



**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**UZUN DÖNEM TERAPÖTİK DOZDA PARASETAMOL  
(ASETAMİNOFEN) UYGULANAN HAMİLE RATLARIN  
YENİ DOĞAN YAVRULARININ BÖBREK VE KARACİĞERİ  
ÜZERİNDE BETAİN'İN OLASI KORUYUCU ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mete ÖZKOÇ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Güngör KANBAK**

**Ocak-2016**





**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**UZUN DÖNEM TERAPÖTİK DOZDA PARASETAMOL  
(ASETAMİNOFEN) UYGULANAN HAMİLE RATLARIN  
YENİ DOĞAN YAVRULARININ BÖBREK VE KARACİĞERİ  
ÜZERİNDE BETAİN'İN OLASI KORUYUCU ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mete ÖZKOÇ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Güngör KANBAK**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Mete ÖZKOÇ'un Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı “**Uzun dönem terapötik dozda parasetamol (asetaminofen) uygulanan hamile ratların yeni doğan yavrularının böbrek ve karaciğeri üzerinde betain'in olası koruyucu etkileri**” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “**KABUL**” edilmiştir.

Tarih  
05.01.2016

Üye : Prof.Dr.Güngör KANBAK (Danışman)

Üye : Prof.Dr.Özkan ALATAŞ

Üye : Prof.Dr.Sema USLU

Üye : Doç.Dr.Hakan ŞENTÜRK

Üye : Yrd.Doç.Dr.Fahrettin AKYÜZ

08/01/2016 tarih ve 1073.../5033. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ  
Enstitü Müdürü

## Özet

Dünyada yaygın olarak kullanılan analjezik ve antipiretiklerin başında Parasetamol (PARA) gelmektedir. Özellikle hamilelikteki orta ve hafif şiddetli ağrılarda önerilebilmesi en muhtemel ağrı kesicidir. PARA'nın başta karaciğer ve böbrek gibi dokularda oluşturabileceği toksisite bilinmektedir. Çalışmamızda uzun dönem PARA uyguladığımız hamile ratların yeni doğan yavrularındaki hepatotoksisite ve nefrotoksistide antioksidan özellikli Betainin koruyucu rolünü araştırdık.

Çalışmamızda; Kontrol, PARA ve PARA+Betain grupları oluşturduk. Gruplardaki annelere sperm gözlemlendiği günün ertesi gününden başlayarak doğumun olacağı güne (ortalama 21 gün) kadar maddeleri gavaj yolu ile uyguladık. Kontrol grubu için 2 ml serum fizyolojik (%0,09 NaCl çözeltisi), PARA grubu için 30 mg/kg/gün Parasetamol, PARA+Betain grubu için sırasıyla 30 mg/kg/gün ve 800 mg/kg/gün Betain uygulandı. Doğumun olduğu gün yeni doğan yavrular eter altında bayıldıktan sonra dekapite edilmiştir. 8 adet yavrunun böbrek ve karaciğer dokusunda MDA (malondialdehit), GSH (redükte glutatyon), NO (nitrik oksit), PON (paraoksanaz) ve ARE (arilesteraz) ölçümleri ve 5 adet yavrunun karaciğer ve böbrek örneklerinde ise histolojik çalışmalar yapılmıştır.

Biyokimyasal bulgularımız, Parasetamolun; karaciğer ve böbrek MDA ve NO düzeylerinde anlamlı bir artışa sebep olduğunu, GSH düzeylerinde belli bir oranda düşüşün olduğunu ancak anlam ifade etmediğini, PON aktivitesinin ise anlamlı düzeyde düştüğünü ve buna karşılık karaciğer ve böbrek ARE aktivitelerinde düşüşün olduğunu ancak anlam ifade etmediğini gösterdik. MDA ve NO düzeylerindeki anlamlı artışın ve PON düzeylerindeki anlamlı düşüşün karaciğer ve böbrekte oluşan toksisitenin varlığından söz etmemize yardımcı olmaktadır. Histolojik bulgularımız ise biyokimyasal parametrelerimizi destekler niteliktedir.

Uzun dönem terapötik dozda Parasetamol uygulanan grupta oluşan hepatotoksisite ve nefrotoksisteye karşı uyguladığımız antioksidan özellikli ve iyi bir metil donörü olup hücre içi trans sülfürasyon reaksiyonlarında önemli bir basamağa sahip olan Betainin toksisiteyi bir miktar engelleyebileceğini hem biyokimyasal parametreler hem de histolojik bulgular yardımı ile araştırdık.

**Anahtar Kelimeler:** Parasetamol, Hamilelik, Paraoksanaz ve Arilesteraz, Yenidoğan, Betain

## Summary

Paracetamol (PARA), which is antipyretic and analgesic, is widely used around the world. Paracetamol can be recommended for moderate or mild pains especially in pregnancy as an analgesic. It is known that, paracetamol can cause hepatotoxicity or nephrotoxicity. We aim that in this present study to show potential protective effect of Betaine against hepatotoxicity and nephrotoxicity which can be formed in long term paracetamol using at therapeutic doses.

It has been prepared 3 groups, control, PARA and PARA+Betain groups. Paracetamol and Betaine was administered by gavage to pregnant rats, from first day to the last day of pregnancy (aprox. 21 day). 2 ml physiological saline (%0,9 NaCl solutions), 30 mg/kg/day Paracetamol, 30 mg/kg/day Paracetamol and 800 mg/kg/day Betain was given by orally to control, PARA and PARA+Betain groups respectively. The day of the birth, newborn rats anesthetized by ether and after decapitated. 8 newborn rat's liver and kidney tissues used for biochemical analysis (Malondialdehyde(MDA), Reduced Glutathione (GSH), Nitric Oxide (NO) and Paraoxonase-Arylesterase (PON-ARE)) and 5 rat's liver and kidney tissues used for histological studies.

We showed that, MDA and NO levels was significantly increased, while PON activities decreased. On the other hand GSH levels and ARE activities was decreased but these decline wasn't significant in the liver and kidney PARA group. These biochemical results helps us to hepatotoxicity and nephrotoxicity in neonates which can be formed in long term maternal paracetamol using at therapeutic doses. Also our histological findings was support these biochemical results.

We used Betaine against potential hepatotoxic and nephrotoxic effect of long term maternal Paracetamol using at therapeutic doses for neonates. Betaine has antioxidant properties and also used as a methyl donor for transsulfuration reactions in the cell. Our biochemical and histological examinations showed that Betaine protected the tissue injury.

**Key Words:** Paracetamol, Pregnancy, Paraoxonase and Arylesterase, Newborn, Betaine.

# İçindekiler

<b>ÖZET</b> .....	<b>V</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>VI</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>VII</b>
<b>TABLO DİZİNİ</b> .....	<b>IX</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	<b>X</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>XII</b>
<b>1 GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2 GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1 OKSİDATİF STRES .....	3
2.1.1 Serbest radikallerin tanımı .....	3
2.1.2 Reaktif oksijen türleri (ROT) .....	3
2.1.2.1 Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	3
2.1.2.2 Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) .....	4
2.1.2.3 Hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) .....	4
2.1.3 Nitrik Oksit (NO) .....	5
2.1.3.1 Nitrik oksit sentezi .....	5
2.1.4 Lipit peroksidasyonu .....	6
2.1.4.1 Malondialdehit (MDA) .....	8
2.2 PARASETAMOL (ASETAMİNOFEN) .....	9
2.2.1 Parasetamolün yapı ve özellikleri .....	9
2.2.2 Parasetamolün Metabolizması ve Toksik Etkisi .....	10
2.2.3 Parasetamolün Oksidatif Stres İle İlişkisi .....	12
2.3 HAMİLELİKTE PARASETAMOL KULLANIMI .....	14
2.4 BETAİN (TRİMETİL GLİSİN) .....	15
2.4.1 Betainin Yapısı ve Özellikleri .....	15
2.4.2 Betain Metabolizması .....	15
2.5 ANTİOKSİDAN SAVUNMA .....	17
2.5.1 Glutasyon .....	17
2.5.2 Paraoksonaz (PON) ve Arilesteraz (ARE) .....	19

<b>3</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>21</b>
3.1	DENEY HAYVANLARININ TEMİN VE BAKIMI.....	21
3.2	HAMİLELİĞİN ANLAŞILMASI, DENEY GRUPLARI VE MADDE UYGULANMASI.....	21
3.2.1	<i>Hamileliğin Anlaşılması .....</i>	<i>21</i>
3.2.2	<i>Deney Grupları ve Madde Uygulanması .....</i>	<i>23</i>
3.3	CERRAHİ İŞLEMLER .....	24
3.4	DOKU MDA DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ.....	24
3.5	DOKU GSH DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ .....	26
3.6	DOKU NO DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ .....	29
3.7	DOKU PARAOKSONAZ VE ARİLESTERAZ AKTİVİTELERİNİN ÖLÇÜMÜ.....	32
3.8	DOKU TOTAL PROTEİN ÖLÇÜMÜ.....	35
3.9	KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDA YAPILAN HİSTOLOJİK İŞLEMLER .....	36
3.10	İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	37
<b>4</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>38</b>
4.1	BİYOKİMYASAL BULGULAR .....	38
4.1.1	<i>Karaciğer MDA bulguları.....</i>	<i>38</i>
4.1.2	<i>Böbrek MDA bulguları .....</i>	<i>39</i>
4.1.3	<i>Karaciğer GSH bulguları.....</i>	<i>40</i>
4.1.4	<i>Böbrek GSH bulguları .....</i>	<i>41</i>
4.1.5	<i>Karaciğer NO bulguları.....</i>	<i>42</i>
4.1.6	<i>Böbrek NO bulguları .....</i>	<i>43</i>
4.1.7	<i>Karaciğer PON ve ARE bulguları .....</i>	<i>44</i>
4.1.8	<i>Böbrek PON ve ARE bulguları.....</i>	<i>46</i>
4.2	HİSTOLOJİK BULGULAR.....	48
4.2.1	<i>Karaciğer Dokusunda Histolojik Bulgular .....</i>	<i>48</i>
4.2.2	<i>Böbrek Dokusunda Histolojik Bulgular.....</i>	<i>51</i>
<b>5</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>63</b>
	<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>64</b>



## Tablo Dizini

<b>Tablo 3.1.</b> MDA ölçüm prosedürü. ....	25
<b>Tablo 3.2.</b> GSH ölçüm prosedürü. ....	28
<b>Tablo 3.3.</b> NO ölçüm prosedürü. ....	30
<b>Tablo 3.4.</b> PON aktivitesi ölçüm prosedürü. ....	33
<b>Tablo 3.5.</b> ARE aktivitesi ölçüm prosedürü. ....	34
<b>Tablo 4.1.</b> Karaciğer MDA düzeyleri.....	38
<b>Tablo 4.2.</b> Böbrek MDA düzeyleri. ....	39
<b>Tablo 4.3.</b> Karaciğer GSH bulguları. ....	40
<b>Tablo 4.4.</b> Böbrek GSH bulguları.....	41
<b>Tablo 4.5.</b> Karaciğer NO bulguları. ....	42
<b>Tablo 4.6.</b> Böbrek NO bulguları.....	43
<b>Tablo 4.8.</b> Böbrek PON ve ARE bulguları. ....	46

## Şekil Dizini

<b>ŞEKİL 2.1.</b> L-ARGİNİN SİTRULİNE DÖNÜŞÜMÜ SIRASINDA NO'İN OLUŞUMU (BRUCKDORFER, 2005). .....	6
<b>ŞEKİL 2.2.</b> LİPİT PEROKSİDASYONU (GUTTERIDGE, 1995). .....	7
<b>ŞEKİL 2.3.</b> MALONDİALDEHİT (MDA) (GUERAUD VD., 2010). .....	8
<b>ŞEKİL 2.4.</b> 2 MOL TBA İLE 1 MOL MDA'NIN OLUŞTURDUĞU PEMBE RENKLİ BİRLEŞİK (SANS & CHOZAS, 1998). .....	9
<b>ŞEKİL 2.5.</b> PARASETAMOL MOLEKÜLER FORMÜLÜ (GRAHAM & SCOTT, 2005). .....	10
<b>ŞEKİL 2.6.</b> PARASETAMOLUN METABOLİK YOLAKLARI (GRAHAM, SCOTT, & DAY, 2005). .....	11
<b>ŞEKİL 2.7.</b> PARASETAMOLÜN MİTOKONDİRİ ÜZERİNDEN OLUŞTURDUĞU TOKSİSİTE (JAESCHKE VD., 2011). .....	13
<b>ŞEKİL 2.8.</b> BETAİNİN MOLEKÜLER FORMÜLÜ (CRAIG, 2004). .....	15
<b>ŞEKİL 2.9.</b> BETAİN METABOLİZMA YOLAKLARI (LEVER & SLOW, 2010). .....	16
<b>ŞEKİL 2.10.</b> METİYONİN/GLUTATYON BİYOSENTEZ YOLAĞI (LIU VD., 2010). .....	17
<b>ŞEKİL 2.11.</b> GLUTATYONUN KİMYASAL YAPISI (KIDD, 1997). .....	18
<b>ŞEKİL 2.12.</b> REDÜKTE/OKSİDE GLUTATYON DÖNGÜSÜ (KIDD, 1997). .....	18
<b>ŞEKİL 3.1.</b> VAGİNAL SMEAR UYGULANMASI. ....	22
<b>ŞEKİL 3.2.</b> SIÇAN SPERMİ (X60 BÜYÜTME). .....	22
<b>ŞEKİL 3.3.</b> HAMİLE SIÇANLARA MADDE UYGULANMA SÜRECİNİ GÖSTEREN SKALA. ....	23
<b>ŞEKİL 3.4.</b> MDA STANDART GRAFİĞİ. ....	26
<b>ŞEKİL 3.5.</b> GSH STANDART GRAFİĞİ. ....	28
<b>ŞEKİL 3.6.</b> NO STANDART GRAFİĞİ. ....	31
<b>ŞEKİL 3.7.</b> PROTEİN STANDART GRAFİĞİ. ....	36
<b>ŞEKİL 4.1.</b> KARACİĞER MDA DÜZEYLERİ. ....	38
<b>ŞEKİL 4.2.</b> BÖBREK MDA DÜZEYLERİ. ....	39
<b>ŞEKİL 4.3.</b> KARACİĞER GSH BULGULARI .....	40
<b>ŞEKİL 4.4.</b> BÖBREK GSH BULGULARI. ....	41
<b>ŞEKİL 4.5.</b> KARACİĞER NO DÜZEYLERİ. ....	42
<b>ŞEKİL 4.6.</b> BÖBREK NO BULGULARI. ....	43
<b>ŞEKİL 4.7.</b> KARACİĞER PON BULGULARI. ....	45

<b>ŞEKİL 4.8.</b> KARACİĞER ARE BULGULARI. ....	45
<b>ŞEKİL 4.9.</b> BÖBREK PON BULGULARI. ....	47
<b>ŞEKİL 4.10.</b> BÖBREK ARE BULGULARI. ....	47
<b>ŞEKİL 4.11.</b> KONTROL GRUBU HİSTOLOJİK GÖRÜNTÜSÜ (HE, SKALA BAR: 100µM, X20). .....	48
<b>ŞEKİL 4.12.</b> PARASETAMOL GRUBUNUN HİSTOLOJİK GÖRÜNTÜSÜ (HE, SKALA BAR: 100µM, X20).....	49
<b>ŞEKİL 4.13.</b> PARA+BETAİN GRUBUNUN HİSTOLOJİK GÖRÜNTÜSÜ (HE, SKALA BAR: 100µM, X20).....	50
<b>ŞEKİL 4.14.</b> KONTROL GRUBUNUN HİSTOLOJİK GÖRÜNTÜSÜ (HE, SKALA BAR: 100µM, X20). ....	51
<b>ŞEKİL 4.15.</b> PARASETAMOL GRUBUNUN HİSTOLOJİK GÖRÜNTÜSÜ (HE, SKALA BAR: 100µM, 50.0µM, X20, X40). ....	52
<b>ŞEKİL 4.16.</b> PARA+BETAİN GRUBUNUN HİSTOLOJİK GÖRÜNTÜSÜ (HE, SKALA BAR: 200µM, 100µM, X10 X20). ....	53

## **Simge ve Kısaltmalar Dizini**

AA: Araşidonik Asit

AIF: Apoptoz Uyarıcı Faktör

ARE: Arilesteraz

BH4: Tetrahidro biyoprotein

BHMT: Betain Homosistein Metil Transferaz

BSA: Sığır Serum Albumini

CAT: Katalaz

Ca<sup>+2</sup>: Kalsiyum

DHA: Dokozahekzaenoik Asit

DTNB: 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit

EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit

Fe<sup>+3</sup>: Demir

FMN: Flavin mononükleotid

FAD: Flavin adenin dinükleotid

GSH: Redükte Glutatyon

GSSG: Okside Glutatyon

GPx: Glutatyon peroksidaz

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit

HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

HE: Hematoksilen Eozin

JNK: c-jun-N-terminal kinaz

LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

LPO: Lipit peroksidasyonu

L<sup>·</sup> : Lipit Radikali

LOO<sup>·</sup>: Lipit peroksil radikali

LOOH: Lipit Peroksil

MDA: Malondialdehit

NSAİD: Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaç

NAPQI: N-asetil-p-benzokinon imin

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz  
nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz  
NADP: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat  
NO: Nitrik Oksit  
N<sub>2</sub>O: Azot oksit  
NO<sub>2</sub>: Azot dioksit  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Süperoksit Radikali  
OH<sup>-</sup>: Hidroksil radikali  
O<sub>2</sub>: Oksijen  
ONOO<sup>-</sup>: Peroksinitrit Radikali  
PARA: Parasetamol  
PON: Paraoksonaz  
PUFAs: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri  
ROT: Reaktif Oksijen Türleri  
SOD: Süperoksit Dismutaz  
-SH: Sülfidril grubu, Tiyol  
SAM: s-adenozil metiyonin  
SDS: Sodyum dodesil sülfat  
TBA: Tiyobarbitürik Asit  
L: Litre  
ml: Mililitre  
nmol: Nanomol  
µl: Mikrolitre  
µmol: Mikromol  
µg: Mikrogram

# 1 GİRİŞ VE AMAÇ

Ağrı hamilelerde sık sık rastlanan bir durumdur. Hamilelikte ortaya çıkabilecek bu ağrılarda ağrı kesicilere başvurulabilmektedir. Ağrı kesiciler basit ilaçlar olmayıp hamilelik sürecinde plasenta yolu ile fetüse geçebilmektedir. Plasental yolla geçen ağrı kesici toksik dozlarda ya da uzun süre alımda fetüs üzerinde ciddi sorunlara neden olabilmektedir. Aynı zamanda annelerde de birçok sorun ortaya çıkabilmektedir. Gebeliğin her döneminde kısa süreli olmak kaydı ile terapötik dozlarda analjezik ve antipiretik olarak parasetamol kullanılabilir (Şavlı, 2012).

Parasetamol; zayıf bir asit olup fizyolojik pH aralığında noniyonize olarak bulunur, zayıf bir şekilde plazma proteinlerine bağlanır ve kan-beyin bariyeri ile plasentayı geçer. Anneden bebeğe lipitte çözünür maddelerin geçişi plasental kan akımı ile doğru orantılı olmaktadır (Arana vd., 2001).

Parasetamolun küçük bir kısmı değişmeden vücuttan atılırken büyük bir kısmı ise büyük oranda karaciğerde ve belli bir oranda böbreklerde biyotransformasyona uğrayarak atılır. Parasetamol sülfat ve glukuronid konjugasyonu olarak atılmakla birlikte bir kısmı reaktif bir metaboliti olan n-asetil-p-benzokinonimine (NAPQI)'e dönüşmektedir. NAPQI karaciğerde sitokrom P450 sisteminde Parasetamolun metabolize edilmesi sırasında oluşmaktadır [(Prescott, 1980); (Küçükardalı vd., 2002); (Pacifici & Allegarert, 2015)].

NAPQI temel olarak -SH grubu içeren yapılara bağlanma eğilimindedir bu yüzden NAPQI oluşurkenden hızlı bir şekilde özellikle hücresel GSH'a bağlanır ve bu yolla detoksifiye edilir (Graham vd., 2005). Hücre içinde azalan GSH düzeyleri artan NAPQI miktarına cevap veremez düzeye geldiğinde parasetamolun reaktif bir metaboliti olan NAPQI, diğer -SH içeren hücresel proteinlere bağlanarak hücresel hasarın gelişmesine neden olmaktadır.

Sitokrom P450 tarafından metabolize edilen Parasetamol aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin de oluşmasına neden olur. Hidrojen peroksit ve süperoksit radikali Parasetamol metabolizması sonucu oluşan ürünlerdir. Oluşan NAPQI bir çok proteinle birlikte mitokondriyal proteinlere de bağlanmaktadır. Mitokondri matriksinde süperoksit radikalleri NO ile birleşerek daha reaktif bir ürün olan peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) radikali oluşur. Mitokondri içerisinde genişleyip yayılan oksidatif stres mitokondri membranının permeabilitesinde bozukluğa neden olarak mitokondriyal faktörlerin (Endonükleaz G, Apoptoz Uyarıcı Faktör, Sitokrom C) hücre içine salınımını tetikler (Jaeschke vd., 2011). Parasetamolun metabolizması sonucu oluşumu artan süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroksil

radikalleri lipitlerle reaksiyona girerek lipit peroksidasyonunu (LPO) başlatırlar (James vd., 2003).

Betain hücre içi birçok strese karşı önemli derecede koruma sağlamaktadır. Betain aynı zamanda birçok kimyasal yolakta meydana gelen trans metilasyon reaksiyonlarına metil donörü olarak katılır (McCue & Hanson, 1992). Memelilerde kolin 2 basamakta Betaine dönüştürülür. Bu dönüşüm mitokondri içerisinde mitokondriyal enzimlerce gerçekleştirilir. Betain homosistein metil transferaz (BHMT) homosisteinden metiyonin oluşumu sırasında Betainden metil grubu sağlar (Lever & Slow, 2010).

Yine prokürsör olarak Betainin kullanıldığı ve BHMT enzimi aracılığı ile meydana gelen bir başka reaksiyon zincirinde hücre içi kuvvetli bir antioksidan olan GSH sentezlenmektedir. Burada homosistein Betainden metil grubu alarak metiyonine dönüşmektedir. Metiyonin hücrede s-adenozil metiyonine (SAM) ve SAM de birkaç reaksiyon sonunda GSH'un oluşmasını sağlayacak hücrede sistein düzeylerinin artmasına sebep olur. Bu durum Betain'in antioksidan özelliğini açıklar (Liu vd., 2010).

Özellikle Amerika Birleşik Devletler'i olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde Parasetamol hamilelik sırasında bilinçsizce kullanılmaktadır. Terapötik dozlarda alınsa bile uzun süre Parasetamol kullanımının hem maternal hem de fetal hasara sebep olabileceği bilinmektedir. Bizde tez çalışmamızda Parasetamol ile oluşturmayı hedeflediğimiz hepatotoksisite ve nefrotoksisitenin önlenmesinde Betainin olası koruyucu etkilerini araştırmayı hedefledik. Bu amaçla *Sprague-Dawley* türü dişi sıçanlar hamile bırakılmıştır ve E1-E21 (Hamileliğin 1. gününden 21. gününe kadar) kontrol, PARA ve PARA+Betain gruplarına ayrı ayrı serum fizyolojik, serum fizyolojikde çözülmüş Parasetamol ve Betain uygulanmıştır ve doğum olduğu gün yeni doğanların karaciğer ve böbreklerinde etkisine bakılmıştır. Oluşan toksisiteyi göstermek adına MDA, GSH ve NO düzeylerine ve PON ve ARE aktiviteleri biyokimyasal parametreler olarak ayrı ayrı karaciğer ve böbrekte incelenmiştir. Biyokimyasal parametrelerimizi desteklemek adına böbrek ve karaciğer doku kesitlerinin ışık mikroskopisi de yapılmıştır. Bu süreçte Parasetamolun olası oluşturabileceği hepato ve nefrotoksisitede Betainin potansiyel koruyucu özelliğe sahip olup olmadığı hem biyokimyasal parametreler hem de histolojik görüntülerle araştırılması hedeflenmiştir.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Oksidatif Stres

Oksidatif stres hücre içerisindeki oksidan dengenin bozulmasıdır. Hücre içerisinde bu denge bozulduğunda serbest radikallerin düzeyi artmakta ve hücre içi çeşitli moleküllere bağlanarak oksidatif stresi meydana getirmektedir (Çakatay & Kayalı, 2006).

#### 2.1.1 Serbest radikallerin tanımı

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran reaktif atom veya moleküllerdir. Serbest radikallerin biyolojik önemi çeşitli dokularda hasara sebep olmasından kaynaklanmaktadır. Serbest radikal üretimindeki artış, azalan antioksidan savunma ile birleşince birçok hasarın meydana gelmesi kaçınılmaz olur (Chabot, Mitchell, Gutteridge, & Evans, 1998).

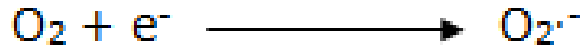
Serbest radikal denilince; insan vücudunda moleküler oksijenin kullanılma oranı ve dağılımı çok yüksek olduğundan ilk akla reaktif oksijen türleri gelmektedir (Weight, Bell, & Nicholson, 1996).

Serbest radikaller oldukça dayanıksız ve aynı zamanda reaktif moleküller olup, son yörüngelerinde serbest halde buldukları elektronları sayesinde hücre içerisindeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif stres (hasar) meydana getirirler. Serbest radikaller normal hücrenin kendi metabolizması sırasında oluşabileceği gibi diğer dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilmektedir (Çakatay & Kayalı, 2006).

#### 2.1.2 Reaktif oksijen türleri (ROT)

##### 2.1.2.1 Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )

Normal aerobik metabolizmanın bir ürünü olan süperoksit radikali moleküler oksijenin ( $O_2$ ) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Süperoksit radikali çok iyi ve zayıf bir oksitleyici molekül olup reaktivitesi büyük ölçüde oluşturulduğu yerdeki çevresel koşullara bağlıdır (Chabot vd., 1998).

