnsan genomundaki 57 P450 geninden sadece 7 gen bölgesi mitokondriyel P450'leri kodlamaktadır. Enzimlerin ER ya da mitokondriye yönlendirilmesi, sentezlenen peptidin N-terminal kısmında bulunan hedeflendirici dizi yardımıyla olmaktadır (413). Proteinin N-terminal ucunda "mitokondri-hedeflendirici sekans" içeren CYP450'ler mitokondriye, "ER-hedefleyici dizi" içerenler ise ER membranlarına taşınmaktadır (408, 414).

Mikrozomal CYP450'ler sitozolde sentezlenmenin ardından SER membranına bağlanırlar (415). Mikrozomal CYP450'lerdeki ER-hedeflendirici dizilerinin iki ana fonksiyonu bulunmaktadır; 1) yeni oluşturulan P450 peptitlerinin ER'ye hedeflendirilmesi, 2) katlanan CYP450 proteinlerinin SER membranlarına bağlanmasının sağlanmasıdır (409, 416). Peptitlerin N-terminal kısmında bulunan ER-hedeflendirici dizileri uzun hidrofobik aminoasit zincirinden oluşmaktadır (417). Bu diziyi sırasıyla topolojiyi belirleyen bazik aminoasitlerin oluşturduğu sekans ve proteinlerin doğru katlanması için gerekli olan proline zengin sekans izlemektedir (418, 419).

Mitokondriyel CYP450'ler N-terminal ucunda sinyal dizisi içeren öncül peptitler olarak sitozolde sentezlenerek mitokondriye hedeflenmektedir. N-terminal ucundaki mitokondriyel hedeflendirici dizi; nötral ve hidrofobik aminoasitler arasında arjinin ve lizin gibi birkaç pozitif yüklü aminoasitten oluşmaktadır. Öncül peptitlerdeki mitokondri hedeflendirici sekans iki şekilde aktive olmaktadır; bu mekanizmalardan ilki, sitozolik *endoproteazlar* ile enzimin ER-hedeflendirici dizisinin kesilmesi ve ikincisi olarak mitokondriyel hedeflendirici dizilerin aktive olmasıdır. Bir diğer mekanizma ise protein fosforilasyonu (*protein kinaz A* veya *C* aracılığıyla) sonucu latent mitokondriyel hedeflendirici dizilerin aktif hale gelmesidir (416, 420). CYP1A1 proteolitik reaksiyon sonucu, CYP2B1 ve 2E1 ise fosforilasyon sonucu mitokondriye hedeflenmektedir (420, 421).

Hedeflendirici dizideki pozitif yüklü aminoasitlerin mitokondriyel dış membrandaki *the import channel of the mitochondrial outer membrane* (TOM40) ve diğer dış membran protein komplekslerinin negatif yüklü kısımlarıyla etkileşmesi sonucu enzimin mitokondriye girişi sağlanır. CYP enzimleri iç membrandaki kanal proteinleri aracılığıyla matrikse

geçerler. Matrikse gelen öncül protein genellikle mitokondriye spesifik *metaloproteazlar* tarafından yıkılır, ana protein yapısı oluşur ve iç membrana bağlanır (422).

CYP1A1 enziminin mitokondri ve ER'ye hedeflendirilmesinde farklı *N*-terminal dizileri ve aktivasyon mekanizmaları görev almaktadır (421-424). ER'de bulunan CYP1A1, *N*-terminal ucunda ER hedeflendirici sinyal içerirken, 33-48 aminoasitleri arası iç sekans proteini mitokondriye hedeflemek için bilgi sağlar. Fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda eksprese edilen Cyp1A1 enzimlerinin % 25'ine ER hedeflendirici dizisinin eklenmediği ve bu enzimlerin mitokondriye hedeflendiği gösterilmiştir. Mitokondriye hedeflendirilmesi için sitozolde enzimin 33-48. aminoasitler arasında bulunan gizli mitokondriyel sekansının 33. aminoasitten *serin endoproteaz*la aktive olması gereklidir, bu durum insan dahil tüm memelilerde aynıdır (425). Sıçanlarda daha az miktarda +5/1A1 saptanırken, +33/1A1 (MT-CYP1A1) ise en baskın 1A1 olarak gösterilmiştir (421-424, 426). Proteinin mitokondriye girmesi için sitozolik şaperonlar Hsp70 ve Hsp90, mitokondriyel dış membran TOM reseptörleri ve kanal proteinleri gereklidir (427).

Polisiklik aromatik hidrokarbonlarla (PAH) ile indüklenebilen CYP1 ailesinin bir diğer üyesi olan CYP1B1 de *N*-terminal ucundaki gizli sekans ile mitokondriye hedeflendirilir. CYP1A1 enzime benzer olarak enzimin pozitif yüklü 41-48 aminoasit dizisi sitozolik serin proteazlarla etkileşir ve aktifleşir (428, 429).

İnsan karaciğer dokusunda yapılan bir çalışmada hem uzun zincirli hem de *N*-terminalden kesilmiş CYP2C8 (varyant 3) enzimleri saptanmıştır. RT-PCR ve modelleme çalışmalarıyla iki enzimin *hem* bağlama bölgelerinin hemen hemen aynı olduğu, kısa enzimin (wild-type; WT) *N*-terminal ucundaki 102. aminoasitten kesildiği, bu izoformun yüksek oranda (WT'den 3 kat daha fazla) mitokondriye hedeflediği ve enzimlerin substrat seçiciliğinin farklı olduğu gösterilmiştir (430).

CYP2D6 enziminin mitokondriye hedeflendirilmesinde gizli mitokondriyel sinyalin Ser-148 konumundan *protein kinaz A* tarafından fosforilasyonu rol oynamaktadır. *N*-terminal kısmının 23-33 aminoasitleri arası kimerik sinyal dizisi taşır ve bu dizinin pozitif yüklü 24, 25, 26, 28 ve 32. aminoasitleri mitokondriye hedeflendirme için önemlidir (67, 431, 432).

CYP2B1 enziminin ER ve mitokondriye hedeflendirilmesinde cAMP-bağımlı fosforilasyon rol oynamaktadır. Ser-128 konumundan *protein kinaz A* aracılı fosforilasyon sonucu enzim mitokondriye girer (433).

CYP2E1 enzimi de *N*-terminal Ser-129 konumundan *protein kinaz A* aracılı fosforilasyon sonrası kriptomik dizinin (*N*-terminal 21-31) aktivasyonu sonucu mitokondriye

girer. Fosforilasyon iki enzimin de Hsp70/Hsp90 şaperonlara afinitesini ve TOM40 kompleksine bağlanmasını artırır ve böylece mitokondriye girişlerini kolaylaştırır. CYP2E1 enzimin N-terminal kısmındaki mutasyonlar sonucu enzimin hücresel konumu değişir, fizyolojik ve patofizyolojik değişiklikler oluşur. CYP2E1 enzimidaki tek nükleozid mutasyonları (L32N, W30R, W23R, W23/30R) sonucu oluşan mutant enzimler ER'yi hedeflerler (410, 434, 435).

2.5.1.2.2. Endojen Metabolizma ve Ksenobiyotik Metabolizmasında Mitokondriyel CYP'lerin Rollerini

Mitokondriyel CYP enzimleri memelilerde endojen steroid metabolizmasında görevlidir. Adrenal korteks, gonad ve over mitokondrilerinden üç farklı P450 (11A, 11B1 ve 11B2) izoziminin saflaştırılması sonucu bu enzimlerin adrenal ve seks hormonlarının sentezindeki rolleri gösterilmiştir. Memeli steroidojenik organlarında steroid hormon sentezinde hız kısıtlayıcı basmakta mitokondriyel CYP11A rol almaktadır (436, 437). Andersson ve ark.'nın 1989 yılında yaptıkları çalışmada, karaciğerde kolestrolden safra asitlerinin sentezinde CYP27A izoenziminin rol oynadığı (438) bildirilmiş, ilerleyen yıllarda ise bu izoenzimin mitokondrilerde olduğu gösterilmiştir (439, 440).

Vitamin D, D2 ve D3'ün aktif formlara metabolik dönüşümü iki mitokondriyel enzim (CYP27A ve 27B) tarafından gerçekleştirilmektedir. CYP27A, D vitamininin karaciğerde 25-hidroksilasyonunu, CYP27B ise böbrekte 25-hidroksivitamin D3'ün 1 α -hidroksilasyonunu (D vitaminin aktivasyonu) katalizlemektedir (441, 442). 25-hidroksivitamin D3'ün 1 α ,25-dihidroksivitamin D3'e dönüşümü, böbrek mitokondrilerinde CYP24A tarafından gerçekleştirilmektedir (443).

Tablo 2'de mitokondriyel CYP450 enzimleri ve endojen metabolizmadaki bilinen rolleri özetlenmiştir.

Tablo 2. Mitokondriyel P450 enzimlerinin endojen metabolizmadaki rolleri ve buldukları dokular

P450	Endojen görev	Doku
11A	Kolesterolden pregnenol oluşumu	Adrenal korteks, gonadlar (436,437)
11B1	11-deoksikortizolün kortizole 11- β hidroksilasyonu	Adrenal korteks (436,437)
11B2	11-deoksi-kortikosterondan aldosteron sentezi	Adrenal korteks (436,437)
24A	25-hidroksivitamin D3'ün 24-hidroksilasyonu	Böbrek (443)
27A	Vitamin D3'ün 25-hidroksilasyonu Kolesterolün 27-hidroksilasyonu	Karaciğer, böbrek (441,442)
27B	25-hidroksivitamin D3'ün 21 α -hidroksilasyonu	Böbrek (441,442)

Mitokondriyel CYP450'lerin endojen steroid ve D vitamini metabolizmasındaki rolleri kanıtlanmasına rağmen ksenobiyotik biyotransformasyonundaki rolleri tartışmalıdır. 1980'lerin başında izole karaciğer ve böbrek mitokondrilerinin metabolizasyon kapasitesi olabileceği bildirilmiş olmasına karşın veriler çok ikna edici değildir (68, 69).

Bazı CYP450 enzimleri, mikrozom ve mitokondriyi ayrı ayrı hedefler. CYP1A1, 2A, 2B1, 2C, 2E1, 3A, 2D6 gibi ilaç biyotransformasyonunda görevli izozimlerin mitokondrilerde de bulunduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (423, 444-449).

Sıçan karaciğer, beyin, akciğer dokularının mitokondrilerinde Cyp1A1 varlığı immunoblotlama yöntemiyle ve enzimin metabolik açıdan kapasitesi ise *N*-demetilasyon reaksiyonu ile gösterilmiştir (410, 416, 421, 435).

COS-7 hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada mitokondriyel CYP1A1 aktivitesi; *etoksirezorufin O-dealkilasyon* (EROD), CYP2B1 aktivitesi; *benzoksirezorufin O-dealkilasyon* (BROD), *nitrozodimetilamin N-demetilaz* aktivitesi (NMDA), CYP3A aktivitesi ise *eritromisin N-demetilaz* (ERND) aktivite ölçümleri ile gösterilmiştir (420).

Bir başka çalışmada sıçan karaciğer mitokondrilerinde yine EROD ve BROD aktivitelerinin varlığı bildirilmiştir. Ayrıca sıçanların bir kısmına fenobarbital ve β -naftoflavon uygulanmış ve mitokondriyel CYP'lerin de mikrozomal eşdeğerleri gibi indüklenebilir oldukları kanıtlanmıştır (408).

Farelerle yapılan bir çalışmada mitokondriyel Cyp1A1'in eritromisin, morfin, lidokainin yanı sıra bazı kardiyak ve antipsikotik ilaçların (diazepam, imipiramin,

amitriptilin) N-demetilasyonunu katalize ettiği gösterilmiş ancak aynı reaksiyonlar mikrozomal Cyp1A1 ve elektron sağlayıcı olarak *NADPH-sitokrom P450 redüktaz* tarafından katalize edilmemiştir. Bu substratlar mikrozomal CYP2D6 ve CYP3A2'nin ana substratları olduğundan dolayı mitokondriyel CYP1A1'in mikrozomal forma göre farklı fizyolojik ve metabolik rolleri olduğu sonucuna varılmıştır (408, 416, 450, 451). Bu örnekte de görüldüğü gibi mitokondriye hedeflenen CYP enzimleri ile mikrozomal eşdeğerlerinin substratları farklı olabilmektedir. Mikrozomal CYP1A1 substratları olan benzo- α -piren (B[a]P) ve 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksinin (TCDD) ise mitokondriyel CYP1A1 tarafından çok fazla metabolize edilmediği bilinmektedir. Mikrozomal eksprese eden transgenik fareler B[a]P toksisitesine daha duyarlı iken, mitokondriyel CYP1A1 ekspresyonunun olduğu farelerde toksisite daha az gözlenmiştir (428, 429, 452-454).

Mitokondriyel CYP1B1 enzimleri, PAH ile indüklenen akciğer toksisitesinde önemlidir. Farelerle yapılan bir çalışmada wild-type (WT) ve transgenik (*CYP1B1* geni susturulmuş) fareler kullanılmış, özellikle sigara dumanında bulunan çevresel karsinogen B[a]P uygulaması yapılmıştır. Akciğerde mitokondriyel toksisite göstergesi olarak oksijen tüketimi ve mitokondriyel ROT düzeyleri ölçülmüştür (428). WT farelerde ciddi mitokondriyel toksisite oluşurken, transgenik hayvanlarda hasarın çok az olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada mitokondriyel Cyp1B1 hedeflendirilmesi baskın ve ER hedeflendirilmesi baskın olmak üzere iki ayrı hücre hattı kullanılmıştır. B[a]P ve TCDD uygulanması sonucu birinci grup hücrelerde mtDNA miktarının çok daha fazla miktarda azaldığı tespit edilmiştir (428).

HepG2 hücreleriyle yapılan bir çalışmada mitokondride kısa peptid zincirli CYP2C8 enziminin WT enzime göre çok daha fazla miktarda olduğu ancak, az miktarda da olsa mitokondrilerde WT enzimin de bulunduğu gösterilmiştir. Hücrelerden mikrozomal ve mitokondriyel fraksiyonlar elde edilmiş ve metabolit oluşumları sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) ile saptanmıştır. Paklitaksel 6-hidroksilasyonunun hem mikrozomal hem de mitokondriyel WT tarafından katalize edildiği, mitokondrilerde daha baskın olarak bulunan kısa zincirli enzim tarafından ise daha az katalize edildiği gösterilmiştir. Mitokondriyel formun araşidonik asit metabolizmasında rol aldığı bildirilmiştir. Araşidonik asit inkübasyonu sonucu varyant 3 enzimini daha çok eksprese eden HepG2 hücrelerinde ROT üretiminin ve mitokondriyel solunum hasarının daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle mitokondriyel CYP2C8'in ilaç toksisitesinde önemli olabileceği ileri sürülmüştür (430).

Sangar ve ark. 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada, mikrozomal CYP2D6 enzimin spesifik substratı olan 7-metoksi-4-(aminometil)kumarin (MAMC) kullanarak insan

karaciğer mitokondrilerinde CYP2D6 enziminin iç membranda bulunduğunu ve metabolik aktivitesinin de olduğunu göstermişlerdir. MAMC'ın insan karaciğer mitokondriyel CYP2D6 ile 7-hidroksi-4-aminometilkumarine (HAMC) *O*-demetilasyonu spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ayrıca, yine aynı çalışmada WT CYP2D6 hücre hattından izole edilen mitokondrilerde CYP2D6 enzimi tarafından katalize edilen bufuralolun 1-hidroksibufuralole oksidasyon reaksiyonu LC-MS yöntemiyle gösterilmiştir (67).

COS-7 fibroblast hücreleriyle yapılan bir çalışmada hücrelerden mitokondri ve mikrozomal fraksiyonlar elde edilerek bufuralol ve MPTP inkübasyonları gerçekleştirilmiş ve metabolitler LC-MS ile saptanmıştır. Mitokondriyel CYP2D6'nın bufuralol biyotransformasyonunda ve MPTP'nin *Kompleks I* aktivitesini inhibe eden MPP^+ piridin iyonuna oksidasyonunu katalize ettiği gösterilmiştir (455).

CYP2E1'in % 40'ının *protein kinaz A* tarafından fosforilasyonu sonucu mitokondrinin iç membranına yerleştiği, mitokondriyel izoenzimlerin de katalitik olarak aktif olduğu ve endojen metabolizma sırasında oksidatif strese artışa neden oldukları bildirilmiştir (456). Mitokondriyel CYP2E1'in mikrozomal izoenzime göre oksidatif stres oluşturma potansiyelinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Yüksek dozdaki etanolün mitokondriyel CYP2E1 aracılıklı metabolizması, COS-7 ve HepG2 hücre hatları kullanılarak araştırılmış, bu çalışmada WT ile mutant hücrelerdeki mitokondriyel etanol toksisitesi incelenmiştir. W23/30R mutasyonu nedeniyle CYP2E1 daha çok mitokondriye, daha az mikrozoma hedeflenir. Bu hücrelerin etanol toksisitesine daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Bu hücrelerde ROT üretiminin arttığı, oluşan oksidatif stres nedeniyle *sitokrom c oksidaz* enziminin işlevselliğini yitirdiği, OCR'nin azaldığı ve sitotoksosite oluştuğu gösterilmiştir. CYP2E1 enziminin daha çok mikrozomu hedeflediği L32N içeren hücrelerde ise etanol toksisitesine karşı duyarlılığın daha az olduğu gösterilmiştir (434, 457, 458).

2.6. Çalışılan İlaçlar

2.6.1. Klozapin

Klozapin, atipik antişizofrenik bir ilaçtır. Klinik kullanımda hastaların %2'sinde nötropeni ve agranülositoz gibi oldukça ciddi toksik etkilere neden olmasına karşın birtakım klinik üstünlükleri bulunmaktadır (459); diğer şizofreni ilaçlarına yanıt vermeyen olgularda klozapin ile çok iyi sonuç alınmaktadır, ayrıca klozapin şizofreni hastalarında gözlenen intihar eğilimini önemli derecede azaltmaktadır (460-462).

Klozapinin terapötik plazma konsantrasyonu 0.3 - 0.8 µg/mL (0.9 - 2.5 µM), toksik plazma konsantrasyonu ise 0.9 µg/mL (2.7 µM)'dir (463). Organizmada klozapinin sadece %0.12'si değişmeden atılır (464), yani yüksek oranda metabolize olur. Ana biyotransformasyon yolları sırasıyla CYP450 aracılıklı *N*-demetilasyon, *N*-oksidasyon ve aromatik halka hidroksilasyonudur (465-467). Bu reaksiyonlar sonucu klozapinin iki stabil metaboliti olan *N*-desmetilklozapin (norklozapin; NorKLZ) ve klozapin-*N*-oksit oluşmaktadır (468-474). Bu stabil metabolitlerin oluşumu CYP1A2 ve CYP3A4 enzimleri tarafından katalize edilir. Yapılan *in vivo* bir çalışmada klozapinin NorKLZ ve KLZ-*N*-oksit'e dönüşümünde en önemli payın CYP1A2 enzimine ait olduğu bildirilmiştir (475). Ayrıca polimorfik enzim CYP2D6 ve 2C19'un da stabil metabolit oluşumuna katıldığı düşünülmektedir (474, 476) daha sonraki yıllarda yapılan bir çalışmada bu enzimlerin düzeyleri ile metabolit oluşumu arasında bir ilişki saptanamamıştır (477). Klozapinin reaktif metabolitleri klozapin nitrenyum ve iminyum iyonlarının ilaçla gözlenen advers reaksiyonların nedeni olduğu düşünülmektedir. CYP enzimleri aracılıklı klozapin biyoaktivasyonu sonucunda elektrofilik nitrenyum ve iminyum iyonları oluşmaktadır (478-482). Klozapinin, NorKLZ'in ve KLZ-*N*-oksit'in piperazin halkalarının dehidrojenasyonu sonucunda oluşan iminyum iyonunun *in vitro* mikrozomal inkübasyon ortamında sert nükleofilik madde siyanür ile, reaktif nitrenyum iyonunun ise yumuşak nükleofilik madde GSH ile konjugatı oluşturularak kimyasal yapıları tanımlanmıştır (482-484). Piperazin halkasından azot-metilen zincirinin farklı bölgelerinin dehidrojenasyonu sonucunda iki farklı iminyum iyonu oluşabilmektedir. Klozapin biyoaktivasyonunda hangi CYP450 enzimlerinin daha etkili olduğunun araştırıldığı bir *in vitro* çalışmada ilaç, rekombinant insan karaciğer enzimleri ile inkübe edilmiş ve CYP3A4 ile CYP2D6'nın nitrenyum iyonu oluşumunda en yüksek aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Enzimlerin spesifik inhibitörlerinin inkübasyon ortamlarına eklenmesiyle en önemli rolün CYP3A4 enziminde olduğu, çalışılan 100 farklı insan karaciğer mikrozomlarında bu enzim aktivitesinin yüksek bir varyasyona sahip olduğu gözlenmiştir (485).

Klozapinin reaktif metabolitlerinin detoksifikasyonunda GST enzimlerinin rollerinin araştırıldığı bir çalışmada dört rekombinant GST enzimi varlığında (hGST A1-1, hGST M1-1, hGST P1-1, and hGST T1-1) klozapin, mutant BM3 P450 102A1M11H enzimi ve sıçan karaciğer mikrozomlarıyla inkübe edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda GST enzimleri yokluğunda klozapinin nitrenyum iyonunun GSH ile konjugasyonundan kaynaklanan üç ayrı GSH konjugatı tespit edilmiştir. hGST P1-1, hGST M1-1 ve hGST A1-1 varlığında tüm GSH konjugasyonu artarken, en yüksek konjugat miktarının hGST P1-1 varlığında olduğu gösterilmiştir. Polimorfik hGST T1-1 enziminin ise konjugasyonda rolü bulunmamaktadır. Bu çalışmadaki önemli bir gözlem GST enzimlerinin varlığında reaktif metabolitin GSH ile

farklı regioselektif konjugatlar oluşturmaktadır. Daha önce *in vivo* olarak gösterilen iki yeni GSH konjugatı inkübasyon ortamlarında oluşturulmuş, bu konjugasyon reaksiyonlarının en çok hGST P1-1 tarafından katalize edildiği gösterilmiştir (481).

Klozapin kullanan hastalarda metabolik bozukluklar, hepatotoksisite ve hayati öneme sahip agranülositoz, nötropeni ve kardiyotoksisite gibi advers etkiler görülebilmektedir (486). Klozapin kullanımı sırasında oluşan agranülositoz nedeniyle hastaların kan tablosu rutin olarak kontrol edilir, gerektiği durumlarda tedaviye ara verilerek başka bir ilaca geçilir ve kan tablosunun düzelmesi beklenir. Bu yan etkinin altında yatan mekanizmanın klozapinden faz I biyotransformasyonu sonucu oluşan elektrofilik nitrenyum iyonunun nötrofillerde hücre ölümüne yol açması olduğu düşünülmektedir (487). “Klozapini nitrenyum iyonuna okside eden *miyeloperoksidaz* enziminin kemik iliğinde fazla miktarda bulunması” kemik iliğinin hedef olmasını açıklanmaktadır. Diğer ileri sürülen mekanizmalar ise hipersensitivite ve genetik yatkınlıktır (488). Bu hipotezlerin hiçbiri yeterince ikna edici biçimde deneysel verilerle desteklenememiştir.

Klozapin tedavisi sırasında hastaların % 37’sinde hafif hepatotoksisite oluşurken bu hastaların sadece % 0.06’sında karaciğer hasarı ilerlemektedir (489). Hepatotoksisitenin altında yatan mekanizmanın bir önceki paragrafta vurgulandığı gibi CYP enzimleri aracılıklı reaktif metabolit oluşumu olduğu düşünülmektedir (468, 478, 487, 490). Toksisite oluşturmada temel olarak reaktif nitrenyum iyonu rol oynasa da (478) iminyum iyonunun da payı olabileceği gözardı edilmemelidir (482-484). İnsan karaciğer dokusunda klozapin mikrozomal biyoaktivasyonundan sorumlu temel enzim olan CYP3A4 (485) yanında CYP2D6 ve CYP2C18’in ise çok daha az olmakla beraber katkı sağlayabilecekleri ileri sürülmüştür (468).

Klozapinin yine az karşılaşılan ancak yüksek oranda ölümlü sonuçlanan bir başka toksik etkisi ise kardiyomiyopati ve miyokardit şeklinde ortaya çıkan kalp toksisitesidir. Klozapin tedavisi uygulanan hastaların % 1-3’ünde miyokardit (491, 492) ve % 0.02-0.1’inde kardiyomiyopati (493) oluşmaktadır. FDA verilerine göre 1989-1999 yılları arasındaki 10 yıl sürecinde klozapin kullanımına bağlı 28 miyokardit (18 ölüm) ve 41 kardiyomiyopati (10 ölüm) vakası kaydedilmiştir (494). Miyokardit ve kardiyomiyopati riski klozapin kullananlarda genel toplama kıyasla sırasıyla 2000 ve 5 kat daha fazladır (495). Ölümcül de olabilen kardiyotoksik etkinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Klozapin tedavisi noradrenalin, adrenalin gibi katekolaminlerin plazma düzeylerini artırmaktadır (496). Aşırı miktarda katekolamin salınımı sonrası oluşan miyokardiyal iskemi ROT düzeylerinin artışına neden olur. İndüklenen oksidatif stresin DNA hasarına ve hücre

canlılığının kaybına neden olabileceği ileri sürülmüştür (497), ancak deneysel verilerle desteklenmemiştir.

Mekanizmayı aydınlatmaya yönelik yapılan bir çalışmada sıçan kalbinden elde edilen mikrozomal fraksiyon, klozapin ile *in vitro* koşullarda inkübe edilmiş ve reaktif nitrenyum iyonu oluşumu gösterilmiştir (498). Ancak bu veri dolaylı bir parametre ölçümü ile elde edilmiştir ve klozapine bağlı bu etkinin neden hastaların küçük bir kısmında (% 1.2) ve neden kalpte ortaya çıktığı açıklanamamıştır. Klozapin biyoaktivasyonundaki bireyler arası farklılığın nedenlerinin ilaç biyoaktivasyonunda görevli olan CYP3A4 ve diğer CYP'ler ile detoksifiye edici GST enzimlerinin genetik polimorfizmi, ksenobiyotik aracılıklı enzim indüksiyonu ya da inhibisyonu olabileceği bildirilmiştir (485).

Klozapin tedavisi sırasında hastalarda hiperglisemi, dislipidemi, metabolik sendrom, obezite ve diyabet gibi metabolik bozukluklar gözlenmektedir. Klozapinin neden olduğu metabolik advers etkileri açıklayan çeşitli mekanizmalar önerilmiştir; klozapin ya da reaktif metabolitlerinin yağ asidi metabolizmasını ve oksidatif fosforilasyonu bozarak mitokondriyel hasara neden olmaları, *piruvat kinaz*, *malat dehidrogenaz* gibi mitokondriyel proteinlerin oksidasyonuna yol açarak enerji metabolizmasını bozmaları bu hipotezlerden bazılarıdır. Sıçan ve fare beyin dokularında yapılan çalışmalarda klozapinin enerji metabolizmasını, *süksinat dehidrogenaz* ve *sitokrom C oksidaz* gibi ETC proteinlerinin ekspresyonunu değiştirerek mitokondriyel işlevleri bozduğu bildirilmiştir (499-503). Diyabet, insülin direnci gibi metabolik bozuklukları olan hastalarda mitokondriyel fonksiyon bozuklukları saptanmıştır. Bu hastalarda oksidatif fosforilasyonun bozulduğu, mitokondri morfoloji ve sayısının değiştiği, kas hücrelerinde mitokondriyel dinamiğin bozulduğu ve oksidatif stresin indüklendiği gösterilmiştir (504-506). Adiposit, miyoblast, hepatosit ve monosit hücre hatları kullanılarak yapılan bir çalışmada hücreler 25, 50 ya da 75 µM klozapin ile 24 saat inkübasyonun ardından analiz edilmiş, mitokondri morfolojilerinin değiştiği, fizyonun ve mitokondriyel matriks hacimlerinin arttığı gözlenmiştir. Mitokondriyel membran potansiyeli değişmiş, 75 µM dozda membran potansiyelinde istatistiksel olarak önemli derecede azalma kaydedilmiştir. Ayrıca ATP üretiminin etkilendiği, 75 µM doz düzeyinde % 60-80 arasında ATP içeriğinin azaldığı bulunmuştur (507). Bu nedenlerle klozapinin insüline duyarlı hücrelerde mitokondriyel işlev bozukluklarına yol açarak metabolik sendroma neden olduğu düşünülmektedir.

Metabolik bozukluklar dışında klozapinin diğer advers etkilerinin oluşumunda da mitokondriyel toksisitenin önemli bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle klozapin ve/veya metabolitlerinin mitokondriye etkisinin araştırıldığı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir;

Maurer ve Möller tarafından 1997 yılında yapılan bir çalışmada klozapinin insan beyin dokusundan izole edilen mitokondrilerde *Kompleks I* aktivitesini 0.5 mM konsantrasyonda inhibe etmeye başladığı ve 10 mM dozda ise inhibisyonun % 70 olduğu gösterilmiştir (187). 2003 yılında yapılan başka bir çalışmada klozapinin 200 µM dozda C6 astroglial (astosit benzeri) hücre hattında *Kompleks I*'i % 25 oranında inhibe ettiği ve oksijen tüketiminde de % 18 oranında azalmaya neden olduğu bulunmuştur (508). Ayrıca, 28 hafta boyunca klozapin kullanan 21 hastanın mononükleer kan hücrelerinde klozapin kullanımı ile *Kompleks I* inhibisyonu arasında ilişki olduğu gözlenmiştir (503).

2012 yılında Nadanaciva ve ark., klozapinin oksijen tüketimine etkisini HepG2 hücre hattında araştırmışlardır. 300 µM'a kadar test edilen klozapin, *Kompleks I* inhibisyonu yapmış ancak oksijen tüketiminde değişikliğe neden olmamıştır (509).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada 25 mg/kg dozda klozapin 28 gün boyunca i.p. yolla uygulanmış ve sürenin sonunda sıçanların beyin dokularında çeşitli enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Striatum bölgesinde mitokondriyel *süksinat dehidrogenaz* enzim aktivitesinde önemli derecede inhibisyon gözlenmiştir (502).

Bir başka çalışmada sıçanlara 38 gün boyunca 45 mg/kg/gün dozda i.p klozapin uygulanması sonucu serebral korteks ve serebellumda altı mitokondriyel oksidatif fosforilasyon protein (ADH dehidrojenaz alfa 1-alt ünite 10, NADH dehidrojenaz flavoprotein 2, NADH dehidrojenaz Fe-S protein 3, F1-ATPaz beta alt ünitesi, ATPaz-H⁺ transport proteini; beta 56/58 kDa-izoform 2, ATPaz-H⁺ transport proteini V1 alt ünite A) düzeyinin Western blot analizi sonucunda azaldığı gösterilmiştir (501).

2.6.2. Parasetamol

Parasetamol terapötik dozlarda kullanıldığında oldukça güvenli bir analjezik ve antipiretik ilaçtır. Ancak terapötik dozların üzerinde alınması durumunda çoğunlukla ölümcül olan hepatosellüler nekroz ve akut karaciğer hasarına yol açmaktadır (510, 511). Parasetamol intoksikasyonu günümüzde akut karaciğer hasarının en sık nedenidir. Kronik alkol kullanımı ve polifarmasi genellikle CYP enzimlerinin aktivitesinin artmasına, aşırı alkol kullanımına bağlı malnütrisyon ise karaciğerdeki tiyol seviyesinin düşmesine neden olduğu için alkoliklerde ya da çoklu ilaç kullanan bireylerde terapötik dozlarda bile (3-4 g/gün) parasetamol hepatoksisitesi görülebilmektedir (512). Parasetamolün terapötik plazma konsantrasyonu 2.5 - 25 µg/mL (17- 170 µM), toksik plazma konsantrasyonu ise 75 µg/mL (510 µM)'dir (463). Parasetamolün neden olduğu hepatotoksisitede önemli derecede bireyler arası farklılıklar söz konusudur. Parasetamol biyoaktivasyonunda rol oynayan

enzimlerdeki (özellikle CYP2E1, CYP3A4, CYP1A2) ve faz II enzimlerdeki (*UDP-glukroniltransferaz, sülfotransferaz, glutatyon-S-transferaz*) genetik polimorfizm ve fenotipik farklılıklar bireyler arası farklılıkları açıklamaktadır (513, 514).

Karaciğer toksisitesinde en çok etkilenen bölüm, CYP içeriğinin yani biyoaktivasyon kapasitesinin fazlalığı nedeniyle sentrolobüler bölgedir (Zon 3). Çok yüksek dozlarda ise Zon 1 ve Zon 2'de de nekroz görülmektedir. Karaciğer toksisite mekanizması, parasetamolün biyotransformasyonu ile ilişkilidir. Terapötik dozlarda vücuda giren parasetamol başlıca glukronidasyon (%60) ve sülfatasyon (%35) sonucu, %1 oranında ise değişmeden idrarla atılır. %4 oranında ise ana olarak CYP2E1 ayrıca CYP3A4, CYP1A2 enzimleri aracılığı ile elektrofilik metaboliti olan NAPQI'ya okside olur. NAPQI, GSH ile konjuge olarak detoksifiye edilir. Ancak doz aşımı durumunda hücrel GSH ve sülfat depoları tükeneceğinden dolayı serbest kalan NAPQI, başta mitokondriyel proteinler olmak üzere birçok hücrel proteine bağlanarak toksisite yolağını başlatır (515, 516).

Yüksek doz parasetamol maruziyetinde karaciğer toksisitesinin yanı sıra hastaların % 1-2'lik kısmında böbrek toksisitesi de gözlenmektedir (517). Parasetamole bağlı nefrotoksisite mekanizmasının hepatotoksisite mekanizmasından farklı olabileceği düşünülmektedir. Bunun nedenleri; böbrek toksisitesinin karaciğer hasarından bağımsız olarak da gelişebilmesi (518, 519), karaciğeri çıkarılmış farelerde ya da *in vitro* böbrek modellerinde de nefrotoksisite gözlenmesi (520, 521) ve parasetamole bağlı karaciğer hasarının antidotu olan *N*-asetilsisteinin böbrek toksisitesini engellememesi hatta artırmasıdır (522). Böbrekte karaciğerden farklı olarak fazla miktarda bulunan *prostaglandin endoperoksit sentetaz* (PTGS) enziminin NAPQI oluşumunu katalize etmesinin yanı sıra *N*-asetil-*p*-benzosemikinonimin serbest radikalının oluşumuna da neden olmasının parasetamol aracılıklı böbrek toksisitesinde rolü olduğu düşünülmektedir (523). Fischer F344 sıçanlarında parasetamolün ve NAPQI'nın böbrekte deasetilasyon sonucu *p*-aminofenole (PAP) dönüştüğü gösterilmiştir. PTGS enzimi nedeniyle parasetamolün bu dönüşüme daha fazla uğradığı bulunmuştur. Parasetamol tedavisi sonrası insanların idrar örneklerinde PAP ve metabolitlerinin saptanması, bu oksidasyon reaksiyonunun insanlarda da gerçekleştiğini göstermektedir. 2005 yılında Parasetamol-SG konjugatının GI kanal ve böbrekte yıkımı sırasında oluşan Parasetamol-sistein konjugatının renal toksisitede payı olabileceği öne sürülmüştür. Sistein konjugatının γ -Glutamil döngüsüne girmesi sonucu GSH depolarının tükeneceği ve bu nedenle toksisite oluşabileceği düşünülmektedir (524-526).

Son yıllarda insanlarda parasetamol hepatotoksisitesinde mitokondriyel hasar ve nükleer DNA fragmentasyonunun gerçekleştiğine dair bulgular elde edilmiştir (527). Yüksek miktarda NAPQI oluşumu sitozolik ve mitokondriyel GSH'ın azalmasına neden olur. Serbest

kalan NAPQI başta *süksinat dehidrogenaz (Kompleks II)* olmak üzere yağ asidi oksidasyonunda da görev alan diğer bazı mitokondriyel proteinlere bağlanarak oksidatif stres ve mitokondriyel solunum hasarı oluşturur (528). Oksidatif fosforilasyonun bozulması sonucu ATP üretimi azalır, mitokondri fonksiyonları bozulur (529, 530).

Parasetamol toksisitesinde ROT üretiminin önemli bir neden olduğu bilinse de deneysel çalışmalar süperoksit anyonunun NO ile reaksiyona girerek oluşturduğu peroksinitrit anyonunun önemli payı olduğunu göstermiştir (531). Parasetamol uygulanan farelerde NO sentezinde artış olduğu ve nitrotirozin protein katım ürünleri oluşumunun önemli derecede arttığı gözlenmiştir (532). Kupffer hücreleri, hepatositler ve endotel hücrelerinin karaciğerde NO sentezine katkısı vardır. Süperoksit radikalinin ana kaynağı mitokondride ETC'dir, bunun yanı sıra inflamasyon sırasında aktive olan makrofajlar da inflamasyon bölgesindeki süperoksit radikali üretimine katkıda bulunur. Yapılan bazı çalışmalarda Kupffer hücrelerinin aktiviteleri kısıtlandığında parasetamol toksisitesinin azaldığı görülmüş, bu nedenle Kupffer hücrelerindeki *NADPH oksidaz* enzimin süperoksitin ana kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür (533-535). Ancak 2003 yılında yayınlanan başka bir çalışmada *NADPH oksidaz* aktivitesi olmayan farelerde parasetamol uygulaması sonucu hepatik hücrelerdeki nitrotirozin düzeylerinin yabancı farelerle aynı derecede olduğu gösterilmiştir (536). 2004 yılında yapılan bir çalışmada parasetamol toksisitesinde ROT'un artmasının MPTP indüksiyonundan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (227).

Parasetamol hepatotoksitesinde iki ayrı faz görülmektedir. İlk faz olan metabolik faz; parasetamol metabolizması ile ilişkili olup reaktif metabolit oluşumu, GSH tükenmesi ve NAPQI'nın proteinlere kovalent bağlanma süreçlerini kapsamaktadır. İkinci faz ise MPTP oluşumu ve sonrasında gelişen toksik süreçlerin görüldüğü oksidatif stres fazıdır (227). Hücre içi ROT seviyesindeki artış nedeniyle *Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)* aracılıklı olaylar dizisi aktifleşir, c-Jun N-terminal kinase (JNK) fosforilasyonu başlar. Phospho-JNK dış membranın sitozole bakan yüzündeki proteinlere bağlanır ve mitokondri içine girer. Mitokondriyel oksidatif stresi daha da artırır ve MPTP oluşumu indüklenir (537-539). MPTP oluşumuyla iç membran permeabilitesi artar ve sitokrom c gibi proteinler sitozole salınır. Sitokrom c kaspaz yolağının aktive olmasıyla hücreyi apoptoza götürür (540, 543).

Hücre ATP düzeyindeki düşüğe bağlı olarak apoptoz yerine hücre onkotik nekroza da gidebilir. Ayrıca, plazma membranındaki $Ca^{+2}-Mg^{+2}ATPaz$ 'ın inhibisyonu ve mitokondriyel Ca^{+2} salınımı nedeniyle hücre içinde Ca^{+2} birikir. Artan Ca^{+2} seviyeleri birçok enzimin aktivasyonuna neden olur, yapısal proteinlerde degradasyon başlar (544). Nekrotik hücrelerden salınan proteolitik enzimler birçok komşu hücrenin de zarar görmesine neden

olmaktadır (545). Parasetamol toksisitesinde eş zamanlı ilerleyen sitozolik ve mitokondriyel olaylara nükleer DNA hasarı da eşlik etmektedir. Sitozolik Ca^{+2} seviyelerindeki artış sonucu Ca^{+2} bağımlı endonükleazlar aktifleşir ve DNA fragmentasyonu başlar (546, 548). Tüm bu hücrel toksisite mekanizmalarını takiben nekroptozis sonucu hücre ölümüne gider (programlanmış nekrozis) (549). Ayrıca farelerde parasetamol uygulaması sonucunda karaciğerde saptanan 20 arillenmiş proteinin 8 tanesinin mitokondriyel protein olması (550, 551), parasetamol aracılıklı hepatotoksistide mitokondrilerin hedef olabileceği hipotezini güçlendirmektedir. Böbrek ile karaciğer toksisite mekanizmasındaki NAPQI oluşumu ve proteinlere bağlanma benzerdir. Kemiricilerin böbrek hücrelerinde parasetamolün mitokondriyel solunumu inhibe ettiğine dair bulgular olmasına rağmen (552, 553) oksidatif stresin, kinaz aktivasyonunun, MPTP oluşumunun, mitokondriyel işlev bozukluğunun nefrotoksistide önemli mekanizmalar olup olmadığı ya da hangi oranda rol oynadığı henüz netleşmemiştir (526).

2.6.3. Diklofenak

Diklofenak özellikle osteoartrit, romatoid artrit, akut kas ağrısı ve ankilozan spondilit tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan antiinflamatuvar bir ilaçtır (554). Farmakolojik etkisini *siklooksijenaz* (COX) enzimlerini inhibe ederek gösterir.

Diklofenak fenilasetik asit grubunun bağlı olduğu diklorofenil halkasından oluşmaktadır. Diklofenakın terapötik plazma konsantrasyonu 0.5 - 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1.6 - 9.6 μM), toksik plazma konsantrasyonu ise 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (192 μM)'dır (463). İnsanlarda temel olarak faz I oksidasyon ve faz II glukronidasyon reaksiyonları ile biyotransformasyona uğramaktadır (555). CYP2C9 enzimi ile diklofenak hidroksilasyonu sonucunda majör metabolit 4-hidroksidiklofenak (4-OHDik) oluşmaktadır (556). Yüksek dozlarda ise fenilasetil grubunun CYP3A4 ile oksidasyonu sonucunda 5-hidroksidiklofenak (5-OHDik) meydana gelmektedir (557). Bu iki metabolitin CYP2C9 ve CYP3A4 enzimleriyle ileri metabolizasyonu sonucu benzokinonimin (Dik-1,4-kinonimin ve Dik-2,5-kinonimin) ara ürünleri oluşur. Benzokinonimin ara ürünleri elektrofilik yapıdadır ve protein, protein dışı sülfhidril (-SH) gruplarına kovalent bağlanarak oksidatif stres oluşturabilirler. Bu reaktif metabolitlerin tümü GSH ile konjuge edilir. 5-hidroksi-4-glutatyon-S-diklofenak, 4-hidroksi-3-glutatyon-S-diklofenak ve 5-hidroksi-6-glutatyon-S-diklofenak tanımlanan diğer metabolitlerdir (558, 559). Oksidasyon reaksiyonları sonucu oluşan diklofenak metabolitleri toksisteden sorumlu ana metabolitlerdir (55, 560).

Diklofenakın glukronidasyon reaksiyonu sonucu belirli koşullarda oluşan 1-diklofenak-1-O-açıl glukronid (DikGluA) kimyasal olarak reaktiftir, proteinlere kovalent bağlanarak onların işlevlerini bozabilir ya da immün yanıtı şiddetlendirebilir (561, 562). Birçok *in vivo* çalışmada açıl glukronidin hepatik proteinlere, albümine, tübiline, UDP-glukroniltransferaz ve SOD gibi enzimlere bağlandığı ve bu proteinlerin aktivitelerini azalttığı bildirilmiştir (563).

Yan ve ark.'ının 2016 yılında yaptıkları çalışmada insan karaciğer mikrozomal inkübasyon ortamında yeni bir metabolit bulunmuştur. Diklofenakın C-3 pozisyonundan oksidasyonu sonucu 3,4-oksit ve 2,3-oksit türevleri oluşmaktadır. Bu metabolitlerin ileri oksidasyonu ve GSH konjugasyonu sonucunda oluşan yeni bir GSH konjugatı tanımlanmıştır (564).

Aren oksit yapıları birçok toksik bileşiğin toksisite mekanizmasında rol almaktadır (358). Bu nedenle diklofenak ilacına ait arenoksit yapılarının tespiti toksisite mekanizmalarının aydınlatılmasına da katkı sağlayabilir (564).

Diklofenak kullanımı sırasında en sık gözlenen advers etki gastrointestinal (GI) komplikasyonlardır. Bu durumun nedeni COX enzim inhibisyonu sonucu GI mukozada koruyucu etki yapan prostoglandinlerin azalmasıdır. Bir diğer advers etki olan hepatotoksisite ise diklofenak kullanan 100.000 hastadan 1'inde görülmekte iken, ilacın kronik kullanımı sonucu oran 6/100.000'e yükselir (565).

Diklofenak tedavisi sırasında gözlenen idiyosenkratik hepatik hasar serum aminaz seviyelerinde artışa (566), hepatosellüler ve kolestatik karaciğer hasarına neden olmaktadır (560, 567, 568). Hepatotoksitenin altında yatan mekanizma tam olarak aydınlatılmamış olsa da reaktif metabolit aracılıklı mitokondriyel hasarın ve immünojenik katım ürünü oluşumunun toksisitede önemli rol oynadığı düşünülmektedir (569). Diklofenakın biyoaktivasyonu sonucu oluşan reaktif metabolitlerin hücresel proteinlere bağlanarak sinyal yollarında ya da immün yanıtta değişiklikler oluşturduğu bildirilmiştir (560). Diklofenak-aracılıklı hepatotoksisitede ana rolün faz I reaktif metaboliti 4-OHDik'e ait olduğu bilinmesine rağmen faz II metabolitlerinin de toksisiteye önemli katkıları vardır. Diklofenak açıl glukronidleri hepatosellüler proteinlere kovalent bağlanarak katım ürünü oluştururlar ve bu nedenle işlevsel proteinlerin aktiviteleri bozular (570). *In vitro* veriler yapılan *in vivo* çalışmalarla da desteklenmiştir. Sıçanlarla gerçekleştirilen birçok çalışmada DikGluA'nın 110 kD ağırlığındaki kanaliküler membran proteinleri ve plazma membran proteinleri (*dipeptidilpeptidaz IV*, Mg^{+2} -ATPaz, *lösin aminopeptidaz*) ile katım ürünleri oluşturduğu, bu proteinlerin aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir (571, 572). DikGluA ve GSH arasındaki reaksiyon sonucu oluşan ve minör metabolit olarak tanımlanan DikSG'nin de tiyol

gruplarına reaktivitesinin DikGluA'a göre daha fazla olmasından dolayı hepatotoksisitede payı olabileceği düşünülmektedir (573, 574).

Diklofenak ve metabolitlerinin ATP sentezini inhibe ederek mitokondriyel ve dolayısıyla hücrel hasara neden olmalarının, hepatotoksisitenin ana nedeni olduğu düşünülmektedir. Syed ve ark., 2016 yılında yayınladıkları bir çalışmada diklofenak ve metabolitlerinin (4'-OH-Dik, 5-OH-Dik, DikGluA, DikSG) ATP sentezi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada mitokondriler ortamda GSH varken diklofenak ile inkübe edildiğinde ATP sentezindeki inhibisyonun önemli derecede azaldığı görülmüştür. 4'-OH-Dik, DikGluA ve DikSG'nin ATP sentezini 2-5 kat oranında azalttığı, 5'-OH-Dik'in ise DİK'e göre inhibitör etkisinin daha az olduğu gösterilmiştir (563).

ATP sentezinin inhibisyonunun ardında farklı toksisite mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalardan ilki kenetsizleyici etkidir. Diklofenak diğer zayıf asidik ve lipofilik maddelerde olduğu gibi protonoforetik etkiye sahiptir; protonların mitokondri membranları arasına girişini artırır. Mitokondriyel iki membran arasına giren diklofenak anyonu burada protonlanarak matrikse geçer ve nispeten bazik matrikste tekrar anyonik forma dönüşüp membranlar arası boşluğa geri döner. Bu döngü sırasında ATP sentezinin bağımlı olduğu proton gradiyenti bozulur, ETC'ye oksijen girişi artar ve kenetsizleyici etki yoluyla ATP sentezi azalır (575). Diklofenak ayrıca, ETC *Kompleks III* (Rip1P alt ünitesi) ve *IV* (Cox9P alt ünitesi) proteinlerinin inhibisyonuna neden olarak oksidatif fosforilasyonun bozulmasına neden olmaktadır (576). Diklofenak ya da reaktif metabolitlerinin mitokondrilerde hedeflediği üçüncü toksisite mekanizması ise MPTP oluşumunun indüklenmesidir. Mitokondriyel dış membran permeabilitesindeki artış sonucu Bax/Bak proteinleri aktifleşir (577), MPT porları oluşur, iç membran potansiyeli azalır, proton gradiyenti bozulur, ATP sentezi azalır ve apoptoz indüklenebilir (253, 578). 1999 yılında Pessayre ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada diklofenakın 2 µM gibi düşük konsantrasyonda bile MPT por oluşmasına ve mitokondriyel membran hasarına neden olduğu gösterilmiştir (579). Diklofenakın ve metabolitlerinin oksidatif strese yol açarak mitokondriyel membranlarda hasar oluşturduğu ve bu durumun da MPT porlarının oluşmasına neden olduğu düşünülse de altta yatan mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır (253). Özellikle kinonimin ve açıl glukronid reaktif metabolitlerinin oksidatif stres oluşumunda payı bulunmaktadır. Sıçanlara diklofenak uygulanması sonucu hepstositlerde oksidatif stresin arttığı, mitokondriyel membranlarda yapısal ve işlevsel kayıpların olduğu, sitozole sitokrom c salınımının arttığı gösterilmiştir (580).

Hepatotoksisiteye katkı sağlayan bir diğer toksisite mekanizması ise diklofenak ya da metabolitleri tarafından mitokondriyel yağ asidi oksidasyonunun inhibe edilmesidir. Bir

çalışmada diklofenak uygulanan farelerin karaciğer mitokondrilerinde uzun zincirli yağ asidi oksidasyonunun güçlü şekilde inhibe olduğu gösterilmiştir. Yağ asidi oksidasyonunun bozulması sonucu lipid metabolizmasında ve mitokondrilerin lipid membranlarında değişiklikler meydana gelir, membran permeabilitesi değişir. Kontrolsüz Ca^{+2} geçişi sonucu mitokondrilerin homeostazi bozulur, oksidatif stres meydana gelir ve devamındaki mitokondriyel hasar hücrel toksisiteye neden olur (581).

Diklofenak kullanımı sırasında gözlenen hepatotoksisite idiyosinkratik tarzda bir advers etkidir. İlacın biyoaktivasyonunda görev alan CYP2C9, UGT2B7 enzimlerinin genetik açıdan polimorfik olmaları ekspresyon ve/veya aktivitelerinde farklılıklara neden olmaktadır. UGT2B7 enzim geninin iki alelik formu vardır; UGT2B7*2 aleli taşıyan bireyler, UGT2B7*1 homozigot bireylere göre diklofenak hepatotoksitesine daha duyarlıdır (582). Ayrıca, MPT por oluşumunda yer alan CyD ve ANT proteinlerinin, DikGluA metabolitinin karaciğerden safraya ya da hücre dışına atılımında görev alan *multidrug resistance associated proteins*'in (Mrp) ekspresyonundaki farklılıklar da bireyler arası toksisite farklılıklarına neden olabilmektedir (564,583,584).

Yaşamı tehdit eden kardiyovasküler toksisite diklofenak kullanımında dikkat edilmesi gereken bir advers etkidir (585). Diklofenak kullanan hastaların % 40'ından fazlasında koroner arter problemleri görülmektedir. Aşırı doz diklofenak kullanımı sonucu kalp yetmezliğine bağlı ölümler kaydedilmiştir (586, 587). Diklofenakın neden olduğu kardiyotoksisite mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da COX-2 enzim inhibisyonunun toksisitenin nedeni olduğu düşünülmektedir (588). Son yıllarda farklı hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda COX enzim inhibisyonundan bağımsız toksisite mekanizmalarının da olabileceği bildirilmiştir (589). Diklofenakın kardiyomiyositlerde oksidatif strese neden olduğu ve hücrelerde ölüme kadar giden toksisite yollarının olduğu gösterilmiştir. Mitokondri hasarının hepatotoksistede olduğu gibi kardiyotoksistedeki rolü de son yıllardaki araştırma konuları arasındadır. 2016 yılında yayımlanan bir çalışmada diklofenak maruziyeti sonucu kardiyomiyositlerde *Kompleks III*'ün güçlü bir şekilde inhibe olduğu, mitokondriyel membran potansiyelinin ise azaldığı gösterilmiştir. Hücredeki oksidatif stresin ana kaynağının mitokondriyel toksisite olduğu bildirilmiş ve kardiyotoksistenin altında mitokondriyel hasarın olduğu vurgulanmıştır (590).

2.6.4. Valproik Asit

Epilepsi, bipolar hastalıklar ve migren tedavisinde çok sık reçetelendirilen valproik asit terapötik indeksi dar olduğu için gözetim altında kullanılması gereken bir ilaçtır (591).

Valproik asidin terapötik plazma konsantrasyonu 40 - 100 µg/mL (0.3 – 0.75 mM), toksik plazma konsantrasyonu ise 120 - 150 µg/mL (0.9 – 1.125 mM)'dir (463). Toksik epidermal nekroza, Stevens-Johnson sendromuna ve ciddi hepatotoksisiye neden olabilmektedir (592, 593). Valproik asit biyotransformasyonu çok büyük oranda karaciğerde gerçekleştiği için karaciğer valproik asit için hedef organdır. Ekstrahepatik biyotransformasyonun (deri, akciğer, böbrek vb.) eliminasyona katkısı tam olarak bilinmemektedir. Valproik asit iki tür hepatotoksisteye neden olmaktadır. Birincisi; karaciğer enzimlerde artış ve fibrinojende azalışla karakterize olan doza bağımlı, geri dönüşlü toksisite ya da idiyosinkratik tarzda, geri dönüşsüz ve ölümcül karaciğer hasarıdır. (591, 594, 595). İkinci hepatotoksik etki ise steatozis ve karaciğer nekrozudur (594).

Valproik asit kimyasal açıdan orta zincirli yağ asidi benzediği için mitokondriye serbestçe girebilir. Mitokondriyel matrikste VPA-CoA yapısı oluşur ve bu bileşik yağ asiti oksidasyonunu inhibe eder. Valproik asit biyotransformasyonu sonucunda 50'den fazla metabolit oluştuğu gösterilmiştir (596). Toksisiteden esas olarak sorumlu metabolit CYP2C9, CYP2A6 (597) ve CYP2B6 (596) enzimi aracılığıyla oluşan 4-en-VPA mitokondriye girer, burada 4-en-VPA-CoA ve diğer metabolitler oluşur. 4-en-VPA ve 2,4-dien-VPA, GSH ile konjuge edilir. İdrar ve safrada en fazla bulunan metabolit ise glukronik asit konjugatıdır (598). VPA-glukronid hidroliz reaksiyonları sonucu proteinlerle kovalent bağlanarak (599) immün yanıt oluşmasına neden olabilir (599-601).

