



**FARELERDE PARASETAMOLLE İNDÜKLENEN AKUT
KARACİĞER HASARINA KARŞI
OMAPATRİLATIN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep Berna AKSAKALLI MAĞDEN

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Elif ÇADIRCI**

Doktora Tezi-2020

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE PARASETAMOLLE İNDÜKLENEN AKUT
KARACİĞER HASARINA KARŞI OMAPATRİLATIN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep Berna AKSAKALLI MAĞDEN

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Elif ÇADIRCI**

**ERZURUM
2020**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARELERDE PARASETAMOLLE İNDÜKLENEN AKUT
KARACİĞER HASARINA KARŞI OMAPATRİLATIN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep Berna AKSAKALLI MAĞDEN

Tez Savunma Tarihi : 27/01/2020

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Elif ÇADIRCI (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zekai HALICI (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yasin BAYIR (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Muhammed YAYLA (Kafkas Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi İrfan ÇINAR (Kafkas Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki Jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2020

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Parasetamol	4
2.2. Parasetamol'ün Farmakokinetiği ve Metabolizması.....	5
2.3. Parasetamol'ün Farmakolojik Etkileri	6
2.4. Parasetamol'ün Yan Etkileri	7
2.5. Akut Karaciğer Toksisitesi	8
2.6. Parasetamol Zehirlenmesi.....	8
2.6.1. Parasetamol Zehirlenmesinin Klinik Bulguları	10
2.7. Parasetamol Zehirlenmesi'nin Tedavisi.....	10
2.7.1. N-Asetil Sistein (NAC).....	11
2.7.2. Diğer Tedavi Yöntemleri	13
2.7.2.1. Simetidin	13
2.7.2.2. Dializ.....	13
2.7.2.3. Karaciğer Transplantasyonu	13
2.7.3. Prognoz	14
2.8. Biyokimyasal Parametreler	14

2.8.1. Aspartat Aminotransferaz (AST, SGOT)	14
2.8.2. Alanin Aminotransferaz (ALT, SGPT)	15
2.9. Oksidatif Stres.....	16
2.10. Antioksidanlar.....	17
2.10.1. Glutasyon (GSH).....	17
2.10.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)	18
2.11. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitörleri ve Fizyolojik Önemi.....	19
2.12. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitörlerinin Parasetamol Zehirlenmesindeki Önemi	20
2.13. Omapatrilat	20
2.13.1. Omapatrilat'ın Farmakokinetiği	21
2.13.2. Omapatrilat'ın Endikasyonları ve Yan Etkileri	21
3. MATERYAL VE METOT.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Deney Hayvanları	22
3.1.2. Kullanılan İlaçlar	22
3.1.3. Kullanılan Cihaz ve Aletler	23
3.2. Metot.....	23
3.2.1. Deney Planı.....	23
3.2.2. Histolojik Çalışmalar	25
3.2.2.1. Parafin Kesitlerde Konvansiyonel Işık Mikroskop.....	25
3.2.3. Biyokimyasal Çalışmalar	27
3.2.3.1. Serumda Yapılan Analizler.....	27
3.2.3.2. Karaciğer Dokusu Üzerinde Yapılan Analiz İşlemleri	29
3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	36

4. BULGULAR.....	37
4.1. Histopatolojik Bulgular.....	37
4.2. Biyokimyasal Bulgular	39
4.2.1. ALT ve AST Ölçümleri	39
4.2.2. SOD, GSH ve MDA Ölçümleri	41
4.2.3. ACE ve Neprilisin Ölçümleri	42
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR	53
EKLER	64
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	64
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	65
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	66

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, aynı zamanda doktora eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerinden faydalandığım değerli danışmanım Prof. Dr. Elif ÇADIRCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na ve tez çalışmalarım süresince bulgularımı takip eden, tez izleme komitemde görev yaparak çalışmalarımı geliştirmemi sağlayan hocalarım Prof. Dr. Zekai HALICI ve Prof. Dr. Yasin BAYIR'a tüm içtenliğim ile teşekkür ederim. Ayrıca bölümdeki çalışmalarım ve ders dönemim boyunca deneyimlerinden faydalandığım Prof. Dr. Abdülmecit ALBAYRAK ve Doç. Dr. Erol AKPINAR hocalarıma da çok teşekkür ederim. Deneylerim sırasında ve ölçümlerimde bana yardım eden Dr. Öğr. Üyesi Rüstem Anıl UĞAN ile Dr. Öğr. Üyesi Harun ÜN'e de teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışmamı **TDK-2018-6840** proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve çalışmalarımı bünyesinde gerçekleştirdiğim Atatürk Üniversitesi Klinik Araştırma, Geliştirme ve Tasarım Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (KARGETAM) de teşekkürlerimi sunarım

Doktora eğitimim ve araştırmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen ve beni sürekli motive eden annem, babam, kardeşim, eşim, ve oğluma da tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Zeynep Berna AKSAKALLI MAĞDEN

ÖZET

Farelerde Parasetamolle İndüklenen Akut Karaciğer Hasarına Karşı Omapatrilatın Etkisinin Araştırılması

Amaç: Parasetamol toksisitesi ilaçla zehirlenme vakaları arasında halen en çok karşılaşılan vakalar arasındadır ve gerek patofizyolojisini aydınlatmaya gerekse yeni tedavi protokollerini araştırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu tez ile amacımız, karaciğer toksisitesi oluşturulmuş farelerde renin-anjiyotensin sistemini etkileyen ilaçlardan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ve nötral endopeptidaz (Neprilisin veya NEP) inhibitörü olan Omapatrilatın etkisini incelemektir.

Materyal ve Metot: Erkek Balb C fareler 7 adet gruba ayrılmış, 24 saat aç bırakılmış, sonrasında Parasetamol, Omapatrilat ve NAC oral yoldan verilmiştir. Parasetamol uygulaması Omapatrilat ve NAC verildikten 1 saat sonra yapılmıştır. Parasetamol uygulamasından 24 saat sonra farelerin serum ve doku örnekleri elde edilmiştir. Fare gruplarında SOD, GSH, ACE, Neprilisin seviyeleri ve ALT, AST, MDA değerleri biyokimyasal yöntemlerle ve elde edilen dokular histopatolojik olarak çalışılmıştır.

Bulgular: İncelemelerde toksisite grubundaki değişikliklerin omapatrilat gruplarında yüksek oranda azaldığı görüldü. Parasetamol toksisitesi ile artmış olan ALT ve AST miktarlarının omapatrilat uygulaması ile sağlıklı gruplara yaklaştığı ve bu etkinin doza bağlı olduğu gözlemlendi. 40 mg/kg dozunda omapatrilat uygulanan fare dokularında yapılan histopatolojik incelemede neredeyse hiç patolojik bulgulara rastlanmadı ve sağlıklı gruba en benzer sonuçlar elde edildi. 10 mg/kg'dan 40 mg/kg'a artan omapatrilat miktarı ile SOD, GSH ve MDA değerleri sağlıklı gruba yaklaştı. Parasetamol toksisitesi oluşturulan gruplarda ACE ve Neprilisin seviyeleri sağlıklı gruba göre anlamlı artış gösterdi. Parasetamol+omapatrilat uygulanan gruplarda doz arttıkça ACE ve Neprilisin seviyelerinde de artış gözlenirken NAC uygulaması parasetamol grubunda artmış olan bu parametreleri anlamlı olarak azalttı.

Sonuç: 40 mg/kg dozunda uygulandığında omapatrilat grubunun gerek histopatolojik, gerek de GSH, SOD, MDA, ALT ve AST seviyeleri dahil olmak üzere biyokimyasal tetkiklerle elde edilen bulgularının sağlıklı grup ile çok benzer olduğunu gördük. Parasetamol uygulaması ile ACE ve Neprilisin seviyesinde meydana gelen artışın hasara eşlik eden bir savunma mekanizması olabileceğini ve NAC ile tedavi sağlandıkça azaldığını öne sürebiliriz. Omapatrilat ile dokulardaki patolojik ve biyokimyasal bulgularda düzelme gözlemlenmiş olmamıza rağmen bu iki enzimin artması, son ürünle çalışan negatif feedback mekanizmasının çalışmadığını göstermektedir. Bu bulgular ACE ve Neprilisin enzimlerinin parasetamol toksisitesindeki rolünü ve omapatrilatın koruyucu etkilerini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Hepatotoksisite, Omapatrilat, Parasetamol.

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Omapatrylate on Acute Liver Damage Induced in Paracetamol in Mice

Objective: Paracetamol toxicity is still one of the most common cases among drug poisoning cases; and studies are underway to both clarify its pathophysiology and investigate new treatment protocols. Our aim with this thesis is to investigate the effect of angiotensin converting enzyme (ACE) and neutral endopeptidase (Neprilisin or NEP) inhibitor Omapatrilat, which is used in liver toxic mice.

Material and Method: Male Balb C mice were divided into 7 groups, fasted for 24 hours, then Paracetamol, Omapatrilat, and NAC were given orally. Paracetamol was administered 1 hour after administration of Omapatrilat and NAC. Serum and tissue samples of mice were obtained 24 hours after paracetamol administration. SOD, GSH, ACE, Neprilisin activities and ALT, AST, MDA values in mouse groups were studied by biochemical methods; and the tissues obtained were studied histopathologically.

Results: In the studies, it was seen that the changes in the toxicity group decreased significantly in the omapatrilat groups. It was observed that ALT and AST levels increased with paracetamol toxicity approached healthy groups with omapatrilat application and this effect was dose dependent. Histopathological examination of mouse tissues with 40 mg/kg omapatrilat showed almost no pathological findings; and results in this group were the most similar to the healthy group. With increasing omapatrilat dose from 10 mg/kg to 40 mg/kg, the SOD, GSH and MDA values approached the healthy group. ACE and Neprilisin levels increased significantly in groups with paracetamol toxicity. In groups treated with paracetamol + omapatrilat, an increase in ACE and Neprilisin activities was observed as the dose increased while NAC administration significantly decreased these activities.

Conclusion: When applied at a dose of 40 mg/kg, we found that the results of the omapatrilat group obtained by both histopathological and biochemical tests including GSH, SOD, MDA, ALT and AST levels were very similar to the healthy group. With Paracetamol application, the rise in ACE and Neprilisin levels may be defense mechanisms accompanying the damage, and decrease as the NAC treatment is provided. Although we observed an improvement in the pathological and biochemical findings in the tissues with omapatrilat, the increase of these two enzymes shows that the negative feedback mechanism utilizing the end product cannot work. These findings reveal the role of ACE and Neprilisin enzymes in paracetamol toxicity and protective effects of omapatrilat.

Keywords: Hepatotoxicity, Omapatrilat, Paracetamol.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A°	:	Angstrom
AAZ	:	Asetozolamit
ACE	:	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
Act. D	:	Aktinomisin D
COX	:	Siklooksijenaz
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
GSH	:	Glutasyon
MDA	:	Malondialdehit
NAC	:	N-asetil sistein
OMA	:	Omapatrilat
PARA	:	Parasetamol
Ppm	:	Milyonda bir kısım
Pro	:	Prolin
SOD	:	Süperoksit dismutaz
TCA	:	Trikloroasetik asit
Zn	:	Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Parasetamol'un moleküler yapısı	4
Şekil 2.2. Parasetamol'ün metabolizması.....	5
Şekil 2.3. N-Asetil Sistein'in kimyasal yapısı	11
Şekil 2.4. Glutatyon sentezi'nin basamakları	12
Şekil 2.5. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron sistemi	19
Şekil 2.6. Omapatrilat'ın moleküler yapısı	20
Şekil 4.1. (A) Sağlıklı, (B) Sağlıklı + OMA 40 grubundaki, (C) PARA grubundaki, (D) PARA + NAC grubundaki, (E) PARA + OMA 10 grubundaki, (F) PARA + OMA 20 grubundaki, (G) PARA + OMA 40 grubundaki farelerden alınan karaciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü. (H) Skor tablosu.....	38
Şekil 4.2. ALT ve AST ölçümleri grafiksel sonuçları	40
Şekil 4.3. SOD, GSH ve MDA ölçümleri grafiksel sonuçları	42
Şekil 4.4. ACE ve Neprilisin ölçümleri grafiksel sonuçları	43

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan cihazların model ve markaları	23
Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan hayvanların sayıları ve tedavi grupları	25
Tablo 4.1. Histopatolojik bulguların fare gruplarına göre karşılaştırmalı skorları	39
Tablo 4.2. ALT ve AST ölçümleri sonuçları	39
Tablo 4.3. SOD, GSH ve MDA ölçümleri sonuçları	41
Tablo 4.4. ACE ve Neprilisin ölçümleri sonuçları.....	42



1. GİRİŞ

Asetaminofen ya da N-asetil-Para-aminofenol (APAP) olarak da bilinen parasetamol analjezik ve antipiretik bir ilaçtır. Tek bir bileşik olarak ya da diğer ilaçlarla kombine bir şekilde reçetesiz veya reçeteli olarak satılmaktadır. Dünya çapında en çok kullanılan ve kolay ulaşılabilen bir ilaç olması zehirlenme vakalarını da artırmaktadır. Parasetamol, tedavi edici dozlarda alınması durumunda iyi bir güvenlik profiline sahiptir. Hamileler ve çocuklar için bile güvenli kabul edilen bir ilaç olmasına rağmen tedavi edici dozun üzerinde kullanıldığı zaman (çocuklarda tek seferde 150 mg/kg, erişkinlerde ise 7.5 g'ın üzerinde alınması ¹ veya 24 saat içinde çocuklarda 250 mg/kg, yetişkinlerde ise 12 g'ın üzerinde alınması ^{2, 3}) akut hepatotoksisiteye neden olduğu gösterilmiştir. Parasetamol bağıli gelişebilen bu hepatotoksisitede akut karaciğer yetmezliği, ağır karaciğer hasarı ve bunların sonucunda mortalite ve morbidite gözlenebilir. Serum alkalin fosfataz, aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz gibi enzim aktiviteleri ile total bilirubin seviyesinin belirlenmesi karaciğer toksisitesinin teşhisi için laboratuvar parametreleridir. ⁴

Parasetamol karaciğerde metabolize edilir. İlacın büyük bir kısmı glukuronik asid veya sülfürik asidle konjuge edilerek detoksifikasyona uğrar ve idrarla atılır. Parasetamolün oldukça küçük bir kısmı ise sitokrom (CYP) p450 enzimi ile N-hidroksilasyona uğrayarak toksik bir metabolit olan N-asetil-p-benzokinonimine (NAPQI) dönüşmektedir. Bu metabolit oldukça reaktif elektrofilik bir molekül olup diğer intrasellüler proteinlere kovalent bağlanarak zarar verir. NAPQI normal şartlar altında glutatyon (GSH) ile reaksiyona girerek zarar vermeden safra yoluyla atılmaktadır. ^{5, 6} Ancak yüksek dozlarda alınması ile bu reaktif ürün sürekli oluşmaya devam eder ve GSH depolarını tüketerek karaciğer hasarına neden olur. Parasetamolün hepatotoksisitedeki asıl mekanizmasının bu yolla gerçekleştiği düşünölmektedir. ⁶

Parasetamol toksisitesinin tedavisinde kullanılan yöntemler arasında; nazogastrik tüp ya da oral yolla uygulanan aktif kömür, gastrointestinal dekontaminasyon, uygun zamanda N-Asetilsistein (NAC) kullanımı ve destekleyici tedavi bulunmaktadır. ⁷ Parasetamolün indüklediği hepatotoksositeye karşı NAC, sisteinin öncü bir bileşimidir ve tedavi için klinikte en yaygın kullanılan ajandır. NAC hastalara intravenöz ya da oral yolla verilebilir. ^{8,9} Ancak tam bir tedavi sağlanamamaktadır. Ayrıca, NAC'ın optimal tedavi süresi de tam olarak bilinmemektedir.