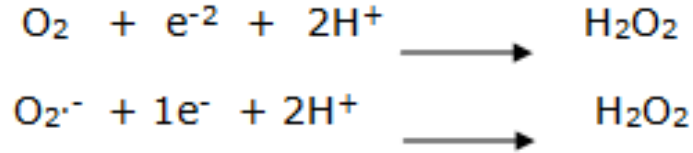


Süperoksit hızlı bir şekilde süperoksit dismutaz (SOD) enzimi sayesinde ya da hücresel nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek inaktive edilir (Chabot vd., 1998).

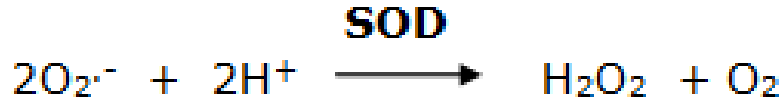


### 2.1.2.2 Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hidrojen peroksit, genellikle ökaryotik hücre peroksizomlarında bir kaç oksidazın katalizlediği reaksiyonda iki mol O<sub>2</sub>'nin indirgenmesi ile oluşur (Farber, 1994). Ayrıca süperoksit radikalinin bir elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton ile (H<sup>+</sup>) ile birleşmesi sonucu oluşur (Şahin, 2011).



Ayrıca iki mol süperoksit anyonu SOD enziminin kataliziyle moleküler oksijeni ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi oluşturmaktadır. Bu yüzden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süperoksit radikalinin olduğu hemen hemen her yerde ve her koşulda oluşmaktadır (Farber, 1994).



### 2.1.2.3 Hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin oksijen bağları bir elektron eklenmesi ile koparılabilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Fenton reaksiyonu ile nispeten zararsız olan hidroksit anyonuna ve oldukça reaktif hidroksil radikale dönüşür (Farber, 1994) (Bruckdorfer, 2005).



### 2.1.3 Nitrik Oksit (NO)

NO var olan birçok azot oksit gruplarından biridir. Bunlardan en iyi bilineni anesteziye özelliklere sahip olan ve gülme gazı olarak da bilinen N<sub>2</sub>O (Azot oksit)'dir. Görünmez bir gaz olan NO aynı zamanda bir serbest radikal olup, diğer serbest radikaller ile reaksiyona girebilir, yine bir kahverengi gaz olan NO<sub>2</sub> (Azot dioksit) radikalini oluşturmak üzere moleküler oksijenle reaksiyona girebilir (Bruckdorfer, 2005).

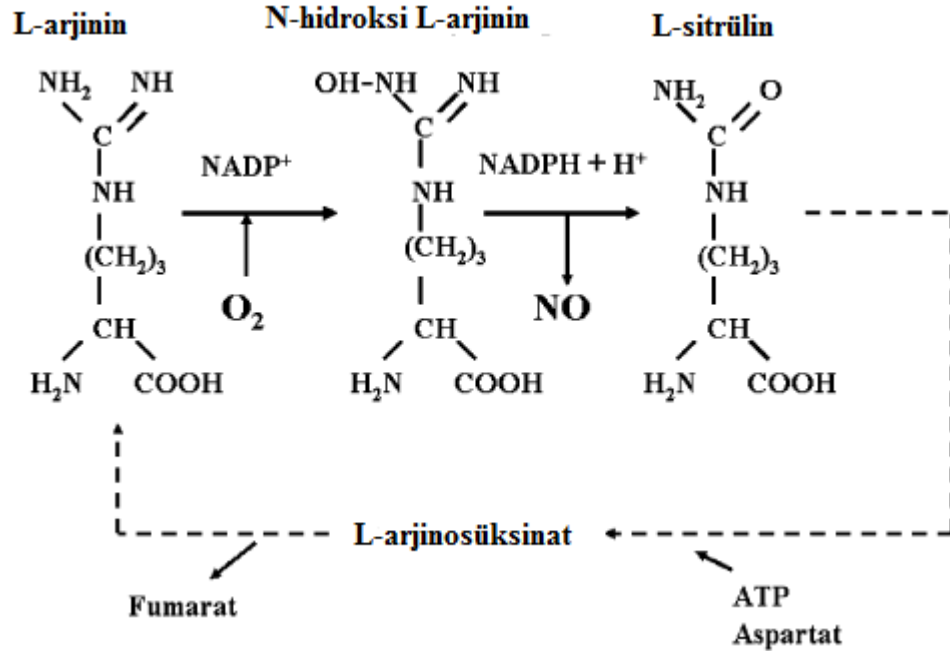


Nitrik oksit (NO) oksijen içeren bir serbest radikal olmakla birlikte O<sub>2</sub> gibi hem esansiyel hem de toksiktir. NO tek bir elektrona sahip olup Fe<sup>+3</sup> gibi tek elektron içeren diğer bileşiklere bağlanır. Düşük konsantrasyonlarda fizyolojik olarak nörotransmitter ve vazodilatasyona neden olan bir hormon olarak görev yapar. Yüksek konsantrasyonlarda ise toksik türlere dönüşmek üzere O<sub>2</sub> ve süperoksitle birleşir (Çekmen, Turgut, Türköz, Aygün, & Gözükara, 2001).

#### 2.1.3.1 Nitrik oksit sentezi

NO, oksijen varlığında her bir hücrede farklı olarak bulunan nitrik oksit sentazların izoenzimleri tarafından L-Arjinin kullanılarak oluşturulur. Endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) sürekli olarak aktif bulunurlar ve düşük miktarlarda NO üretirler. Kalsiyum bağımlı olan indüklenebilir NOS (iNOS), bazı sitokinler ve bakteriyel polisakkaritler gibi faktörlerin altında makrofajlarda, nötrofillerde, mikroglial ve astroglial hücrelerde ifade edilir (Litvinova, et al., 2015).

NO biyosentezinin gerçekleşmesi için substrat olarak L-arjinin ve oksijene ihtiyaç duyulur. Aynı zamanda tetrahidrobiyoprotein (BH<sub>4</sub>), NADPH, Ca<sup>+2</sup>, kalmodulin, flavin mono nükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD)'e de ihtiyaç duyulur (Şekil 2.1.). Nitrik oksit sentezi, plazma membranında, sitoplazmada, nukleus, düz endoplazmik retikulum ve hücrelerin mitokondrisinde gerçekleşmektedir. Bu sentez işlemi 3 farklı NOS izoenzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Hücreler herhangi bir immunolojik uyarıcı ile uyarıldığında bir çok hücrede iNOS oldukça yüksek miktarlarda ekspresyona edilir ve oluşturulan iNOS geniş ölçüde NO üretilmesini sağlar (Jobgen, Fried, Fu, Meininger, & Wu, 2006).



**Şekil 2.1.** L-Arginin sitruline dönüşümü sırasında NO'nin oluşumu (Bruckdorfer, 2005).

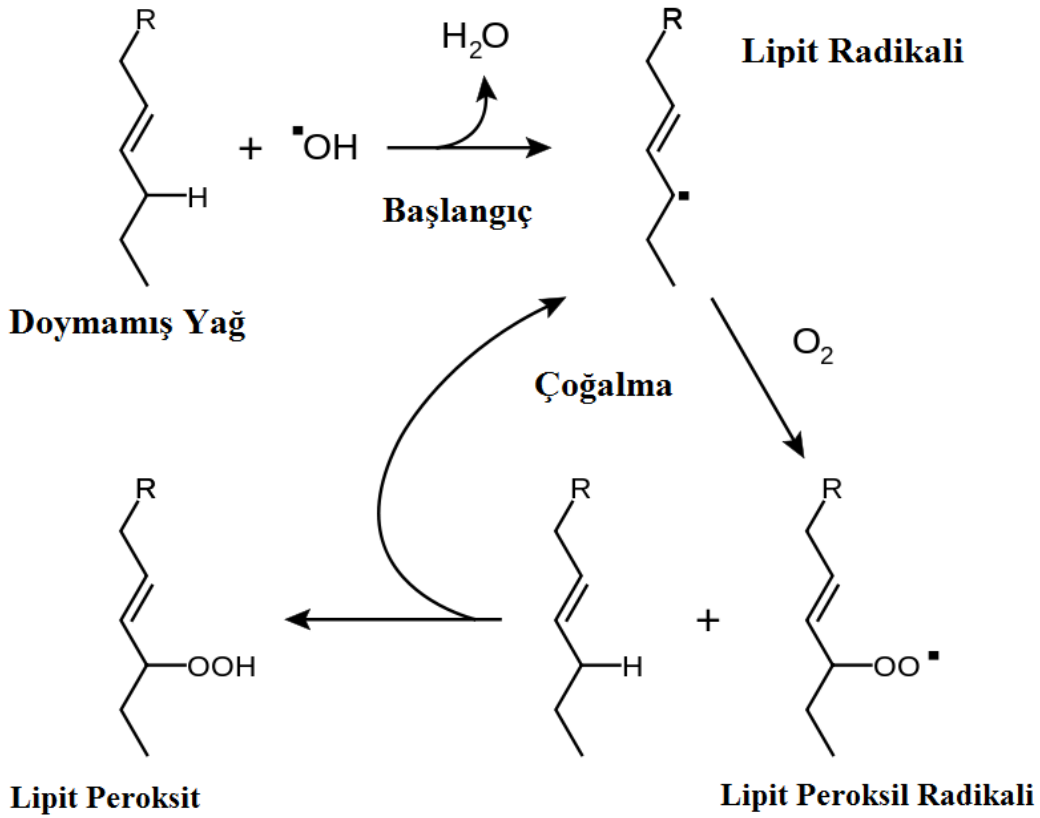
NO'un süperoksit anyonu ile reaksiyonu sonucunda meydana gelen ve oldukça aktif bir oksijen radikali olan peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) meydana gelmektedir. Toksik bir molekül olan peroksinitrit radikali hücre içerisinde önce hücre zarı lipitlerini oksitleyerek lipit peroksidasyonundaki artışa ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu bilgi çerçevesinde çeşitli yollarla NOS inhibe ederek NO'nin meydana getirebileceği olası hasarlar engellenmiş olabilir. NOS inhibitörü olarak yaygın kullanılanlar N-nitro-L- arginin (L-NA), bunun metil türevi olan N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) ve N-iminometil-L-ornitin (L-NIO)'dir (Atakişi, Atakişi, Atabay, & Uzun, 2009).

#### **2.1.4 Lipit peroksidasyonu**

Reaktif oksijen türleri hücre membranında bulunan kolesterol ve doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipit reaksiyonunu başlatırlar (Halliwell & Gutteridge, 1984). Bu da hücre lipit çift katlı tabakanın geçirgenliğinde ve akışkanlığında bir bozukluğa ve sonra hücre bütünlüğünün önemli derecede değişmesine neden olur. Lipit peroksidasyonu (LPO);

hücrel hasarın gelişmesinde etkili bir süreç olarak bilinir (Gueraud vd., 2010).

Lipit peroksidasyonu farklı mekanizmalarla gerçekleşir ve aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir; enzimatik, enzimatik-radikal kaynaklı olmayan peroksidasyon ve enzimatik olmayan serbest radikal aracılı peroksidasyon. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFAs) enzimatik olmayan serbest radikal aracılı peroksidasyonu yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. LPO'nun karmaşıklığı sonuçta oluşabilen birçok bileşenine dayanmaktadır. Temel bileşeni olan lipit hidroperoksitleri kararsızdır ve daha stabil ancak reaktif ve toksik ikincil bileşenlere ayrışır (Gueraud vd., 2010).



**Şekil 2.2.** Lipit peroksidasyonu (Gutteridge, 1995).

Temelde 3 evrede gerçekleşen lipit peroksidasyonunun ilk evresinde bir hidroksil radikali ile tepkimeye giren lipit bir su çıkışı ile lipit radikalini meydana getirir ( $\text{L}\cdot$ ). 2. evrede lipit radikali aerobik solunum yapan hücrelerde moleküler oksijenle reaksiyona girer ve lipit peroksil radikali oluşur ( $\text{LOO}\cdot$ ). Son evrede ise bir başka doymamış lipit ile reaksiyona girer ve

bir hidrojeni ortaklanmamış elektrona bağlayarak lipit peroksit (LOOH) oluşur (Şekil 2.2.). Böylece tek bir başlatıcı etkisiyle yüzlerce yağ asidi zincirinin hidroperoksitlere dönüşümü gerçekleşebilmektedir. Lipit peroksidasyonu geri dönüşümsüz bir hasara sebep olur (Gutteridge, 1995).

Lipit peroksitlerin yıkımından oluşan ürünlerden birisi malondialdehittir (MDA). Tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyon veren MDA lipit peroksidasyonun en önemli göstergelerinden biridir (Gutteridge, 1995).

Lipit peroksidasyonu hücre membranının fizyolojik yapısını ve özelliklerini değiştirerek membran bütünlüğünü bozar ve böylece hücre membranında fonksiyonel bozukluklar ortaya çıkar.

#### 2.1.4.1 Malondialdehit (MDA)

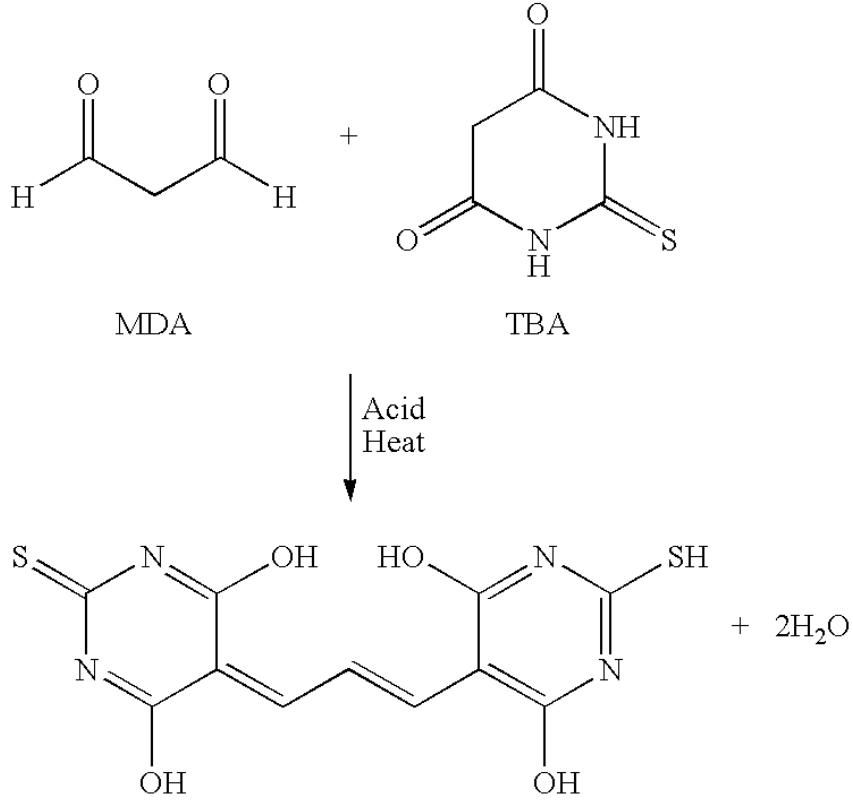
Araşidonik asit (AA) ve dokosahekzaenoik asit (DHA) gibi en az 3 tane çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan bir üründür (Şekil 2.3.) (Gueraud vd., 2010)



**Şekil 2.3.** Malondialdehit (MDA) (Gueraud vd., 2010).

Oluşan MDA, birçok hasara sebep olabilmektedir. Başta membran bütünlüğünü bozarak membrandan iyon alış verişinin bozulmasına sebep olur. Ayrıca oluşan MDA'nın aldehit grubu DNA'nın azot içeren bazlarıyla reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkiler yaratabilir [(Niki, 1987); (Placer, Cushman, & Johnson, 1990); (Porter, 1984)].

Tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyon veren ve lipit peroksidasyonun bir ürünü olan MDA, bilirubin gibi maddeler de TBA ile reaksiyon verdiği için LPO (lipit peroksidasyonu) düzeyi TBARs olarak ifade edilir (Knight, Pieper, & McClellan, 1988). Kısa zincirli bifonksiyonel bir aldehit olan MDA, iki aldehit grubu ile birer amino grubuna bağlanarak schiff bazını oluşturmaktadır (Horton & Fairhurst, 1987). Ayrıca MDA iki molekül TBA ile reaksiyona girerek (Şekil 2.4.) spektrofotometrede 512 nm'de okunabilen pembe renkli bir bileşik oluşturur (Sans & Chozas, 1998).

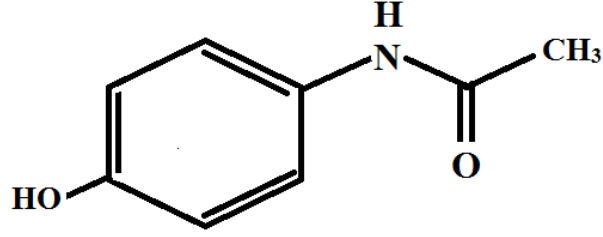


**Şekil 2.4.** 2 mol TBA ile 1 mol MDA'nın oluşturduğu pembe renkli birleşik (Sans & Chozas, 1998).

## 2.2 Parasetamol (Asetaminofen)

### 2.2.1 Parasetamolün yapı ve özellikleri

Parasetamol (N-asetil-p-aminofenol, Asetaminofen) reçetesiz satılan, analjezik ve antipiretik olarak kullanılan bir ilaçtır. Hafif veya orta şiddetli ağrı ve ateşlerde tedavi için en sık başvuru yapılan parasetamol yeni doğanlarda dahi kullanılabilir. Parasetamol farklı yollarla kullanılabilir (oral, rektal ve intravenöz) (Pacifi & Allegaert, 2015). Moleküler formülü C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>'dir (Şekil 2.5.). Moleküler ağırlığı 151.7, erime noktası 169<sup>0</sup>C, yoğunluğu 1.263 g/cm<sup>3</sup> olup sudaki çözünürlüğü 1.4 gr/ 100 ml'dir (Bozoğluer, 2009).



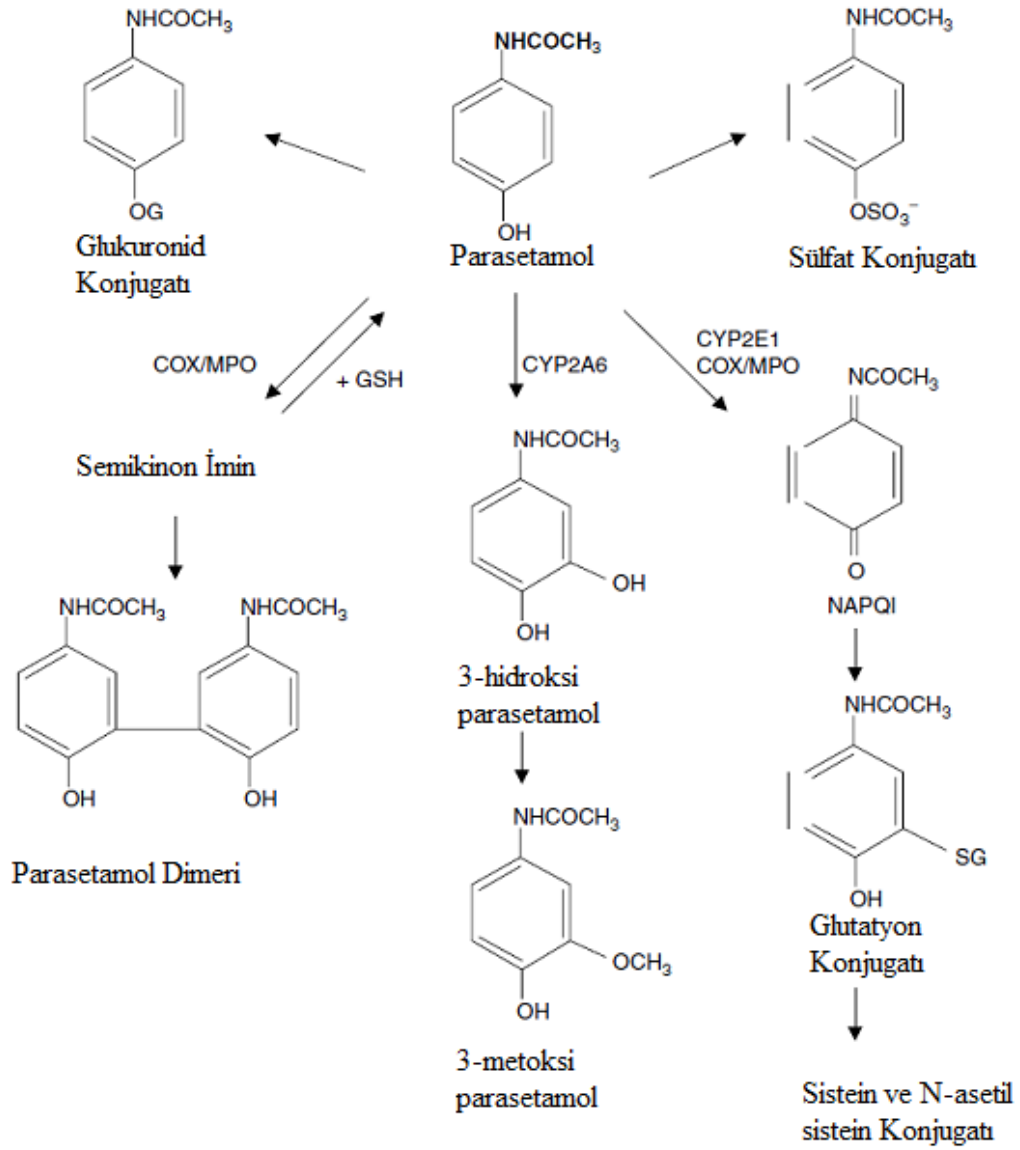
**Şekil 2.5.** Parasetamol moleküler formülü (Graham & Scott, 2005).

Parasetamol oral yoldan alındığında mideden emilimi zayıf, incebağırsaklardan emilimi ise güçlüdür. Bazı besinler ile alındığında bu emilim düzeyi düşebilmektedir. Parasetamol emilmeye başladıktan sonra yaklaşık 20-30 dk. içerisinde kandaki konsantrasyonu pik yapar. Plazma proteinlerine düşük oranda bağlanır. Vücut sıvı ve dokularına eşit oranda dağılır. Yarı ömrü 2,5 saat olan parasetamol karaciğerde yüksek oranda (%80-90) metabolize olur. Glukronik asit, sülfirik asit ve sistein ile konjuge oluşturarak idrar aracılığı ile atılır (Bozoğluer, 2009).

### **2.2.2 Parasetamolun Metabolizması ve Toksik Etkisi**

Parasetamol yüksek oranda metabolize olabilmesinin yanında uygulanan bir terapötik dozun sadece % 2-5 idrarla değişmeden atılır. Biyotransformasyon çoğunlukla (%85-90) karaciğerde (Küçükardalı vd., 2002) meydana gelmesine rağmen bir kısmı da böbreklerde gerçekleşebilmektedir (Prescott, 1980).

Parasetamolun ana metabolitleri sülfat ve glukuronid konjugatlarıdır; ancak yenidoğanlarda ve küçük çocuklarda glukuronid konjugasyonu eksiktir (şekil 2.6.). Parasetamol metabolizmasında sülfat konjugasyonu baskın olan metabolik yoldur (Prescott, 1980).



**Şekil 2.6.** Parasetamolun metabolik yolları (Graham, Scott, & Day, 2005).

Bunların yanında yaklaşık % 4 ile 10'luk kısmı ise sitokrom P450 sistemi adı verilen bir enzim kompleksi tarafından, parasetamolun bir ara metaboliti olan n-asetil-p-benzokinonimine (NAPQI) dönüştürülerek metabolize edilir. Parasetamol; aşırı doz uygulanmasından sonra büyük oranda sitokrom P450 sistemi tarafından metabolize edilmekte ve böylece NAPQI toksik seviyelere ulaşabilmektedir (Pacifi & Allegaert, 2015).



Aşırı miktarlarda hücre içerisinde biriken NAPQI karakteristik sentralobular hepatotoksisiteye neden olur. Terapötik dozlarda NAPQI hızlı bir şekilde glutasyon ile tepkimeye girer ve etkili bir şekilde detoksifiye edilir. Bu yüzden, parasetamol metabolizması karaciğerdeki hücrel glutasyon seviyesinde çarpıcı bir düşüşe sebep olur. Yüksek dozlarda parasetamolun reaktif metabolitine dönüşümü hücrel redükte glutasyon seviyesinin düşmesine neden olur ve böylece açıkta kalan NAPQI kovalent olarak hücrel proteinlere bağlanır (Mossa, Heikal, & Omara, 2013).

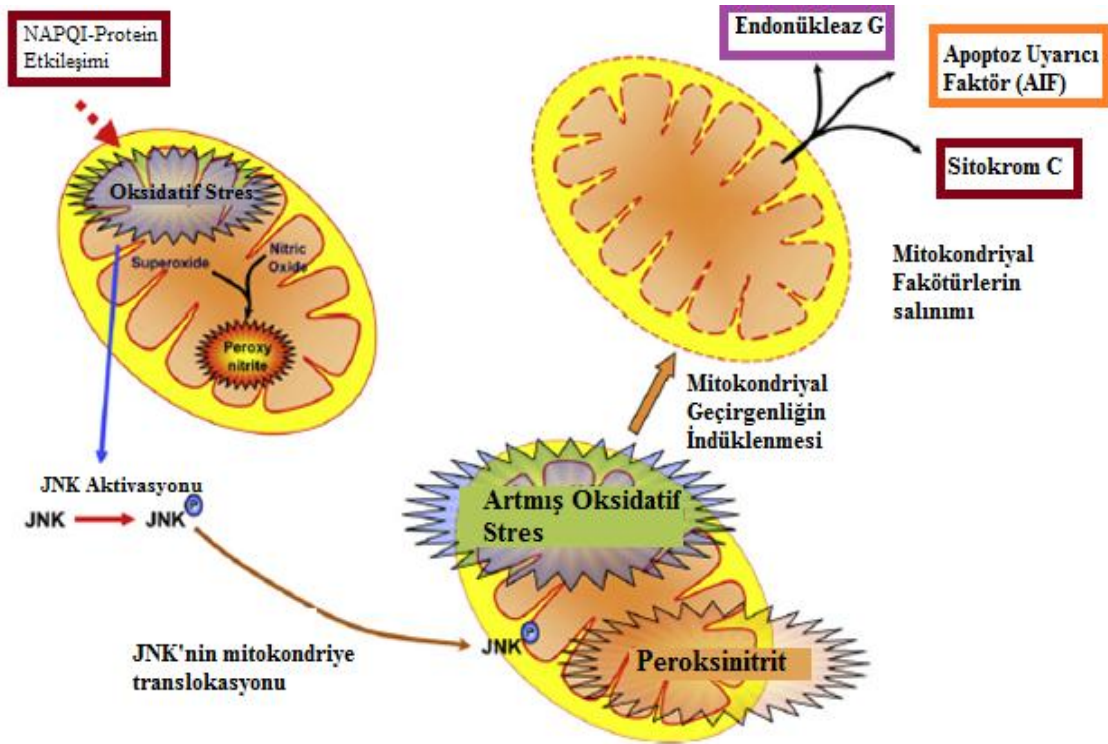
Glutasyon ile tepkimeye giren NAPQI, NAPQI-glutasyon konjugatı oluşturur. Bu bileşik önce sistein konjugatına ve daha sonra da N-asetil konjugatına dönüştürülerek idrar ile atılır (Şekil 2.6.) (Graham vd., 2005).