Karaciğer toksisitesinin altında yatan neden tam olarak aydınlatılamamış olsa da ana olarak mitokondriyel işlev bozukluğunun rol oynadığı düşünülmektedir (602). Valproik asidin hepatotoksik metaboliti 4-en-VPA'nın oluşturduğu reaktif ara ürün karaciğerde hücresel makromolekülleri alkiler, yağ asidi β -oksidasyonunu inhibe eder ve hepatik steatozisi indükler (592, 593).

Valproik asite maruz kalma ile mitokondriyel solunum inhibe olur. İnsan dokularıyla yapılan çalışma sayısı kısıtlı olmasına rağmen hücre kültürü çalışmalarında valproik asit nedenli solunum inhibisyonunun mitokondriye süksinat girişinin değişmesine (603), ayrıca yüksek dozlarda ise Kompleks IV düzeyindeki inhibisyona bağlı olduğu gösterilmiştir (38, 604). Valproik asit inkübasyonu sonucu ATP üretimi ve mitokondri membran potansiyeli azalır. Bu durum, mitokondriyel işlev bozukluğuna ve oksidatif stresin daha da artmasına neden olur (605). Yağ asidi oksidasyonu, glukoneogenesis ve üre sentezi inhibe olurken, hücre içi trigliserid seviyeleri artar ve laktik asidoz gelişir (14, 579, 591). Lipid peroksidasyonu düzeylerinde artış, GSH ve antioksidan enzim seviyelerinde azalış gözlenir (606, 607). Ayrıca mitokondriyel membran potansiyelindeki düşüş MPTP oluşumu ve ATP üretiminin bozulması sonucu hücre onkotik nekroza gider (228, 608).

2.6.5. Olanzapin

Olanzapin şizofreni tedavisinde kullanılan, ekstrapiramidal yan etkileri diğer ilaçlara göre daha az olan bir nöroleptiktir (609). Ancak, olanzapin kullanımı hastalarda glukoz ve lipid metabolizmasında ciddi bozukluklara neden olmaktadır. (610-612).

Olanzapin ve klozapinin insan lökosit hücrelerinde neden oldukları toksisitenin incelendiği bir çalışmada her iki ilacın da nötrofillerdeki ana okside edici bileşik olan HOCl tarafından reaktif türevlerine okside olduğu, ancak agranülositozun olanzapin kullanımı ile daha az ortaya çıktığı bildirilmiştir (613). Kemik iliği stroma hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada ise benzer şekilde olanzapinin de biyoaktivasyona uğrayarak reaktif ara ürün oluşturmasına karşın sitotoksositeye yol açmadığı gösterilmiştir (614). Olanzapin kullanan hastalarda hayati önem taşıyan hepatotoksosite görülmektedir. (615, 616). Olanzapin tedavisi sonucu karaciğer enzim seviyelerinde değişim olduğu ve akut kolestatik hepatik hasarın oluşabildiği bildirilmiştir (617-620). Bu advers etkinin mekanizmasının aydınlatılması amacıyla yapılan bir çalışmada sıçan karaciğer doku kesitlerinde düşük ve yüksek doz olanzapin maruziyeti sonucu histopatolojik değişikliklerin olduğu görülmüştür (621). Ayrıca, 2016 yılında yayınlanan bir başka çalışmada sıçan hepatositleri kullanılmış ve olanzapinin hücrede lipid peroksidasyonunu arttırarak oksidatif stres oluşturduğu, GSH seviyelerini azalttığı ve mitokondriyel membran potansiyelini düşürdüğü gösterilmiştir (231).

Olanzapinin terapötik plazma konsantrasyonu 0.001 – 0.02 µg/mL (3.2 - 64 nM), toksik plazma konsantrasyonu ise 1 - 4.9 µg/mL (3.2 - 16 µM)'dir (463). Olanzapin esas olarak 10-*N*-glukronid, 4'-*N*-desmetilolanzapin (DMO) ve olanzapin-*N*-oksite metabolize olur. Bu reaksiyonlarda *flavin içerikli monooksijenaz* enzimleri, CYP1A2, CYP2D6 ve UGT rol oynar (622). İnsan karaciğer mikrozomları ile yapılan *in vitro* inkübasyonlar sonucunda bilinen faz I ve II metabolitlerinin yanında yeni bir hidroksillenmiş metabolit de saptanmıştır (623).

2.6.6. Nifedipin

Nifedipin hipertansiyon, angina pectoris ve Raynaud fenomeni gibi vasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan dihidropiridin sınıfı kalsiyum antagonistlerinin prototipidir. Nifedipinin terapötik plazma konsantrasyonu 0.025 – 0.1 µg/mL (72 - 288 nM), toksik plazma konsantrasyonu ise 0.1 µg/mL (288 nM)'dir (463). Dihidropiridin yapısında olan nifedipin ana olarak karaciğerde mikrozomal CYP3A4 enzimi ile aktif olmayan piridin türevine dönüşür (624). Nifedipine ait herhangi bir reaktif metabolit tanımlanmamıştır. Genetik polimorfizm ve enzim indüksiyonu ya da inhibisyonuna neden olan ksenobiyotiklere

maruz kalma nedeniyle ilacın hipotansif etkisinde bireyler arası farklılıklar oluşmaktadır. Nifedipin tedavisi sırasında hastalarda hafif karaciğer hasarı (serum aminaz düzeylerinde artış), ayrıca makroveziküler steatozis ve steatohepatit görülebilir. Hepatotoksisitenin nedeninin mitokondriyel β -oksidasyon inhibisyonu olduğu düşünülmektedir. Ancak bu hipotez henüz deneysel çalışmalarla ispatlanmamıştır (207).

Nifedipin tedavisi sırasında gastrointestinal advers etkiler, negatif inotropik etki ve vazodilatasyon da görülebilmektedir. Vazodilatasyon nedeniyle baş ağrısı, baş dönmesi, taşikardi, ödem ve hipotansiyon görülebilir. Ayrıca nifedipin pulmoner damarların geçirgenliğini arttırarak akciğer ödemeine de neden olabilmektedir (625, 626.)

2.6.7. Tiyaprofenik asit

Tiyaprofenik asit romatoid artrit ve osteoartrit tedavisinde kullanılan arilpropiyonik asit türevi bir NSAİ ilaçtır. Tiyaprofenik asitin terapötik plazma konsantrasyonu 20 - 35 $\mu\text{g/mL}$ (0.07- 0.13 mM)'dır (627). Karaciğerde iki stabil metaboliti olan a-(5-benzilalkol-2-tienil) propanoik asit (redüktif metabolit) ve oksidasyonu sonucu a-[5-(4-hidroksibenzil)-2-tienil] propanoik asit oluşur (628). İlacın büyük bir kısmı (% 63) ise idrarla değişmeden atılır (629). Kronik ilaç kullanımı sistite ve gastrointesinal hasara neden olabilmektedir (630, 631). Tiyaprofenik asit kullanımı sonucu kütanöz fotosensitivite görülmekte ve bu durum eritrosit lizisi ve histidin degradasyonuna neden olmaktadır.

İlacın toksisite mekanizmalarının araştırıldığı çalışma sayısı kısıtlıdır. Geneve ve ark., farelere i.p. yolla tiyaprofenik asit uygulamış ve mitokondriyel solunum ile β -oksidasyon düzeylerini ölçmüşlerdir. Bu çalışmada tiyaprofenik asitin mitokondriyel solunumu etkilemediği ancak β -oksidasyonu *Asetil-CoA karboksilaz* düzeyinde inhibe ettiği gösterilmiştir (632). Tiyaprofenik asit eritrositlerin lizisine ve histidin degradasyonuna neden olmaktadır. Bu advers etkinin altında yatan mekanizmanın araştırıldığı bir çalışmada oksijen ve azot konsantrasyonunun artması sonucu toksisitenin arttığı, GSH ya da BHT uygulaması sonucu ise toksisitede azalma olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle oksidatif ve nitrozatif stresin toksisiteye yol açabileceği ileri sürülmektedir (633). Orhan ve Şahin tarafından 2001 yılında yayınlanan bir başka *in vitro* çalışmada ise insan eritrositlerinin terapötik dozda tiyaprofenik asit ile inkübasyonu sonucu GST ve GPx enzim aktivitelerinin azaldığı, CAT aktivitesinde ise inhibisyon gözlenmediği bildirilmiştir (634).

2.6.8. Dapson

Dapson romatolojik hastalıkların profilaksisinde, inatçı cilt hastalıkları ve lepranın tedavisinde kullanılan antimikrobiyal/antiprotozoal ve antiinflamatuvar etkili sülfon grubu bir ilaçtır. Dapsonun terapötik plazma konsantrasyonu 0.5 - 2 µg/mL (2 - 8 µM), toksik plazma konsantrasyonu ise 10 µg/mL (40 µM)'dir (463). Dapson tedavisi sırasında ilacın kullanımını kısıtlayan ciddi hematolojik advers etkiler görülebilmektedir, ilacı kullanan hastaların küçük bir bölümünde (1: 2000) agranülositoz ve ateşin eşlik ettiği hayatı tehdit eden idiyosinkratik reaksiyon oluşabilir (635). Bu advers etkinin mekanizması tam olarak ortaya konulamamıştır ancak hidroksilamin metaboliti ve bu metabolitin ileri biyoaktivasyon ürünlerinin toksisitede rolü olduğu düşünülmektedir. Ayrıca hidroksilamin ve nitrozo-dapson reaktif metabolitleri nedeniyle oluşan Stevens-Johnson sendromunun ve methemoglobineminin de dapson tedavisi sırasında görüldüğü bildirilmiştir. Dapson kullanımında akut methemoglobinemi nadir görülür ancak anemi ve vasküler kollaps ölümle sonuçlanabilen bir advers etkidir. Ayrıca dermatit, ürtiker, eritem, toksik epidermal nekrozis gibi dermatolojik advers etkiler (636), fotosensitivite reaksiyonları, primer motor fonksiyon kayıplarının eşlik ettiği periferik nöropati ve karaciğer fonksiyon testlerinde bilirubin ve karaciğer enzimlerinin artışı, hepatik fonksiyon bozuklukları ve hepatit de bildirilmiştir (637).

Dapsonun advers etkilerinin mekanizmaları tam aydınlatılmamış olmakla beraber toksisitede ilacın aktif metabolitlerinin önemli payı olduğu düşünülmektedir (638). Toksisiteden sorumlu olan *N*-hidroksilasyon reaksiyonu temel olarak karaciğerde gerçekleşmektedir. Sıçan karaciğerinde bu reaksiyon CYP2C11 ve CYP3A1 enzimleriyle katalize edilirken (639), insanlarda *N*-hidroksilasyondan sorumlu enzimler CYP2C9, CYP3A4 ve CYP2E1'dir (640, 641). Ayrıca ilacın hepatik biyotransformasyonunda *flavin monooksijenaz* ve *prostaglandin H* sentetaz enzimleri de rol oynamaktadır. Dapson lökositlerde miyeloperoksidaz ile oksidasyona uğramaktadır (642-644).

2.6.9. Sülfafenazol

Lepra tedavisinde kullanılan sülfonamid sınıfı atipik bir antibakteriyel ilaçtır. Farmakolojik etkisini folat sentezinde görev yapan *dihidropteroilat sentaz* enzimini kompetitif tarzda inhibe ederek göstermektedir. CYP2C9 enziminin spesifik inhibitörüdür. Bu nedenle ilaç-ilaç etkileşimlerine neden olabilir. Sülfafenazol ile birlikte CYP2C9 enziminin substratı olan ilaçların kullanımı sonucu farmakolojik ve/veya toksikolojik yanıt değişebilir (645). Sülfafenazolün antiprotozoal amodiakuin, beta blokör metoprolol ve NSAİ

piroksikam ile birlikte kullanımı sonucu bu ilaçların plazma konsantrasyonlarının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca yine CYP2C9 inhibisyonu nedeniyle varfarinin aktif metabolitine dönüşümünün inhibe olduğu, bu nedenle farmakolojik etkisinin azaldığı bildirilmiştir. CYP2C9 enzimi ile detoksifiye olan deksketoprofen ile birlikte kullanıldığında deksketoprofenin advers etkileri artar (646). Sülfafenazolün terapötik plazma konsantrasyonu 35 - 75 µg/mL (0.11 – 0.24 mM), toksik plazma konsantrasyonu ise 200 - 400 µg/mL (0.64 – 1.28 mM)'dir (463).

Sülfafenazol uygulanan sıçanların kardiyak iskemik hasara daha az duyarlı olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni ilacın CYP inhibisyonuna bağlı olarak ROT oluşumunu azaltması ve oksidatif stres kaynaklı kardiyak iskemiyi engellemesidir (647). Buna karşın sülfafenazole ait toksisite bilgileri ve toksisite mekanizmalarının araştırıldığı çalışma sayısı çok kısıtlıdır.

2.6.10. Metformin

Tip II diyabet hastalarının tedavisinde kullanılan metformin, biguanid sınıfı bir antidiyabetiktir. Metforminin terapötik plazma konsantrasyonu 0.1 - 1 µg/mL (0.7 - 7 µM)'dir (463). İlaç gastrointestinal kanal absorpsiyonunu takiben intestin, karaciğer, böbrekler ve diğer birçok dokuya dağılır, büyük oranda değişmeden idrarla atılır. Metformin farmakokinetiğinde bireyler arası farklılıklar fazladır. İlacın karaciğere geçişi *organic cation transporter-1* (OCT-1) ve OCT-3, böbreklere girişi OCT-2, böbreklerden lümeneye atılımı ise multi-antimicrobial extrusion protein (MATE) taşıyıcı proteinleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler ilacın kinetiğinde ve ilaca karşı verilen yanıtta bireyler arası farklılıklara neden olur (648).

Metformin son yıllarda mitokondriyel ve hücrel etkileri nedeniyle dikkat çekmektedir. Metforminin mitokondriyel toksisitesi hala tartışmalı olup mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda metforminin *Kompleks Pi* inhibe ederek oksidatif fosforilasyonu bozduğu gösterilmiştir (649). İlaç oral yoldan kullanıldığında karaciğer, portal dolaşım nedeniyle yüksek dozda metformine maruz kalmaktadır. Enerji üretiminin azalması sonucu glukoneogenez azalır, hiperglisemi ve hiperinsülinemi tablosu oluşabilir.

Son yıllarda metformin, *mitohormesis mekanizması* yoluyla umut verici bir anti-aging ilaç olarak tanımlanmıştır. ETC'de oksijenin redüksiyonunu ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu belirli bir düzeye kadar artırarak paradoksal bir şekilde yaşlanmayı geciktirici etki yapan metforminin bu etkisi terapötik etkisinden bağımsız görünmektedir ve son 10 yıl

içerisinde ortaya konulmuştur. 2014 yılında tamamlanan bir retrospektif çalışmaya göre metformin kullanımıyla insan ömrünün 120 yıla kadar uzayacağı tahmin edilmektedir (650). Dolayısıyla metformin, Food and Drug Administration (FDA) tarafından ilk onaylanan anti-aging ilaç olacaktır (651).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

<u>Kimyasal Madde</u>	<u>Firma Adı</u>
1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB)	Sigma D68800
1,2-epoksi-3-(4-nitrofenoksi)propan (EPNP)	Sigma E7004
1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)	Sigma 138630
% 30 Akrilamid/Bis Çözeltisi	Biorad 161-0158
Amonyum persülfat (APS)	Biorad 161-0754
Anti-binding immunoglobulin protein; Bip	Proteintech 3177-S
Anti- cytochrome c oxidase IV; COXIV	Proteintech-66110-1
Anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Proteintech 60004-1-1
Anti- heat shock protein; Hsp60	Proteintech 66041-1
Anti-mouse IgG (H+I)-HRP	Proteintech-1706516
Anti-rabbit IgG (H+I)-HRP	Proteintech-1706515
Anti-voltage dependent anion channel; VDAC I	Proteintech-4661-S
Asetonitril (Acn)	Sigma 34870
Askorbik asit	Sigma 50-81-7;
Bradford	Sigma B6916
Bromofenol mavisi	SantaCruz 115-39
Dapson	Fluca 46158
Diklorometan	Merck 106054
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	AppliChem A-3006
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	AppliChem A-2945

DMEM F12	GIBCO 41966
Etanol	Merck 100986
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma E5134
Etilenglikol-bi(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraasetik asit (EGTA)	Sigma E3889
Fetal sığır serumu (FBS)	GIBCO 7F-188145
Formik Asit	Sigma 27001
Gliserol	Fluka BioChemika 49781
Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz	Sigma G8404
Glikoz-6-fosfat disodyum tuzu	Appllichem-A3789
HEPES	RES6003H-B701X
Hidrojen peroksit	Merck 108600
Hidroklorik asit	Sigma 07102
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Carlo Erba 439355
Mannitol	Merck 105982
Metformin	Sentez
Mitokondriyel DNA izolasyon kiti	Abcam-ab65321
Mitokondriyel DNA metilasyon kiti	Epigentek P-1034
Nikotinamit adenin dinükleotit fosfat (NADPH)	Appllichem -A1395
Nifedipin	Sigma 724041
Oksijen tüketim hızı tayin kiti	Luxcel Biosciences MitoXpress® Xtra Oxygen Consumption Assay Kit
Olanzapin	Abdi İbrahim İlaç hibesi
Parasetamol	96/8045-9601021

Percoll	Sigma P4937
Pirogallol	Sigma P0381
<i>p</i> -nitrofenol	Fluka 73560
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	AppliChem A-2946
Potasyum siyanür (KCN)	Riedel-De Haen AG-067103 ve Merck 3008518
PVDF membran	Biorad 162
Redükte glutasyon (GSH)	Sigma G4251
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma A8022
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma 151-21-3
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck B733062
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma S7795
Sodyum klorür (NaCl)	Atabay AT053-S30
Susuz magnezyum klorür (MgCl ₂)	M-8266
Sodyum azit (NaN ₃)	Merck K20741188
Sükroz	Merck M107651.1000
Sülfafenazol	Sigma S0758
TEMED	Biorad 161-0801
Tiyaprofenik asit	-
Trans-4-fenil-3-büten-2-on	Sigma 241091
Trietilamin	Sigma T0886
Trietilsilan	Sigma 617-86-7
Trifloroasetik asit	Sigma T6220
Tripsin-EDTA	GIBCO 25200-056

Tris baz (Tris(hidroksimetil)aminometan)	Sigma T1378
Tris-HCl	Sigma T3253
Tween 20	Sigma 9005-64-5
Valproik asit	Sigma P4543

3.1.2. Kullanılan Gereçler

Makine ve Teçhizat

Firma Adı

LC-MS/MS	Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max
Multiplaka okuyucu	Thermo Scientific Varioskan Flash
pH metre	Hanna Instruments HI 221
Santrifüj	Thermo Scientific CL31R Multispeed Centrifuge
Vorteks	Velp Scientifica Nüve NM 110 Velp Scientifica 2x ³
Manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica 100162 Wisestir MSH-20A
Su banyosu	Nüve-BM 302
Su arıtma cihazı	Millipore Direct Q
Saf su cihazı	ELGA PureLab Classic UV
Thermo shaker	BOECO Germany, TS-100
Derin dondurucu (-86°C)	New Brunswick Scientific U 410 Premium

Buzdolabı	Arçelik
Ultrasonik Banyo	Elma Transsonic T460IH
Hassas Terazi	Sartorius GP1200P
Daunce homojenizatörü	Teflon-Kolben für Potter S, BBI- 8542805
Hassas Terazi (FABAL)	Denver Instrument TB 215D
Buz Makinesi	Hoshizaki
Otomatik mikropipet	Eppendorf, Gilson
Çeker ocak	Shinsaeng Fumehood
İnkübatör	Nuaire NU-5510E
Laminar Hava Akımlı Steril Kabin	Shinsaeng SCBN-1013/1300
El homojenizatörü	Heidolp SilentCrusher
Western blotlama sistemi	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Mini Trans-Blot Module, PowerPac; 1658033

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1. Mikrozomal Fraksiyon Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

% 0.9 NaCl içeren 100 mM fosfat tamponu; pH:7.40

% 0.9 NaCl içeren 50 mM fosfat tamponu; pH: 7.40

% 25 Gliserol ve % 0.1 EDTA içeren 100 mM fosfat tamponu; pH 7.40

3.1.3.2. İnsan Dokularından Mitokondriyel Fraksiyon Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

Sükroz-mannitol tamponu (20 mM hepes, 70 mM sükroz, 220 mM mannitol, 2 mM

EDTA, 0.5 mg/ml BSA, pH: 7.50)

10 mM Tris-HCl tamponu; pH: 8.50

3.1.3.3. İnsan Dışı Türlerden Mitokondriyel Fraksiyon Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

Mitokondri izolasyon tamponu (0.3 M sükroz, 5 mM trietilsilan, 0.2 mM EGTA, % 0.1 BSA pH:7.20)

BSA'sız izolasyon tamponu (0.3 M sükroz, 5 mM trietilsilan, 0.2 mM EGTA, pH: 7.20)

3.1.3.4. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1mg/ml Albümin stok çözeltisi

Bradford çözeltisi

3.1.3.5. Western Blot Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler

1 M Tris tamponu; pH:8.80

1 M Tris tamponu; pH:6.80

% 10 Amonyum persulfat

% 20 SDS

% 30 Akrilamid-bis akrilamid çözeltisi

Laemmler tamponu (200 mM Tris-HCl; pH 6.80, % 8 SDS, % 0.4 bromofenol mavisi, % 40 gliserol)

Yürütme tamponu (250 mM Tris bazı, 1.92 M glisin, % 1 SDS)

Transfer tamponu (% 0.025 SDS, 39 mM glisin, 48 mM Tris bazı)

TBS tamponu (100 mM Tris tamponu; pH 8.00, 1.5 M NaCl)

3.1.3.6. Total GST Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

100 mM Potasyum fosfat tamponu; pH:6.50

40 mM Redükte glutatyon çözeltisi

40 mM CDNB çözeltisi

3.1.3.7. GSTM Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

100 mM Potasyum fosfat tamponu; pH:7.50

40 mM Redükte glutatyon çözeltisi

20 mM DCNB çözeltisi

20 mM trans-4-fenil-3-büten-2-on çözeltisi

3.1.3.8. GSTT Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

100 mM Potasyum fosfat tamponu; pH:6.50

40 mM Redükte glutatyon çözeltisi

20 mM EPNP çözeltisi

3.1.3.9. Total SOD Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

50 mM Tris çözeltisi

50 mM Tris tamponu; pH: 8.20 (1 mM EDTA içerir.)

10 mM HCl çözeltisi

6 mM Pirogallol çözeltisi

3.1.3.10. Mn-SOD Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

50 mM Tris çözeltisi tamponu; pH: 8.20 (1 mM EDTA ve 1 mM KCN içerir)

3.1.3.11. CAT Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

50 mM Potasyum fosfat tamponu; pH: 7.00

30 mM H₂O₂ çözeltisi

3.1.3.12. GPx Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

50 mM Tris-HCl tamponu; pH:7.60 (1 mM EDTA içerir.)

8.8 mM H₂O₂ çözeltisi

Reaksiyon karışımı

3.1.3.13. Mitokondriyel ve Mikrozomal İnkübasyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

100 mM Potasyum fosfat tamponu pH: 7.40

10 mM Parasetamol çözeltisi

10 mM Klozapin çözeltisi

50 mM Redükte glutatyon çözeltisi

50 mM NADPH çözeltisi

50 mM Glukoz-6-fosfat çözeltisi

Hareketli faz A (98.9:10:0.1 (%)) oranında *distile su: Acn : formik asit*)

Hareketli faz B (98.9:10:0.1 (%)) oranında *Acn : distile su : formik asit*)

3.1.3.14. CYP3A4 Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

0.1 M Potasyum fosfat tamponu; pH: 7.85

20 mM Nifedipin çözeltisi

10 mg/ml NADPH çözeltisi

100 mM Glukoz-6-fosfat çözeltisi

2 M NaCl içeren Na₂CO₃ tamponu; pH: 10.50

Hareketli faz (55:45:0.2 (%)) oranında *metanol : distile su : formik asit*)

3.1.3.15. CYP2E1 Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

50 mM Potasyum fosfat tamponu; pH: 6.80 (2 mM MgCl₂ ve 1 mM askorbik asit içerir)

10 mM *p*-nitrofenol çözeltisi

5 mM NADPH çözeltisi

50 mM Glukoz-6-fosfat çözeltisi

25 mM Askorbik asit çözeltisi

Hareketli faz (59.9 : 40 : 0,1 (%)) oranında *distile su : Acn : formik asit*)

3.1.3.16. Penetrasyon Testinde Kullanılan Çözeltiler

10 mM Klozapin çözeltisi

100 mM Tris tamponu; pH: 7.40

3.1.3.17. MPTP Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

Solunum tamponu (125 mM sükröz, 50 mM KCl, 5 mM HEPES, 2 mM KH₂PO₄ ve 1 mM MgCl₂; pH: 7.20)

10 mM Kalsiyum klorür çözeltisi

İlaç stok çözeltileri (Dimetilsülfoksit (DMSO) içinde 10 mM klozapin, olanzapin, nifedipin, valproik asit, dapson, tiyaprofenik asit, sülfafenazol, metformin çözeltileri)

3.1.3.18. Mitokondriyel DNA Metilasyonun Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

10 mM redükte glutatyon çözeltisi

İlaç stok çözeltileri (DMSO içinde 10 mM klozapin, olanzapin, nifedipin, valproik asit, dapson, tiyaprofenik asit, sülfafenazol, metformin çözeltileri)

3.1.3.19. Mitokondriyel Oksijen Tüketiminin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

İlaç stok çözeltileri (DMSO içinde 10 mM klozapin, olanzapin, nifedipin, valproik asit, dapson, tiyaprofenik asit, sülfafenazol, metformin çözeltileri)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücresel Fraksiyonların İzole Edilmesi

3.2.1.1. Mikrozomal Fraksiyonların Hazırlanması

3.2.1.1.1. İnsan Dokularından Mikrozomal Fraksiyon Hazırlanması

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi ve Üroloji Anabilim Dallarında sırasıyla karaciğer ve böbrek kanseri tanısı konan ve cerrahi operasyon kararı alınan hastalardan gönüllü olur formu imzasıyla sağlanan karaciğer ve böbrek doku örnekleri, laboratuvarımızda mikrozomal fraksiyon hazırlanmasında kullanılmıştır. Tüm protokol Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Yerel Etik Kurulu onayı ile (belge no = 2016-008) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 9 farklı kişiden karaciğer dokusu (4 kadın, 5 erkek) ve 8 farklı kişiden böbrek dokusu (3 kadın, 5 erkek) sağlanmıştır. Her bir birey ve doku için ayrı ayrı mikrozomal fraksiyonların elde edilmesinde kademeli santrifüj yöntemi uygulanmıştır. Bunun için 0.5 mg doku saat camı üzerinde makas ve bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılarak *g organ/2 mL* olacak şekilde fosfatla tamponlanmış serum fizyolojik çözeltisi (PBS; phosphate buffered saline, % 0.9 NaCl içeren 100 mM fosfat tamponu, pH:7.40) içeren tüplere alınmıştır. Ardından tüp lokal ısınmayı engellemek amacıyla sulu buz içeren beher içerisinde tutulurken blender tipi homojenizatör (Heidolph homogenizers SilentCrusher) yardımıyla homojenize edilmiştir (25000 rpm, 2 dk). Elde edilen doku homojenatı, önceden +4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 10 dk boyunca 12.000 *xg* hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında sitozolik ve mikrozomal fraksiyonları içeren üst faz temiz ultrasantrifüj tüplerine alınarak 105000*xg* hızda 1 saat süre ile +4°C'de santrifüj edilmiştir. Sitozolik fraksiyonu oluşturan üst faz Eppendorf tüplere alınarak farklı çalışmalar için depolanmıştır. Pellet halinde çöktürülen mikrozomal fraksiyon üzerine aynı hacimde tampon çözelti (% 0.9 NaCl içeren 50 mM fosfat tamponu; pH: 7.40) eklenerek pipet yardımıyla süspande edilmiş ve aynı koşullarda tekrar santrifüj edilerek üst faz pipet yardımıyla atılmıştır. Çöktürülen mikrozomal fraksiyon, % 25 gliserol ve % 0.1 EDTA içeren pH 7.40 100 mM fosfat tamponu içerisinde teflon homojenizatör yardımıyla homojen bir şekilde süspande edilmiş ve porsiyonlara ayrılarak deneysel çalışmalara kadar -86°C'de depolanmıştır (652). İnsan karaciğer dokularından izole edilen mikrozomal fraksiyonlar HLM (human liver microsomes), böbrek dokularından izole edilen mikrozomal fraksiyonlar ise HKM (human kidney microsomes) olarak kodlanmıştır.

3.2.1.1.2. Fare Dokularından Mikrozomal Fraksiyon Hazırlanması

Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden ticari olarak sağlanan BALB/c türü fareler, *Ege Üniversitesi Rektörlüğü İlaç Araştırma Geliştirme ve Farmakokinetik Uygulama ve Araştırma Merkezi*'ne getirilmişlerdir. Tüm protokol *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yerel Etik Kurulu* onayı ile (belge no = 21589509/39) gerçekleştirilmiştir. Adaptasyonlarının sağlanması amacıyla yüz fare, sekizerli gruplar halinde 3 gün boyunca oda ısısında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta ve uygun nem oranında bakılmış ve bu süre boyunca fareler standart laboratuvar yemi ve suyu ile beslenmişlerdir. Sürenin sonunda fareler ketamin anestezisi (i.p. 1 ml/kg vücut ağırlığı) ile uyutulmuşlardır. Karın ve göğüs boşlukları bir makas yardımıyla açılan farelerin karaciğer, böbrek ve kalpleri çıkartılmıştır. Dokular PBS ile yıkanarak porsiyonlara ayrılmış ve ardından mikrozomal ve mitokondriyel fraksiyonların izolasyonuna kadar -86°C'de depolanmıştır. Fare karaciğer ve kalp dokularından mikrozomal fraksiyonların elde edilmesinde insan dokularına da uygulanan yöntem uygulanmıştır (652). Fare karaciğer dokusundan hazırlanan mikrozomal fraksiyonlar MLM (mouse liver microsomes), böbrek dokusundan hazırlanan mikrozomal fraksiyonlar ise MHM (mouse heart microsomes) olarak adlandırılmıştır.

3.2.1.2. Mitokondriyel Fraksiyon Hazırlanması

3.2.1.2.1. İnsan Dokularından Mitokondriyel Fraksiyon Hazırlanması

Adli Tıp Kurumu İzmir Grup Başkanlığı tarafından gerçekleştirilen otopsiler sırasında, ölen kişinin yasal temsilcisinden önceden onay alınmış ve bu çalışmada kullanılmak üzere karaciğer ve kalp dokuları sağlanmıştır. Bu örneklerin alınabilmesi için *Adli Tıp Kurumu Başkanlığı*'ndan ve *Ege Üniversitesi Yerel Etik Kurulu*'ndan gerekli onaylar sağlanmıştır (belge no = 21589509/39). Doku örneklerinin alınmasında dâhil olma ölçütleri olarak otopsi yapılan kişilerin 18-50 yaş aralığında olması ve örnek alınacak dokularda herhangi bir kalıtsal ya da sonradan kazanılmış hastalık olmaması ya da hasar gelişmemiş olması esas alınmıştır. Karaciğer nispeten homojen bir doku olduğundan herhangi bir bölgesinden, ancak anatomik olarak portal üçlü ve hepatik venle birlikte safra kanallarını mutlaka içerecek şekilde, kalp dokusu olarak miyokard, böbrek dokusu olarak ise korteksten papillaya doğru tüm anatomik tabakaları içerecek şekilde doku örneği adli tıp hekimi tarafından alınmıştır (n=12, 5 kadın, 7 erkek). Doku örnekleri soğuk zincir koşullarında *Ege Üniversitesi. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı*'na ulaştırılmıştır.

Karaciğer, kalp veya böbrek dokusunun 1.5 g'ı petri kabı üzerinde bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Cam Potter homojenizasyon tüpüne alınan doku, 5mL sükröz-mannitol tampon çözeltisi (20 mM hepes, 70 mM sükröz, 220 mM mannitol, 2 mM EDTA, 0.5 mg/ml BSA, pH: 7.50) içinde teflon havaneli yardımıyla 20-30 vuruş uygulanarak homojenize edilmiştir. Doku homojenatı aynı tamponla 15 mL'ye tamamlanarak, +4°C'de 10 dk boyunca önce 600 xg, sonra ise 650 xg hızda santrifüj edilmiştir. Patlamamış hücreler, nispeten büyük membran parçaları ve dansitesi yüksek olan nükleus çökeltisinin uzaklaştırılmasının ardından üst faz 8000xg hızda 15 dk boyunca tekrar santrifüj edilerek mitokondrielerin çökmesi sağlanmıştır. Bu ham mitokondriyel ekstraktın sükröz-mannitol tampon çözeltisiyle iki kez yıkanmasının ardından (8000xg, 15 dk, +4°C) sükröz gradiyenti yöntemiyle saflaştırma aşamasına geçilmiştir. Ham mitokondri ekstraktı, 0.8 M sükröz çözeltisi üzerine eklenmiş ve 14000xg hızda 30 dk boyunca santrifüj edilerek mitokondriyel fraksiyonun diğer hücresel kontaminantlardan ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen pellet, iki kez sükröz-mannitol tamponu ile yıkanmış (8000xg, 15 dk, +4°C) ve "saf mitokondri fraksiyonu" elde edilmiştir (67, 434).

Mitokondriyel membran ve matriks fraksiyonlarının ayrı ayrı izole edilebilmesi amacıyla mitokondriyel sonikasyon işlemi uygulanarak patlatılmıştır. 30 kHz'de her biri 10'ar sn olacak şekilde üç kez sonikasyon uygulanmış, membran ve matriks fraksiyonları santrifüjle birbirinden ayrılmıştır (160000xg, 1 saat, +4°C). Membranların 10 mM pH: 8.50 Tris-HCl tamponu ile yıkanarak (160000xg, 1 saat, +4°C) matriksten tamamen temizlenmesi sağlanmıştır. Her iki fraksiyon da deneysel çalışmalar gerçekleştirilene kadar -86°C'de saklanmıştır (653).

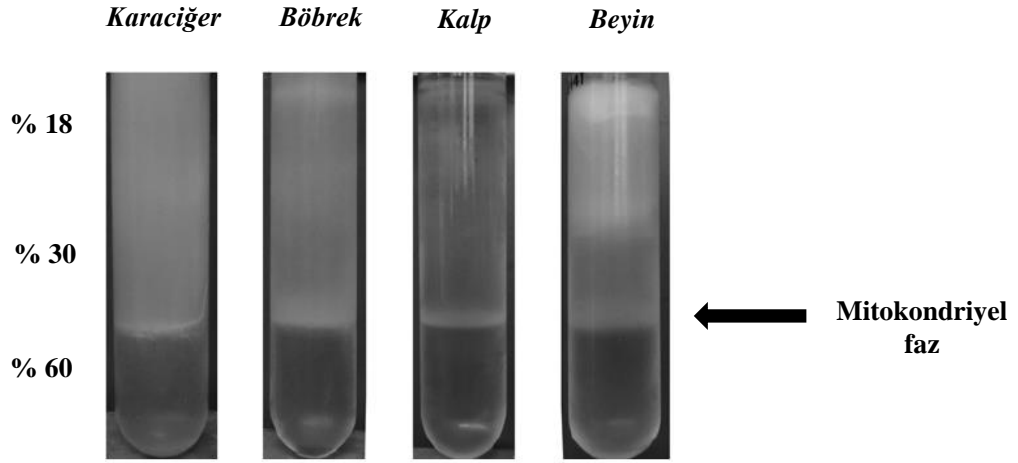
Karaciğer dokusundan izole edilen mitokondri fraksiyonu "LMit" (liver mitochondria), kalp dokusundan izole edilen mitokondri fraksiyonu ise "HMit" (heart mitochondria) olarak isimlendirilmiştir. Mitokondriyel membranlar doku kaynağına bağlı olarak LMM (liver mitochondrial membranes), HMM (heart mitochondrial membranes) olarak kodlanırken, matriks fraksiyonları ise LMx (liver mitochondrial matrix), HMx (heart mitochondrial matrix) olarak kodlanmıştır.

3.2.1.2.2. İnsan Dışı Türlerden Mitokondriyel Fraksiyon Hazırlanması

Klozapin biyotransformasyon çalışmalarında BALB/c türü fare karaciğer ve kalp dokusu, ilacın mitokondri içerisine penetrasyonu deneyinde Wistar albino türü sıçan karaciğer dokusu kullanılmıştır. MPTP deneyleri için sığır karaciğer dokusundan mitokondri izolasyonu yapılmıştır. Cam Potter homojenizasyon tüpü içine alınan 1 g doku, 5 mL

mitokondri izolasyon tampon çözeltisi (0.3 M Sükröz, 5 mM trietilsilan, 0.2 mM EGTA, % 0.1 BSA pH: 7.20) içinde 20-30 vuruş uygulanarak homojenize edilmiştir. Doku homojenatı, aynı tampon çözelti ile 30 mL'ye tamamlanarak 15 mL'lik iki ayrı falkon tüpe ayrılmış ve +4°C'de 800xg hızda 10 dk boyunca iki kez santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üst faz +4°C'de 9.000xg hızda 10 dk boyunca santrifüj edilmiş ve ham mitokondri ekstraktı (crude mitochondrial extract) elde edilmiştir. MPTP deneyinde ham mitokondri ekstraktı kullanılırken, diğer deneyler için saflaştırma aşamasına geçilmiştir.

Ham mitokondriyel ekstraktı, 4 mL % 18'lik Percoll çözeltisi içinde süspande edilerek üzerine 4'er mL damla damla sırasıyla % 30 ve % 60'lık Percoll çözeltileri eklenmiş ve ardından karaciğer mitokondrileri için 9000 xg, kalp mitokondrileri içinse 29000 xg hızda santrifüj işlemi uygulanmıştır (+4°C; 10 dk). Santrifüj sonunda % 30 ve % 60'lık Percoll gradiyentleri arasında kalan saf mitokondriyel fraksiyon cam pastör pipeti yardımıyla toplanmıştır (Şekil 2). Toplanan mitokondri fraksiyonu sığır serum albümini (BSA) içermeyen izolasyon tamponu çözeltisi ile (0.3 M sükröz, 5 mM trietilsilan, 0.2 mM EGTA, pH: 7.20) 9000 xg hızda 10 dk boyunca iki kez yıkanmıştır. Mitokondriyel membranların (MM) ve çözüdür fraksiyon olan matriksin (Mx) elde edilebilmesinde mitokondriler sonikasyon ile patlatılmıştır. Üçer kez 30 kHz'de 10 sn boyunca sonikasyon uygulamasının ardından ekstraktlar +4°C'de ve 147000 xg hızda 1 saat boyunca santrifüj edilmiştir. Üst fazı oluşturan matriks fraksiyonu ve çöken mitokondri membran fraksiyonu, porsiyonlara ayrılarak planlanan deneysel çalışmalar gerçekleştirilene kadar -86°C'de saklanmıştır (13, 654).



Şekil 2. Percoll dansisite gradiyenti (% 18, 30 ve 60) yardımıyla farklı dokulardan mitokondriyel fraksiyon izole edilmesi. Mitokondriyel fraksiyon % 30 - % 60 Percoll gradiyentleri arasında toplanmıştır (13)

3.2.2. Protein Miktar Tayini

Mikrozomal ve mitokondriyel fraksiyonların protein miktar tayinleri Bradford yöntemine göre 96 kuyucuklu plakalarda yapılmıştır(655). 1 mg/mL stok BSA çözeltisinden hareketle bir seri protein standart çözeltisi (125, 250, 500, 750, 1000 µg/mL BSA) hazırlanmış, kör çözelti olarak distile su kullanılmıştır. Her bir örnek, kör ve standart çözeltisinin 5 µL'si üzerine 250 µL Bradford çözeltisi eklenmiştir. 5 dk boyunca oda ısısında gerçekleştirilen inkübasyonun ardından 595 nm'de kuyucukların absorbansı ölçülmüştür. Standart seriden hareketle elde edilen kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi yardımıyla örneklerin toplam protein miktarları hesaplanmıştır.

3.2.3. Western Blot Tekniğiyle Saflık Kontrolü

Mikrozomal ve mitokondriyel fraksiyonların saflık derecesi, Western blot (WB) tekniğiyle kontrol edilmiştir. Bu tekniğin kullanılmasının iki amacı vardır, birincisi izolasyonun başarılı olup olmadığının, yani izole edilmek istenen hücresel fraksiyonun gerçekten elde edilip edilemediğinin anlaşılmasıdır. İkinci amaç ise izole edilen fraksiyonun saflığının, yani diğer hücresel bileşenlerle kontamine olup olmadığını belirlenmesidir. Bu amaçlarla Towbin ve ark.'nın 1979 yılında yayımladıkları yöntem, laboratuvarımızda bazı değişikliklerle uygulanmıştır (656).

Mikrozomal ve mitokondriyel fraksiyonların izole edilebildiğini ve bu iki fraksiyonun birbiriyle ya da diğer hücrel fraksiyonlarla kontamine olup olmadığını göstermek üzere seçilen proteinler Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3. Hücrel fraksiyonların izole edilebildiğini ve birbirleriyle kontaminasyon derecesini belirlemeye yönelik seçilen ve western blot tekniğinde kullanılan markör proteinler (657).

<i>Mitokondriyel Proteinler</i>		
Protein (kısaltma)	Bulunduğu fraksiyon	kDa
Voltage dependent anion channel; VDAC	Dış membran	31-33
Cytochrome c oxidase IV; COXIV	İç membran	17-18
Heat shock protein 60; Hsp60	Matriks	60
<i>Sitozolik Proteinler</i>		
Protein (kısaltma)		kDa
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH		36
<i>ER Spesifik Proteinler</i>		
Protein (kısaltma)		kDa
Binding immunoglobulin protein; Bip / Glucose-regulated protein; GRP78		78

Mikrozomal ve mitokondriyel proteinler (10-50 µg) % 12 sodyumdodesil sülfat-poliakrilamid jeli’ne (SDS/PAGE) uygulanmış ve elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektriksel voltaj 15 dk boyunca 80 V değerinde tutulmuş, proteinlerin aynı hizaya gelmesinin ardından ise 120 V’a çıkarılmıştır. Jel üzerinde yürümesi tamamlanan proteinler polivinilidin florür (PVDF) membrana aktarılmıştır; transfer işlemi 2 saat boyunca 120 V uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Uygulanacak olan antikorlar ile membranların spesifik

olmayan etkileşimlerini önlemek amacıyla bloklama işlemi uygulanmış, membranlar TBS-T (% 0.1 Tween 20 içeren Tris tamponu) içinde % 5'lik süt tozu ile 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından her bir membran üzerine varlığı araştırılan proteine özgü anti-GRP78/Bip (tavşan, poliklonal, 1:5000), anti-VDAC1/porin (tavşan, poliklonal, 1:2000), anti-COX IV (tavşan, poliklonal, 1:5000) ve anti-HSP60 (tavşan, poliklonal, 1:10000) primer antikorları belirtilen dilüsyon oranlarında uygulanarak gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Primer antikor inkübasyonunun ardından TBS-T ile membranlar iki kez yıkanmış, sekonder antikor uygulaması amacıyla Horseradish peroxidase (HRP)-konjuge antikor ile (1:3000) 2 saat inkübe edilmiştir. Sekonder antikor uygulanmasının ardından membranlar TBS-T çözeltisi ile üç kez yıkanmış ve görüntüleme işlemi için 2 mL kemilüminesans substratı membran yüzeyine steril bir pipetle uygulanarak reaksiyon için 2 dk beklenmiştir. Kemilüminesans ajanı, ikincil antikor ile aynı konjuge grubu taşıdığı için bu antikora bağlanarak ışımaya yapmaktadır. FUSION FX7 kemilüminesans jel görüntüleme sistemi yardımıyla membranlardaki bantların görüntülenmesi sağlanmıştır (656).

3.2.4. İlaç Biyoaktivasyon Çalışmaları

3.2.4.1. Bireyler ve Organlararası Parasetamol Biyoaktivasyonu Farklılığı Çalışması

3.2.4.1.1. Mikrozomal Çalışmalar

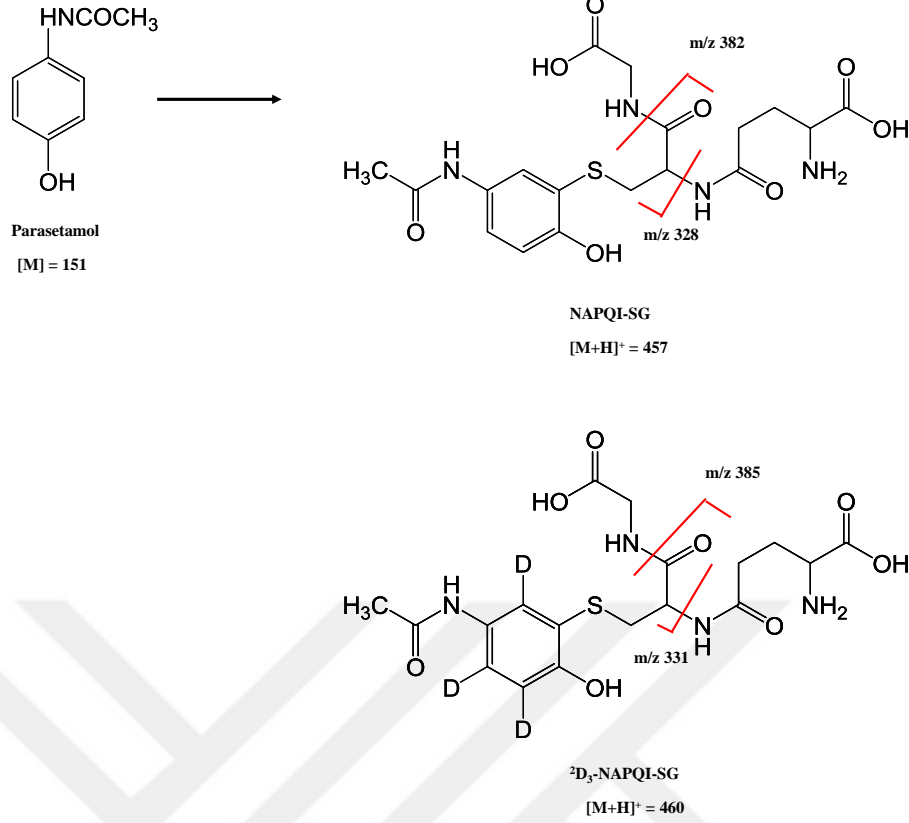
3.2.4.1.1.1. Oluşan NAPQI'nın Miktar Tayini

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi ve Üroloji Anabilim Dalları'ndan sağlanan 9 farklı hastaya ait karaciğer ve 8 farklı hastaya ait böbrek doku örneklerinden hazırlanan mikrozomal fraksiyonlarla parasetamolün *in vitro* inkübasyonları gerçekleştirilmiş ve her bir dokunun parasetamolden NAPQI reaktif metabolit oluşturma kapasitesi belirlenmiştir. Son hacmi 250 µL olan inkübasyonlarda 100 mM potasyum fosfat tamponu çözeltisi (pH 7.40, 5 mM MgCl₂ içeren) içerisine sırasıyla son konsantrasyonu 250 µM olacak şekilde parasetamol, 5 mM GSH, 1mg *protein /mL* HLM ya da HKM eklenmiştir. 500 µM NADPH (bazı inkübasyonlarda ayrıca NADPH-üretici sistem (NRS); 500 µM glukoz-6-fosfat ve 1 U/mL *glukoz-6-fosfat dehidrojenaz* dâhil edilmiştir) eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Çalkalamalı blok ısıtıcıda 300 rpm devirde ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübasyon gerçekleştirildikten sonra reaksiyon, 50 µL fosforik asit (% 10, V/V) eklenmesiyle sona erdirilmiştir. İnternal standart (I.S.) olarak laboratuvarımızda daha önce sentezlenen [²D₃]-NAPQI-SG, son konsantrasyonu 5 µM olacak şekilde inkübasyon ortamlarına eklenmiştir. 14000xg hızda 25°C'de 10 dk boyunca santrifüj işlemi uygulanarak

üst berrak fazlar viyallere aktarılmış ve 25 µL örnek, guard kolon bağlı HPLC kolonuna enjekte edilmiştir (Phenomenex Inertsil, ODS-2.5 µm 4.6x15 mm). HPLC sistemi Thermo Accela system controller, LC gradiyent pompa, kolon fırını, enjektör ve bir ultraviyole (UV) detektörden (254 nm) oluşmaktadır. Yüzde 0.2 formik asit içeren su içerisinde asetonitril (Acn) gradiyenti uygulanmıştır; % 1 Acn ile başlanmış, 20 dk sonunda % 99 Acn'e çıkılmış, 2 dk sonra % 10'a, 3 dk sonra ise tekrar % 1 Acn'e dönmüştür. Akış hızı 0.5 mL/dk'dır. HPLC-UV detektöründen çıkan elüent, elektrosprey iyonizasyon kaynağı içeren triple quadropole kütle spektrometresine yönlendirilmiştir (Thermo Quantum Access Max). Kütle spektrometresi, NAPQI-SG konjugatının $[M+H]^+$ iyonundan piroglutamik asitin nötral kaybı ve glisin kaybını izlemek için pozitif iyonizasyon (+ESI) ile *selected reaction monitoring* (SRM) modunda çalıştırılmıştır. Ana molekül parasetamol, NAPQI-SG ve I.S. $[^2D_3]$ -NAPQI-SG için izlenen reaksiyonlar ve oluşan kütle fragmentleri Şekil 3 ve aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Madde	Başlangıç iyonu $[M + H]^+$	Parçalanma ürünü (m/z)	İyonizasyon enerjisi (V)
Parasetamol	152	110 131	20
NAPQI-SG	457	328 382	20
$[^2D_3]$ -NAPQI-SG	460	331 385	20

Elüent püskürtücü (nebulizer), yardımcı (auxiliary) ve kaplayıcı/kılıf (sheath) gaz olarak azot gazı kullanılmıştır. Buharlaştırıcı ve kapiller sıcaklıkları sırasıyla 350°C ve 370°C'dir. Kapiller voltaj 3500 V, nebulizer gaz basıncı 40 psig, m/z tarama aralığı 50-1000, tarama sıklığı 1.003 *spektra/sn* olarak ayarlanmıştır. Çarpışma (collision) enerjisi hem doğal konjugat hem de döteryum işaretli konjugat için 20 V olarak uygulanmıştır.



Şekil 3. NAPQI-SG ve I.S. ²D₃-NAPQI-SG'nin pozitif elektrosprey iyonizasyonu sonrasında izlenen reaksiyonları ve kütle fragmentleri

Her bir inkübasyon ortamında oluşan metabolitin miktar tayininin gerçekleştirilmesi amacıyla 5 µM I.S. içeren parasetamol standart çözeltileri (0.5, 0.25, 0.125 ve 0.0625 mM) hazırlanarak LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Her bir standart çözeltideki parasetamol pik alanı, I.S. pik alanına bölünmüş ve bu pik alanı oranları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Her bir örneğin pik alan oranı [*Pik alanı*_(PAR)/*Pik alanı*_(I.S.)] kullanılarak inkübasyon ortamlarında oluşan NAPQI-SG miktarları, doğru denklemden hareketle hesaplanmıştır. Ardından protein başına oluşan NAPQI-SG miktarları karşılaştırmalı olarak grafiğe geçirilmiştir.

3.2.4.1.1.2. NAPQI-SG Oluşumda NADPH Bağımlılığının Belirlenmesi

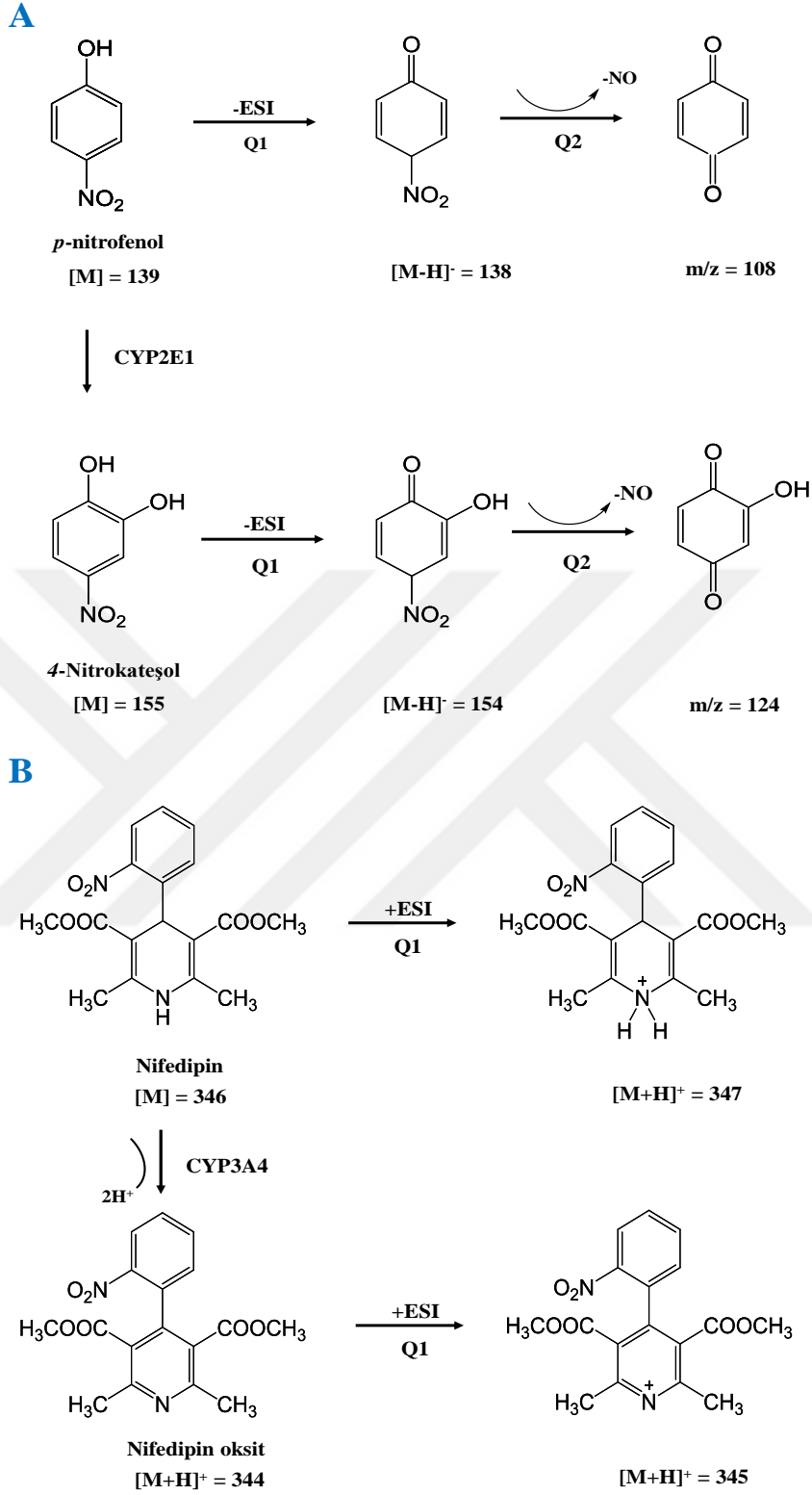
NAPQI-SG oluşumunun sürekli elektron akışına bağlı olup olmadığının araştırılması amacıyla NRS içeren ve içermeyen HLM ve HKM inkübasyonları eşzamanlı gerçekleştirilmiştir. 9 ayrı HLM (+/- NRS) ve 8 ayrı HKM (+/- NRS) inkübasyonlarında

oluşan NAPQI-SG miktarlarının ortalama değerleri belirlenerek NRS gerekliliği her iki organ için ayrı ayrı belirlenmiştir.