Yukarıda bahsettiğimiz aşırı parasetamol alımının oluşturduğu toksik etkiye karşı geliştirilen tedavi basamaklarının bulunmasına rağmen parasetamolün toksik etkiyi nasıl oluşturduğunun mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu yüzden sürekli olarak yeni çalışmalar yapılmakta ve elde edilen yeni gelişmeler sayesinde parasetamol toksisitesine bağlı karaciğer hasarını önleyici ve tedavi edici yeni ilaçlar denenmektedir. Özellikle son zamanlarda yapılan çalışmaların bazılarında renin-anjiyotensin-aldosteron yolağını etkileyen ilaçlarla ilgili yapılan çalışmalar dikkatleri üzerine çekmektedir. ¹⁰

Renin anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS), kan basıncını, elektrolit ve sıvı dengesini düzenleyen hormonal bir sistemdir. Renin anjiyotensin aldosteron sistemin üzerinden etkisini gösteren Omapatrilat isimli yeni geliştirilmekte olan etken madde hem anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) hem de nötral endopeptidaz (NEP veya Neprilisin) inhibisyonu yaparak hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliği vakalarında etkili bulunmuştur. ¹¹ Omapatrilat'ın yer aldığı Renin anjiyotensin aldosteron sistemi, organizmanın işleyişinde önemli bir role sahip olmasına rağmen vücutta meydana gelen oksidatif stres ve enflamasyon gibi patofizyolojik olaylara da katkı sağlamaktadır. ¹²⁻¹⁵

Biyolojik yapılarda oksitleyici hasarların oluşmasının sebebi serbest radikallerdir. Antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması oksidatif stres olarak ifade edilen doku hasarına neden olur. Oksidatif strese bağlı olarak gelişen

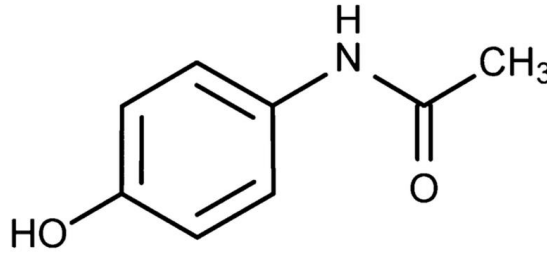
endotel disfonksiyonu ve damar inflamasyonu süresince anjiyotensin II üretimi gerçekleşir. Aşırı üretilen anjiyotensin II ise vasküler NADPH oksidazı artırmak suretiyle süperoksit oluşumunu indükler. Bu reaksiyonların sonucunda nitrik oksit seviyesi düşer, oksidatif stres artar ve aktifleşen mediyatörler yoluyla vasküler komplikasyonlar ve endotelial hasara bağlı ateroskleroz süreci başlatılmış olur. ¹⁶

Bizim bu çalışmadaki amacımız; farelerde parasetamolle oluşturulmuş karaciğer toksisitesinde RAAS 'ın rolünü incelemektir. Aynı zamanda; hem ACE hem NEP inhibitörü olan Omapatrilat'ın parasetamol toksisitesine bağlı karaciğer hasarında oksidatif stres parametreleri ve antioksidan savunma sistemleri üzerindeki etkilerini ortaya koymaktır. Bu amaçla parasetamol toksisitesi oluşturulan farelerde Omapatrilat uygulaması sonucu elde edilen serum ve dokulardaki temel karaciğer fonksiyon testleri, oksidatif stres hasarının önemli belirteçleri deney grupları arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parasetamol

Para-aminofenol türevi olan parasetamol aynı zamanda asetaminofen ve Nasetil-P-aminofenol (APAP) olarak da bilinmektedir. Kimyasal yapısı Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Ağrı kesici ve ateş düşürücü bir etken maddedir. Prostaglandin sentezini ve sinir sisteminde siklooksijenazı (COX) selektif olarak inhibe ederek etki gösterir. Ülkemizde 500 mg'lık tabletleri ve 5ml'sinde 120 mg etken madde içeren şurupları mevcuttur. Kombine preparatlardaki parasetamol miktarı ise 100 ile 500 mg arasında değişmektedir. 120 veya 200 mg Parasetamol'ü asetilsalisilik asid veya fenobarbitalle kombine şekilde içeren rektal preparatlar dışında, Türkiye'de tek madde olarak parasetamol içeren supozituarlar mevcut değildir.



Şekil 2.1. Parasetamol'un moleküler yapısı ¹⁷

4 veya 6 saatlik aralarla verilebilen mutad oral veya rektal doz 500-1000 mg'dır. Bir günlük dozun 4 g'ı aşmaması önerilir. Çocuklarda kullanılan doz bir defada 40-120 mg olup yaş ve ağırlık faktörleri göz önüne alınır.

Çocuklar için önerilen dozlar:

3 Aylık - 1 Yaş : 40 - 120 mg

1-6 Yaş : 120 - 250 mg.

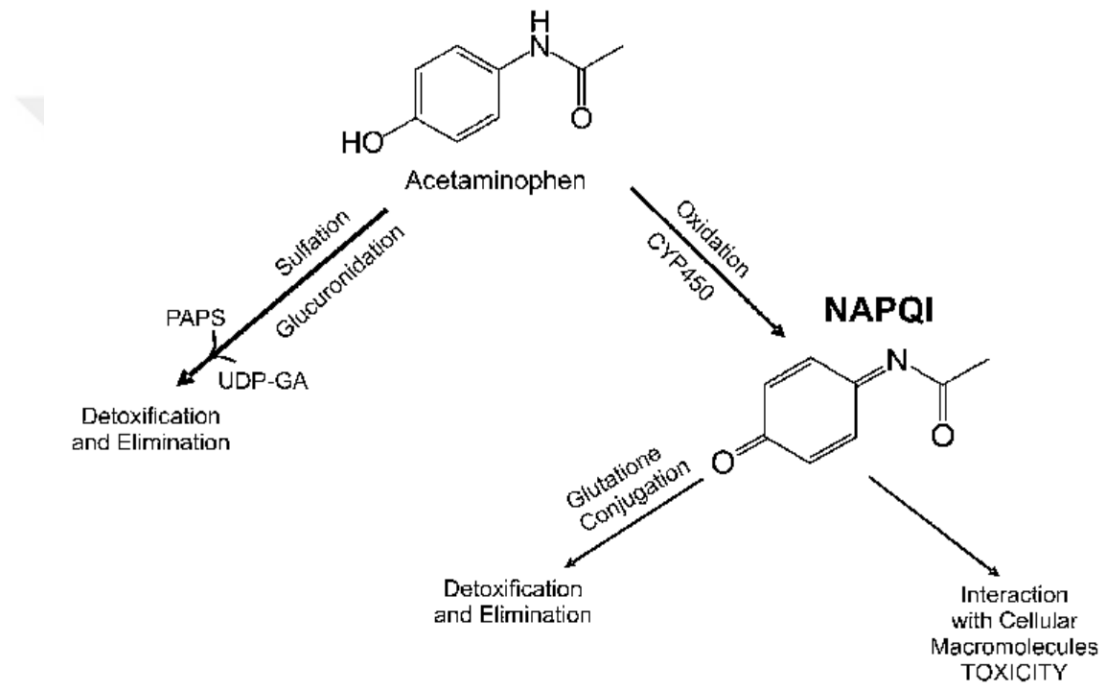
7-12 Yaş : 500 mg.

Bu dozlar gerektiğinde günde 3-4 defa tekrarlanabilir. 10-15 mg/kg dozunda da kullanılabilceği bildirilmektedir.

2.2. Parasetamol'ün Farmakokinetiği ve Metabolizması

Absorpsiyonu: Parasetamol'ün ağız yoluyla alınmasını takiben hızlı ve tam olarak absorbe edildiği bilinmektedir. En hızlı absorpsiyon ilacın çözelti halinde verilmesiyle elde edilir.

Dağılımı: Plazma proteinlerine %10 oranında bağlanan parasetamol'ün zahiri (sanal) dağılım hacmi de bu nedenle 1 litre / kg'dır, diğer bir deyişle erişkin bir kişide 70 litre kadardır. Parasetamol'un dozu arttıkça proteinlere bağlanma oranı da artar.



Şekil 2.2. Parasetamol'ün metabolizması

Metabolizması: Parasetamol'ün birincil metabolizma yolu sülfat ve glukuronik asitle konjugasyondur. Bu metabolitlerin her ikisi de farmakolojik bakımdan etkisizdir. Verilen dozun %5 veya daha azı değişmeden itrah edilmektedir. Minör metabolitlerden aktif olanı, mutad tedavi dozlarında konjugasyonla hızla etkisiz hale getirilir. Bir defada alınan doz 7 g'ı geçerse (ömeğin intihar amacıyla veya kazaen) konjugasyon kapasitesi aşılır ve reaktif metabolit (N-Asetil Para Benzokinonimin) karaciğerdeki, böbreklerdeki, kalpteki ve olasılıkla diğer organlardaki doku componentleriyle reaksiyona girer.

Yetişkinlerin bir defada 15 g ve daha yüksek dozda parasetamol almaları sonucunda oluşan karaciğer hasarı geri dönüşümsüz, hatta hemen uygun tedaviye geçilmezse ölümcül olabilir.

Eliminasyon kinetiği: Mutad dozlardaki parasetamol'un normal yetişkinlerdeki yarılanma ömrü 2-3 saat arasındadır. Bu süre çocuklarda daha kısa, yenidoğanlarda ve sirozlu hastalarda daha uzundur. Toksik miktarlarda alındığında parasetamol'un sülfat ve glukuronat metabolitlerine dönüşüm kapasitesi sınırlıdır, bu nedenle yarılanma ömrü 4 saat, hatta üzerine çıkar.

2.3. Parasetamol'un Farmakolojik Etkileri

Parasetamol'un endikasyonları; baş ağrısı, migren, adet sancıları, diş ağrısı, soğuk algınlığı ve gribal enfeksiyonlara bağlı ağrı, nefralji, nefrit, siyatik, lumbago, kas ve eklem ağrıları, orta kulak ağrıları, sinüzit ve cerrahi operasyonlardan veya yaralanmalardan kaynaklanan ağrılardır. Endikasyonlarından da anlaşılacağı gibi parasetamol yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden etki mekanizmasının da iyi bilinmesi gerekmektedir. Etki mekanizmasını anlamak için çalışmalar devam etse de henüz tam olarak anlaşılammıştır. Yapılan bazı çalışmalarda parasetamol'un merkezi sinir sistemi (MSS) üzerinden santral siklooksijenaz (COX) inhibisyonu ve serotoninergic sistemle indirekt etkileşim yoluyla etki ettiğine inanılmaktadır. ¹⁸

Lim ¹⁹, yaptıkları bir çalışmada köpeğin dalağına enjekte ettikleri bradikininin ağrı yapıcı etkisini parasetamolün engellediğini görmüştür. Yapılan bu çalışmada parasetamolün ağrı kesici etkisinin santralde değil de periferde prostaglandin sentezini inhibe ederek ortaya koyduğu gösterilmiştir.

Parasetamolün ateş düşürücü etkisi hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Milton ve Wendlant kedilerin beyin ventriküllerine endotoksin kaynaklı maddeleri enjekte ederek oluşturdukları ateşi parasetamolün engellediğini, fakat aynı yere enjekte edilen

prostaglandin E1 (PGE1) kaynaklı ateşi etkilemediğini bildirmişlerdir. ²⁰ Daha sonra yapılan çalışmalarda parasetamolün beyin omurilik sıvısındaki prostaglandin (PG) benzeri maddeleri inhibe ederek ateşi düşürdüğü gösterilmiştir. ²¹

Yapılan yeni çalışmalarda parasetamolün MSS’de tespit edilen COX-3 olarak adlandırılan yani bilinen COX (COX-1, COX-2 den farklı) enzim varyantlarından farklı bir enzimi selektif olarak bloke ettiği düşünülmektedir. ²² Bu mekanizma üzerinde pek çok araştırmacı da hemfikir olmuştur. ^{23,24} Bütün bunlara rağmen insanda bulunan COX enzim varyantlarından COX-3 ile ilgili literatürde kesin bir bilgi mevcut değildir. ^{24,25}

Parasetamol inflamasyona sebep olan prostaglandin sentezini fazla etkilemediği için zayıf bir antiinflamatuvar olarak bile düşünülmemektedir. ²⁶⁻²⁸ Antitrombotik etkinliği zayıf olup kanama süresini değiştirmemektedir. ²⁷

2.4. Parasetamol’ün Yan Etkileri

Parasetamol, genellikle hafif yan etkilere neden olur, ancak hematolojik reaksiyonlar da bildirilmiştir. Deri döküntüleri ve alerjik reaksiyonlar nadiren görülebilir. Yüksek dozda parasetamol alınmasını izleyen ilk 24 saat içinde renk solukluğu, bulantı, kusma, anoreksi ve karın ağrısı gibi şikayetler ortaya çıkar.

12-24 saat içinde serum aminotransferaz düzeyleri ve bilirubinin yükselmesi ile protrombin zamanının uzamasıyla karaciğer hasarı belirir. Ciddi zehirlenme durumunda karaciğer yetmezliği ensefalopati, koma ve ölüme neden olabilir. Karaciğer hasarının, 10 g veya daha fazla miktarda parasetamol alan yetişkinlerde meydana gelme olasılığı yüksektir. Bunun nedeni ise, normal dozlarda parasetamol alındığında glutatyon (GSH) tarafından yeterli bir şekilde detoksifiye edilen toksik bir metabolit olan N asetil para benzokinonimin aşırı miktarda birikerek karaciğer dokusuna geri dönüşümsüz olarak bağlanmasıdır.

2.5. Akut Karaciğer Toksikitesi

Altta yatan herhangi bir karaciğer hastalığı karaciğer fonksiyonlarının aniden, tam veya tama yakın bir şekilde kaybıyla karakterize, hepatik ensefalopatinin eşlik ettiği akut karaciğer yetersizliği (AKY)'nin mortalitesi karaciğer transplantasyonunun keşfinden önceki dönemde %80'nin üzerinde iken ²⁹, günümüzde posttransplant dönemde surveyi'nin %65'in üzerinde olduğu bilinmektedir. ³⁰ Öncesinde herhangi bir karaciğer hastalığı olmaksızın, ağır karaciğer hasarı sonucu, semptomların başlamasından itibaren 8 hafta içinde hepatik ensefalopatinin gelişmesiyle karakterize tablo Fulminan karaciğer yetersizliği olarak ilk kez Trey tarafından tanımlanmıştır. ³¹ Gimson ise, 8-24 hafta arasında ensefalopati gelişen olguları geç başlangıçlı karaciğer yetersizliği şeklinde tanımlamıştır. ³² 1993'te Williams ise konuyu 3 kategoride ele alarak yeni bir sınıflama önermiştir: hiperakut, akut ve subakut karaciğer yetersizliği. ³³ Bu sınıflandırmaya göre süperenfeksiyonlar ve taşıyıcılık zemininde spontan veya 6 değişik nedene bağlı reaktivasyonlar (kortikosteroid kullanımı, antiviral kesilmesi veya direnci vb.) sonucu AKY gelişebilmektedir. Mortalite ise % 3.7-60 arasında değişmektedir. ³⁴

AKY'nin etiyojisi bölgelere göre değişiklikler göstermektedir. İngiltere'de akut karaciğer yetersizliğinin % 70'inden, ABD'de de % 20'inden asetaminofen toksisitesi sorumludur. ^{35,36}

2.6. Parasetamol Zehirlenmesi

Parasetamol zehirlenmesi, istemli ilaç alımları arasında en sık rastlanılanıdır. Normal tedavi dozlarında parasetamol karaciğer üzerine toksik değildir. Ancak 7.5-10 gramı geçen dozlarda ölümle sonuçlanabilen kuvvetli bir hepatotoksik etkisi vardır. Parasetamol zehirlenmesinde minimal ya da semptomsuz (bulantı, kusma, iştahsızlık) evre, klinik hepatotoksikite bulguları ortaya çıktığı, tedavisiz bile çoğu hastanın sekelsiz iyileştiği evre, metabolik asidoz, koagulopati, renal yetmezlik ve ensefalopatinin eşlik

ettiği fulminant hepatik yetmezlik evresi ve son olarak 1-3 ay sonunda karaciğer fonksiyon bozukluğunun tamamen ortadan kalktığı klinik iyileşme evresi olmak üzere 4 klinik evre tanımlanmaktadır.

Parasetamol karaciğerde metabolize edilir. İlacın büyük bir kısmı glukuronik asid veya sülfürik asidle konjuge edilerek idrarla atılır. Bunun yanında parasetamol karaciğerdeki karma fonksiyonlu oksidazlarla reaktif bir ara maddeye dönüştürülür. (Bu enzimler normal olarak farmakolojik bakımdan etkili veya toksik maddelerin metabolizmasında rol oynayan mikrozomal enzimlerdir.) Mikrozomal enzimlerin etkisiyle önce azot hidroksilasyonu, daha sonra da kinoid bir yapı oluşur ki, bu metabolit nükleofil özelliği taşıyan maddelerle reaksiyona girer. Kinoid yapılı bu ara metabolit o kadar reaktiftir ki, daha karaciğerde iken reaksiyona girer. Hücrede bulunan en kuvvetli nükleofil madde bir tripeptid olan glutatyon'dur. Serbest SH-grubuyla parasetamol metaboliti hemen reaksiyona girerek onu zehirsiz hale getirir. Oluşan glutatyon konjugatı, bir bölümü böbreklerde meydana gelen değişimler geçirdikten sonra merkaptürik asid (N-asetil sistein-konjugatı) şeklinde idrarla atılır. Glutatyon'un hepatositlerdeki konsantrasyonu birkaç mmol olduğundan ancak tedavi dozlarında verilen parasetamolden oluşan kinoid metabolitini zehirsiz hale getirebilir. İntihar amacıyla alınan çok yüksek dozlardaki parasetamolden oluşan metabolit miktarı için hepatositlerdeki glutatyon düzeyi yetersiz kalır. Kendisiyle reaksiyona girebilecek glutatyon ortamda olmayınca hücre proteinlerinin SH-gruplarıyla reaksiyona girer. Bu reaksiyon aşırı oranda meydana gelmişse karaciğer enzimleri görevlerini yapamaz hale gelir ve karaciğer nekrozu oluşur. Bu patofizyolojik mekanizma, aynı zamanda zehirlenme tedavisinde rol oynayan mekanizmayı açıklar. En ideali, kuşkusuz antidot olarak glutatyon kullanmaktır, ancak glutatyon hücre membranını geçemediğinden sistein, asetilsistein veya metionin antidot

olarak kullanılır. Sistein hem reaktif metaboliti bağlar, hem de glutatyon sentezi için kullanılabilir.

2.6.1. Parasetamol Zehirlenmesinin Klinik Bulguları

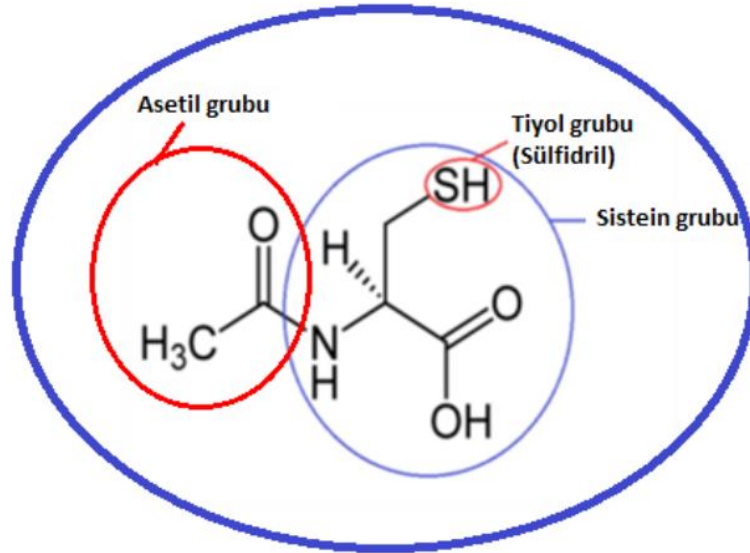
Parasetamol ile zehirlenme sonucu görülen klinik tablonun en önemli belirtisi, aspartat aminotransferaz (SGOT) düzeyinin 1000 IU/litre'nin üzerine çıkmasıdır. Asetilsistein tedavisinin, parasetamol alınmasını izleyen ilk 10 saat içinde başlatılması sonucu SGOT düzeyi 43 IU / litre olarak saptanan hastaların %7'sinde toksik reaksiyonlar ortaya çıkmıştır. 10-16 saat içinde asetilsistein tedavisine başlananların %29'unda, 16-24 saat içinde antidot alanların %62'sinde ve 24 saatten sonra asetil sistein kullananların %43'ünde toksik reaksiyon görülmüştür.