Sitokrom P2E1 parasetamolun oksidasyonunu sağlayan bir sitokrom enzim sistemi izoenzimidir. Aynı zamanda parasetamol MPO (myeloperoksidaz) dahil birkaç peroksidaz ile de okside olmaktadır. Aynı zamanda parasetamol dimeri ve diğer parasetamol polimerlerinin oluşumu sırasında kullanılan peroksidazlar tarafından da serbest radikaller oluşmaktadır (Şekil 6) (Graham vd., 2005).

### **2.2.3 Parasetamolun Oksidatif Stres İle İlişkisi**

Parasetamolun toksik etki yaratması oksidatif stres, NAPQI'ın proteinlere ve lipitlere kovalent olarak bağlanması sonucunda meydana gelen değişikliklerdir. Parasetamolun sitokrom P450 enzim sistemi tarafından NAPQI'ya oksidasyonundaki artış, serbest oksijen radikallerinin artmasına da sebep olmaktadır. Hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri parasetamol metabolizmasının aktivasyonu sonucu oluşan ürünlerdir (Jaeschke, McGill, Williams, & Ramachandran, 2011).

Parasetamolun metabolizması sonucu reaktif bir metaboliti olan NAPQI oluşur ve bu metabolit birçok proteinle birlikte mitokondrial proteinlere de bağlanarak hem mitokondrial hem de hücrel oksidatif stresi başlatır. Bu oksidatif stresin bir sonucu olarak oluşan süperoksit radikalleri mitokondri matriksi içerisinde NO (Nitrik Oksit) ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşur ve JNK (c-jun-N-terminal kinaz) mitokondriden çıkarak sitozole geçer. JNK'nin aktifleşip yeniden mitokondriye geçişi mitokondrial oksidatif stresi ve peroksinitrit oluşumunu daha fazla tetikleyerek, sonuçta mitokondrinin permeabilitesinin bozulmasına neden olmaktadır. Bunun bir sonucu olarak da sitokrom c, endonükleaz G ve apoptoz uyarıcı faktör (AIF) gibi mitokondriyal faktörler mitokondri dışına salınır (Şekil 2.7.). Endonükleaz G ve AIF nükleer DNA fragmentasyonunu başlatmak için nukleusa geçer (Jaeschke vd., 2011).



**Şekil 2.7.** Parasetamolün mitokondri üzerinden oluşturduğu toksisite (Jaeschke vd., 2011).

Yapılan çalışmalarda yüksek dozlarda parasetamol alımının katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzim aktiviteleri ile hücre içi antioksidan sisteminin bir parçası olan redükte/okside glutatyon düzeylerini azalttığı bildirilmiştir. NAPQI yüksek oksidatif kapasitesi sayesinde oluşan tiyol oksidasyonunun karaciğer toksisitesinde önemli bir yer tuttuğu düşünülmektedir. GSH (redükte glutatyon) düzeylerinde azalma, GPx enzim aktivitesinin de azalmasına sebep olur. NAPQI ile proteinlerin sülfhidril (-SH) gruplarının oksidasyonu ile protein-protein ve protein-GSH arasında disülfid köprüleri oluşmakta böylece NAPQI ve proteinler arasındaki bu kovalan bağlar hücre fonksiyonlarında kayıplara ve hücre ölümüne yol açmaktadır [(Jaeschke vd., 2011); (James, Mayeux, & Hinson, 2003)].

Parasetamol toksisitesinde, oksidatif stresin gelişiminde lipit peroksidasyonu hipotezi önemli bir yer tutmaktadır (Jaeschke vd., 2011). Parasetamol toksisitesi ile oluşan oksidatif stresle lipit peroksidasyonu eş zamanlı gerçekleşebilmektedir. Parasetamolün metabolizması sırasında oluşumu artan süperoksit radikalleri hidrojen peroksit radikallerinin miktarının yükselmesine ve böylece hidrojen peroksitteki artışa bağlı olarak da hidroksil radikallerinin artışına neden olmaktadır. Bu oluşan hidroksil (OH $\cdot$ ) radikalleri lipitlerle reaksiyona girerek lipit peroksidasyonunu (LPO) başlatır (James vd., 2003).

## 2.3 Hamilelikte Parasetamol Kullanımı

Hamilelerde ağrı sık rastlanan şikayetlerden biridir. Hamilelikte farklı tedavi süreçlerinde ağrı kesici ilaçların kullanılması gerekebilir. Ağrı kesiciler basit ilaçlar olmamakla birlikte anne ve fetüs organları üzerinde içerdikleri etken maddelerden dolayı olumsuz etkilere sebep olabilmektedirler. Gebeliğin her döneminde kısa süreli olmak kaydı ile terapötik dozlarda analjezik ve antipiretik olarak parasetamol kullanılmaktadır (Şavlı, 2012).

Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın reçetesiz kullanılan ilaç asetaminofendir (Parasetamol) ve bu nedenle gebelikte en sık aşırı doz kullanım vakaları parasetamol kullanımı ile görülmektedir (Şavlı, 2012). Aşırı dozlarda alınan parasetamol plasentadan geçerek hem fetal hem de maternal hepatotoksisiteye neden olur (Wilkes, Clark, & Herrera, 2005).

Parasetamol; zayıf bir asit olup fizyolojik pH aralığında noniyonize olarak bulunur, zayıf bir şekilde plazma proteinlerine bağlanır ve kan-beyin bariyeri ile plasentayı geçer. Anneden bebeğe lipitte çözünür maddelerin geçişi plasental kan akımı ile doğru orantılı olmaktadır (Arana, Morton, & Hansen, 2001).

Standart dozlarda parasetamolun hamileliğin herhangi bir trimesterinde kullanılması fetal gelişimde herhangi bir yan etki oluşturmadığı günümüze kadar gelen literatür bilgisinde görülüyor olsa da son yıllarda hamilelikte parasetamol kullanımı ile ilgili yapılan bazı çalışmalar dikkatleri parasetamol üzerine çekmektedir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda prenatal parasetamol maruziyeti ile ilgili düşük yapma, düşük doğum ağırlığı, preterm doğum komplikasyonları ile bir bağlantısı gösterilmemiştir (Scialli, Ang, Breitmeyer, & Royal, 2010).

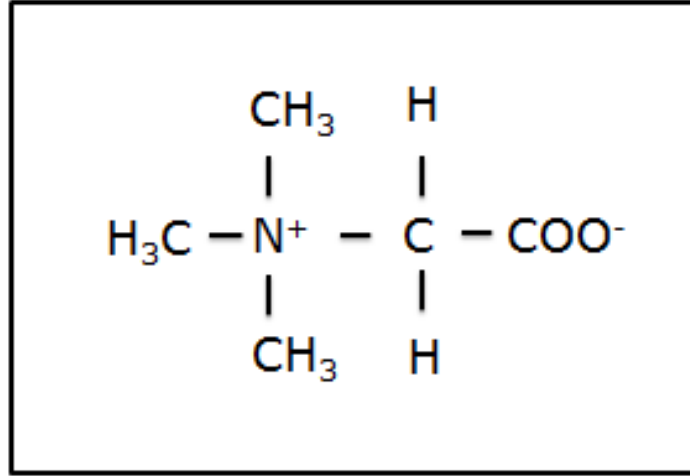
Kristensen ve ark.'nın 2011 yılında binkırk Danimarkalı ve bindörtüzyetmiş Finlandiyalı erkek bebeği değerlendirmişler ve bu çalışmada hamilelik dönemindeki annelerin parasetamol, asetil salisilik asit ve ibuprofen gibi NSAİ (non-steroid anti inflamatuvar) ilaç kullanımının bir sonucu olarak bu erkek bebeklerde kriptorşidizm görülme riskinin arttığı konusunda bağlantı kurmuşlardır (Kristensen, et al., 2012). Ayrıca yapılan bir çok çalışmada hamilelik döneminde kullanılan parasetamolün çocuklarda astım riski arasında pozitif bir bağlantı olduğu savunulmaktadır ve literatürde bu görüşleri eleştirici ve destekleyici nitelikte yayınlar bulunmaktadır (Scialli vd., 2010).

Parasetamolün fetüs üzerinde istenmeyen olası etkileri konusunda toplumsal bilgilendirme yapılarak reçetesiz parasetamol kullanımının önüne geçilmelidir. Farmakoloji alanında hızla artan bilgilerin ve yeni deneyimlerin ışığında bir ilacın kategorisinin her an değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu araştırma alanlarındaki çelişkilere rağmen parasetamol hamilelikte kullanılabilir yegane analjezik ve antipiretik bir ilaç olmaya devam etmektedir (Şavlı, 2012).

## 2.4 Betain (Trimetil Glisin)

### 2.4.1 Betainin Yapısı ve Özellikleri

Betain mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlarda bulunan özellikle ıspanak, şeker pancarı, buğday ve kabuklu deniz ürünleri gibi birçok gıdada bulunan önemli bir bileşendir. Metil gruplarına sahip ve glisin amino asitinden türemiş bir bileşik olan Betain  $(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{COO}$  olarak formülize edilir ve 117.2 molekül ağırlığına sahiptir (Şekil 2.8.) (Craig, 2004).



Şekil 2.8. Betainin moleküler formülü (Craig, 2004).

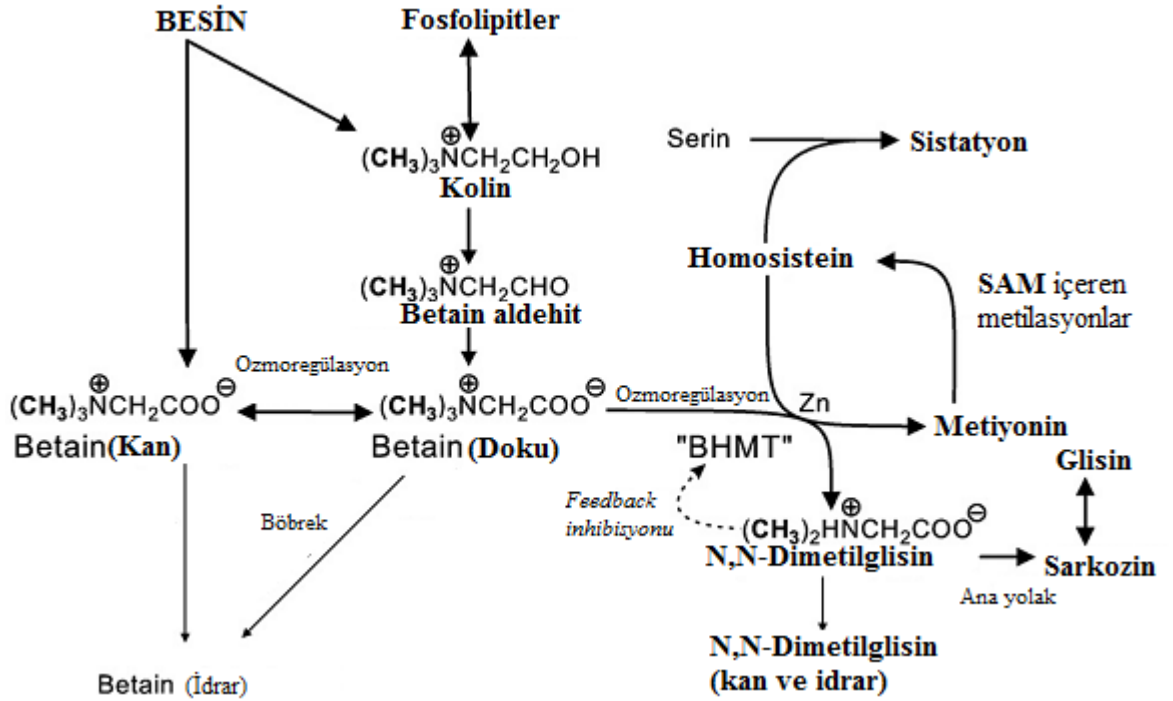
Betainin fizyolojik fonksiyonu hem stres altındaki hücrelerde koruyucu bir etki göstermesi hem de bir çok kimyasal yolakta meydana gelen transmetilasyon tepkimelerinde bir metil donörü olarak kullanılmasıdır. Bitki ve mikroorganizmalarda Betainin temel görevi hücrelerde meydana gelen ozmotik değişime karşı hücreleri korumaktır. Kuraklık, yüksek tuzluluk veya sıcaklık gibi streslere maruz kalındığında mitokondri içinde Betain sentezi başlar ve bu da Betainin birikmesine neden olur. Betain bir osmolit olarak hücrelerde su tutulmasını artırır, inorganik tuzları değiştirir, ozmotik uyarılma ve sıcaklıkla uyarılan inaktivasyona karşı hücre içi enzimleri korur (McCue & Hanson, 1992).

### 2.4.2 Betain Metabolizması

Memeliler Betaini iki anahtar fonksiyon için kullanır. Bunlardan birincisi Betainin temel özelliği olan su tutucu (osmolit) özelliğini kullanarak bir çok doku ve hücre hacmini stabil tutmaktır. Bir diğer fonksiyonu homosisteinin metiyonine dönüşümü sırasında gerekli olan metil gruplarının donörü olarak görev yapmaktır (Lever & Slow, 2010).

Memelilerde kolin bileşiği 2 basamakta Betaine dönüştürülür (Şekil 2.9.). Bu dönüşümü 2 enzim katalizler; bu enzimler kolin dehidrojenaz (EC 1.1.99.1) ve Betain aldehit dehidrojenazdır (EC 1.2.1.8). Bu iki memeli enzimi sadece karaciğer ve böbrek mitokondrilerinde bulunmaktadır. Bu dönüşüm sürecinin ilk kontrol noktası kolinin mitokondri içerisine transportudur (Lever & Slow, 2010).

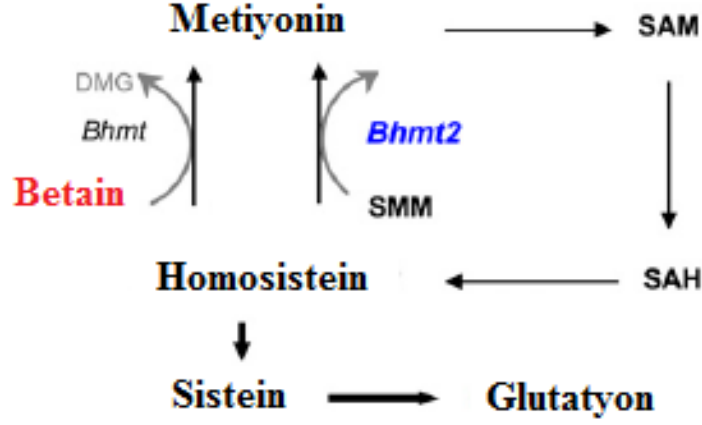
Betain homosistein metil transferaz (BHMT), homosisteinden metionin ve N,N dimetilglisin oluşumu sırasında Betainden metil grubu sağlar (Şekil 2.9.). Bu yolak karaciğerdeki metilasyonun %50 kadarlık bir kısmını oluşturur. Bu yüzden bu yolakda Betain; metiyonin ve s-adenozil metiyonin (SAM) konstantrasyonlarının sürdürülmesi için çok önemli bir yer tutar (Lever & Slow, 2010).



**Şekil 2.9.** Betain metabolizma yolları (Lever & Slow, 2010).

Yine Betainin prokürsör olarak kullanıldığı bir yolak üzerinden de hücre içi kuvvetli bir antioksidan olan GSH sentezlenmektedir. Metiyonin/glutasyon biyosentez yolağı içerisinde, metiyonin SAM'e, ki SAM daha sonra bir kaç reaksiyon sonucu sisteine ve son olarak da sisteinden glutatyona dönüştürülür. Bu yolakta metil donörü olarak kullanılan Betain, BHMT enzimi tarafından substrat olarak kullanılır (Şekil 2.10.). Bu yolak üzerinde sistein biyosentezi hız kısıtlayıcı basamak olarak bilinmektedir. Çalışmalar artan SAM

seviyelerinin hücre içi GSH seviyelerinde bir düzelmeye olduğunu göstermiştir (Liu vd., 2010). Dolayısıyla dışarıdan alınan Betain, homosistein remetilasyonunda kendine oldukça önemli yer bulur.



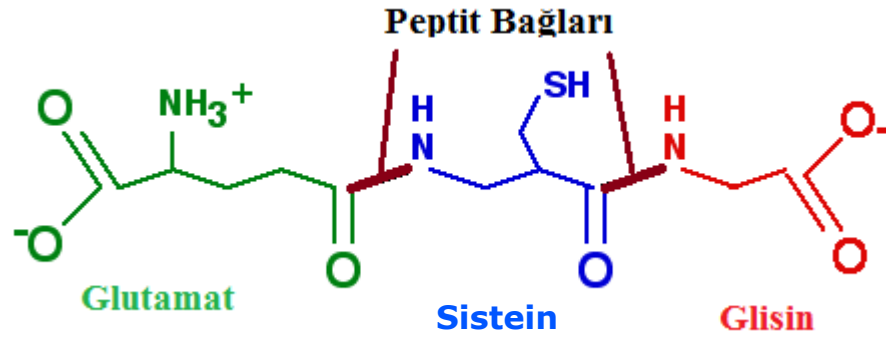
**Şekil 2.10.** Metiyonin/glutatyon biyosentez yolu (Liu vd., 2010).

Betain, serum metiyonin, transmetilasyon oranını, homosistein remetilasyonu ve metiyonin oksidasyonunu arttırmaktadır. Betain enjeksiyon yoluyla veya Betain içeren besinler aracılığı ile alındığında bir seri enzim reaksiyonu ile katabolize olur. Bu reaksiyonlar genellikle böbrek ve karaciğer hücrelerinin mitokondrilerinde gerçekleşmektedir. Transmetilasyon reaksiyonları metiyonin döngüsündeki metil grubu transferini içermektedir. Homosisteinin metiyonine dönüşümü, metiyonin konsantrasyonlarının korunması, DNA metilasyonunun sağlanmasında direkt metil grubu donörü olarak görev alan SAM'ın üretiminde Betain önemli bir role sahiptir. Eğer Betain katabolize olmazsa da organik bir ozmolit olarak iş görür. Hücre içi osmolaritenin sağlanması birçok biyolojik fonksiyonun devamlılığını sağlamada olmazsa olmazdır. Betainin, BHMT yoluyla homosisteini remetile ederek (Şekil 2.10.) SAM ve glutatyon seviyelerini koruduğu gösterilmiştir (Craig, 2004).

## 2.5 Antioksidan Savunma

### 2.5.1 Glutatyon

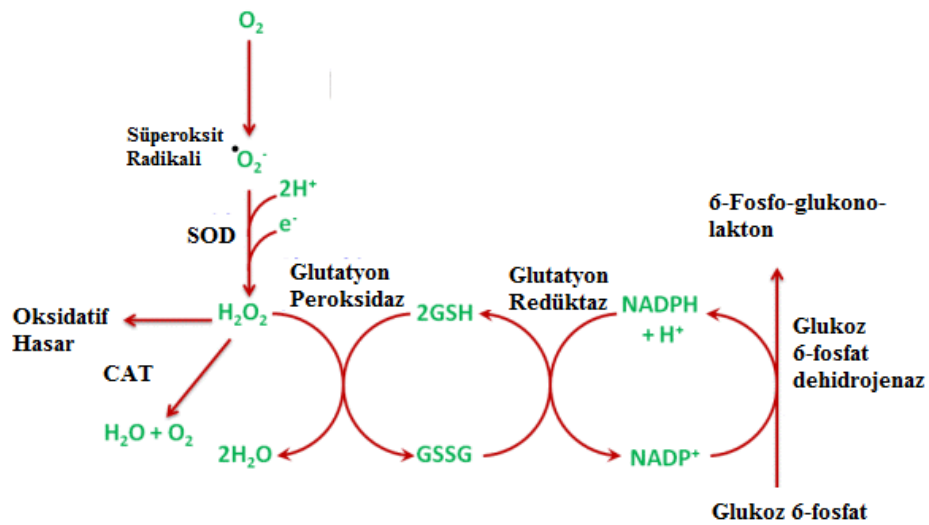
Glutatyon ( $\gamma$ -glutamil sisteinil glisin) sülfhidril (-SH) antioksidan, antitoksin ve enzim kofaktörüdür. Glutatyon glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir (Şekil 2.11.). Elektron donörü olarak görev yapan sülfhidril grubu sistein aminoasiti kalıntısından gelmektedir. Glutatyon hücrede genel olarak redükte formunda (GSH) bulunmaktadır. Sağlıklı bir hücrede total glutatyon düzeyinin sadece %10 luk bir kısmını okside formu olan GSSG oluşturmaktadır (Kidd, 1997).



**Şekil 2.11.** Glutatyonun kimyasal yapısı (Kidd, 1997).

Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan glutatyon hücre içi oksidasyon redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanlara karşı korumaktadır. Aminoasitlerin transportunda, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynayan glutatyon aynı zamanda proteinlerin -SH gruplarının korunmasında ve bazı reaksiyonlarda koenzim olarak da görev yapar (Konukoğlu & Akçay, 1995).

Vücutta normal metabolizma sonucu oluşan süperoksit radikali ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri kullanılarak bu maddelerin zararlı etkileri ortadan kaldırılır. Bu reaksiyonda GSH; GPx etkisi ile GSSG'ye ve daha sonra da GSSG glutatyon redüktaz tarafından tekrar GSH'ya dönüştürülerek gerçekleşir (Şekil 2.12.). Glutatyon redoks sisteminin tüm komponentlerinin aktivitesinin yaşlanma ile azaldığı hayvan eritrositlerinde ve insanda gösterilmiştir (Konukoğlu & Akçay, 1995).



**Şekil 2.12.** Redükte/Okside glutatyon döngüsü (Kidd, 1997).

Glutasyon eksikliği karaciğer hasarının oluşumunda ve karaciğer hasarına bağlı ölümlerde önemli bir unsur olarak öne çıkar. Karaciğer hücrelerinin detoksifikasyon mekanizmalarını yerine getirebilmeleri için hücre içi glutasyon seviyeleri oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar diyetlerinde sülfür içeren aminoasitleri düzenli bir şekilde alan bireylerin GSH düzeylerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Karaciğer hücreleri içerisindeki GSH düzeylerinin azalması çeşitli patolojik tablolara sebep olabilmektedir. İlaçlar, toksik maddeler ve karsinojenler GSH ile konjuge edilmezse DNA, RNA ve hücre içi proteinlere kovalanarak bağlanarak önemli derecede hasara sebep olur (Kidd, 1997).

### **2.5.2 Paraoksonaz (PON) ve Arilesteraz (ARE)**

PON (E.C.3.1.1.2), organofosfat paraokson'un non-toksik bir ürün olan p-nitrofenol ve dietil fosforik asite hidrolizini katalizler. Bir aromatik esteraz olan paraoksonaz, aktivitesi için kalsiyuma ihtiyaç duymaktadır. Serum kolinesterazının aksine organofosfatlar ile geri dönüşümsüz olarak inhibe olmaz. Aynı zamanda Arilesteraz (E.C.3.1.1.2) da aromatik esteraz olarak tanımlanmaktadır. O- ve p- nitrofenol, beta-naftilasetat gibi diğer aromatik esterleri hidrolize edebiliyor olmasının yanı sıra, ARE'nin asıl substratı fenilasetattır. PON gibi ARE de aktivitesi için kalsiyuma ihtiyaç duymaktadır (Eckerson, Wyte, & La Du, 1983).

PON en az 3 tipi bulunan, PON<sub>1</sub>, PON<sub>2</sub> ve PON<sub>3</sub>, multigen ailesinin üyesi olup kalsiyum bağımlı bir serum esterazıdır. Bu PON'ları kodlayan genler bir birlerine bitişik bulunmaktadır. PON kodlayan genler insanlarda 7. kromozomda bulunurken farelerde ise 6. Kromozomda konumlanmaktadır (Labrecque vd., 2009). Bu üç farklı PON'un aminoasit dizilimi memeli türleri arasında yüksek seviyede benzerlik göstermektedir. Temel olarak PON<sub>1</sub> ve PON<sub>3</sub> karaciğerde üretilirken PON<sub>2</sub> ise beyin, karaciğer, böbrek ve testislerde üretilmektedir. PON<sub>1</sub> ve PON<sub>2</sub>'nin koroner kalp hastalıkları ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Son zamanlarda PON<sub>2</sub> ve PON<sub>3</sub>'de tıpkı PON<sub>1</sub> gibi antioksidan özelliklere sahip oldukları öne sürülmüştür (Rodrigo, Gil, Hernandez, Lopez, & Pla, 2003).

PON esas olarak karaciğer tarafından üretilen ve apolipoprotein A1 ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile ilişkili dolaşıma katılır. Son zamanlarda PON<sub>1</sub>'in antioksidan savunma sistemine katkısı; HDL'lerde bulunan PON<sub>1</sub>'in LDL oksidasyonunu önleme üzerine olduğu bildirilmiştir. PON<sub>1</sub> aynı zamanda oksidatif strese neden olan lipit preoksidlerini ve hidrojen peroksidleri de inaktive etmektedir (Jaichander, Selvarajan, Garelnabi, & Parthasarathy, 2008).