3.2.4.1.1.3. Bireyler Arası Mikrozomal CYP3A4 Aktivite Farklılıkları

CYP3A4 enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla enzim tarafından katalize edilen nifedipin oksidasyonu reaksiyonundan yararlanılmıştır (658). İnsan dokularına oldukça zor ve çok az miktarda ulaşıyor olması nedeniyle literatürde HPLC için tanımlanmış aktivite ölçüm yöntemi tarafımızdan LC-MS cihazına uyarlanmış, daha az doku ile yüksek hassasiyet, doğruluk ve seçicilikte bir analiz hedeflenmiştir. Bu amaçla geliştirilen yöntemde 1/10 oranında mikrozom ile çalışılmıştır.

Dokuz ayrı HLM ve 8 ayrı HKM ile nifedipinin *in vitro* inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. Nifedipin son konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde 0.1 M potasyum fosfat tamponu çözeltisi içerisinde (pH:7.85) ve 10 µL mikrozom (HLM ya da HKM) süspansiyonu varlığında inkübe edilmiştir. Inkübasyonlar amber renkli viyallerde, son hacim 425µL olacak şekilde yapılmıştır. Çalkalamalı blokta 5 dk süreyle 37°C'de tutulmasının ardından her inkübasyon ortamına 75 µL NADPH ve NRS karışımı (10 mg/mL NADPH, 100 mM glukoz-6-fosfat, 1 U/mL *glukoz-6-fosfat dehidrojenaz*) eklenmesiyle oksidasyon başlatılmıştır. 37°C'de 10 dk inkübasyon sonrasında 2 mL diklorometan ve 100 µL Na₂CO₃ (1 M) tamponu çözeltisi (2 M NaCl içeren) eklenmiş ve devamında 15 dk süreyle 1 000xg'de santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. Berrak alt faz, azot gazı yardımıyla kuruluğa kadar uçurulmuş ve kalıntı 100 µL metanolde çözülerek teknik ayrıntıları bir önceki başlık altında tanımlanan HPLC-MS sistemine enjekte edilmiştir. Farklı olarak Symmetry Shield (RP18 3.5 µm 4.6x100 mm) HPLC kolonu kullanılmış, enjeksiyon hacmi 25 µL, akış hızı 0.7 mL/dk, analiz süresi 25 dk ve gradiyent yerine izokratik akış uygulanmıştır. Hareketli faz olarak 55:45:0.2 (%) oranında *metanol : distile su : formik asit* kullanılmış, SRM yerine (+ESI) Q1MS modunda çalışılmıştır. Nifedipinin moleküler parçalanma profilinin tayin edilmesi için 1 ppm nifedipin çözeltisi infüzyon şeklinde doğrudan MS detektöre verilmiş ve en uygun analiz yöntemi oluşturulmuştur.



Şekil 4. CYP2E1 ve CYP3A4 enzim aktivitelerinin LC-MS ile aktivite ölçümünde kullanılan iki substratın elektrosprey iyonizasyonu sonucu izlenen reaksiyonları. A: *p*-Nitrofenol ve metaboliti 4-nitrokatekolün Q1 ve Q2 iyonizasyonları ve oluşan iyonları. B: Nifedipin ve piridin türevi metabolitinin Q1 iyonizasyonları ve protonlanmış iyonları.

İnfüzyon sırasında belirlenen koşullara göre kapiller voltaj 3500V, azot gazı sıcaklığı 350°C, nebulizer gaz basıncı 40 psig, iyonizasyon enerjisi 25 V, m/z tarama aralığı 50-1000, tarama sıklığı 1.003 *spektra/sn* olarak ayarlanmıştır. LC-MS'de izlenen reaksiyonlar ve oluşan iyonlar Şekil 4 ve aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Madde	Başlangıç iyonu [M + H] ⁺	İyonizasyon enerjisi (V)
Nifedipin	347	25
Nifedipin oksit	345	25

Nifedipin ve nifedipin oksitin (piridin türevi metabolit) Q1 iyonizasyonları, MS detektörü yardımıyla izlenmiştir. Örneklerde oluşmuş nifedipin oksit metabolitinin pik alanları belirlenmiştir. Miktar tayininin gerçekleştirilmesi amacıyla standart nifedipin çözeltileri (0.2, 0.01, 0.005 ve 0.0025 mM) hazırlanarak LC-MS'e enjekte edilmiş ve pik alanları belirlenmiştir. Her bir standart çözeltinin konsantrasyonuna karşı pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu denklemi yardımıyla her bir örnekteki ana madde ve metabolit konsantrasyonları hesaplanmıştır. Hem aynı organ için bireyler arası, hem de aynı bireyde organlar arası CYP3A4 farklılıkları belirlenmiştir.

3.2.4.1.1.4. Bireyler Arası Mikrozoal CYP2E1 Aktivite Farklılıkları

CYP2E1 aktivitesi bu enzim tarafından katalize edilen *p*-nitrofenol'ün 4-nitrokatekol metabolitine yükseltgendiği oksidasyon reaksiyonu aracılığı ile ölçülmüştür. Elbarbry tarafından 2006 yılında geliştirilen HPLC analiz yöntemi laboratuvarımızda LC-MS/MS cihazına uyarlanmıştır (659).

Dokuz ayrı HLM ve 8 ayrı HKM ile *p*-nitrofenol'ün *in vitro* inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. Final hacim olan 0.5 mL içerisinde son konsantrasyonu 0.2 mM olacak şekilde *p*-nitrofenol, 0.4 mg *protein/mL* HLM veya HKM, 1 mM NADPH ve NRS (5 mM glukoz-6-fosfat ve 1 U/mL *glukoz-6-fosfat dehidrojenaz*) varlığında 50 mM fosfat tamponu çözeltisi içinde (pH: 6.80, 2 mM MgCl₂ ve 1 mM askorbik asit içeren) inkübe edilmiştir. Bir saat süreyle 37°C sıcaklıkta ve 300 rpm hızda çalkalamalı blokta gerçekleştirilen inkübasyonun ardından 10000xg'de 15 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üst berrak fazlar

viyallere aktarılarak HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. HPLC kolonu olarak Symmetry Shield (RP18, 3.5 µm 4.6x100 mm) kullanılmış, enjeksiyon hacmi 50 µL, akış hızı 0.7 mL/dk, analiz süresi 25 dk ve hareketli faz olarak *distile su : Acn : formik asit* (% 59.9 : 40 : 0.1) ile izokratik akış uygulanmıştır. UV deteksiyonun ardından elüent önceki bölümde tanımlanan triple quadrupole-kütle spektrometresine yönlendirilerek negatif iyonizasyon-elektrosprey modunda (-ESI) analiz edilmiştir. Biyolojik örneklerin analizi öncesinde moleküler parçalanma profilinin tayin edilmesi için 1 ppm *p*-nitrofenol çözeltisi, infüzyon tekniğiyle doğrudan MS detektöre uygulanmış, optimum analiz koşulları belirlenerek yöntem oluşturulmuştur. MS detektörde *p*-nitrofenol ve 4-nitrokatekolden Q1 iyonizasyon sırasında oluşan [M-H]⁻ iyonlarının her ikisinden NO grubunun kaybı, negatif iyonizasyon (-ESI) ile SRM modunda izlenmiştir. İzlenen reaksiyonlar ve kütleler Şekil 4 ve aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Madde	Ana iyon (m/z)	Parçalanma ürünü (m/z)	İyonizasyon enerjisi (V)
<i>p</i> -nitrofenol	138	46 108	22
4-nitrokatekol	154	124	15

Miktar tayininin gerçekleştirilmesi amacıyla standart *p*-nitrofenol çözeltileri (0.2, 0.01, 0.005 ve 0.0025 mM) hazırlanarak LC-MS/MS ile analiz edilmiş ve pik alanları belirlenmiştir. Konsantrasyona karşı pik alanı grafiği çizilerek kalibrasyon doğrusu hazırlanmış ve doğru denklemi elde edilmiştir. Her bir örnekte oluşmuş olan 4-nitrokatekol metabolitinin miktar tayini yapılarak CYP2E1 aktiviteleri hesaplanmıştır. Böylece hem aynı organ için bireyler arası CYP2E1 aktivite farklılıkları hem de aynı birey için organlar arası farklılıklar belirlenmiştir. Her iki enzimin aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Enzim aktivitesi} = \text{nmol (ürün)} / \text{nmol (P450)} / \text{inkübasyon süresi}$$

1 mg karaciğer mikrozomal proteindeki P450 miktarı 0.75 nmol, 1 mg böbrek mikrozomal proteindeki P450 miktarı 0.22 nmol kabul edilerek inkübasyon ortamlarındaki "nmol P450" değeri, her bir mikrozomun total protein değerinden hesaplanmıştır (658).

3.2.4.1.2. Mitokondriyel Parasetamol Biyotransformasyonu

Mitokondrilerin NAPQI oluşturma kapasitesinin araştırılması amacıyla sıçan karaciğer ve kalp dokularından izole edilen mitokondriyel fraksiyonlar, *in vitro* koşullarda parasetamolle inkübe edilmiştir. Enzim kaynağı olarak taze izole edilen mitokondriyel membran ya da matriks fraksiyonu kullanılmış, inkübasyon ortamındaki protein son konsantrasyonu olarak da *0.5 mg protein/mL*, membran+matriks inkübasyonlarında ise *1 mg protein/mL* olacak şekilde uygulanmıştır.

İki ayrı kontrol inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Kontrol inkübasyonlarından ilki “-Enzim -GSH”, yani hem enzim kaynağı hem de GSH yokluğunda gerçekleştirilen inkübasyondur. İkinci kontrol inkübasyonu “-Enzim +GSH”, yani enzim kaynağı yokluğunda ancak GSH varlığında gerçekleştirilen inkübasyondur. İnkübasyon ortamındaki konsantrasyonu 100 µM olan parasetamol, mitokondriyel enzim kaynakları ile 100 mM potasyum fosfat tamponu çözeltisi (pH 7.40, 5 mM MgCl₂ içeren) içerisinde inkübe edilmiştir. 250 µL’lik inkübasyon ortamına 5 mM GSH eklenmesinin ardından 1 mM NADPH ve NRS (1 mM G6P, 1 U/mL G6PD) eklenmesiyle inkübasyon başlatılmıştır. Çalkalamalı blok ısıtıcıda 1 saat boyunca 300 rpm devir ve 37°C’de inkübasyon gerçekleştirilmiş, reaksiyon % 10 (V/V) Acn eklenmesiyle sonlandırılmıştır. 14 000xg hızda 25°C’de 10dk boyunca santrifüj işlemi uygulanarak üst berrak fazlar viallere aktarılmış ve örnekler LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. LC-MS/MS analiz koşulları “*Oluşan NAPQI’in Miktar Tayini*” başlığı altında ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Her bir inkübasyon ortamında oluşan NAPQI’in pik alanları, inkübasyon ortamının protein miktarı başına grafiğe geçirilerek farklı mitokondriyel enzim kaynaklarının biyoaktivasyon kapasitesi birbiriyle kıyaslanmıştır.

3.2.4.2. Klozapin Biyoaktivasyonu Çalışmaları

3.2.4.2.1. Mitokondriyel Klozapin Biyotransformasyonu

Klozapinin mitokondriyel (LMM, HMM, LMx, HMx) ve mikrozomal (LM, HM) inkübasyonları, Balb/c soyundan fare karaciğer ve kalbinden elde edilen fraksiyonlarla gerçekleştirilmiştir. Karaciğer ve kalp dokularından hem mitokondriyel hem de mikrozomal fraksiyonların izolasyonu sağlanmıştır. İnkübasyonlar ve kontrol inkübasyonları bir önceki bölümde parasetamol için tarif edildiği gibi yapılmıştır.

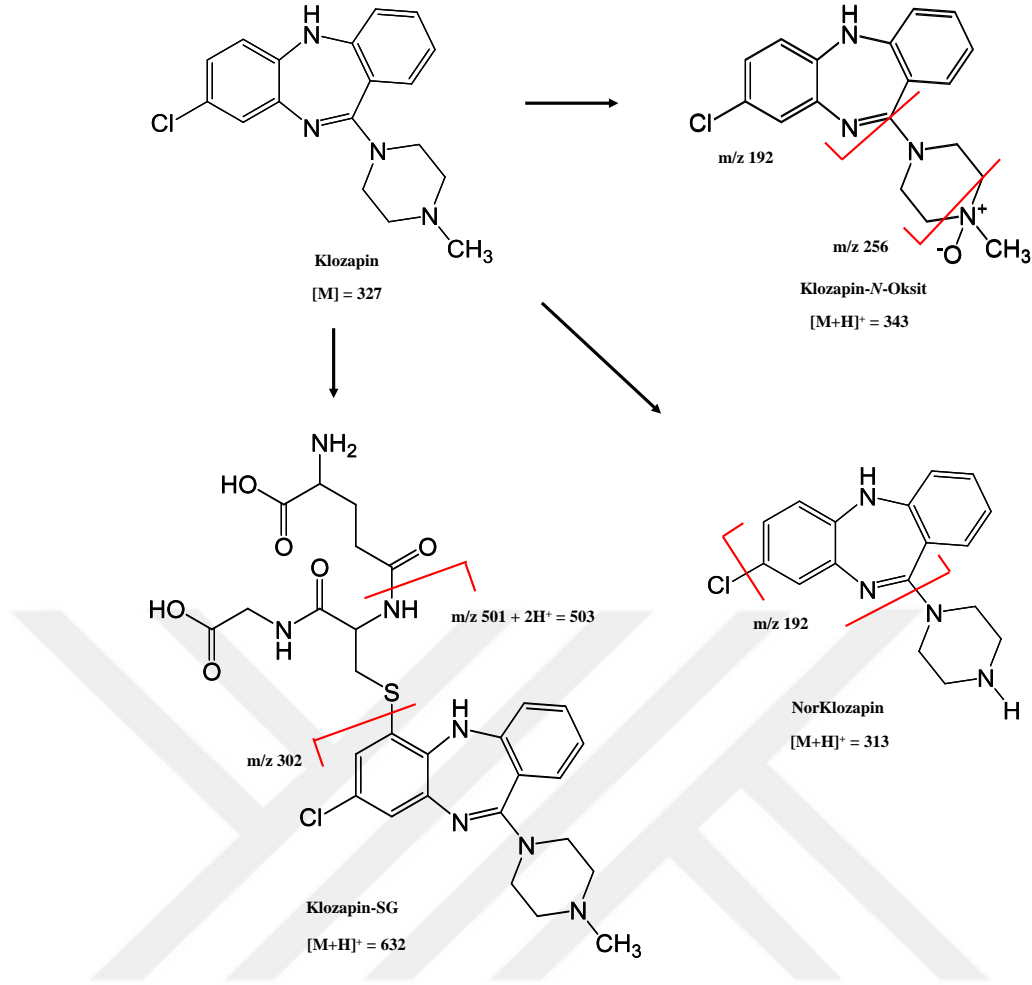
İnkübasyon ortamındaki konsantrasyonu 100 µM olan klozapin, farklı enzim kaynakları ile 100 mM potasyum fosfat tamponu çözeltisi (pH 7.40, 5 mM MgCl₂ içeren)

içerisinde inkübe edilmiştir. 250 µL'lik inkübasyon ortamına 5 mM GSH eklenmesinin ardından 1 mM NADPH ve NRS (1 mM G6P, 1 U/mL G6PD) eklenmesiyle inkübasyon başlatılmıştır. Çalkalamalı blok ısıtıcıda 1 saat boyunca 300 rpm devir ve 37°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiş, reaksiyon % 10 (V/V) Acn eklenmesiyle sonlandırılmıştır. 14 000xg hızda 10 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulanarak üst berrak faz viyallere alınmış ve LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Her bir inkübasyon ortamında oluşan stabil metabolitler NorKLZ, KLZ-N-Oksit ile reaktif nitrenyum iyonunun GSH konjugatına (KLZ-SG) ait pik alanları belirlenmiştir. Her 3 metabolit için izlenen reaksiyonlar ve oluşan iyonlar Şekil 5'de gösterilmiştir. Pik alanları, inkübasyon ortamının protein miktarı başına grafiğe geçirilerek farklı enzim kaynaklarının biyoaktivasyon kapasitesi birbiriyle kıyaslanmıştır (485).

Triple quadrupole LC-MS/MS analizi, önceki bölümlerde tanımlanan Thermo Quantum Access Max cihazında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kolon "Phenomenex Inertsil, ODS-2 RP18, 5 µm 4.6x15 mm", enjeksiyon hacmi 25 µL, akış hızı 0.7 mL/dk, analiz süresi 25 dk'dır. UV analizinde kullanılan dalga boyu 254 nm'dir. Hareketli faz A [Distile su: Acn: formik asit (% 98.8:1:0.2)] ve hareketli faz B [distile su: Acn: formik asit (% 1:98.8:0.2)] olmak üzere 2 ayrı hareketli faz ile gradiyent elüsyon uygulanmıştır. HPLC kolonundan başlangıçtan 3. dk'ya kadar % 100 A geçirilmiş, 20 dk.'da % 100 B'ye birim zamanda doğrusal değişimle çıkılmış, 22. dk.'da % 90 A'ya, 25. dk.'da ise tekrar % 100 A'ya dönmüştür.

Klozapin ve metabolitleri elektrosprey-pozitif iyonizasyon ile (+ESI) SRM modunda analiz edilmiştir. Kapiller voltaj 3500 V, azot gazı sıcaklığı 350°C, nebulizer 40 psig, iyonizasyon enerjisi 25 V, *m/z* tarama aralığı 50-1000, tarama sıklığı 1.003 *spektra/sn* olarak ayarlanmıştır. LC-MS/MS analizinde izlenen reaksiyonlar, parçalanma ürünü iyonlar ve iyonizasyon enerjileri Şekil 5 ve aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Madde	Ana iyon (m/z)	Parçalanma ürünü (m/z)	İyonizasyon enerjisi (V)
Klozapin	328	271	39
KLZ-N-Oksit	343	192 256	55
NorKLZ	313	192	52
KLZ-SG	632	503 302	40



Şekil 5. Klozapin biyotransformasyonu analizinde izlenen reaksiyonlar ve oluşan iyonlar.

3.2.4.2.2. Mitokondriyel Penetrasyonun Belirlenmesi

In vivo koşullarda hücre sitoplazmasına kadar ulaşan klozapinin karaciğer ve kalp mitokondrisine ne kadarının geçtiğinin belirlenmesi amacıyla sıçanların karaciğer ve kalp dokusundan intakt mitokondri elde edilmiş ve 2 saat içinde kullanılmıştır.

Mitokondri içerisine geçme oranını belirlemek üzere 100 µM klozapin, *in vitro* biyoaktivasyon inkübasyonlarında olduğu gibi, ancak bu kez yapısal bütünlüğü korunmuş (intakt) sıçan karaciğer mitokondrileri (LMit) veya sıçan kalp mitokondrileri (HMit) ile son protein konsantrasyonu 1.2 mg/mL olacak şekilde, 100 mM Tris tamponu (pH 7.40) çözeltisi içinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon çalkalamalı blok ısıtıcıda 37°C'de 1 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda inkübasyon ortamı +4°C'de 15 dk süreyle santrifüj edilerek (800xg) mitokondrilerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Üst faz, inkübasyon ortamında

kalan ve mitokondriye girmemiş olan klozapin miktarının ($KLZ_{dış}$) belirlenmesi için saklanmıştır. Pellet, yani çöktürülmüş mitokondri fraksiyonu aynı Tris tamponu ile 3 kez yıkanmış ve her seferinde santrifüjle tekrar çöktürülerek ($+4^{\circ}C$ 'de 15 dk, 7000xg) yıkama çözeltisi atılmıştır. Ardından mitokondrilerin patlatılması amacıyla pellet 3 kez 10^3 ar sn süreyle 30 kHz'de sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonikasyonun ardından mitokondriyel matriksi elde etmek amacıyla sonike edilen homojenat $+4^{\circ}C$ 'de 1 saat süreyle 147000xg hızda santrifüj edilmiştir. Mitokondri matriksinden oluşan üst faz, mitokondriye girmiş olan klozapin miktarını ($KLZ_{iç}$) belirlemek amacıyla saklanmıştır.

$KLZ_{dış}$ ve $KLZ_{iç}$ miktarları, bir önceki “*Mitokondriyel Biyotransformasyonun Belirlenmesi*” başlığı altında tanımlanan triple quadropole LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilmiştir. İnkübasyon ortamına son konsantrasyonu 100 μM olacak şekilde eklenen klozapinin mitokondri içine giren ve girmeyen miktarları araştırılmıştır. Ayrıca, inkübasyon ortamında mitokondri içinde ve dışında klozapinin iki stabil metaboliti olan NorKLZ ve KLZ-N-Oksit de ölçülmüştür. Tris tamponu çözeltisi içinde hazırlanan ancak mitokondri fraksiyonu eklenmeden aynı koşullarda inkübe edilen 100 μM klozapin çözeltisindeki klozapinin cihazda verdiği pik alanı referans alınarak, $KLZ_{dış}$ ve $KLZ_{iç}$ örneklerindeki klozapin ve metabolit miktarları % referans olacak şekilde grafiğe geçirilmiştir.

3.2.4.2.3. Sıçanda *in vivo* Klozapin Dağılımının Belirlenmesi

Oral uygulama sonrasında klozapinin organizmada dağılımını belirlemek amacıyla dört Wistar Albino sıçana, 20 mg/kg klozapin gavajla oral yoldan uygulanmıştır. İki saatlik süre sonunda hayvanlar anestezisi altında açılmış, iki hayvanın (#3 ve #4 nolu hayvanlar) kalp ve karaciğerleri kanından kurtarmak amacıyla perfüze edilerek, diğer ikisinin ise perfüze edilmeden çıkarılmıştır. Kalp ve karaciğer yanında kemik iliği, kan (kalp içinden) ve idrar (mesaneden) toplanmıştır. Kan örneklerinin yarısı antikoagülan uygulaması sonrası santrifüj edilerek plazma elde edilmiştir. Ardından örnekler analize hazırlanmış ve her bir örnekte klozapin, desmetilklozapin ve klozapin-N-oksit LC-MS/MS yöntemiyle ölçülmüş ve dokulara dağılan miktarlar grafiğe geçirilmiştir.

3.2.5. Farklı Saklama Sıcaklıklarında Mitokondri İşlevselliğinin MPTP Oluşturma Yeteneği Aracılığıyla İzlenmesi

“*Genel Bilgiler*” bölümünde tanımlandığı gibi MPTP oluşumu yapısal ve işlevsel bütünlüğünü koruyan, yani sağlıklı, intakt mitokondride gerçekleşen, ancak patolojik bir

süreçtir; örneğin aşırı kalsiyum varlığında mitokondri iç ve dış zarında yer alan belirli proteinler ilişkiye geçer ve söz konusu porları oluşturur. Bu tez çalışmasında MPT por oluşumunun mitokondri stabilitesini izlemeye bir parametre olarak kullanılabilirliğini test etmek amacıyla taze sağlanan sığır karaciğeri porsiyonlara ayrılmış, farklı ortam sıcaklıklarında depolanmış ve belirli zaman noktalarında izole edilen mitokondrielerin MPTP oluşturma özellikleri belirlenmiştir. Başlangıç noktası olarak doku alınır alınmaz ilk porsiyondan hemen mitokondri izole edilmiş (13,654) ve zaman geçirmeden Ca^{++} tarafından indüklenen MPTP oluşumu ölçülmüştür (başlangıç değeri) (253). Porsiyonlardan bir grup 1 hafta süreyle $+4^{\circ}C$ 'de, bir grup ise 3 ay süreyle $-86^{\circ}C$ 'de saklanmış, belirli zaman noktalarında mitokondri izole edilerek MPTP oluşumu ölçülmüş, başlangıç değerine göre por oluşturabilme kapasitesindeki değişiklik grafiğe geçirilmiştir.

Ayrıca yine aynı dokudan izole edilen mitokondriyel fraksiyon da üç porsiyon grubuna ayrılmış, başlangıç MPTP değeri kaydedilmiş ve benzer şekilde farklı ortam sıcaklıklarında saklanmışlardır; 6 saat süreyle oda sıcaklığında, 24 saat süreyle $+4^{\circ}C$ 'de ve 3 ay süreyle $-86^{\circ}C$ 'de saklanan izole mitokondriyel fraksiyonların MPTP oluşturma kapasitesi belirli zaman noktalarında ölçülmüştür.

MPTP testinde izole mitokondriyer 96-kuyucuklu plakada son protein konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde solunum tamponu çözeltisi (pH:7.20, 125 mM sükröz, 50 mM KCl, 5 mM HEPES, 2 mM KH_2PO_4 ve 1 mM $MgCl_2$) içinde, $30^{\circ}C$ 'de 10 dk süreyle inkübe edilmiştir. Kalsiyum klorür ($CaCl_2$) MPTP indüksiyonu amacıyla pozitif kontrol olarak kullanılmış, son konsantrasyonu 250 μM olacak şekilde $CaCl_2$ varlığında inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. $CaCl_2$ uygulamasının ardından 10 dk boyunca absorbanstaki düşüş (540 nm) *Thermo Scientific Varioskan Flash Mikropłaka Okuyucuda* izlenmiştir. Okuma süresi 10 dk, okuma sıklığı ise 1 dk'dır. Deney ve okuma aşamalarında sıcaklık $30^{\circ}C$ 'de sabit tutulmuş ve her bir kuyucuktaki absorbans değişim oranları (ΔA) hesaplanmıştır (253). $CaCl_2$ uygulanan mitokondriyel inkübasyonların ΔA değerleri hesaplanarak mitokondriyel stabilite değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.2.6. Çalışılan İlaçların Mitokondriyel İşlevlere Etkilerinin Değerlendirilmesi

Klozapin, olanzapin, valproik asit, diklofenak, metformin, dapson, tiyaprofenik asit ve sülfafenazol tez çalışması kapsamında mitokondriyel toksisite hedefleri araştırılan ilaçlardır. Bu amaçla ilaçların MPTP oluşumu, mtDNA metilasyonu ve mitokondriyel oksijen tüketim hızı (OCR) üzerinde etkileri olup olmadığı incelenmiştir.

3.2.6.1. İlaçların MPTP Oluşumu Üzerine Etkilerinin Test Edilmesi

Bu deney kapsamında klozapin, olanzapin, valproik asit, diklofenak, dapson, tiyaprofenik asit ve sülfafenazolün 1, 10 ve 100 µM olacak şekilde belirlenen üç dozu ile çalışılmıştır. *In vitro* inkübasyonlarda kullanılan bu dozlar ilaçların insanda kararlı kan konsantrasyonları dikkate alınarak düşük, terapötik ve toksik dozlar olarak seçilmiştir. Mitokondriyel stabilitenin araştırılması aşamasında olduğu gibi bu testlerde de sıgır karaciğeri kullanılmıştır. Dokuların çıkarılmasını takiben mitokondri izolasyonu 4 saat içinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya üç ayrı kontrol grubu dâhil edilmiştir; ilki ilaçların çözücüsü olarak kullanılan % 1 DMSO, ikincisi herhangi bir ilaç ve DMSO içermeyen mitokondriyel fraksiyon, üçüncüsü ise pozitif kontrol olarak CaCl₂'dir (son konsantrasyonu 250 µM).

İlaçların olası etkisi iki düzeyde incelenmiştir:

1. Kendilerinin MPTP oluşturma olasılıkları (Ca⁺⁺ yokluğunda),
2. Ca⁺⁺ tarafından indüklenen MPTP oluşumu üzerinde olası etkileri (Ca⁺⁺ varlığında).

Tüm inkübasyonlar deneysel varyasyonu tespit edebilmek için üçlü seriler halinde (triplike) “*Farklı Saklama Sıcaklıklarında Mitokondri İşlevselliğinin MPTP Oluşturma Yeteneği Aracılığıyla İzlenmesi*” başlığı altında tanımlandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Ca⁺⁺ varlığında gerçekleştirilen inkübasyonlarda ilaçlar ortama eşzamanlı olarak eklenmiştir. Tüm inkübasyonların ΔA değerleri hesaplanarak grafiğe geçirilmiştir.

3.2.6.2. İlaçların mtDNA Metilasyonu Düzeylerine Etkileri

Test edilen ilaçların mtDNA metilasyon düzeyleri ve mitokondriyel oksijen tüketimi üzerine etkileri CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary) hücre hattında çalışılmıştır. Besi ortamı olarak % 10 fetal bovine serum (FBS) içeren DMEM-F-12K (1:1) kullanılmıştır. Hücreler 25 cm²'lik flasklarda 37°C'de, nemli ortamda ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde sürdürülmüş, testler en az 3 kez pasajlanan hücrelerle gerçekleştirilmiştir. CHO-K1 hücrelerinin sürdürülmesinde gün aşırı besi ortamı uzaklaştırılmış, hücreler 4 mL PBS ile yıkanarak besi ortamı kalıntısı uzaklaştırılmıştır. 1.5 mL tripsin çözeltisi eklenerek hücreler 37°C'de 2 dk bekletilmiş, hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Ardından ortama 4 mL besi ortamı eklenerek tripsin aktivitesi sonlandırılmıştır. Hücre süspansiyonu 5 dk boyunca +4°C'de santrifüj edilmiş (800xg), çöken hücre pelletine taze besi ortamı eklenmiştir.

Önceki çalışmalarımızda ilaçların sitotoksisite oluşturmayan en yüksek konsantrasyonları belirlenmiş ve bu konsantrasyonlarda ilaçların mtDNA metilasyonu

düzeyine etkileri test edilmiştir. Klozapin 10 ve 50 µM, olanzapin 100 µM, nifedipin 10 µM, valproik asit 100 µM, diklofenak 0.01 µM, dapson 100 µM, tiyaprofenik asit 100 µM ve sülfafenazol 100 µM konsantrasyonları ile çalışılmıştır.

Klozapinin iki doz düzeyi için de hücre inkübasyonları GSH varlığında ve yokluğunda ayrı ayrı yapılmıştır. Bunun nedeni, görülmesi olası etkinin reaktif metabolit aracılıklı olup olmadığının belirlenmesidir. GSH içeren inkübasyonlarda GSH'ın son konsantrasyonu 5 mM'dır. Çalışmada kullanılan iki kontrol grubundan ilki çözücü kontrol (% 1 DMSO), diğeri ise literatürde mtDNA metilasyonunu önemli derecede artırdığı gösterilen 15 mM valproik asit (660) yani pozitif kontroldür. Tüm inkübasyonlar triplike gerçekleştirilmiştir.

CHO-K1 hücreleri hemositometreyle sayılarak DMEM-F-12K besi ortamı içerisinde süspande edilmiştir. Her kuyucukta 2 milyon hücre olacak şekilde hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücrelerin 4 saat tutunma süresi boyunca 37°C bekletilmesinin ardından çalışılacak olan ilaçlar uygulanmış, 16 saat inkübasyonun ardından hücreler tripsin uygulanarak kaldırılmış ve mtDNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir. İzolasyon "Abcam-ab65321 mitDNA İzolasyon Kiti" kullanılarak yapılmıştır. Hücreler 5 mL soğuk PBS ile 2 kez yıkanmış ve PBS santrifüjle uzaklaştırılmıştır (6000 xg, 10 dk, +4°C). Hücreler Potter tüpünde sitozol ekstraksiyon tamponu içinde teflon havaneli yardımıyla 50 vuruş ile patlatılmıştır. Homojenat 10 dk süreyle +4°C'de santrifüj edilerek (7000 xg) üst faz alınmıştır. 30 dk süreyle +4°C'de yapılan ikinci santrifüj (10000 xg) sonrasında pellet, yani izole mitokondri elde edilmiştir. Mitokondriyel fraksiyon 10 dk süreyle 30 µL lizis tamponunda bekletilmiş ve süre sonunda 5 µL enzim karışımı eklenerek 1 saat süreyle 50°C su banyosunda inkübe edilmiştir. 100 µL absölu etanol eklenmesinin ardından mitokondriler 10 dk süreyle -20°C'de tutulmuş, +4°C'de 10 dk santrifüj işlemi (14000 xg) uygulanarak mtDNA'nın çöktürülmesi sağlanmıştır. Pellet, yani mtDNA hızlıca kuru buz içinde dondurularak metilasyon deneylerinin yapıldığı *İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi*'ne gönderilmiştir.

Kontrol ve ilaç inkübasyonlarında mtDNA metilasyon düzeyleri "EpiGentek MethylFlash™ Methylated DNA" kiti kullanılarak belirlenmiştir. 96 kuyucuklu plakada her kuyucuğa 80 µL ME2, 1 µL ME3, 1 µL ME4 çözeltileri, 100 ng mitokondriyel DNA eklenmiştir. Plaka parafilm ile kaplanarak 37°C'de 90 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki çözeltiler uzaklaştırılmış, kuyucuklar 3 kez 150 µL ME1 yıkama çözeltisiyle yıkanmıştır. Kuyucuklara seyreltilmiş ME5 eklenerek oda ısısında 1 saat inkübasyon sağlanmıştır. Sürenin sonunda ME5 çözeltisi uzaklaştırılmış, kuyucuklar yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından 150 µL ME6 ve ME7 çözeltileri ile 30 dk inkübasyon sağlanmıştır. Sürenin sonunda yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Her kuyucuğa

100 µL ME8 çözeltisi eklenerek oda ısısında 10 dk inkübasyon yapılmıştır. ME8 çözeltisi metillenmiş DNA varlığında mavi rengi almaktadır. 100 µL ME9 eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve maviden yeşile dönen renk 450 nm’de 10 dk boyunca izlenmiştir.

3.2.6.3. İlaçların Mitokondriyel Oksijen Tüketimine Etkileri

Bu deneyler yine CHO-K1 hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Klozapin, olanzapin, nifedipin, valproik asit, diklofenak, metformin, dapson, tiyaprofenik asit ve sülfafenazolün 1, 10 ve 100 µM dozları ile çalışılmıştır. Bu ilaçların CHO-K1 hücrelerinin oksijen tüketimine etkileri “Luxcel Biosciences MitoXpress®Xtra Oxygen Consumption Assay Kit” yardımıyla incelenmiştir. MitoXpress®Xtra reajanının verdiği floresans, O₂ miktarı ile ters orantılı bir şekilde azalmaktadır, yani hücre dışına çıkan oksijen miktarı ile floresans şiddet arasında ters orantı vardır. Hücresel solunum sırasında O₂ konsantrasyonu azalacağı için MitoXpress®Xtra sinyali zamanla artar. Bu sayede oksijen tüketim hızı, zaman içerisinde floresans sinyaldeki değişimden hesaplanabilir. Tüm kontrol ve ilaç uygulamaları triplike olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 60000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 37 °C’de 16 saatlik inkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besi ortamları (DMEM-F-12K) uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 150 µL taze besi ortamı eklenmesinin ardından kör kontrol dışındakilere 10 µL Mitoxpress®Xtra ajanı eklenmiştir (kör kontrole bunun yerine 10 µL besi yeri eklenmiştir). DMSO içinde test maddesi ya da kontrol inkübasyonunda sadece DMSO (2.5 µL) her bir kuyucuğa eklenmiştir. Kit içeriğindeki önceden ısıtılmış HS mineral yağın 2 damlası (ya da 100 µL) hava kabarcığı oluşturmadan hızlıca eklenerek floresans okuma aşamasına geçilmiştir. Thermo Scientific Varioskan Flash Mikroplaka Okuyucu’da 200 dk boyunca (her 3 dk’da bir) *time-resolved fluorescence* (TRF) modunda kinetik okuma yapılmıştır. Deney ve okuma aşamalarında sıcaklık 37°C’de sabit tutulmuştur. Eksitasyon 380 nm, emisyon 650 nm, delay time 30µs, integration time 100 µs olarak ayarlanmıştır.

Çalışmada 5 ayrı kontrol kullanılmıştır. Kontrol grupları aşağıda özetlenmiştir;

Kör kontrol: Hücre içeren kuyucuklara sadece 150 µL taze besi yeri eklenmiştir.

Sinyal kontrolü: Hücre içermeyen kuyucuklara 150 µL taze besi yeri ve 10 Mitoxpress®Xtra eklenmiştir.

Test maddesi içermeyen kontrol: Hücre içeren kuyucuklara 150 µL taze besi yeri ve 10 µL Mitoxpress®Xtra ajanı eklenmiştir.

Pozitif kontrol (Antimisin A): Hücre içeren kuyucuklara 50 µL taze besi yeri, 1 µL Antimisin A stok çözeltisi (DMSO içinde, son kons. 150 µM) ve 10 µL Mitopress®Xtra eklenmiştir.

Çözücü kontrolü: Hücre içeren kuyucuklara 150 µL taze besi yeri, 2.5 µL DMSO ve 10 µL Mitopress®Xtra eklenmiştir.

Kör kontrolün, yani reaktif ajan içermeyen, sadece hücre barındıran kuyucukların sinyal ortalama değerleri örneklerden çıkarılmıştır. Tüm kontrol grupları ve ilaç inkübasyonlarına ait zamana bağlı floresans şiddetindeki değişiklikler grafiğe geçirilerek doğrusal zaman aralıkları belirlenmiş, doğrunun eğiminden hareketle OCR yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.2.7. İnsan Mitokondriyel Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Otopsi sırasında alınan dokulardan hazırlanan 12 ayrı insan karaciğer ve kalp mitokondriyel matriks fraksiyonlarında (LMx, HMx) GST, SOD, CAT ve Se-GPx enzimlerinin spesifik aktiviteleri araştırılmıştır.

3.2.7.1. Total GST Enzim Aktivitesi Ölçümü

GSTT dışındaki tüm GST izoenzimleri CDNB'ye karşı aktivite gösterirler (173). Bu nedenle mitokondri örneklerinde öncelikle genel GST aktivitesi, substrat olarak GST kullanılarak Habig ve ark.'nın yöntemi esas alınarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu amaçla 1 mL'lik kuvartz spektrofotometre küvetinde 100 mM fosfat tamponu (pH: 6.50) içerisine son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde sırasıyla CDNB, 1 mM GSH ve 20 µL LMx ya da HMx eklenerek 20 sn ön inkübasyondan sonra enzimatik ürün (CDNB-SG konjugatı) oluşumu, 340 nm'de 2 dk boyunca izlenmiştir (661).

3.2.7.2. GST İzoenzimlerinin Spesifik Aktivite Ölçümleri

DCNB ve trans-4-fenil-3-büten-2-on, GSTM'nün (172), EPNP ise GSTT'nın spesifik substratlarıdır (662). Bu substratlardan uygun koşullarda ilgili GST izoenzimiyle ürün oluşumu izlenerek enzimlerin spesifik aktiviteleri tayin edilmiştir.

GSTM aktivitesi iki ayrı substrat aracılığıyla ölçülmüştür. DCNB'ye karşı GSTM aktivitesinin belirlenmesi sırasında 100 mM fosfat tamponu (pH: 7.50) içerisine DCNB (son

konsantrasyonu 1 mM), GSH (son konsantrasyonu 5 mM) ve 20 µL enzim kaynağı eklenmiştir. 345 nm’de 2 dk boyunca ürün oluşumu izlenmiştir. Trans-4-fenil-3-buten-2-on’a karşı GSTM aktivitesinin belirlenmesi sırasında ise 100 mM fosfat tamponu (pH: 6.50) içerisine trans-4-fenil-3-buten-2-on (son konsantrasyonu 0.25 mM), GSH (son konsantrasyonu 0.5 mM) ve 20 µL enzim kaynağı eklenmiş, 290 nm’de 2 dk boyunca ürün oluşumu izlenmiştir (661).

GSTT aktivitesi için, 100mM fosfat tamponu (pH: 6.50) içerisine EPNP (son konsantrasyonu; 0.5 mM), GSH (son konsantrasyonu; 5 mM) ve 20 µL enzim kaynağı eklenmiş, 360 nm’de 2 dk boyunca ürün oluşumu izlenmiştir (661).

3.2.7.3. Total SOD Aktivitesinin Ölçülmesi

Total SOD aktivitesinin ölçülmesi amacıyla 50 mM Tris HCl tamponu çözeltisi (pH: 8.20, 1 mM EDTA içeren) içerisine 17 µL 6 mM pirogallol çözeltisi ve 20 µL LMx ya da HMx eklenmiştir. 20 sn ön inkübasyon süresinin ardından 420 nm’de pirogallolün otooksidasyonunun inhibisyonu 1 dk boyunca izlenmiştir (663).

3.2.7.4. Mn-SOD Aktivitesinin Ölçülmesi

Total SOD aktivitesinin ölçüleceği reaksiyon ortamı tekrar hazırlanmış ve 1 mM KCN eklenerek Mn-SOD dışındaki diğer SOD izozimlerinin inaktive olması sağlanmıştır. Böylece örneklerdeki Mn-SOD aktivitesi belirlenmiştir (664).

3.2.7.5. Cu,Zn-SOD Aktivitesinin Ölçülmesi

Total SOD aktivitesinden Mn-SOD aktivitesinin çıkarılması sonucu örneklerdeki Cu,Zn-SOD aktivitesi hesaplanmıştır (664).

3.2.7.6. CAT Aktivitesinin Ölçülmesi

CAT aktivitesinin ölçülmesi sırasında 50 mM fosfat tamponu çözeltisi (pH: 7.00), 20 µL LMx ya da HMx eklenmiştir. 1 mL 30 mM hidrojen peroksitin (H₂O₂) ilave edilmesi sonrası 30 sn boyunca küvetler karıştırılmış ve H₂O₂’nin enzimatik yıkılması 240 nm’de 2 dk boyunca izlenmiştir (665).

3.2.7.7. Se-GPx Aktivitesinin Ölçülmesi

Örneklerdeki Se-GPx aktivitesi, Pleban ve ark.'nın yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (666). İndirgenmiş glutatyon (GSH) hidrojen peroksit varlığında GPx enzimi ile okside glutatyona (GSSG) dönüşür, GSSG ise *glutatyon redüktaz* enzimi ile tekrar GSH'a redüklenir. Oluşan tepkimede, ortamdaki NADPH'ın NADP⁺'ya dönüşmesi 340 nm dalga boyunda izlenerek GSSG oluşum hızı ölçülmüş ve GPx enzim aktivitesi hesaplanmıştır. 980 µL reaksiyon ortamına 15 µL 100 mM fosfat tamponu çözeltisi (pH: 7.40) ve 20 µL LMx ya da HMx eklenmiştir. Beş dakika ön inkübasyon süresi sonunda 8.8 mM H₂O₂ 10 µL olacak şekilde ortama eklenmiş ve enzimatik oksidasyon 3 dk boyunca izlenmiştir.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Tüm testlerde elde edilen veriler “*ortalama ± standart hata*” şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel önem testi olarak unpaired t test kullanılmıştır. İki ortalama arasındaki farkın önem testinde *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 düzeylerinde yanılma payları esas alınmıştır.

4. BULGULAR

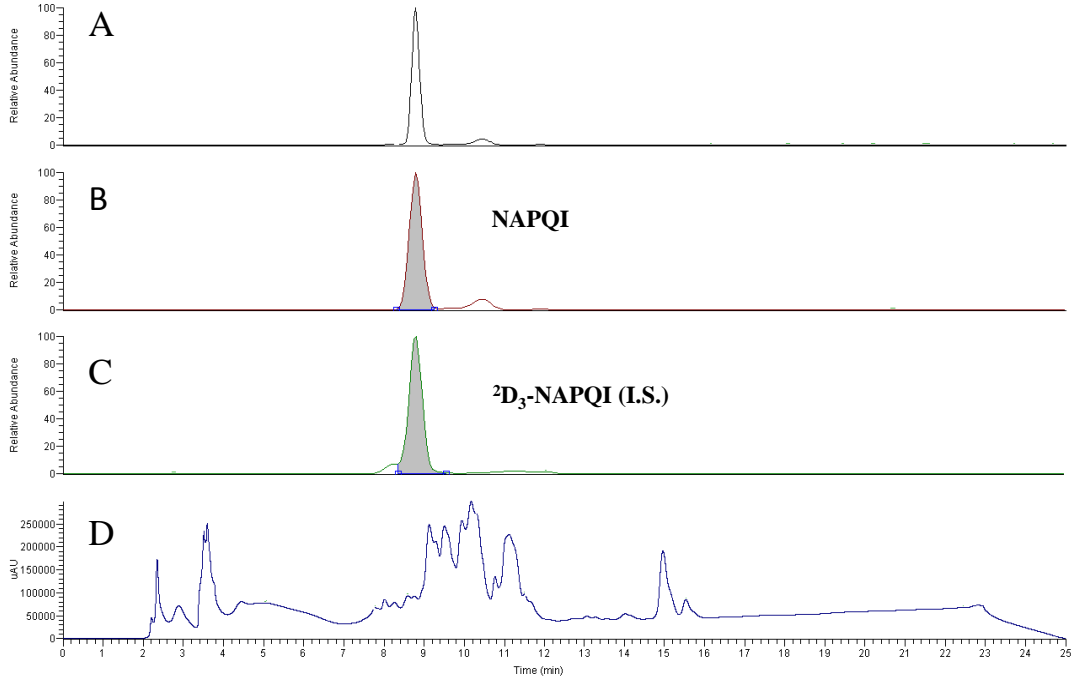
4.1. Bireyler ve Organlararası Parasetamol Biyoaktivasyonu Farklılığı Çalışması Bulguları

4.1.1. Mikrozomal Çalışmalara Ait Bulgular

4.1.1.1. Oluşan NAPQI'nın Miktar Tayini

Parasetamolün 9 farklı hastadan alınan karaciğer ve 8 farklı hastadan alınan böbrek dokularından hazırlanan mikrozomal fraksiyonlarla *in vitro* inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. Hastalardan birisine ait karaciğer mikrozomlarıyla yapılan ilaç inkübasyonunun kromatogramı Şekil 6'da gösterilmektedir. Şekil 6A'da, NAPQI'nın GSH konjugatına (NAPQI-SG) ait total iyon kromatogramı, Şekil 6B'de NAPQI-SG ve Şekil 6C'de [²D₃]-NAPQI-SG (I.S.) konjugatına ait SRM dönüşümlerini gösteren kromatogramlar bulunmaktadır. Şekil 6D ise aynı örneğin 254 nm'deki HPLC-UV sinyalini göstermektedir.

Şekil 6D'de görüldüğü gibi UV detektör, düşük miktardaki metaboliti (NAPQI-SG) ölçebilmek için yeterince seçici ve duyarlı değildir. Bu nedenle kütle spektrometrisine dayalı yonteme ihtiyaç duyulmuştur. Şekil 6B ve 6C'de görüldüğü gibi NAPQI-SG konjugatı MS dedektör ile 8.78.dk'da (m/z 457 [M]⁺ → m/z 328 [M-129]⁺, m/z 382 [M-75]⁺), ²D₃-NAPQI-SG ise 8.74.dk'da tespit edilmiştir (m/z 460 [M]⁺ → m/z 331 [M-129]⁺, m/z 385 [M-75]⁺).

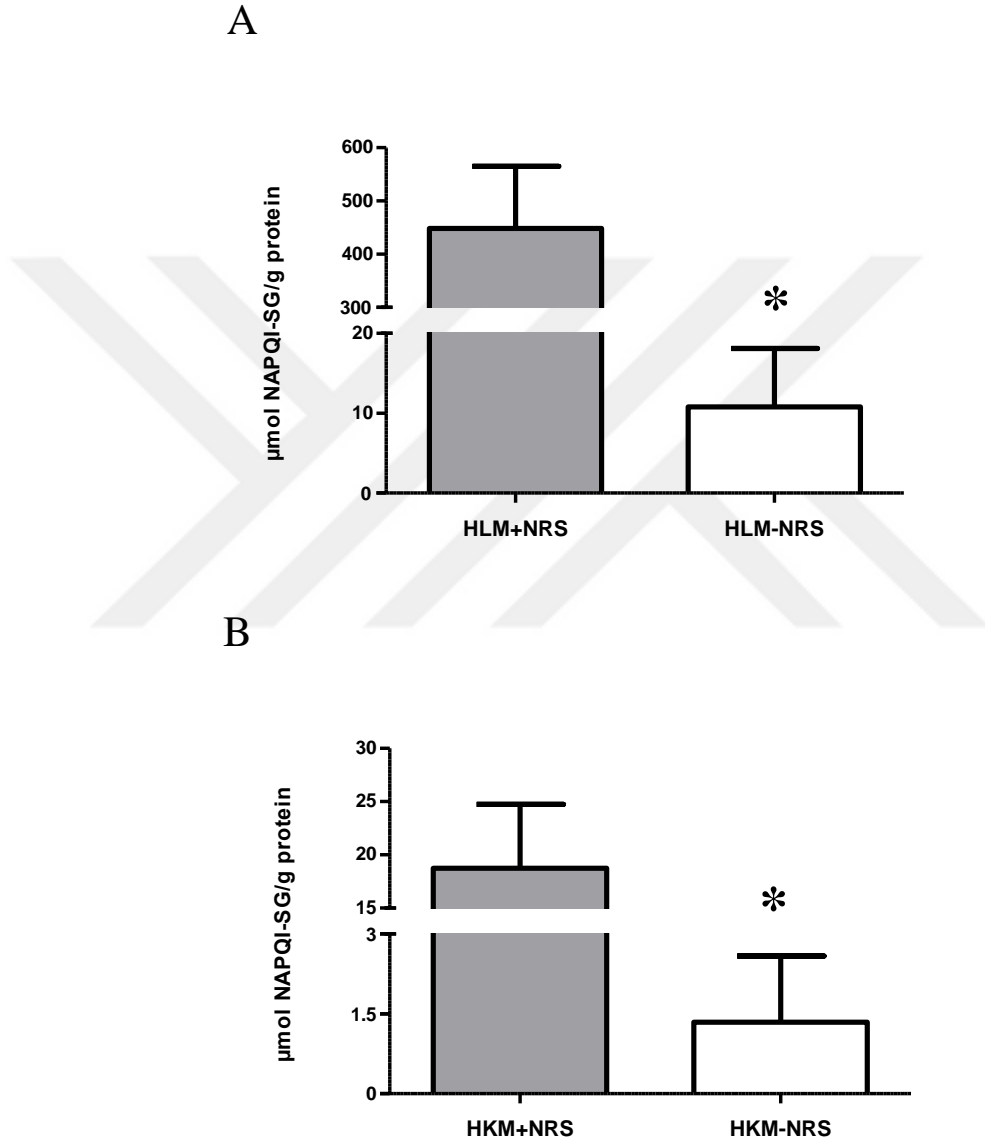


Şekil 6. Bir hastanın karaciğer mikrozomal fraksiyonu tarafından oluşturulan N-asetil-*p*-benzokinonimin'e (NAPQI) ait total iyon ve SRM kromatogramları. A, Kütle spektrumunun total iyon kromatogramı; B, NAPQI-SG'nin m/z 457 $[M]^+$ 'dan m/z 328 $[M-129]^+$ ve m/z 382 $[M-75]^+$ kütle dönüşümlerine ait SRM kromatogramı; C, 2D_3 -NAPQI-SG'nin m/z 460 $[M]^+$ 'dan m/z 331 $[M-129]^+$ ve m/z 385 $[M-75]^+$ kütle dönüşümlerine ait SRM kromatogramı; D, HPLC-ultraviyole (UV) kromatogramı (254 nm).

Her bir hastaya ait karaciğer veya böbrek mikrozomal inkübasyonlarında oluşan NAPQI-SG miktarları, LC-MS/MS kromatogramlarından hareketle “Gereç ve Yöntem” bölümünde açıklandığı şekilde hesaplanmış ve sonuçlar ilerleyen sayfalarda diğer parametrelerle birlikte sütun grafikler şeklinde sunulmuştur.

P450 aracılıklı katalitik reaksiyonların devamlı elektron akışına bağımlı olup olmadığının araştırılması amacıyla insan karaciğer ve böbrek mikrozomal inkübasyonları, *NADPH-regenerating system* (NRS) varlığında ve yokluğunda ayrı ayrı yapılmıştır. Şekil 7'deki ilk sütun NRS içeren, ikinci sütun ise NRS içermeyen inkübasyonlarda oluşan NAPQI-SG miktarlarının ortalama değerleridir. Parasetamolün bireyler arası biyoaktivasyonu karaciğer mikrozomlarında ortalama $450 \mu\text{mol metabolit/g protein}$ arasında, böbrek mikrozomlarında ise $12 \mu\text{mol metabolit/g protein}$ arasında değişmektedir (Şekil 7). Sonuçlar, HLM ve HKM ile konjugat oluşumunun sürekli elektron akışına bağlı olduğunu

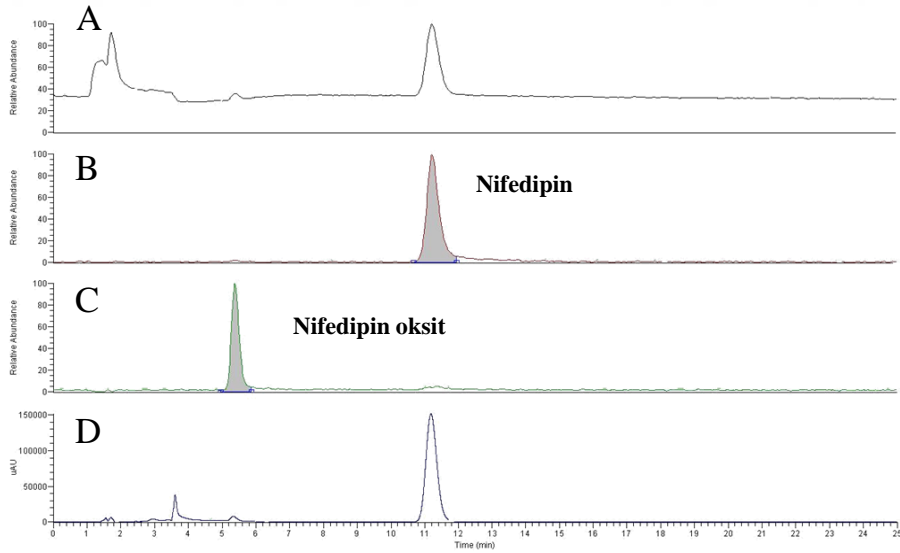
göstermektedir (Şekil 7A ve B). HLM ile NAPQI oluşumu NRS varlığında 45 kat, HKM ile 14 kat artmaktadır. Beklenildiği gibi karaciğer mikrozomlarıyla oluşan konjugat miktarı, böbrek mikrozomlarıyla oluşan miktarın 24 katıdır.