2.7. Parasetamol Zehirlenmesi'nin Tedavisi

Genellikle, parasetamol kan düzeyinin bilinmediği olgular da dahil, 7.5 g ve üzerinde parasetamol aldığı saptanan hastalara ilk 10 saat içinde spesifik antidot verilmelidir. Genel olarak 4.saatte ölçülen kan düzeyi 200 mg/L'yi, 10.saatteki kan düzeyi 60 mg/L'yi aşıyorsa tedavi gerekir. Sisteamin ve metionin eskiden antidot olarak kullanılırdı. Ancak her iki maddenin önemli kendilerine ait yan etkileri mevcuttu. Flushing, bulantı, kusmadan başlayıp depresyona dek genişleyen yan etki spektrumları olan bu maddeler insanlarda tedaviye uygun bulunmamıştır.³⁷ Bugün bu amaçla asetilsistein tercih edilmektedir. Asetilsistein ağız yolundan kullanılacaksa 140 mg/kg'lık bir yükleme dozunda verilmeli, 4 saatlik aralarla 70mg/kg'lık doz 17 defa uygulanmalıdır ya da 15 dakika içinde 150mg/kg, sonraki 4 saat içinde 50 mg/kg ve daha sonraki 16 saat içinde 100 mg/kg intravenöz enfüzyon şeklinde asetilsistein uygulanabilir. Zehirlenmenin üzerinden uzun süre geçmişse antidotları kullanabilmek için kan perfüzyonu gerekli olabilir. Dekstroz ve kan infüzyonu gibi temel önlemler de gerekli olabilir.

2.7.1. N-Asetil Sistein (NAC)

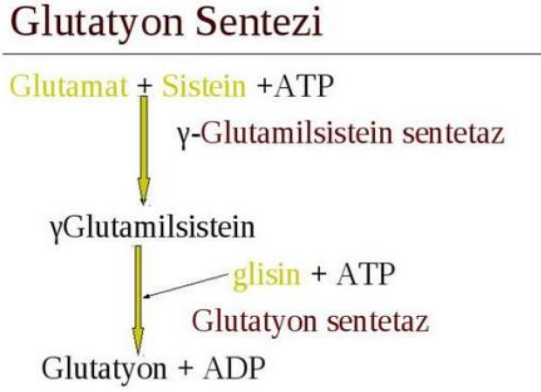
N-Asetil Sistein (NAC) parasetamol zehirlenmesinin bilinen aktif kullanılan antidotudur. Parasetamol zehirlenmesinin erken döneminde NAC kullanıldığında, etkili bir şekilde azalmış olan glutatyon depolarını doldurarak parasetamolün toksik metaboliti olan NAPQI'nın yaptığı hepatotoksisiteyi ve AKY'ni önler. ³⁸ NAC bir glutatyon prekürsörüdür, glutatyon depolarını doldurur ve karaciğerde sülfat konjugasyonunu artırır. Sonuç olarak glutatyon gibi etki ederek toksik metabolit olan NAPQI'ya bağlanır ve metabolizasyonunu sağlar. Parasetamol toksisitesini takiben 8-10 saat içerisinde uygulanması ciddi hepatotoksisiteyi engelleyebilmektedir. Eğer hastalarda AKY gelişmişse, komplikasyon ve ölüm riski %30'lara kadar ulaşmaktadır. ³⁹ Böylece bu hastalara erken dönemde NAC tedavisi uygulanarak mortalite oranı %1'in altına çekilebilir. NAC'ın optimal tedavi süresi tam olarak bilinmemektedir. Kemirgenlerde yapılan bir çalışmada, NAC tedavisinin uzamasının karaciğer iyileşmesini bozduğu ve parasetamol toksisitesini ise kötüleştirdiği belirlenmiştir. ⁴⁰



Şekil 2.3. N-Asetil Sistein'in kimyasal yapısı ⁴¹

Asetil sistein yapısındaki tiyol grubunun hidrojenini kolayca oksijen radikallerine vererek onları doyurur ve suya indirger. N Asetil Sistein yapısındaki sisteini Glutatyonun

karaciğerdeki cyp450 enzimleri tarafından oluşan yıkım ürünü Glutamata vererek Glutasyon oluşumunu artırır.



Şekil 2.4. Glutasyon sentezi'nin basamakları ⁴¹

1974 yılında ilk kez Prescott, parasetamol kaynaklı akut karaciğer toksisitesinde antidot olarak kullanılabileceğini göstermiştir. ⁴² Daha sonrasında yine Prescott tarafından 1977 yılında yapılan bir çalışmada 15 hastaya %20 solüsyon içinde oral olarak asetilsistein verilmiş ve etkinliği gösterilmiştir. ⁴³ 1988 yılında Smilkstein tarafından yapılan bir çalışmada ise 2540 hastada parasetamol zehirlenmesinde oral NAC tedavisi yapılarak NAC antidotunun etkisi gösterildi. ⁴⁴ Parasetamol alımını takiben 10 saat içinde NAC uygulamasının ilk 10-24 saatte NAC uygulamasına kıyasla oldukça başarılı şekilde AST ve ALT yükselmesini engellediği görüldü. Bu sonuçlara göre NAC tedavisine parasetamol zehirlenmesi olan hastalarda ilk 8 saat içinde başlamak gerektiği görülmektedir. Ayrıca parasetamol zehirlenmesi tedavisinde yüksek doz parasetamol alımını takip eden 8-10 saat içerisinde uygulanan oral N-asetilsistein kullanımının intravenöz form kadar etkili olduğu bu nedenle oral formun tercih edilebileceği gösterilmiştir. ⁹

2.7.2. Diğer Tedavi Yöntemleri

2.7.2.1. Simetidin

Simetidin mikrozomal bir enzim olan CYP2E1 enzimi tarafından metabolize olmaktadır. Parasetamol de CYP2E1 enzimi tarafından metabolize olmaktadır. Simetidin ve Parasetamolün birlikte alınması durumunda CYP2E1 enzimi yarışmalı olarak inhibe edildiğinde parasetamolün toksik metaboliti NAPQI oluşumu azalmaktadır. Fakat Slattery ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada parasetamol alımından 8 saat sonra 300 mg simetidin verilmesinin NAPQI oluşumunu azaltmadığını göstermiş olup bu da bize simetidin uygulamasının erken saatlerde başlanmasının gerektiğini göstermektedir.^{45,46}

2.7.2.2. Dializ

Parasetamol'ün ekstrakorporal eliminasyonu parasetamol toksisitesi tedavisinde tartışmalıdır ve varolan datalar karışıktır.⁴⁷ Hemodializ; şiddetli parasetamol toksisitesinde kullanılmış olup hemodializin hepatotoksisiteyi önlediğini veya azalttığını gösteren güvenilir bir data elde edilememiştir.⁴⁷ Hemodializin parasetamol toksisitesinde yararlı olamamasının en önemli nedeni ise yüksek doz alınan parasetamolün karaciğere hemen uğrayıp hasara başlaması olabilir.⁴⁸

2.7.2.3. Karaciğer Transplantasyonu

Karaciğer transplantasyonu parasetamol toksisitesine bağlı olarak gelişmiş yaygın karaciğer hasarındaki altın standart tedavi yöntemidir.⁴⁹ Çok az parasetamol toksisitesi gelişmiş hastada karaciğer transplantasyonu gerekmemektedir. Transplantasyon sonrası geriye dönüşümü olmayan ömür boyu süren bir immünoşüpresif tedavi gerekmektedir.⁵⁰ AHH gelişmiş hastalarda karaciğer transplantasyonu gerekip gerekmediğini belirleyen King College Hospital (KCH) kriterleri oldukça uygun olup bu kriterlere göre bu hastaların yol haritası çizilmektedir.⁵¹ KCH kriterlerine göre karaciğer transplantasyonu

gereken hastaların transplantasyonsuz mortalite oranı %90'a yaklaşmaktadır.⁵⁰ KCH kriterlerine kısaca değinmemiz gerekirse pH'ın 300 mikromol/l olması ve hastaların evre 3 veya evre 4 ensefalopatik olmasıyla değerlendirilir. Bu kriterlerin spesifitesi çok iyi olmasına rağmen zayıf sensitivitesi bulunmaktadır.

2.7.3. Prognoz

Parasetamolün aşırı dozunu almış, hepatotoksisite gelişmiş veya gelişmemiş hastaların %90'ı tam anlamıyla iyileşme gösterir.⁵² Hepatotoksisite gelişmiş hastaların %80'i ilk 12 saatte NAC uygulaması ile iyileşmiş olup eğer NAC verilmezse bu iyileşme %48'lerde kalmaktadır.² KCH kriterlerini tam karşılamayan hastaların %90-93'ü sağ kalmakta olup parasetamol harici gelişen AHH'ların oranından çok daha iyidir. Parasetamolle indüklenen karaciğer hasarında karaciğer transplantasyonsuz sağkalım oranı % 65-73 arasında değişmektedir.³⁰ Parasetamol alımından sonraki ilk 24 saatte 18 hastane yoğun bakımlarında tedaviye alınanların sağ kalım oranı sonraki zaman periyodunda gelenlerden oldukça yüksektir. Hepatik ensefalopatinin derecesi arttıkça sağkalım oranı azalmaktadır.² Serum kreatinin ve protrombin zamanı ile sağkalım arasında çok güçlü bir korelasyon bulunmaktadır.⁵³ PT'si 90 sn olan hastalarda sağkalım oranı %80 iken PT'si 180 sn olan hastalardaki sağkalım oranı %8'lere kadar gerilemektedir.⁵³ Benzer şekilde serum kreatinin seviyesi 100 mmol/L olan hastaların sağ kalım oranı % 65 iken 300 mmol/L olan hastalarda bu oran % 23 e kadar inmektedir.²⁹ Parasetamol ile indüklenen karaciğer hasarında karaciğer transplantasyon ihtiyacı diğer nedenlerle oluşan karaciğer hasarındaki karaciğer transplantasyon ihtiyacından oldukça düşüktür.⁵⁴

2.8. Biyokimyasal Parametreler

2.8.1. Aspartat Aminotransferaz (AST, SGOT)

Aspartat aminotransferaz veya serum glutamik oksalasetik transaminaz (AST)

organa spesifik olmayan bir enzimdir. Hepatositlerde, kalp kasında, iskelet kaslarında, böbrek dokusunda ve plasentada bulunur. Bu dokularda nekroz geliştiğinde serum AST konsantrasyonunda artış görülür. Hepatositlerin içinde bulunan aspartat aminotransferazın % 60-80'i mitokondri içinde bulunurken diğer bölümü çözünür formda sitoplazma içinde bulunur. AST'nin mitokondriyel formunun salınımı için membran permeabilitesinde değişime neden olan harabiyetten daha şiddetli bir bozukluğun olması gereklidir. Bunun sonucu olarak AST aktivitesindeki artış, alanin aminotransferazın artışından daha geç gerçekleşir. AST'nin konsantrasyonundaki artış en yaygın olarak hepatoselüler hastalıklarda görülür.^{55, 56} AST, L-aspartat ve alfa- 27 ketoglutarat'ın oksaloasetat ve glutamata transaminasyonunu katalize eder. B6 vitaminin aktif metaboliti olan Piridoksal 5'-fosfat, AST'ye sıkıca bağlanan bir kofaktördür ve enzimin aktivitesi için gereklidir. Bu vitaminin alımındaki yetersizlik enzim aktivitesinde azalmaya sebep olur.⁵⁷ AST'nin sitozolik (AST1) ve mitokondrial (AST2) iki izoenziminin çok sayıda formları vardır.⁵⁸ AST pek çok yumuşak dokuda bulunduğundan (iskelet kasları, kalp kası ve karaciğerde yüksek konsantrasyonda; eritrositler ve böbreklerde daha az), serum aktivitesinde yükselme yumuşak doku hasarının bir göstergesidir.⁵⁵ Ancak organa spesifik bir enzim değildir.⁵⁹ Tüm hayvanlarda yumuşak doku nekrozunun spesifik olmayan indikatörüdür.

2.8.2. Alanin Aminotransferaz (ALT, SGPT)

Alanin aminotransferaz veya serum glutamik pirüvik asit transaminaz (ALT) sitoplazmik bir enzimdir. Hepatoselüler membran permeabilitesinin artışında hücre dışına salınımı artar. Yüksek serum alanin aminotransferaz seviyesi hepatoselüler hasarın şiddetli olduğunu gösterir. ALT transferazlar grubunda yer alır ve albumin metabolizmasında aspartat aminotransferaz ile birlikte görev alır. Alanin aminotransferaz, hücre sitoplazmasında L-alanin ve L-ketoglutarat'ın piruvat ve

glutamata geri dönüşümlü transaminasyonunu katalize eder. Piridoksal 5'-fosfat, ALT ve pek çok aminotransferazlara sıkı şekilde bağlanan bir kofaktördür ve ASTde olduğu gibi B6 vitamininin alınımındaki yetersizlik enzim aktivitesinde azalmaya sebep olur. Serum ve spinal sıvıda ALT aktivitesi olmasına rağmen, çok düşük renal spesifik aktivitesi nedeniyle idrarda ALT aktivitesi yoktur. AST ve ALT'nin serumdaki yükselmiş aktiviteleri genellikle klinik pratikte ve sağlık taramalarında karaciğer hastalıklarının belirteci olarak kullanılır. Bu bozukluklar yüksek alkol alımı ve hepatitis virüsü enfeksiyonu olmadan rastlanan alkolik olmayan karaciğer yağlanması tanımında önemlidir. Diyabetli hastalarda serum aminotransferazlarının yükselmesi sıklıkla gözlenmekte ve bu çoğunlukla karaciğere yağ infiltrasyonundan kaynaklanmaktadır. Şişmanlıkta da serum aminotransferazlarının özellikle de ALT aktivitesinin yükseldiği bilinmektedir. ⁶⁰ Diyabette serum glikoz konsantrasyonu; aspartat aminotransferaz aktivitesi ile birlikte serum alanin aminotransferaz düzeylerinde de önemli oranda yükselmektedir. ⁶¹

2.9. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidanlar tüm canlı dokularda belirli bir denge halinde üretilmektedir. Doku bütünlüğünün ve fonksiyonlarının normal fizyolojik şartlarda devam ettirilebilmesi için aşırı üretilen ROS'lar, vücudumuzun antioksidan savunma sistemlerince nötralize edilirler. Glutasyon (GSH), glutasyon s transferaz (GST), glutasyon peroksidaz (GPO), glutasyon reduktaz (GRx), katalaz (CAT), süperoksid dismutaz (SOD) ve antioksidan vitaminler (A, E ve C vitamini gibi) bu savunma sistemleri içerisinde yer almaktadırlar. ⁶² Oluşan fazla oksidatif stresi antioksidan savunma sistemlerinin nötralize etmede yetersiz kalması durumunda oksidan/antioksidan denge lehine bozulur ve oksidatif hasar denen zararlı etkiler ortaya çıkmaya başlar. Normal fizyolojik şartlarda ise oksidan/antioksidan dengesinde

antioksidanların üstünlüğü söz konusudur. ^{63, 64} Oksidanların bu dengeyi bozmasına “oksidatif stres” denir ve sonuçta doku hasarı meydana gelir. ⁶⁵ Oksidatif doku hasarı, süresince oksidan moleküller hücrenin yapı taşları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimler üzerinde çeşitli reaksiyonlara neden olurlar. ⁶⁶ ROS’ların aşırı oluşumu, polimorf çekirdekli lökositlerin (PNL) aktivasyonuna da yol açmaktadır ve böylece ROS’ların üretimi daha da artmaktadır. ⁶⁷ ROS’lar, hücre membran lipidlerini oksidasyona uğratarak, lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) gibi toksik ürünlerin meydana gelmesine neden olurlar. ⁶⁸ MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak, membranlarda reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri etkisiz hale getirmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. ⁶⁹

2.10. Antioksidanlar

Canlı organizmalar, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için hem hücre içerisinde hem de hücre membranında etkili olan çok sayıda korunma mekanizması geliştirmektedirler. Bu mekanizmalar gerek radikal üretimini engelleyerek, gerekse oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırarak etki göstermektedirler. GSH, SPO, GST, GRx SOD ve CAT ‘lar canlı dokularda en çok bilinen önemli antioksidanlardandır. GSH, birçok hücrede bulunan L-glutamat, L-sistein ve glisinden oluşan tripeptiddir. GSH aktif bölgesinde selenyum içeren bir enzim olan GRx enzimi katalizörlüğünde, H₂O₂ ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidan etki gösterir ve H₂O₂’yi hücrelerden uzaklaştırır. GSH hidrojen peroksiti veya organik oksitleri kimyasal olarak zehirsizleştirerek ve hücreleri ROS hasarından korur. ^{70, 71}

2.10.1. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH) karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan glisin, sistein ve glutamat amino asitlerinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Glutasyon (GSH) çok önemli

bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. ⁷⁰ Glutasyon (GSH) yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. Glutasyon (GSH) eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir.