PON ve ARE aynı gen tarafından kodlanan ve aktif merkezleri benzer olan esteraz grubundaki enzimlerdir. PON<sub>1</sub>'in polimorfik değişim gösterdiği



bilinmesine karşın ARE enzimi genetik polimorfik bir değişim göstermemektedir. Yine iki enziminde doğal substratları farklı olmasına karşın, ARE'nin doğal substratı olan fenil asetat PON<sub>1</sub> enzimi tarafından hidrolize edilebilmektedir. Arilesteraz PON<sub>1</sub>'deki değişimlerden etkilenmeyen asıl proteinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Türkoğlu, Bulmuş, Parmaksız, Özkan, & Gürsu, 2008).

PON<sub>1</sub>; PON, ARE ve diyazoksanaz olmak üzere 3 ayrı aktiviteye sahip bir enzimdir. PON<sub>1</sub>; paraokson, aromatik esterler ve fenilasetat gibi organofosfatları hidrolize eder. Aynı zamanda PON<sub>1</sub> tiolaktonlar dahil, arilesterler, fosfat esterleri ve laktonlar gibi çeşitli substratları da hidrolize etmektedir (Isik, Koca, Ustundag, Celik, & Yildirim, 2007). PON<sub>1</sub> ve arilesteraz aktivitesi karaciğer fonksiyonunun bir göstergesi olarak anlam ifade eder ve PON<sub>1</sub> ile arilesteraz aktiviteleri tek bir enzim gibi işlev göstermektedir (Kilic vd., 2005).

### **3 GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1 DENEY HAYVANLARININ TEMİN VE BAKIMI**

Çalışmaya başlamadan önce, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan 410 no'lu karar ile onay alındı. Çalışmamızda deney hayvanların bakım ve cerrahi müdahaleleri Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Deney Hayvanları Laboratuvarında, biyokimyasal analizler Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, histolojik analizler ise Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Çalışmamızda hamile sıçan olarak kullanılacak olan 12 adet 200-250 gr dişi *Sprague Dawley* türü sıçan, ESOĞÜ Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (TICAM) temin edildi. TICAM'dan temin edilen hayvanlar getirilen laboratuvara uyum sağlamaları için bir hafta süresince bekletildi. Hayvanlar 12 saat gündüz/gece olarak ayarlanmış,  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  sabit sıcaklıkta ve sabit nemli ortamda tutulup *ad libitum* beslenme uygulandı. 1 hafta boyunca dişi ve erkek sıçanlar ayrı ayrı kafeslerde tutulmuş daha sonra deneyin başlaması ile kafesler birleştirilmiş ve hayvanlar çiftleşmeye bırakılmıştır.

#### **3.2 HAMİLELİĞİN ANLAŞILMASI, DENEY GRUPLARI VE MADDE UYGULANMASI**

##### **3.2.1 Hamileliğin Anlaşılması**

Sperm gözlemlenmesi hamileliğin anlaşılması için kullanılmıştır. Dişi ve erkek sıçanlar aynı kafeslere koyulduktan sonra her günün sabahında rutin olarak vaginal smear testi ile mikroskop altında sperm varlığı gözlemlenmiştir.

Bir Pasteur Pipetine yaklaşık 0,5 ml kadar serum fizyolojik çekildi ve serum fizyolojinin tamamı hayvanın vajeninden bir kaç sefer boşaltılıp geri çekildi (Şekil 3.1.). Daha sonra Pasteur Pipeti içerisindeki sıvı bir damla kadar lamın üzerine damlatıldı ve mikroskop altında sperm varlığı incelenmiştir. Sıçan spermleri kanca şeklinde görüntüye sahiptir (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.1.** Vaginal smear uygulanması.



**Şekil 3.2.** Sıçan spermi (x60 büyütme).

Çalışmada mikroskop altında spermin görüldüğü ilk günden (E0) yavruların doğacağı güne kadarki dönem embriyonik prenatal dönem (E) olarak ifade edildi. Bütün gruplarda doğum normal 20 veya 21 (E20-21) gün içerisinde gerçekleşmiştir. Her gruptaki ana sıçanların doğum sayısı aşağı yukarı 10-14 arası olmuştur. Çalışmamız yeni doğanlarda olduğu için ilk 24 saatlik dilim içerisinde yeni doğan sıçanların diseksiyonları eter altında bayıldıktan ve dekapitasyon oluşturulduktan sonra gerçekleştirilmiştir.

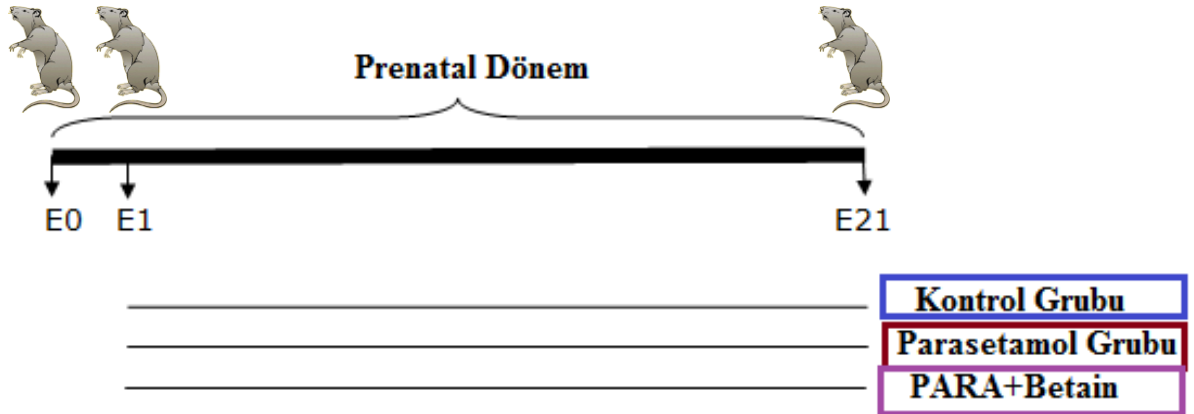
Öncelikle hamileliği anlaşılan sıçanlar, gruplara ayrıldı. Bu grupların her birinde 4 adet anne olacak şekilde 3 grup oluşturulup madde uygulaması yapıldı. Doğum olduktan sonra her bir gruptaki annelerin yeni doğan yavruları kullanılarak yenidoğan havuzu oluşturuldu. Bu havuzdan her bir grup için onüç'er adet yenidoğan yavru seçildi ve araştırmalar gerçekleştirildi.

### 3.2.2 Deney Grupları ve Madde Uygulanması

1. **Kontrol Grubu (n=4)**: Bu gruptaki hamile sıçanlara 2 ml serum fizyolojik hamilelik süresince her gün gavaj yolu ile uygulandı.

2. **PARA Grubu (n=4)**: Bu gruptaki hamile sıçanlara 30 mg/kg olacak şekilde hamilelik süresince her gün serum fizyolojik içerisinde çözülerek taze hazırlandı ve gavaj yolu ile uygulandı.

3. **PARA+Betain Grubu (n=4)**: Bu gruptaki hamile sıçanlara 30mg/kg olacak şekilde PARA ve 800 mg/kg olacak şekilde Betain hamilelik süresince her gün serum fizyolojik içerisinde taze olarak hazırlandı ve gavaj yolu ile uygulandı.



**Şekil 3.3.** Hamile sıçanlara madde uygulanma sürecini gösteren skala.

Dişi sıçanlarda sperm gözlemlendikten sonra, dişi sıçanlar erkek sıçanların yanından ayrıldı ve ayrı bir kafeste tek başına bakıma alındı. E0'dan (Sperm gözlemlendiği gün) bir sonraki gün (E1) Parasetamol

uygulanacak gruba Parasetamol; Parasetamol+Betain uygulanacak gruba Betain ve parasetamol her gün taze bir şekilde serum fizyolojik içerisinde çözülerek hazırlandı ve gavaj ile uygulandı (Şekil 3.3.). Kontrol grubuna ise sadece serum fizyolojik verildi.

### **3.3 CERRAHİ İŞLEMLER**

21. ve 22. günlerde doğan yavrular ilk 24 saatlik dönem içerisinde cerrahi müdahalelere tabi tutuldu. Eter altında bayıltılan yeni doğan yavrular dekapite edilerek öldürüldü. Büyüteç altında karaciğer ve böbrekleri çıkartıldı. Biyokimyasal çalışmalar için dokular çalışma anına kadar -80°C 'de saklandı. Histolojik çalışmalar için ayrılan dokular nötral formaldehitte 24-48 saat süre ile fiske edildi. Fiksasyondan sonra dokuların histolojik takipleri yapıldı.

### **3.4 Doku MDA Düzeylerinin Ölçümü**

#### **Ölçüm Prensipleri:**

MDA ölçümü için Ohkawa ve ark. kullandığı yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Yöntem lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehitin (MDA) tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği renk reaksiyonuna dayanmaktadır (Ohkawa, Ohishi, & Yagi, 1979).

#### **MDA ve GSH Analizi İçin Doku homojenatının hazırlanması:**

Dokular derin dondurucudan çıkarıldı ve her biri tek tek tartıldı. Tartılan her bir doku ayrı ayrı numaralandırılmış tüplere koyuldu. Tartılan doku gramının 9 katı kadar 0,15 M'lık KCl dokuların bulunduğu tüplere eklendi ve 15000 devir/dk hızla ortalama 1 dakika boyunca buz üzerinde homojenize edildi ve böylelikle %10'luk homojenat hazırlanmış oldu. Hazırlanan homojenatlar daha sonra +4°C'de 4000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

#### **Ölçüm Sırasında Kullanılan Çözeltiler:**

- %8,1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS): 8,1 gr SDS tartıldı ve bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.
- %20'lik Asetik asit (pH: 3.5): Bir miktar distile su içerisine 20 ml asetik asit eklendi ve 100 ml'ye yakın bir değere kadar distile su eklendikten sonra NaOH ile pH 3.5 ayarlanıp distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- %0,8'lik Tiyobarbitürik Asit (pH: 5.5): 0,8 gr TBA tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra pH NaOH ve HCl kullanılarak 5,5 a ayarlandıktan sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

### **Deney Protokolü:**

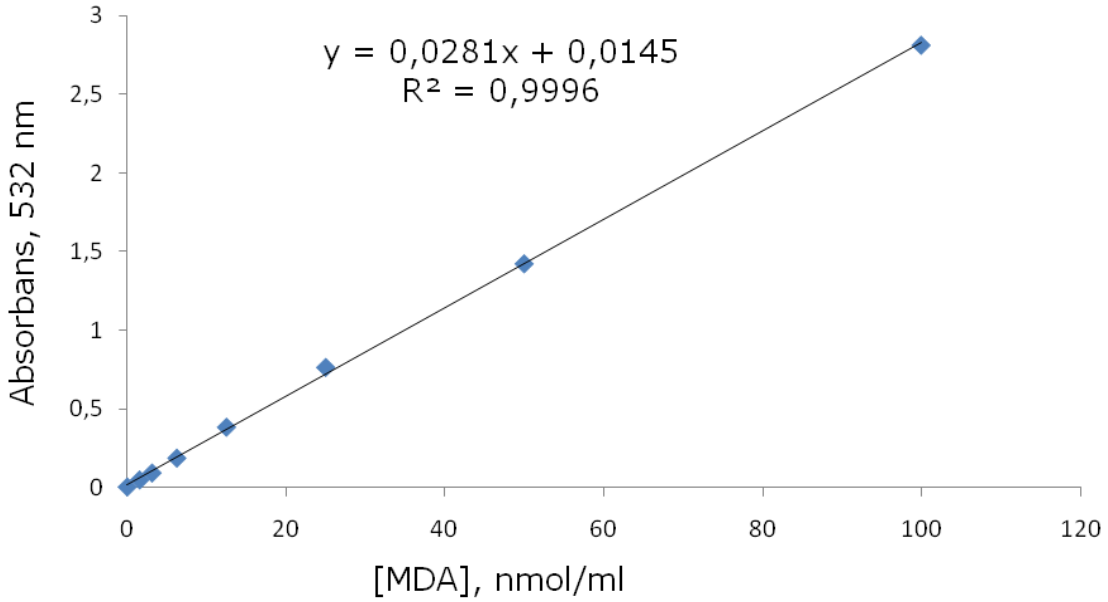
Kapaklı tüpler alınarak kör, standart ve örnek tüpler hazırlandı. Kör tüpüne 20 µl SDS, 150 µl asetik asit, 150 µl TBA, 80 µl distile su koyuldu; örnek tüplerine ise; 40 µl süpernatant ,20 µl SDS, 150 µl asetik asit, 150 µl TBA ve 40 µl distile su koyuldu; standart tüplerine örnek tüplerine koyulan maddelerin aynısı koyuldu ancak süpernatant yerine hazırlanan standart çözeltiler koyuldu. Tüplerin kapakları kapatıldı ve tüm tüpler 100°C'de 60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda tüm tüpler musluk suyu altında soğutuldu. Soğutulan tüpler daha sonra 4000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatanttan 200 µl alınıp mikroplater içerisine koyulduktan sonra 532 nm'de okuma yapıldı (Tablo 3.1.).

**Tablo 3.1.** MDA ölçüm prosedürü.

	<b>Kör</b>	<b>Numune</b>	<b>Standart</b>
<b>Homojenat</b>	--	40 µl	40 µl (Std.)
<b>%8,1 SDS</b>	20 µl	20 µl	20 µl
<b>%20'lik Asetik asit</b>	150 µl	150 µl	150 µl
<b>%0,8'lik TBA</b>	150 µl	150 µl	150 µl
<b>Distile Su</b>	80 µl	40 µl	40 µl
<b>60 dakika boyunca 100°C'de inkübe edilir.</b>			
<b>N-Bütanol/piridin</b>	500 µl	500 µl	500 µl
<b>4000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilir.</b>			
<b>Süpernatantlar mikroplate içerisine alınır ve 532 nm'de ölçülür.</b>			

## Doku MDA Düzeylerinin Hesaplanması

Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için standart çözelti olarak 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nmol/ml'lik konsantrasyonlarında 1,1,3,3 tetraetoksipropan hazırlandı. Aynı ayrı bütün standart tüpleri içerisine koyuldu. Tablodaki gibi kör ve örnek tüplere uygulanan aşamalar uygulandı. Elde edilen absorbanslarla konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2010 programı kullanılarak bir standart grafiği oluşturuldu (Şekil 3.4.). Örneklerin konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak hesaplandı. Daha sonra her bir dokuya ait olan homojenatlar kullanılarak total protein konsantrasyonları da hesaplandı. Örneklerin konsantrasyonu total protein konsantrasyonlarına oranlandı ve MDA sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.



Şekil 3.4. MDA standart grafiği.

## 3.5 Doku GSH Düzeylerinin Ölçümü

### Ölçüm Prensipleri:

GSH ölçümü için Beutler ve ark. kullandığı yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Yöntem ortamdaki tiyol bileşikleriyle DTNB (5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit) ile reaksiyona girip oluşan rengin 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır (Beutler, Duron, & Kelly, 1963).

## **Doku homojenatının hazırlanması:**

Doku homojenatı olarak MDA için kullanılan homojenat kullanılmıştır.

## **Ölçüm Sırasında Kullanılan Çözeltiler:**

- Çöktürücü Solüsyon: 1.67 gr metafosforik asit, 0,20 gr EDTA, 30 gr NaCl tartılıp bir miktar suda çözüldükten sonra son hacim distile su 100 ml'ye tamamlandı.
- 0.3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Çözeltisi: 2,13 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılıp bir miktar distile su içerisinde çözüldükten sonra son hacim distile su 50 ml'ye tamamlandı.
- DTNB Solüsyonu: 0,25 gr sodyum sitrat ve 10 mg DTNB tartılıp 100 ml distile suda çözülür.
- 0.15 M KCl Çözeltisi: 1.15 gr KCl tartıldı ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

## **Deney Protokolü:**

Mikroplate içerisine kör, örnek ve standartları oluşturacak kuyucuklar içerisine 160 µl Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltisinden eklenir, daha sonra kör kuyucuk içerisine 40 µl yalancı filtrat, örnek kuyucuklara daha önceden santrifüj edilmiş numunelerden elde edilen süpernatanttan 40 µl ve standart kuyucuklara 40 µl hazırlanmış standart çözeltilerinden eklenir. En son üzerlerine DTNB koyulur ve 5 dakika sonra 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (Tablo 3.2.).

## **Numunenin Hazırlanışı:**

25 µl daha önceden hazırlanmış homojenattan, 75 µl 0.15 M KCl çözeltisinden ve 150 µl çöktürücü solüsyondan tüpler içerisine koyulup 3500 rpm +4°C'de 10 dakika süresince santrifüj edilir. Süpernatant ölçüm için numune olarak kullanılır.

## **Yalancı Filtrat:**

150 µl çöktürücü solüsyon ve 100 µl distile su tüp içerisine koyulduktan sonra 3500 rpm +4°C'de 10 dakika süresince santrifüj edilir. Süpernatant ölçüm için numune olarak kullanılır.



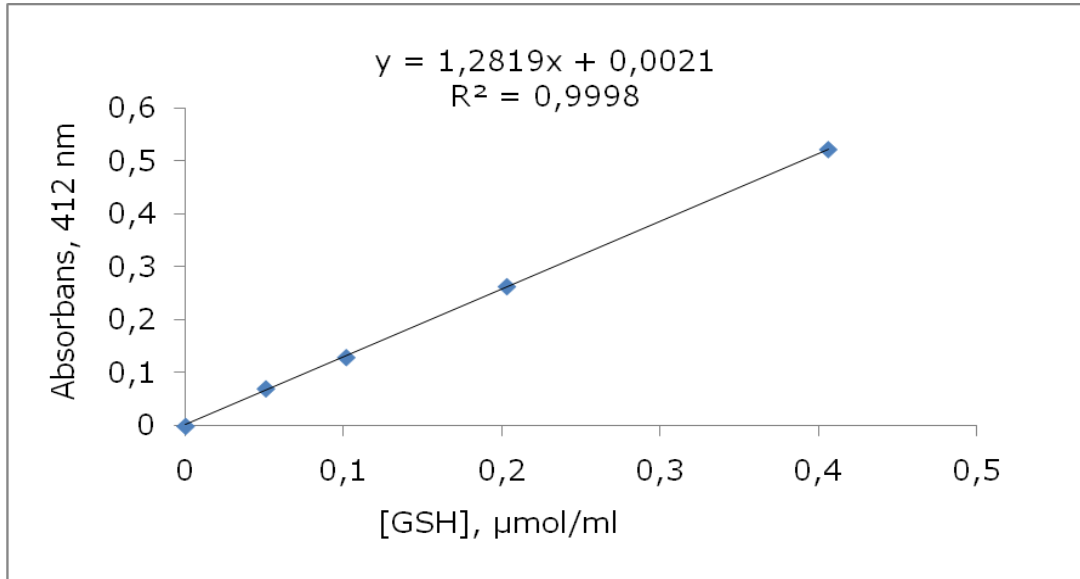
**Tablo 3.2.** GSH ölçüm prosedürü.

	<b>Kör</b>	<b>Numune</b>	<b>Standart</b>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	160 µl	160 µl	160 µl
<b>Süpernatant</b>	--	40 µl	40 µl (Std.)
<b>Yalancı Filtrat</b>	40 µl	--	--
<b>DTNB</b>	20 µl	20 µl	20 µl

**5 dakika beklendikten sonra 412 nm’de ölçülür.**

### **Doku GSH Düzeylerinin Hesaplanması**

Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için standart çözelti olarak 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 µmol/ml’lik konsantrasyonlarında Glutasyon hazırlandı. Tablodaki gibi kör ve örnek kuyucuklara uygulanan aşamalar uygulandı. Elde edilen absorbanlarla konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2010 programı kullanılarak bir standart grafiği oluşturuldu. Örneklerin konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak hesaplandı (Şekil 3.5.). Daha sonra her bir dokuya ait olan homojenatlar kullanılarak total protein konsantrasyonları da hesaplandı. Örneklerin konsantrasyonu total protein konsantrasyonlarına oranlandı ve Glutasyon sonuçları µmol/mg protein olarak verildi.



**Şekil 3.5.** GSH standart grafiği.

### 3.6 Doku NO Düzeylerinin Ölçümü

#### Ölçüm Prensipleri:

Nitrik oksit ölçümünde Cortas ve Wakid'in ölçüm prensibi modifiye edilerek kullanıldı. Yöntem bakır kaplı kadmiyum granülleri ile Nitrat ( $\text{NO}^{-3}$ )'ın Nitrit ( $\text{NO}^{-2}$ )'ye dönüştürülmesi ve Nitritin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Cortas & Wakid, 1990).

#### Doku Homojenizatlarının Hazırlanması:

Tartılıp numaralandırılmış tüplere aktarılan dokuların üzerine tartılan miktarın 9 katı kadar 0.1 M'lık Fosfat tamponu (pH: 7.4) eklendi ve homojenizatör ile buz üzerinde yaklaşık 1 dk boyunca homojenize edildi. Homojenize edilen dokular  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dk boyunca 4000x g'de santrifüj edildi ve süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

#### Ölçüm Sırasında Kullanılan Çözeltiler:

- 75 mM'lık  $\text{ZnSO}_4$  Çözeltisi: 5,39 gr  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'dan tartıldı biraz distile suda çözüldü ve son hacim 250 ml'ye tamamlandı.
- 55 mM'lık NaOH Çözeltisi: 0,55 gr NaOH tartıldı biraz distile su içerisinde çözüldükten sonra son hacim 250 ml'ye tamamlandı.
- 0.2 M Glisin-NaOH Tamponu: 7,5 gr glisin yaklaşık 100 ml distile suda çözüldü. 0.1 M'lık NaOH çözeltisi ile glisin pH'sı 9.7'ye ayarlandı ve son hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.
- 0.1 M NaOH Çözeltisi: 3.2 gr NaOH tartılıp 40 ml distile suda çözüldü.
- Kadmiyum Granüllerinin Aktivasyonu: Eşit boyutlardaki kadmiyum granülleri örnek, standart ve kör sayısı kadar ayrıldı.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  içerisinde tutulan kadmiyum granülleri distile su ile 3 defa yıkandı.  $\text{CuSO}_4$  içerisinde iki dakika bekletildikten sonra glisin-NaOH tamponu ile 3 defa yıkandı ve 10 dakika içerisinde kullanıldı.
- 0.2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  Çözeltisi: Bir miktar distile su içerisinde 1.4 ml derişik  $\text{H}_2\text{SO}_4$  koyuldu ve son hacim 250 ml'ye tamamlandı.
- 5 mM  $\text{CuSO}_4$  Çözeltisi: 3.12 gr  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  tartıldı bir miktar distile su içerisinde çözüldü ve son hacim 250 ml'ye tamamlandı.
- 58 mM'lık Sülfanilamid Çözeltisi: 3M HCl'den 66.2 ml alınıp hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlanıp 2.5 gr sülfanilamid eklendi. Sülfanilamid sıcak HCl içinde iyice çözüldü. Oda sıcaklığında saklandı.
- 0.77 M'lık N-Naftiletilediamin Çözeltisi: 50 mg N-Naftiletilediamin tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 250 ml'ye tamamlanır.

**Tablo 3.3.** NO ölçüm prosedürü.

	<b>Deney</b>	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>
<b>Süpernatant</b>	50 µl	50 µl(D. su)	-
<b>NaOH</b>	250 µl	250 µl	-
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	200 µl	200 µl	-
<b>3500x g'de 10 dakika santrifüj edilir.</b>			
<b>Süpernatant</b>	100 µl	100 µl	100 µl (Std.)
<b>Distile Su</b>	200 µl	200 µl	200 µl
<b>Glisin Tamponu</b>	100 µl	100 µl	100 µl
<b>Kadmiyum Granülleri</b>	Eklenir	Eklenir	Eklenmez
<b>Oda sıcaklığında 90 dakika inkübasyon.</b>			
<b>Süpernatant</b>	200 µl	200 µl	200 µl
<b>Sülfanilamid</b>	100 µl	100 µl	100 µl
<b>N-naftiletilediamin</b>	100 µl	100 µl	100 µl
<b>Distile Su</b>	50 µl	50 µl	50 µl
<b>60 dk oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 545'nm de okundu.</b>			

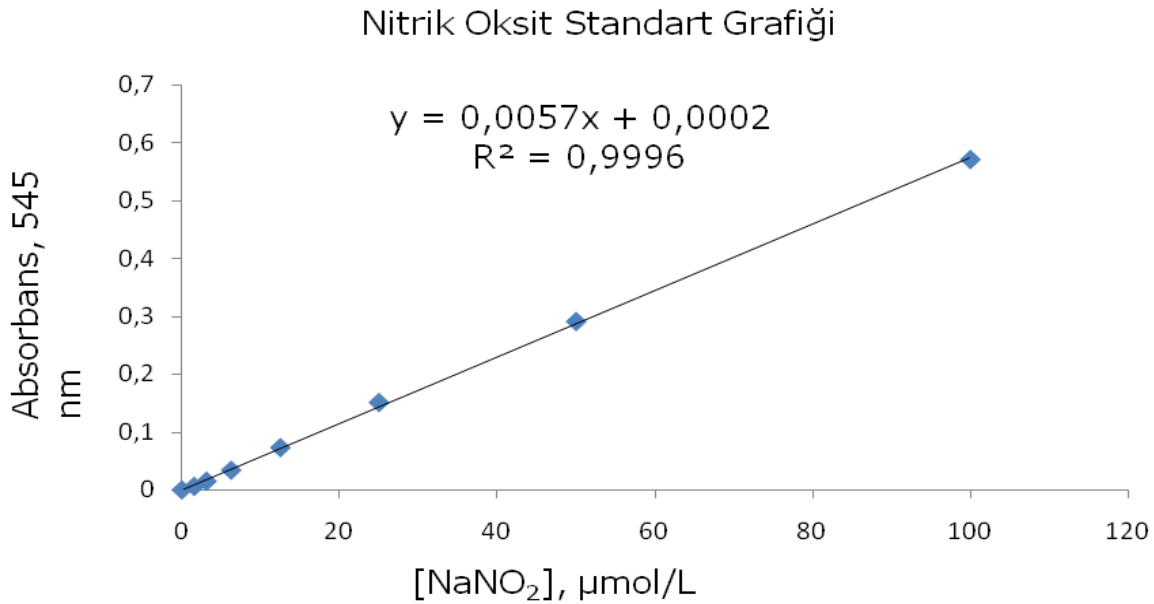
**Deney Protokolü:**

Hazırlanan homojenizatlar santrifüj edilmeden sonra süpernatantlar ölçüm için kullanıldı. Deneyin ilk aşamasını deproteinizasyon aşaması oluşturmaktadır. Deproteinizasyon için kör tüpe 250 µl 55 mM'lık NaOH ve 200 µl 75 mM ZnSO<sub>4</sub> koyuldu; örnek tüplere 50 µl süpernatant 250 µl 55 mM'lık NaOH, 200 µl 75 mM ZnSO<sub>4</sub> koyuldu; standartlar için deproteinizasyon işlemleri uygulanmadı. Daha sonra kör ve örnek tüpler 3500x g'de 10 dk santrifüj edilir ve süpernatant bir sonraki aşama için kullanılır. Bu aşamada örnek ve kör tüp için süpernatantlardan, standartlar için ise hazırlanan standart çözeltilerinden 100 µl alınıp üzerine 200 µl distile su, 100 µl glisin tamponu koyuldu. Çözeltiler vorteksledikten sonra, örnek ve kör tüplerinin her birine bir adet olacak şekilde bakır kaplı kadmiyumlardan eklendi. Standart tüplerine eklenmedi. 90 dakika süresince oda sıcaklığında

inkübasyona bırakıldı. 90 dakika sonunda standart, kör ve örneklerden 200'er µl alındı ve üzerlerine 100'er µl N-Naftiletilediamin ve Sülfanilamid eklendikten sonra distile su ile 450 µl'ye tamamlandı. 1 saat süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakılan tüplerden daha sonra 200 µl alınıp mikrotelatlere koyuldu ve spektrofotometrede 545 nm'de absorban değerleri ölçüldü (Tablo 3.3.).