Şekil 7. NADPH üretici sistem (NRS) varlığında ve yokluğunda inkübasyon ortamında oluşan NAPQI-SG miktarları. A, İnsan karaciğer mikrozomal (HLM; human liver microsomal) inkübasyonları; B, İnsan böbrek mikrozomal (HKM; human kidney microsomal) inkübasyonları. Değerler *ort*± *standart hata* şeklinde ifade edilmiştir. * +NRS'ye kıyasla önemli derecede ($p < 0.05$) farklı.

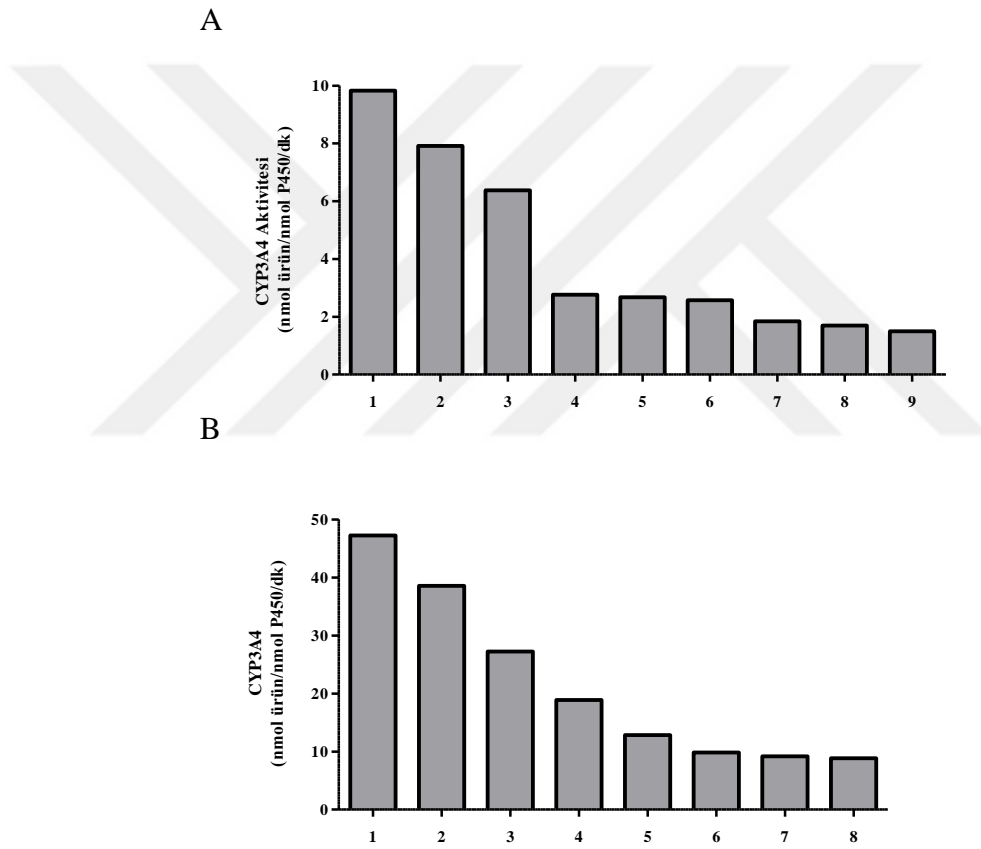
4.1.1.2. Bireyler Arası Mikrozomal CYP3A4 Aktivite Farklılıkları Bulguları

CYP3A4 aktivitesi, enziminin seçici bir biçimde katalize ettiği nifedipin oksidasyon reaksiyonundan yararlanılarak ölçülmüştür. Literatürde HPLC-UV tekniği için tanımlanmış olan yöntem, Gereç ve Yöntem Bölümünde açıklandığı üzere çok daha az insan doku materyali ile çalışabilmek üzere LC-MS tekniğine uyarlanmıştır. Nifedipin ve oksidatif metaboliti olan nifedipin oksit için ESI pozitif iyon modu kullanılmış, analiz için Q1MS yeterince duyarlı ve seçici bulunduğundan tandem MS tekniğine gerek duyulmamıştır. İki bileşiğin de pozitif elektrosprey iyonizasyonu ile gerçekleştirilen analizleri sonucu elde edilmiş olan bir hastaya ait temsili kromatogramlar, Şekil 8’de gösterilmiştir. İnkübasyon ortamına ait total iyon kromatogramı Şekil 8A’da görülmektedir. Nifedipinin protonlanmış moleküler iyonuna ait pik 11.2. dk’da (Şekil 8B), metabolit nifedipin oksitin protonlanmış moleküler iyonuna ait pik ise 5.2.dk’da görülmektedir (Şekil 8C). 254 nm’deki HPLC-UV sinyal piki ise Şekil 8D’de gösterilmiştir. Nifedipin oksite ait UV ve MS detektör sinyal yoğunlukları kıyaslandığında LC-MS tekniğinin hassasiyet ve seçicilik açısından çok daha üstün olduğu görülmektedir (Şekil 8C ve D).



Şekil 8. Nifedipin’in mikrozomal oksidasyonuna ait total iyon, Q1MS ve UV (254 nm) kromatogramları. **A**, MS total iyon kromatogramı; **B**, Nifedipin’e ait Q1 MS iyonizasyon kromatogramı (Rt:11.2 dk., m/z 346 $[M]^+$ \rightarrow m/z 347 $[M+H]^+$); **C**, Nifedipin piridin metabolitine ait Q1 MS iyonizasyon kromatogramı (Rt:5.2 dk., m/z 344 $[M]^+$ \rightarrow m/z 345 $[M+H]^+$); **D**, HPLC-UV kromatogramı (254 nm).

Karaciğer ve böbrek mikrozomlarına ait bireysel CYP3A4 aktiviteleri sırasıyla Şekil 9A ve B'de gösterilmektedir. Karaciğer mikrozomlarındaki enzim aktiviteleri 1.5 ile 9.8 *nmol ürün/nmol P450/dk*, böbrek mikrozomlarında ise 8.8 ile 47.2 *nmol ürün/nmol P450/dk* arasında değişkenlik göstermektedir. Karaciğer ve böbrek mikrozomlarındaki bireyler arası CYP3A4 aktivite farklılıkları incelendiğinde en düşük ve en yüksek değerler arasındaki farkın 6 kat olduğu görülmektedir (Şekil 9). Karaciğer mikrozomal CYP3A4 enziminin ortalama aktivite değeri, böbrek mikrozomal CYP3A4 ortalamasından 6.3 kat daha düşüktür.

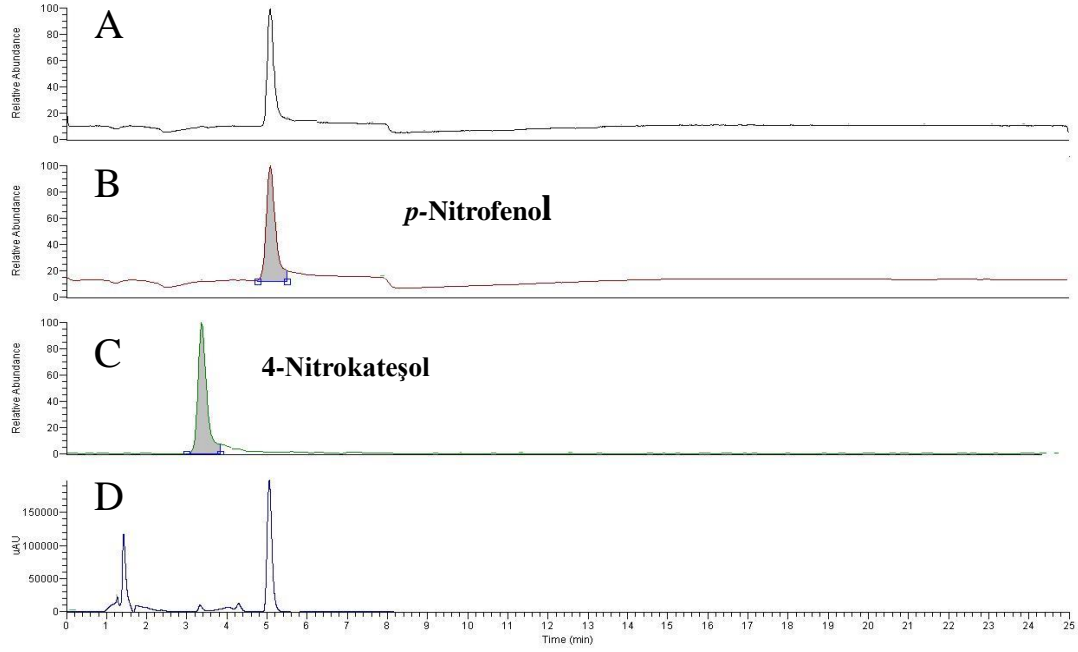


Şekil 9. Hastaların bireysel mikrozomal CYP3A4 aktiviteleri. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak Nifedipin kullanılmıştır. A, Karaciğer; B, Böbrek.

4.1.1.3. Bireyler Arası Mikrozoal CYP2E1 Aktivite Farklılıkları Bulguları

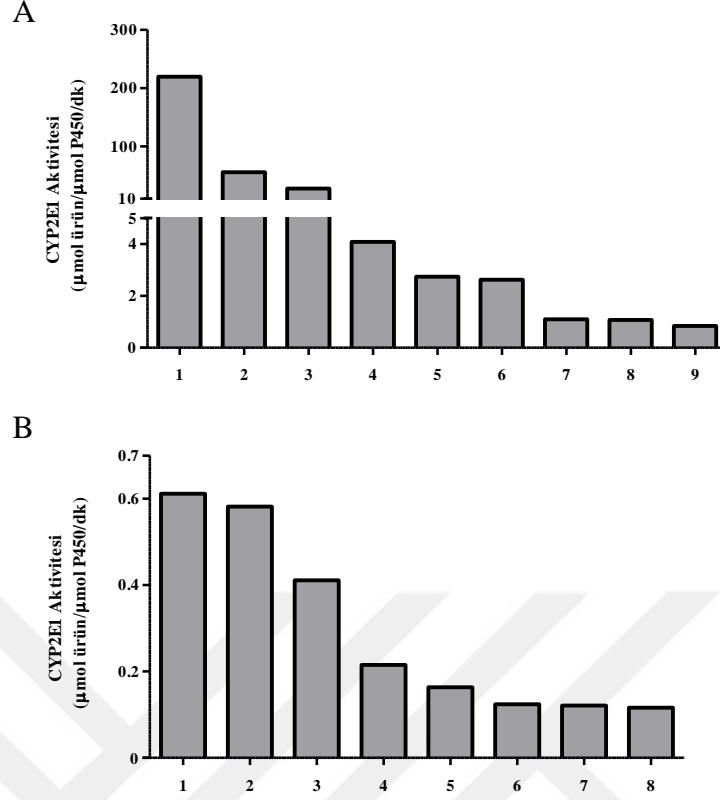
Mikrozoal fraksiyonların CYP2E1 aktivitesi, bu enzim tarafından katalize edilen *p*-nitrofenolün 4-nitrokatekole oksidasyonu reaksiyonunun izlenmesi esasına dayalı olan, tez çalışması kapsamında geliştirilen LC-MS/MS yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 10).

Ana ilaç *p*-nitrofenol ve metaboliti 4-nitrokatekol tayini için ilacın standart çözeltisinin doğrudan MS detektöre infüzyonu ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre negatif iyonizasyon (-ESI) modunda triple quadropole tandem MS ile çalışılmıştır; Q1 iyonizasyon *p*-nitrofenol ve metaboliti 4-nitrokatekolün her ikisinden bir proton kaybına neden olarak [M-H]⁻ moleküler iyonlarının oluşmasına, Q2 iyonizasyon ise [NO] grubunun molekülü terk etmesiyle her iki analitten kinon türevlerinin oluşumuna neden olmuştur. Dolayısıyla analiz yönteminde bu reaksiyon serileri SRM modunda izlenmiştir. Reaksiyon sonunda inkübasyon ortamının enjekte edildiği LC-MS/MS analizi total iyon kromatogramı Şekil 10A'da, *p*-nitrofenol'e ait SRM kromatogramı Şekil 10B'de ve oksidasyon ürünü metaboliti 4-nitrokatekole ait SRM kromatogramı ise Şekil 10C'de gösterilmektedir. Şekil 10D, aynı örneğin MS detektörün hemen öncesindeki HPLC-UV (254 nm) kromatogramını göstermektedir. Bu kromatogramda *p*-nitrofenol ve metabolitinin alıkonma zamanları, MS detektörle tespit edilen alıkonma zamanlarına göre sırasıyla 0.05 ve 0.03 dk daha erkendir. Bu durumun nedeni; inkübasyon örneğinin LC kolonunu terk etmesinden önce UV-detektörden geçmesi, ardından belirli bir mesafeyi katederek MS detektöre ulaşması ve sinyal vermesidir. UV ve MS detektör sinyalleri arasındaki zaman farkı, analit sinyallerinin MS detektörden önce UV-detektörle izlendiği NAPQI oluşumu ve CYP3A4 analizi için de geçerlidir. CYP2E1 aktivite ölçüm yönteminde 4-nitrokatekol'e ait UV sinyal çok zayıf ve yetersizdir (Şekil 10D). Aynı miktar metabolit MS detektöre ulaştığında çok daha güçlü (700 kat) bir sinyal oluşturmaktadır (Şekil 10C).



Şekil 10. *p*-nitrofenol'ün *p*-nitrokatekol'e mikrozomal oksidasyonuna ait total iyon, SRM ve UV (254 nm) kromatogramları. (*p*-nitrofenol alıkonma zamanı 5.06 dk., [M-H]⁻:138 → 108, 46; *p*-nitrokatekol alıkonma zamanı 3.36 dk., [M-NO]⁻: m/z 154 → m/z 125). A, MS total iyon kromatogramı; B, *p*-nitrofenol'ün m/z 139 [M]⁻'den m/z 138 [M-H]⁺ ve m/z 108 [M-30]⁺ kütle dönüşümlerine ait SRM kromatogramı; C, *p*-nitrokatekol'ün m/z 155 [M]⁻'den m/z 154 [M-H]⁺ ve m/z 125 [M-30]⁺ kütle dönüşümlerine ait SRM kromatogramı; D, HPLC-UV kromatogramı (254 nm).

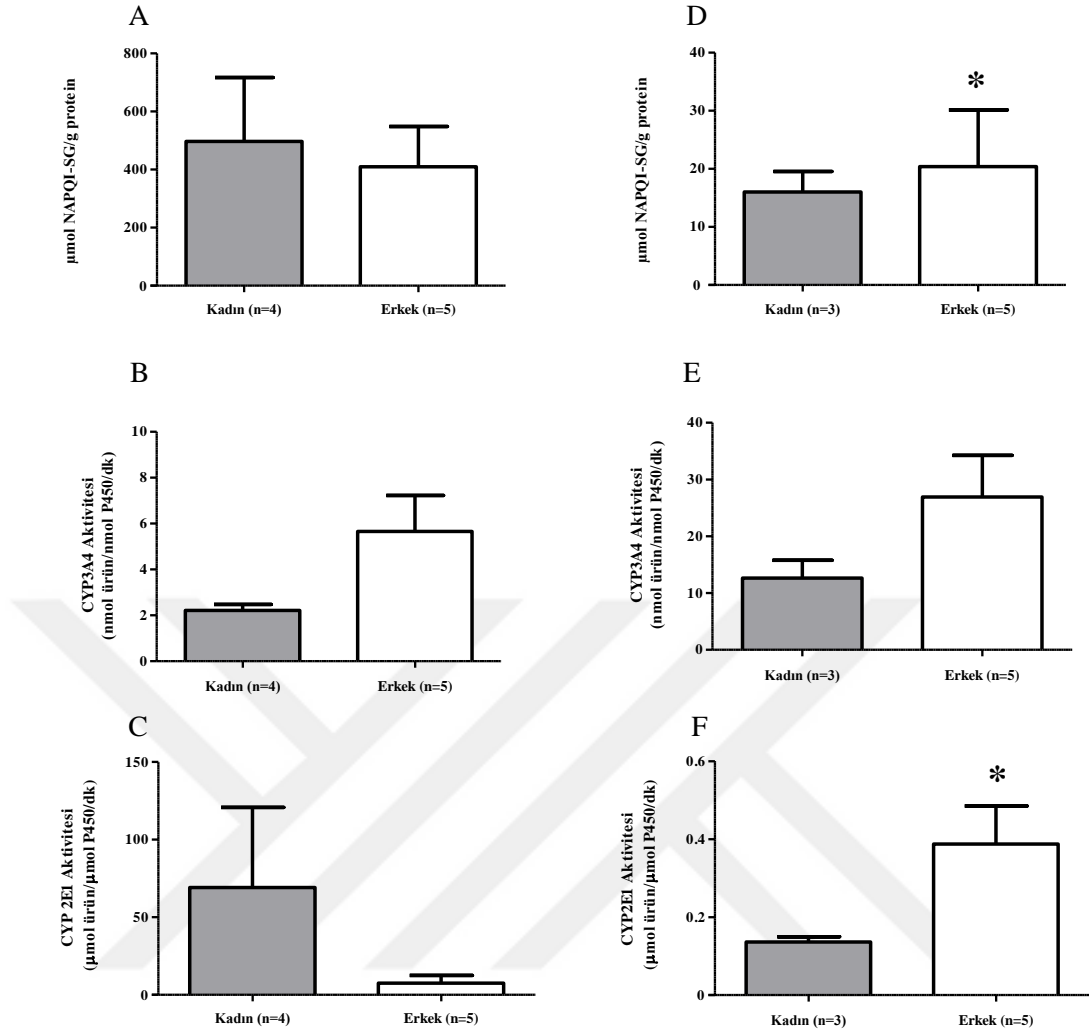
Şekil 11A ve B, sırasıyla karaciğer ve böbrek mikrozomlarındaki bireysel CYP2E1 aktivitelerini göstermektedir. Karaciğer mikrozomlarında enzim aktiviteleri 0.84 ile 219.3 nmol ürün/nmol P450/dk arasında, böbrek mikrozomlarında enzim aktiviteleri ise 0.12 ile 0.61 nmol ürün/nmol P450/dk arasında değişmektedir. Karaciğer CYP2E1 aktivitesinde bireyler arası büyük farklılıklar bulunmaktadır; en yüksek ve en düşük CYP2E1 aktivitesi arasındaki fark 261 kat iken, böbrek mikrozomlarında bu fark sadece 5'dir. Bu çalışmada organlar arası ortalama spesifik CYP2E1 aktiviteleri kıyaslandığında, literatüre uygun biçimde karaciğerde aktivitenin böbreğe kıyasla 124 kat fazla olduğu gözlenmiştir (667, 668).



Şekil 11. Hastaların bireysel mikrozomal CYP2E1 aktiviteleri. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak *p*-nitrofenol kullanılmıştır. A, Karaciğer; B, Böbrek.

4.1.1.4. Cinsiyetler Arası Biyoaktivasyon ve Enzim Aktivitesi Farklılığı Bulguları

Şekil 12’de NAPQI oluşturma kapasitesi, CYP2E1 ve CYP3A4 aktivitelerindeki cinsiyete bağlı farklılıklar gösterilmiştir. Karaciğerde NAPQI oluşturma kapasitesi açısından erkek ve kadın arasında fark gözlenmezken (Şekil 12A), böbrekte erkeklerin kadınlara kıyasla önemli derecede yüksek NAPQI ürettiği gözlenmiştir (Şekil 12D). Kadınlarda karaciğer dokusunda CYP2E1 aktivitesi erkeklere kıyasla yükseklik eğilimi göstermesine karşın çalışmaya dahil edilebilen birey sayısının düşüklüğü (4 kadın, 5 erkek) ve bireyler arası varyasyonun yüksekliği nedeniyle istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Şekil 12B). Buna karşın erkeklerde böbrek CYP2E1 aktivitesi kadınlara kıyasla önemli derecede yüksektir (Şekil 12E). Son olarak CYP3A4 aktivitesi hem karaciğer (Şekil 12C) hem de böbrekte (Şekil 12F) erkeklerde yükseklik eğilimi gösterse de CYP2E1 için de geçerli olan nedenlerden dolayı bu fark istatistiksel açıdan önemsizdir.



Şekil 12. Reaktif metabolit oluşturma kapasitesi ve P450 aktivitelerinde cinsiyete bağlı farklılıklar. A, Karaciğer mikrozomal NAPQI oluşumu; B, Karaciğer mikrozomal CYP3A4 aktivitesi; C, Karaciğer mikrozomal CYP2E1 aktivitesi; D, Böbrek mikrozomlarıyla NAPQI oluşumu; E, Böbrek mikrozomal CYP3A4 aktivitesi; F, Böbrek mikrozomal CYP2E1 aktivitesi. Değerler *ort± standart hata* şeklinde ifade edilmiştir. * Kadınlara kıyasla önemli derecede ($p < 0.05$) farklı.

Bu çalışmada son olarak mikrozomlar tarafından oluşturulan NAPQI miktarları ile CYP3A4 ve CYP2E1 aktiviteleri arasındaki olası korelasyon ilişkisi araştırılmıştır. Korelasyon katsayıları (r) ve p değerleri hesaplanarak Tablo 4’de gösterilmiştir.

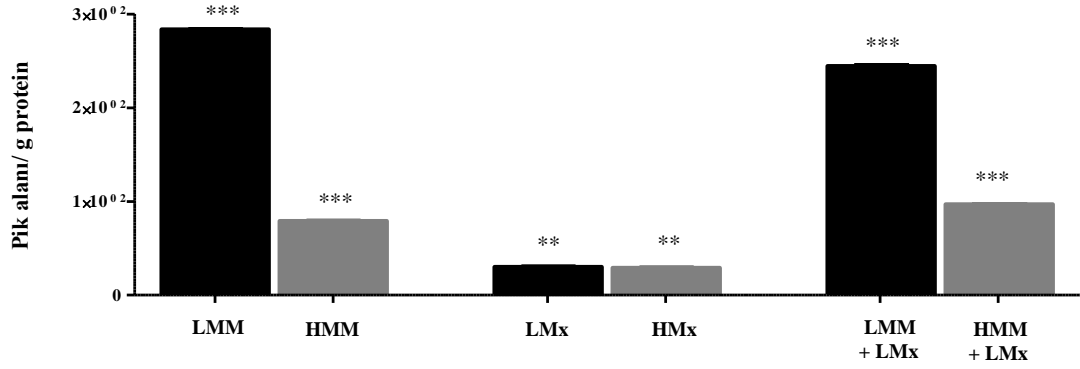
Tablo 4. Karaciğer ve böbrek tarafından üretilen NAPQI-SG miktarları ile aynı organların CYP2E1 ve CYP3A4 aktiviteleri arasındaki korelasyon katsayıları ve istatistiksel önemleri.

Enzim	r	p değeri
NAPQI-CYP2E1 (karaciğer)	0.784	0.012
NAPQI-CYP3A4 (karaciğer)	0.26	0.499
NAPQI-CYP2E1 (böbrek)	0.221	0.674
NAPQI-CYP3A4 (böbrek)	0.493	0.32

4.1.2. Mitokondriyel Biyoaktivasyon Bulguları

Mitokondriyel enzim kaynakları ile parasetamolden oluşan reaktif metabolit NAPQI'nın GSH konjugatına (NAPQI-SG) ait sonuçlar Şekil 13'de gösterilmektedir. Grafik karaciğer ve kalp inkübasyon sonuçlarını kapsamakta olup aynı fraksiyona ait sütunlar (mitokondriyel membran ve mitokondriyel matriks) yan yana olacak şekilde verilmiştir. Farklı inkübasyon ortamlarında oluşan metabolit miktarları, ortama eklenen gram cinsinden protein miktarına oranlanarak gösterilmiştir. Kontrol inkübasyonu olan “-Enzim+GSH” ile test inkübasyonları karşılaştırılarak istatistiksel önem analizleri yapılmıştır.

En yüksek oranda metaboliti karaciğer mitokondriyel membran fraksiyonunun oluşturduğu görülmektedir (Şekil 13). Mitokondriyel matriks ile kıyaslandığında membranların 9.5 kat daha fazla NAPQI oluşturduğu gözlenmiştir. Membran ve matriks fraksiyonunun kombine kullanıldığı inkübasyonlarda karaciğerde oluşan konjugat miktarı membran fraksiyonunun tek başına oluşturduğu kadarken, kalp dokusunda matriks katkısı gözlenmektedir (Şekil 13). Kalp dokusundan izole edilen mitokondriyel fraksiyonlarla yapılan inkübasyonlarda membran fraksiyonu matriksten 2.8 kat fazla NAPQI oluşturmuştur. Her iki enzim kaynağını da birlikte içeren inkübasyonda ise oluşan metabolit miktarı, yukarıda bahsedildiği gibi fraksiyonların tek tek oluşturdukları miktarın toplamına yakındır. Karaciğer mitokondriyel membran fraksiyonu kalp mitokondriyel membran fraksiyonundan 3.5 kat fazla NAPQI oluştururken, iki dokunun mitokondriyel matriks fraksiyonlarının NAPQI oluşturma kapasitesi ise birbirine yakındır (Şekil 13).

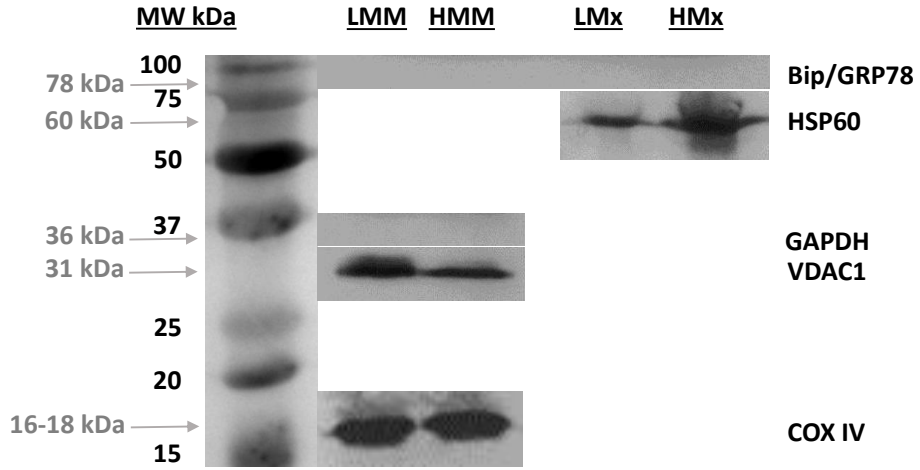


Şekil 13. Sıçan karaciğer ve kalp mitokondriyel fraksiyonları varlığında parasetamol biyoaktivasyonu. LMM, *karaciğer mitokondriyel membranları*; HMM, *kalp mitokondriyel membranları*; LMx, *karaciğer mitokondriyel matriks*; HMx, *kalp mitokondriyel matriks*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.2. Klozapin Biyoaktivasyonu Çalışmalarına Ait Bulgular

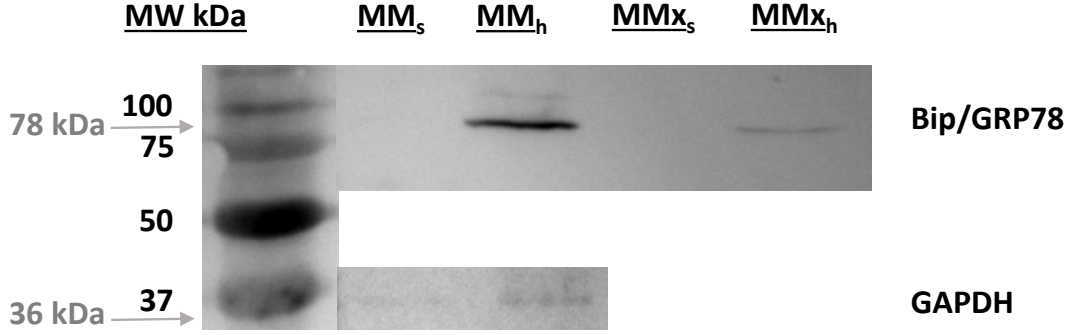
4.2.1. Western Blot ile Saflık Kontrolü Bulguları

Fare karaciğer ve kalp dokusundan izole edilen mitokondriyel membran ve mitokondriyel matriks fraksiyonlarının saflık kontrolü amacıyla WB tekniği kullanılmıştır. İzolasyonun başarısını göstermek amacıyla mitokondri iç membran proteini olan COXIV, dış membran protein olan VDAC1 ve matriks proteini HSP60, fraksiyonlarda analiz edilmiştir. Ayrıca, hücrenin mikrozomal ya da sitozolik fraksiyonundan kaynaklanabilecek kontaminasyon düzeylerini belirlemek için sırasıyla Bip/GRP78 ve GAPDH proteinleri araştırılmıştır. Şekil 14, izole edilen fraksiyonlarda WB analiz sonuçlarını göstermektedir. VDAC1 ve COXIV proteinlerinin beklenildiği gibi membran fraksiyonlarında (LMM, HMM), HSP60 proteinin ise matriks fraksiyonlarında (LMx, HMx) saptanması, izolasyonun başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir. Sitozolik protein GAPDH ve mikrozomal protein Bip/GRP78'in bantları, mitokondriyel fraksiyonlarda saptanmamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda mitokondriyel fraksiyonların karaciğer ve kalp dokularından yüksek saflıkta ve güvenilir bir şekilde izole edildiği gözlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Fare karaciğer ve kalbinden izole edilen mitokondriyel fraksiyonların Gereç ve Yöntem Bölümü'nde tanımlanan uygun antikorlarla Western blot analizi. Standart/markör proteinlerin molekül ağırlıkları, sağ sütunda oklarla gösterilmiştir. İlk sütun, kullanılan 15-100 kDa arası protein standartına aittir. Mitokondriyel protein olarak dış membran proteini VDAC1, iç membran proteini COXIV ve matriks proteini HSP60 kullanılmıştır. Bip/GRP78 ve GAPDH ise sırasıyla mikrozomal ve sitozolik kontaminasyonu test etmek için analiz edilmiştir. LMM, karaciğer mitokondriyel membran; HMM, kalp mitokondriyel membran; LMx, karaciğer mitokondriyel matriks; HMx, kalp mitokondriyel matriks.

İzole edilen ham mitokondriyel ekstraktlar, Percoll ya da sükröz dansite gradiyenti tekniği ile ileri saflaştırılmıştır; örnek olarak Percoll gradiyent işleminin performansı Şekil 15'de karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Fare karaciğer mitokondriyel membran ve matriks fraksiyonlarında bulunan mikrozomal kontaminant Bip/GRP78 ve sitozolik kontaminant GAPDH, uygulanan Percoll gradiyenti sonrası tamamen uzaklaştırılmıştır (Şekil 15).



Şekil 15. Fare karaciğer ve kalp mitokondriyel fraksiyonlarının Percoll dansite gradiyenti saflaştırması öncesi ve sonrasında mikrozomal ve sitozolik kontaminasyon düzeylerinin Western blot analizi. Bip/GRP78 ve GAPDH sırasıyla mikrozomal ve sitozolik kontaminasyon düzeyleri açısından belirleyici ER-spesifik protein ve sitozolik çözümlü protein olarak kullanıldı. Standart/markör proteinlerin molekül ağırlıkları, sağ sütunda oklarla gösterilmiştir. MM_s, saflaştırılmış mitokondriyel membran; MM_h, ham mitokondriyel membran; MM_{x_s}, saf mitokondriyel matriks; MM_{x_h}, ham mitokondriyel matriks.

4.2.2. Mitokondriyel Biyotransformasyonun Belirlenmesine Ait Bulgular

Mitokondriyel fraksiyonların varlığında oluşan stabil metabolitler (NorKLZ ve KLZ-N-oksit) ve reaktif metabolit nitrenyum iyonunun GSH konjugatına (KLZ-SG) ait sonuçlar, Şekil 16'da gösterilmiştir. Mitokondrinin metabolik kapasitesini karşılaştırabilmek amacıyla aynı fare karaciğer ve kalp dokusundan elde edilen mikrozomal fraksiyonların varlığında oluşan metabolit miktarları da gösterilmiştir. Farklı inkübasyon ortamlarında oluşan metabolit miktarları, ortama eklenen gram cinsinden protein miktarlarına oranlanarak sunulmuştur. Çalışmada *-Enzim-GSH* ve *-Enzim+GSH* olmak üzere iki ayrı kontrol örneği bulunmaktadır. İstatistiksel önem analizlerinde test inkübasyonları sonucu oluşan metabolit miktarları, *-Enzim+GSH* kontrol inkübasyonu sonucu oluşan eser miktardaki metabolit miktarları ile karşılaştırılmış, enzim yokluğunda gözlenen bu miktarlar enzim fraksiyonu varlığında oluşan ilgili metabolit miktarlarından çıkarılmıştır. Şekil 16-üst paneli, karaciğer ve kalp mikrozomal ve mitokondriyel fraksiyonları varlığında oluşan NorKLZ metabolit miktarlarını göstermektedir. NorKLZ beklenildiği gibi en yüksek oranda karaciğer mikrozomal fraksiyonu ile oluşmuştur. Ancak karaciğer mitokondriyel membran ve matriks fraksiyonları da mikrozomal fraksiyonun % 30'u gibi önemli miktarda metabolit oluşturmuşlardır. Bu iki fraksiyonun birlikte inkübasyon ortamına konduğu durumlarda metabolit miktarı, tek tek oluşturdukları miktarın toplamı kadar oluşmuştur. Buna karşın kalp

dokusundan izole edilen mikrozomal, mitokondriyel membran ve mitokondriyel matriks fraksiyonlarıyla oluşan NorKLZ miktarları karaciğer dokusu ile kıyaslandığında sırasıyla % 16, % 2.6 ve % 4.6 kadardır.

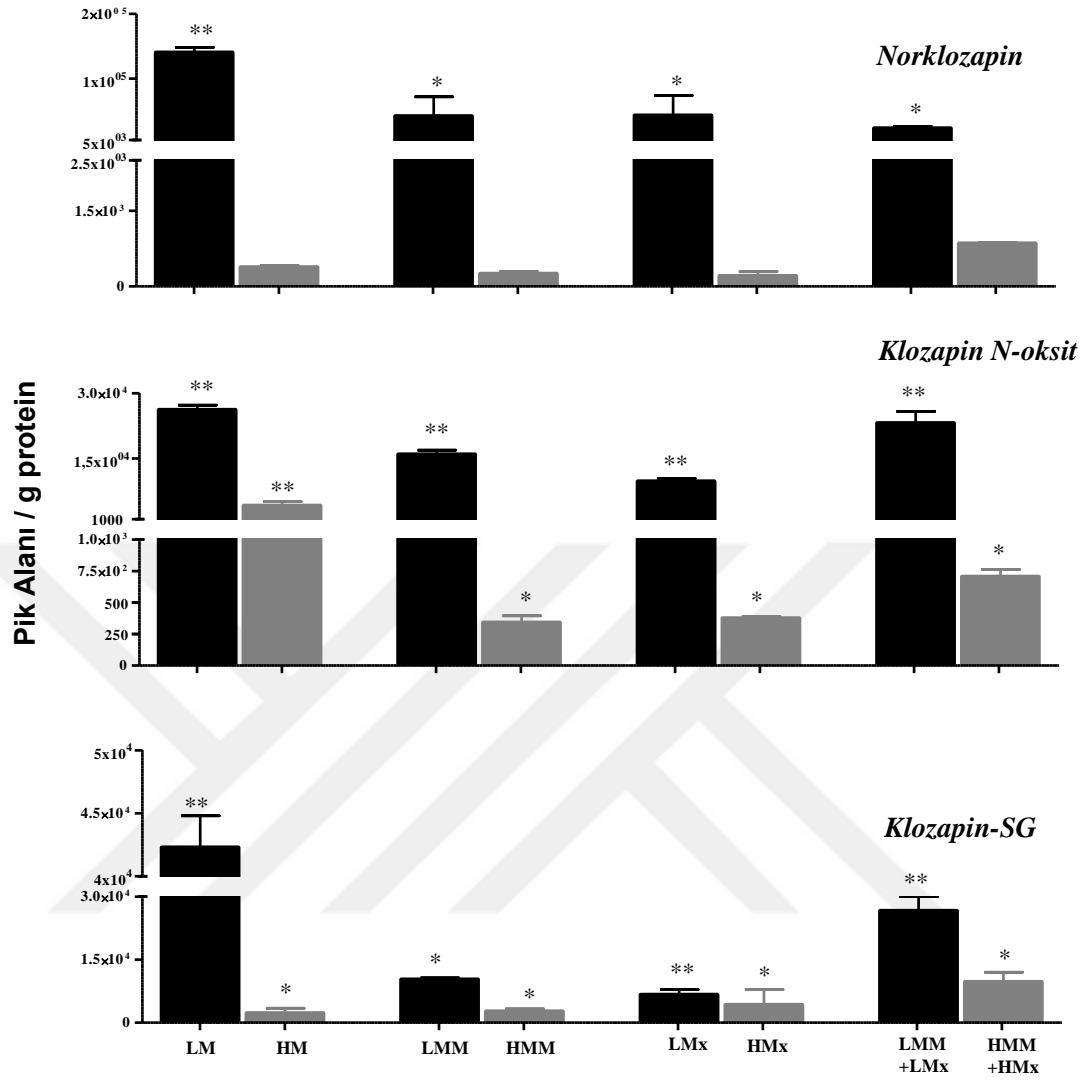
Mikrozomal inkübasyonda oluşan NorKLZ, kontrol inkübasyonuna kıyasla 144 kat daha fazladır. Karaciğer mitokondriyel membran ve matriks fraksiyonlarının her ikisi de kontrolün yaklaşık 45 katı kadar NorKLZ oluşturmuştur. Oluşan NorKLZ miktarlarına istatistiksel analiz uygulandığında sadece karaciğer fraksiyonları kontrole kıyasla anlamlı derecede metabolit üretmiştir. Karaciğer mitokondriyel membran ve matriks fraksiyonları, mikrozomal fraksiyonun % 30'u kadar NorKLZ oluşturmuştur. Karaciğer mitokondriyel membran fraksiyonunun NorKLZ oluşturma kapasitesi, matriks fraksiyonuyla hemen hemen aynıdır. Mitokondriyel membran ve matriks fraksiyonlarının birlikte kullanıldığı inkübasyon ortamında ise her iki fraksiyonla tek başına oluşan miktarların toplamı kadar metabolit oluşmuştur (Şekil 16-üst panel). Kalp dokusuna ait sonuçlara bakıldığında ise oluşan metabolit miktarının kontrol inkübasyonları kadar olduğu görülmektedir. Kalp mikrozomu kontrolün 1.4 katı, mitokondriyel membranlar ve matriks fraksiyonu ise 1.2 katı oranında metabolit oluşturmuştur. Kardiyak mikrozomal ve mitokondriyel enzimlerin NorKLZ oluşturmada etkili bir rolü yoktur (Şekil 16-üst panel).

KLZ-*N*-oksit'e ait sonuçlar ise Şekil 16 orta panel'de gösterilmiştir. Karaciğer mikrozomal fraksiyonu, beklenildiği gibi yine en yüksek oranda metabolit oluştururken, karaciğer mitokondriyel membran ve matriks fraksiyonları sırasıyla mikrozomun % 50'si ve % 30'u kadar metabolit oluşturmuşlardır. Bu iki fraksiyonun KLZ-*N*-oksit oluşturma kapasiteleri kıyaslandığında mitokondriyel membran fraksiyonunun matriksten 1.7 kat daha yüksek olduğu görülmektedir. Her iki fraksiyonu birlikte içeren inkübasyonlarda ise oluşan metabolit miktarı, fraksiyonların tek başlarına oluşturdukları miktarın yaklaşık toplamı kadardır. Kalp dokusundan izole edilen fraksiyonlarla yapılan inkübasyonlarda kardiyak mikrozomal fraksiyon, karaciğer mikrozomal fraksiyonunun % 16'sı kadar, mitokondriyel membran ve matriks fraksiyonları ise karaciğer dokusu karşılıklarına göre sırasıyla % 2.6 ve % 4.6'sı kadar KLZ-*N*-oksit oluşturmaktadır. KLZ-*N*-oksit açısından membran ve matriks fraksiyonlarının kapasitesi hemen hemen aynıdır. Membran ve matriks fraksiyonunu birlikte içeren inkübasyonlarda, fraksiyonların tek başlarına oluşturdukları miktarın toplamı kadar metabolit oluşmuştur (Şekil 16-orta panel). Karaciğer membranı kalp membranından 36 kat, matriksi ise kalp matriksinden 20 kat daha fazla KLZ-*N*-Oksit oluşturmuştur (Şekil 16-orta panel).

Klozapinin reaktif metabolitinin glutasyon konjugatı KLZ-SG ise karaciğer mikrozomal fraksiyonu ile kontrole kıyasla 7270 kat, kalp mikrozomal fraksiyon ile ise 347

kat daha fazla oluşmuştur (Şekil 16-alt panel). Mitokondriyel fraksiyonlar kontrol inkübasyonu ile kıyaslandığında karaciğer membranları ile 1587 kat, matriksiyle 1020 kat daha fazla reaktif metabolit üretildiği görülmüştür. Kalp mitokondriyel membranları ise kontrolün 420 katı, matriksi ise 653 katı oranında daha fazla konjugat oluşturmuştur. Karaciğer mikrozomu karaciğer mitokondriyel membranlarına göre 4 kat fazla glutatyon konjugatı oluştururken, kalp membranları kalp mikrozomunun 1.2 katı konjugat oluşturmuştur. Aynı durum matrikste de gözlenmektedir.

Karaciğer mikrozomu, karaciğer mitokondriyel matriksin 6 katı kadar fazla SG konjugatı oluştururken, kalp mitokondriyel matriksi kalp mikrozomunun 1.8 katı kadar konjugat oluşmasına neden olmuştur. Karaciğer membranlarının konjugat oluşturma gücü matriksin 1.6 katı daha fazla iken şaşırtıcı sonuçlar kalp mitokondriyel fraksiyonları arasındadır. Kalp mitokondriyel matriksi membranlarına göre 1.6 kat daha fazla SG konjugatı oluşturmuştur. Mitokondriyel membran ve matriks fraksiyonlarının birlikte kullanıldığı inkübasyonlarda ise karaciğerde membranın 2.6 katı, kalp için ise membranın 3.4 katı oranında konjugat oluştuğu görülmektedir. İki doku arasındaki sonuçlar kıyaslandığında ise karaciğer mikrozomlarının kalp mikrozomlarına göre 18 kat, karaciğer mitokondriyel membranlarının kalp mitokondriyel membranlarına göre 3.8 kat daha fazla konjugat oluşturduğu görülmektedir. Matriks fraksiyonlarının reaktif metabolit oluşturma kapasitesine bakıldığında ise karaciğer matriksinin kalbin sadece 1.6 katı olduğu gözlenmiştir (Şekil 16 alt panel).

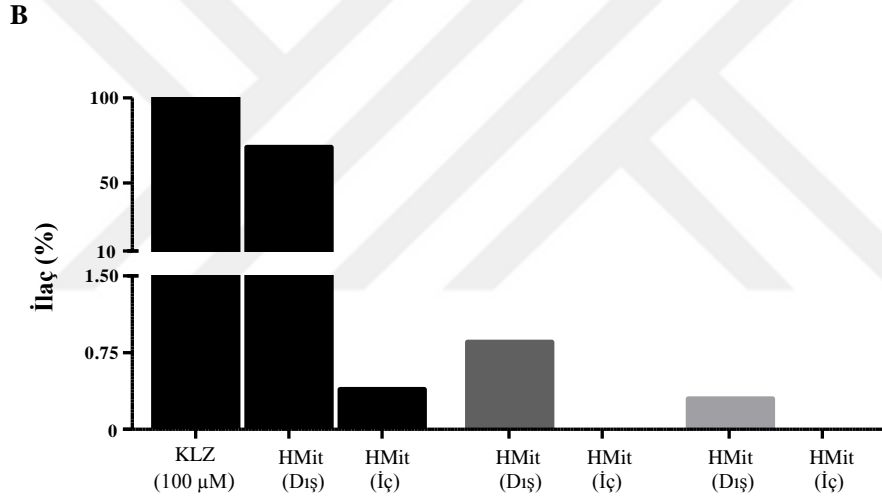
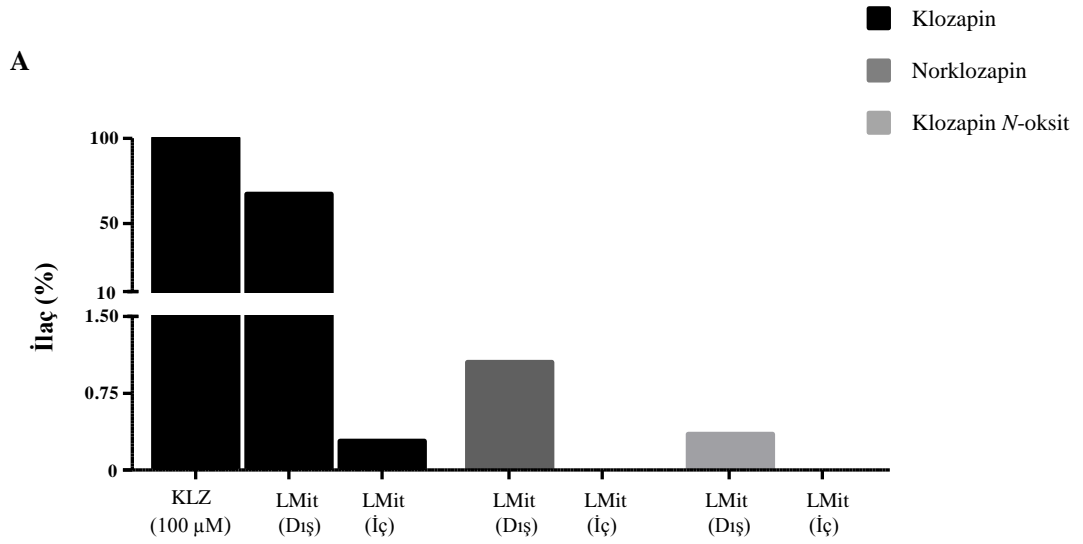


Şekil 16. Fare karaciğer ile kalp mikrozomal ve mitokondriyel fraksiyonları varlığında klozapin biyotransformasyonu. LM, karaciğer mikrozomları; HM, kalp mikrozomları; LMM, karaciğer mitokondriyel membranları; HMM, kalp mitokondriyel membranları; LMx, karaciğer mitokondriyel matriks; HMx, kalp mitokondriyel matriks. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.2.3. Mitokondriyel Penetrasyonun Belirlenmesine Ait Bulgular

Klozapin kullanan hastaların sadece % 2'sinde ortaya çıkan, ancak bunların yarısında ölüme yol açan kardiyak toksisite mekanizması daha önce de belirtildiği gibi bilinmemektedir. Bizim bu konudaki hipotezimiz; klozapinin enerji ihtiyacı yüksek olan kalp kası hücrelerinin mitokondrisinde biyoaktivasyona uğrayarak devamında ATP üretimi dâhil olmak üzere mitokondriyel işlevleri bozduğu yönündedir. Bu hipotezin geçerliliğinin test edilmesinde ilk basamak olan saf mitokondriyel fraksiyonların varlığında reaktif metabolit oluşumu, bir önceki bölümde gösterilmiştir. Bir sonraki aşamada hücre sitozolüne kadar ulaşan klozapinin mitokondri içine girip girmediği test edilmiştir. Bu amaçla izole mitokondriler belirli konsantrasyonda klozapin ile inkübe edildikten sonra inkübasyon ortamında klozapin ve stabil metabolitleri LC- MS/MS yöntemiyle ölçülmüştür.

Penetrasyon deneyleri karşılaştırma amacıyla yine hem karaciğer hem de kalp dokusundan izole edilen mitokondrilerle gerçekleştirilmiştir. Şekil 17'de klozapinin karaciğer ve kalp mitokondrisine ne oranda girdiği, aynı zamanda inkübasyon ortamında oluşan stabil metabolit oranları gösterilmiştir. İnkübasyonlar 1 mg/mL protein mitokondriyel fraksiyon ve 100 µM klozapin ile gerçekleştirilmiş, bu miktar ilacın pik alanı % 100 kabul edilerek mitokondri içinde ve dışındaki miktarlar buna göre oranlanmıştır. Şekil 17A, karaciğer sonuçlarını göstermektedir. İnkübasyon sonunda mitokondri dışında klozapin, başlangıç konsantrasyonunun % 67'sine düşmüştür (Şekil 17A). Kalp inkübasyonlarında ise mitokondri dışında kalan oran % 70'dir (Şekil 17B). Buna karşın ilacın mitokondri içinde ölçülen klozapin oranı karaciğerde % 0.3, kalpte % 0.4'dür.



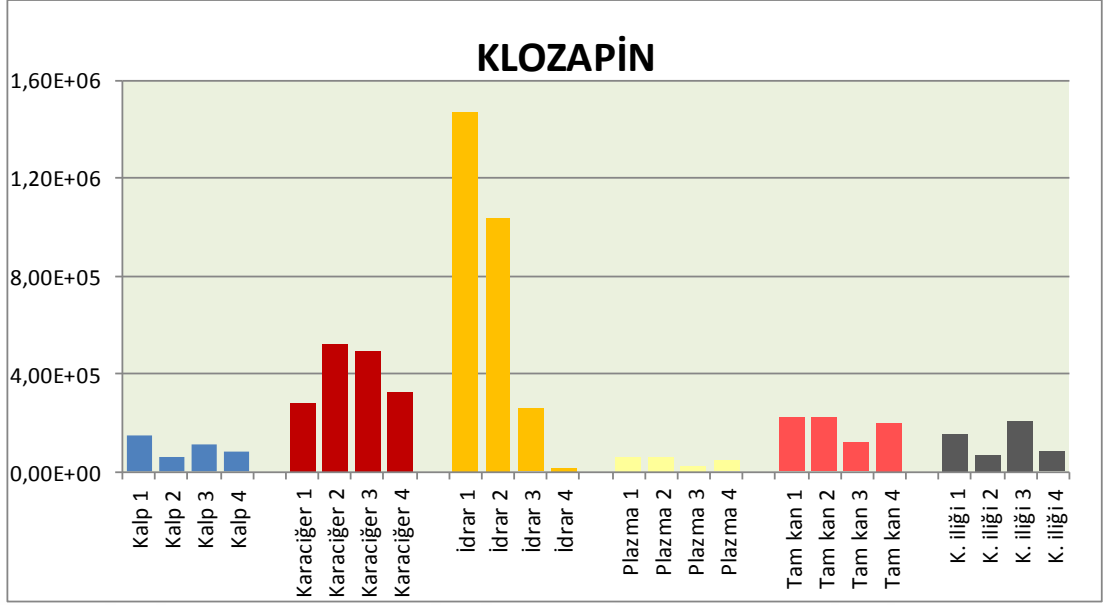
Şekil 17. Klozapinin sıçan karaciğer ve kalp mitokondrisine penetrasyonu. A:Karaciğer, B:Kalp. Gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar klozapin, koyu gri sütunlar Norklozapin, açık gri sütunlar ise klozapin N-oksit'e aittir. LMit, *karaciğer mitokondrisi*; HMit, *kalp mitokondrisi*.

İnkübasyon sonucunda dışarda kalan miktardan kayıp her iki organ için yaklaşık % 30 olmasına karşın mitokondri içinde ölçülen miktarların % 1'in altında olmasının ilk akla gelen açıklaması, ilacın inkübasyon ortamında mitokondri içinde ve/veya dışında metabolize olması olasılığıdır. Sitokrom P450 aracılıklı faz I reaksiyonları için gerekli kosubstratlar ortama eklenmemiş olsa da mitokondrinin kendi yapısında barındırdığı kofaktörler aracılığı ile metabolize olma olasılığı gözardı edilemez. Bu olasılığı test etmek üzere inkübasyon

ortamında mitokondri içinde ve dışında klozapinin iki stabil metaboliti olan NorKLZ ve KLZ-*N*-Oksit ölçülmüştür. Stabil metabolitlerin toplam oranı karaciğer için % 1.5 (% 1.07 NorKLZ ve % 0.43 KLZ-*N*-oksite) ve kalp için % 1.4 (% 1.01 NorKLZ ve % 0.39 KLZ-*N*-oksite)'dir. Bu oranlarla inkübasyondaki % 30 kayıp arasında yaklaşık % 28.5 fark vardır. Bu farkın bir bölümü, stabil metabolitler gibi klozapinden oluşması olası reaktif metabolit olan klozapin nitrenyum iyonudur. Bu elektrofilik metaboliti ölçebilmenin yolu, daha önceki bölümlerde uygulandığı şekilde ortama nükleofilik GSH koymak ve nitrenyum iyonunu stabil konjugatı şeklinde hapsetmektir. Bu deneylerde klozapinin mitokondriye girişi üzerinde herhangi olası bir etkiyi elimine etmek üzere ortama GSH eklenmemiş, dolayısıyla olası reaktif metabolit ölçülmemiştir. İnkübasyon sırasındaki klozapin kaybı ve sonunda ölçülen metabolitler arasındaki farkın son açıklaması, ilaç molekülünün enzimatik olmayan yollarla yani kimyasal olarak kısmen farklı yapılara parçalanmış olmasıdır. Bu iki olasılık doktora sonrası çalışmalar arasında planlanmıştır; 100 µM klozapin mitokondri içermeyen ortamda ancak aynı koşullarda inkübe edilerek kimyasal parçalanma oranı belirlenecek, ayrıca mitokondri içeren inkübasyonlarda ortama GSH konarak reaktif metabolit miktarı belirlenecektir.