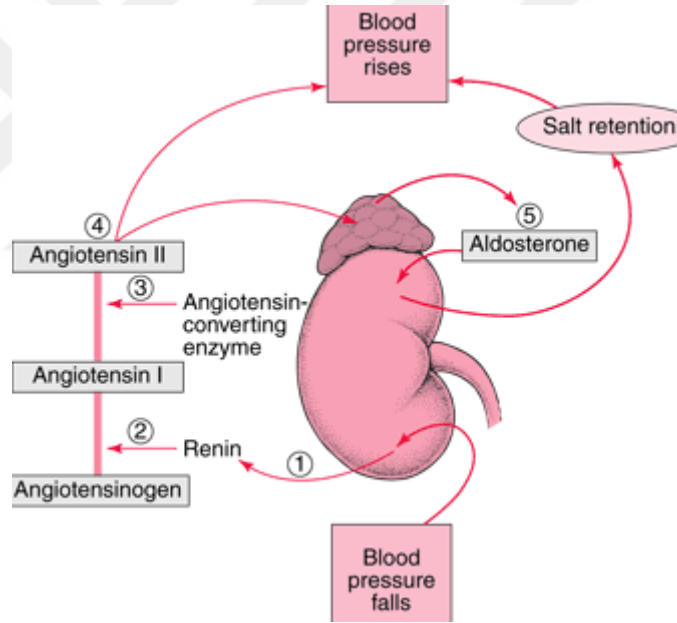
2.10.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Bu enzim, süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. SOD aktivitesi yaş ilerledikçe artar. SOD hemen hemen bütün canlılarda bulunmaktadır. Memelilerde üç tip SOD bulunmaktadır. Bunlar; 1- sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn ihtiva eden Cu-Zn SOD, 2- extraselüler etki gösteren EC SOD ve 3- mitokondride bulunan tetrametrik Mn ihtiva eden Mn-SOD'dur. SOD'un demir ihtiva eden izomeri Fe-SOD ise sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunmaktadır. SOD'un tüm çeşitleri süperoksitin dismutasyon reaksiyonunu katalizleyebilir. ⁷² Hemen hemen bütün canlılarda bulunan ve süperoksit gibi oldukça saldırgan bir radikalın etkisini ortadan kaldıran SOD'un, canlılarda önemli roller üstlendiği ve yaşamsal etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. ⁷³ Serbest radikallerin oluşturduğu yıkıcı etkinin önlenmesinde, SOD enziminin katalaz enzimi ile birlikte incelenmesi gerektiği düşünülmektedir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan hidrojen peroksit, oksijenin toksik türlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir. ⁷⁴

2.11. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitörleri ve Fizyolojik

Önemi

Bu grup ilaçlar, angiotensin I'in güçlü bir vazokonstriktör olan angiotensin II (AII)'ye dönüşümünü katalize eden ACE'yi inhibe ederek etki ederler. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzimin bir diğer adı ise kininaz'dır. Ace inhibitörleri bradikininin yıkımını azaltarak bradikinin düzeyini artırır. Böylece, vazokonstriksiyon önlenir ve vazodilatasyon sonucu periferik damar direnci düşer. Antihipertansif etki meydana gelir. ACE inhibitörleri bunun yanı sıra, kalp ve damar düz kas hücrelerinde proliferasyonu ve "remodeling"i azaltır. AII'nin aldosteron salınımını uyarıcı etkisi önlenir, natriüretik etki meydana gelir, su ve tuz tutulması azalır.



Şekil 2.5. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron sistemi ⁷⁵

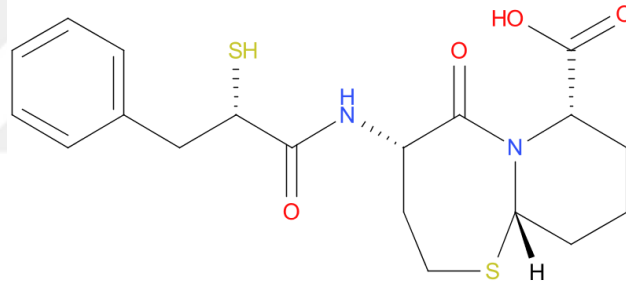
Şuan kullanımda olan ACE inhibitörlerinden bazıları Enalapril, Fosinopril, Kaptopril, Lizinopril, Ramipril ve Perindopril'dir. Yeni geliştirilmekte olan ACE inhibitörlerinden bazıları ise Omapatrilat, Sampatrilat ve Fosidotrilattır.

2.12. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitörlerinin Parasetamol Zehirlenmesindeki Önemi

Yeung tarafından yapılan bir çalışmada ACE inhibitörlerinden olan kaptopril, yapısında bulunan endojen tiyol grubundan dolayı antioksidan mekanizma olan glutatyon tükenmesine bağlı parasetamol kaynaklı hepatotoksisitede etkili bulunmuştur. ⁷⁶

Farklı bir çalışmada ise Anjiyotensin II oluşumu ile oksidatif stres arasında güçlü bir ilişki olduğu görülmüştür. ¹⁰ Anjiyotensin II, kardiyovasküler sistemde NADPH oksidazın kuvvetli bir aktivatörüdür ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırır. Bu nedenle ACE inhibisyonu sonucu azalan anjiyotensin II ile oksidatif stres ve buna bağlı doku hasarı engellenmiş bulunmaktadır.

2.13. Omapatrilat



Şekil 2.6. Omapatrilat'ın moleküler yapısı ⁷⁷

Molekül ağırlığı 408.53 g/mol, formülü $C_{19}H_{24}N_2O_4S_2$, moleküler yapısı Şekil 2.6'da gösterilen omapatrilat hem ACE hem NEP (nötral endopeptidaz) inhibisyonu yapan hipertansiyon ve kalp hastalıklarında kullanılması amaçlanan yeni geliştirilmekte olan bir etken maddedir. ACE inhibisyonuyla Anjiyotensin II oluşumu engellenir ve böylece bu peptitlerin; vazokonstrüktör, tuz birikimi etkileri azaltılmış olur. NEP ise farklı olarak bazı regülatuar peptitleri [atriyal natriüretik peptit (ANP) dahil] inaktive eden enzimleri bloke eder. ANP ve bradikinin (BK) artışı sonucu; vazodilatasyon ve natriürezin artışı ve kalbin hipertrofisi ve fibrozisinin engellenmesi mümkün olabilir. NEP ve ACE'nin ayrı

ayrı inhibisyonuna göre ikisinin birlikte kullanılmasıyla daha fazla vazokonstrüksiyon, sodyum tutulumu azaltılır, kardiyak proliferasyon önlenir, vazodilatasyon, antihipertrofik ve natriüretik etkiler ön plana çıkar. NEP; bir hücre yüzey enzimidir. Birçok dokuda bulunur ve ANP ve BNP (brain natriüretik peptit) gibi biyoaktif peptitleri parçalar. NEP inhibisyonuyla ANP ve BK katabolizması korunarak; vazokonstrüktör, sodyum birimimi dengesi vazodilatör, natriüretik ve kardiyoprotektif etki artışına dönüşebilir ve böylece antihipertansif etki ortaya çıkar. ⁷⁸⁻⁸⁰ Ayrıca daha önce yapılmış olan çalışmalarda omapatrilat için tedavi edici dozun 40 mg/kg olduğu gösterilmiştir. ^{11, 79, 81}

2.13.1. Omapatrilat'ın Farmakokinetiği

Daha önce yapılmış bir çalışmada 18-50 yaş arası sağlıklı gönüllü erkek ve hasta gönüllü erkek hastalarda omapatrilat 25 mg/250ml su şeklinde oral olarak ve 10mg/10ml infüzyon şeklinde uygulandığında ilaç absorpsiyonu hızlı ve maksimum konsantrasyona 2 saatte ulaşmıştır. ⁸² Yarı ömrü ortalama 14-19 sa olarak gösterilmiştir. Yüksek oranda metabolize olan Omapatrilat, S-metilasyon, S-oksidasyona, amid hidrolizine uğramaktadır. Eliminasyon miktarı ise %80 oranında böbreklerden idrarla atılarak gerçekleşir.

2.13.2. Omapatrilat'ın Endikasyonları ve Yan Etkileri

Hem ACE hem NEP inhibisyonu yapan Omapatrilatın hipertansiyon tedavisinde, Konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanılması hedeflenmiştir. Ancak klinik deneme aşamasında Omapatrilatın anjiyoödem yapması konjestif kalp yetmezliği tedavisinde başarısız bulunmuştur. ⁷⁹

3. MATERYAL VE METOT

Bu tezde yapılan çalışmalar Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarları, Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarları ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmada ATADEM'in (Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi) deneysel hayvan laboratuvarından temin edilen toplam 56 adet Balb C erkek fare kullanıldı. Bu farelerin ağırlıkları 40-50 gram arasında değişmekteydi. Deneyler öncesinde ve sırasında bu farelere yeterli miktarda su ve yem verildi; ve hayvanlar belirlenen gruplara ayrılarak standart sıcaklıkta (22 °C) laboratuvarda tutuldu. Yapılması gereken çalışmalar öncesinde Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'na (HADYEK) 19.04.2018 tarihli ve 42190979-000-E.1800126822 sayılı yazı ile başvuru yapılmış, bu başvurunun HADYEK tarafından 04.05.2018 tarihli 75296309-050.01.04-E.1800138830 sayılı yazıda 108 nolu karar ile etik ilkelere uygun olduğu kabul edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan İlaçlar

Parasetamol (PARA): Yapılan çalışmalarda 1X'lik PBS (fosfat bazlı tampon çözelti – 1 ml) içerisinde %1 sodyum karboksi metil selüloz (CMC) beraberinde 400 mg/kg parasetamol çözündürülerek ve bir miktar ısıtıp karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan parasetamol çözeltisi, oral olarak gavaj yöntemiyle farelere uygulandı.

N-Asetil Sistein (NAC): %0.9 luk NaCl çözeltisinde 600 mg tek tablet NAC hazırlandı. Hazırlanan çözelti farelere 140 mg/kg dozunda oral olarak gavaj yöntemiyle uygulandı.

Omapatrilat: %0.9 luk NaCl çözeltisinde omapatrilat süspansiyon edildi. Hazırlanan süspansiyon farelere uygun dozlarda (10, 20 ve 40 mg/kg) oral olarak gavaj yöntemiyle uygulandı.

3.1.3. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan cihazların model ve markaları

Cihaz	Modeli ve Markası
Buzdolabı (-86 °C)	Nuaire NU-9483E, USA
Derin Dondurucu	Vestel BZP-XL3402W, Türkiye
Doku Homojenizatörü	Tissue Lyser II Qiagen, Germany
Eliza Okuyucu	Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA
Etüv	Memmert WNB 7-45, Germany
Hassas Terazi	Shimadzu ATX224, USA
Karıştırıcı	IKA- MS 3 basic, USA
Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A, Germany
Mikroplate Yıkayıcı	Stat Fax 2600 Microplate Washer, USA
Otomatik Multikanal Pipet	Eppendorf Research Pro (20-300µ)
pH Metre	SCHOTT Instruments Lab 850, Germany
Pipet Seti	Eppendorf Research Plus
Santrifüj (Soğutmalı)	Hettich Zentrifugen 320R, Germany

3.2. Metot

3.2.1. Deney Planı

Yapılan çalışmada hayvanlar 7 gruba ayrıldı. Grupların her birinde en az 8 adet olmak üzere toplam 56 adet fare kullanıldı. Deneyler başlamadan önce bütün fareler 24 saat süre boyunca aç bırakıldı. Sonrasında deneyde aşağıda belirtilen plana göre gruplara ayrılan farelere ilaçlar uygulandı.

1. Hayvan Grubu (sağlıklı): % 1'lik CMC içeren 1 ml 1X PBS çözeltisi, gavaj metoduyla oral olarak uygulandı.

2. Hayvan Grubu (sağlıklı + omapatrilat 40 mg/kg): % 0.9'luk NaCl çözeltisinde hazırlanan 40 mg/kg dozunda omapatrilat gavaj yoluyla oral olarak uygulandı.

3. Hayvan Grubu (parasetamol 400 mg/kg): 400 mg/kg dozunda % 1'lik CMC içeren 1 ml 1X PBS'de hazırlanan parasetamol çözeltisi, gavaj yoluyla oral olarak uygulandı.

4. Hayvan Grubu (parasetamol 400mg/kg + NAC 140mg/kg): % 0.9'luk NaCl çözeltisinde hazırlanan 140 mg/kg N-Asetil Sistein oral yoldan verildikten 1 saat sonra 400 mg/kg dozunda 1 ml parasetamol çözeltisi, gavaj yoluyla oral olarak uygulandı. Parasetamol verildikten 12 saat sonra NAC tekrar aynı dozda uygulandı.

5. Hayvan Grubu (parasetamol 400mg/kg + omapatrilat 10mg/kg): 10 mg/kg dozunda omapatrilat oral olarak verildikten 1 saat sonra, 400 mg/kg dozunda 1 ml parasetamol solüsyonu gavaj yoluyla oral olarak uygulandı.

6. Hayvan Grubu (parasetamol 400 mg/kg + omapatrilat 20 mg/kg): 20 mg/kg dozunda omapatrilat oral olarak verildikten 1 saat sonra, 400 mg/kg dozunda 1 ml parasetamol solüsyonu gavaj yoluyla oral olarak uygulandı.

7. Hayvan Grubu (parasetamol 400 mg/kg + omapatrilat 40 mg/kg): 40 mg/kg dozunda omapatrilat oral olarak verildikten 1 saat sonra, 400 mg/kg dozunda 1 ml parasetamol solüsyonu gavaj yoluyla oral olarak uygulandı.

Bu hayvan grupları aşağıdaki deney planı tablosunda özetlenmiştir:

Tablo 3.2. Deneyleerde kullanılan hayvanların sayıları ve tedavi grupları

Gruplar	Hayvan Sayısı	Tedavi
1	8	Sağlıklı (1 ml PBS)
2	8	Sağlıklı (1 ml PBS) + Omapatrilat (40 mg/kg)
3	8	Parasetamol (400 mg/kg)
4	8	Parasetamol (400 mg/kg) + NAC (140 mg/kg)
5	8	Parasetamol (400 mg/kg) + Omapatrilat (10 mg/kg)
6	8	Parasetamol (400 mg/kg) + Omapatrilat (20 mg/kg)
7	8	Parasetamol (400 mg/kg) + Omapatrilat (40 mg/kg)

Uygulanan parasetamol dozları literatür araştırması ile belirlenmiştir. ^{43, 83} Parasetamol verildikten 4 saat sonra tüm gruplara deney bitene kadar yeterli su ve yem verildi. Bu literatür bulgularına göre 400 mg/kg parasetamol gavaj yöntemiyle oral olarak uygulanmasının üzerinden 24 saat geçtikten sonra karaciğer toksisitesi oluşmuştur.

3.2.2. Histolojik Çalışmalar

Bu tezdeki histolojik çalışmalar Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı histoloji Laboratuvarı ve Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2.2.1. Parafin Kesitlerde Konvansiyonel Işık Mikroskop

Tüm gruplardaki farelerden alınan karaciğer dokularına kod numaraları verilerek içinde %4'lük formaldehit içeren şişelere bırakıldı. Ardından aşağıda belirtilen sırası ile doku takip işlemlerine geçildi.

1. Akarsuda yıkama (gün boyu)
2. %70'lik Alkolde (Merck) ® 1 gece bekletme
3. %80'lik Alkolde 1 saat bekletme
4. %96'lık Alkolde 1 saat bekletme
5. %96'lık Alkolde 1 saat bekletme

6. %100'lük Alkolde 1 saat bekletme
7. %100'lük Alkolde 1 saat bekletme
8. Ksilende (Merck) ® 10 dakika bekletme
9. Ksilende 10 dakika bekletme
10. Ksilende 10 dakika bekletme
11. Ksilen + boncuk parafin (Merck) ® 60°C'lik etüvde 1 saat bekletme
12. Boncuk parafinde 60°C'lik etüvde 1 saat bekletme
13. Boncuk parafinde 60°C'lik etüvde 2 saat bekletme.

Dokular parafin bloklara gömülerek kesit alınması işlemlerine hazır hale getirildi. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT) ile 5 µm'lik kesitler cam lamalar üzerine alındıktan sonra aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutularak boyama işlemi gerçekleştirildi.

1. Ksilolde (20 dak.) bekletme
2. Ksilolde (10 dak.) bekletme
3. İki ayrı % 96'lık Alkol serisinde (5 dak.) bekletme
4. %80'lik Alkol (10 dak.) bekletme 34
5. Çeşme suyunda yıkama
6. Hemotoksilen boyasında (1 dak.) bekletme
7. Asit-Alkol karışımına batırılıp çıkarma
8. Eozin solüsyonunda (1 dak.) bekletme
9. Suda (1 dak.) yıkama
10. %80'lik Alkolde (10 dak.) bekletme
11. İki ayrı % 96'lık Alkol serisinde (10 dak.) bekletme
12. Ksilol serilerinde (20 dak.) bekletme
13. Entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirildi.

İncelemeye hazır hale gelen kesitler, Olympus BH 40 marka kamera ataçmanlı ışık mikroskobu altında incelenerek ilgili tüm gruplara ait fotoğraflar çekildi.

3.2.3. Biyokimyasal Çalışmalar

3.2.3.1. Serumda Yapılan Analizler

AST, ALT ölçümü için serumun elde edilmesi: EDTA'lı biyokimya tüpüne konulan kanlar 4000 rpm'de 10 dakika boyunca 4 °C'de santifüj işlemi gerçekleştirildi. Analiz yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Her örneğin AST ve ALT seviyeleri ikişer kere yüksek hassasiyetteki ELISA kitiyle (USCN Life Science-E90207Ra, E91214Ra-China) ölçüldü.