### Doku NO Düzeylerinin Hesaplanması

Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için standart çözelti olarak 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µmol/L'lik konsantrasyonlarında NaNO<sub>2</sub> hazırlandı. Ayrı ayrı bütün standart tüpleri içerisine koyuldu. Tablodaki gibi kör ve örnek tüplere uygulanan aşamalar uygulandı. Elde edilen absorbanlarla konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2010 programı kullanılarak bir standart grafiği oluşturuldu (Şekil 3.6.). Örneklerin konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar dilüsyon faktörü ile çarpıldı. Daha sonra her bir dokuya ait olan homojenatlar kullanılarak total protein konsantrasyonları hesaplandı. Örneklerin konsantrasyonu total protein konsantrasyonlarına oranlandı ve NO sonuçları µmol/mg protein olarak verildi.



Şekil 3.6. NO standart grafiği.

## 3.7 Doku Paraoksonaz ve Arilesteraz Aktivitelerinin Ölçümü

### Paraoksonaz Ölçüm Prensipleri:

Paraoksonaz aktivitesi ölçümü yönteminde substrat olarak kullanılan paraoksonun hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenolun 25°C ve 405 nm'de birim zamandaki değişiminin ölçümü esasına dayanır (Beltowski, Wisniewska, Borkowska, & Wojcicka, 2005).

### Doku homojenatının hazırlanması:

-80°C'den dokular çıkarıldı ve her biri tek tek tartıldı. Tartılan her bir doku ayrı ayrı numaralandırılmış tüplere koyuldu. Tartılan doku gramının 9 katı kadar 50 mM Tris-HCl tamponundan dokuların bulunduğu tüplere eklendi ve 15000 devir/dk hızla ortalama 1 dakika boyunca buz üzerinde homojenize edildi ve böylelikle %10'luk homojenat hazırlanmış oldu. Hazırlanan homojenatlar daha sonra +4°C'de 10.000x g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

### Ölçüm İçin Kullanılan Çözeltiler:

- 100 mM'lık Tris-HCl Tamponu (pH: 8): 3.027 g Tris, 34.7 mg CaCl<sub>2</sub> ve 14.61 NaCl tartılıp 200 ml distile suda çözülüp HCl ile pH 8'e getirilip son hacim 250 ml'ye tamamlandı.
- Paraokson Çözeltisi: 18 µl paraokson 654 µl aseton içerisinde çözülür ve üzerine 12,7 ml Tris-HCl tamponu eklenir ve iyice karıştırıldı. Daha sonra üzerine 50 ml Tris- HCl tamponu eklenerek paraokson çözeltisi hazırlanmış oldu.

### Deney Protokolü:

Mikroplate içerisindeki kuyucuklara örnekler ve kör için 190 µl Tris-HCl tamponu koyuldu, daha sonra örneklerden karaciğer için 10 µl böbrek için 30 µl eklendi, kör için ise karaciğer ölçümünde 10 µl böbrek ölçümünde 30 µl distile su eklendi. En son olarak çoklu otomatik pipet yardımı ile seri bir şekilde bütün kuyucuklara 47 µl paraokson çözeltisi eklendi ve 405 nm'deki absorban değişimi 5 dakika boyunca kaydedildi (Tablo 3.4.).

**Tablo 3.4.** PON aktivitesi ölçüm prosedürü.

<b>Paraoksonaz Aktivite Ölçümü</b>					
<b>Karaciğer İçin</b>			<b>Böbrek İçin</b>		
	<b>Numune</b>	<b>Kör</b>		<b>Numune</b>	<b>Kör</b>
<b>Tris-HCl Tamp.</b>	190 µl	190 µl	<b>Tris-HCl Tamp.</b>	190 µl	190 µl
<b>Süpernatant</b>	10 µl	--	<b>Süpernatant</b>	30 µl	--
<b>Distile Su</b>	--	10 µl	<b>Distile Su</b>	--	30 µl
<b>Paraokson</b>	47 µl	47 µl	<b>Paraokson</b>	47 µl	47 µl

#### **Paraoksonaz Aktivitesinin Hesaplanması:**

$$U/ml = \frac{\Delta A/dk}{\epsilon} \times SF \times 10^6 \times 1/0.6$$

**ΔA/dk:** Bir dakikadaki absorptivite değişimi.

**ε:** p-nitrofenolun molar absorbtivite katsayısı, mevcut şartlar için 17600.

**SF:** Seyreltme fakötür (Total Hacim/Numune Hacmi).

**10<sup>6</sup>:** nmole çevirme faktörü.

**1/0,6:** Plate ışık yolunun uzaklığı.

Yukarıdaki formüle göre hesaplanan enzim aktiviteleri daha sonra protein miktarına oranlanarak sonuçlar U/mg protein şeklinde verilmiştir.

#### **Arilesteraz Ölçüm Prensibi:**

Arilesteraz aktivitesi ölçümü yönteminde substrat olarak kullanılan fenilasetatin hidrolizi sonucu oluşan fenolun 25°C ve 270 nm'de birim zamandaki değişimi spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır (Beltowski vd., 2005).

#### **Doku homojenatının hazırlanması:**

-80°C'den dokular çıkarıldı ve her biri tek tek tartıldı. Tartılan her bir doku ayrı ayrı numaralandırılmış tüplere koyuldu. Tartılan doku gramının 9 katı kadar 50 mM Tris-HCl tamponundan (NaCl içermeyen tampon) dokuların

bulunduğu tüplere eklendi ve 15000 devir/dk hızla ortalama 1 dakika boyunca buz üzerinde homojenize edildi ve böylelikle %10'luk homojenat hazırlanmış oldu. Hazırlanan homojenatlar daha sonra +4°C'de 10.000x g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

### Ölçüm İçin Kullanılan Çözeltiler:

- 100 mM'lık Tris-HCl Tamponu (pH: 8): 3.027 g Tris ve 34.7 mg CaCl<sub>2</sub> tartılıp 200 ml distile suda çözülüp HCl ile pH 8'e getirilip son hacim 250 ml'ye tamamlandı.
- Fenilasetat Çözeltisi: 24 µl fenilasetat 15.2 ml Tris-HCl tamponunda çözülür ve üzerine 40 ml Tris-HCl tamponu eklenip çözelti hazırlandı.

### Deney Protokolü:

Karaciğer ve böbrek homojenatları 1/40 oranında dilüe edildi ( 8 µl süpernatanta 312 µl distile su eklendi). Seyreltilmiş örneklerden karaciğer için 40 µl böbrek için 120 µl eklendi, kör için ise karaciğer ölçümünde 40 µl böbrek ölçümünde 120 µl distile su eklendi. Daha sonra üzerine 800 µl fenilasetat eklenip 270 nm'de 3 dakika boyunca kinetik okuma yapıldı (Tablo 3.5).

**Tablo 3.5.** ARE aktivitesi ölçüm prosedürü.

<b>Ariesteraz Aktivite Ölçümü</b>					
<b>Karaciğer İçin</b>			<b>Böbrek İçin</b>		
	<b>Numune</b>	<b>Kör</b>		<b>Numune</b>	<b>Kör</b>
<b>Süpernatant</b>	40 µl	--	<b>Süpernatant</b>	120 µl	--
<b>Distile Su</b>	--	40 µl	<b>Distile Su</b>	--	120 µl
<b>Fenilasetat</b>	800 µl	800 µl	<b>Fenilasetat</b>	800 µl	800 µl

### Ariesteraz Aktivitesinin Hesaplanması:

$$U/ml = \frac{\Delta A/dk}{\epsilon} \times SF \times 10^3 \times 40$$

**$\Delta A/dk$ :** Bir dakikadaki absorbans değişimi.

**$\epsilon$ :** p-nitrofenolun molar absorbtivite katsayısı, mevcut şartlar için 1310.

**SF:** Seyreltme fakötür (Total Hacim/Numune Hacmi).

**$10^3$ :**  $\mu$ mole çevirme faktörü.

**40:** Seyreltilmiş örnekler.

Yukarıdaki formüle göre hesaplanan enzim aktiviteleri daha sonra protein miktarına oranlanarak sonuçlar U/mg protein şeklinde verilmiştir.

### **3.8 Doku Total Protein Ölçümü**

#### **Ölçüm Prensibi:**

Ölçüm Bradford'un yöntemi kullanılarak uygulandı. Bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein miktarına bağlı olarak verdiği farklı şiddetlerdeki mavi rengin spektrofotometrik olarak 595nm'de ölçümüne dayanmaktadır (Bradford, 1976).

#### **Doku Homojenatlarının Hazırlanması:**

MDA, NO, GSH ve PON-ARE ölçümlerinde kullanılan homojenizatlar kullanıldı.

#### **Çözeltiler:**

- Reaktif: Coomassie Brilliant Blue G-250 tartıldı. 12.5 ml %95'lik etanolde çözdürüldü ve üzerine 25 ml  $H_3PO_4$  eklendi. Son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Bu stok çözeltilerdir. Kullanılacağı zaman 5 katı seyreltilip Whatman filtre kağıdından süzülüp öyle kullanıldı.

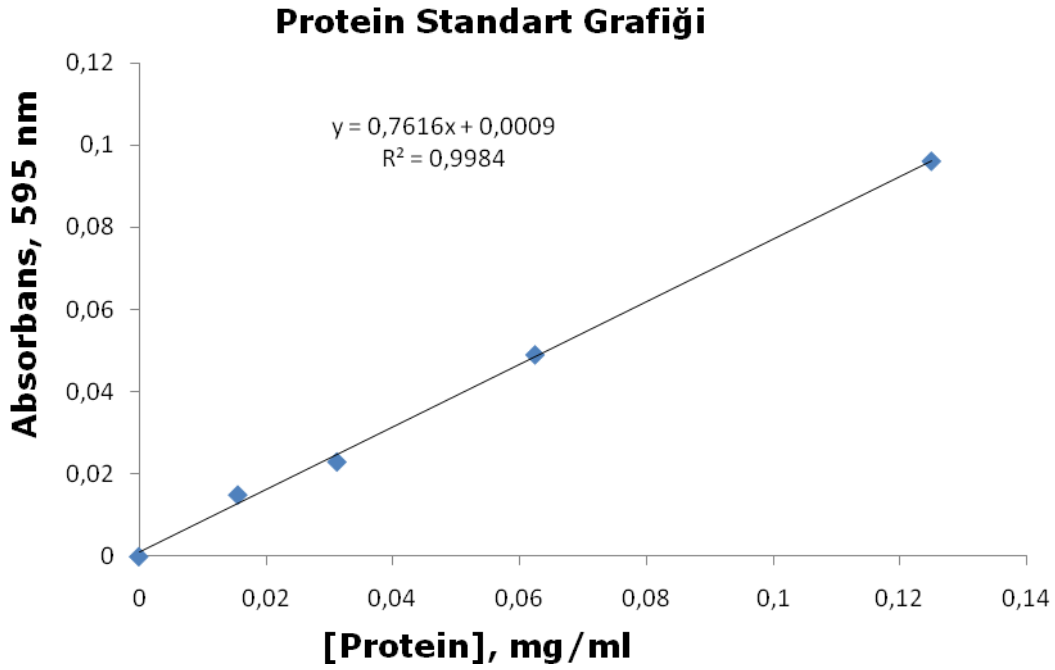
#### **Deney Protokolü:**

Mikroplate kör, örnek ve standart için hazırlandı. Kör kuyucuğa 5  $\mu$ l distile su, örnekler için homojenizattan 5  $\mu$ l ve standartlar için hazırlanmiş olan farklı konsantrasyonlardan 5'er  $\mu$ l eklendi. Daha sonra üzerlerine 250  $\mu$ l Bradford rekatifi eklendi ve 5 dakika sonra 595 nm'de ölçüldü.



## Sonuçların Hesaplanması:

Örnek konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için standart çözelti olarak 0.015, 0.031, 0.062, 0.125 mg/ml konsantrasyonlarında sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Yukarıdaki prosedür uygulanıp ölçülen absorbans ve konsantrasyonlar Microsoft Office Excel 2010 programı kullanılarak bir standart grafiği oluşturuldu (Şekil 3.7.). Örneklerin Konsantrasyonu standart grafiği kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.7. Protein standart grafiği.

## 3.9 Karaciğer ve Böbrek Dokularında Yapılan Histolojik İşlemler

Kontrol, parasetamol ve PARA+Betain gruplarını oluşturan tüm sıçanlardan karaciğer ve böbrek örnekleri alındı. Alınan karaciğer ve böbrek örneklerinin % 10'luk formalin fiksasyonu içinde 48 saat süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'şer dakika ksilolde bekletildi. Karaciğer ve böbrek örnekleri şeffaflanmalarının

ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi.

Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutularak, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamlar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi.

Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eozin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eozin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflaştırıldı ve şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapılarak karaciğer ve böbrek örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 digital kamera ile fotoğrafları çekildi.

### **3.10 İstatistiksel Analiz**

Çalışmanın istatistiksel analizleri, Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapıldı. İstatistiksel analizde SPSS 22.0 Windows kullanıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Gruplara arasındaki farklılıklar değerlendirmek amacıyla Kruskal-Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi testi kullanılmıştır.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4 Bulgular

### 4.1 Biyokimyasal Bulgular

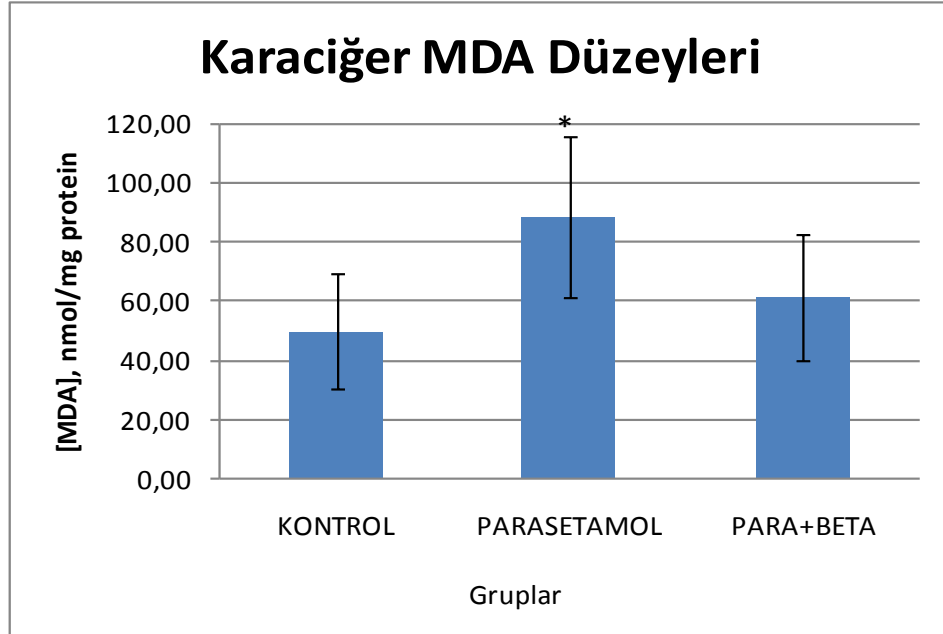
#### 4.1.1 Karaciğer MDA bulguları

Çalışmamızda, gavaj yolu ile PARA uygulanan grubun MDA düzeyleri kontrol grubunun düzeylerinden anlamlı derecede yüksekti ( $p < 0.05$ ). "Kontrol ile PARA+Betain grubunun" ve "PARA ile PARA+Betain grubunun" MDA düzeyleri karşılaştırıldığında ise aralarında herhangi bir fark bulunamadı (Tablo 4.1.; Şekil 4.1.).

**Tablo 4.1.** Karaciğer MDA düzeyleri.

Gruplar	N	Karaciğer MDA Düzeyi (nmol/mg protein $\pm$ s.s)
Kontrol	8	49,78 $\pm$ 19,37
PARA	8	88,52 $\pm$ 27,51 *
PARA + Betain	8	61,11 $\pm$ 21,42

\* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$



**Şekil 4.1.** Karaciğer MDA Düzeyleri.

\* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$

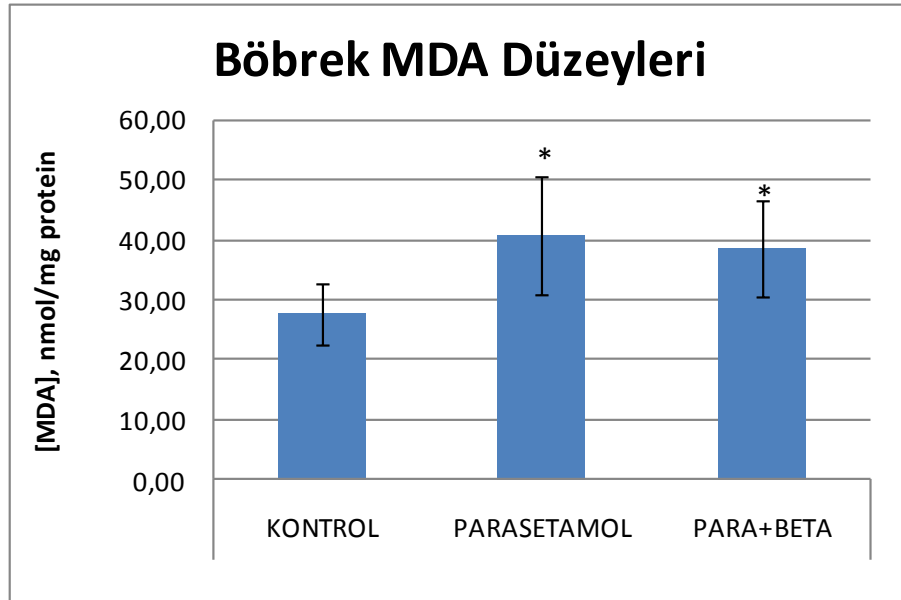
#### 4.1.2 Böbrek MDA bulguları

Çalışmamızda, PARA ve PARA+Betain grubunun MDA düzeyleri kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksekti ( $p<0.05$ ). PARA ile PARA+Betain gruplarının MDA düzeyleri arasında ise herhangi bir anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.2; Şekil 4.2).

**Tablo 4.2.** Böbrek MDA düzeyleri.

Gruplar	N	Böbrek MDA Düzeyi (nmol/mg protein $\pm$ s.s)
Kontrol	8	27,76 $\pm$ 5,14
PARA	8	40,81 $\pm$ 9,79 *
PARA + Betain	8	38,65 $\pm$ 8,01 *

\* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$



**Şekil 4.2.** Böbrek MDA Düzeyleri.

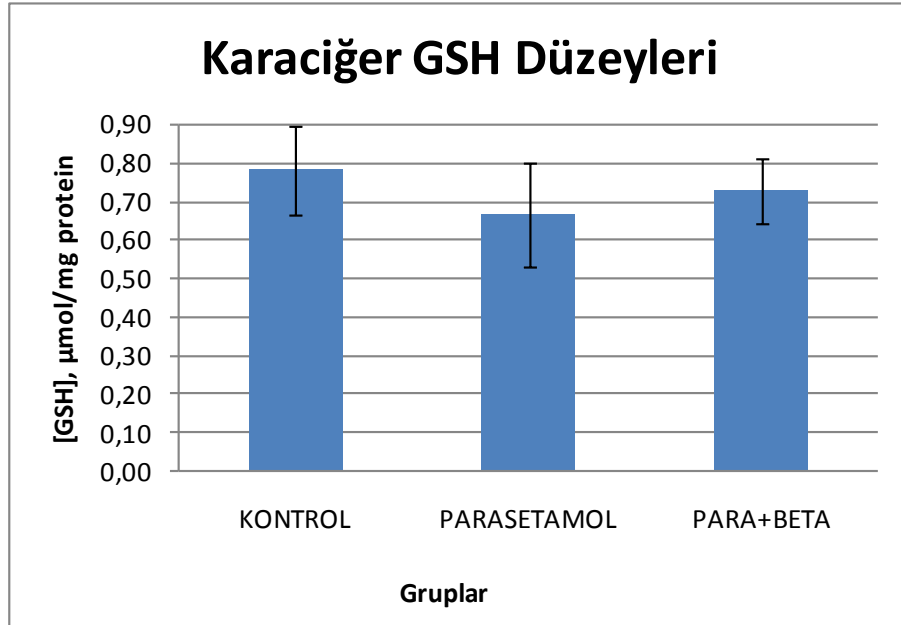
\* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$

### 4.1.3 Karaciğer GSH bulguları

Çalışmada karaciğer; PARA grubunun GSH düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PARA grubunda bir düşüşün olduğu gözlemlendi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bir farkı ifade etmemektedir (Tablo 4.3.; Şekil 4.3.).

**Tablo 4.3.** Karaciğer GSH bulguları.

Gruplar	N	Karaciğer GSH Düzeyi ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein $\pm$ s.s)
Kontrol	8	0,78 $\pm$ 0,11
PARA	8	0,67 $\pm$ 0,13
PARA + Betain	8	0,73 $\pm$ 0,09



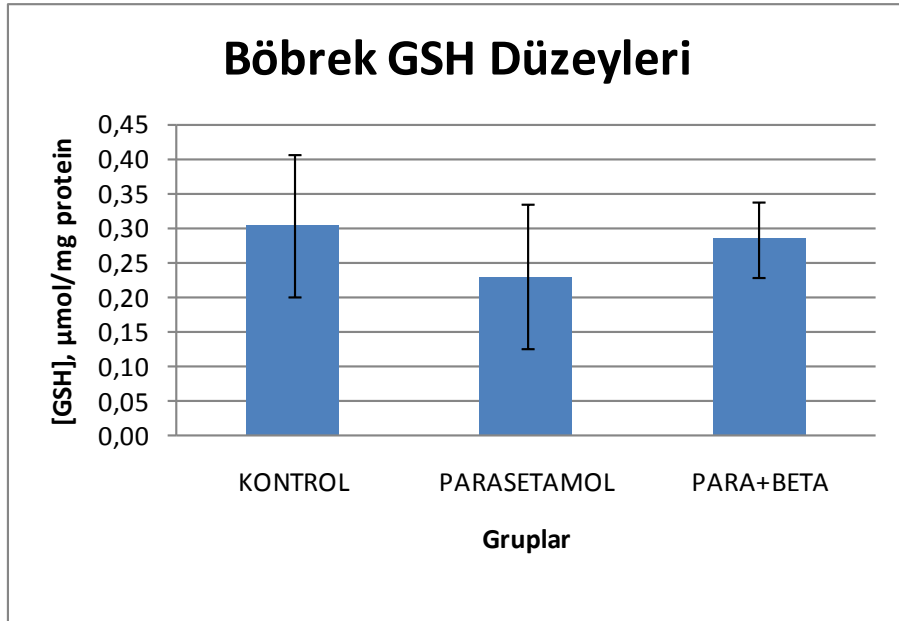
**Şekil 4.3.** Karaciğer GSH bulguları

#### 4.1.4 Böbrek GSH bulguları

Çalışmada böbrek; PARA grubunun GSH düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PARA grubunda bir düşüşün olduğu gözlemlendi ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bir farkı ifade etmemektedir (Tablo 4.4.; Şekil 4.4.).