4.2.4. Sıçanda *in vivo* Klozapin Dağılımının Belirlenmesine ait Bulgular

Dozlanan dört Wistar sıçan dokularının analizine ait sonuçlar, Şekil 18'de gösterilmiştir. Şekilden görüleceği gibi kalbe ulaşan ilaç miktarı diğer organlarla karşılaştırılabilir düzeydedir. Karaciğere kıyasla 1/3 kadar klozapin kalp dokusuna ulaşmıştır (Şekil 18).



Şekil 18. Oral uygulama sonrası klozapinin sıçan dokularında dağılımı. Dört sıçana oral yoldan 20 mg/kg klozapin uygulanmış, anestezi altında açılan hayvanlardan #3 ve #4 nolu sıçanların kalp ve karaciğerleri perfüze edilmiştir.

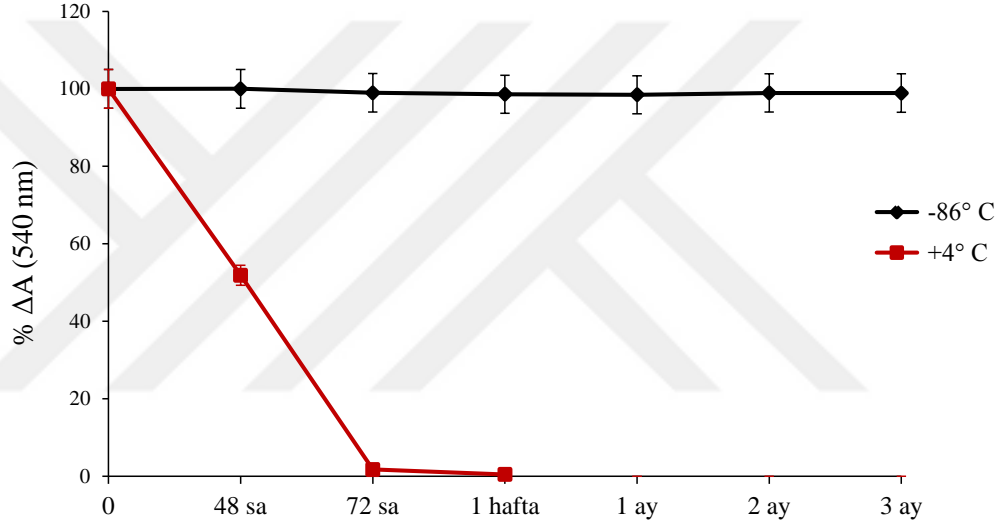
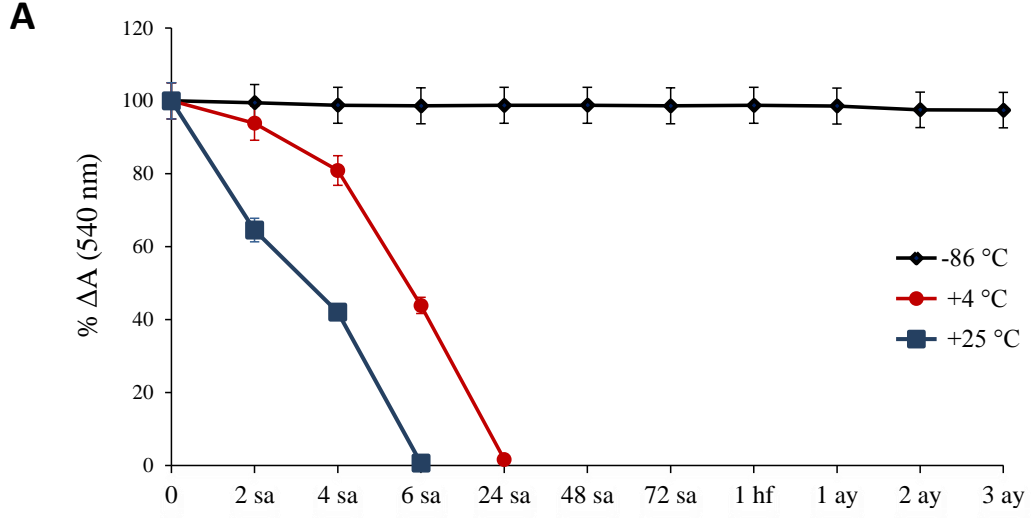
4.3. Farklı Saklama Sıcaklıklarında Mitokondri İşlevselliğinin MPTP Oluşturma Yeteneği Aracılığıyla İzlenmesine Ait Bulgular

Mitokondri iç ve dış membran proteinlerinin etkileşerek por oluşturabilme yeteneğinin mitokondri stabilitesini gösterebilecek bir parametre olarak kullanılabilirliğini test etmek amacıyla sığır karaciğer dokusundan taze izole edilerek +25°C (oda sıcaklığı), +4°C ve -86°C'de saklanan mitokondriyel fraksiyonların stabilite grafikleri, Şekil 19A'da gösterilmiştir. Oda sıcaklığında saklanan mitokondrilerde CaCl₂ ile indüklenen MPTP oluşumunun 2. saatin sonunda % 40, 4. saatin sonunda ise % 60 oranında azaldığı, 6. saatte ise mitokondrilerin por oluşturamadığı gözlenmiştir (Şekil 19A). +4°C'de saklanan mitokondrilerde 6. saatte MPTP indüksiyonu % 60 oranında azalmış, 24. saatte ise por açılımı gerçekleşmemiştir (Şekil 19A).

İzole mitokondri halde saklamanın stabiliteye etkilerinin yanı sıra doku halde saklamanın mitokondri stabilitesine etkisi, yine farklı ortam sıcaklıklarında ve farklı zaman noktalarında MPTP oluşturma yeteneği ölçümü ile test edilmiştir. Bu amaçla karaciğer dokusu porsiyonlara ayrılmış, farklı ortam sıcaklıklarında tutulmuş (+4°C ve -86 °C) ve belirli zaman noktalarında bunlardan izole edilen mitokondrilerin MPTP oluşturma yeteneklerinde bir değişiklik olup olmadığı, başlangıç (0. dk.) ölçümü ile kıyaslanarak analiz

edilmiştir. Şekil 19B, taze sığır karaciğer dokusunun +4°C 1 haftaya kadar ve -86°C'de ise 3 aya kadar saklanması sonucu farklı zaman noktalarında mitokondriyel fraksiyon izole edilerek uygulanan MPTP test sonuçlarını göstermektedir. +4°C'de saklanan doku örneğinden 12, 48, 72 saat ve 1 hafta sonunda izole edilen mitokondrilerde CaCl₂ ile MPTP açılması 48 saat sonunda ise % 50'ye düşmüştür, 72. saat sonunda ise MPTP oluşumu gerçekleşmemiştir. Bu veriler, mitokondri yapısal ve/veya işlevsel bütünlüğünün hızlı bozulması nedeniyle dokuların +4°C'de saklanmasının uygun olmadığını göstermektedir (Şekil 19B). Aynı izolasyon protokolü ve MPTP testi -86°C'de saklanan doku için de 3 ay boyunca uygulanmış ve mitokondriyel stabilitede önemli değişikliklerin olmadığı görülmüştür. (Şekil 19B).

Doku ve izole mitokondriler için en uygun saklama sıcaklığının -86°C olduğu görülmektedir; mitokondrilerde CaCl₂ uygulaması sonucu absorbans şiddetindeki azalma 3 aya kadar aynıdır, yani mitokondrinin yapısal ve işlevsel bütünlüğü korunmuştur (Şekil 19A ve B).



Şekil 19. Farklı depolama sıcaklıklarının izole mitokondri ve doku stabilitesine etkisinin MPTP testi ile değerlendirilmesi. A, +25°C, +4°C ve -86°C’de saklanan izole mitokondri; B, +4°C ve -86°C’de saklanan doku örnekleri. X skalasında birimler eşit aralıklı kullanılmamıştır.

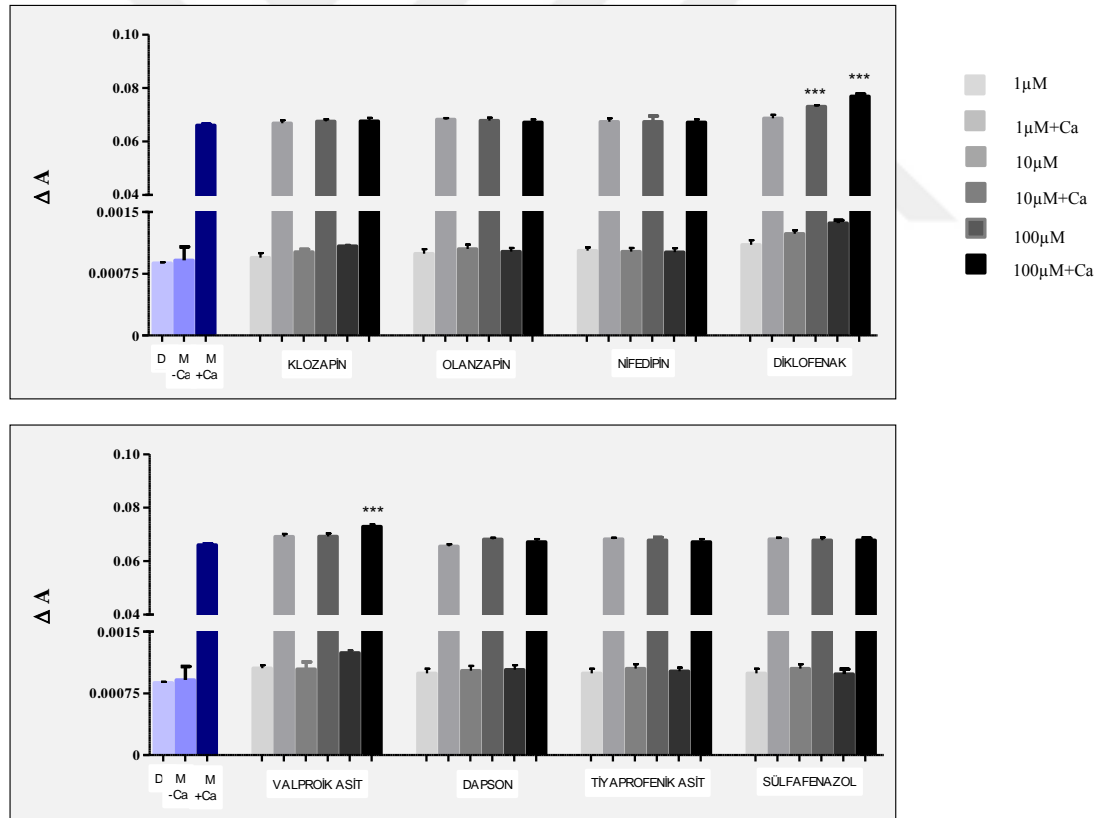
4.4. Çalışılan İlaçların Mitokondriyel İşlevlere Etkilerine Ait Bulgular

4.4.1. İlaçların MPTP Oluşumu Üzerine Etkilerinin Test Edilmesine Ait Bulgular

Şekil 20’de çalışma dâhilindeki ilaçların 1, 10, 100 µM konsantrasyonlarında MPTP oluşumuna etkileri gösterilmektedir. Kolon sayıları fazla olduğu için ilaçlar A ve B şeklinde iki grup halinde gösterilmiştir. Kontrol inkübasyonlarından ilki çözücü kontrol olan % 1 DMSO’dur. Bir diğer kontrol inkübasyonu ilaç ya da CaCl₂ içermeyen mitokondriyel inkübasyon ortamıdır. Pozitif kontrol olarak 250 µM CaCl₂ kullanılmış, mitokondriyel

inkübasyon ortamına eklenerek MPTP indüksiyon düzeyi ölçülmüştür. Ayrıca çalışma dâhilindeki ilaçların mitokondriyel inkübasyonları CaCl_2 içeren ve içermeyen iki ayrı ortamda da gerçekleştirilmiş, tüm sonuçlar Şekil 20’de özetlenmiştir. 250 μM CaCl_2 uygulanması, MPTP oluşumunda yaklaşık 72 katlık bir artış meydana getirmiştir (“Mit+ CaCl_2 ”, “Mit” ile kıyaslanmıştır).

Test edilen ilaçlardan sadece 10 μM ve 100 μM diklofenak (Şekil 20A) ile 100 μM valproik asit (Şekil 20B) Ca^{++} ile indüklenen MPTP oluşumunu anlamlı derecede artmıştır. “İlaç+ CaCl_2 ” inkübasyonlarının istatistiksel önemi, “Mit+ CaCl_2 ” pozitif kontrol grubuna kıyasla hesaplanmıştır. Ortamda Ca^{++} bulunmayan, ilaçların tek başına inkübe edildiği durumlarda MPTP oluşumu gerçekleşmemiştir. Diklofenak sonuçlarında doza bağımlı bir artış eğilimi olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 20. Çeşitli ilaçların MPTP oluşumuna etkileri. Kolon sayıları fazla olduğu için sonuçlar “A” ve “B” olacak şekilde iki grup halinde verilmiştir. A, Klozapin, olanzapin, nifedipin ve diklofenak ın MPTP oluşumuna etkisi, B, valproik asit, dapson, tiyaprofenik asit, sülfafenazolün MPTP oluşumuna etkisi. (D: % 1 DMSO, çözücü kontrolü, Mit: sadece mitokondri içeren inkübasyon, Mit+ CaCl_2 : 250 μM CaCl_2 içeren mitokondriyel inkübasyondur. Çalışma kapsamındaki ilaçların 1, 10 ve 100 μM

olmak üzere 3 ayrı doz düzeyindeki MPTP oluşumuna etkileri CaCl_2 ile beraber ya da ayrı olarak incelenmiştir. Değerler *ort±standart hata* şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel önem analizleri yapılırken “Mit+ CaCl_2 ” örneği “Mit” ile “Mit+İlaç+ CaCl_2 ” inkübasyonları ise “Mit+ CaCl_2 ” inkübasyonu ile kıyaslanmıştır. (***) $p < 0.001$)

4.4.2. İlaçların Mitokondriyel DNA Metilasyonu Düzeylerine Etkilerine Ait Bulgular

Tez kapsamında mitokondriyel yapılar ve işlevler üzerinde olası etkileri araştırılan ilaçlar, mtDNA metilasyonu üzerindeki olası etkileri açısından da incelenmiş, sonuçlar Şekil 21 ve 22’de % *metilsitozin* cinsinden gösterilmiştir. Çalışmadaki iki kontrol grubundan ilki ilaçların çözücüsü olarak kullanılan % 1 DMSO (D), diğeri ise 2017 yılında *in vitro* ortamda 15 mM konsantrasyonda mtDNA düzeylerini % 92 oranında düşürdüğü bildirilmiş olan valproik asittir (pozitif kontrol; VPA) (660). İlaçların inkübasyon ortamında uygulanan konsantrasyonları daha önceki çalışmalarımızda belirlenen sitotoksikite oluşturmayan en yüksek konsantrasyonlarıdır. Olanzapin, tiyaprofenik asit, sülfafenazol ve dapson için 100 μM , nifedipin ve valproik asit için 10 μM , klozapin için 10 ve 50 μM , diklofenak için ise 0.01 μM konsantrasyonlarda çalışılmıştır.

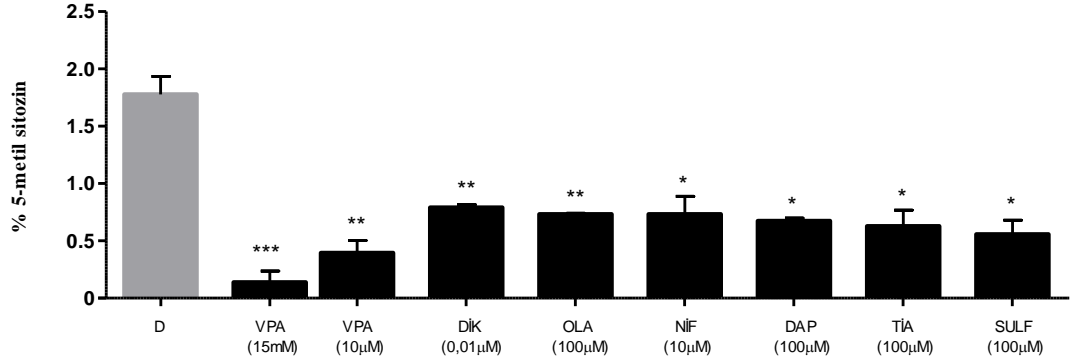
Herbir ilaç varlığında belirlenen mtDNA metilasyon düzeyi, % 1 DMSO kontrol ile karşılaştırılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. Tüm ilaçlar çalışılan dozlarda mtDNA metilasyonunu anlamlı biçimde azaltmıştır (Şekil 21). Farklı olarak klozapin ile 2 ayrı doz düzeyinde çalışılmış, 10 μM dozda mtDNA metilasyonunu %1 DMSO kontrole kıyasla %73 oranında azaltırken, ilacın dozunun 50 μM ’a çıkarılmasıyla metilasyon % 83 oranında azalmıştır (Şekil 22). Gözlenen bu etkinin reaktif nitrenyum iyonuna bağlı olup olmadığını test etmek üzere aynı inkübasyonlar 5 mM GSH varlığında da gerçekleştirilmiş, GSH yokluğunda metilasyonda gözlenen azalmalar sırasıyla % 30 ve % 80 oranında geri döndürülmüştür (Şekil 22).

Pozitif kontrol olarak çalışılan valproik asit 15 mM dozda literatürde bildirilene benzer şekilde %92 oranında hipometilasyona neden olurken (660), doz 1/1500 oranında azaltılmasına karşın, yani 100 μM ’da da % 78 gibi ilkine çok yakın oranda bir hipometilasyona neden olmuştur (Şekil 21).

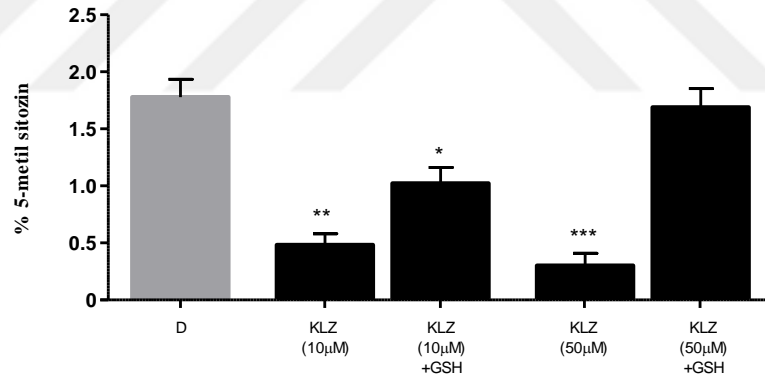
Diklofenak 0.01 μM dozda kontrole göre metilasyonu % 44 oranında, 100 μM olanzapin ve 10 μM nifedipin ise birbirine eşdeğer biçimde % 41 oranında azaltmıştır (Şekil

21). İnkübasyon ortamındaki son konsantrasyonu 100 µM olarak seçilen dapson, tiyaprofenik asit ve sülfafenazol ise mtDNA metilasyonunda sırasıyla % 62, % 65 ve % 69 oranında azalmalara neden olmuşlardır (Şekil 21).





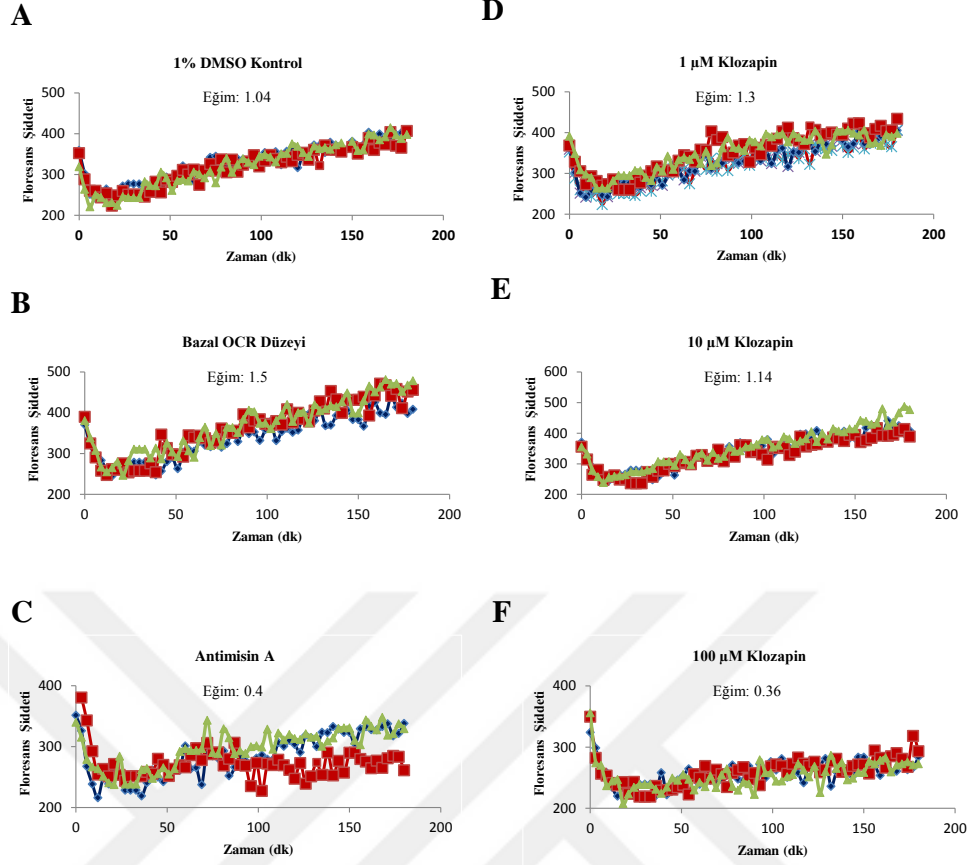
Şekil 21. Bazı ilaçların sitotoksisiteye neden olmayan en yüksek konsantrasyonlarında CHO-K1 hücrelerinde mtDNA metilasyonuna etkileri. D: % 1 DMSO, çözücü kontrol. VPA, valproik asit; DİK, diklofenak; OLA, olanzapin; NİF, nifedipin; MET, metformin; DAP, dapson; TİA, tiyaprofenik asit; SULF, sülfafenazol. Değerler $ort \pm standart\ hata$ şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel önem analizleri “%1 DMSO” kontrol grubuna göre yapılmıştır; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Şekil 22. Klozapinin GSH varlığında ve yokluğunda CHO-K1 hücrelerinde mtDNA metilasyon düzeylerine etkileri. D, % 1 DMSO çözücü kontrol; KLZ, klozapin. Değerler $ort \pm standart\ hata$ şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel önem analizleri “% 1 DMSO” kontrol grubuna göre yapılmıştır; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.4.3. İlaçların Mitokondriyel Oksijen Tüketimine Etkilerine Ait Bulgular

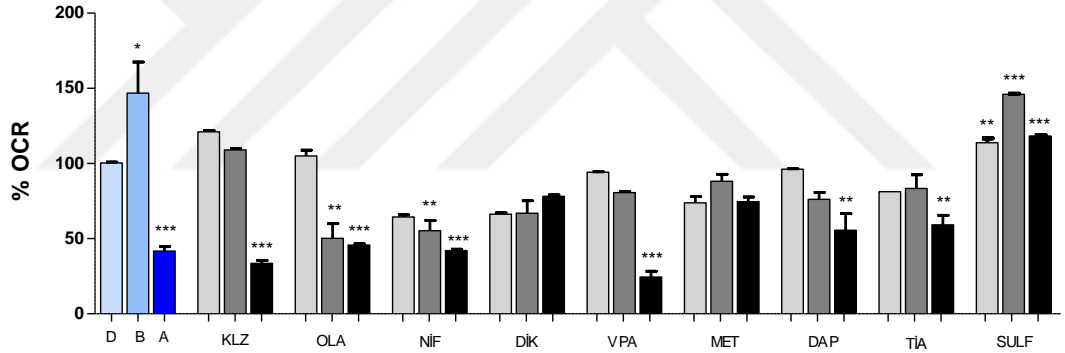
Çalışılan ilaçların CHO-K1 hücrelerinin mitokondrilerinde oksijen tüketimine etkileri, floresan bazlı bir kit olan Luxcel®Xtra kullanılarak 1, 10 ve 100 µM olmak üzere üç doz düzeyinde ölçülmüştür. Önce hücreler 96 kuyucuklu plakaya ekilip tutunmaları sağlandıktan sonra reajan eklenmekte ve hücrelerin üzeri atmosferik oksijen ile alışverişi kesmek üzere mineral yağ damlacığı ile kapatılmaktadır. MitoXpress®Xtra reajanının verdiği floresans ile hücre dışına çıkan oksijen miktarı arasında ters orantı vardır. Hücresel solunum sırasında O₂ konsantrasyonu azalacağı için MitoXpress®Xtra sinyali zamanla artar. Bu sayede oksijen tüketim hızı, zaman içerisinde floresans sinyaldeki değişimden hesaplanabilir. Çalışmada beş ayrı kontrol (kör kontrol, çözücü kontrol, test maddesi içermeyen kontrol, pozitif kontrol; Antimisin A ve sinyal kontrolü) kullanılmıştır. Kontrollerin ve ilaç inkübasyonlarının zamana bağlı floresan sinyal grafikleri çizilerek doğrusal zaman aralıklarının 42-99. dk'lar arası olduğu belirlenmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. Kontrol örneklerinin OCR değerleri ve klozapinin 3 ayrı konsantrasyonda CHO-K1 hücrelerinin oksijen tüketim hızına (OCR; oxygen consumption rate) etkisi. Oksijen tüketim hızı *Time-Resolved Fluorescence* modunda izlenmiştir (eks. 380 nm, em. 650 nm, okuma süresi: 200 dk, okuma sıklığı: 3 dk). İnkübasyonlar üçlü seriler halinde (triplike) yapılmıştır, her bir renk, üçlü seriyi temsil etmektedir. İlk sütundaki grafikler (A-C) deneydeki kontrol örneklerini göstermektedir; A, % 1 DMSO çözücü kontrolü; B, Bazal (test maddesi içermeyen kontrol; C, Pozitif kontrol (Antimisin A); D, 1 μM klozapin varlığında OCR; E, 10 μM klozapin varlığında OCR; G, 100 μM klozapin varlığında OCR.

Çalışılan ilaçların CHO-K1 hücrelerinde OCR üzerindeki etkileri toplu halde Şekil 24’de gösterilmiştir. Kontrollerden ilki olan kör kontrolün, yani reaktif ajan içermeyen ve sadece hücre barındıran kuyucukların sinyal ortalama değerleri, tüm örneklerden çıkarılmıştır. Her örnek için elde edilen eğimden hareketle OCR değerleri hesaplanmıştır. Bir diğer kontrol ise çözücü kontrol olan % 1 DMSO’dur. İlaçların taşıyıcısı olan DMSO’nun inkübasyon ortamlarındaki son konsantrasyonu % 1 olduğu için ilaç uygulanmayan hücelere aynı oranda DMSO konmuştur. Çözücü kontrolün OCR değeri % 100 kabul edilerek tüm inkübasyonların % OCR değerleri oranlanarak hesaplanmış ve Şekil 24’de grafiğe

geçirilmiştir. İlaç ya da herhangi bir madde uygulanmayan, sadece hücre ve reaktif ajan içeren kontrol, hücrelerin bazal OCR düzeyini yansıttığı için *bazal kontrol* olarak isimlendirilmiştir. Bir diğer kontrol örneği ise ROT oluşumunu arttıran ve *Kompleks III* düzeyinde mitokondriyel solunumu 150 μM konsantrasyonda % 60 inhibe eden Antimisin A'dır. 100 μM klozapin, OCR'de % 67 oranında inhibisyona neden olurken 10 ve 100 μM dozlarında benzer etki gözlenmemiştir. Olanzapin 10 μM konsantrasyonda OCR'de % 50, 100 μM konsantrasyonda ise % 54 oranında düşüğe neden olmaktadır. 1 μM nifedipin OCR'de % 36, 10 μM nifedipin % 44 ve 100 μM ise % 57 oranında azalmaya neden olmuştur. Valproik asit, tiyaprofenik asit ve dapson 100 μM konsantrasyonda OCR'yi sırasıyla % 75, % 40 ve % 44 oranında azaltmıştır. Sülfafenazol test edilen üç doz değerinde de oksijen tüketim oranı arttırmıştır. Diklofenak ve metforminde de azalma eğilimi olmasına karşın istatistiksel analiz sonucunda önemli bir fark bulunmamıştır (Şekil 24).



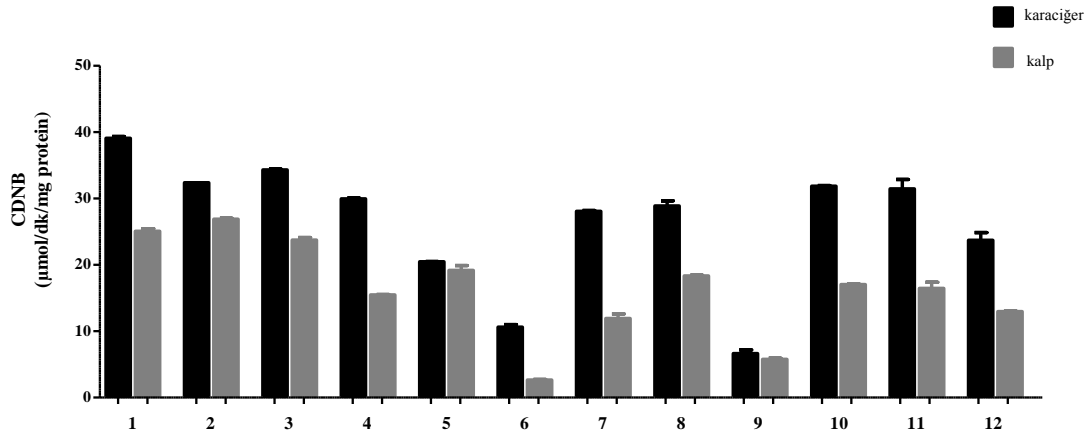
Şekil 24. CHO-K1 hücrelerinin farklı ilaçlarla inkübasyonu sonucu oksijen tüketim hızındaki (OCR) değişiklikler. (Çalışmadaki üç önemli kontrol grubuna ait % OCR değerleri grafikte gösterilmiştir; D; %1 DMSO, çözücü kontrolü, B; bazal OCR kontrol, A; Antimisin A, pozitif kontrol. Çalışılan ilaçlar ise KLZ; klozapin, OLA; olanzapin, NİF; nifedipin; DİK; diklofenak, VPA; valproik asit, MET; metformin, DAP; dapson, TİA; tiyaprofenik asit ve SULF; sülfafenazol. Tüm ilaçların 1, 10 ve 100 μM olmak üzere üç ayrı konsantrasyonları çalışılmıştır). Değerler $ort \pm standart\ hata$ şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel önem analizleri “%1 DMSO” kontrol grubuna göre yapılmıştır; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Bu sonuçlar birkaç açıdan ilginçtir; 100 μM klozapinin ve valproik asitin oksijen tüketim hızı üzerindeki inhibisyonu, ETC *Kompleks III* düzeyinde inhibisyon yaptığı iyi bilinen Antimisin A'nın 150 μM konsantrasyonu ile sağlanan % 60 oranından fazladır. Bu durum, klozapin ve valproik asitin son derece potent bir oksidatif solunum inhibitörü olabileceğini göstermektedir (Şekil 24). Ayrıca 100 μM olanzapin ve nifedipinin de hemen hemen pozitif kontrol kadar inhibisyona neden olması bu ilaçlar için de aynı durumun geçerli olduğunu düşündürmektedir.

4.5. İnsan Mitokondriyel Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümleri

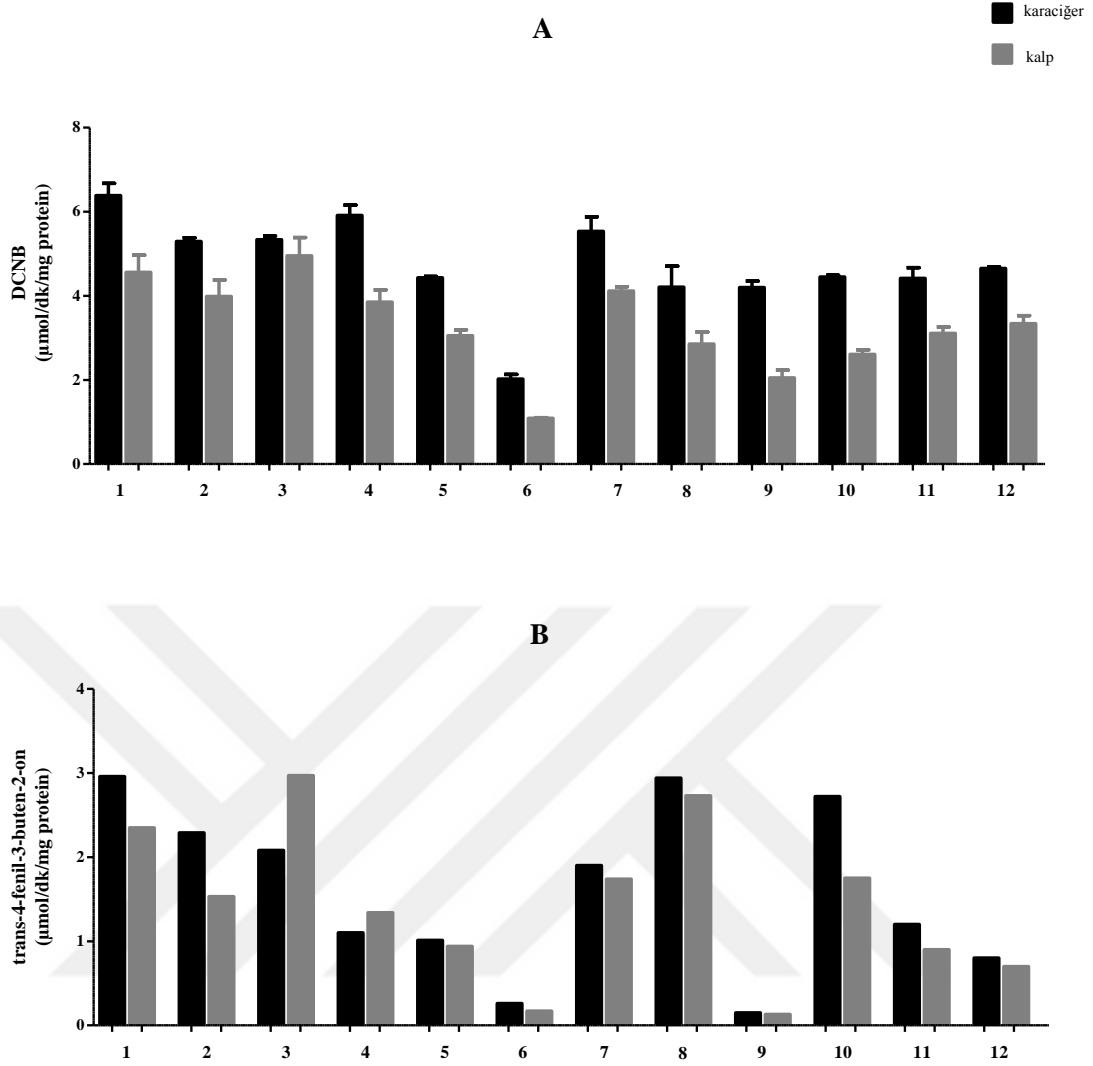
Otopsi sırasında alınan dokulardan hazırlanan 12 ayrı insan karaciğer ve kalp mitokondriyel matriks fraksiyonlarında GST, SOD, CAT ve Se-GPx enzimlerinin spesifik aktiviteleri araştırılmıştır.

GSTT dışındaki tüm GST izoenzimleri, CDNB'nin GSH ile konjugasyonunu katalize ederler, yani CDNB tüm izozimler için ortak substrattır. Şekil 25'de toplam 12 bireyin karaciğer ve kalp mitokondriyel matriks fraksiyonlarındaki GST enzimlerinin CDNB'ye karşı toplam aktiviteleri gösterilmektedir. GST genel aktivitesi karaciğer mitokondrilerinde 6.6 ve 39 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ arasında (ortalama 26 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$), kalp mitokondrilerinde ise 2.64 ve 25 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ arasında (ortalama 17 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$) değişmektedir. Bireylerin karaciğer ve kalp mitokondrilerindeki ortalama GST aktiviteleri arasında 1.5 katlık fark bulunmaktadır (Şekil 25).



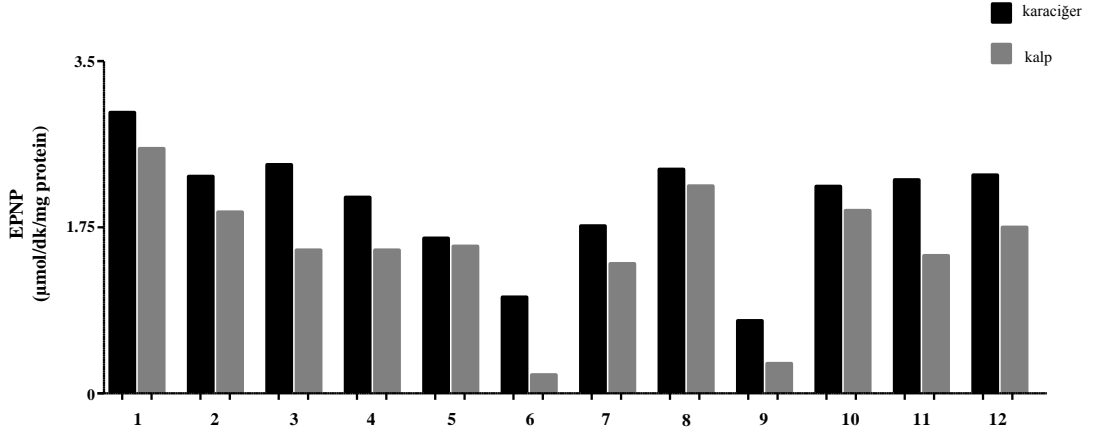
Şekil 25. İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel total GST enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. Karaciğer ve kalp mitokondriyel GST aktiviteleri, izoenzimlerin genel substratı olan CDNB'ye karşı ölçülmüştür, bu nedenle her bir aktivite, GSTT dışında tüm mitokondriyel GST izoenzimlerinin toplam aktivitesini yansıtmaktadır.

GSTM izoenzimi spesifik aktivitesinin belirlenmesinde ise iki ayrı substrat kullanılmıştır. Bu substratlardan ilki DCNB'dir. DCNB'ye karşı ölçülen bireysel mitokondriyel GSTM aktiviteleri karaciğerde 2.02 ile 6.38 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ arasında (ortalama 4.73 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$), kalp mitokondrilerinde ise 1.09 ile 4.55 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ arasında (ortalama 3.29 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$) değişmektedir (Şekil 26). İkinci spesifik substrat *trans*-4-fenil-3-buten-2-on'a karşı ölçülen GSTM aktiviteleri ise karaciğer mitokondrilerinde 1 ile 2.96 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ arasında (ortalama 1.72 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$), kalp mitokondrilerinde ise 0.17 ile 2.7 $\mu\text{mol /dk/mg protein}$ arasındadır (ortalama 1.63 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$) (Şekil 26).



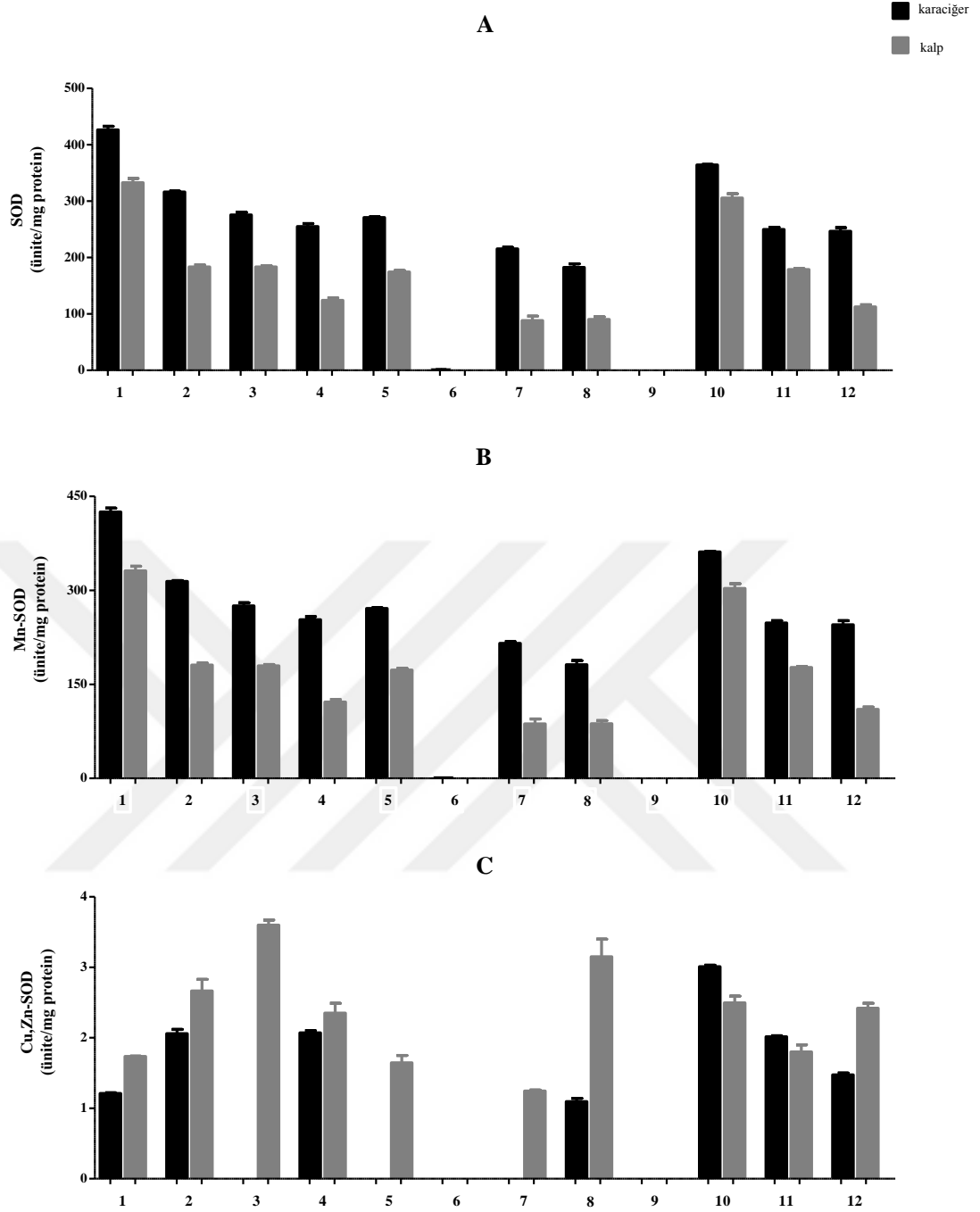
Şekil 26. İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel GSTM enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. A, DCNB spesifik substratına karşı GSTM aktivitesi; B, *trans*-4-fenil-3-buten-2-on'a spesifik substratına karşı GSTM aktivitesi.

GSTT aktivitesi ise EPNP substratı kullanılarak ölçülmüş, karaciğer mitokondrilerinde GSTT aktivitesinin 1 ile 2.96 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ arasında (ortalama 2 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$), kalp mitokondrilerinde ise 0.19 ile 2.58 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ arasında (ortalama 1.5 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$) değiştiği gösterilmiştir (Şekil 27). Bireylerin karaciğer ve kalp mitokondrilerindeki ortalama GSTT aktiviteleri arasında 1.3 katlık fark bulunmaktadır.



Şekil 27. İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel GSTT enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. Karaciğer ve kalp mitokondriyel GSTT aktiviteleri, EPNP'ye karşı ölçülmüştür.

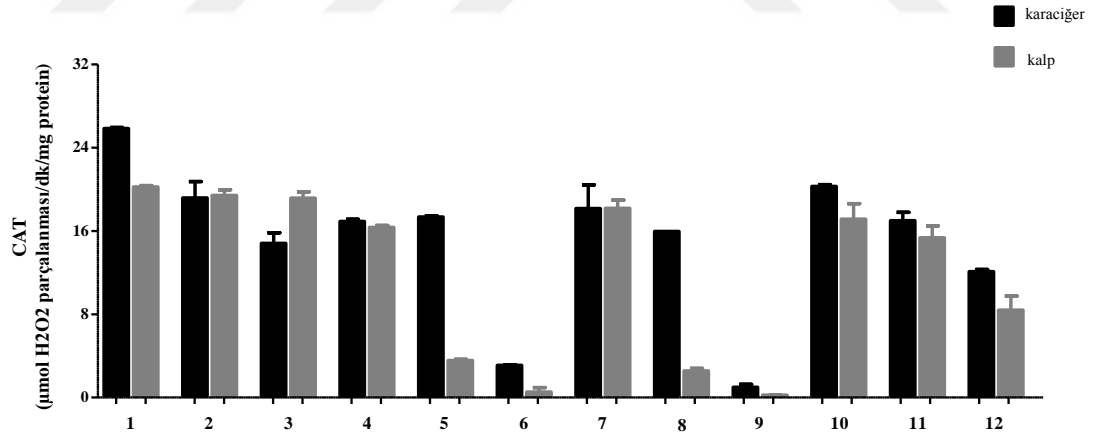
“Genel Bilgiler Bölümü”nde bahsedildiği üzere iki SOD enziminin (SOD1 ve SOD2) aktivitesi önce total ölçülmekte, daha sonra aktif bölgesinde Cu ve Zn taşıyan sitozolik SOD (SOD1), CN ile inhibe edilerek aktif bölgesinde Mn taşıyan mitokondriyel SOD (SOD2) aktivitesi ölçülmekte, total aktivite ve SOD2 arasındaki farktan da SOD1 aktivitesi hesaplanmaktadır. Total SOD aktivitesine bakıldığında (Şekil 28A) örneklerin ikisinde, 6 ve 9 nolu bireylerde karaciğer ve kalpte SOD aktivitesi saptanmamıştır; 6 nolu karaciğerde eser miktarda aktivite vardır. Karaciğer mitokondriyel matriks örneklerinde Mn-SOD aktivitesi, 0 ile 424 *ünite/mg protein*, kalp mitokondriyel matriksinde ise 0 ile 330 *ünite/mg protein* arasında değişmektedir. Bireylerin karaciğer ve kalp mitokondriyelerindeki ortalama Mn-SOD aktiviteleri arasında 1.6 katlık fark bulunmaktadır (Şekil 28B). Sitozolde bulunan Cu,Zn-SOD enziminin mitokondriyel matriks fraksiyonlarında aktivite göstermemesi gerekir, buna karşın hem karaciğer, hem kalp mitokondriyel matriks fraksiyonlarında Cu,Zn-SOD enzim aktivitesi saptanmıştır (Şekil 28C), bu durum matriks fraksiyonunun kontamine olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan Mn-SOD aktivitesi (Şekil 28B) ve Cu,Zn-SOD aktivitesi (Şekil 28C) karşılaştırıldığında Mn-SOD aktivitesi en az 150 kat daha yüksektir, dolayısıyla kontaminasyonun derecesi çok düşüktür. Cu,Zn-SOD enzim aktivitesi karaciğerde 0 ile 3 *ünite/mg protein*, kalpte ise 0 ile 3.15 *ünite/mg protein* arasında değişmektedir (Şekil 29C).



Şekil 28. İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel SOD enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. A, Total SOD aktivitesi; B, Mn-SOD (SOD2) aktivitesi; C, Cu,Zn-SOD (SOD1) aktivitesi. SOD aktivitesi, pirogallol otooksidasyonunun enzim varlığında engellenmesi yoluyla ölçülmüştür.

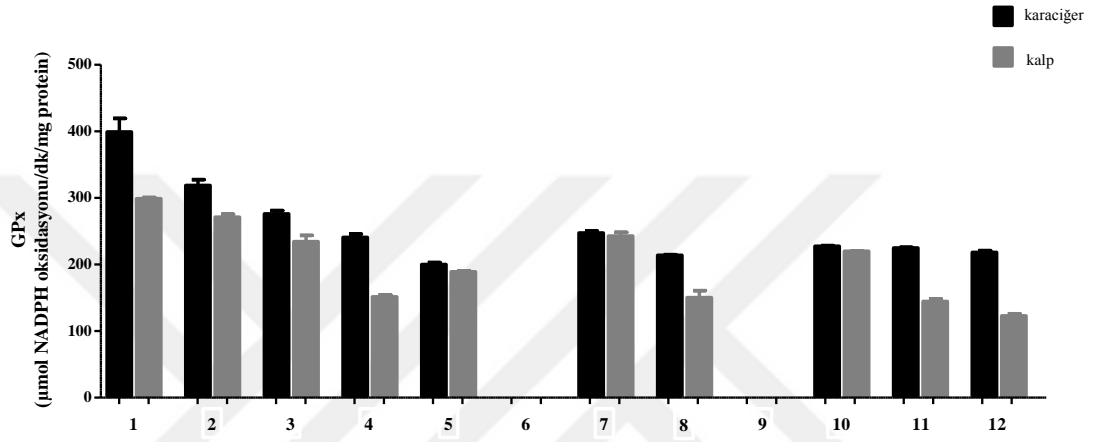
Bireyler arasında SOD aktivitelerine bakıldığında ilk göze çarpan sonuç, 6 ve 9 nolu bireylerin karaciğer ve kalp mitokondriyel matrikslerinde total enzim aktivitesinin bulunmayışıdır (Şekil 28A). Mitokondriyel MnSOD aktivite sonuçları bu bulguyla tamamen uyumludur (Şekil 28B). MnSOD aktivitesinin en çok 1/150'si oranında belirlenen Cu,Zn-SOD aktivitesi, matriks elde edilmesi sırasındaki sitozolik bulaşığı göstermektedir, dolayısıyla ideal durumda "0" olması gerekir. Bu nedenle Cu,ZnSOD aktivitesi, total ve MnSOD aktivitesine kıyasla daha az sayıda örnekte saptanmıştır, ayrıca sonuçlarımız bu bulaşığın gözardı edilebilecek kadar küçük olduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde Cu,ZnSOD 6 ve 9 nolu bireylerde bulaşık olarak da bulunmamaktadır (Şekil 28C). Bu bireylerde mitokondriyel form olan MnSOD exprese edilmiyor olabilir.

Bir diğer antioksidan enzim CAT'dır. İnsanlarda CAT aktivitesi karaciğer mitokondriyel matriks fraksiyonlarında 0.98 - 25 *ünite/mg protein*, kalp mitokondriyel matrikslerinde ise 0.23 - 20.2 *ünite/mg protein* arasında değişmektedir. Karaciğer ve kalp mitokondriyelerindeki ortalama CAT aktiviteleri arasında 1.25 katlık bir fark bulunmaktadır (Şekil 29).



Şekil 29. İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel CAT enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. Karaciğer ve kalp mitokondriyel CAT aktiviteleri, substrat olarak H₂O₂ kullanılarak ölçülmüştür.

Tez çalışmasında insan karaciğer ve kalp dokularında aktivitesi belirlenen son antioksidan enzim Se-GPx'dir. Enzim aktivitesi karaciğer mitokondriyel matriks fraksiyonlarında 0 - 398 *ünite/mg protein*, kalp mitokondriyel matriksinde ise 0 - 299 *ünite/mg protein* arasında değişmektedir. Bireylerin karaciğer ve kalp mitokondriyelerindeki ortalama GPx aktiviteleri arasında 1.3 katlık fark bulunmaktadır (Şekil 30).



Şekil 30. İnsan karaciğer ve kalp dokusunda bireyler arası mitokondriyel Se-GPx enzim aktivitesi farklılıkları. İkili gruplar halinde gösterilen siyah sütunlar karaciğer, gri sütunlar ise aynı bireylerin kalp dokusu aktivitesini göstermektedir. Karaciğer ve kalp mitokondriyel Se-GPx aktiviteleri, substrat olarak H₂O₂ kullanılarak ölçülmüştür.

Bireylerin karaciğer ve kalp mitokondriyel matrikslerinde ölçülen enzim aktiviteleri arasında korelasyon ilişkisi araştırılmış, sonuçlar Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Karaciğer ve kalp mitokondriyel enzimlerin korelasyon değerleri.

Enzim	Korelasyon Katsayısı; r (karaciğer-kalp)	p Değeri (karaciğer-kalp)
GST (CDNB)	0,840	<0,0001
GSTM (DCNB)	0.895	<0.0001
GSTM (trans-4-fenil-3-buten-2-on)	0.902	<0.0001
GSTT (EPNP)	0.942	<0.0001
Mn-SOD	0.936	<0.0001
CAT	0.753	0.005
GPx	0.955	<0.0001

5. TARTIŞMA

İlaçlarla gözlenen advers etkilerin mekanizmasında yapısal ya da işlevsel mitokondriyel bozuklukların çeşitli derecelerde rol oynayabileceği düşüncesi, son 15 yıldır önem kazanmıştır (669), bu durum tolkapon, troglitazon, serivastatin gibi bazı ilaçların klinik kullanımdan kaldırılmasına dahi yol açmıştır (585). Bu tez çalışmasında mitokondrielerin kompleks yapılarının ve hücre canlılığının sürdürülmesindeki işlevlerinin hedef olabilmesi ve/veya toksik yolları doğrudan başlatabilme kapasiteleri araştırılmıştır.