AST Ölçümü

Kullanılan reaktifler: Standart (dondurulmuş), Detection reagent A (green), Detection reagent B (red), TMB substrate, Wash buffer, Standart diluent, Assay Diluent A, Assay diluent B, Stop solution.

Deneyin yapılışı:

1. Kuyulara Standart, kör ve numunelerden 100 ul eklendi. Plate'in üstü kapatıldıktan sonra 2 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
2. Yıkama işlemi 3 kere yapıldıktan sonra, her kuyuya 100 ul Detection Reagent A solüsyonu eklendi. 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
3. Yine yıkama işlemi 3 kere yapıldıktan sonra her kuyuya 100 ul Detection Reagent B solüsyonu eklendi. 30 dk. 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
4. Solüsyonlar kuyulardan alındı ve yıkama işlemi uygulandı.
5. Her kuyuya 90 ul Substrat eklendi. 15-20 dk. 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
6. Her kuyuya 50 ul stop solüsyonu eklendi ve sıvılarda sarı renk gözlemlendi.
7. 450 nm'de ölçüm alındı.

AST Miktarının Hesaplanması: Ölçümler Epoch Elisa reader cihazında yapıldı. Cihazın Gen 5 programı kullanılarak hesaplamalar yapıldı. Standart Log-Log eğri hazırlandı. Y axis: AST kons., X axis: abs. Standartlara en uygun şekilde bir doğru çizildi ve numunelerimizin konsantrasyonları belirlendi. Konsantrasyonlar ng/ml olarak hesaplandı.

ALT Ölçümü

Kullanılan reaktifler: Standart(dondurulmuş), Detection reagent A (green), Detection reagent B (red), TMB substrate, Wash buffer, Standart diluent, Assay Diluent A, Assay diluent B, Stop solution.

Deneyin yapılışı:

1. Standart, blank ve numunelerimizden her kuyuya 100 ul eklendi. 2 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
2. Tüm sıvılar alındı, yıkama işlemi uygulanmadı.
3. Her kuyuya 100 ul Detection Reagent A solüsyonu eklendi. 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
4. Solusyonlar kuyulardan alındı ve yıkama işlemi uygulandı.
5. Her kuyuya 100 ul Detection Reagent B solüsyonu eklendi. 30 dk. 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
6. Solusyonlar kuyulardan alındı ve yıkama işlemi uygulandı.
7. Her kuyuya 90 ul Substrat solüsyonu eklendi. 15-20 dk. 37 °C'de karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
8. Her kuyuya 50 ul stop solüsyonu eklendi ve sarı renk gözlenmeye başlandı.
9. 450 nm'de ölçüm alındı.

ALT Miktarının Hesaplanması: Ölçümler Epoch Elisa reader cihazında yapıldı. Cihazın Gen 5 programı kullanılarak hesaplama yapıldı. Standartlara uygun log-log eğrisi

hazırlandı. Y axis: ALT kons., X axis: abs. Numunelerimizin konsantrasyonları belirlendi. Numune konsantrasyonlar ng/ml olarak hesaplandı.

3.2.3.2. Karaciğer Dokusu Üzerinde Yapılan Analiz İşlemleri

Büyükölçekli analiz işlemlerinden sonra, deney hayvanlarına ait karaciğer doku örnekleri -80°C'de muhafaza edildi. 75 mg'lık fare karaciğer dokularının homojenizasyonu işlemi 3 dk süresince 30 Hz titreşimde spesifik homojenat tampon solüsyonunda (uygun bufferda) buz üzerinde Tissue Lyser sayesinde gerçekleştirildi. Sonrasında ise kitte belirtilen yaptırımlar üzerinden gidilerek doku santrifüjü sağlandı. Biyokimyasal analizler için her bir fare karaciğerindeki SOD aktivitesi ve MDA seviyesi manuel yöntemlerle, GSH, ACE ve Neprilisin seviyeleri ise ELISA kitleriyle tayin edilmiştir. Ayrıca spesifik buffer ile homojenizasyonu sağlanmış bütün karaciğer dokularında tüm veriler her mg protein için ort±standart sapma şeklinde ifade edildi.

Protein tayini: Protein yoğunlukları ticari protein standartlarından Lowry metodu kullanımıyla saptandı (Sigma Aldrich, Total protein kit-TP0300-1KT-USA).

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite tayini

Reaktif Maddeler: Assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH: 8, 0.1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)), Sample Buffer (50 mM Tris-HCl, pH: 8), Radical Detector (Tetrazolium tuzu), Sod Standart (Bovine eritrosit SOD (Cu/Zn)), Xanthine Oxidase.

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu

1. Dokular kırmızı kan hücresi ve kan pıhtılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkanıp, sıvı azot içinde dokularımız homejenizasyon işlemine tabi tutuldu,
2. 70 mM sükröz, 210 mM mannitol ve 1mM etilen glikol-bis tetraasetik asit (EGTA) içeren pH'ı 7.2 olan doku başına 1 ml soğuk HEPES buffer ile ultra

turrax homojenizatörde buz aküsü üzerinde 1 dakika kadar homojenizasyonu sağlandı,

3. Bütün örnekler işlem bitinceye dek 4 °C’de muhafaza edilerek saklandı,
4. 4 °C 10000 RPM’de 5 dk süresince santrifüj işlemi gerçekleştirildi,
5. Serum kısmında ölçüm yapıldı.

Çalışma prosedürü

1. Çalışmada 96 kuyucuklu plate kullanıldı,
2. Tüm kuyucuklara ölçüm karışımından 200’er µl ilave edildi,
3. Standartlar hazırlanarak 50 µl standartlar sırasına eklendi,
4. Numune çözeltilerinden uygun kuyucuklara 50’şer µl ilave edildi,
5. Kör kuyucuğuna 50 µl homojenat tamponu koyuldu,
6. Oda sıcaklığında herbir kuyucuğa 20’şer µl xantin oksidaz ilave edildi,
7. İlk kuyucuğa XO ekleme işleminin üzerinden 20 dakika geçtikten sonra 560 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

SOD aktivitesi analizi: Oluşan mavi-mor renkteki formazon boyasındaki azalmanın absorbans düzeyleri 560 nm’de 96’lık well plate kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak daha önce hazırlanmış olan SOD stok solüsyonu ile oluşturulan standart grafikten yararlanılarak ölçüm hesabı yapıldı. Numunelerin SOD aktivitesi, U/mg protein şeklinde ifade edildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar yapılarak tespit edildi. Standart ve numunelerin konsantrasyonları hesaplandı.

Total Glutasyon (GSSG/GSH) miktar tayini

Reaktif Maddeler: YLA0167MO ELISA kiti içinde standart dilüsyon çözeltisi, kromojen solüsyon A, kromojen solüsyon B, streptavidin-HRP, standard solüsyon, stop solüsyon, biotin ile işaretlenmiş GSH antibodyleri

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu

1. Dokular kırmızı kan hücresi ve pıhtılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkama yapıldı,
2. 75 mg doku üzerine 4.5 ml homojenat tamponu eklenerek homojenizasyonu sağlandı,
3. Homojenatlar, 12000 RPM ve 4 °C'de 15 dakika boyunca santrifüj edilip ve serumlar GSH seviyesinin tespiti için kullanıldı.

Çalışma prosedürü

1. Çalışmada 96 kuyucuklu plate kullanıldı,
2. Ölçüm tamponundan her bir kuyucuğa 120'şer µl eklendi,
3. Boş kuyucuğa kromojen A, kromojen B ve stop solüsyonu eklendi,
4. Standart solüsyon kuyucuğuna 50 µl standart solüsyon ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi,
5. Ölçüm yapılacak dokuların konulduğu kuyucuklara 40 µl örnek, 10 µl GSH antibodyleri ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi,
6. Kuyucukların olduğu platein üstü yapışkan membran ile örtüldü ve yavaşça karıştırıldı. Sonrasında 37 °C'de etüvde 60 dk inkübe edildi,
7. Yıkama çözeltisi 30 kez seyreltildi ve Mikroplate Yıkayıcı kullanılarak örnekler yıkandı,
8. Her kuyucuğa 50şer µl kromojen solüsyon A ve kromojen solüsyon B konuldu ve hafice karıştırıldıktan sonra 10 dakika boyunca 37 °C'deki etüvde inkübe edildi.
9. 50şer µl stop solüsyon ile her kuyucuktaki reaksiyon durduruldu, ve kuyucuk renklerinin maviden sarıya dönmesi sağlandı,

10. Stop solüsyonunun eklenmesinden 10 dk içinde, tüm kuyucukların 450 nm ışığı boş kuyucuğa göre absorbansları ölçülerek kaydedildi.

GSH miktarının hesaplanması: Oluşan sarı renk miktarları 450 nm'de 96'lık well platede okunup, seyreltme katsayıları dikkate alınarak daha önce hazırlanmış olan GSH stok solüsyonu ile oluşturulan standart grafikten faydalanılarak ölçüm hesabı yapıldı. Serum GSH seviyesi, nmol/mg protein şeklinde ifade edildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar yapılarak tespit edildi.

Malondialdehit (MDA) miktar tayini

Reaktif Maddeler; MDA standart (malon dialdehid bis), Thiobarbituric acid (TBA), SDS lysis solution, TBA acid diluent, Sodium hidroxide solution, BHT solution (İçerisinde % 5 lik butylated hydroxytoluene)

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu

1. Dokuların homojenizasyon öncesinde sıvı azot altında PBS ile yıkaması yapıldı,
2. Sıvı azot ile parça parça olan örnekler 75 mg olacak şekilde tartımı yapıldı,
3. 75 mg doku üzerine 1 ml homojenat tamponu eklenerek 3 dk boyunca 30 Hz'de tissue lyser ile homojenizasyonu sağlandı.

Çalışma prosedürü

1. Çalışmada 96 kuyucuklu plate kullanıldı,
2. Tüm kuyucuklara 10µl SLS, 75 µl %20 asetik asit, 75 µl %0.08 TBA ve 30 µl saf su eklendi,
3. Numune kuyularına 10'ar µl uygun numunelerden eklendi,
4. Kör kuyusuna 10 µl homojenat tampon solüsyonu koyuldu,
5. Standartlar uygun kuyucuklara 20'şer µl eklendi,

6. Pipetleme işleminden sonra plate, 105 °C'de 90 dakika inkübe edildi,
7. İnkübasyon sonunda plate, 4000 rpm'de, 4 °C'de, 15 dakika boyunca santrifüj edildi,
8. Süpernatant (üstte kalan kısım) MDA çözeltisi olarak kullanıldı ve 200'er µl örneklerin 532 nm dalga boyunda absorbansları kaydedildi.
9. Örnek ile standartlar iki tekerrür olarak ölçüldü.

MDA miktarının hesaplanması: Meydana gelen pembe renk miktarları 532 nm'de 96'lık well platede okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak öncesinde hazırlanmış olan MDA stok solüsyonu ile oluşturulan standart grafiğinden faydalanılarak ölçüm hesabı yapıldı. Örneklerin MDA miktarları, nmol/mg protein şeklinde ifade edildi. 2 kez tekrar yapılarak her bir doku faktörünün etkisi tespit edildi.

Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) miktar tayini

Reaktif Maddeler: YLA0163MO ELISA kiti içinde standart dilüsyon çözeltisi, kromojen solüsyon A, kromojen solüsyon B, streptavidin-HRP, standart solüsyon, stop solüsyon, biotin ile işaretlenmiş ACE antibodyleri

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu

1. Dokular kırmızı kan hücresi ve pıhtılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkama yapıldı
2. 75 mg doku üzerine 4.5 ml homojenat tamponu eklenerek homojenizasyonu sağlandı,
3. Homojenatlar, 12000 RPM ve 4 °C'de 15 dakika boyunca santrifüj edilip ve serumlar ACE seviyesinin tespiti için kullanıldı.

Çalışma prosedürü

1. Çalışmada 96 kuyucuklu plate kullanıldı,

2. Ölçüm tamponundan her bir kuyucuğa 120'şer µl eklendi,
3. Boş kuyucuğa kromojen A, kromojen B ve stop solüsyonu eklendi,
4. Standart solüsyon kuyucuğuna 50 µl standart solüsyon ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi,
5. Ölçüm yapılacak dokuların konulduğu kuyucuklara 40 µl örnek, 10 µl ACE antibodyleri ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi,
6. Kuyucukların olduğu platein üstü yapışkan membran ile örtüldü ve yavaşça karıştırıldı. Sonrasında 37 °C'de etüvde 60 dk inkübe edildi,
7. Yıkama çözeltisi 30 kez seyreltildi ve Mikroplate Yıkayıcı kullanılarak örnekler yıkandı,
8. Her kuyucuğa 50şer µl kromojen solüsyon A ve kromojen solüsyon B konuldu ve hafice karıştırıldıktan sonra 10 dakika boyunca 37 °C'deki etüvde inkübe edildi.
9. 50şer µl stop solüsyon ile her kuyucuktaki reaksiyon durduruldu, ve kuyucuk renklerinin maviden sarıya dönmesi sağlandı,
10. Stop solüsyonunun eklenmesinden 10 dk içinde, tüm kuyucukların 450 nm ışığı boş kuyucuğa göre absorbansları ölçülerek kaydedildi.

ACE miktarının hesaplanması: Oluşan sarı renk miktarları 450 nm'de 96'lık well platede okunup, seyreltme katsayıları dikkate alınarak daha önce hazırlanmış olan ACE stok solüsyonu ile oluşturulan standart grafikten faydalanılarak ölçüm hesabı yapıldı. Serum ACE seviyesi, ng/ml protein şeklinde ifade edildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar yapılarak tespit edildi.

Neprilisin miktar tayini

Reaktif Maddeler: YLA1760MO ELISA kiti içinde standart dilüsyon çözeltisi, kromojen solüsyon A, kromojen solüsyon B, streptavidin-HRP, standart solüsyon, stop solüsyon, biotin ile işaretlenmiş Anti NEP antibodyleri

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu

1. Dokular kırmızı kan hücresi ve pıhtılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkama yapıldı
2. 75 mg doku üzerine 4.5 ml homojenat tamponu eklenerek homojenizasyonu sağlandı,
3. Homojenatlar, 12000 RPM ve 4 °C'de 15 dakika boyunca santrifüj edilip ve serumlar Neprilisin seviyesinin tespiti için kullanıldı.

Çalışma prosedürü

1. Çalışmada 96 kuyucuklu plate kullanıldı,
2. Ölçüm tamponundan her bir kuyucuğa 120'şer µl eklendi,
3. Boş kuyucuğa kromojen A, kromojen B ve stop solüsyonu eklendi,
4. Standart solüsyon kuyucuğuna 50 µl standart solüsyon ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi,
5. Ölçüm yapılacak dokuların konulduğu kuyucuklara 40 µl örnek, 10 µl Neprilisin antibodyleri ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi,
6. Kuyucukların olduğu platein üstü yapışkan membran ile örtüldü ve yavaşça karıştırıldı. Sonrasında 37 °C'de etüvde 60 dk inkübe edildi,
7. Yıkama çözeltisi 30 kez seyreltildi ve Mikroplate Yıkayıcı kullanılarak örnekler yıkandı,

8. Her kuyucuğa 50şer µl kromojen solüsyon A ve kromojen solüsyon B konuldu ve hafıçe karıştırıldıktan sonra 10 dakika boyunca 37 °C'deki etüvde inkübe edildi.
9. 50şer µl stop solüsyon ile her kuyucuktaki reaksiyon durduruldu, ve kuyucuk renklerinin mavidan sarıya dönmesi sağlandı,
10. Stop solüsyonunun eklenmesinden 10 dk içinde, tüm kuyucukların 450 nm ışığı boş kuyucuğa göre absorbansları ölçülerek kaydedildi.

Neprilisin miktarının hesaplanması: Oluşan sarı renk miktarları 450 nm'de 96'lık well platede okunup, seyreltme katsayıları dikkate alınarak daha önce hazırlanmış olan Neprilisin stok solüsyonu ile oluşturulan standart grafikten faydalanılarak ölçüm hesabı yapıldı. Serum Neprilisin seviyesi, pg/ml protein şeklinde ifade edildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar yapılarak tespit edildi.

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Deney sonuçlarında ortaya çıkan analiz değerleri ortalama \pm standart sapma parametreleriyle gösterildi ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel bakımdan önemli olduğu kabul edildi. Deney grupları arasındaki nüansın önem seviyesi tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA testi üzerinde Post Hoc çoklu karşılaştırmalı testlerden Duncan tekniğine göre belirlendi. Farklı olan harfler herhangi bir grubun diğer gruptan istatistiksel açıdan farklı olduğunu ifade etmektedir. Eşit harfler ise bu nüansın önemsiz olduğunu belirtmektedir.

4. BULGULAR

Yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular histopatolojik ve biyokimyasal olarak iki kategoriye ayrılmıştır.