**Tablo 4.4.** Böbrek GSH bulguları.

Gruplar	N	Böbrek GSH Düzeyi ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein $\pm$ s.s)
Kontrol	8	0,30 $\pm$ 0,10
PARA	8	0,23 $\pm$ 0,10
PARA + Betain	8	0,28 $\pm$ 0,05



**Şekil 4.4.** Böbrek GSH bulguları.

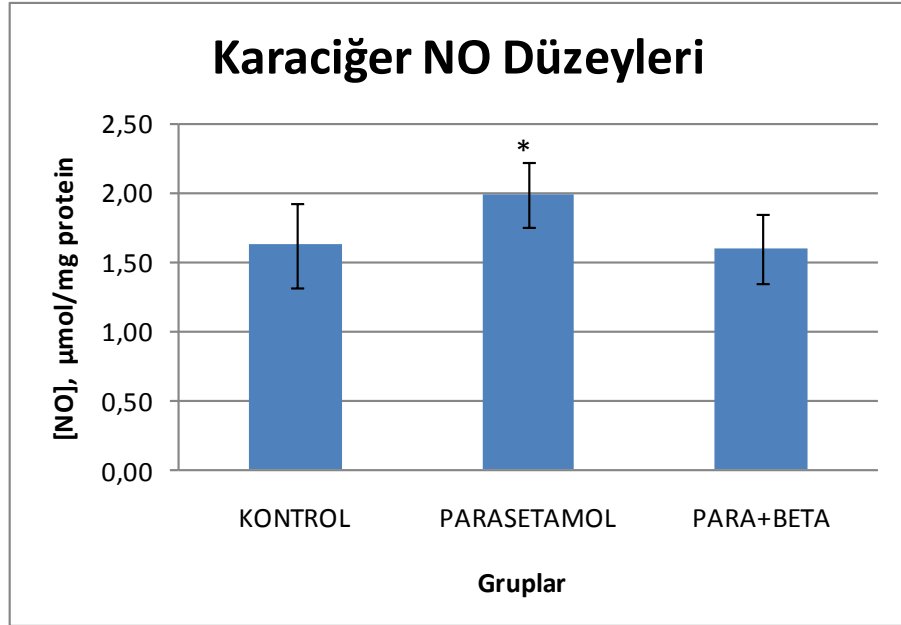
#### 4.1.5 Karaciğer NO bulguları

Çalışmamızda, PARA grubunun NO düzeyleri kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksekti ( $p < 0.05$ ). "Kontrol ile PARA+Betain grubunun" ve "PARA ile PARA+Betain grubunun" NO düzeyleri karşılaştırıldığında ise aralarında herhangi istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4.5.; Şekil 4.5.).

**Tablo 4.5.** Karaciğer NO bulguları.

Gruplar	N	Karaciğer NO Düzeyi ( $\mu\text{mol}/\text{mg protein} \pm \text{s.s}$ )
Kontrol	8	1,62 $\pm$ 0,30
PARA	8	1,99 $\pm$ 0,23 *
PARA + Betain	8	1,60 $\pm$ 0,25

\* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$



**Şekil 4.5.** Karaciğer NO düzeyleri.

\* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$

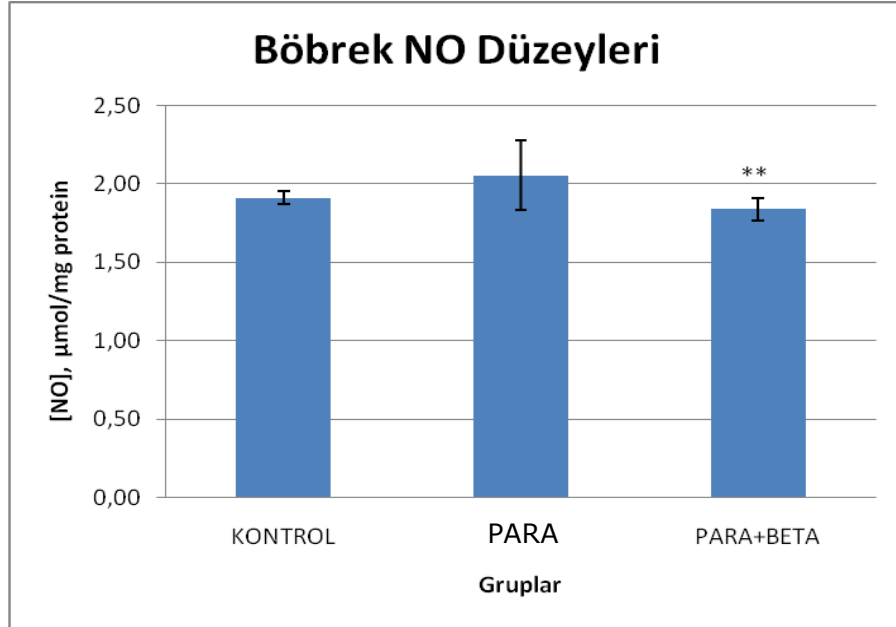
#### 4.1.6 Böbrek NO bulguları

Çalışmada PARA+Betain grubunun NO düzeyleri PARA grubu ile karşılaştırıldığında PARA+Betain grubunun NO düzeyinin anlamlı düzeyde düştüğü gözlemlendi ( $p<0.05$ ). "Kontrol ile PARA grubunun" ve "Kontrol ile PARA+Betain grubunun" NO düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan herhangi bir anlamlı fark tespit edilemedi (Tablo 4.6.; Şekil 4.6).

**Tablo 4.6.** Böbrek NO bulguları.

Gruplar	N	Böbrek NO Düzeyi ( $\mu\text{mol}/\text{mg protein} \pm \text{s.s.}$ )
Kontrol	8	1,91 $\pm$ 0,04
PARA	8	2,06 $\pm$ 0,22
PARA + Betain	8	1,84 $\pm$ 0,07 **

\*\* : PARA grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$



**Şekil 4.6.** Böbrek NO bulguları.

\*\* : PARA grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$



#### 4.1.7 Karaciğer PON ve ARE bulguları

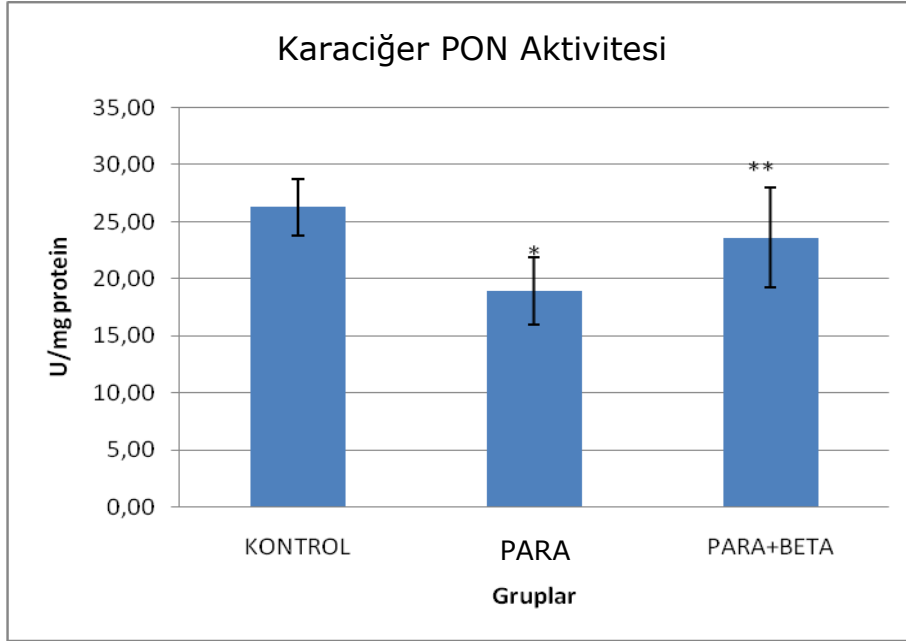
Çalışmamızda karaciğer; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PARA grubunun PON aktivitesi istatistiksel açıdan bir anlam ifade edecek derecede düştü ( $p<0.05$ ). PARA+Betain grubunun ise PARA grubu ile karşılaştırıldığında PON aktivitesi anlamlı bir şekilde yükselmiştir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu ile PARA+Betain grupları arasında ise istatistiksel açıdan anlam ifade edecek bir fark görülmedi. ARE düzeylerinde ise gruplar arasında herhangi anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.7; Şekil 4.7.; Şekil4.8.).

**Tabo 4.7.** Karaciğer PON ve ARE bulguları.

Gruplar	N	Karaciğer PON Aktivitesi (U/mg protein $\pm$ s.s.)	Karaciğer ARE Aktivitesi (U/mg protein $\pm$ s.s.)
Kontrol	8	26,29 $\pm$ 2,48	10,79 $\pm$ 3,36
PARA	8	18,93 $\pm$ 2,93 *	8,36 $\pm$ 3,53
PARA + Betain	8	23,62 $\pm$ 4,35 **	12,60 $\pm$ 3,12

\* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$

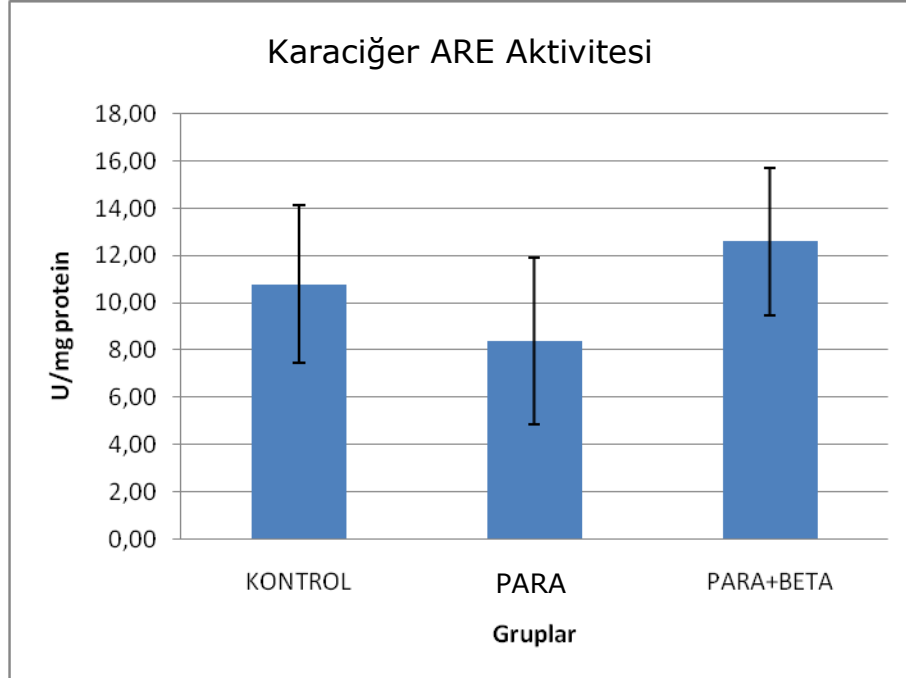
\*\* : PARA grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$



**Şekil 4.7.** Karaciğer PON bulguları.

\* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$

\*\* : PARA grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$



**Şekil 4.8.** Karaciğer ARE bulguları.

#### 4.1.8 Böbrek PON ve ARE bulguları

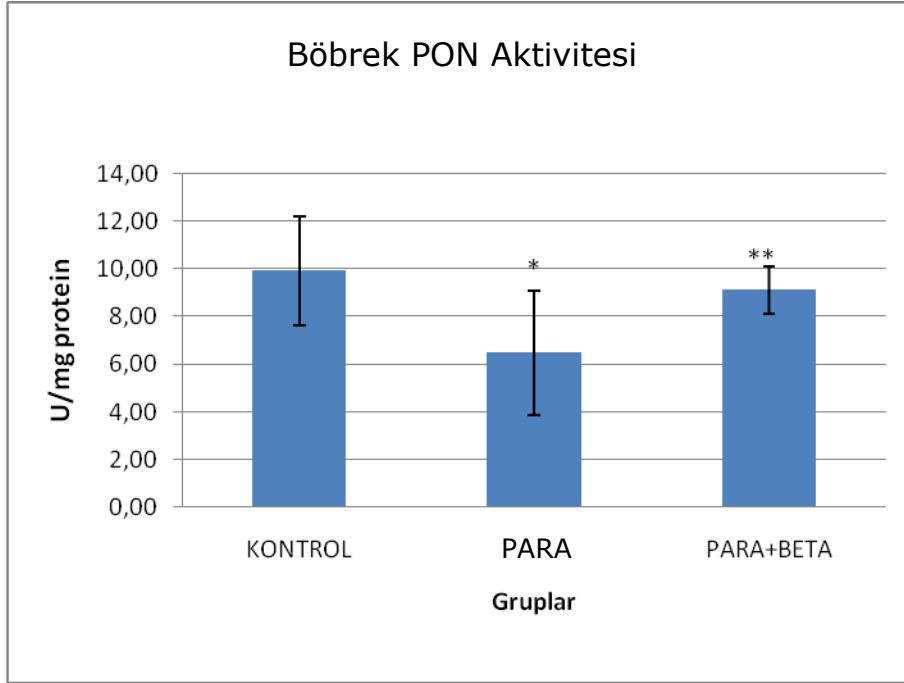
Çalışmamızda böbrek; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PARA grubunun PON aktivitesi istatistiksel açıdan bir anlam ifade edecek derecede düştü ( $p<0.05$ ). PARA+Betain grubunun ise PARA grubu ile karşılaştırıldığında PON aktivitesi anlamlı bir şekilde yükselmiştir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu ile PARA+Betain grupları arasında ise istatistiksel açıdan anlam ifade edecek bir fark görülmedi. Arilesteraz (ARE) düzeylerinde ise gruplar arasında herhangi anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.8.; Şekil 4.9.; Şekil 4.10).

**Tablo 4.8.** Böbrek PON ve ARE bulguları.

Gruplar	N	Böbrek PON Aktivitesi (U/mg protein $\pm$ s.s.)	Böbrek ARE Aktivitesi (U/mg protein $\pm$ s.s.)
Kontrol	8	9,93 $\pm$ 2,29	35,36 $\pm$ 5,63
PARA	8	6,48 $\pm$ 2,60 *	30,98 $\pm$ 4,91
PARA + Betain	8	9,12 $\pm$ 0,98 **	35,90 $\pm$ 6,78

\* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$

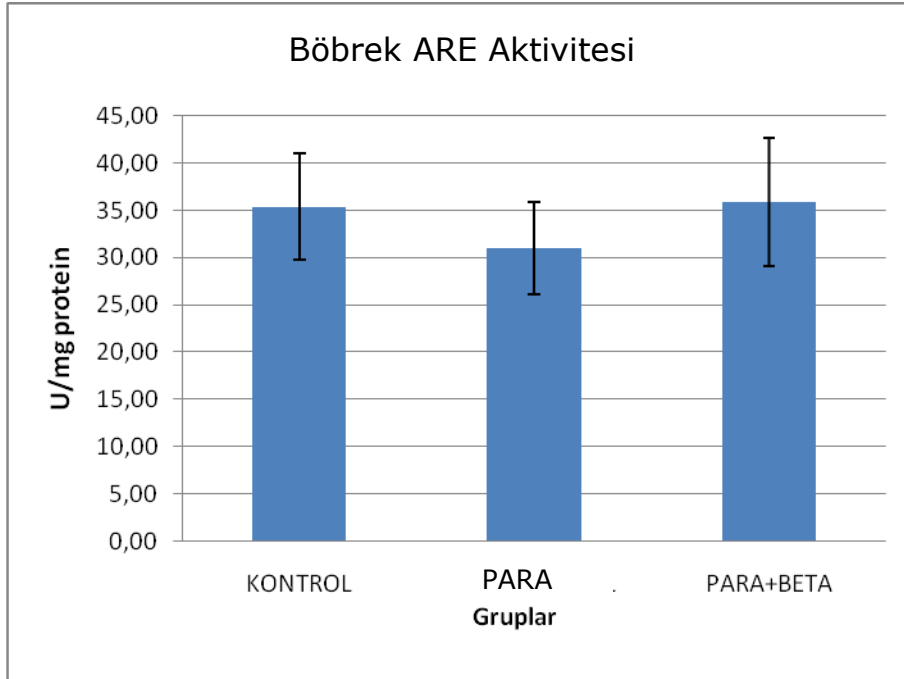
\*\* : PARA grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$



**Şekil 4.9.** Böbrek PON bulguları.

\* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$

\*\* : PARA grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$

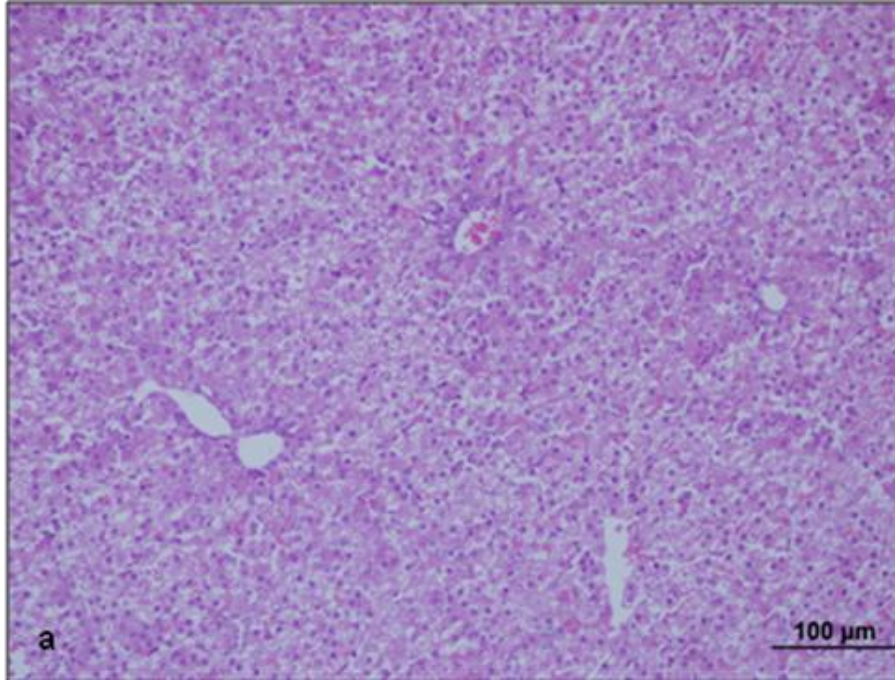


**Şekil 4.10.** Böbrek ARE bulguları.

## 4.2 Histolojik Bulgular

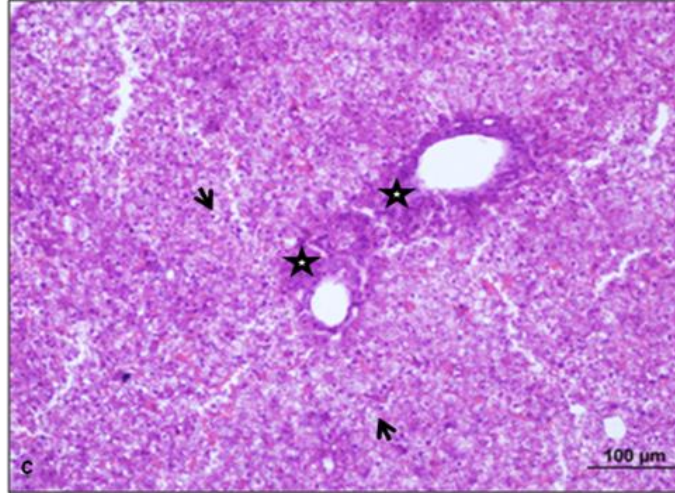
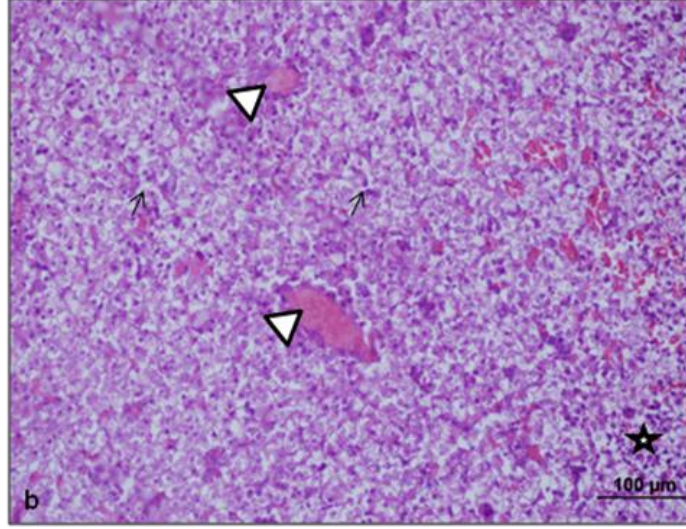
### 4.2.1 Karaciğer Dokusunda Histolojik Bulgular

Çalışmamızda karaciğer dokuları HE boyama yöntemi ile incelendi.



**Şekil 4.11.** Kontrol grubu histolojik görüntüsü (HE, skala bar: 100µm, X20).

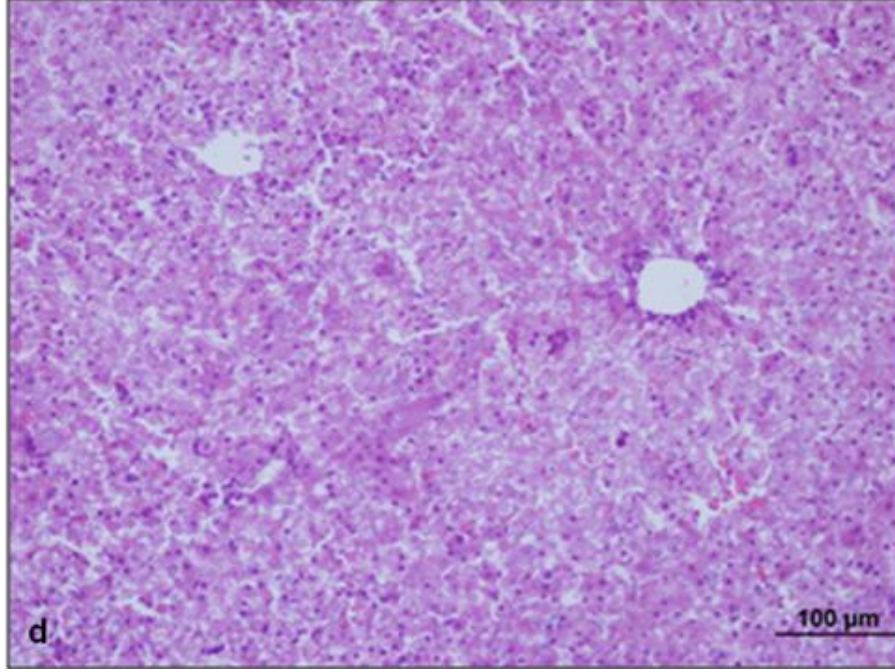
Kontrol grubunda hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapıları ile normal histolojik yapıdaki fetal karaciğer yapısı izlendi (Şekil 4.11.).



**Şekil 4.12.** Parasetamol grubunun histolojik görüntüsü (HE, skala bar: 100µm, X20).

\* Farklı büyütmelerde parankim dokuda yoğun hücresel dejenerasyon (→), sentral vende kongesyon (►), parankim dokuda ve perivasküler alanlarda hücresel infiltrasyon (\*) izlendi.

Parasetamol grubunda farklı büyütmelerde parankim dokuda yoğun hücresel dejenerasyon, sentral vende kongesyon, parankim dokuda ve perivasküler alanlarda hücresel infiltrasyon görüldü (Şekil 4.12.).

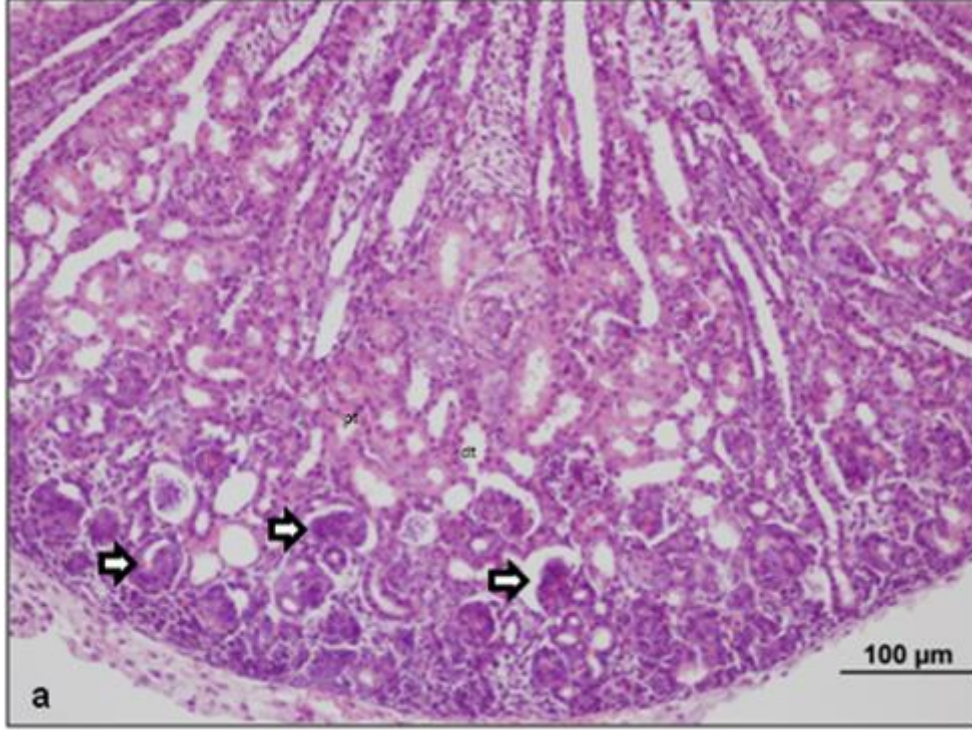


**Şekil 4.13.** PARA+Betain grubunun histolojik görüntüsü (HE, skala bar: 100µm, X20).

PARA+Betain grubunda farklı büyütmelerde hepatosit hücreleri ve sinozoidal yapıları ile azalmış hücresel hasar ve azalmış infiltrasyon ile normale yakın fetal karaciğer yapısı izlendi (Şekil 4.13.).