5.1. Bireyler ve Organlar Arası Parasetamol Biyoaktivasyonu Farklılığı

Bu çalışmada parasetamolün bireyler arası ve organlar arası biyoaktivasyon farklılıklarının *in vitro* belirlenmesi amacıyla cerrahi operasyonlardan karaciğer ve böbrek dokuları sağlanmıştır. İnsan doku örneklerine ulaşım çoğu zaman güç, bazı durumlarda imkânsızdır. Doku örneğine ulaşılabilse dahi miktarlar genellikle düşük olduğundan uygulanacak analitik ve/veya biyokimyasal yöntemlerin mümkün olduğunca hassas olması gerekir. Hastaların karaciğer ve böbrek dokularının reaktif metabolit *N*-asetil-*p*-benzokinonimin oluşturma kapasiteleri ve bu reaksiyonu katalize eden CYP2E1 ve CYP3A4 enzim aktivitelerinin ölçülmesi planlanmıştır. Literatürde bu amaçla tanımlanmış yöntemler nispeten çok miktarda doku gerektirdiği için (658, 659) tarafımızdan çok daha hassas yöntemler geliştirilmiş ve gereken doku miktarları 1/4 ile 1/10 oranında azaltılmıştır. Şekil 8 ve 10'da görülen piklerin yükseklikleri dikkate alındığında bu oranların 1/10 daha da azaltılabileceği görülmektedir. Parasetamol biyoaktivasyonu öncelikle insan karaciğer ve böbrek mikrozomal fraksiyonları ile gerçekleştirilmiştir. Parasetamolün neden olduğu hepatotoksisite mekanizması çok iyi ortaya konmuş olmasına rağmen nefrotoksisite mekanizması tam olarak anlaşılammıştır (523). Parasetamol doz aşımında bazı durumlarda hepatotoksisite yokluğuna karşın nefrotoksisite gözlenmesi (670, 671, 672), karaciğeri çıkarılmış farelerde ve *in vitro* böbrek modellerinde böbrek toksisitesi oluşması (520, 521) ve hepatotoksisite antidotu olan *N*-asetilsisteinin nefrotoksisiteyi önlememesi (522) nefrotoksik mekanizmanın farklı olduğunu göstermektedir. Çalışma sonuçlarımız beklendiği gibi karaciğer NAPQI oluşturma kapasitesinin böbreğe kıyasla 25 kat daha yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 7). İki farklı organın NAPQI oluşturma kapasitelerinin redükleyici kofaktör olan NADPH'nin *in vitro* inkübasyon ortamında sürekli üretilmesine bağımlı olup olmadığını incelemek amacıyla inkübasyonlar 1 mM NADPH'ye ek olarak *NADPH üretici sistem* (NADPH regenerating system; NRS) varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. NRS varlığında oluşan NAPQI miktarında büyük oranda artış meydana gelmiştir (Şekil 7). Bu nedenle inkübasyon ortamında kofaktörlerin reaksiyon tamamlanmadan tükendiği

söylenmektedir. Bu durum ortamda parasetamol konsantrasyonunun çok yüksek miktarda olmasıyla açıklanabilir. NADPH ve *NADPH sitokrom P450 redüktaz* varlığında NAPQI'nın % 80'den fazlasının parasetamole hızla geri redüklendiği daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (673). Buna karşın NRS tarafından inkübasyon ortamında sürekli NADPH sağlanması, geri redüksiyonun engellendiğini göstermektedir. Bu durumun nedeni NAPQI'nın GSH ile konjugasyonunun parasetamole geri redüksiyonuna göre çok daha baskın olmasından kaynaklanmaktadır. Bu durum *in vivo* çalışmalarla da ortaya konulursa, aşırı doz parasetamolün neden olduğu toksik sonuçların önlenmesinde NADPH gibi kofaktörlerin hücre içi konsantrasyonlarının azaltılması önemli olabilir.

Mikrozomal inkübasyon sonuçlarında böbrekte gözlenen CYP3A4 enziminin karaciğere göre çok daha yüksek aktivite göstermesi şaşırtıcıdır, çünkü CYP3A4 böbrekte eksprese edilmemektedir. Yüksek CYP3A4 aktivitesi, CYP3A5 enziminin nifedipin oksidasyonunu katalize etmesiyle açıklanabilir; CYP3A4 ile CYP3A5 sekansı % 85 benzerlik göstermektedir (674). Bir çalışmada CYP3A5 enziminin nifedipin metabolizmasına katkısının CYP3A4'e göre daha az olduğu bildirilmiştir (675). Buna karşın CYP3A5 enzimi, CYP3A ailesi içinde böbrekte eksprese edilen tek izozimdir (676). CYP3A5 enzimi CYP3A4'e göre lapatinip ve tebain gibi bazı substratlara çok daha fazla aktivite gösteren polimorfik bir enzimdir (677, 678). Nifedipinin böbrekte CYP dışındaki enzimlerle okside olması, bu durumu açıklayan bir diğer neden olabilir. *Prostaglandin-endoperoksit sentaz* enzimi de parasetamolün NAPQI'a iki elektron oksidasyonunu katalize ederken yolağın tamamlanmayıp tek elektron redüksiyonuyla oluşan *N*-asetil-*p*-benzosemikinoniminin serbest radikali, parasetamol nefrotoksisitesine katkıda bulunuyor olabilir (523). Böbrekte bu dönüşümden farklı oksidazlar da sorumlu olabilir. NAPQI oluşumundaki majör enzim olan CYP2E1 aktivitesinin karaciğerde NAPQI miktarıyla korelasyon gösterirken böbrekte korele olmaması (Tablo 4), bu hipotezi desteklemektedir. Bu aktivite farklılığının son açıklaması çalışmada kullanılan böbrek dokularının tümör dokusu olmasıyla ilişkili olabilir; literatürde çelişkili çalışmalar da olsa bazı tümör dokularında CYP3A4'ün eksprese edildiği bildirilmektedir (679-681).

CYP2E1 enziminin parasetamol biyoaktivasyonundan sorumlu ana enzim olduğu ve kemiricilerde özellikle böbrekte testosteron ile indüklendiği bildirilmiştir; kemiricilerde yapılan bir çalışmada parasetamol metabolizması ve toksisitesinde cinsiyetler arasında fark gözlenmesine rağmen (682) insanda benzer farklılıklar henüz bildirilmemiştir. Çalışmamızda örnek sayısının yetersiz olmasına karşın erkeklerde böbrek CYP2E1 enzim aktivitesinin kadınlara kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Buna karşın karaciğer CYP2E1 enzim aktivitesinde cinsiyet farkı gözlenmemiştir.

Sıçan karaciğer ve kalp dokularından elde edilen mitokondriyel fraksiyonlarla da (mitokondriyel membran ve matriks fraksiyonları) çalışıldığında, tür farkı olsa da mitokondrinin NAPQI oluşturma kapasitesi olduğu gösterilmiştir (Şekil 13). Bu sonuç, mitokondriyel proteinlere kovalan bağlandığı bildirilen NAPQI'nın (683), sitozolde oluştuktan sonra mitokondriye yönelmek yerine mitokondrilerin içerisinde lokal olarak da oluşabileceği hipotezimizi desteklemektedir. Parasetamolün doz aşımında nadir gözlenen nefrotoksik etkisinin mekanizması anlaşılamamıştır (517). Parasetamolün neden olduğu tübüler hasarın mekanizmasında bir olasılık olarak mitokondriyel biyoaktivasyon test edilmiş ve parasetamolün elektrofilik metaboliti olan NAPQI'nın oluştuğu gösterilmiştir (Şekil 13). Parasetamol doz aşımı kaynaklı nefrotoksisite konusunda da grup olarak çalışmalarımız devam etmektedir.

5.2. Klozapin Dağılımı ve Biyoaktivasyonu Çalışmaları

Mitokondrilerin kompleks yapıları ve hücrede kritik metabolik ve biyokimyasal yollardan sorumlu olmaları nedeniyle ilaçlar ve diğer ksenobiyotiklerin hedefi olmalarının yanı sıra reaktif metabolit oluşumunu doğrudan katalize edip etmedikleri anlaşılamamıştır. İlaçlar ve diğer kimyasalların mitokondri içerisinde P450 tarafından katalize edilen reaksiyonlarla metabolize olup olmadıkları konusu uzun süredir tartışmalıdır. Mitokondrilerde sitokrom P450 varlığı ilk kez 1964 yılında bildirilmiştir. Cyp11A, 11B1 ve 11B2'nin kolesterolden bazı hormonların biyosentezini katalize ettikleri gösterilmiştir (684). Karaciğerde yeni bir mitokondriyel P450 olan 27A ve böbrekte 27B'nin yine bir sterol türevi olan vitamin D aktivasyonunu katalize ettiği bildirilmiştir (439). Bu sonuçlar toplu olarak yorumlandığında mitokondriyel P450'lerin mikrozomal benzerlerinden farklı oldukları ve endojen steroid türevleri ve ilişkili bileşiklerin metabolizmasından sorumlu oldukları görülmektedir. İnsan genomunun 57 CYP450 genine sahip olduğu ve bunların 7'sinin mitokondriyel, kalan 50'sinin ise mikrozomal enzimleri kodladığı bilinmektedir (685). Mikrozomal P450'ler gibi mitokondriyel P450'lerin de membran bağımlı oldukları, mitokondri iç membranına bağlı halde buldukları gösterilmiştir (408). Bununla birlikte bazı araştırma grupları memeli mitokondrilerinde bakteriyel forma benzer şekilde çözünür formda P450'ler olduğunu bildirmişlerdir (420). Mitokondriyel fraksiyonların ilaçlar dahil kimyasal maddeleri biyoaktive etme kapasitesine sahip olabileceğine ilişkin ilk makaleler 1980'li yılların başında yayımlanmaya başlamıştır; en önemli örnekleri aflatoksin B1, benzo- α -piren, trisiklik antidepresanlar gibi nöroaktif ilaçlar, antikonvülsanlar ve diğer bazı ilaçlardır (686, 687, 428).

Mitokondriyle ilgili deneysel sorun, izolasyon sırasında hücrenin diğer enzim içeren fraksiyonları ile kontaminasyonu önlemenin çok zor olmasıdır; bu durum mitokondrilerin ksenobiyotik metabolize etme kapasitesi çalışmaları açısından kısıtlayıcı faktördür. Gerçekten de yukarıda sayılan çalışmalarda %1-2 oranında da olsa mikrozomal kontaminasyon vardır. Daha da önemlisi mitokondrilerin metabolik kapasitesi doğrudan metabolitleri belirlemek yerine inkübasyon ortamında radyoaktif işaretli madde metabolitlerinin calf-thymus DNA'sına bağlanması, ya da ana molekülden oluşması muhtemel ikincil ürün olarak formaldehitin ölçülmesi gibi dolaylı yöntemlerle incelenmiştir (458). Oysa bu yöntemlerin önemli zayıflıkları vardır; ilkinde non-spesifik bağlanma nedeniyle yanıltıcı sonuç alınabilir, ikincisinde ise formaldehit fizikokimyasal özellikleri nedeniyle her türlü ortamı kontamine ettiği için yine yanıltıcı sonuçlara neden olabilir. Muhtemelen çalışmalardaki bu zayıf yönler nedeniyle P450 enzimlerini keşfeden Tsuneo Omura, 2006 yılında yayımladığı makalesinde mitokondriyel P450'lerin ilaç metabolize edici aktivitelerinin fizyolojik öneminin halen aydınlatılmayı bekleyen bir sorun olduğunu vurgulamıştır (412). Bu nedenle biz kendi çalışmamızda bu iki önemli noktaya yoğunlaşarak hem daha saf mitokondriyel fraksiyonlar elde ettik, hem de model olarak seçtiğimiz klozapin ve parasetamolün mitokondriyel fraksiyonlar tarafından metabolize olup olmadığını test etmek üzere her iki ilacın metabolitlerini kütle spektrometrisi tekniğiyle doğrudan belirledik. ER ve mitokondrinin, Ca^{+2} düzeylerinin kontrolü gibi ortak metabolik görevleri (688, 689) nedeniyle hücresel konumları birbirine çok yakındır. Mitokondriyle ilişki membranlar (mitochondrial-associated membrane; MAM) ER'nin alt ünitesini oluşturan tübüler membran yapılarıdır ve iki organel arasında direkt bağlantı oluştururlar (690). Bu nedenle mitokondri izolasyonunda MAM kontaminasyonun tamamen önlenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda izole edilen mitokondriyel fraksiyonlarda ER ve sitozolik kontaminantların bulunmaması sonuçlarımızın güvenilirliğini artırmıştır (691). Saf mitokondriyel fraksiyon elde etmek için bizim yaklaşımımız, standart prosedürü uyguladıktan sonra doku homojenatından izole edilen ham mitokondriyel fraksiyonun Percoll ya da sükröz dansite gradiyenti yöntemiyle ileri saflaştırılmasıdır. Bu yöntemde ajanların farklı konsantrasyonları ile hazırlanan çözeltiler birden fazla tabaka oluşturup bir elek görevi görmekte ve homojenat içindeki mitokondri dahil hücresel parçacıkların özağırlıklarına göre tabakalanmasını sağlamaktadır. Diğer bileşenlerden ayrılan ve mitokondrileri içeren tabakanın pipetle alınmasıyla saf mitokondri elde edilmiştir (Şekil 2). Bu saflaştırmanın başarısı Western blot tekniğiyle markör proteinler analiz edilerek gösterilmiştir (Şekil 14). ER (endoplazmik retikulum, *mikrozomal fraksiyon*) markör proteini olan Bip ve sitozolik markör protein olan GAPDH, Percoll öncesinde net bir şekilde gözlenirken, Percoll sonrasında tamamen kaybolmuşlardır. Buna karşın mitokondriyel membran fraksiyonunun içermesi gereken

VDAC1 ve COX IV, mitokondriyel matriks fraksiyonunun içermesi gereken HSP60, net bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 15).

Karaciğer mitokondriyel membran inkübasyonlarında beklenildiği gibi oluşan KLZ-SG konjugatı miktarı, mitokondriyel matriks inkübasyonlarına kıyasla daha fazladır. Eğer klozapini metabolize eden enzimler mitokondriyel CYP(ler) ise bu enzimlerin iç membrana bağlı olması (408), bu sonucu açıklayabilir. Kalp mitokondriyel inkübasyon sonuçları ise karaciğerden farklıdır; kalp mitokondriyel matriksinin KLZ-SG oluşturma kapasitesi mitokondriyel membran fraksiyonuna göre 1.6 kat daha fazladır. Mitokondriyel matriksin proteince zengin olduğu ve çözünür CYP izozimleri içerdiği bildirilmiştir (420). Kalp dokusundaki KLZ biyoaktivasyonunda çözünür CYP ya da farklı enzimlerin rol alması, bu sonuçları açıklayabilir. Karaciğer ve kalp dokusunda olası enzim içeriği/miktarları ve/veya biyoaktivasyon yolağı farklılıkları, kalbin hedef organ olmasını açıklayabilir. Çalışmalarda Balb/c türü fare dokuları kullanılmış olması, bu durumun türe özgü bir farklılık olabileceği ihtimalini de düşündürmektedir, bu nedenle benzer deneylerin insan dokusu ile yapılması doktora sonrası çalışmalar içerisinde planlanmıştır.

Her iki organda da en yüksek metabolit oluşumu, mitokondriyel membran ve matriks fraksiyonlarının kombine kullanıldığı inkübasyonlarda elde edilmiştir. Mitokondriyel CYP enzimlerinin katalitik açıdan mikrozomal karşılıklarından en önemli farkları, elektron kaynağı olarak NADPH ve *NADPH P450 redüktaz* yerine sırasıyla ferredoksin (Fdx) ve *ferredoksin redüktaz* (Fdr) sistemini kullanmalarındadır (692). Fdx ve Fdr, mitokondrilerin matriksinde bulunan sırasıyla 12 ve 53 kDa ağırlığındaki çözünür proteinlerdir (67). Mitokondri membranlarını ve matriksini birlikte içeren inkübasyonlarda membrana gömülü halde bulunan CYP enzimlerine matriksteki Fdx-Fdr sistemi devamlı elektron akışı sağlayarak enzimin katalitik aktivitesini ve dolayısıyla biyoaktivasyon reaksiyonunu gerçekleştirmiş olabilir. Buna karşın mitokondriyel membranların tek başlarına metabolit oluşturması, ayrıca “membran + matriks” kombinasyonunda oluşan metabolit miktarlarının yaklaşık 2 kat olması bu olasılığı zayıflatmaktadır.

Mitokondrilerin metabolik kapasitesini test etmek amacıyla seçmiş olduğumuz ilk ilaç klozapindir. Klozapinin seçilmiş olmasının bir başka nedeni, “*Genel Bilgiler*” bölümünde ayrıntılı anlatıldığı şekilde ilacın düşük sıklıkta görülmesine karşın mekanizması bilinmeyen bir şekilde ölümcül kardiyak toksisiteye yol açmasıdır (491, 493). Klozapin tedavisi uygulanan hastaların % 2’sinde kardiyotoksisite gözlenmekte, bu belirtilerin ortaya çıktığı her iki hastadan biri ise ölmektedir (495). Mekanizmayı aydınlatmaya yönelik yapılan bir çalışmada sıçan kalbinden elde edilen mikrozomal fraksiyon, klozapin ile *in vitro* koşullarda inkübe edilmiş, klozapinin kardiyak mikrozomlar varlığında reaktif nitrenyum iyonuna

biyoaktif olduğu gösterilmiş ve bu mekanizmanın insanlarda klozapin kullanımına bağlı miyokardit ve kardiyomiyopati patojenezinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür (498). Ancak bu çalışmada klozapin kardiyotoksitesinin altında yatan hücresel mekanizmalar açıklanmamış, ayrıca klozapine bağlı bu etkinin neden hastaların küçük bir kısmında (% 1-2) ve neden kalpte ortaya çıktığı da açıklanmamıştır. Diğer dokulara kıyasla kalp kası hücrelerinde daha yüksek oranda eksprese edilen sitokrom P450 izozimlerinin (CYP2C9, CYP2C8 ve CYP2J2) yanı sıra mitokondrilerinde de bazı faz-I ve faz-II enzimlerinin bulunduğu dair veriler vardır (408, 447, 693, 694). Bu bilgilerin doğrultusunda bu tez kapsamında klozapinin olası kardiyotoksitesite mekanizmasında mitokondrilerin rolü olup olmadığı araştırılmıştır. Bu konuda bizim hipotezimiz, klozapinin kalp kası hücrelerinde ve/veya bu hücrelerin mitokondrilerinde lokal olarak elektrofilik nitrenyum iyonuna biyoaktif olduğu, detoksifikasyon mekanizmalarının diğer organlara göre yetersiz kaldığı ve kalp kası hücrelerinde enerji üretiminin bozulmasıyla toksisitenin ortaya çıktığı şeklindedir. Yüksek enerji ihtiyacı olan kalp kası hücrelerinde yapısal ya da fonksiyonel bir mitokondriyel hasarın gelişmesi, kardiyomiyopatiye ve devamında ölüme neden oluyor olabilir. Bu hipotezimizi test etmenin ilk basamağı, klozapinin mitokondriler tarafından biyoaktif edilip edilmediğinin gösterilmesidir. Saf mitokondriyel fraksiyonlarla elde ettiğimiz sonuçlar, fare kalp kası hücrelerinden izole edilen mitokondrilerin *in vitro* koşullarda klozapin elektrofilik metabolite olan nitrenyum iyonunu oluşturabildiğini göstermiştir (Şekil 16). İnkübasyonlar eşzamanlı olarak aynı deney hayvanlarının karaciğer mitokondrileri ile de yapılarak sonuçlar karşılaştırmalı bir biçimde verilmiştir (Şekil 16). Buna göre kalp kası hücrelerinde karaciğerin % 37'si kadar elektrofilik metabolit oluşmaktadır. Kalp kası hücrelerinin mitokondrilerinde yapısal ve/veya işlevsel kritik bir hasar yoluyla ciddi bir toksik etkiye neden olabilecek organ hasarını başlatmak için gerekli olan elektrofilik metabolit miktarı ayrı bir çalışma konusudur ve çalışmalar laboratuvarımızda devam etmektedir. *In vitro* koşullarda elde ettiğimiz sonuçların fizyolojik geçerliliğini araştırmak üzere öncelikle yine *in vitro* koşullarda yapısal ve işlevsel bütünlüğünü koruyan mitokondrilerle inkübe edilen klozapinin ne kadarının mitokondri içerisine girdiği test edilmiştir. İnkübasyon sonunda ortamda test edilen klozapin miktarında %30 oranında azalma olmuştur. Buna karşın mitokondri içerisine giren ana ilaç ve mitokondri dışında oluşan iki stabil klozapin metaboliti (klozapin-N-oksit ve desmetilklozapin) miktarları, ekstinksiyon katsayılarının aynı olduğu varsayılarak hesaplandığında % 30'luk kaybın % 1.4'ünü karşıladığı görülmektedir. Elektrofilik metabolit olan klozapin nitrenyum iyonu, inkübasyon ortamına nükleofilik GSH konmadığı için ölçülmemiştir. Ancak mitokondriyel fraksiyonlarla inkübasyon sonuçlarını dikkate alacak olursak oluşması muhtemel elektrofilik metabolitin de % 0.06'lık kısmı oluşturması beklenebilir. Bu sonuçlar *in vivo* koşullarda kalp kası hücrelerine kadar ulaşan klozapinin %

1.46'lık kısmının mitokondri tarafından metabolize edildiğini göstermektedir (Şekil 17). *In vivo* uygulama sonrasında (sıçan, oral, 20 mg/kg) dokulara ulaşan klozapin miktarları Şekil 18'de gösterilmiştir. Kalbe ulaşan ilaç miktarı diğer organlarla karşılaştırılabilir düzeydedir. Karaciğere kıyasla 1/3 kadar klozapin kalp dokusuna ulaşmıştır (Şekil 18). Bir önceki bölümde yorumlandığı gibi bu konuda daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için dokuya ulaşarak hücrelere ve oradan mitokondrilere girerek biyoaktivasyona uğrayan ilaçtan oluşacak elektrofilik metabolit miktarı ile ortaya çıkan toksik etki arasındaki ilişki kantitatif olarak ortaya konmalıdır.

5.3. Farklı Saklama Sıcaklıklarında Mitokondri Stabilitesinin MPTP Oluşturma Yeteneği Aracılığıyla İzlenmesi

Mitokondri birçok biyokimyasal ve fizyolojik işleve sahip bir organel olduğu için *in vitro* çalışmalarda sağlıklı sonuçlara ulaşabilmek için yapısal, dolayısıyla işlevsel özelliklerini ne kadar süreyle koruyabildiği önemlidir. Literatürde taze dokudan mitokondri izole edildikten sonra genellikle 3-4 saat içerisinde çalışmanın yapılması gerektiği bildirilmektedir (13). Buna karşın izole mitokondri ya da dokuların hangi sıcaklıklarda ne kadar süreyle saklanabileceğine dair bir veri yoktur. Oysa deneysel çalışmalarda bazı koşullarda elde edilen dokuyla hemen çalışmak mümkün olmamakta ve bir süre depolama gerekebilmektedir. Bu tez çalışmasında mitokondrinin yapısal ve işlevsel bütünlüğünü (intactness) koruyup korumadığını test etmenin bir yolu olarak kalsiyum (Ca^{++}) tarafından indüklenen MPTP oluşturma yeteneğinden yararlanılması düşünülmüştür. MPTP, *Genel Bilgiler* bölümünde açıklandığı gibi mitokondri iç ve dış membranında yer alan bazı proteinlerin etkileşerek matriks ve hücre sitozölü arasında açılan bir kanaldır. Bu kanal aracılığıyla sitozolden matrikse doğru bir içerik geçişi söz konusu olur ve mitokondri şişer. Günümüze kadar MPTP oluşumu patolojik bir süreç olarak tanımlanmış, fizyolojik olarak gerçekleşip gerçekleşmediği netlik kazanmamıştır (250). MPTP'yi oluşturan proteinlerin etkileşebilmesi için mitokondrinin yapısal stabilitesini sürdürmesi gerekir. Farklı sıcaklıklarda saklanan doku ya da izole mitokondriyel fraksiyonların stabilitesini test etmek amacıyla taze dana karaciğeri porsiyonlara ayrılmış, bir porsiyondan mitokondriyel fraksiyon izole edilerek hem dokular hem de izole mitokondriyel fraksiyonlar oda ısısı, +4°C ve -86 °C'de depolanmıştır. İzole mitokondriyel fraksiyonlarda doğrudan, dokularda ise belirlenmiş zaman noktalarında mitokondri izole edilerek MPTP oluşturma yetenekleri spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Sonuçlar beklendiği şekilde saklama sıcaklığı düşürüldükçe mitokondri stabilitesinin hem izole halde (Şekil 19A) hem de doku halde daha iyi korunduğunu göstermektedir (Şekil 19B). İzole mitokondrinin MPTP oluşturma yeteneği

oda ısısında hızla azalmakta ve 6. saatte sıfırlanmaktadır. Buzdolabında +4°C’de saklanan izole mitokondrilerin MPTP oluşturma yeteneklerinin sıfırlanması, 24. saate kadar uzamaktadır. Doku halinde sadece +4°C ve -86 °C’de saklama koşulları çalışılmıştır. Buna göre +4°C’de doku halde MPTP oluşturma yeteneğinin sıfırlanması 72. saati bulmaktadır. Çalışmada uygulanan en düşük saklama sıcaklığı olan -86 °C’de ise gerek izole mitokondri, gerek dokuda MPTP oluşturma yeteneğinde yok sayılabilecek kadar küçük azalmalar gözlenmiştir; son zaman noktası olan 3. ayda izole mitokondrilerdeki yetenek kaybı başlangıca göre % 2.5, dokularda ise % 1.1’dir (Şekil 19A ve B). Mitokondri iç ve dış membranının 3. ayda bile birbiriyle etkileşme ve MPTP oluşturma yeteneğini koruması, iç membran-aracılıklı yürüyen oksijen metabolizması (ETC) ve buna bağlı ATP sentezi gibi kritik hücresel işlevlerin de büyük olasılıkla sürdüğünü düşündürmektedir. MPTP oluşturma yeteneğinin 3. ayında bu tür diğer işlevlerin araştırılması, tez sonrası çalışmalarımız içerisinde planlanmıştır.

5.4. İlaçların MPTP Oluşumuna Etkileri

MPTP oluşturma yeteneğinin belirli bir zaman aralığında bir stabilite parametresi olarak kullanılmasının ardından tez kapsamında mitokondri üzerinde etkileri çalışılan ilaçların Ca⁺⁺ ile indüklenen MPTP oluşturma yeteneğine etkileri olup olmadığı test edilmiştir. Bu amaçla toplam 8 ilaç, Ca⁺⁺ varlığında ve yokluğunda izole mitokondriyel fraksiyon ile inkübe edilmiştir. Ca⁺⁺ yokluğunda yapılan deney, çalışılan ilacın doğrudan kendisinin MPTP oluşturma yeteneği olup olmadığını test etmek üzere planlanmışken, Ca⁺⁺ varlığında yapılan deney ise ilacın indüklenen MPTP oluşumunu artırıp artırmadığını göstermek üzere planlanmıştır; bu iki sürecin mekanizmaları farklı olabilir. Sonuçlar ilaçların çalışılan dozlarda MPTP oluşumunu indüklediğini, ancak diklofenakın 10 ve 100 µM’da, valproik asitin ise 100 µM’da Ca⁺⁺ tarafından indüklenen MPTP oluşumunu anlamlı derecede artırdığını göstermektedir (Şekil 20A). Bu durum *in vivo* koşullarda ilacı kullanan hastalarda eşzamanlı bir Ca⁺⁺ konsantrasyonu artışına bağlı olarak ya da farklı mekanizmayla indüklenen MPTP oluşumunun şiddetlenebileceğini düşündürmektedir.

5.5. İlaçların mtDNA Metilasyon Düzeylerine Etkileri

Tez kapsamında etkisini araştırdığımız ilaçların mitokondriyel yapılar ve/veya işlevler üzerinde incelediğimiz bir başka parametre, son yıllarda önemi artmış olan mtDNA metilasyon düzeyleridir. DNA metilasyonu, epigenetik DNA modifikasyonu mekanizmalarından birisidir ve fizyolojik metilasyon düzeyleri değişmesi hayati öneme

sahip genlerin susması yoluyla kritik proteinlerin ekspresyonunu azalatabilir ya da susması gereken genler aktive olarak eksprese edilmemesi gereken proteini sentezleyebilir. Bu nedenlerden dolayı bazı otoimmün hastalıklar, kanser ve nörolojik hastalıkların patojenezinde DNA metilasyon düzeylerinde anormal değişimlerin rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (274, 275). İlaçlar ya da kimyasalların mtDNA metilasyon düzeyini etkilemesi ETC proteinlerinin sentezinde, dolayısıyla enerji üretiminde değişikliklerin oluşmasına yani mitokondriyel/hücresele toksisiteye neden olabilir. Tez çalışmasında araştırdığımız tüm ilaçlar uygulanan dozlarda *in vitro* ortamda mtDNA metilasyon düzeylerini anlamlı derecede düşürmüştür (Şekil 21 ve 22). Valproik asitin 15 mM konsantrasyonda güçlü hipometilasyon yaptığı gösterildiği için (287) bu ilaç pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışılan daha düşük valproik asit dozu olan 10µM'da dahi ilaç, anlamlı derecede hipometilasyon yapmıştır (Şekil 21). Tez çalışmasında araştırılan ana ilaç olan klozapinin mtDNA metilasyon düzeylerine etkisi 10 ve 50 µM olmak üzere iki dozda incelenmiştir. Bu etkinin klozapinin elektrofilik metaboliti olan nitrenyum iyonuna bağlı olup olmadığını test etmek üzere aynı inkübasyonlar 5 mM GSH varlığında tekrarlanmıştır. Her iki konsantrasyondaki sonuçlarımız klozapin kaynaklı hipometilasyonun metabolit aracılığıyla olduğunu düşündürmektedir; 10 µM konsantrasyonda hipometilasyon etkisi yarı yarıya engellenirken, 50 µM konsantrasyonda ilginç bir şekilde tamamen kontrol düzeylerine geri dönmüştür. mtDNA hipometilasyonun ETC proteinlerinin sentezinde değişikliğe yol açıp açmadığının test edilmesi amacıyla ETC'de yer alan enzim aktivitelerinin ölçülmesi ve mitokondrilerin ATP üretme kapasitesinin belirlenmesi ileri çalışmalarımız olarak planlanmıştır. ETC kompleks proteinlerinin mtDNA tarafından kodlanarak sentezlenmeleri düzeyinde herhangi bir azalma, hücresele enerji üretiminin bozulması yoluyla klozapin kaynaklı kardiyak toksisiteye katkıda bulunuyor olabilir.

5.6. İlaçların Mitokondriyel Oksijen Tüketim Hızına Etkileri

Mitokondrilerde gerçekleşen en hayati işlev; oksijenin suya kadar yıkılarak detoksifiye edilmesi ve buna bağlı bir biçimde besin maddelerinden enerji üretilmesidir. Dolayısıyla mitokondrilerin oksijen kullanımını etkileyen herhangi bir ajan hem ciddi hem de karmaşık toksik yolların başlamasına neden olabilir. Tez kapsamında çalıştığımız ilaçların mitokondrilerin oksijen tüketim hızları (OCR) üzerinde bir etkileri olup olmadığı test edilmiştir. İlaçlar DMSO içinde çözüldükleri için ilaç inkübasyonlarından elde edilen OCR değerleri, % 1 DMSO'nun OCR değeriyle kıyaslanarak istatistik analiz uygulanmıştır. % 1 DMSO'nun kendisi bazal OCR düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Bu çalışmada *sitokrom c redüktaz (kompleks III)* inhibitörü olan antimisin A, pozitif kontrol

olarak kullanılmıştır. İlaçların 1, 10 ve 100 μM konsantrasyonları ile çalışıldığında klozapin, olanzapin, nifedipin, valproik asit, dapson ve tiyaprofenik asitin 100 μM dozda, ilk üç ilacın ek olarak 10 μM dozda da anlamlı derecede OCR'yi engellediği gözlenmiştir (Şekil 24). Bu sonuçlar birkaç açıdan ilginçtir; 100 μM klozapin, olanzapin, nifedipin ve valproik asitin oksijen tüketim hızı üzerindeki inhibisyonları, ETC *Kompleks III* düzeyinde inhibisyon yaptığı iyi bilinen Antimisin A'nın 150 μM konsantrasyonu ile sağlanan % 60 inhibisyon oranından daha fazladır. Bu durum, bu ilaçların oldukça potent oksidatif solunum inhibitörü olduklarını göstermektedir (Şekil 24). Ancak bu ilaçlarla inhibisyon gözlenen konsantrasyonların, terapötik kan konsantrasyonlarının oldukça üzerinde ve toksik aralıkta olmasından dolayı ilaçları kullanan hastalar için bu açıdan herhangi bir risk söz konusu değildir. İlginç bir başka sonuç, sülfafenazolün her üç konsantrasyonda diğer ilaçların tam tersine OCR'de anlamlı artışa neden olmasıdır.

Valproik asit mekanizması bilinmeyen bir şekilde hepatotoksisiteye neden olan bir ilaçtır (602). Valproik asit ile elde ettiğimiz OCR'deki anlamlı inhibisyonla uyumlu bir biçimde mitokondriyel solunumun inhibe olduğunu gösteren hücre kültürü çalışmalarında; valproik asitin mitokondriye süksinat girişini değiştirdiği gösterilmiştir (603, 604, 638). Bir çalışmada valproik asitin 0.5 mM olan terapötik kan konsantrasyonunu da içeren 0-2 mM ilaç doz aralığının HepG2 hücrelerinin oksijen tüketim hızına etkisi araştırılmış, 1 ve 2 mM dozların OCR'de anlamlı bir azalışa neden olduğu gözlenmiştir (230). Bir başka çalışmada sıçan karaciğer mitokondrilerinde valproik asitin oksidatif fosforilasyona etkileri hem ATP sentezinin hem de OCR'nin ölçülmesiyle değerlendirilmiş, valproik asitin 0,1-1 mM konsantrasyon aralığında her ikisini de önemli derecede azalttığı gözlenmiştir (697).

Olanzapinin mitokondriyel solunum üzerindeki etkisini inceleyen iki ayrı çalışma bulunmaktadır. Bir çalışmada domuz beyin dokusundan izole edilen mitokondrilerde olanzapinin 1mM dozda *Kompleks I*'i inhibe ettiği gösterilmiştir (698). Bir başka çalışmada ise 0-25 μM olanzapin ile çalışılmış, HepG2 hücrelerinin oksijen tüketim hızına herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (699). Bizim çalışmamızda ise 10 ve 100 μM olanzapin, CHO-K1 hücrelerinde oksijen tüketim hızını önemli derecede azaltmıştır. Olanzapinin sıçan hepatositlerinde hücrel lipit peroksidasyonunu artırarak oksidatif stres oluşturduğu, GSH seviyelerini azalttığı ve mitokondriyel membran potansiyelini düşürdüğü bilinmektedir (231). Olanzapinin mekanizması tam olarak açıklanamayan hepatotoksitesinin altında diğer toksisite mekanizmalarının yanı sıra oksijen tüketim hızının azalması ve oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu da rol alıyor olabilir.

Dapson ve tiyaprofenik asitin toksisite mekanizmalarının araştırıldığı çalışma sayısı son derece azdır. Geneve ve ark., farelere tiyaprofenik asit uygulamış ve mitokondriyel

solunum ile β -oksidasyon düzeylerini ölçülmüşlerdir. Bu çalışmada tiyaprofenik asitin β -oksidasyonu *Asetil-CoA karboksilaz* düzeyinde inhibe ettiği, mitokondriyel solunumu ise etkilemediği gösterilmiştir (632). Dapsonun oksidatif fosforilasyona etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. 100 μ M dapson ve tiyaprofenik asitin oksijen tüketimini azaltması deney hayvanları ya da insan örneklerinde yapılacak olan çalışmalarla desteklenirse bu bulgular ilaçların toksisite mekanizmalarının ortaya çıkarılmasına katkı sağlayabilir.

Nifedipin kullanan hastalardaki klinik gözlemlerde kalp atım hızının ve kan basıncının ölçülmesi yoluyla tedavinin oksijen tüketimi hızında düşüşe neden olduğu söylenmiştir (700). Bir başka çalışmada ise i.v. infüzyonla verilen 1 mg nifedipin hastalarda oksijen tüketiminde herhangi bir değişikliğe neden olmazken, intrakoroner olarak uygulanması çok hızlı düşüşe yol açmıştır (701). Literatürde nifedipinin izole mitokondrilerdeki oksijen tüketimine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. 2013 yılında yayınlanan bir çalışmada nifedipinin hepatotoksitesinin nedeninin mitokondriyel β -oksidasyon inhibisyonu olduğu önerilmiştir (207). Çalışmada, nifedipin çalışılan üç dozda da (1, 10 ve 100 μ M) CHO-K1 hücrelerinde oksijen tüketim hızını önemli derecede azaltmıştır. Oksijen tüketiminin inhibisyonu da hepatotoksitesinin oluşumuna neden olan bir diğer mitokondriyel toksisite mekanizması olabilir.

Bazı çalışmada klozapinin *Kompleks I* inhibisyonu yaptığı bildirilmiştir (187, 508). Nadanaciva ve ark. 2012 yılında klozapinin oksijen tüketimine etkisini HepG2 hücre hattında araştırmışlardır. 300 μ M'a kadar test edilen klozapin, *Kompleks I* inhibisyonu yapmış, ancak oksijen tüketiminde değişikliğe neden olmamıştır (509). Bu tez çalışmasında *ETC Kompleks* aktiviteleri ölçülmemiştir ancak Nadanaciva ve ark.'nın aksine 100 μ M dozda OCR üzerinde % 60'dan fazla inhibisyon gözlenmiştir. Bir önceki çalışma ile kendi bulgumuz arasındaki bu farklılığı açıklamaya yönelik olarak ilk akla gelen olasılık, çalışmalarda kullanılan hücrelerin farklı olmasıdır. Klozapinin bu etkisinde reaktif metabolitinin rol oynayıp oynamadığını test etmek üzere GSH varlığında gerçekleştirilecek inkübasyonlar, doktora sonrası çalışmalar içinde planlanmıştır.

5.7 İnsan Mitokondriyel Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Tez çalışmasının ana eksenini oluşturan mitokondrilerin ilaç toksisitesindeki rolleri açısından enzim içerikleri özel bir öneme sahiptir çünkü biyotransformasyon, toksik etkiye neden olan ve/veya nicelik ya da niteliğini değiştiren önemli bir faktördür. Hücrede asıl olarak endoplazmik retikulum ve hücre sitozolünde yer alan ve *İlaç Metabolize Edici*

Enzimler (İME) olarak adlandırılan enzimler için geçerli olduğu gibi, mitokondrilerde de faz I enzimleri olan CYP izozimlerinin yanında antioksidan ve faz II konjugasyon reaksiyonlarında rol alan enzimlerin de varlığı gösterilmiştir (121, 122, 140, 141, 162-169). Bu araştırmaların büyük kısmı deney hayvanı çalışmalarıdır. Ancak bu tez çalışmasının konusunu oluşturan ilaç toksisitesi mekanizmalarını araştırıyor olmamızın nihai hedefinin insanda gözlenen toksik etkilerin mekanizmasını anlamaya yönelik olması nedeniyle, insan kaynaklı mitokondrilerin enzim içeriklerini ortaya koymayı amaçladık. Bu nedenle İzmir Adli Tıp Kurumu otopsilerinde 12 farklı kişiden sağlamış olduğumuz karaciğer ve kalp dokularında *süperoksit dismutaz* (SOD), *katalaz* (CAT), *selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz* (Se-GPx) ve glutatyon S-transferaz (GST) izozimlerinin mitokondri matriksinde aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında ilk göze çarpan bireyler arasında gerek karaciğer, gerekse kalp mitokondriyel matriksi enzim aktivitelerinde bireyler arası varyasyonun iki birey dışında yüksek olmamasıdır. Bir diğer bulgu, karaciğer ve kalp mitokondriyel matriksinde enzim aktivitelerinin karşılaştırılabilir düzeyde olması, büyük çoğunlukla karaciğer mitokondrilerinde aktivitenin biraz daha yüksek olmasına karşın GSTM ve CAT aktivitesinin bazı bireylerde kalp dokusunda daha yüksek olmasıdır. SOD izoenzimlerinden yine mitokondriye özgü olan SOD2'nin diğer izozime göre çok yüksek aktivite göstermesi, izolasyonun başarısını göstermektedir. Enzim aktivitesi çalışılan 6 ve 9 nolu bireylerin her iki dokusunda ilginç bir şekilde GSTM aktivitesi dışında tüm aktiviteler ya çok düşük ölçülmüş ya da saptanamamıştır. Bu bireylerden erkek olan 6 nolu kişi trafik kazasında hayatını kaybetmiştir, kadın olan 9 nolu ise ölü bulunmuştur. Her iki bireyin de bilinen bir karaciğer ya da kalp rahatsızlığı yoktur. Doktora sonrası çalışmalarda bu tip durumlarda genetik polimorfizm gösteren enzimleri araştırabilmek açısından daha fazla doku örneği alınması planlanmaktadır. Bu enzimler içerisinde polimorfik olmayanlar için ilginç olabilecek bir olasılık vardır; karaciğer ve kalp mitokondrilerinde aktivitesi araştırılan bu enzimlerin tümü nükleer DNA tarafından kodlandıktan sonra hücre sitoplazmasında sentezlenmekte ve bazı özel peptid dizileri takılarak mitokondrilere yönlendirilmektedirler. Enzimlerin nükleer DNA tarafından kodlanması ve sentezlenmesi aşamalarında herhangi bir sorun olmayabilir, ancak posttranslasyonel aşamada mitokondriye yönlendirilmek üzere aminoasit dizilimlerinin modifikasyonu ve/veya enzimlere bağlanması aşamalarında yine genetik ya da sonradan kazanılmış bazı aksaklıklar olabilir. Bu tür olasılıklar, doktora sonrası çalışmalar içerisinde planlanmıştır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda insan karaciğer mitokondriyel matriksinde GSTA4-4'ün (163) yanı sıra GSTA1, GSTA2 ve GSTP1 izoenzimlerinin varlığı ve aktiviteleri gösterilmiştir (157). GST kapp (GSTK), diğer GST izozimlerinden farklı olarak sadece mitokondriyel fraksiyonda bulunmaktadır (164). İlk olarak sıçan karaciğer

mitokondriyel matriksinde gösterilen GSTK'nın (162) fare karaciğer ve böbreğinde de varlığı kanıtlanmıştır (165). 2003 yılında ise insan karaciğer mitokondriyel matriksinde de GSTK1 aktivitesinin olduğu bildirilmiştir (169). Bu izozimin spesifik substratı olmadığı için tez çalışmamızda aktivitesi ayrıca ölçülemedi. Literatürde insan dokularının kullanıldığı çalışma sınırlıdır. Bir çalışmada insan karaciğer dokularında GST A4-4 ve GSTK1 izoenzimlerinin varlığı WB yöntemiyle kanıtlanmış, ancak enzim aktiviteleri çalışılmamıştır (163, 169). Bir başka çalışmada insan karaciğer mitokondrilerinde GST genel aktivitesi $11.3 \mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg protein}$ bulunmuştur; bu ortalama değer, tez çalışmasında belirlediğimiz ölçüm aralığındadır. Aynı çalışmada insan karaciğer mitokondrisinde DCNB'ye karşı GSTM aktivitesi tespit edilememiştir, ancak tek bir kişinin dokusuyla çalışılmıştır (157). Tez çalışmamızda 12 bireyin hem karaciğer, hem kalp mitokondrilerinde varlığı bugüne kadar araştırılmamış olan GSTT ve GSTM izoenzimlerinin aktiviteleri gösterilmiştir.

Literatürde insan mitokondriyel CAT enzim aktivitesi bildiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sıçan kalp ve karaciğer mitokondriyel matrikslerinde CAT aktivitesi gösterilmiştir. Bu çalışmalarda sıçan karaciğer mitokondrisinde total CAT aktivitesi 825 ünite olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda bireylerin karaciğer mitokondrilerindeki ortalama CAT spesifik aktivitesi $15 \text{ ünite}/\text{mg protein}$ ($0.98-25 \text{ ünite}/\text{mg protein}$) olup bireyler arasında 26 kat fark bulunmaktadır. Kalp mitokondrisinde ise ortalama CAT aktivitesi $12 \text{ ünite}/\text{mg protein}$ 'dir ($0.23-20.2 \text{ ünite}/\text{mg protein}$) ve bireyler arasında 88 kat fark bulunmaktadır. Rati ve ark. sıçan kalp mitokondrilerinde CAT aktivitesinin $20 \pm 5 \text{ ünite}/\text{mg protein}$ olduğunu göstermişlerdir (121, 122). Ancak, bu çalışmanın sonuçları insanı yansıtmayacağı için aktivite değerleri birbiriyle kıyaslanamamaktadır.

GPx enzimlerinden GPx-1 ve GPx-4'ün farklı miktarlarda olmakla beraber fare ve sıçan karaciğer, böbrek, beyin ve kas mitokondrilerinde olduğu bulunmuştur (122, 140, 141). Çalışmamızda bireylerin ortalama GPx aktivitesi, karaciğer mitokondrilerinde $214 \text{ ünite}/\text{mg protein}$ ($0-398 \text{ ünite}/\text{mg protein}$), kalp mitokondrilerinde ise $167 \text{ ünite}/\text{mg protein}$ ($0-299 \text{ ünite}/\text{mg protein}$) arasında değişmektedir. Literatürde insan mitokondrilerinde GPx aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

SOD izoenzimlerinden Mn-SOD enzimi ise mitokondriyel matrikse özgüdür ve O_2^- 'nin sitozole kolayca difüze olabilen H_2O_2 'ye dönüşümünü katalize eder (104). Tez çalışmasında karaciğer örneklerinde ortalama Mn-SOD aktivitesi $232 \text{ ünite}/\text{mg protein}$ ($0-424 \text{ ünite}/\text{mg protein}$), kalp mitokondriyel matriksinde ise $146 \text{ ünite}/\text{mg protein}$ ($0-330 \text{ ünite}/\text{mg protein}$) olarak belirlenmiştir. İnsan böbrek hücre hattı olan HEK293T hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada Mn-SOD aktivitesi $200 \text{ ünite}/\text{mg protein}$ olarak bulunmuştur (702). SOD2 enziminin klozapinden nitrenyum iyonu oluşumunda rol oynama olasılığı bulunmaktadır. Daha önceki yıllarda gerçekleştirilen bir çalışmada sıçan kalp doku

homojenatı klozapin ile inkübe edilmiş, ortama CAT ile birlikte SOD eklendiğinde reaktif nitrenyum metaboliti oluşumu 6-7 kat azalmıştır. Bu sonuç klozapin biyoaktivasyonunda SOD substratı olan süperoksit anyon radikali ve/veya CAT substratı olan hidrojen peroksidin rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu nedenle otopsiyelerden sağlanan insan kalp mitokondrilerinde SOD2 (mitokondriyel SOD) ve CAT enzimlerinin aktivitelerinde gözlenen bireyler arası farklılıklar, kardiyotoksisitenin bazı bireylerde ortaya çıkmasının nedenleri arasında olabilir.

Tez çalışmasında karaciğer ve kalp mitokondrilerinde aktivitesi ölçülen enzimler iki organ arasında güçlü korelasyon göstermektedir (Tablo 5). Bu sonuç en azından bu enzimler açısından dokular arası değişkenliklerin yüksek olmadığını göstermektedir.

İnsan dokularında mitokondriyel ve aynı zamanda mikrozomal enzimlerde protein ya da aktivite düzeyindeki farklılıkların ilaç toksisitesindeki rollerini kapsamlı biçimde değerlendirmek üzere proje hazırlığı çalışmamız devam etmektedir. Mali destek sağlanması durumunda tez kapsamında ön çalışma niteliğinde gerçekleştirilen ve ilginç olasılıkları gündeme getiren konuların aydınlatılması mümkün olabilecektir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mitokondriyel CYP450'lerin ilaç metabolize edici aktivitelerinin fizyolojik önemi, literatürde halen aydınlatılmayı bekleyen bir sorundur. Mitokondrilerin içerdiği diğer enzimlerin ilaç biyotransformasyonunda rol oynayıp oynamadıkları da henüz aydınlatılmamıştır. Bu nedenle bu tez kapsamında model olarak seçtiğimiz klozapin ve parasetamolün mitokondriyel fraksiyonlar tarafından metabolize edilip edilmediği test edilmiş, mitokondrilerin biyoaktivasyon kapasitesi gösterilmiştir. Böylece klozapin kaynaklı kardiyotoksisite ve parasetamol kaynaklı nefrotoksisite mekanizmalarını açıklamaya yönelik yeni olasılıklar sunulmuştur. Çalışmalarımızda izole edilerek ileri saflaştırılan mitokondriyel fraksiyonlarda endoplazmik retikulum ve sitozolik kontaminasyonun olmaması, sonuçlarımızın güvenilirliğini artırmıştır.

Parasetamolün mitokondriyel enzim kaynaklarıyla biyoaktive olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle mitokondriyel proteinlere kovalan bağlandığı gösterilen reaktif metabolit NAPQI'nın sitozolde oluştuktan sonra mitokondriye transfer olması yerine doğrudan mitokondrilerin içerisinde lokal olarak oluşabileceği gösterilmiştir. Parasetamol doz aşımında gözlenen nefrotoksisite mekanizmasının aydınlatılması konusunda grup olarak çalışmalarımız devam etmektedir.

Klozapinin olası kardiyotoksisitesi konusundaki çalışmalarımız, fare kalp kası hücrelerinden izole edilen mitokondrilerin *in vitro* koşullarda elektrofilik metabolit olan nitrenyum iyonunu oluşturabildiğini göstermiştir. Kalp mitokondriyel inkübasyonlarında karaciğerin aksine matriks fraksiyonunun reaktif metabolit oluşturma kapasitesi, mitokondri membranlarına göre daha fazla bulunmuştur. Bu durum, kardiyak mitokondrilerde çözünür CYP450 ya da farklı enzimlerin klozapin biyoaktivasyonunu katalize etmesiyle açıklanabilir. Karaciğer ve kalp dokusunda olası enzim içeriği/miktarları ve/veya biyoaktivasyon yolağı farklılıkları, kalbin hedef organ olmasını açıklayabilir. Çalışmalarda Balb/c türü fare dokuları kullanılmış olması, bu durumun türe özgü bir farklılık olabileceği olasılığını da düşündürmüştür. Bu nedenle benzer deneylerin insan dokusu ile yapılması doktora sonrası çalışmalar içerisinde planlanmıştır.

Söz konusu çalışmalarda deneysel açıdan önemli olan mitokondri stabilitesinde doku ve izole mitokondri fraksiyonları için en uygun saklama sıcaklığının -86°C olduğu gösterilmiştir.

Çalışma kapsamındaki ilaçların mitokondri işlevselliğine etkileri "MPTP oluşumu testi, mtDNA metilasyon düzeylerinin belirlenmesi ve mitokondriyel oksijen tüketim hızının belirlenmesi" yöntemleriyle araştırılmıştır. Sonuçlar ilaçların çalışılan dozlarda MPTP

oluşumunu indüklediğini, ancak diklofenakın 10 ve 100 µM'da, valproik asitin ise 100 µM'da kalsiyum tarafından indüklenen MPTP oluşumunu anlamlı derecede artırdığını göstermektedir. Bu durum *in vivo* koşullarda ilacın, hastalarda Ca⁺⁺ konsantrasyonu artışına bağlı ya da farklı mekanizmayla indüklenen MPTP oluşumunu şiddetlendirebileceğini düşündürmektedir.

Tüm ilaçların mtDNA metilasyonu düzeyini azalttığı, klozapinin bu etkisinde reaktif metabolitinin rolü olduğu gösterilmiştir. mtDNA hipometilasyonun ETC proteinlerinin sentezinde değişikliğe yol açıp açmadığının test edilmesi amacıyla ETC'de yer alan enzim aktivitelerinin ölçülmesi ve mitokondrilerin ATP üretme kapasitesinin belirlenmesi ileri çalışmalarımız olarak planlanmıştır; ETC kompleks proteinlerinin mtDNA tarafından kodlanarak sentezlenmeleri düzeyindeki herhangi bir değişiklik, hücresel enerji üretiminin bozulması yoluyla klozapin kaynaklı kardiyak toksisiteye katkıda bulunuyor olabilir.

Klozapin, olanzapin, nifedipin, valproik asit ve tiyaprofenik asitin 100 µM dozda, ilk 3 ilacın ek olarak 10 µM dozda da anlamlı derecede oksijen tüketim hızını değiştirdiği gözlenmiştir. Klozapin, olanzapin, nifedipin ve valproik asitin 100 µM konsantrasyonda oksijen tüketim hızı üzerindeki inhibisyonları, ETC Kompleks III düzeyinde inhibisyon yaptığı iyi bilinen Antimisin A'nın 150 µM konsantrasyonu ile sağlanan % 60 inhibisyon oranından daha fazladır. Bu durum, bu ilaçların oldukça potent oksidatif solunum inhibitörü olduklarını göstermektedir ancak etki gösterdikleri konsantrasyonlar terapötik düzeylerin üzerinde olduğu için dozaşımı dışında sorun arz etmemektedir.

Tez çalışmasının ana eksenini oluşturan mitokondrilerin ilaç toksisitesindeki rolleri açısından enzim içerikleri özel bir öneme sahiptir. İnsan dokularında mitokondriyel ve aynı zamanda mikrozomal enzimlerde protein ya da aktivite düzeyindeki farklılıkların ilaç toksisitesindeki rollerini kapsamlı biçimde değerlendirmek üzere bir proje hazırlığı çalışmamız devam etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında insan karaciğer ve kalp mitokondrilerinde faz II detoksifikasyon enzimi GST'ler ve çeşitli antioksidan enzimlerin mitokondrilerdeki varlığı gösterilmiştir. İki bireyde hem karaciğer, hem de kalp mitokondrilerinde bazı enzim aktiviteleri ya hiç gözlenmemiş, ya da diğer bireylere göre çok az bulunmuştur. Bu enzimlerden bazılarının genetik polimorfizm göstermeyen enzimler olması, hücre sitozolünde sentezlendikten sonra post-translasyonel süreçte mitokondriye hedeflendirilirken bazı kalıtsal ya da sonradan kazanılmış aksamalar olabileceğini düşündürmüştür. Diğer çalışmalarımızın yanı sıra bu şekilde farklı bireylere rastlanması durumunda bu tür post-translasyonel aksama olasılıklarının çalışılması amacıyla daha fazla doku örneği alınması planlanmaktadır.

Mali destek sağlanması durumunda tez kapsamında 6n çalışma niteliğinde gerçekleştirilen ve ilginç olasılıkları g6ndeme getiren insan dokularında enzim içerikleri ve bireyler arası farklılıklar gibi konuların aydınlatılması m6mk6n olabilecektir.