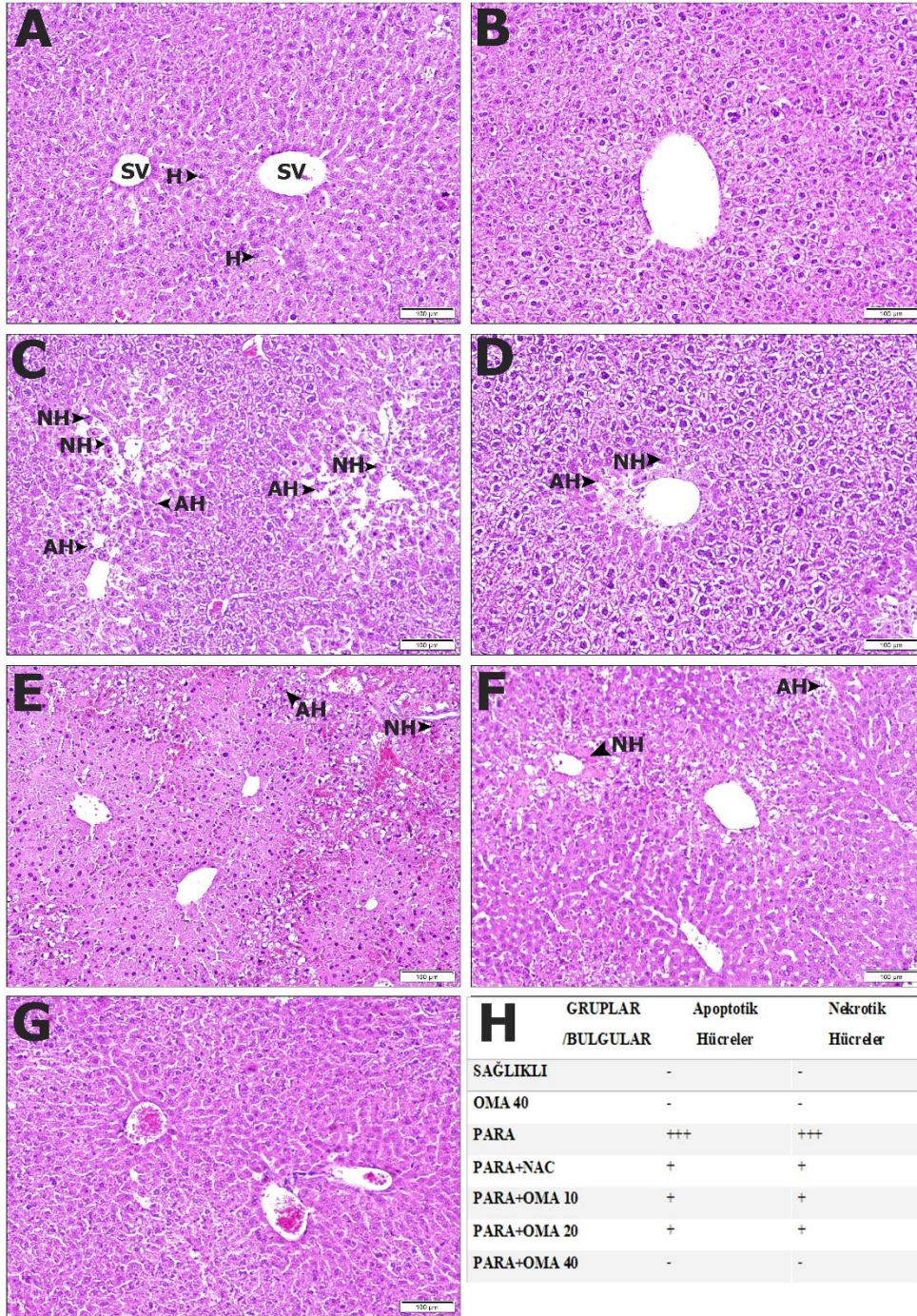
4.1. Histopatolojik Bulgular

Sağlıklı grupta yapılan incelemede karaciğer klasik lobüllerinin normal boyutta ve görünümde olduğu, histolojik olarak ise portal alanın ve sentral venlerin sağlıklı görünümde olduğu ve bunlar arasında seyreden hepatositler ve sinüzoidal aralıklarda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmadı. OMA 40 grubun incelenen histolojik kesitlerinin sağlıklı gruba benzer bir görünümde olduğu, portal alan, sentral ven, hepatosit kordonlarında ve sinüzoidal aralıklarda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmadı.

PARA grubunda yapılan incelemede klasik portal lobul alanlarında dağınık bir görünüm izlenmekteydi. Özellikle portal ven çevresinde yer alan hepatositlerde görülen piknotik çekirdekli apoptotik hücreler ve aşırı eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler dikkat çekmekteydi. PARA + NAC grupta yapılan inceleme de para grubuna göre anlamlı bir düzelme görülmekteydi. Ancak sentral vene komşu alanda yer yer nekrotik ve apoptotik hücreler görülmekteydi. Bunun yanında sentral venden portal alana doğru görülen hepatositlerde neredeyse hiç hasar izlenmedi.

PARA + OMA 10 grupta yapılan preparat sentral ven çevresinde hepatositlerde para grubunda izlenen figürlere rastlanmadı. Ancak nadir olarak nekrotik ve apoptotik hücreler görülmekteydi. PARA + OMA 20 grupta yapılan incelemede para grubuna kıyasla anlamlı derecede farklılık vardı. Sentral vene komşu hepatositlerde eozinofilik hücreler görülmekteydi. Bu alanın dışındaki hepatositlerde neredeyse sağlıklı grupta izlenen hepatositlere benzer hücreler izlenmekteydi. Bu gruptaki bulgular PARA+NAC grubunda görülen bulgulara benzerlik göstermesi dikkatten kaçmadı. PARA + OMA 40

grupta yapılan incelemede neredeyse hiç patolojik bulgulara rastlanmadı. Sağlıklı gruba en benzer grup bu gruptu.



Şekil 4.1. (A) Sağlıklı, (B) Sağlıklı + OMA 40 grubundaki, (C) PARA grubundaki, (D) PARA + NAC grubundaki, (E) PARA + OMA 10 grubundaki, (F) PARA + OMA 20 grubundaki, (G) PARA + OMA 40 grubundaki farelerden alınan karaciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü. (H) Skor tablosu

Bu histopatolojik bulguların karşılaştırmalı olarak daha iyi anlaşılır olacağından skorlama yapılmıştır. Hepatositlerde gözlenen nekrotik ve apoptotik hücrelerin varlığı ve doku içi eritrositlerin birikimi göz önüne alınarak yapılan histopatolojik skorlamaya göre; yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) hasar olacak şekilde aşağıdaki tabloda gösterildiği şekilde sembolize edilmiştir.

Tablo 4.1. Histopatolojik bulguların fare gruplarına göre karşılaştırmalı skorları

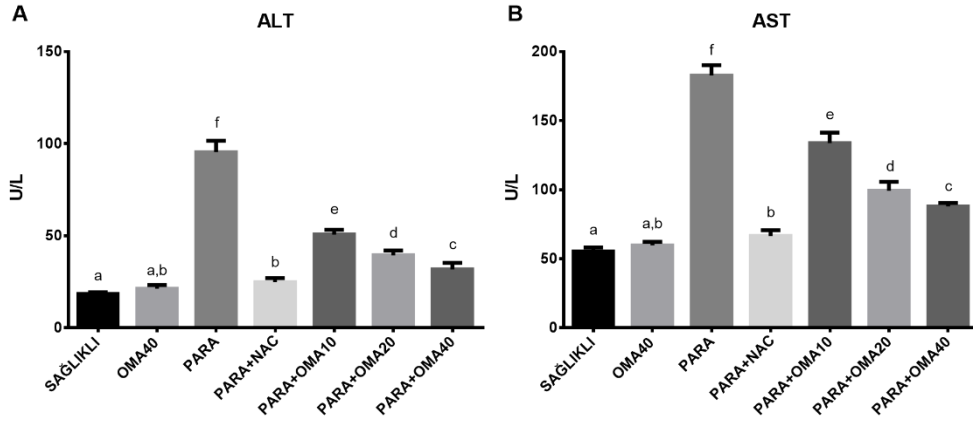
GRUPLAR	Apoptotik Hücreler	Nekrotik Hücreler
SAĞLIKLI	-	-
OMA 40	-	-
PARA	+++	+++
PARA+NAC	+	+
PARA+OMA 10	+	+
PARA+OMA 20	+	+
PARA+OMA 40	-	-

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. ALT ve AST Ölçümleri

Tablo 4.2. ALT ve AST ölçümleri sonuçları

GRUPLAR	ALT (U/L)	AST (U/L)
SAĞLIKLI	18.44 ± 0.88 ^a	55.25 ± 2.89 ^a
OMA 40	21.27 ± 1.92 ^{a,b}	59.67 ± 2.64 ^{a,b}
PARA	95.37 ± 6.20 ^f	182.65 ± 7.47 ^f
PARA+NAC	24.75 ± 2.32 ^b	66.50 ± 4.27 ^b
PARA+OMA 10	50.66 ± 2.63 ^e	133.66 ± 7.70 ^e
PARA+OMA 20	39.40 ± 2.64 ^d	99.33 ± 6.43 ^d
PARA+OMA 40	31.73 ± 3.50 ^c	87.89 ± 2.51 ^c



Şekil 4.2. ALT ve AST ölçümleri grafiksel sonuçları

ALT ve AST miktarları aynı şekilde sağlıklı, sağlıklı + omapatrilat 40mg/kg (OMA40), parasetamol 400mg/kg (PARA), parasetamol 400mg/kg + NAC 140mg/kg, parasetamol 400mg/kg + omapatrilat 10mg/kg (PARA+OMA10), parasetamol 400mg/kg + omapatrilat 20mg/kg (PARA+OMA20), ve parasetamol 400mg/kg + omapatrilat 40mg/kg (PARA+OMA40) olmak üzere yine 7 grupta incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, karaciğer hasarına bağlı PARA grubunda ALT ve AST miktarlarında sağlıklı kontrol grubuna ve OMA40 grubuna göre çok belirgin yükselme gözlenmiştir. Spesifik tedavi kabul edilen PARA+NAC grubunda ise ALT ve AST seviyelerinin neredeyse sağlıklı gruplara geri çekildiği görülmüştür. Omapatrilat dozunu test ettiğimiz PARA+OMA10, PARA+OMA20 ve PARA+OMA40 gruplarında ise giderek artan omapatrilat dozu ile ALT ve AST miktarlarının da aynı şekilde sağlıklı gruplara yaklaştığı gözlenmiştir.

4.2.2. SOD, GSH ve MDA Ölçümleri

Tablo 4.3. SOD, GSH ve MDA ölçümleri sonuçları

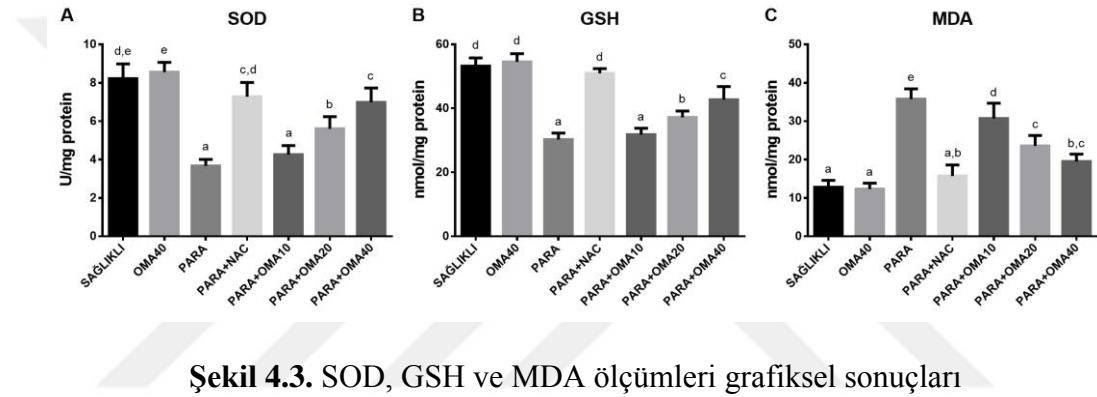
GRUPLAR	SOD (U/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
SAĞLIKLI	8.21 ± 0.77 ^{d,c}	53.21 ± 2.56 ^d	12.80 ± 1.77 ^a
OMA 40	8.55 ± 0.51 ^e	54.52 ± 2.58 ^d	12.34 ± 1.52 ^a
PARA	3.67 ± 0.34 ^a	30.26 ± 2.01 ^a	35.74 ± 2.68 ^e
PARA+NAC	7.28 ± 0.74 ^{c,d}	50.97 ± 1.47 ^d	15.71 ± 2.89 ^{a,b}
PARA+OMA 10	4.25 ± 0.47 ^a	31.78 ± 1.99 ^a	30.67 ± 3.98 ^d
PARA+OMA 20	5.61 ± 0.63 ^b	37.17 ± 1.97 ^b	23.53 ± 2.74 ^c
PARA+OMA 40	6.97 ± 0.75 ^c	42.70 ± 4.12 ^c	19.51 ± 1.90 ^{b,c}

SOD aktivitesi ile GSH ve MDA seviyeleri, sağlıklı, sağlıklı + omapatrilat 40mg/kg (OMA40), parasetamol 400mg/kg (PARA), parasetamol 400mg/kg + NAC 140mg/kg, parasetamol 400mg/kg + omapatrilat 10mg/kg (PARA+OMA10), parasetamol 400mg/kg + omapatrilat 20mg/kg (PARA+OMA20), ve parasetamol 400mg/kg + omapatrilat 40mg/kg (PARA+OMA40) olmak üzere toplam 7 grupta incelenmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre, SOD aktivitesi sağlıklı ve OMA40 gruplarına en yakın olarak PARA+OMA40 grubunda gözlenmiştir. Omapatrilat uygulaması yapılmayan veya daha az yapılan gruplarda SOD aktivitesinin bu sağlıklı değerin altında kaldığı görülmüştür. PARA+NAC grubunda ise sağlıklı grupta ölçülen değere, omapatrilat uygulanan gruplara nazaran bir miktar daha fazla yaklaşan SOD aktivitesi ölçülmüştür.

Benzer şekilde GSH seviyesinde de uygulanan omapatrilat miktarı arttıkça GSH seviyesini de yükselmiştir. PARA grubundan PARA+OMA40 grubuna kadar GSH seviyesini yükselerek sağlıklı değere yaklaştığı sonucu bulunmuştur. Kabul edilen tedavinin test edildiği PARA+NAC grubunda ise sağlıklı değerle istatistik olarak aynı

kabul edilebilecek GSH seviyesi gözlenmiştir. Farelere 40mg/kg OMA dozu verildiğinde ölçülen GSH seviyesinin kabul edilmiş tedavi yöntemi olan NAC verilen farelerdeki GSH seviyesine yaklaştığı görülmüştür.

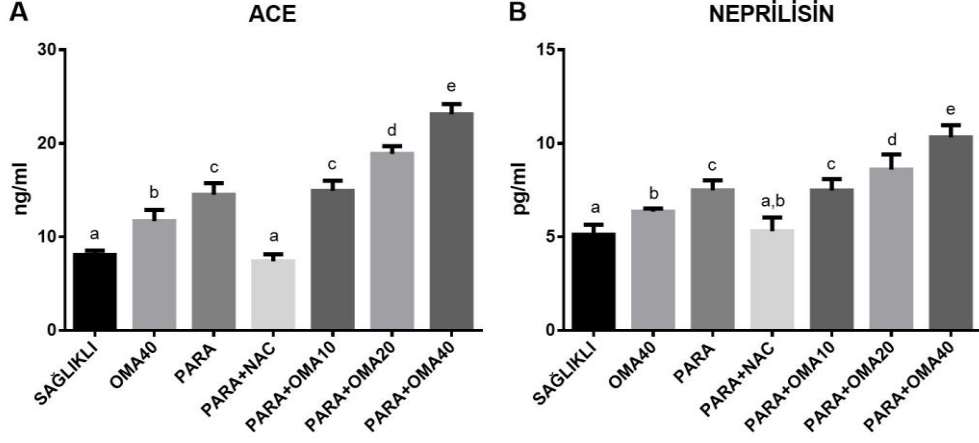
Aynı gruplarda yapılan ölçümlerde ise MDA seviyesinin parasetamol verilen farelerde sağlıklı gruba göre yükseldiği gözlenmiştir. OMA uygulanan gruplarda ise 10mg/kg'dan 40mg/kg'a kadar artan OMA miktarı ile beraber MDA seviyesinin düşerek sağlıklı gruba yaklaştığı ölçülmüştür. Aynı şekilde, kabul edilen tedavi yöntemi olan NAC uygulaması ile sağlıklı MDA seviyesine neredeyse ulaşılmıştır.



4.2.3. ACE ve Neprilisin Ölçümleri

Tablo 4.4. ACE ve Neprilisin ölçümleri sonuçları

GRUPLAR	ACE (ng/ml)	Neprilisin (pg/ml)
SAĞLIKLI	8.08 ± 0.46 ^a	5.11 ± 0.53 ^a
OMA 40	11.67 ± 1.20 ^b	6.35 ± 0.17 ^b
PARA	14.53 ± 1.24 ^c	7.49 ± 0.53 ^c
PARA+NAC	7.40 ± 0.75 ^a	5.31 ± 0.73 ^{a,b}
PARA+OMA 10	14.94 ± 1.09 ^c	7.48 ± 0.61 ^c
PARA+OMA 20	18.89 ± 0.82 ^d	8.61 ± 0.81 ^d
PARA+OMA 40	23.11 ± 1.09 ^e	10.32 ± 0.65 ^e



Şekil 4.4. ACE ve Nephilisin ölçümleri grafiksel sonuçları

ACE ve Nephilisin seviyeleri de sağlıklı, sağlıklı + omapatrilat 40mg/kg (OMA40), parasetamol 400mg/kg (PARA), parasetamol 400mg/kg + NAC 140mg/kg, parasetamol 400mg/kg + omapatrilat 10mg/kg (PARA+OMA10), parasetamol 400mg/kg + omapatrilat 20mg/kg (PARA+OMA20), ve parasetamol 400mg/kg + omapatrilat 40mg/kg (PARA+OMA40) olmak üzere yine 7 grupta incelenmiştir. Sağlıklı gruba göre, OMA uygulanan tedavi gruplarında OMA dozu giderek artan miktarda verildiğinde, ACE ve Nephilisin seviyelerinde de artış gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, farelerde parasetamol kaynaklı karaciğer hasarına karşı Renin anjiyotensin aldosteron yolağı üzerinden etkisini gösteren, hem ACE (Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim) hem de NEP (Nötral Endopeptidaz) inhibitörü olan omapatrilatın etkileri araştırıldı.