#### 4.2.2 Böbrek Dokusunda Histolojik Bulgular

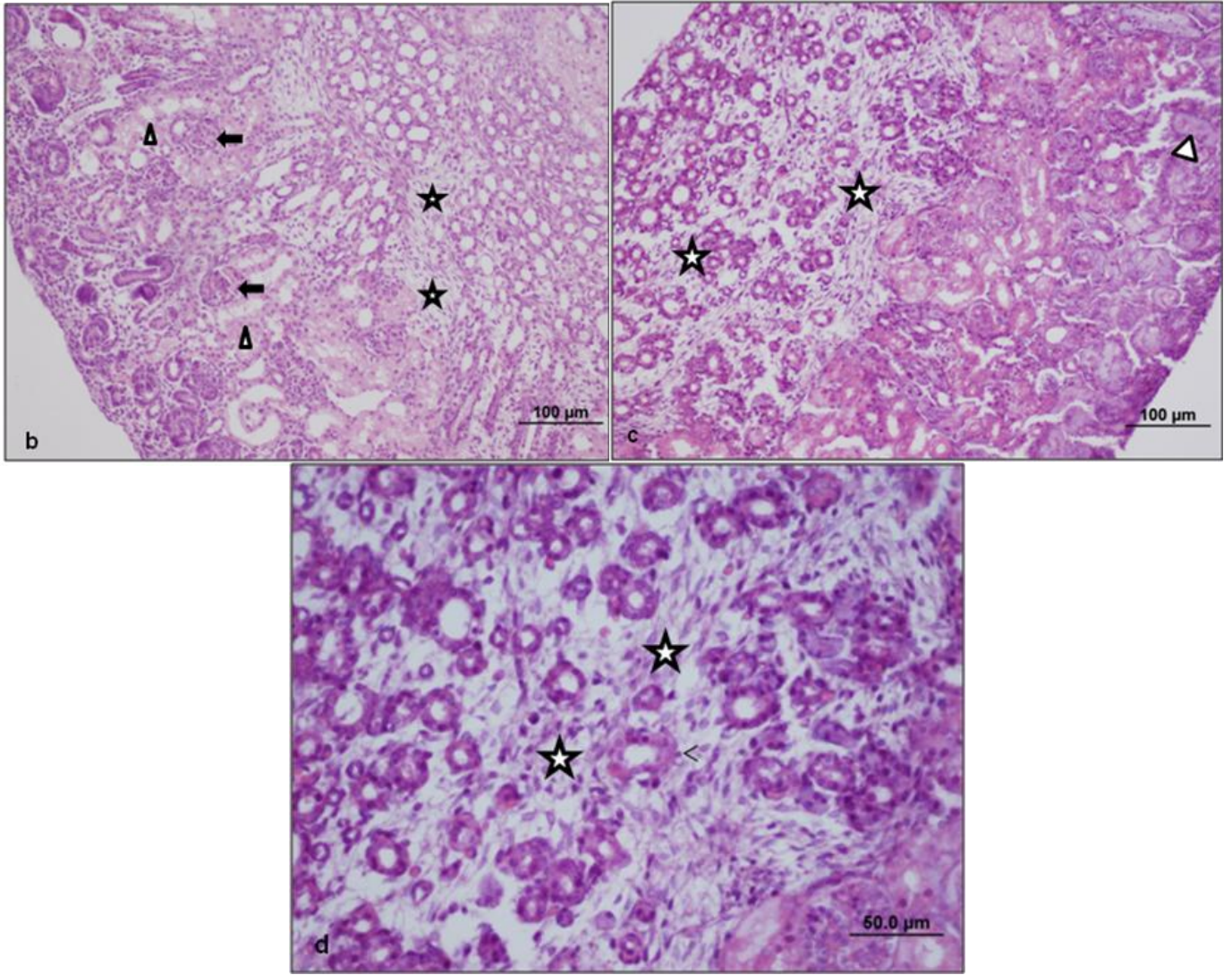
Çalışmamızda karaciğer dokuları HE boyama yöntemi ile incelendi.



**Şekil 4.14.** Kontrol grubunun histolojik görüntüsü (HE, skala bar: 100µm, X20).

Kontrol grubunda Malpighi cisimciğinde gözlenen normal glomürel yapı ve tübüler yapılar ile normal görünümlü fetal böbrek yapısı gözlemlendi (Şekil 4.14.).

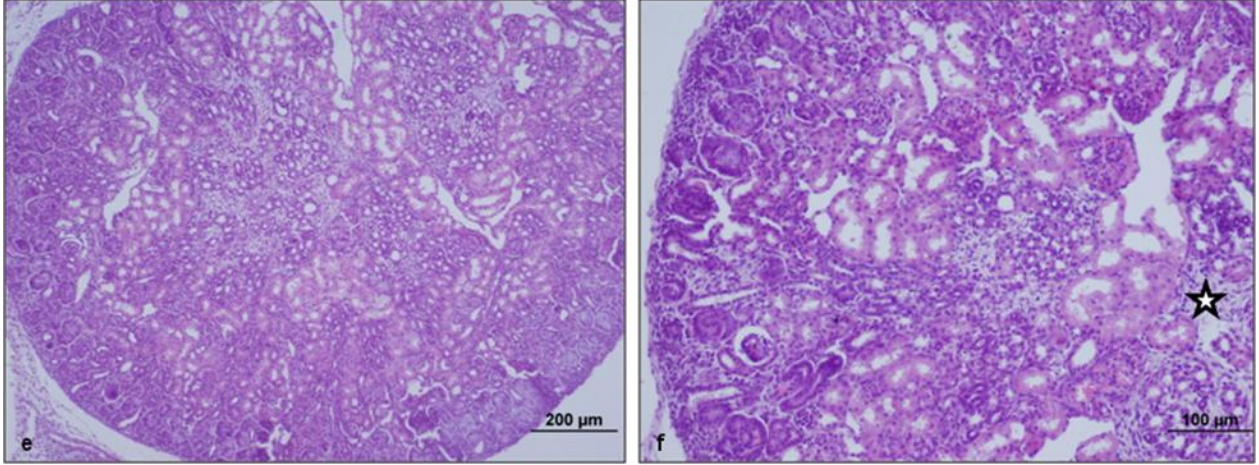




**Şekil 4.15.** Parasetamol grubun un histolojik görüntüsü (HE, sakala bar: 100µm, 50.0µm, X20, X40).

\* Farklı büyültmelerde Malpighi cisimciğinde Bowman aralığında daralma (→), nekrotik tübüler yapılar (▶) ve intersitisyel fibrozis (\*) gözlenen fetal böbrek yapısı.

Parasetamol grubunda farklı büyültmelerde Malpighi cisimciğinde Bowman aralığında daralma, nekrotik tübüler yapılar ve intersitisyel fibrozis fetal böbrek yapısı gözlemlendi (Şekil 4.15.).



**Şekil 4.16.** PARA+Betain grubunun histolojik görüntüsü (HE, skala bar: 200µm, 100µm, X10 X20).

\* Farklı büyültmelerde normale yakın gözlenen Malpighi cisimcikleri ve azalmış tübüler hasar ile azalmış interstisyel fibrozis alanları (\*) görülmekte

PARA+Betain grubunda farklı büyültmelerde normale yakın Malpighi cisimcikleri ve azalmış tübüler hasar ile azalmış intersitisyel fibrozis alanları gözlemlendi (Şekil 4.16.).

## 5 TARTIŞMA

Parasetamol (Asetaminofen) dünya çapında hamilelik sırasında hafif ya da orta şiddetli ağrılarda en çok önerilen ağrı kesicidir. PARA kullanımının uzun yıllardır güvenliği hakkında birçok çalışma yapılmaktadır. Parasetamol klirensi çocuk ve yetişkinlere oranla yeni doğanlarda daha düşüktür. Metabolik dönüşümünden sonra renal yolla atılan PARA'nın metabolik dönüşümü, karaciğerde glukuronik asit ve sülfat ile konjuge edilerek gerçekleşmektedir (Scialli vd., 2010). Bunun yanında az bir kısmı değişmeden atılırken aşağı yukarı %8 ile %10'luk bir kısmı da toksik bir metaboliti olan NAPQI'a dönüşmektedir (Pacifici & Allegaert, 2015).

Oluşan NAPQI hızlı bir şekilde özellikle karaciğerde GSH aracılığı ile konjugasyona uğrayarak detoksifiye edilmekte ve bunun sonucu olarak aşırı dozlardaki NAPQI total hepatik GSH düzeylerinin azalmasına neden olmaktadır. Buna bağlı olarak da NAPQI sistein grubu içeren amino asitlere kovalan olarak bağlanmaktadır (James vd., 2003). Aynı zamanda mitokondriyal proteinelere de bağlanan NAPQI, mitokondriyal oksidatif stresi de başlatır. Mitokondri içerisinde oluşan süperoksit radikalleri NO ile peroksinitrite dönüşür ve bu oluşan reaktif oksijen türleri ile reaktif nitrojen türleri mitokondri DNA'sının hasarlanmasına sebep olurken mitokondriyal membranın da permeabilitesini kaybetmesine sebebiyet verir. Bunların bir sonucu olarak da hücre nekrotik hücre ölümü yolağına girer Ayrıca oksidatif stresin önemli göstergelerinden biri olan lipit peroksidasyonu, Parasetamol toksisitesinin oluşturduğu önemli sonuçlarından birisidir. Bu durumda bozulmuş olan hücre membranı hücrenin ölüm ile sonuçlanmasına neden olmaktadır (Jaeschke vd., 2011).

PON1 karaciğer tarafından sentezlenmekte ve dolaşımdaki yüksek yoğunluklu lipoproteinlere (HDL) bağlanmaktadır. PON1'in asıl işlevi spesifik okside kolesterol esterlerini ve fosfolipitleri indirgeyerek, lipoproteinleri ve hücreleri lipit peroksidasyonundan korumaktır. Okside lipitler PON1'i etkisiz hale getirmektedir. Non-alkolik karaciğer hastalıklarının gelişmesinde oksidatif stres ana rolü üstlenmektedir. Non-alkolik karaciğer hastalarının mitokondriyal morfolojilerinin ve fonksiyonlarının bozuk olması serbest radikal üretimini arttırmakta aynı zamanda lipit peroksidasyonuna da sebebiyet vermektedir. Bu yüzden beklendiği gibi PON1 aktivitesindeki azalma non-alkolik karaciğer hastalıklarıyla ilişkili olabilmektedir (Camps & Joven, 2015). PON1 ve arilesteraz aktiviteleri karaciğerin fonksiyonları ile ilgili bir gösterge olarak önem taşımakta ve PON1 ile arilesterazın ilişkisi tek bir enzim gibi fonksiyon gösterdiği yönündedir (Kilic vd., 2005).

Literatürde PARA ile ilgili yapılan birçok çalışma bulunurken hamilelikte uzun dönem kullanılan PARA'nın yeni doğanlar üzerindeki hepatotoksik ve nefrotoksik etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan çalışmalarda yüksek doz PARA'nın, hücresele GSH düzeylerini azaltırken, lipit peroksidasyonunun artmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Abdul Hamid ve arkadaşları oral yolla 7 gün boyunca 750 mg/kg PARA uyguladıkları grubun böbrek MDA düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında önemli derecede artış olduğunu buna karşılık GSH düzeylerinde de anlamlı derecede düşüş olduğunu göstermişlerdir (Hamid vd., 2012). Yine bir başka çalışmada Galal ve arkadaşları tek doz (2 g/kg) uyguladıkları parasetamol grubunu kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında; parasetamol grubu karaciğer MDA düzeylerinde artışın; GSH düzeylerinde ise %66 oranında azalmanın olduğunu yüzdelik olarak göstermişlerdir (Galal, Zaki, El-Nasr, & Agha, 2012). Naguib ve arkadaşlarının farelerde tek doz 500 mg/kg parasetamol uyguladıkları çalışmada hem hepatotoksiteyi hem de nefrotoksiteyi aynı anda incelediler. Hem karaciğer de hem de böbrekte sonuçların bir birine korele olduğunu göstermişlerdir. Sonuçlara göre parasetamol grubu karaciğer ve böbrek MDA düzeylerinde artışın olduğunu, GSH düzeylerinde ise azalmanın olduğunu belirtmişlerdir. GSH düzeylerindeki azalmanın; parasetamolün sitokrom p450 sistemi ile NAPQI'a dönüşümünden sonra hızlı bir şekilde GSH'ın sülfidril grubuna bağlanmasıyla gerçekleştiğini açıklamışlardır. Aynı zamanda azalan GSH düzeylerinin; GPx, SOD ve GST gibi antioksidan enzim seviyelerinin düşmesine sebebiyet vererek ROT'un antioksidan kapasiteyi aşarak artan ROT'un lipit peroksidasyonuna yol açtığını düşünmektedirler (Naguib, Azmy, Samaka, & Salem, 2014).

Çalışmamızda terapötik dozda hamileliğin ilk gününden doğumun olacağı güne kadar uyguladığımız Parasetamol (30 mg/kg) grubunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri istatistiksel açıdan bir anlam ( $p < 0,05$ ) ifade edecek şekilde PARA grubunda daha yüksekti. Bu da bize terapötik dozlarda bile hamilelik sürecinde alınan Parasetamolün yeni doğan yavrularında hepatotoksiteye ve nefrotoksiteye neden olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte istatistiksel açıdan anlam ifade etmese de karaciğer ve böbrek GSH düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PARA grubunda bir miktar düşüşün olduğu gözlemlenmiştir. Bu düşüş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer dokusu PARA grubunda % 14'lük kadar bir düşüş olurken, böbrek dokusu PARA grubunda ise % 23'lük kadar bir düşüş görülmüştür. Ancak literatür taramalarımızda terapötik dozda uzun dönem maternal uygulanmış ve etkisi yeni doğanlarda incelenmiş bir çalışmaya rastlamadık.

Literatür taramalarımızda PARA'nın NO üzerindeki etkisini gösteren çalışmalara da rastladık. Inkielewicz ve arkadaşlarının dişi ve erkekler sıçanlar ile aynı anda yaptıkları çalışmada Parasetamolün karaciğer ve böbrek

üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Hem dişilerin hem de erkeklerin karaciğer ve böbreklerinde; 6 hafta boyunca gavaj yoluyla Parasetamol (150 mg/kg) uyguladıkları grubun kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında NO düzeylerinde artışın olduğu gösterilmiştir (Stepniak & Knap, 2012). Yine ilgili bir başka çalışmada, Abdel-Zaher ve arkadaşları Parasetamol uyguladıkları çalışmada rat karaciğer ve böbreklerini incelemişlerdir. Parasetamol ile indüklenmiş grubun kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında NO düzeylerinin yükseldiğini göstermişlerdir. Bu durumu PARA ile indüklenen gruplarda karaciğerin sentrilobüler bölgelerinin hasarlanmasının bir sonucu olarak iNOS ekspresyonunun artmasından dolayı NO sentezinin arttığını açıklamışlardır (Zaher, Rahman, Hafez, & Omran, 2007). Çiğremiş ve arkadaşlarının tavşanlar üzerinde tek doz intraperitoneal yolla Parasetamol (250mg/kg) uyguladıkları çalışmada, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Parasetamol grubunun karaciğer NO düzeylerinin yükselmiş olduğunu göstermişlerdir. NO düzeylerindeki artışın sebebi olarak ise iNOS aktivitesindeki artışa bağlamışlardır (Cigremis vd., 2009).

Araştırmamızda hamileliğin ilk gününden doğumun olacağı güne kadar uyguladığımız terapötik dozda Parasetamol (30 mg/kg) grubunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, karaciğerde istatistiksel açıdan bir anlam ( $p<0,05$ ) ifade edecek şekilde NO düzeyinin PARA grubunda arttığı; böbrek NO düzeyinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise PARA grubunda belli bir miktar arttığı ancak bu artışın istatistiksel açıdan anlam ifade edecek bir artış olmadığı gösterilmiştir. Yukarıda yapılmış çalışmalar ışığında karaciğerdeki NO'nun istatistiksel açıdan anlam ifade eden artışının ve böbrekteki NO düzeylerinin artış sebebinin Parasetamol ile indüklenmiş gruplarda oluşan hepatotoksisite ve nefrotoksisitede meydana gelen süperoksit radikalleri ile reaksiyona giren NO peroksinitriti oluşturur ve hücre içerisinde miktarı azalan NO, iNOS'un aktivitesinin artmasını tetikler ve böylelikle artan enzim aktivitesi NO miktarında artışa sebep olur.

Literatürde ratlar üzerinde parasetamol ile indüklenmiş hepatotoksisite ve nefrotoksisitede paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi ile ilgili nerdeyse hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Karadaş ve arkadaşları insanlar üzerinde yaptıkları çalışmada doz aşımı Parasetamol kullanan hasta grubun normal kontrol grubu ile kıyaslandığında PARA grubuna ait bireylerin serum PON1 ve ARE düzeylerinin önemli derecede düştüğünü ( $p<0,001$ ) göstermişlerdir. Bunun nedeni olarak da Parasetamolun oluşturduğu toksisite ve bir biri ile ilişkili olan artmış oksidatif stres ileri sürülmüştür. Yine aynı çalışmada PON1'in ve ARE'nin antioksidan enzimlerden olduğu ve hücreyi lipid peroksidasyonuna karşı koruduğundan bahsetmişlerdir (Karadas vd., 2014). Hafez ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları bir başka çalışmada ise hepatotoksisite yaratabilmek için  $CCl_4$  uygulamışlardır. Yaptıkları bu çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırılınca  $CCl_4$  uygulanan grubun PON1 düzeylerinin anlamlı ( $p<0,05$ ) bir şekilde düştüğünü

göstermişlerdir. Karbon tetraklorür oldukça reaktif serbest radikaller üretir ve bu radikaller sülfhidril grupları içeren GSH ve protein tiyolleri gibi yapılarla reaksiyona girerler. PON1'in antioksidan aktivitesi ise -SH grupları ile ilişkilidir; bu yüzden PON1'in antioksidan aktivitesindeki düşüş moleküldeki serbest tiyol gruplarının sayısının değişmesiyle ilgili olabileceğini ileri sürmektedirler. Bu bilgilerle CCl<sub>4</sub> uygulanması, oksidatif stresi indükleyip lipid peroksidasyonunu arttırır ve PON1'in aktivitesi bunlara bağlı olarak azalır fikrini desteklemektedir (Hafez vd., 2014).

Çalışmamızda terapötik dozda hamileliğin ilk gününden doğumun olacağı güne kadar uyguladığımız Parasetamol (30 mg/kg) grubunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer ve böbrekte PON ve ARE düzeylerinin bir birine korole sonuçlar gösterdiğini bulduk. Bu sonuçlara göre karaciğer ve böbrekte PARA uygulanan grubun kontrol ile karşılaştırıldığında PON düzeylerinin (p<0,05) önemli derecede, ARE düzeylerinin ise bir miktar düştüğünü ancak bu düşüşün istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediğini gösterdik. Birer antioksidan enzim olan PON ve ARE, Parasetamolün reaktif bir metaboliti olan NAPQI'in oluşturduğu oksidatif stresi diğer antioksidan enzimler gibi elemine eder bu da seviyelerindeki azalmaya sebep olur. Yine yukarıdaki bilgiler ışığında PARA grubundaki PON aktivitesinin azalmasını NAPQI'in ve NAPQI aracılı oluşan reaktif oksijen türlerinin enzim üzerindeki -SH grupları ile birleşmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Birçok hayvan çalışması Betain'in iyi bir metilleme ajanı olduğunu göstermiştir. Ratların karaciğer, böbrek ve testislerinde bulunan bir enzim olan Betain-homosistein metil transferaz (BHMT) Betaini metil donörü olarak kullanır homosisteini remetile ederek metiyonine dönüştürür (Schwahn vd., 2004). Metiyonin yine SAM (s-adenozil metiyonin) üzerinden homosisteine dönüşmektedir. Homosisteinin yine bir yoluğu sistein üzerinden GSH sentezine gitmektedir. Bu yolakta sistein biyosentezi GSH üretimi için hız kısıtlayıcı basamaktır. Parasetamolün toksik bir metaboliti olan NAPQI hızla GSH'in -SH grupları ile konjuge olarak atılmaktadır. Bu da hücre içi GSH miktarının düşmesine sebebiyet vermektedir. Ortamdaki Betain bolluğunda ve BHMT'nin düzenlenmesi PARA'nın oluşturduğu toksisiteye karşı direncin gelişmesi artacaktır (Liu vd., 2010). Aynı zamanda Betain lipotropiktir, dışarıdan verildiğinde membran lipid tabakasını hızla geçer ve hücrel membranlarda lipid peroksidasyonu inhibe eder. Betain uygulanmasının nekrotik hasara karşı koruyucu olduğu Kim ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Kim & Kim, 1998).

Kanbak ve arkadaşları etanol ile indüklediği hepatotoksisitede betainin koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmada kontrol, etanol ve etanol+betain olmak üzere 3 grup oluşturmuşlardır. Kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında etanol grubunda MDA düzeylerinin anlamlı düzeyde yükseldiğini buna karşılık

etanol+betain uyguladıkları grupta MDA'nın neredeyse kontrol grubundaki seviyeye yakın bir seviyede olduğunu ve etanol grubundan anlamlı derecede farklı olduğunu göstermişlerdir (Kanbak, İnal, & Bayçu, 2001). Küçükgergin ve arkadaşları dietilnitrozamin (DEN) ile indüklediği hepatotoksistede Betainin koruyucu etkisine bakmışlardır. Bulgularında hasta grubun karaciğer MDA düzeylerinin istatistiksel açıdan bir anlam oluşturacak şekilde yükseldiğini ve Betain+DEN grubunda, DEN grubu ile karşılaştırıldığında yükselen MDA düzeyinin düştüğünü göstermişlerdir. Betainin pre-tedavi uygulanması, hepatik prooksidan düzeyini azalttığını göstermişlerdir. Araştırmalarında antioksidan enzim düzeylerinde bir değişikliğe sebep olmaması Betainin koruyucu rolünün oksidan süpürücü özelliğinden kaynaklandığını ileri sürmektedirler. Aynı zamanda Betainin SAM düzeylerinin artmasına sebebiyet vermektedir ve artan SAM düzeyleri hepatosit membranlarını düzelterip lipid peroksidasyonunu azaltarak hepatoprotektif etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Küçükgergin, et al., 2014). Hagar ve arkadaşlarının sisplatin ile oluşturdukları nefrotoksistede, 21 gün süresince gavaj yoluyla koruyucu olarak Betain (250 mg/kg) uyguladıkları çalışmada ise, tiyobarbitürik asit reaktif maddelerine (TBARs), GSH ve NO düzeylerine bakılmış. Böbrek TBARs düzeyleri sisplatin uygulanan grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artmışken, Betain+sisplatin uygulanan grupta TBARs düzeylerinin kontrol grubuna yaklaştığı; GSH düzeyleri incelendiğinde ise sisplatin grubunda düşmüşken Betain+sisplatin grubunda GSH düzeylerinde istatistiksel açıdan anlam ifade edecek kadar yeniden yükseldiğini göstermişlerdir. Oldukça lipotropik olan Betain kolayca membrandan geçip hücre içi bileşene difüze olur ve bu da Betainin antioksidan etkisini artırır. Ayrıca Betain üzerinde bulundurduğu elektrofilik metil grupları ile oksidatif stresin azalmasına katkıda bulunur. Aynı zamanda Betain metiyonin sentezi içerisinde bulunur metiyonin hücresel sisteminin temel destekçisidir ve bu yol üzerinden gerçekleşen trans sülfürasyon reaksiyonları sonucunda bir hücre içi antioksidan olan GSH sentezi gerçekleşir ve GSH da hücreyi reaktif metabolitlerden korur (Hagar, El Medany, Salam, El Medany, & Nayal, 2015).

Hamileliğin ilk gününden doğumun olacağı güne kadar terapötik dozda Parasetamol (30 mg/kg) ve oluşabilecek olan hasara karşılık koruyucu olarak Betain (800 mg/kg) uyguladığımız çalışmamızın MDA ve GSH düzeylerini incelediğimizde; karaciğer MDA düzeyi PARA grubunda artmışken PARA+Betain grubunda anlamlı derecede ( $p < 0,05$ ) düştüğünü görmekteyiz; ancak böbrekte PARA+Betain grubunda anlamlı derecede bir düşüşün olmadığını görmekteyiz. Redükte glutatyon düzeylerine baktığımızda ise böbrek ile karaciğerin bir birine korele sonuçlar gösterdiğini, istatistiksel açıdan bir anlam ifade etmese de PARA grubunda belli bir miktar düştüğünü buna karşılık PARA+Betain grubunda is GSH düzeylerinin yeniden kontrol grubuna yükseldiğini görmekteyiz. Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda Betainin

doğrudan hücre membranlarını geçtiği ve özellikle hepatositleri lipid peroksidasyonundan koruduğu açıktır. Aynı zamanda BHMT üzerinden metil donörü olarak kullanılan Betain hücre içi bir antioksidan olan GSH düzeylerinin sentez edilmesinde önemli derecede katkı sağlamaktadır.

Hagar ve arkadaşlarının sisplatin ile oluşturdukları nefrotoksisitede, 21 gün süresince gavaj yoluyla koruyucu olarak Betain (250 mg/kg) uyguladıkları çalışmada, böbrek NO düzeylerine baktılar. Sisplatin uyguladıkları grupta yükselen NO düzeylerinin Betain+sisplatin grubunda anlamlı derecede düştüğünü ve NO düzeyinin kontrol grubuna yaklaştığını belirtmişlerdir. Sisplatin grubunda artan böbrek NO sentezi hücre hasarına artmasına sebebiyet verebilir. Oluşan fazla nitrik oksit peroksinitrit radikallerini oluşturmak üzere süperoksit ile reaksiyona girmektedir ki bu oluşan peroksinitrit radikalleri sitotoksik olup doku hasarına sebebiyet vermektedir. Artan NO düzeyleri hücre içi GSH düzeylerinin azalmasına sebep olur ve bu da hücredeki oksidatif stresin artmasını tetikler. Ancak Betain sisplatinin oluşturacağı nefrotoksisiteye karşı bir koruma göstermektedir. Redükta glutasyon sentezinin artmasına sebebiyet veren Betain hücrenin oksidatif strese karşı korunmasında bu yolak üzerinden katkı sağladığı bilinmektedir (Hagar vd., 2015).

Terapötik dozda hamileliğin ilk gününden doğumun olacağı güne kadar Parasetamol (30 mg/kg) ve oluşabilecek olan hasara karşılık koruyucu olarak Betain (800 mg/kg) uyguladığımız çalışmamızın NO düzeylerini incelediğimizde; karaciğerde PARA para grubunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önem ifade edecek ( $p < 0,05$ ) kadar artan NO düzeylerinin, PARA+Betain grubunda neredeyse kontrol grubunun NO düzeyine kadar düştüğünü; böbrekte ise PARA grubunun NO düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belli bir miktar arttığı ancak bu artışın istatistiksel açıdan bir anlam ifade etmediğini bununla birlikte PARA+Betain grubunun NO düzeyinin PARA grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede düştüğünü ortaya koyduk. Yukarıdaki bilgiler ışığında bulduğumuz sonuçlar bize Betainin oksidatif strese karşı iyi bir koruyucu olduğunu PARA grubunda artan NO düzeylerinin Betain kullanıldığında yeniden düşebileceğini gösterdik. Bunun nedenini özellikle Betainin GSH sentezindeki önemli rolünün ve de elektrofilik metil gruplarının oksidatif stresi azaltmaktaki katkısından dolayı olabileceğini düşünmekteyiz.