7. KAYNAKLAR

1. Pessayre D, Fromenty B, Berson A, Robin MA, Lettéron P, Moreau R et. al. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev* 2012;44:34-87.
2. Uranova N, Orlovskaya D, Vikhрева O, Zimina I, Kolomeets N, Vostrikov V et. al. Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res Bull* 2001;55:597-610.
3. Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentals of Biochemistry*, 2nd Edition. John Wiley and Sons; 2006.
4. Selak MA, Lyver E, Micklow E, Deutsch EC, Onder O, Selamoglu N et. al. Blood cells from Friedreich ataxia patients harbor frataxin deficiency without a loss of mitochondrial function. *Mitochondrion* 2011;11:342-350.
5. Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Carreño-Fuentes L, Moreno-Sánchez R. Targeting of cancer energy metabolism. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:29-48.
6. Meyer JN, Leung MC, Rooney JP, Sendoel A, Hengartner MO, Kisby GE et. al. Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicol Sci* 2013;134:1-17.
7. Bereiter-Hahn J, Vöth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 1994;27:198-219.
8. Margulis L, Sagan D. *Microcosmos: Four Billion Years of Microbial Evolution*. University of California Press; 1986.
9. Martin WF, Miklos M. *Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes*. Berlin: Springer-Verlag; 2007.
10. Ferla MP, Thrash JC, Giovannoni SJ, Patrick WM. New rRNA Gene-Based Phylogenies of the Alphaproteobacteria Provide Perspective on Major Groups, Mitochondrial Ancestry and Phylogenetic Instability. *PLoS One* 2013;8:e83383
11. Alberts B. *Cell biology: the endless frontier*. *Mol Biol Cell* 2010;21:3785.
12. Palade GE. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1953;1:188-211.
13. Schulz S, Lichtmanegger J, Schmitt S, Leitzinger C, Eberhagen C, Einer C et. al. A protocol for the parallel isolation of intact mitochondria from rat liver, kidney, heart, and brain. *Methods Mol Biol* 2015;1295:75-86.
14. Begriche K, Massart J, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol* 2011;54:773-94.

15. Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 2004;447:689-709.
16. Fernández-Vizarra E, Enríquez JA, Pérez-Martos A, Montoya J, Fernández-Silva P. Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis. *Mitochondrion* 2011;11:207-213.
17. Malik AN, Czajka A, Cunningham P. Accurate quantification of mouse mitochondrial DNA without co-amplification of nuclear mitochondrial insertion sequences. *Mitochondrion* 2016;29:59-64.
18. Mercer TR, Neph S, Dinger ME, Crawford J, Smith MA, Shearwood AM et. al. The human mitochondrial transcriptome. *Cell* 2011;146:645-58.
19. Fernández-Vizarra E, Ferrín G, Pérez-Martos A, Fernández-Silva P, Zeviani M, Enríquez JA. Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. *Mitochondrion* 2010;10:253–262.
20. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J et.al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457-465.
21. Suzuki T, Nagao A, Suzuki T. Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases. *Annu Rev Genet* 2011;45:299-329.
22. Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain* 2004;127:2153-72.
23. Zeviani M, Carelli V. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 2007;20:564-571.
24. Petrozzi L, Ricci G, Giglioli N, Siciliano G, Mancuso M. Mitochondria and neurodegeneration. *Biosci Rep* 2007;27: 87–104.
25. Mulder H, Ling C. Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta-cells in Type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2009;297:34-40.
26. Kroemer G. Mitochondria in cancer. *Oncogene*. 2006;25:4630-4632.
27. Bereiter-Hahn J, Vöth M. Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fision of mitochondria. *Microsc Res Tech* 1994;27:198-219.
28. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 2012;337:1062-1065.
29. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM et. al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 2010;141:280-289.
30. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 2006;16:R551-560.

31. Van der Bliek AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5: a011072.
32. Hoppins S. The regulation of mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2014;29:46-52.
33. Lackner LL, Ping H, Graef M, Murley A, Nunnari J. Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:E458-467.
34. Rafelski SM. Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. *BMC Biol* 2013;11:71.
35. Mishra P. Interfaces between mitochondrial dynamics and disease. *Cell Calcium* 2016;60:190-198.
36. Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017;482:426-431.
37. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 2014;4:177-197.
38. Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1995;67:101-54.
39. Mayr JA. Lipid metabolism in mitochondrial membranes. *J Inherit Metab Dis* 2015;38:137-144.
40. Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta* 2016;1857:902-914.
41. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Martin R, Keith R, Peter W. *Molecular Biology of the Cell. In: Electron-Transport Chains and Their Proton Pumps.* New York: Garland Science; 2002.
42. Genova ML, Bianchi C, Lenaz G. Supercomplex organization of the mitochondrial respiratory chain and the role of the Coenzyme Q pool: Pathophysiological implications. *BioFactors* 2005; 25:5–20.
43. Dautant A, Meier T, Hahn A, Tribouillard-Tanvier D, di Rago JP, Kucharczyk R. ATP Synthase Diseases of Mitochondrial Genetic Origin. *Front Physiol* 2018;9:329.
44. Wallace KB, Starkov AA. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:353-388.
45. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:367-401.
46. Hüttemann M, Helling S, Sanderson TH, Sinkler C, Samavati L, Mahapatra G et. al. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome c oxidase and

- cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1817:598–609.
47. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010;48:749–762.
 48. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006;12:440-450.
 49. Hodge T, Colombini M. Regulation of metabolite flux through voltagegating of VDAC channels. *J Membr Biol* 1997;157: 271–279.
 50. Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:4666–4671.
 51. Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 2000;7:1182-1191.
 52. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405–413.
 53. Wang C, Youle RJ. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu Rev Genet* 2009;43:95–118.
 54. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2001;29:684–688.
 55. Elmore S, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495–516.
 56. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:517–529.
 57. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:1115–1122.
 58. Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 1998;17:5298–5308.
 59. Patterson RL, Boehning D, Snyder SH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Ann Rev Biochem* 2004;17:437–465.
 60. Szabadkai G, Duchen MR. Mitochondria: the hub of cellular Ca^{2+} signaling. *Physiology* 2008;23:84-94.
 61. Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T. Microdomains with high Ca^{2+} close to IP3-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 1993;262:744-747.

62. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y et. al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011;476:341-345.
63. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011;476:336-340.
64. Velarde MC. Mitochondrial and sex steroid hormone crosstalk during aging. *Longev Healthspan* 2014;3:2.
65. Mori M, Miura S, Morita T, Takiguchi M, Tatibana M. Synthesis, intracellular transport and processing of mitochondrial urea cycle enzymes. *Adv Enzyme Regul* 1983;21:121-132.
66. Mark D, Fleming MD, Hamza I. Mitochondrial heme: an exit strategy at last. *J Clin Invest* 2012;122:4328–4330.
67. Sangar MC, Anandatheerthavarada HK, Tang W, Prabu SK, Martin MV, Dostalek M et. al. Human liver mitochondrial cytochrome P450 2D6--individual variations and implications in drug metabolism. *FEBS J* 2009;276:3440-3453.
68. Niranjana BG, Avadhani NG. Activation of aflatoxin B1 by a mono-oxygenase system localized in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1980;255:6575–6578.
69. Das M, Seth PK, Dixit R, Mukhtar H. Aryl hydrocarbon hydroxylase of rat brain mitochondria: properties of, and effects of inhibitors and inducers on, enzyme activity. *Arch Biochem Biophys* 1982;217:205–215.
70. Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease--consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol* 2001;44:1-12.
71. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:4003-4008.
72. Guzik TJ, Harrison DG. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discov Today* 2006;11: 524–533.
73. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2010;44:479-496.
74. Selivanov VA, Votyakova TV, Pivtoraiko VN, Zeak J, Sukhomlin T, Trucco M. Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain. *PLoS Comput Biol* 2011;7:e1001115.
75. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-247.

76. Lisa FD, Kaludercic N, Paolocci N. β 2-Adrenoceptors, NADPH oxidase, ROS and p38 MAPK: another 'radical' road to heart failure? *Br J Pharmacol* 2011;162: 1009-1011.
77. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417:1–13.
78. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000;29:222–230.
79. Go YM, Jones DP. Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 2011;50:495-509.
80. Lassegue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:653-661.
81. Lamb AL, Torres AS, O'Halloran TV, ROTenzweig AC. Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nat Struct Biol* 2001;8:751-755.
82. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1-40.
83. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000;18:655-673.
84. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53:26-36.
85. Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA, Erzurum SC. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med* 2003;35:213-225.
86. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 1990;8:95-108.
87. Dupuy C, Virion A, Ohayon R, Kaniewski J, Dème D, Pommier J. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J Biol Chem* 1991;266:3739-3743.
88. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemiareperfusion injury. *Am J Physiol* 1988;255:H1269-H1275.
89. Fitzpatrick AM, Teague WG, Holguin F, Yeh M, Brown LA. Severe Asthma Research Program. Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe asthma: evidence for oxidant stress. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:146-152.
90. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005;77:598-625.
91. Kulcharyk PA, Heinecke JW. Hypochlorous acid produced by the myeloperoxidase system of human phagocytes induces covalent cross-links between DNA and protein. *Biochemistry* 2001;40:3648-3656.

92. Orhan H. Analyses of representative biomarkers of exposure and effect by chromatographic, mass spectrometric, and nuclear magnetic resonance techniques: Method development and application in life sciences. *J Sep Sci* 2007;30:149-174.
93. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 2007;100:460–473.
94. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:67-101.
95. Scandalios JG. Genomic responses to oxidative stress. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. Wiley-Blackwell; 2006.
96. Jena NR, DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci* 2012;37:503-517.
97. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003;25:207-218.
98. Buettner GR. Superoxide Dismutase in Redox Biology: The roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11:341–346.
99. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn- SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 2001; 276: 38388–38393.
100. Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 2001;276:38084–38089.
101. Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1988;107: 2169–2179.
102. Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:747–758.
103. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox signaling* 2011;15:1583-1606.
104. Ushio-Fukai M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROT. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:1289–1299.
105. Wintjens R, Noel C, May AC, Gerbod D, Dufernez F, Capron M et. al. Specificity and phenetic relationships of iron- and manganese-containing superoxide dismutases on the basis of structure and sequence comparisons. *J Biol Chem* 2004;279:9248–9254.

106. Whittaker JW. The irony of manganese superoxide dismutase. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1318–1321.
107. Whittaker JW. Metal uptake by manganese superoxidedismutase. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:298–307.
108. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL et. al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995;11:376–381.
109. Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR et. al. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* 2003;16:29–37.
110. Zhang Y, Zhang HM, Shi Y, Lustgarten M, Li Y, Qi W et. al. Loss of manganese superoxide dismutase leads to abnormal growth and signal transduction in mouse embryonic fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2010;49:1255–1262.
111. Miriyala S, Holley AK, Clair DK. Mitochondrial Superoxide Dismutase- Signals of Distinction. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11:181–190.
112. Bag A, Bag N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3298–3305.
113. Wheatley-Price P, Asomaning K, Reid A, Zhai R, Su L, Zhou W et. al. Myeloperoxidase and superoxide dismutase polymorphisms are associated with an increased risk of developing pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2008;112:1037-1042.
114. Liu G, Zhou W, Park S, Wang LI, Miller DP, Wain JC et. al. The SOD2 Val/Val genotype enhances the risk of nonsmall cell lung carcinoma by p53 and XRCC1 polymorphisms. *Cancer* 2004;101:2802–2808.
115. Holla LI, Kankova K, Vasku A. Functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene in patients with asthma. *Clin Biochem* 2006;39:299–302.
116. Miao L, Clair DKS. Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases. *Free Radic Biol Med* 2009;47:344–356.
117. Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2032–2036.

118. Tan RJ, Lee JS, Manni ML, Fattman CL, Tobolewski JM, Zheng M et. al. Inflammatory cells as a source of airspace extracellular superoxide dismutase after pulmonary injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:226–232.
119. Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem* 1999;274:13908–13914.
120. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001;54:176-186.
121. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 1991;266:22028-22034.
122. Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P et. al. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J Biol Chem* 2007;282:24407-24415.
123. Dev IK, Ray PH: Signal peptidases and signal peptide hydrolases. *J Bioenerg Biomembr* 1990;22:271-290.
124. Roise D, Theiler F, Horvath SJ, Tomich JM, Richards JH, Allison DS et. al. Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO J* 1988;7:649–653.
125. Lemire BD, Fankhauser C, Baker A, Schatz G. The mitochondrial targeting function of randomly generated peptide sequences correlates with predicted helical amphiphilicity. *J Biol Chem* 1989;264:20206-20215
126. Phung CD, Ezieme JA, Turrens JF. Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1994;315:479-82.
127. Pehar M, Beeson G, Beeson CC, Johnson JA, Vargas MR. Mitochondria-targeted catalase reverts the neurotoxicity of hSOD1^{G^{93A}} astrocytes without extending the survival of ALS-linked mutant hSOD1 mice. *PLoS One* 2014; 9:e103438.
128. Bai J, Cederbaum AI. Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol Signals Recept* 2001;10:189-199.
129. Radi R, Bush KM, Freeman BA: The role of cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1993;300:409–415.
130. Radi R, Sims S, Cassina A, Turrens JF: Roles of catalase and cytochrome c in hydroperoxide-dependent lipid peroxidation and chemiluminescence in rat heart and kidney mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1993;15:653–659.
131. Gupta BL, Azam M, Baquer NZ. Changes in Erythrocyte Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase in Alloxan Diabetes. *Biochemistry International* 1990;21:725-731.

132. Curello S, Ceconi C, Bigoli C, Ferrari R, Albertini A, Guarnieri C. Changes in the cardiac glutathione status after ischemia and reperfusion. *Experientia* 1985;41:42–43.
133. Zhao T, Singhal SS, Piper JT, Cheng J, Pandya U, Clark-Wronski J et. al. The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 1999;367:216-224.
134. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1825–1835.
135. Betteridge DJ., What is oxidative stress?, *Metabolism* 2000;49:3-8.
136. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family-an evolutionary overview. *FEBS J* 2008;275:3959-3970.
137. Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. *FEBS J* 2007;274:2163–2180.
138. Esworthy RS, Ho YS, Chu FF. The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Arch Biochem Biophys* 1997;340:59-63.
139. Borchert A, Wang CC, Ufer C, Schiebel H, Savaskan NE, Kuhn H. The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoforms in murine embryogenesis. *J Biol Chem* 2006;281:19655-19664.
140. Esposito LA, Kokoszka JE, Waymire KG, Cottrell B, MacGregor GR, Wallace DC. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic Biol Med* 2000;28:754-766.
141. Pushpa-Rekha TR, Burdsall AL, Oleksa LM, Chisolm GM, Driscoll DM. Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J Biol Chem* 1995;270:26993-26999.
142. Arai M, Imai H, Koumura T, Yoshida M, Emoto K, Umeda M et. al. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *J Biol Chem* 1999;274:4924-4933.
143. Nomura K, Imai H, Koumura T, Arai M, Nakagawa Y: Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 1999;274:29294-29302.
144. Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:2685-2700.
145. Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by

- suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J* 2000;351:183-193.
146. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:51–88.
147. Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab Rev* 201;43:138-151.
148. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2001;360:1–16.
149. Aceto A, Di Ilio C, Angelucci S, Felaco M, Federici G. Glutathione Transferase Isoenzymes from Human Testis. *Biochemical Pharmacology* 1989; 38:3653-3660.
150. Wu B, Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33:656-668.
151. Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol* 2005;401:1-8.
152. Raza H, Robin MA, Fang JK, Avadhani NG. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* 2002;366:45–55.
153. Rossjohn J, McKinstry WJ, Oakley AJ, Verger D, Flanagan J, Chelvanayagam G et. al. Human theta class glutathione transferase: the crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site. *Structure* 1998;6:309-322.
154. Rouimi P, Anglade P, Benzekri A, Costet P, Debrauwer L, Pineau T et. al. Purification and characterization of a glutathione S-transferase Omega in pig: evidence for two distinct organ-specific transcripts. *Biochem J* 2001;358:257-262.
155. Ji Y, Toader V, Bennett BM. Regulation of microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities by S-nitrosylation. *Biochem Pharmacol* 2002;63:1397-1404.
156. Morgenstern R, Zhang J, Johansson K. Microsomal glutathione transferase 1: mechanism and functional roles. *Drug Metab Rev* 2011;43:300-306.
157. Gallagher EP, Gardner JL, Barber DS. Several glutathione S-transferase isozymes that protect against oxidative injury are expressed in human liver mitochondria. *Bio Pharm* 2006;71:1619-1628.
158. Goto S, Kawakatsu M, Izumi S, Urata Y, Kageyama K, Ihara Y et. al. Glutathione S-transferase pi localizes in mitochondria and protects against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009;46:1392-403.

159. Robin MA, Prabu SK, Raza H, Anandatheerthavarada HK, Avadhani NG. Phosphorylation enhances mitochondrial targeting of GSTA4-4 through increased affinity for binding to cytoplasmic Hsp70. *J Biol Chem* 2003;278:18960-18970.
160. Raza H, Prabu SK, Robin MA, Avadhani NG. Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes* 2004;53:185-194.
161. Addya S, Mullick J, Fang JK, Avadhani NG. Purification and characterization of a hepatic mitochondrial glutathione S-transferase exhibiting immunochemical relationship to the alpha-class of cytosolic isoenzymes. *Arch Biochem Biophys* 1994;310:82-88.
162. Harris JM, Meyer DJ, Coles B, Ketterer B. A novel glutathione transferase (13-13) isolated from the matrix of rat liver mitochondria having structural similarity to class theta enzymes. *Biochem J* 1991;278:137-141.
163. Gardner JL, Gallagher EP. Development of a peptide antibody against human glutathione S-transferase A4 (hGSTA4-4) reveals preferential localization in hepatic mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 2001;390:19-27.
164. Robinson A, Huttley GA, Booth HS, Board PG. Modelling and bioinformatics studies of the human kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *Biochem J* 2004;379:541-552.
165. Thomson RE, Bigley AL, Foster JR, Jowsey IR, Elcombe CR, Orton TC et. al. Tissue-specific expression and subcellular distribution of murine glutathione S-transferase class kappa. *J Histochem Cytochem* 2004; 52:653-662.
166. Morel F, Rauch C, Petit E, Piton A, Theret N, Coles B, Guillouzo A. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J Biol Chem*. 2004;279:16246-16253.
167. Morel F, Aninat C. The glutathione transferase kappa family. *Drug Metab Rev* 2011;43:281-291.
168. Arakawa S, Fujimoto K, Kato A, Endo S, Fukahori A, Shinagawa A et. al. Evaluation of hepatic glutathione transferase Mu 1 and Theta 1 activities in humans and mice using genotype information. *Drug Metab Dispos* 2012;40:497-503.
169. Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S et. al. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* 2003;21:281-286.
170. Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem* 1999;6:279-309.

171. Ploemen JH, Bogaards JJ, Veldink GA, van Ommen B, Jansen DH, van Bladeren PJ. Isoenzyme selective irreversible inhibition of rat and human glutathione S-transferases by ethacrynic acid and two brominated derivatives. *Biochem Pharmacol* 1993;45:633-699.
172. Arakawa S, Maejima T, Kiyosawa N, Yamaguchi T, Shibaya Y, Aida Y et. al. Methemoglobinemia induced by 1,2-dichloro-4-nitrobenzene in mice with a disrupted glutathione S-transferase Mu 1 gene. *Drug Metab Dispos* 2010; 38:1545-1552.
173. Zhang Y, Wijaya L, Dekker SJ, Vermeulen NPE, Commandeur JNM. High-performance liquid chromatography-based assay for glutathione transferase theta 2 activity: Application to characterize interindividual variability in human liver fractions. *J Pharm Biomed Anal* 2018;156:181-188.
174. Chen Z, Lash LH., Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285:608-618.
175. Mailloux RJ, Xuan JY, McBride S, Maharsy W, Thorn S, Holterman CE et. al. Glutaredoxin-2 is required to control oxidative phosphorylation in cardiac muscle by mediating deglutathionylation reactions. *J Biol Chem* 2014;289:14812-14828.
176. Diotte NM, Xiong Y, Gao J, Chua BH, Ho YS. Attenuation of doxorubicin-induced cardiac injury by mitochondrial glutaredoxin 2 *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:427-438.
177. Arnér ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000;267:6102-6109.
178. Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Anantharam V, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:1282-1294.
179. Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet* 2000;356:1255-1259.
180. Siramshetty VB, Nickel J, Omieczynski C, Gohlke BO, Drwal MN, Preissner R. Withdrawn-a resource for withdrawn and discontinued drugs. *Nucleic Acids Res* 2016; D1080–D1086.
181. Nadanaciva S, Bernal A, Aggeler R, Capaldi R, Will Y. Target identification of drug induced mitochondrial toxicity using immunocapture based OXPHOS activity assays. *Toxicol In Vitro* 2007;21:902-911.
182. Todesco L, Waldhauser K, Krähenbühl S. Mitochondrial Toxicity of Drugs. *Chimia* 2006;60:37–39.
183. Pessayre D, Mansouri A, Berson A, Fromenty B. Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol* 2010;311-365.

184. Watmough NJ, Bindoff LA, Birch-Machin MA, Jackson S, Bartlett K, Ragan CI et. al. Impaired mitochondrial beta-oxidation in a patient with an abnormality of the respiratory chain. Studies in skeletal muscle mitochondria. *J Clin Invest* 1990;85:177-184.
185. Wyatt CN, Buckler KJ. The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells. *J Physiol* 2004;556: 175–191.
186. Sandoval-Acuña C, Lopez-Alarcón C, Aliaga ME, Speisky H. Inhibition of mitochondrial complex I by various non-steroidal anti-inflammatory drugs and its protection by quercetin via a coenzyme Q-like action. *Chem Biol Interact* 2012; 199:18-28.
187. Maurer I, Möller HJ. Inhibition of complex I by neuroleptics in normal human brain cortex parallels the extrapyramidal toxicity of neuroleptics. *Cell Biochem* 1997;174:255-299.
188. Berson A, Schmetts L, Fisch C, Fau D, Wolf C, Fromenty B et. al. Inhibition by nilutamide of the mitochondrial respiratory chain and ATP formation. Possible contribution to the adverse effects of this antiandrogen. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:167-76.
189. Serviddio G, Bellanti F, Giudetti AM, Gnoni GV, Capitano N, Tamborra R et. al. Mitochondrial oxidative stress and respiratory chain dysfunction account for liver toxicity during amiodarone but not dronedarone administration. *Radic Biol Med* 2011;51:2234-2242.
190. Dykens JA, Jamieson JD, Marroquin LD, Nadanaciva S, Xu JJ, Dunn MC et. al. In vitro assessment of mitochondrial dysfunction and cytotoxicity of nefazodone, trazodone, and buspirone. *Toxicol Sci* 2008;103:335-345.
191. Meredith GE, Rademacher DJ. MPTP Mouse Models of Parkinson's Disease: An Update. *J Parkinsons Dis* 2011;1:19–33.
192. Brunmair B, Lest A, Staniek K, Gras F, Scharf N, Roden M et. al. Fenofibrate impairs rat mitochondrial function by inhibition of respiratory complex I. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:109-114.
193. Tirmenstein MA, Hu CX, Gales TL, Maleeff BE, Narayanan PK, Kurali E et. al. Effects of troglitazone on HepG2 viability and mitochondrial function. *Toxicol Sci* 2002;69:131-138.
194. Masubuchi Y, Kano S, Horie T. Mitochondrial permeability transition as a potential determinant of hepatotoxicity of antidiabetic thiazolidinediones. *Toxicology* 2006;222:233-239.
195. Ong MMK, Latchoumycandane C, Boelsterli UA. Troglitazone-Induced Hepatic Necrosis in an Animal Model of Silent Genetic Mitochondrial Abnormalities. *Toxicological Sciences* 2007;97:205-213.

196. Wang DS, Kusuvara H, Kato Y, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin. *Mol Pharmacol* 2003;63:844-888.
197. Nadanaciva S, Will Y. Current concepts in drug-induced mitochondrial toxicity. *Curr Protoc Toxicol* 2009; Unit 2.15.
198. Tuquet C, Dupont J, Mesneau A, Roussaux J., Effects of tamoxifen on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Cell Biol Toxicol* 2000;16:207-219.
199. Leidgens V, Seliger C, Jachnik B, Welz T, Leukel P, Vollmann-Zwerenz A et. al. Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms. *PLoS One* 2015;10:e0140613.
200. Baud FJ. Acute poisoning with carbon monoxide (CO) and cyanide (CN), *Ther Umsch* 2009;66:387-397.
201. Ledesma A, Lacoba MG, Rial E. The mitochondrial uncoupling proteins *Genome Biol* 2002; 3:3015.1–3015.9.
202. Cunarro J, Weiner MW. Mechanism of action of agents which uncouple oxidative phosphorylation: direct correlation between proton-carrying and respiratory-releasing properties using rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1975;387:234-240.
203. Chan K, Truong D, Shangari N, O'Brien PJ. Drug-induced mitochondrial toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2005;1:655-669.
204. Petrescu I, Tarba C. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. *Biochim Biophys Acta* 1997;1318:385-394.
205. Masubuchi Y, Yamada S, Horie T. Diphenylamine as an Important Structure of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs to Uncouple Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Biochemical Pharmacology* 1999;58:861–865.
206. Mehta R, K Chan, O Lee, S. Tafazoli, Brien PJ. Drug- Associated Mitochondrial Toxicity. In Dykens, Will Y, (editör). *Drug- Induced Mitochondrial Dysfunction*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2008:71-126
207. Massart J, Begriche K, Buron N, Porceddu M, Borgne-Sanchez A, Bernard F. Drug-Induced Inhibition of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Steatosis. *Curr Pathobiol Rep* 2013;1:147–157.
208. Labbe G, Pessayre D, Fromenty B. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol* 2008;22:335-353.

209. Bjorge SM, Baillie TA. Studies on the beta-oxidation of valproic acid in rat liver mitochondrial preparations. *Drug Metabolism and Disposition* 1991;19:823-829.
210. Albaugh VL, Judson JG, She P, Lang CH, Maresca KP, Joyal JL et. al. Olanzapine promotes fat accumulation in male rats by decreasing physical activity, repartitioning energy and increasing adipose tissue lipogenesis while impairing lipolysis. *Mol Psychiatry* 2011;16:569–581.
211. Albaugh VL, Vary TC, Ilkayeva O, Wenner BR, Maresca KP, Joyal JL et. al. Atypical antipsychotics rapidly and inappropriately switch peripheral fuel utilization to lipids, impairing metabolic flexibility in rodents. *Schizophr Bull* 2012;38:153–166.
212. Klingerman CM, Stipanovic ME, Bader M, Lynch CJ. Second-Generation Antipsychotics Cause a Rapid Switch to Fat Oxidation That Is Required for Survival in C57BL/6J Mice. *Schizophr Bull* 2014;40:327–340.
213. Maddaiah VT, Miller PS. Effects of ammonium chloride, salicylate, and carnitine on palmitic acid oxidation in rat liver slices *Pediatr Res* 1989;25:119-123.
214. Rognstad R. Effects of salicylate on hepatocyte lactate metabolism. *Biomed Biochim Acta* 1991;50:921-930.
215. Deschamps D, Fisch C, Fromenty B, Berson A, Degott C, Pessayre DJ. Inhibition by salicylic acid of the activation and thus oxidation of long-chain fatty acids. Possible role in the development of Reye's syndrome. *Pharmacol Exp Ther* 1991;259:894-904.
216. Uppala R, Dudiak B, Beck ME, Bharathi SS, Zhang Y, Stolz DB, Goetzman ES. Aspirin increases mitochondrial fatty acid oxidation., *Biochem Biophys Res Commun* 2017;482:346-351.
217. Yu HY, Wang BL, Zhao J, Yao XM, Gu Y, Li Y. Protective effect of bicyclol on tetracycline-induced fatty liver in mice. *Toxicology* 2009;261:112-118.
218. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Review* 2002;82:47-95.
219. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Review Genetics* 2005;6:389-402.
220. Guo CY, Sun L, Chen XP, Zhang DS. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 2013;8:2003-2014.
221. Hollensworth SB, Shen CC, Sim JE, Spitz DR, Wilson GL, LeDoux SP. Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress, *Free Radical Biol Med* 2000;28:1161-1174.
222. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 2006;5:145-152.

223. Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 2007;257:221-239.
224. Andreatza AC, Shao L, Wang JF, Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2010;67:360-368.
225. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev* 2014;94:909–950.
226. Belooshi T, John A, Otaiba A, Raza H. Acetaminophen-induced Mitochondrial Oxidative Stress in Murine J774.2 Monocyte Macrophages. *Am J Biomed Sci* 2010; 2:142-154.
227. Reid AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson J. Mechanisms of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Permeability Transition in Freshly Isolated Mouse Hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005;312:509-516.
228. Tong V, Teng XW, Chang TK, Abbott FS. Valproic acid II: effects on oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and cytotoxicity in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicol Sci* 2005;86(2):436-443.
229. Najafi N, Jamshidzadeh A, Fallahzadeh H, Omidi M, Abdoli N., Najibi A et. al. Valproic Acid-Induced Hepatotoxicity and the Protective Role of Thiol Reductants. *Trends in Pharmaceutical Sciences* 2017;3.
230. Komulainen T, Lodge T, Hinttala R, Bolszak M, Pietilä M, Koivunen P et. al. Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in HepG2 in vitro cell model. *Toxicology* 2015;331:47-56.
231. Eftekhari A, Azarmi Y, Parvizpur A, Eghbal M. Involvement of oxidative stress and mitochondrial/lysosomal cross-talk in olanzapine cytotoxicity in freshly isolated rat hepatocytes. *Xenobiotica* 2016;46:369-378.
232. Berthiaume JM, Wallace KB. Persistent Alterations to the Gene Expression Profile of the Heart Subsequent to Chronic Doxorubicin Treatment. *Cardiovascular Toxicology* 2007;7:178-191.
233. Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2009;61:223–242.
234. Benbrik E, Chariot P, Bonavaud S, Ammi-Saïd M, Frisdal E, Rey C et.al. Cellular and mitochondrial toxicity of zidovudine (AZT), didanosine (ddI) and zalcitabine (ddC) on cultured human muscle cells. *J Neurol Sci* 1997;149:19-22.

235. Kline ER, Bassit L, Hernandez-Santiago BI, Detorio MA, Liang B, Kleinhenz DJ et. al. Long-term exposure to AZT, but not d4T, increases endothelial cell oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol* 2009;9:1-12.
236. Deaval DG, Elizabeth A, Martin EA, Horner JM, Robert R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity Cardiovascular Toxicology. *J Toxicol* 2012:1-13.
237. Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function and permeability in calcium treated mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 1976;251:5069-5077.
238. Bernardes CF, Meyer-Fernandes JR, Basseres DS, Castilho RF, Vercesi AE. Ca²⁺-dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 1994;1188:93-100.
239. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal* 1999;341:233-249.
240. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:79-94.
241. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the Killer Organelles and Their Weapons. *Journal of Cellular Physiology* 2002;192:131–137.
242. Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta B, Petit PX, Kroemer G. *J Bioenerg Biomembr* 1997;29:185–193.
243. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J et. al. *Science* 1997;275:1129–1132.
244. Lisa DF, Carpi A, Giorgio V, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813:1316–1322.
245. Bambrick LL, Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Wright C, Krueger BK, Fiskum G. Cyclosporin A increases mitochondrial calcium uptake capacity in cortical astrocytes but not cerebellar granule neurons. *J Bioenerg Biomembr* 2006;38:43–47.
246. Kowaltowski AJ, Naia-da-Silva ES, Castilho RF, Vercesi AE. Ca²⁺-Stimulated Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Permeability Transition Are Inhibited by Dibucaine or Mg²⁺. *Archives of Biochemistry And Biophysics* 1998;359:77–81.
247. Elustondo PA, Nichols M, Negoda A, Thirumaran A, Zakharian E, Robertson GS et. al. Mitochondrial permeability transition pore induction is linked to formation of the complex of

- ATPase C-subunit, polyhydroxybutyrate and inorganic polyphosphate. *Cell Death Discovery* 2016;1-9.
248. Belosludtsev K, Saris NE, Andersson LC, Belosludtseva N, Agafonov A, Sharma A et. al. *J Bioenerg Biomembr* 2006;38:113-20.
249. Lei X, Chen Y, Du G, Yu W, Wang X, Hong Q et. Al. Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome c release via a conformational change in Bcl-2. *The FASEB Journal* 2006;20:2147-2149.
250. Elrod JW, Wong R, Mishra S, Vagnozzi RJ, Sakthivel B, Goonasekera SA et. al. Cyclophilin D controls mitochondrial poredependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J Clin Invest* 2010; 120:3680–3687.
251. De Marchi E, Bonora M, Giorgi C, Pinton P. The mitochondrial permeability transition pore is a dispensable element for mitochondrial calcium efflux. *Cell Calcium* 2014;56:1–13.
252. Mnatsakanyan N, Beutner G, Porter GA, Alavian KN, Jonas EA. Physiological roles of the mitochondrial permeability transition pore, *J Bioenerg Biomembr* 2017;49:13–25.
253. Masubuchi Y, Nakayama S, Horie T., Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats. *Hepatology* 2002;35:544-551.
254. Tatematsu Y, Hayashi H, Taguchi R, Fujita H, Yamamoto A, Ohkura K. Effect of N-Phenylanthranilic Acid Scaffold Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on the Mitochondrial Permeability Transition. *Biol Pharm Bull* 2016;39:278-284.
255. Mashayekhi V, Eskandari MR, Kobarfard F, Khajeamiri A, Hosseini MJ., Induction of mitochondrial permeability transition (MPT) pore opening and ROS formation as a mechanism for methamphetamine-induced mitochondrial toxicity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2014;387:47-58.
256. Jafarian I, Eskandari MR, Mashayekhi V, Ahadpour M, Hosseini MJ. Toxicity of valproic acid in isolated rat liver mitochondria. *Toxicol Mech Methods* 2013; 23:617–662.
257. Trost LC, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition: a new pathophysiological mechanism for Reye's syndrome and toxic liver injury. *Pharmacol Exp Ther* 1996;278:1000-1005.
258. Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Castell JV, Jover R., Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS *Biochem Pharmacol* 2003;66:2155-2167.
259. Masubuchi Y, Suda C, Horie T. Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Hepatol* 2005;42:110-116.

260. Tay VK, Wang AS, Leow KY, Ong MM, Wong KP, Boelsterli UA. Mitochondrial permeability transition as a source of superoxide anion induced by the nitroaromatic drug nimesulide in vitro. *Free Radic Biol Med.* 2005;39:949-959.
261. Berson A, Cazanave S, Descatoire V, Tinel M, Grodet A, Wolf C et. al. The anti-inflammatory drug, nimesulide (4-nitro-2-phenoxyethane-sulfoanilide), uncouples mitochondria and induces mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells: protection by albumin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318:444-454.
262. Zhou S, Wallace KB. The effect of peroxisome proliferators on mitochondrial bioenergetics. *Toxicological Sciences.* 1999;48:82-89.
263. Wallace DC, Fan W, Procaccio V Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2010;5:297–348.
264. Schon EA, Fromenty B. Alterations of Mitochondrial DNA in Liver Diseases In: Kaplowitz N, Han D, editors. *Mitochondria in Liver Disease.* New York: CRC Press, 2015:283–314.
265. Wu D, Wang X, Sun H. The role of mitochondria in cellular toxicity as a potential drug target *Cell Biol Toxicol* 2018;34:87–91.
266. De Baar MP, de Rooij ER, Smolders KGM, van Schijndel HB, Timmermans EC, Bethell R. Effects of apricitabine and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors on replication of mitochondrial DNA in HepG2 cells. *Antiviral Research.* 2007;76:68-74.
267. McKee EE. Assessing mitochondrial protein synthesis in drug toxicity screening. In: Dykens JA, Will Y. editors. *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction.* John Wiley & Sons, 2008:463-472.
268. De Vriese AS, Coster RV, Smet J, Seneca S, Lovering A, Haute LLVH et. al. et al. Linezolid-Induced Inhibition of Mitochondrial Protein Synthesis. *Clinical Infectious Diseases.* 2006;42:1111-1117.
269. Moullan N, Mouchiroud L, Wang X, Ryu D, Williams EG, Mottis A et. al. Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research. *Cell Reports.* 2015;10:1681-1691.
270. Le Guillou D, Bucher S, Begriche K, Hoët D, Lombès A, Labbe G et. al. Drug-Induced Alterations of Mitochondrial DNA Homeostasis in Steatotic and Nonsteatotic HepaRG Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2018;365:711-726.
271. Thomson JP, Moggs JG, Wolf CR, Meehan RR. Epigenetic profiles as defined signatures of xenobiotic exposure. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014;764-765:3-9.
272. Munzel M, Globisch D, Carell T. 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. *Angew Chem Int Ed* 2011;50:6460–6468.

273. Matarese F, Carrillo-de Santa Pau E, Stunnenberg HG. 5-Hydroxymethylcytosine: a new kid on the epigenetic block?. *Mol Syst Biol* 2011;7:562.
274. Landgrave-Gómez J, Mercado-Gómez O, Guzmán RG. Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 2015;9:58.
275. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010;70:27-56.
276. Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 1991;196:137-140.
277. Bacalini MG, D'Aquila P, Marasco E, Nardini C, Montesanto A, Franceschi C et. al. The methylation of nuclear and mitochondrial DNA in ageing phenotypes and longevity. *Mech Ageing Dev* 2017;165:156-161.
278. Infantino V, Castegna A, Iacobazzi F, Spera I, Scala I, G. Andria et. al. Impairment of methyl cycle affects mitochondrial methyl availability and glutathione level in Down's syndrome. *Mol Genet Metab* 2011;102:378-382.
279. Shock LS, Thakkar PV, Peterson EJ, Moran RG, Taylor SM. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:3630-3635.
280. Chestnut BA, Chang Q, Price A, Lesuisse C, Wong M, Martin LJ. Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2011;31:16619-16636.
281. Manev H, S Dzitoyeva. Progress in mitochondrial epigenetics *Biomol Concepts* 2013;4:381-389.
282. Janssen BG, Byun HM, Gyselaers W, Lefebvre W, Baccarelli AA, Nawrot TS. Placental mitochondrial methylation and exposure to airborne particulate matter in the early life environment: An ENVIRONAGE birth cohort study. *Journal Epigenetics* 2015;10:536-544.
283. Pirola CJ, Gianotti TF, Burgueno AL, Rey-Funes M, Loidl CF, Mallardi P et. al. Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut* 2013;62:1356-1363.
284. Baccarelli AA, Byun HM. Platelet mitochondrial DNA methylation: a potential new marker of cardiovascular disease. *Clinical Epigenetics* 2015;7:44.
285. Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Liang G, Xu GL, Hu YG et. al. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:1270-1278.

286. Appleton K, Mackay HJ, Judson I, Plumb JA, McCormick C, Strathdee G et. al. Phase I and pharmacodynamic trial of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine and carboplatin in solid tumors. *J Clin Oncol* 2007;25:4603-4609.
287. Chen H, Dzitoyeva S, Manev H, Effect of valproic acid on mitochondrial epigenetics. *Eur J Pharmacol* 2012;690:51–59.
288. Lacobazzi V, Castegna A, Infantino V, Andria G. Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool. *Mol Genet Metab* 2013;110:25-34.
289. Pereira SP, Pereira GC, Moreno AJ, Oliveira PJ. Can drug safety be predicted and animal experiments reduced by using isolated mitochondrial fractions? *Alternatives to Laboratory Animals* 2009;37:355-365.
290. Swiss R, Niles A, Cali JJ, Nadanaciva S, Will Y. Validation of a HTS-amenable assay to detect drug-induced mitochondrial toxicity in the absence and presence of cell death. *Toxicology in Vitro* 2013;27:1789-1797.
291. Makrecka- Kuka M, Krumschnabel G, Gnaiger E. High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria. *Biomolecules* 2015;5:1319-1338.
292. Burtscher J, Zangrandi L, Schwarzer C, Gnaiger E. Differences in mitochondrial function in homogenated samples from healthy and epileptic specific brain tissues revealed by high-resolution respirometry. *Mitochondrion* 2015;25:104-112.
293. Duicu O, Jusca C, Falnita L, Mirica S, Maximov D, Fira-Mladinescu O et. al. Substrate-specific impairment of mitochondrial respiration in permeabilized fibers from patients with coronary heart disease versus valvular disease. *Mol Cell Biochem.* 2013;379:229-234.
294. Divakaruni AS, Rogers GW, Murphy AN. Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark- Type Oxygen Electrode. *Current Protocols in Toxicology.* 2014;60:1-16.
295. Krumschnabel G, Makrecka-Kuka M, Kumphune S, Fontana-Ayoub M, Fasching M, Gnaiger E. O2k-Fluorometry: HRR and simultaneous determination of H2O2 production with Amplex Red. *Mitochondrial Physiology Network.* 2014;19.20:1-5.
296. Will Y, Hynes J, Ogurtsov VI, Papkovsky DB. Analysis of mitochondrial function using phosphorescent oxygen-sensitive probes. *Nat Protoc* 2006;1:2563-2572.
297. Fercher A, Borisov SM, Zhdanov AV, Klimant I, Papkovsky DB. Intracellular O2 sensing probe based on cell-penetrating phosphorescent nanoparticles. *ACS Nano.* 2011;5:5499-5508.

298. Hynes J, Carey C. High-throughput real-time analysis of cell oxygenation using intracellular oxygen-sensitive probes. *Methods Mol Biol* 2015;1264:203-17.
299. Sakata- Kato T, Wirth DF. A Novel Methodology for Bioenergetic Analysis of *Plasmodium falciparum* Reveals a Glucose-Regulated Metabolic Shift and Enables Mode of Action Analyses of Mitochondrial Inhibitors. *ACS Infect Dis.* 2016;2: 903–916.
300. Shim J, Weatherly LM, Luc RH, Dorman MT, Neilson A, Ng R et. al. Triclosan is a mitochondrial uncoupler in live zebrafish. *J Appl Toxicol* 2016;36:1662-1667.
301. Fan H, Li S. Modeling universal dynamics of cell spreading on elastic substrates. *Biomech Model Mechanobiol.* 2015;14:1265-1280.
302. Diaz F, Barrientos A, Fontanesi F. Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using blue native gel electrophoresis. *Current Protocols in Human Genetics* 2009; Chapter 19:Unit19.4.
303. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc* 2012;7:1235-1246.
304. Kalghatgi S, Spina CS, Costello JC, Liesa M, Ramirez JRM, Slomovic S et. al. Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells. *Science Translational Medicine* 2013;5:192ra85.
305. Lai K, Selinger DW, Solomon JM, Wu H, Schmitt E, Fabrizio C et.al. Integrated compound profiling screens identify the mitochondrial electron transport chain as the molecular target of the natural products manassantin, sesquicillin, and arctigenin. *ACS Chemical Biology* 2013;8:257–267.
306. Zhao Y, Miriyala S, Miao L, Mitov M, Schnell D, Dhar SK et. al. Redox proteomic identification of HNE- bound mitochondrial proteins in cardiac tissues reveals a systemic effect on energy metabolism after doxorubicin treatment. *Free Radical Biology & Medicine* 2014;72:55–65.
307. Maldonado EN, Lemasters JJ. ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect. *Mitochondrion.* 2014;19:78-84.
308. Will Y, Dykens J. *Mitochondrial Dysfunction Caused by Drugs and Environmental Toxicants.* New Jersey: John Wiley & Sons, 2018.
309. Baldwin TO. Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Structure* 1996;4:223–238.

310. Fan F, Wood KV. Bioluminescent assays for highthroughput screening. *Assay and Drug Development Technologies* 2007;5:127–136.
311. Holman RB, Cross AJ, Joseph MH. High performance liquid chromatography in neuroscience research. John Wiley & Sons, 1993.
312. Papen M, Gambaryan S, Schütz C, Geiger J. Determination of ATP and ADP secretion from Human and Mouse Platelets by an HPLC Assay. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2013;40:116.
313. Zhang X, Gao F. Imaging mitochondrial reactive oxygen species with fluorescent probes: current applications and challenges. *Free Radical Research* 2015;49:374–382.
314. Kalyanaraman B, Darley- Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB et. al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology & Medicine* 2012;52:1–6.
315. Jourdain D, Jourdain FL, Kutchukian PS, Musah RA, Wink DA, Grisham MB. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite- mediated oxidation reactions in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:28799–28805.
316. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 2007;49:717–727.
317. Morgan B, Sobotta MC, Dick TP. Measuring E(GSH) and H₂O₂ with roGFP2- based redox probes. *Free Radical Biology & Medicine* 2011;51:1943–1951
318. Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh AV et. al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature Methods* 2006;3:281–286.
319. Mitchell P, Moyle J. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *European Journal of Biochemistry* 1969;7:471–484.
320. Nicholls DG, Ward MW. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends in Neurosciences* 2000; 23:166–174.
321. Solaini G, Sgarbi G, Lenaz G, Baracca A. Evaluating mitochondrial membrane potential in cells. *Bioscience Reports* 2007;27:11–21.
322. Lemasters JJ, Chacon E, Ohata H, Harper IS, Nieminen AL, Tesfai SA et. al. Measurement of electrical potential, pH, and free calcium ion concentration in mitochondria of living cells by laser scanning confocal microscopy. *Methods in Enzymology* 1995;260:428–444.
323. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques* 2011;50:98–115.

324. Floryk D, Houstek J. Tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) is suitable for cytofluorometric measurements of mitochondrial membrane potential in cells treated with digitonin. *Bioscience Reports* 1999;19:27–34.
325. Scaduto RC, Jr, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical Journal* 1999; 76:469–477.
326. Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat- liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1986;850:436–448.
327. Rottenberg H, Wu S. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998;1404:393–404.
328. Woollacott AJ, Simpson PB. High throughput fluorescence assays for the measurement of mitochondrial activity in intact human neuroblastoma cells. *J Biomol Screen* 2001;6:413-420.
329. Bonora M, Morganti C, Morciano G, Giorgi C, Wieckowski MR, Pinton P. Comprehensive analysis of mitochondrial permeability transition pore activity in living cells using fluorescenceimaging- based techniques. *Nature Protocols* 2016;11:1067–1080.
330. Kaasik A, Safiulina D, Zharkovsky A, Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 2007; 292:C157–163.
331. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition- dependent death of adult rat myocytes after ischemia- reperfusion. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2006;290:H2024–H2034.
332. Kim JS, Wang JH, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes after anoxia/ reoxygenation: role of Ca²⁺- dependent mitochondrial formation of reactive oxygen species. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 2012;302:G723–G731
333. Petronilli V, Costantini P, Scorrano L, Colonna R, Passamonti S, Bernardi P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation- reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269:16638–16642.
334. Cancherini DV, Queliconi BB, Kowaltowski AJ. Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca⁽²⁺⁾- sensitive K⁺ channel activity in isolated heart mitochondria. *Cardiovascular Research* 2007;73:720–738.

335. Marroquin L, Swiss R, Will Y. Identifying compounds that induce opening of the mitochondrial permeability transition pore in isolated rat liver mitochondria. *Current Protocols in Toxicology* 2014;60:1–17.
336. Blattner JR, He L, Lemasters JJ. Screening assays for the mitochondrial permeability transition using a fluorescence multiwell plate reader. *Anal Biochem* 2001;295:220-226.
337. Pozzan T, Rudolf R. Measurements of mitochondrial calcium in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009;1787:1317–1323.
338. Fonteriz RI, de la Fuente S, Moreno A, Lobaton CD, Montero M, Alvarez J. Monitoring mitochondrial [Ca²⁺] dynamics with rhod- 2, ratiometric pericam and aequorin. *Cell Calcium* 2010;48:61-69.
339. Gunter KK, Gunter TE. Measurements of intracellular free calcium concentration in biological systems. *Current Protocols in Toxicology* 2001 Chapter 2:Unit 2.5.
340. Hock MB, Kralli A. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol* 2009;71:177-203.
341. Williams RS. Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J Biol Chem* 1986;261:12390-12394.
342. Malik AN, Czajka A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*. 2013;13:481-492.
343. Veltri KL, Espiritu M, Singh G. Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *J Cell Physiol*;143:160-164.
344. Cavalier L, Johannisson A, Gyllensten U. Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR. *Exp Cell Res* 2000;259:79-85
345. D'Souza GG, Boddapati SV, Weissig V. Gene therapy of the other genome: the challenges of treating mitochondrial DNA defects. *Pharm Res* 2007;24:228-238.
346. Malik AN, Shahni R, Ledesma RA, Laftah A, Cunningham P. Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;412:1–7.
347. Masser DR, Clark NW, Van Remmen H, Freeman WM. Loss of the antioxidant enzyme CuZnSOD (Sod1) mimics an age-related increase in absolute mitochondrial DNA copy number in the skeletal muscle. *Age (Dordr)* 2016;38:323-333.
348. Gibson GG, Skett P. *Introduction to drug metabolism*. London and New York: Chapman and Hall,1989.

349. Weyler W, Hsu YP, Breakfield XO. Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. In: Kalow W, Editor. Pharmacogenetics of Drug Metabolism. London: Pergamon, 1992: 333-336.
350. Klaassen CD. Disposition of Toxicants. In: Eaton DL, Klaassen CD, editors. Casarett and Doull's Toxicology. McGraw-Hill, 2008:196-256.
351. Bachmann KA. Drug Metabolism. In: Hacker M, Messer WS, Bachmann KA, editors. Pharmacology:Principles and Practice. Academic Press, 2009:131-173.
352. Lewis DF. 57 varieties: the human cytochromes P450. Pharmacogenomics. 2004;5:305-318.
353. Guengerich FP, Rendic S. Update information on drug metabolism systems--2009, part I. Curr Drug Metab. 2010;11:1-3.
354. McDonnell AM, Pharm D, BCOP, Dang CH. Basic Review of the Cytochrome P450 System. J Adv Pract Oncol 2013;4:263-268.
355. Reichhart DW, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. Genome Biol 2000;1:3003.1-3003.9.
356. Hamdane D, Xia C, Im SC, Zhang H, Ja PJ, Waskell L. Structure and Function of an NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase in an Open Conformation Capable of Reducing Cytochrome P450. J Biol Chem 2009; 284:11374-11384.
357. Guengerich FP. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. J Biol Chem 1991;266:10019-10022.
358. Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. Chem Res Toxicol 2001b;14:611-650.
359. Guengerich FP. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. J Biochem Mol Toxicol 2007;21:163-168.
360. Isin EM, Guengerich FP. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. Biochim Biophys Acta 2007;1770:314-329.
361. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacology & Therapeutics 2013;138:103-141.
362. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. Lancet. 2002;360:1155-1162.
363. Kim YD, Todoroki H, Oyama T, Isse T, Matsumoto A, Yamaguchi T et. al. Identification of cytochrome P450 isoforms involved in 1-hydroxylation of pyrene. Environ Res 2004;94:262-266.

364. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* 2004;279:23847–23850.
365. Agundez JA. Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. *Curr Drug Metab* 2004;5:211–214
366. Sansen S, Yano JK, Reynald RL, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD et. al. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *J Biol Chem* 2007;282:14348–14355.
367. Wester MR, Johnson EF, Marques-Soares C, Dijols S, Dansette PM, Mansuy D et. al. Structure of mammalian cytochrome P450 2C5 complexed with diclofenac at 2.1 Å resolution: evidence for an induced fit model of substrate binding. *Biochemistry* 2003;42:9335–9345.
368. Marques-Soares C, Dijols S, Macherey AC, Wester MR, Johnson EF, Dansette PM et. al. Sulfaphenazole derivatives as tools for comparing cytochrome P450 2C5 and human cytochromes P450 2Cs: identification of a new high affinity substrate common to those enzymes. *Biochemistry* 2003;42:6363–6369.
369. Rendic S, di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metab Rev* 1997;29:413-580.
370. Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS, Grant DF. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem* 2004;52:447–454.
371. Klose TS, Blaisdell JA, Goldstein JA. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol* 1999;13: 289-295.
372. Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ, Harris JW. Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res* 1994;54:5543-5546.
373. Backman JT, Kyrklund C, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:685-691.
374. Ogilvie BW, Zhang D, Li W, Rodrigues AD, Gipson AE, Holsapple J et. al. Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: implications for drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* 2006;34:191-197.
375. Totah RA, Rettie AE. Characteristics of CYP2C8 and human CYP2C family members. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2005;77:341-352.
376. Kerb R, Fux R, Mörike K, Kremsner PG, Gil JP, Gleiter CH. et. al. Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport. *Lancet Infect Dis* 2009;9:760-774.

377. Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:349-355.
378. Lewis DF, Modi S, Dickins M. Structure-activity relationship for human cytochrome P450 substrates and inhibitors. *Drug Metab Rev* 2002;34:69–82.
379. Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* 2002;12:251–263.
380. Fleming I. Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s) *Pharmacol Res* 2004;49:525–533.
381. Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C. et. al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 2006;108:2244-2247.
382. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O et. al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 2010;38:92-99.
383. Dansette PM, Rosi J, Bertho G, Mansuy D. Cytochromes P450 catalyze both steps of the major pathway of clopidogrel bioactivation, whereas paraoxonase catalyzes the formation of a minor thiol metabolite isomer. *Chem Res Toxicol.* 2012;25:348-356.
384. Boulenc X, Djebli N, Shi J, Perrin L, Brian W, Van Horn R. Effects of omeprazole and genetic polymorphism of CYP2C19 on the clopidogrel active metabolite. *Drug Metab Dispos* 2012;40:187-197.
385. K pfer A, Preisig R. Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1984;26:753-791.
386. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286:487–491.
387. Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet* 2009;48:689-723.
388. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 2005;5:6–13.
389. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369:23–37.
390. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:193–200.

391. Rostami-Hodjegan A, Kroemer HK, Tucker GT. In-vivo indices of enzyme activity: the effect of renal impairment on the assessment of CYP2D6 activity. *Pharmacogenetics*. 1999;9:277-286.
392. Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)--a review. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999;23:991-1007.
393. Pohl HR, Scinicariello F. The impact of CYP2E1 genetic variability on risk assessment of VOC mixtures. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011;59:364-374.
394. Gonzalez FJ. CYP2E1. *Drug Metabolism and Disposition* 2007;35:1-8.
395. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*. 2009;14:996-1007.
396. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011;13:184-190.
397. Wang H, Tompkins LM. CYP2B6: New insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme. *Curr Drug Metab* 2008;9:598-610.
398. Molden E. Variability in cytochrome P450-mediated metabolism of cardiovascular drugs: Clinical implications and practical attempts to avoid potential problems. *Heart Drug* 2004;4:55-79.
399. Lewis DF, Ito Y, Goldfarb PS. Structural modelling of the human drug-metabolizing cytochromes P450. *Curr Med Chem* 2006;13:2645-2652.
400. Strelevitz TJ, Foti RS, Fisher MB. In vivo use of the P450 inactivator 1-aminobenzotriazole in the rat: varied dosing route to elucidate gut and liver contributions to first-pass and systemic clearance. *J Pharm Sci* 2006;95:1334-1341.
401. Barve A, Kovacs SJ, Ke J, Crabbe R, Grosgrain P, Menetrey A et. al. The effects of CYP3A4 induction and inhibition on the pharmacokinetics of alisporivir in humans. *Clin Pharmacol Drug Dev* 2015;4:25-32.
402. Benet LZ. A Holy Grail of clinical pharmacology: prediction of drug pharmacokinetics and pharmacodynamics in the individual patient. *Clin Pharmacol Ther*. 2009 Aug;86(2):133-144.
403. Galetin A, Gertz M, Houston JB. Contribution of intestinal cytochrome p450-mediated metabolism to drug-drug inhibition and induction interactions. *Drug Metab Pharmacokin* 2010;25:28-47.
404. Paine MF, Widmer WW, Hart HL, Pusek SN, Beavers KL, Criss AB et. al. A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1097-105.