Asetaminofen olarak da bilinen parasetamol dünya genelinde en çok kullanılan analjezik ve antipiretik ilaçtır. Parasetamol uygun fiyatlı ve kolay ulaşılabilen OTC(over the counter) olarak sınıflandırılan reçetesiz satılabilen ilaç grubundadır. Terapötik dozda kullanıldığında oldukça iyi bir güvenlik profiline sahiptir.

Yaygın kullanımı ve kolay ulaşılması sebebiyle parasetamol intoksikasyonu sık bildirilen intoksikasyonlardan biridir. Çocuk acil servisine başvuran zehirlenme vakalarıyla ilgili yapılan bir çalışmada ise, ilaç zehirlenmelerinin %31,7 sinin analjezik ve antipiretik ilaç grubundan parasetamol kaynaklı olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin ise çocuklarda ateş düşürücü ilaç olarak ilk sırada parasetamolün sık reçetelenmesi, reçetesiz alınabilmesi ve ucuz olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.⁸⁴

Parasetamole bağlı karaciğer hücre hasarının mekanizması halen tam olarak anlaşılamamıştır. Büyük ölçüde kabul edilen görüşe göre, terapötik dozda verilen parasetamolün büyük bir kısmı (%90) karaciğerde glukronit ve sülfat konjugasyonlarına dönüştürülür, kalan (%8) kısım ise hepatik sitokrom p450 enzimleri tarafından (özellikle CYP2E1) N-asetil p-benzokinonimin (NAPQI)'e metabolize edilir. Zehirlenme durumunda ise aşırı parasetamol alımına bağlı metabolizma glutatyon depolarının tükenmesine ve metabolizmanın sitokrom enzimler tarafına kaymasına ve böylece NAPQI birikmesi sonucu karaciğer hasarına neden olur.²⁷

Canlı dokularda sürekli kontrollü bir şekilde serbest oksijen radikaller (SOR) ve antioksidanlar üretilir. Serbest radikal üretiminin artışı ve antioksidan savunmanın

azalması ile birlikte oksidan/antioksidan dengenin oksidan lehine kayması sonucu oksidatif stres oluşur. Detoksifiye olamayan oksidanlar membran lipidlerinin ve hücrenin çeşitli fonksiyonel ve yapısal proteinlerinin bozulmasına neden olmaktadır.

Oksidatif stres, genelde oksidatif DNA hasar göstergesi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG); lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA; protein oksidasyonu; SOD, GPx, CAT, glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler; alfa-tokoferol, askorbik asit, glutatyon, sistein gibi antioksidanların ölçümü ile belirlenir.⁸⁵

Glutatyon; glisin, sistein ve glutamat amino asitlerinden sentezlenebilen bir tripeptittir. Glutatyon (GSH) çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Albumin, sistein, metionin ve redükte glutatyon gibi protein ve serbest aminoasitlerin yapısında da bulunan tiyol grupları esas olarak, intraselüler antioksidanların düzenlenmesinde rol alırlar. Tiyol içeren antioksidan etkili bileşiklerin antioksidatif aktivitesinde hem moleküldeki tiyol sayısı (ditiyoller monotiyollerden daha etkindir) hem de moleküldeki sülfür atomlarının oksidasyon durumu (daha fazla redükte formlar daha güçlü antioksidanlardır) etkili olmaktadır.⁸⁶

Bu bilgiler ışığında bizim çalışmamızda kullandığımız Omapatrilat isimli etken maddenin kimyasal yapısında tiyol grubu bulunması, karaciğer hasarına neden olduğu düşünülen toksik metabolitin (NAPQI) zararsız hale gelmesini sağlamıştır. Buna bağlı antioksidan mekanizmadaki artışla oksidan/antioksidan dengenin oksidan lehine artışının engellenmiş olduğunu düşünmekteyiz.

Glutatyon tükenmesine bağlı toksisite tedavisinde antidot olarak GSH prekürsörü N-asetil sistein (NAC) kullanılmaktadır. Hem antioksidan seviyesini artırarak hem de

oksidatif strese bağlı oluşan karaciğer hasarını önleyen renin anjiyotesin aldosteron sistemi ilaçları daha önce yapılan çalışmalarda başarılı bulunmuştur.^{10, 76}

ALT ve AST enzimleri hepatositlerde sentezlenen ve hepatoselüler hasarın değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerdir. Önceden yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi toksik dozlarda parasetamol alımları, oksidatif strese ve karaciğer hasarına neden olur.⁸⁷ Tavşanlarda parasetamol zehirlenmesinin antioksidan sisteme etkisinin araştırıldığı Cigremis tarafından yapılan çalışmada ALT ve AST seviyelerinin toksik grupta, kontrol grubuna göre belirgin şekilde artış olduğu saptanmıştır.⁸⁸

Betto tarafından yapılan çalışmada ise ACE inhibitörü olan enalaprilin parasetamol kaynaklı karaciğer hasarına etkisi araştırılmıştır. Bulgulara göre ALT ve AST aktiviteleri enalapril ile tedavi edilen farelerde azalmıştır.⁸⁹ Bizim alışmamızda da bir diğer ACE inhibitörü olan omapatrilatın ALT ve AST üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

ALT aktivitesi ölçümlerinden görüldüğü üzere parasetamol grubundaki farelerde sağlıklı gruba göre çok daha yüksek ALT seviyesi kaydedilmiştir. Sağlıklı örneklerde 18.44 U/L seviyesinde görülen ALT aktivitesi, parasetamol zehirlenmesine maruz bırakılan farelerde 95.37 U/L'ye kadar yükselmiştir. Spesifik tedavi yöntemi olan NAC uygulamasıyla bu seviyenin tekrar 24.75 U/L'ye kadar gerilediği, fakat bu seviyenin yine de sağlıklı farelere göre istatistik olarak yüksek kaldığı kaydedilmiştir. Omapatrilat tedavisinin de diğer ölçümlerdeki gibi doza bağlı olarak enzim aktivitelerini sağlıklı düzeye yaklaştırdığı ölçülmüştür. 10 mg/kg dozunda ALT aktivitesi 50.66 U/L'ye inerken, 20 mg/kg dozunda 39.40 U/L'ye, 40 mg/kg dozunda ise 31.71 U/L'ye kadar gerilemiştir. Fakat test edilen en yüksek doz olan 40 mg/kg dozunda hala sağlıklı örneklerdeki ALT aktivitesi seviyesine erişilememiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak

omapatrilat dozunun 80 mg/kg'a yaklaşması ile ALT aktivitesinin sağlıklı seviyeye tekrar ulaşacağı öngörülmektedir.

ALT sonuçlarına benzer şekilde AST aktivitesinde de parasetamol grubunda ölçülen 182.65 U/L değerinin sağlıklı değer olan 55.25 U/L'nin çok üstünde olduğu görülmüştür. Aynı şekilde 10, 20 ve 40 mg/kg olmak üzere giden artan omapatrilat dozları sayesinde AST aktivitesi sırasıyla 133.66, 99.33 ve 87.89 U/L seviyelerine kadar geri çekilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak yine aynı şekilde 80 mg/kg'a yükseltilecek omapatrilat dozu sayesinde AST aktivitesinin sağlıklı seviyelere çekileceği tahmin edilmektedir.

Toklu, β -glucan'ın farelerde parasetamol kaynaklı karaciğer hasarını önleyici etkisi üzerine yaptıkları çalışmada GSH ve SOD seviyesinin parasetamol verilmesi ile azaldığını görmüş, β -glucan sayesinde bu seviyenin sağlıklı değere geri yaklaştığını ölçmüştür.⁹⁰ Yapılan başka bir çalışmada ise renin-anjiyotensin-aldosteron yolağını etkileyen renin inhibitörü aliskiren kullanıldığında SOD ve GSH değerleri parasetamol verilen grupta önemli ölçüde düşerken, yine parasetamol uygulanan gruplarda MDA seviyesi yükselmiştir. Aynı çalışmada aliskiren tedavi gruplarında ise GSH seviyesi ve SOD aktivitesinin arttığı ve MDA seviyesinin azaldığı görülmüştür.⁹¹ Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz verilere göre Omapatrilat hem endojen antioksidan olan glutatyon (GSH) düzeyinin artırır, hem de oksidatif strese bağlı karaciğer hasarını önleyebilir. Beklediğimiz üzere spesifik tedavi olan NAC grubunda GSH seviyesi sağlıklı gruba çok yakın, istatistik açıdan aynı kabul edilebilecek değerde ölçülmüştür. Dozu 10 mg/kg'dan 40 mg/kg'a kadar artan Omapatrilat gruplarında ise artan doz ile beraber GSH seviyesinin sağlıklı değere yaklaştığı görülmüştür. 40 mg/kg Omapatrilat dozunda ölçülen 42.70 nmol/mg protein GSH değeri, her ne kadar sağlıklı grupta ölçülen 53.21 nmol/mg protein GSH değerinden istatistik açıdan farklı ölçülmüşse de, büyük

ölçüde ve sistematik olarak sağlıklı değere yaklaşmıştır. Nitekim sağlıklı ve PARA gruplarının GSH seviyeleri değerleri arasında 22.95 nmol/mg protein kadar fark ölçülmüşken, PARA+OMA 40 grubunda bu fark yaklaşık % 50 kadar azaltılarak 10.51 nmol/mg protein seviyesine kadar düşürülmüştür. Bu sonuçlardan yola çıkarak Omapatrilat dozunun 80 mg/kg seviyelerine kadar artırılması sonucunda GSH seviyesini sağlıklı farelerdeki GSH seviyesine geleceği öngörülmektedir.

Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalının ($O_2 \cdot^-$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Süperoksit dismutaz'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının ($O_2 \cdot^-$) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. ⁹² SOD aktivitesi için yapılan ölçümlerden de benzer sonuçlar çıkarılabilir. Sağlıklı grupta 8.21 U/mg protein seviyesinde ölçülen SOD aktivitesinin parasetamol verilen grupta 3.67 U/mg seviyesine kadar düştüğü görülmüştür. Spesifik tedavi kabul edilen NAC sayesinde ise bu seviye 7.28 U/mg mertebesine kadar geri çıkabilmiş, fakat istatistik açıdan sağlıklı farelerdeki SOD aktivitesinin gerisinde kalmıştır. Öte yandan, omapatrilat tedavisinde 10, 20 ve 40 mg/kg olarak verilen dozlarda ölçülen SOD aktiviteleri sırasıyla 4.25, 5.61 ve 6.97 U/mg protein olarak ölçülmüştür. Yani 40 mg/kg protein dozunda, NAC tedavisi sonucunda ölçülen değer ile istatistik açıdan neredeyse aynı kabul edilebilecek SOD aktivitesi görülmüştür. Dolayısıyla, GSH seviyesinde olduğu gibi, sağlıklı SOD aktivitesi seviyelerine ulaşılabilmesi için de 80 mg/kg dozunda omapatrilat tedavisinin başarılı olması beklenebilir.

Bir diğer oksidatif hasar biyobelirteçlerinden olan Malondialdehit (MDA) kanda ve idrarda ortaya çıkar, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Bu nedenle biyolojik materyalde Malondialdehit (MDA) miktarı, lipid peroksidasyonun göstergesi olarak belirtilmektedir. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur.

Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur.⁹²

MDA seviyesindeki değişikliklerin ise SOD ve GSH 'daki değişikliklere zıt olduğu görülmüştür. Bilindiği üzere MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve biyolojik membranlardaki lipid peroksidasyon, membran akışkanlığı ile membran potansiyelinin azalmasına, organel veya hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açar.⁹³ Oksidatif strese maruz kalan dokularda MDA düzeyinde artış görülür. Buna bağlı olarak sağlıklı grupta MDA miktarı düşük iken hasta grupta artış beklenir.

Aynı şekilde, MDA ölçümlerinde elde edilen sonuçlar da omapatrilat etkisini kanıtlayacak niteliktedir. Parasetamol nedeniyle değeri sağlıklı grupta ölçülen 12.80 nmol/mg'ın yaklaşık 3 katına çıkan MDA miktarı, farklı omapatrilat dozlarında yine sağlıklı değere yaklaşmıştır. Omapatrilat dozunun yükselmesi ile, 40 mg/kg dozunda MDA seviyesi 19.51 nmol/kg'a kadar düşmüştür. Sağlıklı seviyenin istatistiksel olarak üzerinde olan bu değer yine Omapatrilat'ın 80 mg/kg'a yaklaşan dozları uygulandığında sağlıklı seviye değerine kadar düşürüleceği tahmin edilmektedir.

Neprilisin bir nötral endopeptidazdır ve natriüretik peptidlerin, bradikinin, adrenomedüllin, glukagon ve vazoaaktif intestinal peptid gibi endojen vasoaktif peptidlerin yıkımına aracılık ederek düzeylerini azaltır. Neprilisin çeşitli dokularda bulunmakla birlikte en çok böbrekte bulunur. Omapatrilat dual neprilisin ve renin-anjiyotensin sistemi inhibisyonunun ilk temsilcisidir.⁹⁴ Bu bilgiler ışığında, biz de çalışmamızda ACE ve Neprilisin değerlerini ölçerek renin-anjiyotensin-aldosteron yolunun parasetamol toksisitesinde etkisi hakkında bilgi edindik. Elde ettiğimiz ACE seviyesi sonuçlarına baktığımızda parasetamolün ACE seviyesini sağlıklı farelerde ölçülen 8.08 ng/ml'den yaklaşık 14.53 ng/ml seviyesine çıkardığı, spesifik tedavi olan NAC'ın ise bunu tekrar sağlıklı seviyeye geri çektiği görülmüştür. Buna rağmen test

ettiğimiz omapatrilat dozlarında ACE seviyesinin doz ile doğru orantılı olarak arttığı görülmüş, 10, 20 ve 40 mg/kg omapatrilat dozlarında sırasıyla 14.94, 18.89 ve 23.11 ng/ml ACE seviyeleri ölçülmüştür. 10 mg/kg omapatrilat tedavisinde ACE seviyesinin parasetamol gruba göre değişmediği saptanmıştır; dolayısıyla 10 mg/kg dozunun etkisinin ACE seviyesinde görülmeyecek kadar az olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde Neprilisin seviyesi de sağlıklı gruptaki 5.11 pg/ml'den, parasetamol verildiğinde 7.49 pg/ml seviyesine, 10, 20 ve 40 mg/kg dozlarında omapatrilat verildiğinde ise giderek artarak sırasıyla 7.48, 8.61 ve 10.32 ng/ml seviyelerine ulaşmıştır. Bu sonuçlara göre, tahmin edilenin aksine artan dozlarda bilinen bir ACE inhibitörü olan omapatrilat tedavisinin ACE ve Neprilisin seviyelerini artırdığı gözlenmiştir.

Parasetamol uygulaması ile ACE ve Neprilisin seviyesinde meydana gelen artışın hasara eşlik eden bir savunma mekanizması olabileceğini ve NAC ile tedavi sağlandıkça azaldığını öne sürebiliriz. Omapatrilat ile dokulardaki patolojik ve biyokimyasal bulgularda düzelme gözlemlenmiş olmamıza rağmen bu iki enzimin artması, son ürünle çalışan negatif feedback mekanizmasının çalışmadığını göstermektedir. Bu bulgular ACE ve Neprilisin enzimlerinin parasetamol toksisitesindeki rolünü ve omapatrilatın koruyucu etkilerini ortaya koymuştur.

Çalışmada alınan doku örnekleri üzerinde yapılan histopatolojik bulgular da bu enzimatik bulguları destekler nitelikteydi. Nitekim spesifik tedavi olan NAC grubunun doku örneklerinin sağlıklı gruptan alınan doku örnekleri gibi genel olarak hasarsız olduğu görülmüştür. PARA grubunda yapılan incelemede ise beklenildiği üzere apoptotik ve nekrotik hücreler görülmüştür. Omapatrilat tedavisi uygulanan gruplarda ise giderek artan doz ile beraber histopatolojik bulguları sağlıklıya doğru giden doku örnekleri elde

edilmiştir. Test ettiğimiz en yüksek doz olan 40 mg/kg dozunda neredeyse hiçbir patolojik bulguya rastlanmamış, sağlıklı gruba en yakın doku örnekleri bu gruptan elde edilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada farelerde parasetamol kaynaklı akut hepatotoksistide vazopeptidaz/anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü olan omapatrilatın hepatoprotektif etkisini deneysel olarak inceledik.

Çalışmamızda hasarlı karaciğer dokusunda ACE ve neprilisin enzimlerinin eşzamanlı olarak arttığını-yani parasetamol toksisitesinin fizyopatolojisine bu iki enzimdeki değişikliklerin de katkıda bulunabileceğini gösterdik. Elde ettiğimiz sonuçlar ışığında bu iki enzimi eşzamanlı olarak inhibe eden omapatrilatın karaciğer toksisitesine karşı koruyuculuğunu doza bağımlı bir şekilde artarak gösterdiğini ortaya koyduk. 40 mg/kg dozunda uygulandığında omapatrilat grubunun gerek histopatolojik, gerek de GSH, SOD, MDA, ALT ve AST seviyeleri dahil olmak üzere biyokimyasal tetkiklerle elde edilen bulgularının sağlıklı grup ile çok benzer olduğunu gördük. Ayrıca omapatrilat, oksidatif stres sonucu gerçekleşen doku hasarının göstergesi olan MDA seviyesini azaltarak ve SOD ile GSH antioksidanlarının miktarını artırarak oksidan/antioksidan dengesini antioksidan lehine sağlamıştır.