Varatharajalu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise etanol ile indükledikleri hepatotoksisitede Betaini koruyucu olarak uygulamışlardır. PON1'in de bir biyomarker olarak kullanıldığı çalışmada; etanol uygulanan grubun kontrol grubuna kıyasla serum PON1 aktivitesinde ileri derecede ( $p < 0,01$ ) düşüş olduğu; buna karşılık Betain+etanol grubunun PON1 seviyelerinin kontrol grubunun PON1 aktivitesi düzeyine kadar yükseldiği gösterilmiştir (Varatharajalu, Garige, Leckey, Gong, & Lakshman, 2010).



Harisa 4 hafta boyunca gavaj yolu ile sodyum selenit (Se) uyguladığı bir diğer çalışmada koruyucu olarak Betain denemiştir. Karaciğer dokusunda birçok parametrenin yanı sıra PON1 in aktivitesine de bakmıştır. Se grubunun PON1 aktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sonuçların istatistiksel açıdan önem arz edecek kadar düştüğü; buna karşılık Se+Betain uygulanan grupta PON1 aktivitesinin yeniden yükseldiği ve bu yükselmenin neredeyse kontrol grubuna yaklaşacak kadar olduğunu göstermiştir. ROT, PON1'in aktivitesini inhibe edebilir, bu yüzden selenyum uygulanmış gruplarda oluşan ROT'den dolayı PON1 inaktive olmuştur. Selenyum, proteinler ve diğer biyomoleküller üzerindeki tiyol gruplarına karşı yüksek derecede affinite göstermektedir. PON1'in inaktivasyonu selenyumun tiyol gruplarına olan afinitesinden kaynaklanıyor olabilir. Aynı şekilde selenyumun tiyol gruplarına atak yapması tiyol gruplarının kaybına neden olmaktadır ve PON1 üzerinde kaybolan tiyol grupları enzimin aktivitesini yok eder. Harisa Betainin koruyucu rolünü özellikle GSH biyosentezinin bir prokürsörü olarak görev alması ile açıklamaktadır. Aynı zamanda ROT'u azaltıp trans sülfürasyon reaksiyonlarında da yeri olan Betain tiyol seviyelerinin de düzelmesine katkı sağlamaktadır. Böylelikle PON1 aktivitesinin korunduğunu ileri sürmektedir (Harisa, 2013).

Çalışmamızda terapötik dozda hamileliğin ilk gününden doğumun olacağı güne kadar Parasetamol (30 mg/kg) ve oluşabilecek olan hasara karşılık koruyucu olarak Betain (800 mg/kg) uyguladığımız grubun PON ve ARE düzeylerini incelediğimizde karaciğer ve böbrek için bütün sonuçların bir birine korole olduğunu görmekteyiz. Karaciğer ve böbrekte bir antioksidan enzim olan PON1 aktivitesinin PARA grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede ( $p<0,05$ ) düştüğünü, buna karşılık PARA+Betain grubu PARA grubu ile kıyaslandığında önemli derecede ( $p<0,05$ ) PON1 aktivitesinin yeniden yükseldiğini görmekteyiz. Karaciğer ve böbrekte diğer bir antioksidan enzim olan ARE düzeylerinde ise yine PARA grubundaki düşüşe karşılık PARA+Betain grubunda belli bir miktarda yükselme mevcutken bu sonuçlar istatistiksel açıdan hiçbir anlam ifade etmemektedir. Parasetamolun reaktif bir metaboliti olan NAPQI hücre içerisindeki -SH içeren biyomoleküllere bağlanma eğilimindedir. Aynı zamanda NAPQI oksidatif strese neden olan bazı reaktif oksijen türlerinin de açığa çıkmasına neden olmaktadır. Bu reaktif metabolitler ve NAPQI PON1'in -SH gruplarına bağlanarak PON1'in aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır. Betainin koruyucu özelliği elektrofilik metil gruplarının oksidatif stresi azaltmaktaki katkısından dolayı olabileceğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda Betain metiyonin sentezi içerisinde bulunur. Metiyonin hücresel sisteminin temel destekçisidir ve bu yol üzerinden gerçekleşen trans sülfürasyon reaksiyonları sonucunda bir hücre içi antioksidan olan GSH sentezi gerçekleşir ve GSH da hücreyi reaktif metabolitlerden korur. Reaktif metabolitlerden korunan bir hücrenin PON1 aktivitesinde değişim beklenmez.

Yine Betain PON1 üzerinde bulunan -SH gruplarına katkıda bulunarak PON1 aktivitesinin bozulmasını engellediğini düşünmekteyiz.

Yousef ve arkadaşları Parasetamol ile oluşturdukları hepatotoksistede ışık mikroskobu altında karaciğer doku kesitlerini incelediler. PARA grubu histolojik görüntülerinde şişmiş sentrilobüler hepatositler, oldukça fazla vakuolleşmiş sitoplazma ve lekeli çekirdek yapısı görmüşlerdir (Yousef, Omar, El-Guendi, & Abdelmegid, 2010). Yine bir başka çalışmada Naguib ve arkadaşları Parasetamol ile indüklenmiş hem karaciğer hemde böbrek dokusunda ortaya çıkan hasarın mikroskobik incelemesini yapmışlardır. Karaciğerde sentriolobüler nekrozun, yağlanmanın ve karaciğer parankimine sızmış lenfositlerin varlığından bahsetmişlerdir. Böbrekte ise proksimal tübülün kogülatif nekrozundan ve yer yer kanamaların olduğunu ortaya koymuşlardır (Naguib vd., 2014). Shi ve arkadaşları etanol ile oluşturdukları hepatotoksistede Betaini koruyucu olarak kullandıkları çalışmada karaciğer kesitlerini ışık mikroskobu altında incelemişlerdir. Hasta grubunda hepatic morfolojinin bozulduğunu, yağlanma ve lobüller arası inflamasyonun varlığından bahsetmişlerdir. Koruyucu olarak Betainin kullanıldığı grupta ise bu morfolojik bozuklukların iyileştiğini, yağlanmanın ve inflamasyonun azaldığını belirtmişlerdir (Shi, Wang, Zhang, & Gong, 2010). Hagar ve arkadaşlarının sisplatin ile oluşturdukları nefrotoksistede koruyucu olarak betain kullandıkları çalışmada böbrek kesitlerini ışık mikroskobu altında incelemişlerdir. Sisplatin uyguladıkları grubun görüntülerinde proksimal tübüllerde dilatasyon, vakuoler dejenerasyon, epitelyal deskuamitasyonu takip eden nekroz gösterilmiştir. Betainin koruyucu olarak uygulandığı grupta iste ileri derecede iyileşmenin olduğu, dejenerasyonun ve proksimal tübüllerdeki dilatasyonun azaldığından bahsetmişlerdir (Hagar vd., 2015).

3 grup oluşturduğumuz çalışmamızda 3 ayrı grup için hem karaciğer hem de böbrek kesitleri alıp ışık mikroskobunda inceledik. Histolojik sonuçlarımız biyokimyasal parametrelerimizi destekler nitelikteydi. Karaciğerde; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PARA grubu karaciğer parankim dokuda yoğun hücrel dejenerasyon, sentral vende konjesyon ve parankim doku ile perivasküler alanlarda hücrel infiltrasyon gösterilmiştir. Buna karşılık PARA grubu ile karşılaştırıldığında PARA+Betain grubunda azalmış hücrel hasar, azalmış infiltrasyon ve normale yakın karaciğer yapısı izlenmiştir. Böbrekte ise; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PARA grubunda Bowman aralığında daralma, nekrotik tübüler yapılar ve intersitisyel fibrozis gözlemlenirken; PARA+Betain grubunda normale yakın Malpigi cisimcikleri, azalmış tübüler hasar ve azalmış intersitisyel fibrozis alanları gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar Betainin hem hepatoprotektif hem de nefroprotektif bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Özetlenecek olursa çalışmamızı biyokimyasal incelemeler ve histolojik incelemeler olmak üzere 2 kısma ayırabiliriz. Biyokimyasal olarak MDA, GSH,

NO, PON ve ARE düzeylerini karaciğer ve böbrek dokusunda inceledik. Histolojik olarak da yine karaciğer ve böbrek doku kesitlerini ışık mikroskopisi altında inceledik.

Birçok biyokimyasal parametre ve histolojik görüntüler, uzun dönem terapötik dozlarda bile maternal PARA uygulanmasının yeni doğan yavrularda bir patolojiye sebep olabileceği çeşitli yollar üzerinden anlatılmış ve tartışılmıştır. PARA'nın oluşturduğu bu patolojik sonuca karşılık Betainin koruyucu bir özelliğe sahip olabileceği araştırılmıştır.

## 6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Hamilelikte kullanılan toksik ya da uzun süreli terapötik dozlardaki Parasetamolun oluşturabileceği hem maternal hem de fetal hepatotoksisite veya nefrotoksisite açık bir şekilde bilinmektedir. Çalışmamızda hamilelik süresince Parasetamol kullanımının oluşturacağı karaciğer ve böbrek toksisitesine karşılık Betainin hepato ve nefroprotektif etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda hamile bıraktığımız dişi ratlara doğumun olacağı güne kadar Parasetamol uyguladık. Doğum olduğu gün yavruların karaciğer ve böbrek dokularını alarak biyokimyasal ölçümler ve histolojik incelemeler yaptık.

Parasetamol grubu karaciğer ve böbrek dokularında MDA ve NO düzeylerinin artmış olması buna karşılık GSH, PON ve ARE aktivitelerindeki düşüşün hücre içi oksidan/antioksidan dengesi için oksidan yöne kaydığının bir göstergesidir. Aynı şekilde doku kesitlerinin ışık mikroskobu altında histolojik incelenmesi ile de oksidan yönde artan dengenin dokularda oluşturduğu hasar net bir şekilde görülmüştür.

PARA+Betain grubu karaciğer ve böbrek dokularında MDA ve NO düzeylerinin kontrol grubu düzeylerine yaklaşmış olması GSH, PON ve ARE aktivitelerindeki düzelmelerin de bize Betainin hücre içi iyi bir antioksidan olduğunu hem biyokimyasal parametrelerde hem de histolojik görüntülerde gözlemlenmiştir. Işık mikroskobisinde incelediğimiz histolojik görüntülerde PARA+Betain grubunda Parasetamol grubu ile karşılaştırıldığında neredeyse kontrol grubuna yakın fetal karaciğer ve böbrek dokusu gözlemlendi.

Sonuç olarak terapötik dozlarda hamilelik süresince alınan Parasetamolun bile yeni doğanlarda hepatotoksisite ve nefrotoksisiteye sebep olabileceği buna karşılık Betainin bu toksisiteyi azaltabileceğini düşünmekteyiz. Parasetamolun oluşturduğu bu hasara ve tedavi edici birçok ajanın in vivo hayvan modelleri ve in vitro hücre kültürü modelleri üzerinde daha ileri moleküler çalışmaların yapılması ve bu bilgilerin klinik ve insan deneyleri ile desteklenmesinin sonuçların güvenilirliği açısından önem taşıyacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Arana, A., Morton, N. S., & Hansen, T. G. (2001). Treatment with paracetamol in infants. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 45: 20-29.
- Atakişi, O., Atakişi, E., Atabay, T., & Uzun, M. (2009). L-Arjinin ve N $\omega$ -Nitro-L-Arjinin Metil Esteri Uygulamasının Beyin, Karaciğer, Böbrek Dokusu Nitrik Oksit ve Malondialdehit Düzeylerine Etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 15 (1): 71-75.
- Beltowski, J., Wisniewska, A. J., Borkowska, E., & Wojcicka, G. (2005). Differential effect of antioxidant treatment on plasma and tissue paraoxonase activity in hyperleptinemic rats. *Pharmacological Research*, 51: 523-532.
- Beutler, E., Duron, O., & Kelly, B. M. (1963). Improved Method for the determination of Blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61: 882-890.
- Bozoğlu, E. (2009). Ratlarda oluşturulan parasetamol hepatoksisitesi üzerine flumazenilin terapötik etkinliğinin araştırılması . Tıpta uzmanlık tezi, TC Erciyes Üniversitesi, Erciyes.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bruckdorfer, R. (2005). The basics about nitric oxide. *Molecular Aspects of Medicine*, 26: 3-31.
- Camps, J., & Joven, J. (2015). Chemokine ligand 2 and paraoxonase-1 in non-alcoholic fatty liver disease: The search for alternative causative factors. *World Journal of Gastroenterology*, 21(10): 2875-2882.
- Chabot, F., Mitchell, J. A., Gutteridge, J. M., & Evans, T. W. (1998). Reactive oxygen species in acute lung injury. *European Respiratory Journal*, 11: 745-757.
- Cigremis, Y., Turel, H., Adiguzel, K., Akgoz, M., Kart, A., Karaman, M., & Ozen, H. (2009). The effects of acute acetaminophen toxicity on hepatic mRNA expression of SOD, CAT, GSH-Px, and levels of peroxynitrite, nitric oxide, reduced glutathione, and malondialdehyde in rabbit. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 323: 31-38.
- Cortas, N. K., & Wakid, N. W. (1990). Determination of Inorganic Nitrate in Serum and Urine by a Kinetic Cadmium-Reduction Method. *Clinical Chemistry*, 36(8): 1440-1443.

- Craig, S. A. (2004). Betaine in human nutrition. *American Society for Clinical Nutrition*, 80: 539-549.
- Çakatay, U., & Kayalı, R. (2006). Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37: 162-167.
- Çekmen, M. B., Turgut, M., Türköz, Y., Aygün, A. D., & Gözükara, E. M. (2001). Nitrik oksit (NO) ve Nitrik oksit sentazın (NOS) fizyolojik ve patolojik özellikleri. *Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler Dergisi*, 10: 226-236.
- Eckerson, H. W., Wyte, C. M., & La Du, B. N. (1983). The Human Serum Paraoxonase/Arylesterase Polymorphism. *The American Journal of Human Genetics*, 35:1126-1138.
- Farber, J. L. (1994). Mechanism of Cell Injury by Activated Oxygen Species. *Environmental Health Perspective*, 102: 17-24.
- Galal, R. M., Zaki, H. F., El-Nasr, M. M., & Agha, A. M. (2012). Potential Protective Effect of Honey Against Paracetamol-induced Hepatotoxicity. *Archives of Iranian Medicine*, 15(11): 674-680.
- Graham, G. G., Scott, K. F., & Day, R. O. (2005). Tolerability of Paracetamol. *Drug Safety*, 28(3): 227-240.
- Gueraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., ECKL, P. M., Huc, L., Uchida, K. (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research*, 44(10): 1098-1124.
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry*, 41(12): 1819-1828.
- Hafez, M. M., Al-Shabanah, O. A., Al-HArbi, N. O., Al-Harbi, M. M., Al-Rejaie, S. S., Alsurayea, S. M., & Ahmed, M. M. (2014). Association between Paraoxonases Gene Expression and Oxidative Stress in Hepatotoxicity Induced by CCl<sub>4</sub>. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* .
- Hagar, H., El Medany, A., Salam, R., El Medany, G., & Nayal, O. A. (2015). Betaine supplementation mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative/nitrosative stress and suppression of inflammation and apoptosis in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67: 133-141.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *The Lancet*, 1396-1397.
- Hamid, Z. A., Budin, S. B., Jie, N. W., Hamid, A., Husain, K., & Mohamed, J. (2012). Nephroprotective effects of Zingiber zerumbet Smith ethyl acetate extract against paracetamol-induced nephrotoxicity and

- oxidative stress in rats. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 13(3): 176-185.
- Harisa, G. I. (2013). Oxidative Stress and Paraoxonase Activity in Experimental Selenosis: Effects of Betaine Administration. *Biological Trace Element Research*, 152: 258-266.
- Horton, A. A., & Fairhurst, S. (1987). Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 12: 27-62.
- Isik, A., Koca, S. S., Ustundag, B., Celik, H., & Yildirim, A. (2007). Paraoxonase and arylesterase levels in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 26: 342-348.
- Jaeschke, H., McGill, M. R., Williams, C. D., & Ramachandran, A. (2011). Current issues with acetaminophen hepatotoxicity—A clinically relevant model to test the efficacy of natural products. *Life Sciences*, 88: 737-745.
- Jaichander, P., Selvarajan, K., Garelnabi, M., & Parthasarathy, S. (2008). Induction of paraoxonase 1 and apolipoprotein A-I gene expression by aspirin. *Journal of Lipid Research*, 49: 2142-2148.
- James, L. P., Mayeux, P. R., & Hinson, J. A. (2003). Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 31: 1499-1506.
- Jobgen, W. S., Fried, S. K., Fu, W. J., Meininger, C. J., & Wu, G. (2006). Regulatory role for the arginine–nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17: 571-588.
- Kanbak, G., İnal, M., & Bayçu, C. (2001). Ethanol-induced hepatotoxicity and protective effect of betaine. *Cell Biochemistry and Function*, 19: 281-285.
- Karadas, S., Aslan, M., Gonullu, H., Kati, C., Duron, L., Olmez, S., Demir, H. (2014). Acetaminophen intoxication is associated with decreased serum paraoxonase and arylesterase activities and increased lipid hydroperoxide levels. *Human and Experimental Toxicology*, 33(11): 1134-1140.
- Kidd, P. M. (1997). Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage. *Alternative Medicine Review*, 2(3): 155-176.
- Kilic, S. S., Aydin, S., Kilic, N., Erman, F., Aydin, S., & Celik, I. (2005). Serum arylesterase and paraoxonase activity in patients with chronic hepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 11: 7351-7354.

- Kim, S. K., & Kim, Y. C. (1998). Effects of singly administered betaine on hepatotoxicity of chloroform in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 655-661.
- Knight, J. A., Pieper, R. K., & McClellan, S. (1988). Specificity of the Thiobarbituric Acid Reaction: Its Use in Studies of Lipid Peroxidation. *Clinical Chemistry*, 34(12): 2433-2438.
- Konukoğlu, D., & Akçay, T. (1995). Glutasyon Metabolizması ve Klinik Önemi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 15: 214-218.
- Kristensen, D. M., Lesne, L., Fol, V. L., Lethimonier, C. D., Rainsford, N. D., Leffers, H., & Jegou, B. (2012). Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *International Journal of Andrology*, 35: 377-384.
- Küçükardalı, Y., Cinan, U., Acar, H. V., Özkan, S., Top, C., Nalbant, S., Danacı, M. (2002). Comparison of the Therapeutic Efficacy of 4-Methylpyrazole and N-Acetylcysteine on Acetaminophen (Paracetamol) Hepatotoxicity in Rats. *Current Medical Research and Opinion*, 18(2): 78-81.
- Küçükgergin, C. B., Bingül, İ., Tekkeşin, M. S., V, O., Abbasoğlu, S. D., & Uysal, M. (2014). Effects of carnosine, taurine, and betaine pretreatments on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and tissue injury in rat liver. *Toxicology and Industrial Health*, 1-10.
- Labrecque, B., Beaudry, D., Mayhue, M., Halle, C., Bordignon, V., Murphy, B. D., & Palin, M. F. (2009). Molecular characterization and expression analysis of the porcine. *Gene*, 110-120.
- Lever, M., & Slow, S. (2010). The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical Biochemistry*, 43: 732-744.
- Litvinova, L., Atochin, N. D., Nikolia, F., Mariia, V., Zatolokin, P., & Kirienkova, E. (2015). Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Frontiers in Physiology*, 20: 1-10.
- Liu, H. H., Lu, P., Guo, Y., Farrel, E., Zhang, X., Zheng, M., Peltz, G. (2010). An integrative genomic analysis identifies Bhmt2 as a diet-dependent genetic factor protecting against acetaminophen-induced liver toxicity. *Genome Research*, 20: 28-35.
- McCue, K. F., & Hanson, A. D. (1992). Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Molecular Biology*, 18: 1-11.
- Mossa, A. T., Heikal, T. M., & Omara, E. A. (2013). Physiological and histopathological changes in liver of male rats exposed to Paracetamol



- and Diazinon. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 8(2): 83-95.
- Naguib, Y. M., Azmy, R. M., Samaka, R. M., & Salem, M. F. (2014). Pleurotus ostreatus opposes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in acetaminophen-induced hepato-renal injury. *Complementary and Alternative Medicine*, 14:494.
- Niki, E. (1987). Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44: 227-253.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2): 351-358.
- Pacifici, G. M., & Allegaert, K. (2015). Clinical Pharmacology of Paracetamol in Neonates: A Review. *Current Therapeutic Research*, 77: 24-30.
- Placer, C. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1990). Estimation of product of lipid peroxidation (Malondyaldehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16: 259-264.
- Porter, N. A. (1984). Chemistry of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 150: 273-283.
- Prescott, L. F. (1980). Kinetics and metabolism of Paracetamol and Phenacetin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 10: 291-298.
- Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, A. F., Lopez, O., & Pla, A. (2003). Identification of paraoxonase 3 in rat liver microsomes: purification and biochemical properties. *Biochemical Journal*, 261-268.
- Sans, R. G., & Chozas, M. G. (1998). The Thiobarbituric Acid (TBA) Reaction in Foods: A Review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 38(4): 315-350 .
- Schwahn, B. C., Laryea, M. D., Chen, Z., Melnyk, S., Pogribny, I., Garrow, T., Rozen, R. (2004). Betaine rescue of an animal model with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Biochemical Journal*, 382: 831-840.
- Scialli, A. R., Ang, R., Breitmeyer, J., & Royal, M. A. (2010). A review of the literature on the effects of acetaminophen on pregnancy outcome. *Reproductive Toxicology*, 30: 495-507.
- Shi, Q. Z., Wang, L. W., Zhang, W., & Gong, Z. J. (2010). Betaine inhibits Toll-like receptor 4 expression in rats with ethanol-induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology*, 16(7): 897-903.

- Stepniak, I. I., & Knap, N. (2012). Effect of exposure to fluoride and acetaminophen on oxidative/nitrosative status of liver and kidney in male and female rats. *Pharmacological Reports*, 64: 902-911.
- Şahin, F. (2011). Piaglitazonun böbrek iskemi-reperfüzyonu üzerine olan koruyucu etkisinin incelenmesi. Uzmanlık tezi, Trakya Üniversitesi, Trakya.
- Şavlı, E. (2012). Gebelikte parasetamol kullanımı. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29: 91-94.
- Türkoğlu, S., Bulmuş, F. G., Parmaksız, A., Özkan, Y., & Gürsu, F. (2008). Metabolik Sendromlu Hastalarda Paraoksonaz 1 ve Arilesteraz Aktivite Düzeyleri. *Firat Tıp Dergisi*, 13(2): 110-115.
- Varatharajalu, R., Garige, M., Leckey, L. C., Gong, M., & Lakshman, M. R. (2010). Betaine Protects Chronic Alcohol and x-3 PUFA-Mediated Down-Regulations of PON1 Gene, Serum PON1 and Homocysteine Thiolactonase Activities With Restoration of Liver GSH. *Clinical and Experimental Research*, 34(3): 424-431.
- Weight, S. C., Bell, P. R., & Nicholson, M. L. (1996). Renal ischemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*, 83(2): 162-167.
- Wilkes, J. M., Clark, L. E., & Herrera, J. L. (2005). Acetaminophen overdose in pregnancy. *Southern Medical Journal*, 98: 1118-1122.
- Yousef, M. I., Omar, S. A., El-Guendi, M. I., & Abdelmegid, L. A. (2010). Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 3246-3261.
- Zaher, A. O., Rahman, M. M., Hafez, M. M., & Omran, F. M. (2007). Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicology*, 234: 124-134.

## Özgeçmiş

### Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : METE ÖZKOÇ  
Doğum tarihi ve yeri : 16/09/1991 - Gazimağusa/KKTC  
Uyruğu : KKTC-TC (çift uyruklu)  
Medeni durumu : Bekar  
İletişim adresleri : ozkocmete@gmail.com-05382354427

### Eğitim Durumu

**İlkokul:** Gazi İlkokulu (KKTC) (1997-1999)

Alasya İlkokulu (KKTC) (1999-2002)

**Ortaokul:** Çanakkale Ortaokulu (KKTC) (2002-2005)

**Lise:** 20 Temmuz Fen Lisesi (KKTC) (2005-2008)

Namık Kemal Lisesi (KKTC) (2008-2009)

**Lisans:** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen ve Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2009-2013)

**Y. Lisans:** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2013-...)

**Y. Dil:** Wimbledon Language Academy (WLA) Intermediate Class, İngiltere. (25.06.2012-31.08.2012).

IELTS(Band Score: 5 (Modest User))

İngilizce YDS: 60,00

**Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:** Biyologlar Derneği

### Sözlü Bildiri

:

1- Kevser Kuşat Ol, Güngör Kanbak, Hakan Şentürk, Mustafa Uyanoğlu, Fatma Yıldız, **Mete Özkoç**, Soroush Ghodratizadeh. "Betainin sıçanlarda oluşturulan deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde önleyici etkisi" XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi S-027 No.lu 3-6 Eylül 2013. (Poster)

## **Bilimsel Etkinlikler**

Projeler :

**1002 TUBİTAK Projesi:** KRONİK ALKOL TÜKETİMİNDE STATİN KULLANIMININ İSKELET KASINDAKİ APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ VE BETAINİN KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI, Bursiyer, 2014-2015

Kurslar ve Eğitim Programları :

1. "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası" (Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu)
2. "Deney Hayvanlarında Cerrahi Eğitim" (22. Ulusal Biyoloji Kongresi 23-27 Haziran 2014 Eskişehir)
3. "En İyi Sunum ve En İyi İçerik Dalında 1.'lik Ödülü" (Biyoloji Çözömlmeleri Etkinlik Sergisi Poster Sunumu/ "Diyabet İle Yaşam")