405. Harding BW, Wong SH, Nelson DH. Carbon monoxide combining substances in rat adrenal. *Biochim Biophys Acta* 1964;92:415–417.
406. Omura T. Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:690–698.
407. Omura T, Sanders E, Estabrook RW, Cooper DY, Rosenthal O. Isolation from adrenal cortex of a non-heme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys* 1966;117:660–673.
408. Anandatheerthavarada HK, Addya S, Dwivedi RS, Biswas G, Mullick J, Avadhani NG. Localization of multiple forms of inducible cytochromes P450 in rat liver mitochondria: immunological characteristics and patterns of xenobiotic substrate metabolism. *Arch Biochem Biophys* 1997;339:136–150.
409. Anandatheerthavarada HK, Amuthan G, Biswas G, Robin MA, Murali R, Waterman MR & Avadhani NG. Evolutionarily divergent electron donor proteins interact with P450MT2 through the same helical domain but different contact points. *EMBO J* 2001;2394–2403.
410. Robin MA, Anandatheerthavarada HK, Fang JK, Cudic M, Otvos L, Avadhani NG. Mitochondrial targeted cytochrome P450 2E1 (P450 MT5) contains an intact N terminus and requires mitochondrial specific electron transfer proteins for activity. *J Biol Chem* 2001;276:24680–24689.
411. Katagiri M, Ganguli BN, Gunsalus IC. A soluble cytochrome P450 functional in methylene hydroxylation. *J Biol Chem* 1968;243:3543–3546.
412. Omura T. Mitochondrial P450s. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 163:86-93.
413. Shayiq RM, Addya S, Avadhani NG. Constitutive and inducible forms of cytochrome P450 from hepatic mitochondria. *Methods Enzymol* 1991;206:587–594
414. Bhagwat SV, Mullick J, Raza H, Avadhani NG. Constitutive and inducible cytochromes P450 in rat lung mitochondria: xenobiotic induction, relative abundance, and catalytic properties. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;156: 231–240.
415. Sakaguchi M, Mihara K, Sato R. Signal recognition particle is required for co-translational insertion of cytochrome P-450 into microsomal membrane. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81:3361–3364.
416. Boopathi E, Anandatheerthavarada HK, Bhagwat SV, Biswas G, Fang JK, Avadhani NG. Accumulation of mitochondrial P450MT2, NH(2)-terminal truncated cytochrome P4501A1 in rat brain during chronic treatment with beta-naphthoflavone. A role in the metabolism of neuroactive drugs. *J Biol Chem* 2000;275:34415–34423.

417. Sato T, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T. The amino-terminal structures that determine topological orientation of cytochrome P-450 in microsomal membrane. *EMBO J* 1990;9:2391–2397.
418. Yamazaki S, Sato K, Suhara K, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T. Importance of the proline-rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s. *J Biochem* 1993;114:652–657.
419. Szczesna-Skorupa E, Straub P, Kemper B. Deletion of a conserved tetrapeptide, PPGP, in P450 2C2 results in loss of enzymatic activity without a change in the cellular location. *Arch Biochem Biophys* 1993;304:170-175.
420. Sepuri NB, Yadav S, Anandatheerthavarada HK, Avadhani NG. Mitochondrial targeting of intact CYP2B1 and CYP2E1 and N-terminal truncated CYP1A1 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*—role of protein kinase A in the mitochondrial targeting of CYP2E1. *FEBS J* 2007;274:4615-4630.
421. Dasari VR, Anandatheerthavarada HK, Robin MA, Boopathi E, Biswas G, Fang JK et. al. Role of protein kinase C-mediated protein phosphorylation in mitochondrial translocation of mouse CYP1A1, which contains a non-canonical targeting signal. *J Biol Chem* 2006;281:30834–30847.
422. Ou W, Ito A, Morohashi K, Fujii-Kuriyama Y, Omura T. Processing-independent in vitro translocation of cytochrome P-450(SCC) precursor across mitochondrial membranes. *J Biochem* 1986;100:1287–1296.
423. Addya S, Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Bhagwat SV, Mullick J, Avadhani NG. Targeting of NH₂- terminal- processed microsomal protein to mitochondria: a novel pathway for the biogenesis of hepatic mitochondrial P450MT2. *J Cell Biol* 1997;139:589–599.
424. Anandatheerthavarada HK, Vijayarathy C, Bhagwat SV, Biswas G, Mullick J, Avadhani NG. Physiological role of the N- terminal processed P4501A1 targeted to mitochondria in erythromycin metabolism and reversal of erythromycin- mediated inhibition of mitochondrial protein synthesis. *J Biol Chem* 1999b;274:6617–6625.
425. Boopathi E, Srinivasan S, Fang JK, Avadhani NG. Bimodal protein targeting through activation of cryptic mitochondrial targeting signals by an inducible cytosolic endoprotease. *Mol Cell* 2008;32:32–42.
426. Bhagwat SV, Biswas G, Anandatheerthavarada HK, Addya S, Pandak W, Avadhani NG. Dual targeting property of the N- terminal signal sequence of P4501A1. Targeting of heterologous proteins to endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem* 1999a;274:24014–24022.
427. Anandatheerthavarada HK, Sepuri NB, Avadhani NG. Mitochondrial targeting of cytochrome P450 proteins containing NH₂- terminal chimeric signals involves an unusual TOM20/TOM22 bypass mechanism. *J Biol Chem* 2009;284:17352–17363.

428. Bansal S, Leu AN, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Chowdhury AR, Anandatheerthavarada HK et. al. Mitochondrial targeting of cytochrome P450 (CYP) 1B1 and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon- induced mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 2014b;289:9936–9951.
429. Dong H, Shertzer HG, Genter MB, Gonzalez FJ, Vasiliou V, Jefcoate C et. al. Mitochondrial targeting of mouse NQO1 and CYP1B1 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;435:727–732.
430. Bajpai P, Srinivasan S, Ghosh J, Nagy LD, Wei S, Guengerich FP et. al. Targeting of splice variants of human cytochrome P450 2C8 (CYP2C8) to mitochondria and their role in arachidonic acid metabolism and respiratory dysfunction. *J Biol Chem* 2014;289:29614–29630.
431. Sangar MC, Anandatheerthavarada HK, Martin MV, Guengerich FP, Avadhani NG. Identification of genetic variants of human cytochrome P450 2D6 with impaired mitochondrial targeting. *Mol Genet Metab* 2010a;99:90–97.
432. Sangar MC, Bansal S, Avadhani NG. Bimodal targeting of microsomal cytochrome P450s to mitochondria: implications in drug metabolism and toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010b;6:1231–1251.
433. Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Mullick J, Sepuri NB, Otvos L, Pain D et. al. Dual targeting of cytochrome P4502B1 to endoplasmic reticulum and mitochondria involves a novel signal activation by cyclic AMP- dependent phosphorylation at ser128. *EMBO J* 1999a;18:5494–5504.
434. Bansal S, Anandatheerthavarada HK, Prabu GK, Milne GL, Martin MV, Guengerich FP et. al. Human cytochrome P450 2E1 mutations that alter mitochondrial targeting efficiency and susceptibility to ethanol- induced toxicity in cellular models. *J Biol Chem* 2013;288:12627–12644.
435. Robin MA, Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Sepuri NB, Gordon DM, Pain D et. al. Bimodal targeting of microsomal CYP2E1 to mitochondria through activation of an N- terminal chimeric signal by cAMP- mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 2002;277:40583–40593.
436. Omura T, Morohashi K. Gene regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53:19–25.
437. Okuda K, Weber P, Ullrich V. Photochemical action spectrum of the CO-inhibited 5-cholestane-3,7,12-triol 26-hydroxylase system. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;74:1071–1076.
438. Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jörnvall H, Russell DW. Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* 1989;264:8222–8229.

439. Okuda KI. Liver mitochondrial P450 involved in cholesterol catabolism and vitamin D activation. *J Lipid Res* 1994;35:361-372.
440. Axén E, Postlind H, Sjöberg H, Wikvall K. Liver mitochondrial cytochrome P450 CYP27 and recombinant-expressed human CYP27 catalyze 1 alpha-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:10014-10018.
441. Masumoto O, Okayama Y, Okuda K. Purification and characterization of Vitamin D 25-hydroxylase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1988;263: 14256–14260
442. Takeyama K, Kitanaka S, Sato S, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D₃ 1-hydroxylase and Vitamin D synthesis. *Science* 1997;277:1827–1830.
443. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of Vitamin D. *Trends Biochem Sci* 2004;29:664–673.
444. Bernard S, Neville KA, Nguyen AT, Flockhart DA. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. population: clinical implications. *Oncologist* 2006;11:126–135
445. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007;116:496–526.
446. Glue P, Clement RP. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism – basic concepts and methods of assessment. *Cell Mol Neurobiol* 1999;19:309–323.
447. Bhagwat SV, Boyd MR, Ravindranath V. Brain mitochondrial cytochrome P450: xenobiotic metabolism, presence of multiple forms and their selective inducibility. *Arch Biochem Biophys* 1995;320:73–83.
448. Neve EPA, Ingelman-Sundberg M. A soluble amino-terminally truncated catalytically active form of rat cytochrome P450 2E1 targeted to liver mitochondria. *FEBS Lett* 1999;460:309–314.
449. Genter MB, Clay CD, Dalton TP, Dong H, Nebert DW, Shertzer H. Comparison of mouse hepatic mitochondrial versus microsomal cytochromes P450 following TCDD treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342: 1375–1381.
450. Watkins PB, Murray SA, Winkelman LG, Heuman DM, Wrighton SA, Guzelian PS. Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P-450. Studies in rats and patients. *J Clin Invest* 1989;83: 688–697.
451. Kusano K, Sakaguchi M, Kagawa N, Waterman MR, Omura T. Microsomal P450s use specific proline-rich sequences for efficient folding, but not for maintenance of the folded protein. *J Biochem* 2001;129:259–269.

452. Dong H, Dalton TP, Miller ML, Chen Y, Uno S, Shi Z et. al. Knock- in mouse lines expressing either mitochondrial or microsomal CYP1A1:differing responses to dietary benzo[a]pyrene as proof of principle. *Mol Pharmacol* 2009; 75:555–567.
453. Dorn GW, Kitsis RN. The mitochondrial dynamism- mitophagy- cell death interactome: multiple roles performed by members of a mitochondrial molecular ensemble. *Circ Res* 2015;116:167–182.
454. Raza H, Avadhani NG. Hepatic mitochondrial cytochrome P- 450 system. Purification and characterization of two distinct forms of mitochondrial cytochrome P- 450 from beta-naphthoflavone- induced rat liver. *J Biol Chem* 1988;263:9533–9541.
455. Bajpai P, Sangar MC, Singh S, Tang W, Bansal S, Chowdhury G et. al. Metabolism of 1-methyl- 4- phenyl- 1,2,3,6- tetrahydropyridine by mitochondrion- targeted cytochrome P450 2D6: implications in Parkinson disease. *J Biol Chem* 2013;288:4436–4451.
456. Knockaert L, Descatoire V, Vadrot N, Fromenty B, Robin MA. Mitochondrial CYP2E1 is sufficient to mediate oxidative stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen. *Toxicol In Vitro* 2011;25:475-84.
457. Bansal S, Srinivasan S, Anandasadagopan S, Chowdhury AR, Selvaraj V, Kalyanaraman B et. al. Additive effects of mitochondrion-targeted cytochrome CYP2E1 and alcohol toxicity on cytochrome c oxidase function and stability of respirasome complexes. *J Biol Chem* 2012;287:15284–15297.
458. Bansal S, Liu CP, Sepuri NB, Anandatheerthavarada HK, Selvaraj V, Hoek J et. al. Mitochondria-targeted cytochrome P450 2E1 induces oxidative damage and augments alcohol-mediated oxidative stress. *J Biol Chem* 2010;285:24609–24619.
459. Dettling M, Cascorbi I, Opgen-Rhein C, Schaub R. Clozapine-induced agranulocytosis in schizophrenic Caucasians: confirming clues for associations with human leukocyte class I and II antigens. *Pharmacogenomics J* 2007;7:325-332.
460. Safferman A., Jeffrey A., Lieberman A. Clinical profile of clozapine: Adverse reactions and agranulocytosis. *Psyc Quart* 1992;63:51–70.
461. Wagstaff A, Perry C. Clozapin in prevention of suicide in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. *CNS Drugs* 2003;17:273-280.
462. Meltzer HY, Alphas L, Green AI, Altamura AC, Anand R, Bertoldi A et. al. Clozapine treatment for suicidality in schizophrenia: International Suicide Prevention Trial (InterSePT). *Arch Gen Psychiatry* 2003;60:82-91.
463. Regenthal R, Krueger M, Koepfel C, Preiss R. Drug levels: therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs. *J Clin Monit Comput* 1999;15:529-544.

464. Schaber G, Stevens I, Gaertner HJ, Dietz K, Pfaff UB. Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renal clearance. *Br J Clin Pharmacol* 1998;46:453-459.
465. Centorrino F, Baldessarini RJ, Kando JC, Frankenburg FR, Volpicelli SA, Flood JG. Clozapine and metabolites: concentrations in serum and clinical findings during treatment of chronically psychotic patients. *J Clin Psychopharmacol.* 1994;14:119-125.
466. Dain JG, Nicoletti J, Ballard F. Biotransformation of clozapine in humans. *Drug Metab Dispos.* 1997;25:603-609.
467. Schaber G, Wiatr G, Wachsmuth H, Dachtler M, Albert K, Gaertner I. Isolation and identification of clozapine metabolites in patient urine. *Drug Metab Dispos.* 2001;29:923-931.
468. Pirmohamed M, Williams D, Madden S, Templeton E, Park BK. Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;272:984-990.
469. Eiermann B, Engel G, Johansson I, Zanger UM, Bertilsson L. The involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in the metabolism of clozapine. *Br J Clin Pharmacol* 1997;44:439-446.
470. Linnet K, Olesen OV. Metabolism of clozapine by cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos.* 1997;25:1379-1382.
471. Fang J, Coutts RT, McKenna KF, Baker GB. Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998;358:592-599 .
472. Tugnait M, Hawes EM, McKay G, Eichelbaum M, Midha KK. Characterization of the human hepatic cytochromes P450 involved in the in vitro oxidation of clozapine. *Chem Biol Interact* 1999;118:171-189.
473. Olesen OV, Linnet K. Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the N-demethylation of clozapine in vitro at low and high concentrations. *J Clin Pharmacol* 2001;41:823-832
474. Zhang WV, D'Esposito F, Edwards RJ, Ramzan I, Murray M. Interindividual variation in relative CYP1A2/3A4 phenotype influences susceptibility of clozapine oxidation to cytochrome P450-specific inhibition in human hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* 2008;36:2547-2555.
475. Bertilsson L, Carrillo JA, Dahl ML, Llerena A, Alm C, Bondesson U et. al. Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test. *Br J Clin Pharmacol.* 1994;38:471-473.

476. Fischer V, Vogels B, Maurer G, Tynes RE. The antipsychotic clozapine is metabolized by the polymorphic human microsomal and recombinant cytochrome P450 2D6. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;260:1355-1360.
477. Arranz MJ, Dawson E, Shaikh S, Sham P, Sharma T, Aitchison K. et. al. Cytochrome P4502D6 genotype does not determine response to clozapine. *Br J Clin Pharmacol* 1995;39:417-420.
478. Maggs JL, Williams D, Pirmohamed M, Park BK. The metabolic formation of reactive intermediates from clozapine, a drug associated with agranulocytosis in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:1463-1475.
479. Damsten MC, de Vlieger JS, Niessen WM, Irth H, Vermeulen NP, Commandeur JN. Trimethoprim: novel reactive intermediates and bioactivation pathways by cytochrome p450s. *Chem Res Toxicol* 2008;21:2181-2187.
480. Wen H, Morris KR, Park K. Synergic effects of polymeric additives on dissolution and crystallization of acetaminophen. *Pharm Res* 2008;25:349-358.
481. Dragovic S, Boerma JS, van Bergen L, Vermeulen NPE, Commandeur JNM. Role of human glutathione S-transferases in the inactivation of reactive metabolites of clozapine. *Chem Res Toxicol* 2010;23:1467-1476.
482. Barbara JE, Castro-Perez JM. High-resolution chromatography/time-of-flight MSE with in silico data mining is an information-rich approach to reactive metabolite screening. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011;25:3029-3040.
483. Rousu T, Pelkonen O, Tolonen A. Rapid detection and characterization of reactive drug metabolites in vitro using several isotope-labeled trapping agents and ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009;23:843-855.
484. Argoti D, Liang L, Conteh A, Chen L, Bershas D, Yu CP. Cyanide trapping of iminium ion reactive intermediates followed by detection and structure identification using liquid chromatography-tandem mass spectrometry LC-MS/MS. *Chem Res Toxicol* 2005;18:1537-1544.
485. Dragovic S, Gunness P, Ingelman-Sundberg M, Vermeulen NP, Commandeur JN. Characterization of human cytochrome P450s involved in the bioactivation of clozapine. *Drug Metab Dispos* 2013;41:651-658.
486. Fazio PD, Gaetano R, Caroleo M, Cerminara G, Maida F, Bruno A et. al. Rare and very rare adverse effects of clozapine. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2015;11:1995-2003.
487. Liu ZC, Uetrecht JP. Clozapine is oxidized by activated human neutrophils to a reactive nitrenium ion that irreversibly binds to the cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:1476-1483.

488. Williams DP, Pirmohamed M, Naisbitt DJ, Uetrecht JP, Park BK. Induction of metabolism-dependent and independent neutrophil apoptosis by clozapine. *Mol Pharmacol* 2000;58:207-216.
489. Hummer M, Kurz M, Kurzthaler I, Oberbauer H, Miller C, Fleischhacker WW. Hepatotoxicity of clozapine. *J Clin Psychopharmacol* 1997;17:314-317.
490. Fischer V, Haar JA, Greiner L, Lloyd RV, Mason RP. Possible role of free radical formation in clozapine (clozaril)-induced agranulocytosis. *Mol Pharmacol* 1991;40:846-853.
491. Ronaldson KJ, Fitzgerald PB, McNeil JJ. Clozapine-induced myocarditis, a widely overlooked adverse reaction. *Acta Psychiatr Scand* 2015;132:231-240.
492. Hatton JL, Bhat PK, Gandhi S. Clozapine-Induced Myocarditis: Recognizing a Potentially Fatal Adverse Reaction. *Tex Heart Inst J* 2015;42:155–157.
493. Longhi S, Heres S. Clozapine-induced, dilated cardiomyopathy: a case report. *BMC Res Notes* 2017;10:338.
494. La Grenade L, Graham D, Trontell A. Myocarditis and cardiomyopathy associated with clozapine use in the United States. *N Engl J Med* 2001;345: 224-225.
495. Kilian JG, Kerr K, Lawrence C, Celermajer DS. Myocarditis and cardiomyopathy associated with clozapine. *Lancet* 1999;354:hg1841-1845.
496. Elman I, Goldstein DS, Eisenhofer G, Folio J, Malhotra AK, Adler CM et. al. Mechanism of peripheral noradrenergic stimulation by clozapine. *Neuropsychopharmacology* 1999;20:29–34.
497. Abdel-Wahab BA, Abdalla ME, El-khawanki MM. Does clozapine induce myocarditis, myocardial oxidative stress and DNA damage in rats? *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 2014;4:75–82.
498. Williams DP, O'Donnell CJ, Maggs JL, Leeder JS, Uetrecht J, Pirmohamed M et. al. Bioactivation of clozapine by murine cardiac tissue in vivo and in vitro. *Chem Res Toxicol* 2003;16:1359-1364.
499. Baig MR, Navaira E, Escamilla MA, Raventos H, Walss-Bass C. Clozapine treatment causes oxidation of proteins involved in energy metabolism in lymphoblastoid cells: a possible mechanism for antipsychotic-induced metabolic alterations. *J Psychiatr Pract* 2010;16:325–333.
500. Walss-Bass C, Weintraub ST, Hatch J, Mintz J, Chaudhuri AR. Clozapine causes oxidation of proteins involved in energy metabolism: a possible mechanism for antipsychotic-induced metabolic alterations. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11:1097–1104.
501. Ji B, La Y, Gao L, Zhu H, Tian N, Zhang M et. al. A comparative proteomics analysis of rat mitochondria from the cerebral cortex and hippocampus in response to antipsychotic medications. *J Proteome Res* 2009;8:3633–3641.

502. Streck EL, Rezin GT, Barbosa LM, Assis LC, Grandi E, Quevedo J. Effect of antipsychotics on succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007;376:127–133.
503. Casademont J, Garrabou G, Miro O, Lopez S, Pons A, Bernardo M et. al. Neuroleptic treatment effect on mitochondrial electron transport chain: peripheral blood mononuclear cells analysis in psychotic patients. *J Clin Psychopharmacol* 2007;27:284–288.
504. Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2005;54:8–14.
505. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004;350:664–671.
506. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:2944–2950.
507. Contreras-Shannon V, Heart DL, Paredes RM, Navaira E, Catano G, Maffi SK et. al. Clozapine-induced mitochondria alterations and inflammation in brain and insulin-responsive cells. *PLoS One* 2013;8:e59012.
508. Modica-Napolitano JS, Lagace CJ, Brennan WA, Aprille JR. Differential effects of typical and atypical neuroleptics on mitochondrial function in vitro *Arch Pharm Res* 2003;26:951-959.
509. Nadanaciva S, Rana P, Beeson GC, Chen D, Ferrick DA, Beeson CC et. al. Assessment of drug-induced mitochondrial dysfunction via altered cellular respiration and acidification measured in a 96-well platform. *J Bioenerg Biomembr* 2012;44:421-37.
510. Proudfoot AT, Wright N. Acute paracetamol poisoning. *Br Med J* 1970;3:557-558.
511. Curry RW Jr, Robinson JD, Sughrue MJ. Acute renal failure after acetaminophen ingestion. *JAMA*. 1982;247:1012-1014.
512. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH et. al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 2002;137:947–954.
513. Bessems JG, Vermeulen NP. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemendhaleml mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol* 2001;31:55-138.
514. Zhao L, Pickering G. Paracetamol metabolism and related genetic differences. *Drug Metab Rev* 2011;43:41-52.
515. Klaassen, CD. Casarett & Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons 8th edition: McGraw-Hill Education, 2013.

516. Jollow DJ, Mitchell JR, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1973;187:195–202.
517. Prescott LF, Critchley JA. The treatment of acetaminophen poisoning. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983;23:87-101.
518. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS et. al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* 2005;42:1364-1372.
519. Jones AF, Vale JA. Paracetamol poisoning and the kidney. *J Clin Pharm Ther* 1993;18:5-8.
520. Breen K, Wandscheer JC, Peignoux M, Pessayre D. In situ formation of the acetaminophen metabolite covalently bound in kidney and lung. Supportive evidence provided by total hepatectomy. *Biochem Pharmacol* 1982;131:115-116.
521. Debie J, Hoivika L, Robyn L, KlausBrendelb F, Gandolfib AJ, Khairallahd EA et. al. Protein arylation precedes acetaminophen toxicity in a dynamic organ slice culture of mouse kidney. *Fundam Appl Toxicol* 1996;136:161-169.
522. Blakely P, McDonald BR. Acute renal failure due to acetaminophen ingestion: a case report and review of the literature” *J Am Soc Nephrol* 1995;6: 48-53.
523. Testa B, Kramer SD. *The Biochemistry of Drug Metabolism: Conjugations, Consequences of Metabolism, Influencing Factors*. Zurich: Wiley-VCH, 2010.
524. Stern ST, Bruno MK, Hennig GE, Horton RA, Roberts JC, Cohen SD. Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice: I. Enhancement of acetaminophen nephrotoxicity by acetaminophen-cysteine. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;202:151–159.
525. Stern ST, Bruno MK, Horton RA, Hill DW, Roberts JC, Cohen SD. Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity II. Possible involvement of the gamma-glutamyl cycle. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;202:160–171.
526. Kennon-McGill S, McGill MR., Extrahepatic toxicity of acetaminophen: critical evaluation of the evidence and proposed mechanisms. *J Clin Transl Res* 2018;3:5
527. McGill MR, Williams CD, Xie Y, Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012a;264:387-394.
528. Burcham PC, Harman AW. Acetaminophen toxicity results in site-specific mitochondrial damage in isolated mouse hepatocytes. *J Biol Chem* 1991;266: 5049–5054

529. Jaeschke H. Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice in vivo: the protective effect of allopurinol. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:935–941.
530. Tirmenstein MA, Nelson SD. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols. Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 1990;265:3059–3065.
531. Denicola A, Radi R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology* 2005;208:273–288.
532. Hinson JA, Pike SL, Pumford NR, Mayeux PR. Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem Res Toxicol* 1998;11:604-647.
533. Blazka ME, Wilmer JL, Holladay SD, Wilson RE, Luster MI. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;133:43-52.
534. Laskin DL, Gardner CR, Price VF, Jollow DJ. Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. *Hepatology* 1995;21:1045-1050.
535. Michael SL, Pumford NR, Mayeux PR, Niesman MR, Hinson JA. Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology*. 1999 Jul;30(1):186-195.
536. James LP, McCullough SS, Knight TR, Jaeschke H, Hinson JA. Acetaminophen toxicity in mice lacking NADPH oxidase activity: role of peroxynitrite formation and mitochondrial oxidant stress. *Free Radic Res* 2003;37:1289-1297.
537. Saito C, Lemasters JJ, Jaeschke H. c-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;246:8–17.
538. Du K, Xie Y, McGill MR, Jaeschke H. Pathophysiological significance of c-jun N-terminal kinase in acetaminophen hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2015;11:1769–1779.
539. Win S, Than TA, Han D, Petrovic LM, Kaplowitz N. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent acute liver injury from acetaminophen or tumor necrosis factor (TNF) requires mitochondrial Sab protein expression in mice. *J Biol Chem* 2011;286:35071–35078.
540. Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304: 463–470.
541. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri Es et. al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479–489.

542. Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 2000;275:31199–31203.
543. Baliga B, Kumar S. Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow? *Cell Death Differ* 2003;10:16–18.
544. Tsokos-Kuhn JO, Hughes H, Smith CV, Mitchell JR. Alkylation of the liver plasma membrane and inhibition of the Ca²⁺ ATPase by acetaminophen, *Biochem. Pharmacol* 1988;37:2125–2131.
545. Limaye PB, Apte UM, Shankar K, Bucci TJ, Warbritton A, Mehendale HM. Calpain released from dying hepatocytes mediates progression of acute liver injury induced by model hepatotoxicants. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;191:211–226.
546. Ray SD, Sorge CL, Raucy JL, Corcoran GB. Early loss of large genomic DNA in vivo with accumulation of Ca²⁺ in the nucleus during acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;106:346–351.
547. Shen W, Kamendulis LM, Ray SD, Corcoran GB. Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: effects of Ca(2+)-endonuclease, DNA repair, and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation and cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;112:32–40.
548. Lawson JA, Fisher MA, Simmons CA, Farhood A, Jaeschke H. Inhibition of Fas receptor (CD95)-induced hepatic caspase activation and apoptosis by acetaminophen in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;156:179–186.
549. Ghanema CI, Pérezc MJ, Manautoud JE, Mottinoe AD. Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity *Pharmacological Research* 2016;109 :119–131.
550. Qiu Y, Benet LZ, Burlingame A. Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen in vivo in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Biol Chem* 1998;273:17940-17953.
551. McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, Taha M, Curry SC, Jaeschke H. The mechanism underlying acetaminophen induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J Clin Invest* 2012;122 1574-1583.
552. Porter KE, Dawson AG. Inhibition of respiration and gluconeogenesis by paracetamol in rat kidney preparations. *Biochem Pharmacol* 1979;28:3057–3062.
553. Satav JG, Bhattacharya RK. Respiratory functions in kidney mitochondria following paracetamol administration to young-adult & old rats. *Indian J Med Res* 1997;105:131–135.

554. Small RE. Diclofenac sodium. *Clin Pharm*. 1989;8:545-558.
555. Tang W. The metabolism of diclofenac—enzymology and toxicology perspectives. *Curr Drug Metab* 2003;4:319–329.
556. Leemann T, Transon C, Dayer P. Cytochrome P4502B (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci*. 1993;52:29-34.
557. Shen S, Hargus SJ, Martin BM, Pohl LR. Cytochrome P4502C11 is a target of diclofenac covalent binding in rats. *Chem Res Toxicol* 1997;10:420-423.
558. Tang W, Stearns RA, Wang RW, Chiu SH, Baillie TA. Roles of human hepatic cytochrome P450s 2C9 and 3A4 in the metabolic activation of diclofenac. *Chem Res Toxicol* 1999a;12:192-199.
559. Tang W, Stearns RA, Bandiera SM, Zhang Y, Raab C, Braun MP et. al. Studies on cytochrome P-450-mediated bioactivation of diclofenac in rats and in human hepatocytes: identification of glutathione conjugated metabolites. *Drug Metab Dispos* 1999b;27:365-372.
560. Boelsterli UA. Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;192:307–322.
561. Kretz-Rommel A, Boelsterli UA. Selective protein adducts to membrane proteins in cultured rat hepatocytes exposed to diclofenac: radiochemical and immunochemical analysis. *Mol Pharmacol* 1994a;45:237-244.
562. Kretz-Rommel A, Boelsterli UA. Mechanism of covalent adduct formation of diclofenac to rat hepatic microsomal proteins. Retention of the glucuronic acid moiety in the adduct. *Drug Metab Dispos* 1994b;22:956-961.
563. Syed MM, Skonberg C, Hansen SH. Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI), *Toxicology in Vitro* 2016;31:93–102.
564. Yan Z, Li J, Huebert N, Caldwell GW, Du Y, Zhong H. Detection of a novel reactive metabolite of diclofenac: evidence for cyp2c9-mediated bioactivation via arene oxides. *Drug metabolism and disposition* 2005;33:706-713.
565. de Abajo FJ, Montero D, Madurga M, García Rodríguez LA. Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study. *Br J Clin Pharmacol* 2004;58:71–80.
566. Helfgott SM, Sandberg-Cook J, Zakim D, Nestler J. Diclofenac-associated hepatotoxicity. *JAMA* 1990;264:2660–2662.

567. Thompson RA, Isin EM, Li Y, Weidolf L, Page K, Wilson I et. al. In vitro approach to assess the potential for risk of idiosyncratic adverse reactions caused by candidate drugs. *Chem Res Toxicol* 2012;25:1616–1632.
568. Banks AT, Zimmerman HJ, Ishak KG, Harter JG. Diclofenac-associated hepatotoxicity: analysis of 180 cases reported to the Food and Drug Administration as adverse reactions. *Hepatology* 1995;22:820-827.
569. Miyamoto G, Zahid N, Uetrecht JP. Oxidation of diclofenac to reactive intermediates by neutrophils, myeloperoxidase, and hypochlorous acid. *Chem Res Toxicol* 1997;10:414-419.
570. Kretz-Rommel A, Boelsterli UA. Diclofenac covalent protein binding is dependent on acyl glucuronide formation and is inversely related to P450-mediated acute cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;120:155–161.
571. Hargus SJ, Martin BM, George JW, Pohl LR. Covalent modification of rat liver dipeptidyl peptidase IV (CD26) by the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Chem Res Toxicol* 1995;8:993–996
572. Sallustio BC, Holbrook FL. In vivo perturbation of rat hepatocyte canalicular membrane function by diclofenac. *Drug Metab. Dispos.* 2001;29:1535–1538.
573. Grillo MP, Hua F, Knutson CG, Ware JA, Li C. Mechanistic studies on the bioactivation of diclofenac: identification of diclofenac-S-acyl-glutathione in vitro in incubations with rat and human hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 2003a;16:1410–1417.
574. Grillo MP, Knutson CG, Sanders PE, Waldon DJ, Hua F, Ware JA. Studies on the chemical reactivity of diclofenac acyl glucuronide with glutathione: identification of diclofenac-S-acyl-glutathione in rat bile. *Drug Metab. Dispos.* 2003b;31:1327–1336.
575. Masubuchi Y, Yamada S, Horie T. Possible mechanism of hepatocyte injury induced by diphenylamine and its structurally related nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292:982–987.
576. Van Leeuwen JS, Orij R, Luttik MA, Smits GJ, Vermeulen NP, Vos JC. Subunits Rip1p and Cox9p of the respiratory chain contribute to diclofenac-induced mitochondrial dysfunction. *Microbiology* 2011;157:685–694.
577. Siu WP, Pun PB, Latchoumycandane C, Boelsterli UA. Bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), distinct from the mitochondrial permeability transition, is a key mechanism in diclofenac-induced hepatocyte injury: multiple protective roles of cyclosporin A. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;227:451–461.
578. Kass GE. Mitochondrial involvement in drug-induced hepatic injury. *Chem Biol Interact* 2006;163:145–159.

579. Pessayre D, Haouzi D, Fau D, Robin MA, Mansouri A, Berson A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J Hepatol* 1999;31:760–770.
580. Moorthy M, Fakurazi S, Ithnin H. Morphological alteration in mitochondria following diclofenac and ibuprofen administration. *Pak J Biol Sci* 2008;11:1901–1908.
581. Kasuya F, Kazumi M, Tatsuki T, Suzuki R. Effect of salicylic acid and diclofenac on the medium-chain and long-chain acyl-CoA formation in the liver and brain of mouse. *J Appl Toxicol* 2009;29:435-445.
582. Daly AK, Aithal GP, Leathart JB, Swainsbury RA, Dang TS, Day CP. Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes. *Gastroenterology* 2007;132:272–281.
583. Sekine S, Kimura T, Motoyama M, Shitara Y, Wakazono H, Oida H et. al. The role of cyclophilin D in interspecies differences in susceptibility to hepatotoxic drug-induced mitochondrial injury. *Biochem Pharmacol* 2013;86: 1507–1514.
584. Scialis RJ, Csanaky IL, Goedken MJ, Manautou JE. Multidrug Resistance-Associated Protein 3 Plays an Important Role in Protection against Acute Toxicity of Diclofenac. *Drug Metab Dispos* 2015;43:944-950.
585. Dykens JA, Will Y. The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discov Today* 2007;12:777–7785.
586. Patrono C. Cardiovascular Effects of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Curr Cardiol Rep* 2016;18:25.
587. Unzueta A, Vargas HE. Non-Steroidal Antiinflammatory Drug-Induced Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 2013;17:643-656.
588. Wang D, Patel VV, Ricciotti E, Zhou R, Levin MD, Gao E et. al. Cardiomyocyte cyclooxygenase-2 influences cardiac rhythm and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:7548–7552.
589. Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F. NSAIDs: learning new tricks from old drugs. *European journal of immunology* 2015;45:679–686.
590. Ghosh R, Goswami SK, Feitoza LF, Hammock B, Gomes AV. Diclofenac induces proteasome and mitochondrial dysfunction in murine cardiomyocytes and hearts. *Int J Cardiol* 2016;223:923-935.
591. Silva MF, Aires CC, Luis PB, Ruiter JP, IJlst L, Duran M et. al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:205-216.

592. Granneman GR, Wang SI, Kesterson JW, Machinist JM. The hepatotoxicity of valproic acid and its metabolites in rats. II. Intermediary and valproic acid metabolism. *Hepatology* 1984;4:1153-1158.
593. Kesterson JW, Granneman GR, Machinist JM. The hepatotoxicity of valproic acid and its metabolites in rats. I. Toxicologic, biochemical and histopathologic studies. *Hepatology* 1984;4:1143-1152.
594. Koenig SA, Buesing D, Longin E, Oehring R, Häussermann P, Kluger G et. al. Valproic acid-induced hepatopathy: nine new fatalities in Germany from 1994 to 2003. *Epilepsia* 2006;47:2027-2031.
595. Cotariu D, Zaidman JL. Valproic acid and the liver. *Clin Chem.* 1988;34:890-897.
596. Abbott FS, Anari MR. Valproate. In: Löscher W, editor. *Milestones in Drug Therapy*. Basel: Birkhäuser, 1999.
597. Sadeque AJ, Fisher MB, Korzekwa KR, Gonzalez FJ, Rettie AE. Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:698-703.
598. Booth CL, Pollack GM, Brouwer KL. Hepatobiliary disposition of valproic acid and valproate glucuronide: use of a pharmacokinetic model to examine the rate-limiting steps and potential sites of drug interactions. *Hepatology.* 1996;23:771-780.
599. Spahn-Langguth H, Benet LZ. Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metab Rev* 1992;24:5-47.
600. Bailey MJ, Dickinson RG. Chemical and immunochemical comparison of protein adduct formation of four carboxylate drugs in rat liver and plasma. *Chem Res Toxicol* 1996;9:659-666.
601. Williams AM, Worrall S, de Jersey J, Dickinson RG. Studies on the reactivity of acyl glucuronides--III. Glucuronide-derived adducts of valproic acid and plasma protein and anti-adduct antibodies in humans. *Biochem Pharmacol* 1992;43:745-755.
602. Holt MP, Ju C. Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J* 2006;8:E48-54.
603. Rumbach L, Cremel G, Marescaux C, Warter JM, Waksman A. Succinate transport inhibition by valproate in rat renal mitochondria. *Eur J Pharmacol.* 1989 May 30;164(3):577-581.
604. Ponchaut S, van Hoof F, Veitch K. Cytochrome aa3 depletion is the cause of the deficient mitochondrial respiration induced by chronic valproate administration. *Biochem Pharmacol* 1992;43:644-647.

605. Komulainen T, Lodge T, Hinttala R, Bolszak M, Pietilä M, Koivunen P et. al. Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in HepG2 in vitro cell. *Toxicology* 2015;331:47–56.
606. Tong V, Teng XW, Chang TK, Abbott FS. Valproic acid I: time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Toxicol Sci* 2005;86:427-435.
607. Jurima-Romet M, Abbott FS, Tang W, Huang HS, Whitehouse LW. Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology* 1996;112:69-85.
608. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*. 2006;6:1-28.
609. Kantrowitz JT, Citrome L. Olanzapine: review of safety 2008. *Expert Opin Drug Saf* 2008;7:761-769.
610. Hasnain M, Vieweg WV, Fredrickson SK, Beatty-Brooks M, Fernandez A, Pandurangi AK. Clinical monitoring and management of the metabolic syndrome in patients receiving atypical antipsychotic medications *Prim Care Diabetes*. 2009;3:5-15.
611. Maina G, Ripellino C. The risk of metabolic disorders in patients treated with asenapine or olanzapine: a study conducted on real-world data in Italy and Spain. *Expert Opin Drug Saf* 2014;13:1149-1154.
612. Smith GC, Vickers MH, Shepherd PR. Olanzapine effects on body composition, food preference, glucose metabolism and insulin sensitivity in the rat. *Arch Physiol Biochem* 2011;117:241-249.
613. Gardner I, Zahid N, MacCrimmon D, Utrecht JP. A comparison of the oxidation of clozapine and olanzapine to reactive metabolites and the toxicity of these metabolites to human leukocytes. *Mol Pharmacol* 1998;53:991-998.
614. Pereira A, Dean B. Clozapine bioactivation induces dose-dependent, drug-specific toxicity of human bone marrow stromal cells: a potential in vitro system for the study of agranulocytosis. *Biochem Pharmacol* 2006;72:783-793.
615. Dumortier G, Cabaret W, Stamatiadis L, Saba G, Benadhira R, Rocamora JF et. al. Hepatic tolerance of atypical antipsychotic drugs. *Encephale* 2002;28:542-551.
616. Raz A, Bergman R, Eilam O, Yungerman T, Hayek T. A case report of olanzapine-induced hypersensitivity syndrome. *Am J Med Sci* 2001;321:156-158.
617. Hung CC, Wei IH, Huang CC. Late-onset cholestatic hepatitis induced by olanzapine in a patient with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33:1574-1575.

618. Jadallah KA, Limauro DL, Colatrella AM. Acute hepatocellular-cholestatic liver injury after olanzapine therapy. *Ann Intern Med.* 2003;138:357-358.
619. Manceaux P, Constant E, Zdanowicz N, Jacques D, Reynaert C. Management of marked liver enzyme increase during olanzapine treatment: a case report and review of the literature. *Psychiatr Danub.* 2011 Sep;23 Suppl 1:S15-17.
620. Tchernichovsky E, Sirota P. Hepatotoxicity, leucopenia and neutropenia associated with olanzapine therapy. *Int J Psychiatry Clin Pract* 2004;8:173-177.
621. Odacı E, Bilen H, Hacimuftuoglu A, Keles ON, Can I, Bilici M. Long-term treatments with low- and high dose olanzapine change hepatocyte numbers in rats. A stereological and histopathological study. *Arch Med Res* 2009;40:139-145.
622. Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, Beasley CM. Olanzapine Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. *Clin Pharmacokinet* 1999;37: 177–193.
623. Murphy AT, Lake BG, Bernstein JR, Franklin RB, Gillespie TA. Characterization of Olanzapine (LY170053) in Human Liver Slices by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom* 1998;33:1237-1245.
624. Guengerich FP, Brian WR, Iwasaki M, Sari MA, Bäärnhielm C, Berntsson P. Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P-450 IIIA4. *J Med Chem* 1991;34:1838-1844.
625. Russell A, Kappagoda T. Reactive hyperemia in patients with Raynaud's phenomenon. *J Rheumatol* 1988;15:1653-1657.
626. Brownlee JR, Beekman RH, Rosenthal A. Acute hemodynamic effects of nifedipine in infants with bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension. *Pediatr Res* 1988;24:186-190.
627. Descotes J. *Human Toxicology.* Elsevier; 1996.
628. Malatkov P, Skarka A, Musilov K, Wsol V. Reductive metabolism of tiaprofenic acid by the human liver and recombinant carbonyl reducing enzymes, *Chemico-Biological Interactions* 2017;276:121-126.
629. Davies NM. Clinical pharmacokinetics of tiaprofenic acid and its enantiomers. *Clin Pharmacokinet* 1996;31:331-347.
630. Crawford ML, Waller PC, Wood SM. Severe cystitis associated with tiaprofenic acid. *Br J Urol* 1997;79:578-584.
631. Buchbinder R, Forbes A, Kobben F, Boyd I, Snow RM, McNeil JJ. Clinical features of tiaprofenic acid (surgam) associated cystitis and a study of risk factors for its development. *J Clin Epidemiol* 2000;53:1013-1019.

632. Geneve J, Hayat-Bonan B, Labbe G, Degott C, Letteron P, Freneaux E et. al. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation of fatty acids by pirprofen. Role in microvesicular steatosis due to this nonsteroidal anti-inflammatory drug. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;242:1133-1137.
633. Figueiredo A, Ribeiro CA, Gonçalo M, Baptista AP, Teixeira F. Experimental studies on the mechanisms of tiaprofenic acid photosensitization. *J Photochem Photobiol B* 1993;18:161-168.
634. Orhan H, Sahin G. In vitro effects of NSAIDs and paracetamol on oxidative stress-related parameters of human erythrocytes. *Exp Toxicol Pathol.* 2001;53:133-140.
635. Roychowdhury S, Cram AE, Aly A, Svensson CK. Detection of haptened proteins in organotypic human skin explant cultures exposed to dapsone. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1463-1465
636. Kar BR. Dapsone-induced photosensitivity: a rare clinical presentation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2008;24:270-271
637. Graham WR. Adverse effects of dapsone. *Int J Dermatol* 1975;14:494-500.
638. Wozel G, Blasum C. Dapsone in dermatology and beyond. *Arch Dermatol Res* 2014;306:103-124.
639. Vage C, Svensson CK. Evidence that the biotransformation of dapsone and monoacetyldapsone to their respective hydroxylamine metabolites in rat liver microsomes is mediated by cytochrome P450 2C6/2C11 and 3A1. *Drug Metab Dispos* 1994;22:572-577.
640. Vyas PM, Roychowdhury S, Khan FD, Prinszano TE, Lamba J, Schuetz EG et. al. Enzyme-Mediated Protein Haptentation of Dapsone and Sulfamethoxazole in Human Keratinocytes: I. Expression and Role of Cytochromes P450. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006;319:488-496.
641. Mitra AK, Thummel KE, Kalhorn TF, Kharasch ED, Unadkat JD, Slattery JT. Metabolism of dapsone to its hydroxylamine by CYP2E1 in vitro and in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 1995;58:556-566.
642. Uehleke H, Tabarelli S. N-hydroxylation of 4,4'-diaminodiphenylsulphone (Dapsone) by liver microsomes, and in dogs and humans. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1973;278:55-68.
643. Uetrecht J, Zahid N, Shear NH, Biggar WD. Metabolism of dapsone to a hydroxylamine by human neutrophils and mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;245:274-279.
644. Tingle MD, Mahmud R, Maggs JL, Pirmohamed M, Park BK. Comparison of the metabolism and toxicity of dapsone in rat, mouse, J *Pharmacol Exp Ther* 1997;283:817-23.

645. Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith GJ, Ayrton AD, Clarke SE, Chenery RJ. Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. *Xenobiotica* 1995;25:261-270.
646. Rettie AE, Korzekwa KR, Kunze KL, Lawrence RF, Eddy AC, Aoyama T et. al. Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem Res Toxicol* 1992;5:54-59.
647. Ishihara Y, Sekine M, Hamaguchi A, Kobayashi Y, Harayama T, Nakazawa M et. al. Effects of Sulfaphenazole Derivatives on Cardiac Ischemia–Reperfusion Injury: Association of Cytochrome P450 Activity and Infarct Size. *J Pharmacol Sci* 2010;113:335–342.
648. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Kleina TE. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 2012;22:820–827.
649. Cameron AR, Logie L, Patel K, Erhardt S, Bacon S, Middleton P et. al. Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox Biol* 2018;14:187–197.
650. De Haes W, Frooninckx L, Van Assche R, Smolders A, Depuydt G, Billen J et. al. Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:E2501-9.
651. <http://clinicaltrials.gov/>
652. Guengerich FP, Bartleson CJ. In: Hayes A.W. Editor. *Analysis and Characterization of Enzymes and Nucleic Acids In: Principles and Methods of Toxicology*. Philadelphia: Taylor&Francis, 2007:1625–1687.
653. Bhat NK, Avadhani NG. Transport of Proteins into Hepatic and Nonhepatic Mitochondria: Specificity of Uptake and Processing of Precursor Forms of Carbamoyl-Phosphate Synthetase. *Biochemistry* 1985;24:8107-8113.
654. Wieckowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc* 2009;4:1582-1590.
655. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
656. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.
657. <https://www.ptglab.com>

658. Sohl CD, Cheng Q, Guengerich FP. Chromatographic assays of drug oxidation by human cytochrome P450 3A4. *Nat Protoc* 2009;4:1252-1257.
659. Elbarbry F, Wilby K, Alcorn J. Validation of a HPLC method for the determination of p-nitrophenol hydroxylase activity in rat hepatic microsomes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;834:199-203.
660. Wolters JEJ, van Breda SGJ, Caiment F, Claessen FM, de Kok TMCM, Kleinjans JCS. Nuclear and Mitochondrial DNA Methylation Patterns Induced by Valproic Acid in Human Hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 2017;30:1847-1854.
661. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130-7139.
662. Mulder GJ, Peters WHM, Vermeulen NPE, van Bladeren PJ. *Glutathione S-Transferases: Structure, Function and Clinical Implications*. CRC Press, 1996.
663. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47:469-474.
664. Dubick MA, Carden SC, Jordan BS, Langlinais PC, Mazingo DW. Indices of antioxidant status in rats subjected to wood smoke inhalation and/or thermal injury. *Toxicology* 2002;176:145-57.
665. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-126.
666. Pleban PA, Munyani A, Beachum J. Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. *Clin Chem* 1982;28:311-316.
667. de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:387-394.
668. Amet Y, Zerilli A, Goasduff T, Dréano Y, Berthou F. Noninvolvement of CYP2E1 in the (omega-1)-hydroxylation of fatty acids in rat kidney microsomes. *Biochem Pharmacol* 1997;54:947-952.
669. Gröber U. Mitochondrial toxicity of drugs. *Med Monatsschr Pharm.* 2012;35:445-456.
670. Jones AF, Vale JA. Paracetamol poisoning and the kidney. *J Clin Pharm Ther* 1993;18:5-8.
671. Eguia L, Materson BJ. Acetaminophen-related acute renal failure without fulminant liver failure. *Pharmacotherapy* 1997;17:363-370.
672. Mour G, Feinfeld DA, Caraccio T, McGuigan M. Acute renal dysfunction in acetaminophen poisoning. *Ren Fail* 2005;27:381-383.

673. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad* 1984;81:1327-1331.
674. Ko JW, Shin JY, Kim JW, Park SH, Shin NR, Lee IC et. al. Interindividual variability and tissuespecificity in the expression of cytochrome p450 3a mRNA. *Drug Metab Dispos* 2002;30:1108–1114.
675. Patki KC, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5. *Drug Metabolism & Disposition* 2003;31:938–944.
676. Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmöller J, Hustert E, Burk O et. al. Interindividual variability and tissuespecificity in the expression of cytochrome p450 3a mRNA. *Drug Metab Dispos* 2002;30:1108-1114.
677. Kramlinger VM, Rojas MA, Kanamori T, Guengerich FP. Cytochrome P450 3A enzymes catalyze the o6-demethylation of thebaine, a key step in endogenous mammalian morphine biosynthesis. *J Biol Chem* 2015;209:20200–20210.
678. Hardy KD, Wahlin MD, Papageorgiou I, Unadkat JD, Rettie AE, Nelson SD. Studies on the role of metabolic activation in tyrosine kinase inhibitor-dependent hepatotoxicity: induction of CYP3A4 enhances the cytotoxicity of lapatinib in HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 2014;42:162–171.
679. Mouelhi E. Hepatic drug-metabolizing enzymes in primary and secondary tumors of human liver. *M Cancer Res* 1987;47:460–466.
680. Fujitaka K, Oguri T, Isobe T, Fujiwara Y, Kohno N. Induction of cytochrome P450 3A4 by docetaxel in peripheral mononuclear cells and its expression in lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;48:42–46.
681. Hughes SJ, Morse MA, Watkins PB, Guengerich FP, Orringer MB, Beer DG. Cytochromes P450 are expressed in proliferating cells in barrett's metaplasia. *Neoplasia* 1999;1:145–153.
682. Hu JJ, Lee MJ, Vapiwala M, Reuhl K, Thomas PE, Yang CS. Sex-related differences in mouse renal metabolism and toxicity of acetaminophen. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;122:16–26.
683. Hinson JA. Mechanisms of Acetaminophen-Induced Liver Necrosis. *Handb Exp Pharmacol* 2010;196: 369–405.
684. Smart RC, Hodgson E. *Molecular and Biochemical Toxicology*. USA: John Wiley & Sons; 2017.
685. Aguirre AU, Conn M. *Cellular Endocrinology in Health and Disease*. Academic Press; 2014.

686. Niranjani BG, Wilson NM, Jefcoate CR, Avadhani NG. Hepatic mitochondrial cytochrome P450 system. Distinctive features of cytochrome P450 involved in the activation of aflatoxin B1 and benzo(a)pyrene. *J Biol Chem* 1984;259:12495–12501.
687. Honkakoski P, Kojo A, Raunio H, Pasanen M, Juvonen R, Lang MA. Hepatic mitochondrial coumarin 7-hydroxylase: comparison with the microsomal enzyme, *Arch Biochem Biophys* 1988;267:558–567.
688. Marchi S, Paternani S, Pinton P. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 2014;1837:461–469.
689. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM et. al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses *Science* 1998;280:1763–176.
690. Ardail D, Popa I, Bodennec J, Louisot P, Schmitt D, Portoukalian J. The mitochondria-associated endoplasmic-reticulum subcompartment (MAM fraction) of rat liver contains highly active sphingolipid-specific glycosyltransferases. *Biochem J* 2003;371:1013–1019.
691. Williamson CD, Wong DS, Bozidis P, Zhang A, Colberg-Poley AM. Isolation of Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Mitochondria-Associated Membrane and Detergent Resistant Membrane Fractions from Transfected Cells and from Human Cytomegalovirus-Infected Primary Fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol* 2015;68:1-33.
692. Avadhani NG, Sangar MC, Bansal S, Bajpai P. Bimodal targeting of cytochrome P450s to endoplasmic reticulum and mitochondria: the concept of chimeric signals. *FEBS J* 2011;278:4218-4229.
693. Steenbergen C, Zeldin DC, Delozier TC, Kissling GE, Coulter SJ, Dai D et. al. Detection of human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in cardiovascular tissues. *Drug Metab Dispos* 2007;35:682-688.
694. Gonzalez FJ. Molecular genetics of the P450 superfamily. *Pharmacol Ther* 1990;45:1-38.
695. Orhan H. Extrahepatic Targets and Cellular Reactivity of Drug Metabolites. *Current Medicinal Chemistry* 2015;22:408-437.
696. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1973;187:195–202.
697. Luís PB, Rüter JP, Aires CC, Soveral G, de Almeida IT, Duran M et. al. Valproic acid metabolites inhibit dihydrolipoyl dehydrogenase activity leading to impaired 2-oxoglutarate-driven oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2007;1767:1126-1133.

698. Hroudova J, Fisar Z. Activities of respiratory chain complexes and citrate synthase influenced by pharmacologically different antidepressants and mood stabilizers. *Neuro Endocrinol Lett* 2010;31:336-342.
699. Schmidt RH, Jokinen JD, Massey VL, Falkner KC, Shi X, Yin X et. al. Olanzapine activates hepatic mammalian target of rapamycin: new mechanistic insight into metabolic dysregulation with atypical antipsychotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2013;347:126-135.
700. Mueller HS, Antman EM, Ferst JA, Muller JE. Nifedipine in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacotherapy* 1981;1:78-94.
701. Schanzenbächer P, Liebau G, Deeg P, Kochsiek K. Effect of intravenous and intracoronary nifedipine on coronary blood flow and myocardial oxygen consumption. *Am J Cardiol* 1983;51:712-717.
702. Lu J, Cheng K, Zhang B, Xu H, Cao Y, Guo F et. al. Novel mechanisms for superoxide-scavenging activity of human manganese superoxide dismutase determined by the K68 key acetylation site. *Free Radic Biol Med* 2015;85:114-126.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Şanlıurfa'da doğdum. 2007 yılında İzmir 60. Yıl Anadolu Lisesi'nden mezun oldum. Aynı yıl girdiğim Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden 2012 yılında mezun oldum. 2012 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime ve araştırma görevliliği görevime başladım.

Email: egearzuk@gmail.com