Bu sonuçlara bakıldığında parasetamol toksisitesinde kabul edilmiş tedavi olan NAC uygulamasına alternatif olarak renin-anjiyotensin-aldosteron ve nötral endopeptidaz yolaklarını birlikte etkileyen omapatrilatın başarılı olabileceği kanıtlanmıştır. Bu çalışma parasetamol toksisitesinde ACE-Nötral endopeptidaz enzimlerinin rolünü aydınlatmak açısından sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Lewis RK, Paloucek FP. Assessment and treatment of acetaminophen. *Clinical pharmacy*, 1991, 10: 765-774.
2. Makin AJ, Wendon J, Williams R. A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity (1987–1993). *Gastroenterology*, 1995, 109: 1907-1916.
3. Prescott L. Paracetamol overdose. *drugs*, 1983, 25: 290-314.
4. Göktaş HG, Bacanlı M, Başaran N. Drug Induced Liver Injury And Biomarkers Used For Its Determination. *The Turkish Journal Of Occupational/Environmental Medicine and Safety*, 1.
5. Corcoran GB, Mitchell JR, Vaishnav YN, Horning EC. Evidence that acetaminophen and N-hydroxyacetaminophen form a common arylating intermediate, N-acetyl-p-benzoquinoneimine. *Mol Pharmacol*, 1980, 18: 536-542.
6. Bessems JG, Vermeulen NP. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Critical reviews in toxicology*, 2001, 31: 55-138.
7. Hung OL, Nelson LS. Acetaminophen. *Emergency medicine. A comprehensive study guide*. New-York: McGraw-Hill, 2004: 1088-1094.
8. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine—a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current opinion in pharmacology*, 2007, 7: 355-359.
9. Kanter MZ. Comparison of oral and iv acetylcysteine in the treatment of acetaminophen poisoning. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 2006, 63: 1821-1827.
10. Hitomia H. Anjiyotensin II ve oksidatif stres. *Current Opinion in Cardiology*, 2007, 2: 150-156.

11. Packer M, Califf RM, Konstam MA, Krum H, McMurray JJ, Rouleau J-L, Swedberg K. Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE). *Circulation*, 2002, 106: 920-926.
12. Sakuraya K, Endo A, Someya T, Hirano D, Murano Y, Fujinaga S, Ohtomo Y, Shimizu T. The synergistic effect of mizoribine and a direct renin inhibitor, aliskiren, on unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis in rats. *J Urol*, 2013.
13. Moore ED, Kooshki M, Metheny-Barlow LJ, Gallagher PE, Robbins ME. Angiotensin-(1-7) prevents radiation-induced inflammation in rat primary astrocytes through regulation of MAP kinase signaling. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 1060-1068.
14. Aroor AR, Demarco VG, Jia G, Sun Z, Nistala R, Meininger GA, Sowers JR. The Role of Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone System in the Development of Endothelial Dysfunction and Arterial Stiffness. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4: 161.
15. Zhu D, Tong Q, Liu W, Tian M, Xie W, Ji L, Shi J. Angiotensin (1-7) protects against stress-induced gastric lesions in rats. *Biochem Pharmacol*, 2013.
16. Oğuz A. Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi inhibisyonu ve kardiyovasküler koruma. *N Engl J Med*, 2000, 342: 145-153.
17. Lawson G, Ogwu J, Tanna S. Quantitative screening of the pharmaceutical ingredient for the rapid identification of substandard and falsified medicines using reflectance infrared spectroscopy. *PloS one*, 2018, 13: e0202059.
18. Clissold SP. Paracetamol and phenacetin. *drugs*, 1986, 32: 46-59.
19. Lim R, Guzman F, Rodgers D, Goto K, Braun C, Dickerson G, Engle R. Site of action of narcotic and non-narcotic analgesics determined by blocking bradykinin-evoked

- visceral pain. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 1964, 152: 25.
20. Milton A, Wendlandt S. A possible role for prostaglandin E1 as a modulator for temperature regulation in the central nervous system of the cat. *The Journal of physiology*, 1970, 207: 76P-77P.
21. Feldberg W, Gupta K, Milton A, Wendlandt S. Effect of pyrogen and antipyretics on prostaglandin activity in cisternal CSF of unanaesthetized cats. *The Journal of physiology*, 1973, 234: 279-303.
22. Swierkosz TA, Jordan L, McBride M, McGough K, Devlin J, Botting RM. Actions of paracetamol on cyclooxygenases in tissue and cell homogenates of mouse and rabbit. *Medical Science Monitor*, 2002, 8: BR496-BR503.
23. Botting RM. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clinical Infectious Diseases*, 2000, 31: S202-S210.
24. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *The FASEB journal*, 2004, 18: 790-804.
25. Davies NM, Good RL, Roupe KA, Yáñez JA. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error? Not as easy as 1, 2, 3. *J Pharm Pharm Sci*, 2004, 7: 217-226.
26. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS drug reviews*, 2006, 12: 250-275.
27. Kayaalp SO. *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*. Baskı. Hacettepe Taş Kitapçılık Limited Şti., 2005.
28. Aaron C, Howland M. Insecticides: organophosphates and carbamates. *Goldfrank LR*, 1998.

29. O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology*, 1989, 97: 439-445.
30. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schioødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Annals of internal medicine*, 2002, 137: 947-954.
31. Trey C. The management of fulminant hepatic failure. *Progress in liver diseases*, 1970: 282-298.
32. Gimson AE, O'Grady J, Ede RJ, Portmann B, Williams R. Late onset hepatic failure: clinical, serological and histological features. *Hepatology*, 1986, 6: 288-294.
33. Williams R, Schalm S, O'Grady J. Acute liver failure: redefining the syndromes. *The Lancet*, 1993, 342: 273-275.
34. Steinberg JL, Yeo W, Zhong S, Chan JY, Tam JS, Chan PK, Leung NW, Johnson PJ. Hepatitis B virus reactivation in patients undergoing cytotoxic chemotherapy for solid tumours: precore/core mutations may play an important role. *Journal of medical virology*, 2000, 60: 249-255.
35. Mutimer D, Ayres R, Neuberger J, Davies M, Holguin J, Buckels J, Mayer A, McMaster P, Elias E. Serious paracetamol poisoning and the results of liver transplantation. *Gut*, 1994, 35: 809-814.
36. Schioødt FV, Atillasoy E, Shakil AO, Schiff ER, Caldwell C, Kowdley KV, Stripling R, Crippin JS, Flamm S, Somberg KA. Etiology and outcome for 295 patients with acute liver failure in the United States. *Liver Transplantation and Surgery*, 1999, 5: 29-34.
37. Denizbaşı A. N- asetil sistein kullanımı yalnız parasetamol zehirlenmeleri ile sınırlı değildir. *Toksikoloji Çalışma Grubu*, 2019.

38. Heard KJ. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. *New England Journal of Medicine*, 2008, 359: 285-292.
39. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, Reisch JS, Schiødt FV, Ostapowicz G, Shakil AO. Acetaminophen- induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*, 2005, 42: 1364-1372.
40. Yang R, Miki K, He X, Killeen ME, Fink MP. Prolonged treatment with N-acetylcysteine delays liver recovery from acetaminophen hepatotoxicity. *Critical care*, 2009, 13: R55.
41. Söğüt Ö. N-Asetilsistein'nin Akut Karaciğer Yetmezliğinde ve Antibiyoterapiye Destek Amacıyla Kullanımı. *Atuder Kapadokya Toksikoloji Sempozyumu*, 2017.
42. Prescott L, Swainson C, Forrest A, Newton R, Wright N, Matthew H. Successful treatment of severe paracetamol overdose with cysteamine. *The Lancet*, 1974, 303: 588-592.
43. Prescott L, Ballantyne A, Proudfoot A, Park J, Adriaenssens P. Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *The Lancet*, 1977, 310: 432-434.
44. Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, Rumack BH. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. *New England Journal of Medicine*, 1988, 319: 1557-1562.
45. Burkhart KK, Janco N, Kulig KW, Rumack BH. Cimetidine as adjunctive treatment for acetaminophen overdose. *Human & experimental toxicology*, 1995, 14: 299-304.
46. Slattery JT, McRorie TI, Reynolds R, Kalhorn TF, Kharasch ED, Eddy AC. Lack of effect of cimetidine on acetaminophen disposition in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1989, 46: 591-597.

47. McBride PV, Rumack BH. Acetaminophen intoxication. *Seminars in Dialysis*, 1992, 5: 292-298.
48. Matthew H. Acute acetaminophen poisoning. *Clinical toxicology*, 1973, 6: 9-11.
49. Farmer DG, Anselmo DM, Ghobrial RM, Yersiz H, McDiarmid SV, Cao C, Weaver M, Figueroa J, Khan K, Vargas J. Liver transplantation for fulminant hepatic failure: experience with more than 200 patients over a 17-year period. *Annals of surgery*, 2003, 237: 666.
50. Barshes NR, Gay AN, Williams B, Patel AJ, Awad SS. Support for the acutely failing liver: a comprehensive review of historic and contemporary strategies. *Journal of the American College of Surgeons*, 2005, 201: 458-476.
51. Dargan PI, Jones AL. Acetaminophen poisoning: an update for the intensivist. *Critical care*, 2002, 6: 108.
52. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clinics in liver disease*, 2007, 11: 525-548.
53. Harrison P, O'grady J, Keays R, Alexander G, Williams R. Serial prothrombin time as prognostic indicator in paracetamol induced fulminant hepatic failure. *Bmj*, 1990, 301: 964-966.
54. Bernal W, Wendon J, Rela M, Heaton N, Williams R. Use and outcome of liver transplantation in acetaminophen- induced acute liver failure. *Hepatology*, 1998, 27: 1050-1055.
55. Gupta SK, Saxena A, Singh U, Arya DS. Bosentan, the mixed ET A–ET B endothelin receptor antagonist, attenuated oxidative stress after experimental myocardial ischemia and reperfusion. *Molecular and cellular biochemistry*, 2005, 275: 67-74.
56. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*, 2006, 43: S31-S44.

57. Sun WY, Wei W, Gui SY, Wu L, Wang H. Protective effect of extract from *Paeonia lactiflora* and *Astragalus membranaceus* against liver injury induced by bacillus Calmette- Guérin and lipopolysaccharide in mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 2008, 103: 143-149.
58. Laskin DL, Gardner CR, Price VF, Jollow DJ. Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. *Hepatology*, 1995, 21: 1045-1050.
59. Satoh M, Yamazaki M. Tumor necrosis factor stimulates DNA synthesis of mouse hepatocytes in primary culture and is suppressed by transforming growth factor β and interleukin 6. *Journal of cellular physiology*, 1992, 150: 134-139.
60. Luster MI, Simeonova PP, Gallucci RM, Bruccoleri A, Blazka ME, Yucesoy B, Matheson JM. The Role of Tumor Necrosis Factor α in Chemical- Induced Hepatotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, 919: 214-220.
61. Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby G, Diehl A. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1992, 263: G579-G585.
62. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 2003, 189: 41-54.
63. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American journal of clinical nutrition*, 2000, 72: 637S-646S.
64. Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1997, 1362: 116-127.

65. Yeum K-J, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 430: 97-103.
66. Yu BP. Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties. *Mechanisms of ageing and development*, 1999, 111: 73-87.
67. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *The Journal of pathology*, 2000, 190: 255-266.
68. Kisaoglu A, Borekci B, Yapca OE, Bilen H, Suleyman H. Tissue damage and oxidant/antioxidant balance. *The Eurasian journal of medicine*, 2013, 45: 47.
69. Goulart M, Batoreu M, Rodrigues A, Laires A, Rueff J. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagenesis*, 2005, 20: 311-315.
70. Murray RK, Granner D, Mayes P, Rodwell V. *Harper's illustrated biochemistry*. Baski. Citeseer, 2009.
71. Akbari M, Ostadmohammadi V, Lankarani KB, Tabrizi R, Kolahdooz F, Heydari ST, Kavari SH, Mirhosseini N, Mafi A, Dastorani M. The effects of vitamin D supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress among women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hormone and Metabolic Research*, 2018, 50: 271-279.
72. Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers V, Schafer FQ. A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 41: 1338-1350.
73. McCord J, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *Journal of Biological Chemistry*, 1970, 245: 1374-1377.

74. Mao GD, Thomas P, Lopaschuk G, Poznansky M. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268: 416-420.
75. Messerli FH, Bangalore S, Bavishi C, Rimoldi SF. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in hypertension: to use or not to use? *Journal of the American College of Cardiology*, 2018, 71: 1474-1482.
76. Yeung J. Effect of sulphhydryl drugs on paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. 1988.
77. compendium DCod. Omapatrilat. <http://drugcentral.org/drugcard/1989>.
78. Nawarskas J, Rajan V, Frishman W. Vasopeptidase inhibitors, neutral endopeptidase inhibitors, and dual inhibitors of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase. *Heart disease (Hagerstown, Md.)*, 2001, 3: 378-385.
79. Kostis JB, Packer M, Black HR, Schmieder R, Henry D, Levy E. Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *American journal of hypertension*, 2004, 17: 103-111.
80. Paydaş S In *Yeni antihipertansif ajanlar*, IV. Ulusal Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Kongresi, Antalya, (editör).^(editörler). Antalya, 2002.
81. Bäcklund T, Palojoki E, Grönholm T, Eriksson A, Vuolteenaho O, Laine M, Tikkanen I. Dual inhibition of angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase by omapatrilat in rat in vivo. *Pharmacological research*, 2001, 44: 411-418.
82. Kostis JB, Klapholz M, Delaney MC, Vesterqvist O, Cohen M, Manning Jr JA, Jemal M, Kollia GD, Liao WC. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of omapatrilat in heart failure. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2001, 41: 1280-1290.

83. Prescott L, Matthew H, Todd J. Cysteamine for paracetamol overdose. *The Lancet*, 1974, 303: 998.
84. Güzel IŞ, Kibar AE, Vidinlisan S. Çocuk acil servisine başvuran zehirlenme vakalarının demografik özelliklerinin incelenmesi. *Genel Tıp Dergisi*, 2011, 21: 101-107.
85. Eken A. rat kan ve doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 2017.
86. Atmaca G. Sarımsağın ve tiol içeren bazı bileşiklerin antioksidatif etkileri. *Trakya Üniv Tıp Fak Derg*, 2003, 20: 54-60.
87. Ersoy O. Karaciğer Enzim Yüksekliğinin Değerlendirilmesi. *Ankara Medical Journal*, 2012, 12.
88. Cigremis Y, Turel H, Adiguzel K, Akgoz M, Kart A, Karaman M, Ozen H. 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*, 2009, 323: 31-38.
89. Betto MR, Lazarotto LF, Watanabe TT, Driemeier D, Leite CE, Campos MM. Effects of treatment with enalapril on hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2012, 385: 933-943.
90. Toklu HZ, Şehirli AÖ, Velioğlu-Öğünç A, Çetinel Ş, Şener G. Acetaminophen-induced toxicity is prevented by β -d-glucan treatment in mice. *European journal of pharmacology*, 2006, 543: 133-140.
91. Karcioğlu SS, Palabiyik SS, Bayir Y, Karakus E, Mercantepe T, Halici Z, Albayrak A. The Role of RAAS Inhibition by Aliskiren on Paracetamol- Induced Hepatotoxicity Model in Rats. *Journal of cellular biochemistry*, 2016, 117: 638-646.

92. Archer SL, Peterson D, Nelson DP, DeMaster EG, Kelly B, Eaton JW, Weir EK. Oxygen radicals and antioxidant enzymes alter pulmonary vascular reactivity in the rat lung. *Journal of applied physiology*, 1989, 66: 102-111.
93. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo (Athens, Greece)*, 1999, 13: 295-309.
94. Sarı İ. Angiotensin Reseptör–Neprilisin inhibitorü (ARNİ).



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Zeynep Berna Aksakallı Mağden
Doğum tarihi:	26 Mart 1989
Doğum Yeri:	Erzurum
Medeni Hali:	Evli
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Tel:	0506 845 50 49
Faks:	-
E-mail:	zeyberaks@hotmail.com
Eğitim	
Lise:	Erzurum Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen Lisesi
Lisans:	Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Yüksek lisans:	-
Doktora:	Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Almanca:	-
Rusça:	-
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
İlgi Alanları ve Hobiler	
Edebiyat, Tiyatro, Sinema Seyahat	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof.Dr.Elif ÇADIRCI danışmanlığında sunulan “Farelerde Parasetamolle İndüklenen Akut Karaciğer Hasarına Karşı Omapatrilatın Etkisinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	Tezdeki benzerlik oranın yazınız	4
Genel Bilgiler	Tezdeki benzerlik oranın yazınız	26
Materyal ve Metod	Tezdeki benzerlik oranın yazınız	28
Bulgular	Tezdeki benzerlik oranın yazınız	2
Tartışma	Tezdeki benzerlik oranın yazınız	13

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 07/02/2020

Öğrenci Adı-Soyadı

Zeynep Berna AKSAKALLI MAĞDEN

İmza

Danışman Adı-Soyadı

Prof.Dr.Elif ÇADIRCI

İmza

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1800138830
Konu : HADYEK Kararı.

04.05.2018

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 19.04.2018 tarihli ve 42190979-000-E.1800126822 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 27.04.2018 tarih ve 5 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 108 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmanın yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

TOPLANTI TARİHİ : 27.04.2018

TOPLANTI SAYISI : 5

KARAR NO 108: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Elif ÇADIRCI'nın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Farelerde Parasetamolle İndüklenen Akut Karaciğer Hasarına Karşı Vazopeptidaz/Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü Omapatrilatın Hepatoprotektif Etkisinin Araştırılması" isimli araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 19.04.2018 tarih ve 42190979-000-E.1800126822 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/?birim=veteriner-fakultesi>

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

1 / 2

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
<https://ubys.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=5017F63>

birliği ile kabulüne; (**Yönetmeliğin 8.maddesinin 8/h bendi gereğince, Prof.Dr.Elif ÇADIRCI, görüşmeye katılmadı ve oy kullanmadı**). karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

